

**Charakterisierung bio – und chemosensitiver Schichten mit  
Ellipsometrie und AFM**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von  
Tina Mutschler

The difference between

My little cat

And I

Is

That I

Know

I am going to die.

*Rita Mae Brown, Poems.*

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Oberhammer



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die Möglichkeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe diese Arbeit fertigen zu können und für das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte. Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Allen Kollegen sowohl der Biogruppe als auch der Chemogruppe danke ich für ihr fröhliches und hilfsbereites Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Chem. Goran Markovic, Frau Dipl. Chem. Daniela Dankbar und Herrn Dipl. Biochem. Bernd Moehrle für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der biosensitiven Schichten und vor allem für die vielen interessanten fachlichen und privaten Diskussionen. Frau Dipl. Chem. Maura Kasper und Herrn Dipl. Chem. Stefan Busche danke ich besonders für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Chemoschichten sowie für die vielen interessanten Gespräche und für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Elke Nadler steht ebenfalls mein besonderer Dank zu für die hervorragende Einführung in die Atomkraftmikroskopie und andauernde Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Lutz Scheideler danke ich für die gute Zusammenarbeit beim DFG-Projekt Biofunktionalisierung dentaler Titanimplantate.

All denen, die mir privat zur Seite standen, kann ich gar nicht genug danken.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>7</b>
2.1	Optik .....	7
2.1.1	Beschreibung einer elektromagnetischen Welle .....	7
2.1.2	Brechungsindex .....	7
2.1.2.1	Parametrisierungen der Dispersion .....	9
2.1.2.2	Cauchy Parametrisierung .....	9
2.1.2.3	Effective Medium Approximation (EMA) .....	10
2.1.3	Reflexion und Transmission von Licht .....	11
2.1.4	Polarisation von Licht .....	15
2.2	Ellipsometrie .....	18
2.2.1	Ellipsometrische Definitionen .....	18
2.2.2	Mathematischer Formalismus für die Auswertung in der spektralen Ellipsometrie.....	21
2.3	Atomkraftmikroskopie .....	24
2.3.1	Lennard-Jones-Potential .....	24
2.3.2	Messprinzip .....	25
2.3.3	Abbildungsmethoden des AFM .....	29
2.3.3.1	Kontakt-Modus.....	29
2.3.3.2	Tapping Mode AFM .....	33
2.3.3.3	Nicht-Kontakt-Modus .....	35
2.4	Polymere und ihre Eigenschaften .....	36
2.4.1	Allgemeine Eigenschaften von Polymeren.....	36
2.4.2	Beschreibung der Wechselwirkung von Polymeren mit Analytmolekülen.....	37
2.4.2.1	Kalibrierung.....	40

---

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>41</b>
3.1	Chemikalien und Materialien.....	41
3.2	Geräte .....	43
3.2.1	Ellipsometer .....	43
3.2.2	Gasmischanlage .....	46
3.2.3	Spin-Coater.....	46
3.2.4	Atomkraftmikroskop .....	47
3.2.5	Lichtmikroskop .....	47
3.2.6	Weitere Geräte.....	47
3.3	Reinigung der Substrate .....	47
3.4	Schichtpräparation.....	48
3.4.1	Präparation der Polymerschichten.....	48
3.4.2	Präparation der dentalen Implantatschichten.....	49
3.4.3	Präparation der Bioschichten .....	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
4.1	Mikroporöse Polymere.....	55
4.1.1	Makrolon .....	57
4.1.1.1	Charakterisierung der Schichtpräparation .....	58
4.1.1.2	Charakterisierung der Quelleigenschaften.....	62
4.2	Biosensorische Schichtsysteme .....	68
4.2.1	Charakterisierung der Anbindungsmethoden und der Wechselwirkung biosensitiver Schichtsysteme.....	69
4.2.1.1	Anbindungsmethoden auf SiO <sub>2</sub> .....	69
4.2.1.2	Anbindungsmethoden auf TOPAS.....	87
4.3	Charakterisierung des Schichtaufbaus zur Optimierung einer bioaktiven zahnmedizinischen Beschichtung.....	97

---

4.3.1	Das Substrat .....	99
4.3.2	Die Titan/Titandioxidschicht .....	99
4.3.3	Modifizierung der Schicht zur Biokompatibilität.....	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>
8.1	Publikationsliste .....	121
8.2	Akademische Lehrer .....	123
8.3	Lebenslauf .....	124



## 1 Einleitung und Motivation

In der Chemischen Analytik spielen sensorische Methoden eine immer größere Rolle, vor allem in den Bereichen der Umwelt-, Lebensmittel- und medizinischen Analytik, wobei die gleichen oder sogar bessere Nachweisgrenzen erreicht werden als bei den herkömmlichen Methoden.

Die Probe muss weder gezogen, noch ins Labor befördert, noch aufbereitet werden, somit zeichnen sich die sensorischen Methoden gegenüber den bisherigen analytischen Methoden durch eine verkürzte Analysenzeit aus. Die Analyse wird direkt vor Ort on-line durchgeführt.

In der Sensorik gibt es verschiedene Ansätze innerhalb der Detektionsmethoden sowie bei der Anwendung der sensitiven Materialien.

Bei den Detektionsmethoden unterscheidet man zwischen elektrochemischen, thermischen und optischen Methoden sowie Schwingquarzanwendungen. Optische Methoden beruhen entweder auf Evaneszenzfeldtechniken wie Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), Totale Interne Reflektions Fluoreszenz (TIRF) und Gitterkoppler, oder reflektometrische Methoden wie Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIfS).

Schwingquarze werden als Mikrowaagen genutzt. Die sensitive Schicht, die auf den Schwingquarz aufgebracht ist, nimmt durch

Analytexposition an Masse zu und verändert proportional zur Analytkonzentration die Schwingungsfrequenz des Schwingquarzes.

Das Hauptmerkmal der sensorischen Methoden ist die Verwendung sensitiver Materialien, die eine Wechselwirkung mit dem Analyten eingehen. Diese Wechselwirkungen führen entweder zu einer Änderung der physikalischen Eigenschaften wie Schichtdicke und/oder Brechungsindex der sensitiven Schicht, die mit den optischen Methoden detektiert werden können oder aber zu einer Massenzunahme, wie oben beschrieben. Anschließend kommt es zu einer qualitativen und quantitativen Auswertung der detektierten Signale, wobei es möglich ist, mit einer einzigen sensitiven Schicht mehrere Analyte gleichzeitig nachzuweisen.

In dieser Arbeit wird auf die sensitiven Schichten, die durch optische Methoden detektiert werden, eingegangen. Diese Schichten müssen bestimmte Anforderungen erfüllen.

- **Reversible Sorption:** Die Schichten müssen bei Mehrfachmessungen der gleicher Analytexposition zuverlässig den gleichen Signalhub ergeben.
- **Chemisch inert:** Für eine mehrmalige Anwendung der sensitiven Schichten muss die Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet sein. Die sensitiven Schichten dürfen deshalb nur durch Sorption mit dem Analyten wechselwirken. Geht die sensitive Schicht eine Reaktion mit dem Analyten ein, so wäre der Sorptionsvorgang der nächsten Messung nicht mehr derselbe, da sich die chemische Zusammensetzung der sensitiven Schicht geändert hätte.

- **Photostabilität:** Bei den optischen Detektionsmethoden wird die sensitive Schicht mit Licht bestrahlt. Deshalb muss sie photostabil sein, damit bei der Detektion die sensitive Schicht nicht verändert oder zerstört wird.
- **Transparenz:** Einige optischen Methoden, wie z. B. die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), benötigen transparente Schichten, da durch die sensitive Schicht hindurch gemessen wird.
- **Homogenität:** Inhomogene Schichten führen zu Streuverlusten und somit zu einem geringeren Auflösungsvermögen.
- **Selektivität:** Die sensitive Schicht muss selektiv auf den nachzuweisenden Analyten reagieren, damit eine qualitative und quantitative Detektion möglich ist.

Sensitiven Schichten können Polymerschichten sein, die eine relativ gute Stabilität aber eine eher schlechte Selektivität aufweisen, da bei diesen Polymerschichten die Wechselwirkung nur auf einer Sorption des Analyten in die Polymerschicht basiert und nur der Diffusionskoeffizienten als Selektivitätsmaß von Bedeutung ist (Abb.1). Supramolekulare Polymerschichten gehören ebenfalls zu den sehr stabilen Schichten. Sie haben aber im Vergleich zu den Polymerschichten eine erhöhte Selektivität, da sie eine bestimmte supramolekulare Passform an der Oberfläche besitzen, z.B. durch die Ausbildung von „Kelchen“, an der sich ein Analyt mit einer bestimmten Geometrie besser einpassen kann als andere. Die Selektivität erhöht sich bei den molekular geprägten Polymerschichten, da hier eine ganz

bestimmte Passform auf den Analyten maßgeschneidert wird durch dessen Einlagerung vor der Polymerisierung. Nachdem die Schicht polymerisiert worden ist, wird der Analyt herausgelöst und zurück bleiben Kavitäten mit der genauen Passform des Analyten. Diese Selektivität wird von den sogenannten Biopolymeren übertroffen. Diese Polymere sind mit biologischen Rezeptoren modifiziert und können definierte „Schlüssel-Schloss-Wechselwirkungen“ eingehen, wie z.B. Peptid-Protein-, Antigen-Antikörper- und DNA-DNA-Wechselwirkungen.

Der erste Teil dieser Arbeit geht auf mikroporöse Polymere als größenselektive chemosensitive Polymerschichten ein. Die Präparation und die davon abhängigen Schichteigenschaften sowie die Wechselwirkung mit drei homologen Alkoholen wurden charakterisiert.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit Biopolymeren und deren kovalente Anbindung auf unterschiedliche Substrate.

Um diese Biopolymere charakterisieren zu können, wurden die Polymerschichten vor der kovalenten Anbindung der biologischen Rezeptormoleküle auf ihre Schichteigenschaften untersucht. Auf der Basis der Charakterisierung dieser Polymerschichten wurden folgende biologische Systeme untersucht:

- DNA/PNA-Schichten auf Silizium und deren Hybridisierung
- DNA auf TOPAS-Substrat
- Biotin/Streptavidin auf TOPAS

Der dritte Teil befasst sich mit der Charakterisierung des Schichtaufbaus einer bioaktiven Implantatschicht. Dabei handelt es sich um eine proteinmodifizierte Titandioxidschicht, die in der Zahnmedizin eingesetzt werden soll. Das Ziel der Proteinmodifizierung war die verbesserte Anheftung und Ausbreitung von Zellen *in vivo*.

Charakterisierungsmethode war die Spektrale Ellipsometrie, mit der Brechungsindex und Schichtdicke bestimmt werden können. Ausserdem kam die Atomkraftmikroskopie zur Abbildung von Oberflächentopographien im fast-atomaren Masstab zur Anwendung. Des Weiteren wurden Kontaktwinkelmessungen und lichtmikroskopische Aufnahmen zur Oberflächencharakterisierung durchgeführt.

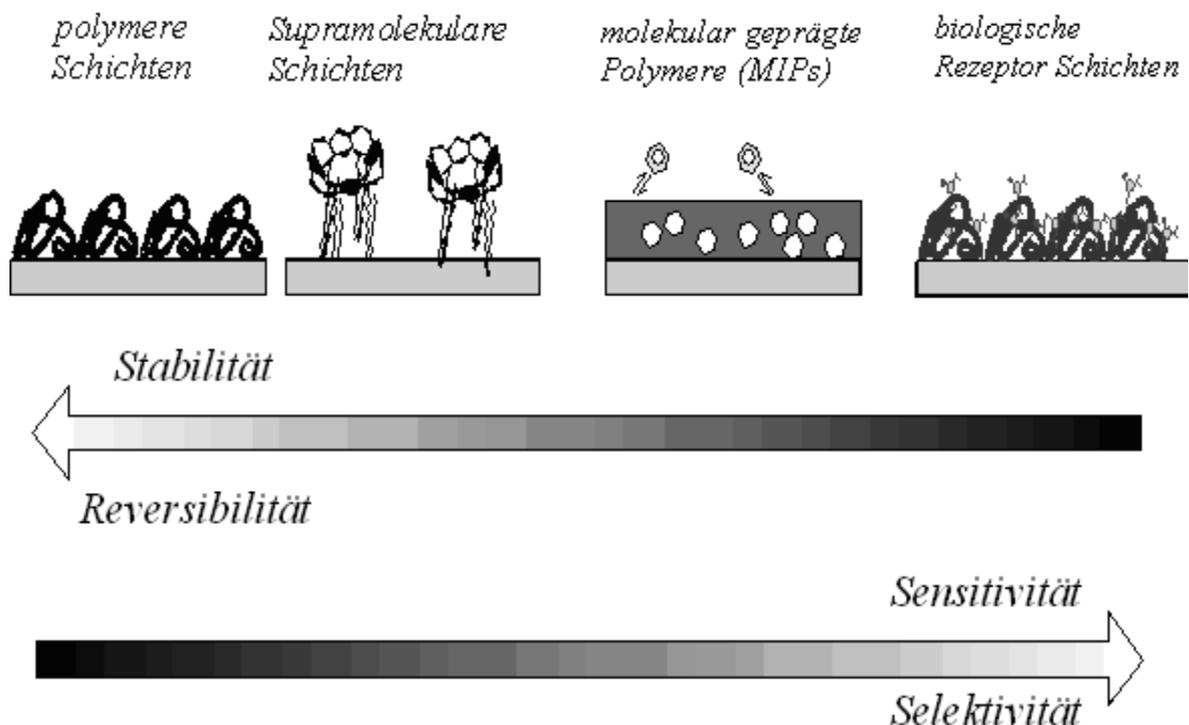


Abb. 1: Wechselwirkungen bestimmen die Eigenschaften sensitiver Schichten.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Optik

#### 2.1.1 Beschreibung einer elektromagnetischen Welle

Licht ist eine elektromagnetische Welle, die sich aus einem elektrischen und einem magnetischen Feldvektor zusammensetzt. Diese sind zueinander und gleichzeitig zur Ausbreitungsrichtung der Welle orthogonal.

Die elektromagnetische Welle kann durch eine Sinus- oder Kosinusfunktion beschrieben werden <sup>[1,2]</sup>:

$$A(x,t) = A_0 \cos[\omega(t - x/c) + \varepsilon]$$

[Gl. 1]

mit  $A_0$ : Amplitude,  $\omega$ : Kreisfrequenz,  $x$ : zurückgelegte Entfernung vom Ausgangspunkt,

$t$ : Zeit,  $c$ : Lichtgeschwindigkeit,  $\varepsilon$ : Phasenversatz.

#### 2.1.2 Brechungsindex

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer elektromagnetischen Welle ist im Vakuum eine universelle Konstante und von der Frequenz der Strahlung unabhängig <sup>[1,2]</sup>.

$$c_0 = \frac{1}{\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}}$$

[Gl. 2]

mit  $c_0$ : Ausbreitungsgeschwindigkeit im Vakuum,  $\mu_0$ : magnetische Feldkonstante des Vakuums,  $\epsilon_0$ : elektrische Feldkonstante des Vakuums.

In allen anderen Medien ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit kleiner als im Vakuum.

$$c = \frac{c_0}{n}$$

[Gl. 3]

mit  $c$ : Ausbreitungsgeschwindigkeit im Medium,  $n$ : Brechungsindex des Mediums.

Der Brechungsindex ist von der Wellenlänge des Lichts und der Temperatur des Mediums abhängig. Dies gilt für alle Medien und muss im gesamten Spektralbereich berücksichtigt werden. Diese Abhängigkeiten werden unter dem Begriff „Dispersion des Brechungsindex“ beschrieben.

Die komplexe Formulierung des Brechungsindex berücksichtigt die Absorption:

$$\bar{n} = n \cdot (1 - ik)$$

[Gl. 4]

Der Imaginärteil des Brechungsindex  $k$  hängt mit dem Absorptionskoeffizienten  $\alpha$  des Mediums nach Lambert-Beer zusammen:

$$\alpha = (4\pi k) / \lambda$$

[Gl. 5]

$k$  ist für nicht absorbierende Stoffe null.

### 2.1.2.1 Parametrisierungen der Dispersion

Durch Parametrisierung wird die Dispersion des Brechungsindex von nicht tabellierten Stoffen auf einfache Weise beschrieben.

Es werden einige Modelle vorgestellt, wobei nicht auf die theoretische Herleitung der Dispersionsgleichungen eingegangen werden soll.

### 2.1.2.2 Cauchy Parametrisierung

Die Cauchy-Parametrisierung ist eine häufig verwendete Parametrisierung für den Verlauf des realen und imaginären Brechungsindex im sichtbaren Bereich.

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad k(\lambda) = D + \frac{E}{\lambda} + \frac{F}{\lambda^3}$$

[Gl. 6]

$n$  = realer,  $k$  = imaginärer Teil des Brechungsindex,  $\lambda$  = Wellenlänge [nm],  $A, B, C, D, E, F$  = Parameter.

Die Cauchy-Parametrisierung wird verwendet bei homogenen Stoffen und versagt bei Metallen und Farbstoffen. Eine ausführliche Behandlung der Cauchy-Parametrisierung findet sich in [3,4].

### 2.1.2.3 Effective Medium Approximation (EMA)

Heterogene Materialien können durch Präparation oder Verunreinigungen Unregelmäßigkeiten in der Zusammensetzung aufweisen. Dies hat Einfluss auf die optischen Konstanten des Materials. Bei der EMA werden die physikalischen Konstanten des heterogenen Materials aus den physikalischen Konstanten der Bestandteile bestimmt. In [5] findet sich eine allgemeine Beschreibung der optischen Konstanten eines Mischmediums. Durch folgende Gleichung wird die allgemeine Form zur Beschreibung der optischen Konstanten eines heterogenen Mischmediums gegeben:

$$\frac{\langle e \rangle - \varepsilon_W}{\langle e \rangle + 2\varepsilon_W} = f_1 \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_W}{\varepsilon_1 + 2\varepsilon_W} + f_2 \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_W}{\varepsilon_2 + 2\varepsilon_W} + f_3 \frac{\varepsilon_3 - \varepsilon_W}{\varepsilon_3 + 2\varepsilon_W} + \dots$$

[Gl. 7]

$\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \dots$  sind die Dielektrizitätskonstanten der im Wirtsmedium  $\varepsilon_W$  eingeschlossenen Komponenten und  $f_1, f_2, f_3, \dots$  die entsprechenden Volumenbrüche, die den Anteil am Gesamtvolumen der Mischung beschreiben.  $\langle e \rangle$  ist die resultierende Dielektrizitätskonstante der Mischung.

Dieser Ansatz kann nur unter den folgenden Voraussetzungen gemacht werden:

- die Einschlüsse in das Wirtsmedium besitzen Kugelform
- bei den Wechselwirkungen zwischen den Medien handelt es sich um Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

Es gibt verschiedene Approximationen, die alle auf Gl. 7 beruhen, jedoch werden für das Wirtsmedium verschiedene Annahmen gemacht:

- Lorentz-Lorenz-Approximation:  $\varepsilon_W = 1$ : Mit dieser Approximation werden punktförmige, polarisierbare Medien beschrieben, die sich im Vakuum befinden.
- Maxwell-Garnett-Approximation:  $\varepsilon_1 = \varepsilon_W$ : Hier werden makroskopische, dielektrische Einschlüsse in einem Dielektrikum beschrieben
- Bruggemann-Medien-Approximation <sup>[6]</sup>:  $\langle e \rangle = \varepsilon_W$ : Ansatz hier ist eine ungeordnete Form von Kugelaggregaten. Es ist ein selbstkonsistenter Ansatz, bei dem  $f_1 = f_2$  erfüllt sein muss.

Die am häufigsten verwendete Approximation ist die nach Bruggemann. Sie wird häufig als Modell für organische Schichten verwendet.

### 2.1.3 Reflexion und Transmission von Licht

Wenn Licht von einem Medium in ein anderes tritt, so kann es zu Reflexion, Transmission und Absorption kommen <sup>[1,2,7,8]</sup>.

Trifft ein Lichtstrahl von einer Phase mit dem Brechungsindex  $n_1$  auf die Grenze zu einer Phase mit dem Brechungsindex  $n_2$ , so wird ein Teil des Lichts transmittiert, der Rest wird reflektiert.

Für die Transmission gilt das Brechungsgesetz von Snellius:

$$n_1 \sin \Phi_1 = n_2 \sin \Phi_2$$

[Gl. 8]

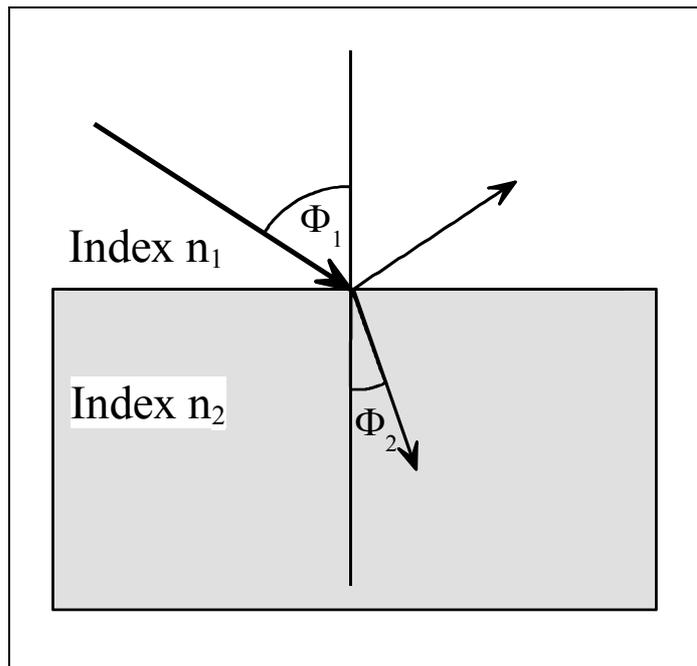


Abb. 2: Reflexion und Transmission an einer Oberfläche mit  $n_1 < n_2$ .

Für die Reflexion gilt allgemein das Reflexionsgesetz „Einfallswinkel = Ausfallswinkel“. Die Reflektivität des Mediums wird durch die Fresnelkoeffizienten beschrieben:

$$r_{12}^p = \frac{\bar{n}_2 \cos \Phi_1 - \bar{n}_1 \cos \Phi_2}{n_2 \cos \Phi_1 + n_1 \cos \Phi_2} \quad r_{12}^s = \frac{\bar{n}_1 \cos \Phi_1 - \bar{n}_2 \cos \Phi_2}{n_1 \cos \Phi_1 + n_2 \cos \Phi_2}$$

[Gl. 9]

mit  $r$ : Fresnelscher Reflexionskoeffizient, 12 steht für den Übergang von Phase 1 nach Phase 2,  $p$  bedeutet parallel und  $s$  senkrecht zur

Einfallsebene polarisierter Lichtstrahl,  $\Phi_1$  ist der Winkel des reflektierten,  $\Phi_2$  der Winkel des gebrochenen Lichtstrahls bezüglich der Flächennormalen.

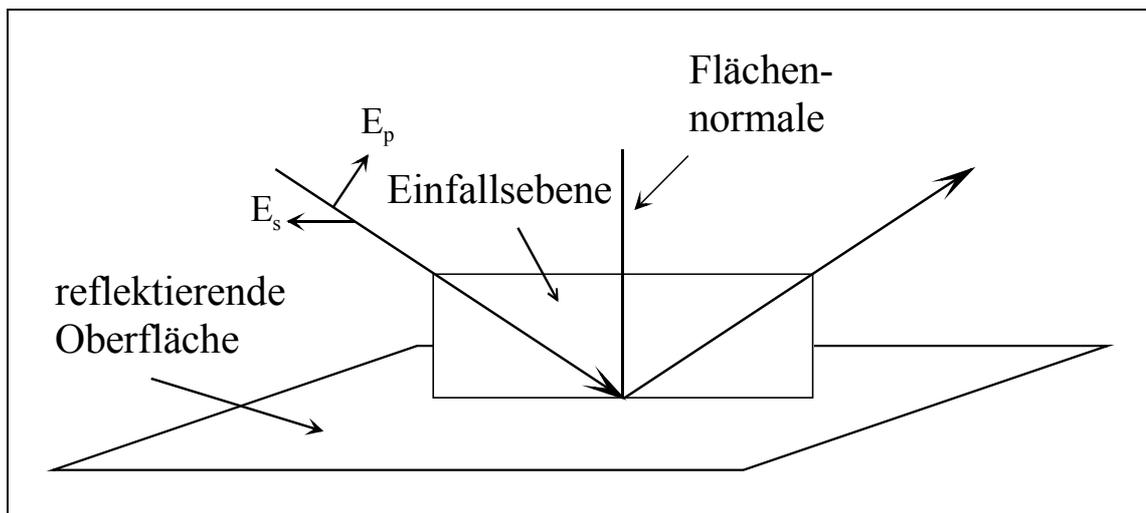


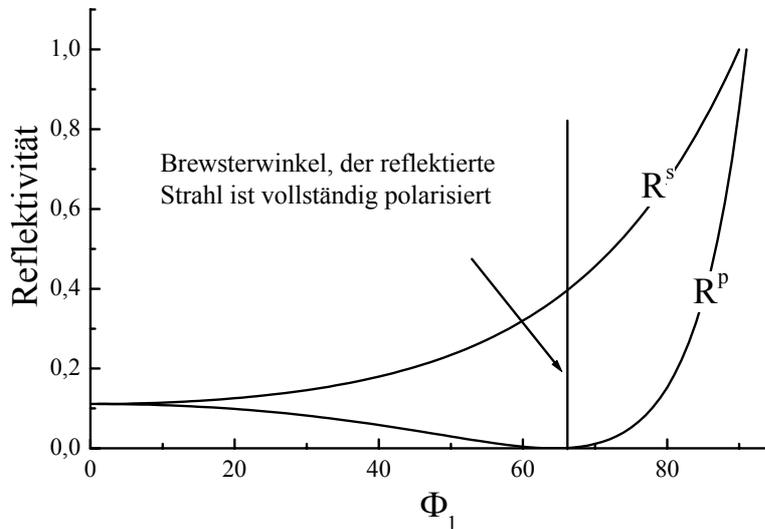
Abb. 3: Koordinatensystem für die Reflexion eines Lichtstrahls an einer Oberfläche.

Die Reflektivität ergibt sich zu:

$$R_p = |r_{12}^p|^2 \quad \text{und} \quad R_s = |r_{12}^s|^2$$

[Gl. 10]

Sie ist von dem Einfallswinkel und der Polarisation abhängig.



*Abb. 4: Abhängigkeit der Reflektivität von der Polarisierung und vom Einfallswinkel beim Übergang von einem Medium mit  $n_1 = 1,0$  nach  $n_2 = 2,0$ .*

Bei Schichtsystemen muss Mehrfachreflexion berücksichtigt werden<sup>[2,9]</sup>. Für die Reflexion an einem 3-Schichtsystem ergibt sich der Ausdruck:

$$R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-i \cdot 2\beta)}{1 + r_{12}^p \cdot r_{23}^p \exp(-i \cdot 2\beta)} \quad R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-i \cdot 2\beta)}{1 + r_{12}^s \cdot r_{23}^s \exp(-i \cdot 2\beta)}$$

[Gl. 11]

Der gebrochene Lichtstrahl erfährt beim Durchdringen des Films eine Phasenveränderung, die als Phasentiefe  $\beta$  bezeichnet wird:

$$\beta = 2\pi \left( \frac{d}{\lambda} \right) n_2 \cos \Phi_2$$

[Gl. 12]

mit  $d$ : physikalische Filmdicke,  $\bar{n}_2$ : komplexer Brechungsindex des Films,  $\Phi_2$ : siehe oben.

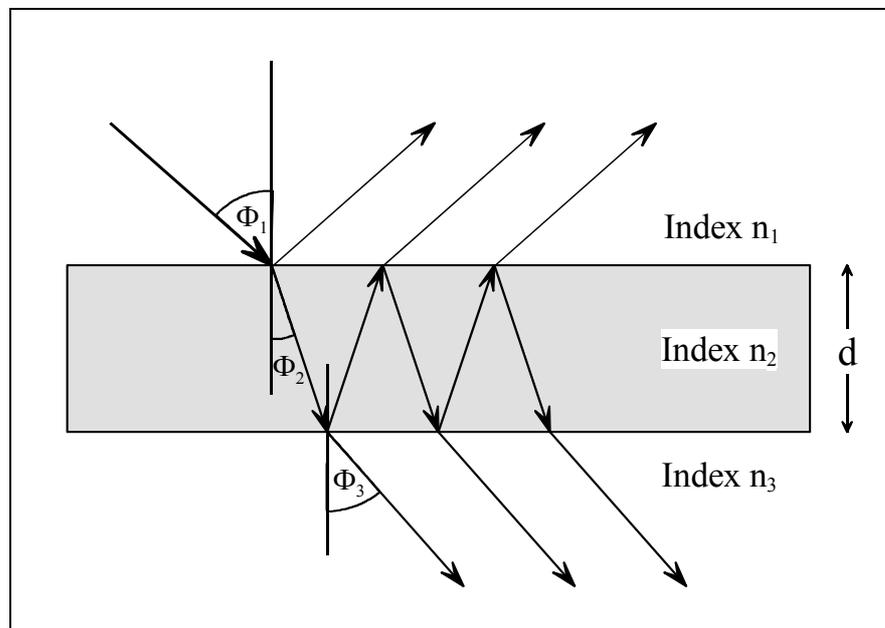


Abb. 5: Reflexion und Transmission an einem System mit einer Schicht mit  $n_1 < n_2 < n_3$ .

#### 2.1.4 Polarisation von Licht

Die Polarisation des Lichts wird durch die Schwingungsebene des E-Feldvektors bestimmt. Kommt im zeitlichen Mittel jede Schwingungsebene zu gleichen Teilen vor, so ist das Licht unpolarisiert.

Man kann beliebige Polarisationszustände als Superposition von zwei zueinander senkrechten, linear polarisierten Wellen beschreiben [1,10,11].

$$E = E_x + E_y$$

[Gl. 13]

Die Beschreibung der elektrischen Felder der beiden Polarisationszustände erfolgt mit:

$$E_x = \mathbf{e}_x E_{0x} e^{(i\omega t - ikz)}$$

[Gl. 14]

$$E_y = \mathbf{e}_y E_{0y} e^{(i\omega t - ikz + i\phi)}$$

[Gl. 15]

$E_{0x}$  und  $E_{0y}$  sind die Schwingungsamplituden der E-Feld-Vektoren,  $\mathbf{e}_x$  und  $\mathbf{e}_y$  die Einheitsvektoren in x- und y- Richtung. Die Wellen breiten sich in z-Richtung mit  $k$  als Wellenzahl und der Phasenverschiebung  $\phi$  zwischen den beiden Polarisationszuständen aus.

Dabei gibt es für den resultierenden Polarisationszustand bei Superposition beider Wellen verschiedene Möglichkeiten.

Man erhält linear polarisiertes Licht, wenn die Phasenverschiebung  $\phi = m\pi$  beträgt, wenn  $m$  nur ganzzahlige Werte annimmt. Der elektrische Feldvektor schwingt dann in einer Richtung orthogonal zur Ausbreitungsrichtung.

Allgemein erhält man linear polarisiertes Licht, wenn man zwei linear polarisierte Wellen gleicher Wellenlänge in Phase kombiniert.

Von zirkular polarisiertem Licht spricht man, wenn die Amplituden gleich groß sind,  $E_{0x} = E_{0y}$ , und der Phasenunterschied  $\phi = (2m + 1)\pi/2$  beträgt. Projiziert man den resultierenden Feldvektor auf eine Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, so beschreibt  $E$  eine Kreisbahn.

Bei elliptisch polarisiertem Licht sind die Amplituden nicht mehr gleich groß,  $E_{0x} \neq E_{0y}$ , und die Phasenverschiebung  $\phi$  kann beliebige Werte annehmen. Projiziert man den resultierenden Feldvektor wiederum auf

eine zur Ausbreitungsrichtung senkrechte Ebene, so beschreibt  $E$  eine elliptische Bahn.

Zirkular und linear polarisiertes Licht sind also Spezialfälle von elliptisch polarisiertem Licht. Die mathematische Beschreibung erfolgt über Jones- und Mueller-Matrizen.

Durch Reflexion kann aus linear polarisiertem Licht elliptisch polarisiertes entstehen. Durch die Reflexion ändern beide Komponenten (parallel und orthogonal zur Einstrahlungsebene) ihre Phase. Die Änderung der Phase ist im Allgemeinen für beide Komponenten unterschiedlich und dadurch kommt es zur elliptischen Polarisation. Die Verschiebung der Phase hängt unter anderem von den optischen Eigenschaften des Substrates, wie auch von der Dicke und den optischen Eigenschaften der darüber liegenden Schicht ab.

Polarisation	$E$ -Vektor	Phase, $m \in \mathbb{N}_0$
linear	Beliebig	$\Phi = m \cdot \pi$
zirkular	$E_{0x} = E_{0y}$	$\Phi = (2m+1) \cdot \pi/2$
elliptisch	$E_{0x} \neq E_{0y} \neq 0$	$\Phi \neq m \cdot \pi$
	$E_{0x} = E_{0y} \neq 0$	$\Phi \neq (2m+1) \cdot \pi/2 \neq m \cdot \pi$

*Tab. 1: Mögliche Polarisationszustände durch Linearkombination zweier orthogonaler Teilstrahlen.*

## 2.2 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein optisches Verfahren zur zerstörungsfreien Untersuchung von Oberflächen und dünnen organischen und anorganischen Schichten. Grundlage des Verfahrens ist die Änderung des Polarisationszustandes des eingestrahlichten Lichtes mit der optischen Schichtdicke bei Reflexion an einer Oberfläche. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Polarisationszustände gemessen werden, wodurch diese Methode unempfindlich gegenüber Intensitätsschwankungen der Lichtquelle ist.

Ellipsometrie wird in der Grundlagenforschung wie auch in der Qualitätssicherung, z. B. in der Halbleiterindustrie, angewandt.

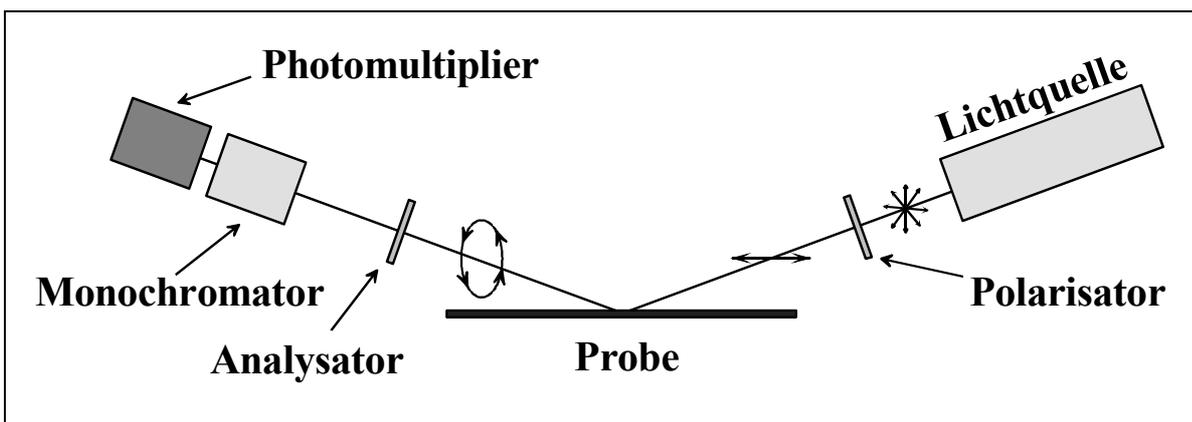


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Spektraellipsometers.

### 2.2.1 Ellipsometrische Definitionen

Die Ellipsometrie <sup>[4,10]</sup> ist ein Messverfahren, bei dem die Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei Reflexion an einer Oberfläche oder an einem Schichtsystem gemessen wird. Die ermittelten ellipsometrischen Winkel stehen dabei in Zusammenhang

mit dem Phasenversatz der s- und p-polarisierten Teilstrahlen. Hierbei wird die Differenz  $\Delta$  des Gangunterschiedes  $\delta = \phi_p - \phi_s$  der parallel und senkrecht polarisierten Teilstrahlen vor ( $\delta_1 = \phi_{1p} - \phi_{1s}$ ) und nach ( $\delta_2 = \phi_{2p} - \phi_{2s}$ ) der Reflexion bestimmt.

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2$$

[Gl. 16]

Lässt man die Phasenbeziehung außer Acht, so kann man die Änderung der Amplitude bei der Reflexion gemäß (Gl. 11) formulieren. Das Betragsverhältnis ist:

$$\tan \Psi = \frac{|R_p|}{|R_s|}.$$

[Gl. 17]

$\Psi$  kann Werte von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  annehmen.

Das Verhältnis der Fresnelkoeffizienten ist eine komplexe Größe:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s}$$

[Gl. 18]

Durch Einsetzen in (Gl. 17) erhält man:

$$\rho = \tan \Psi \cdot e^{i\Delta} \quad \text{oder} \quad \tan \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s}$$

[Gl. 19]

Gleichung (Gl. 19) wird auch als „fundamentale Gleichung der Ellipsometrie“<sup>[10]</sup> bezeichnet. Mit ihr lassen sich durch Einsetzen von

Gleichung (Gl. 11) aus den ermittelten  $\Delta$  und  $\Psi$ -Werten Schichtdicke und Brechungsindex bestimmen.

Durch eine ellipsometrische Messung bei einer Wellenlänge und einem Winkel können maximal zwei unbekannte Größen ermittelt werden. Ist die Anzahl der unbekannt Parameter  $> 2$ , so müssen entsprechend mehr  $\Delta - \Psi$  - Werte für die Berechnung herangezogen werden. Es stehen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl:

- es wird mit monochromatischer Lichtquelle unter mehreren Einfallswinkeln gemessen (*variable angle ellipsometry, VAE*)
- bei einem festen Einfallswinkel wird spektroskopisch gemessen (*spectroscopic ellipsometry, SE*)
- sowohl Winkel und Wellenlänge werden variiert (*variable angle spectroscopic ellipsometry, VASE*)

Die Datenauswertung erfolgt in diesen Fällen über eine nichtlineare Regression<sup>[12]</sup>.

### 2.2.2 Mathematischer Formalismus für die Auswertung in der spektralen Ellipsometrie

Da Licht eine elektromagnetische, transversale Welle ist, kann der Polarisationszustand durch die Joneschen Vektoren beschrieben werden <sup>[1]</sup>. Für die elektrische Feldstärke gilt

$$E = \begin{bmatrix} E_x(t) \\ E_y(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_{0x}e^{i\varphi_x} \\ E_{0y}e^{i\varphi_y} \end{bmatrix}$$

[Gl. 20]

mit den in x- und y- Richtung polarisierten Feldstärkekomponenten  $E_x(t)$  und  $E_y(t)$ . Das senkrecht (s) und parallel (p) zur Einfallsebene polarisierte Licht wird beschrieben über:

$$E_p = \begin{bmatrix} E_{0x}e^{i\varphi_x} \\ 0 \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad E_s = \begin{bmatrix} 0 \\ E_{0y}e^{i\varphi_y} \end{bmatrix}$$

[Gl. 21]

beschrieben. Die Reflexion eines Lichtstrahls an einer ebenen, nicht streuenden Fläche wird durch die Multiplikation des Joneschen Vektors mit einer die Probe charakterisierenden Jones-Matrix beschrieben<sup>[14]</sup>:

$$\begin{bmatrix} E_{xr} \\ E_{yr} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_p & 0 \\ 0 & r_s \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} E_{0x}e^{i\varphi_x} \\ E_{0y}e^{i\varphi_y} \end{bmatrix}.$$

[Gl. 22]

Dabei sind  $r_p$  und  $r_s$  die Fresnelkoeffizienten der Probe für parallel bzw. senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht. Die Polarisatoren und ihre Drehung werden ebenfalls durch Jones-Matrizen beschrieben.

$$\begin{pmatrix} E_{dp} \\ E_{ds} \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos A & \sin A \\ -\sin A & \cos A \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_p & 0 \\ 0 & r_s \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos P & -\sin P \\ \sin P & \cos P \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{pmatrix} E_p \\ E_s \end{pmatrix}$$

Detektor    Analysator    Drehung    Analysator    Probe    Drehung    Polarisator    Lichtquelle

[Gl. 23]

Nach der Reflexion an der Probe ist der vorher linear polarisierte Lichtstrahl im Allgemeinen elliptisch polarisiert. Durch Rotation des Polarisators ( $P$ ) werden die Halbachsen der Ellipse bestimmt. Da die Fresnelkoeffizienten für parallel und senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht unterschiedlich sind, erhält man aufgrund der Drehung des Polarisators eine sinusförmige Modulation der Signalintensität.

$$I = I_0 \cdot (\alpha \cos 2P + \beta \sin 2P + 1)$$

[Gl. 24]

$P$  ist die Stellung des Polarisators,  $I$  = Signalintensität,  $I_0$  = Intensität der Lampe. Die Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  werden aus den Integralen S1, S2, S3 und S4 über die Intensitätsverteilung ermittelt.

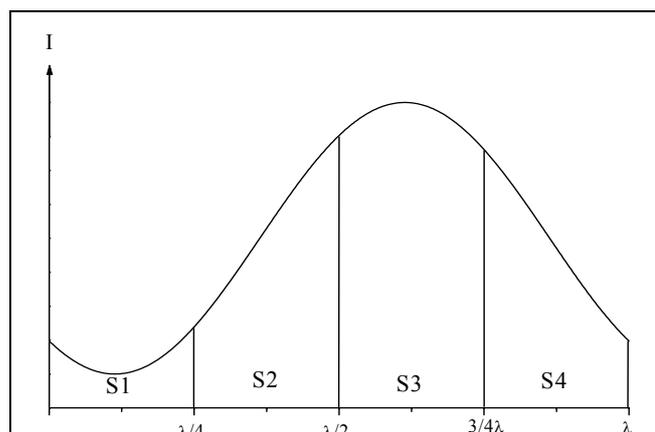


Abb. 7: Sinusförmige Signalintensität nach der Reflexion an der Probe.

Für die Integrale ergeben sich

$$\begin{aligned}
 S_1 &= \int_0^{\pi/4} I(P) dP = \frac{I_0}{2} (\alpha + \beta + \pi/2) \\
 S_2 &= \int_{\pi/4}^{\pi/2} I(P) dP = \frac{I_0}{2} (-\alpha + \beta + \pi/2) \\
 S_3 &= \int_{\pi/2}^{3\pi/4} I(P) dP = \frac{I_0}{2} (-\alpha - \beta + \pi/2) \\
 S_4 &= \int_{3\pi/4}^{\pi} I(P) dP = \frac{I_0}{2} (\alpha - \beta + \pi/2) \quad .
 \end{aligned}$$

[Gl. 25]

Aus den Integralen lassen sich nun die Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  bestimmen.

$$\alpha = \frac{1}{2I_0} (S_1 - S_2 - S_3 + S_4)$$

$$\beta = \frac{1}{2I_0} (S_1 + S_2 - S_3 - S_4)$$

$$I_0 = \frac{1}{\pi} (S_1 + S_2 + S_3 + S_4)$$

[Gl. 26]

Mit ihnen kann man  $\tan \Psi$  und  $\cos \Delta$  errechnen. Es gilt:

$$\alpha = \frac{\tan^2 \Psi - \tan^2 A}{\tan^2 \Psi + \tan^2 A}$$

[Gl. 27]

$$\beta = 2 \cos \Delta \cdot \frac{\tan \Psi \cdot \tan A}{\tan^2 \Psi + \tan^2 A}$$

[Gl. 28]

Nach Umformen erhält man

$$\tan \Psi = \sqrt{\frac{1+\alpha}{1-\alpha}} \tan A$$

[Gl. 29]

und

$$\cos \Delta = \frac{\beta}{\sqrt{1-\alpha^2}}.$$

[Gl. 30]

## 2.3 Atomkraftmikroskopie

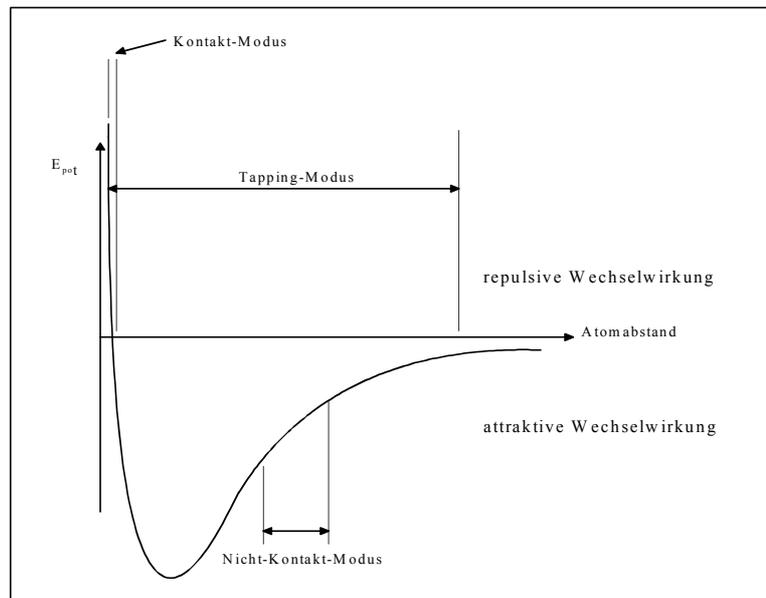
### 2.3.1 Lennard-Jones-Potential

Bei der Annäherung zweier Teilchen wirken zuerst Attraktionskräfte, die sich proportional zu  $(r^{-6})$  verhalten. Bringt man die Teilchen einander sehr nahe, so beginnen die Abstoßungskräfte der Kerne und der Elektronen sowie die zunehmende kinetische Energie der Elektronen die Anziehungskräfte zu überwiegen. Mit kleiner werdendem Abstand nehmen die Abstoßungskräfte sehr schnell zu. Oft findet man eine Abhängigkeit der Abstoßungskraft von  $(r^{-12})$ . Addiert man die abstoßende und anziehende Wechselwirkung, so erhält man das Lennard-Jones-Potential<sup>[13]</sup>:

$$E_{\text{pot}}(r) = 4E_e \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

[Gl. 31]

mit  $E_{\text{pot}}$ : wirkendes Lennard-Jones-Potential in Abhängigkeit vom Abstand  $r$ ,  $E_e$ : Energie im Gleichgewicht,  $\sigma$ : Teilchendurchmesser.



*Abb. 8: Lennard-Jones-Potential.*

### 2.3.2 Messprinzip

Die Atomkraftmikroskopie<sup>[15,16,17]</sup> ist eine Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie. Bei der Rastertunnelmikroskopie wird der extrem abstandsempfindliche Tunnelstrom zwischen einer feinen Spitze und der Probenoberfläche, die elektrisch leitfähig sein muss, gemessen.

Bei der Atomkraftmikroskopie wird die Kraft gemessen, die zwischen einer scharfen Spitze und der Probenoberfläche herrscht. Die Spitze ist am Ende eines beweglichen Cantilevers lokalisiert, und die Kraft zwischen Spitze und Probenoberfläche führt zu einer Verbiegung des Cantilevers, welche detektiert wird. Es werden im Wesentlichen zwei verschiedene Cantilevergeometrien verwendet. Man unterscheidet zwischen balkenförmigen und V-förmigen Cantilevern. V-förmige Cantilever besitzen den Vorteil, dass sie gegenüber lateralen Torsionskräften wesentlich stabiler sind als die balkenförmigen. Der Cantilever ist direkt mit einem Substrat verbunden, das in eine

Halterung eingesetzt wird, welche über elektrische Kontakte mit einem Piezoelement gekoppelt ist. Über dieses Piezoelement wird, angetrieben von einem Frequenzgenerator, beim Arbeiten im Tapping-Modus (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) sowohl der Cantilverhalter als auch der Cantilever selbst zur Schwingung angeregt. Das zur Schwingungsanregung benutzte Piezoelement ist direkt mit dem z-Piezoelement gekoppelt, welches die Auslenkung der AFM-Spitze in vertikaler Richtung steuert. Daran schließt sich der eigentliche Scanner an, eine Piezokeramik, die für das Rastern in x-y-Richtung verantwortlich ist.

Die durch die Wechselwirkung der Spitze mit der Probenoberfläche verursachte Verbiegung des Cantilevers kann durch eine optische Methode detektiert werden. Dabei wird ein fein fokussierter Laserstrahl auf der Rückseite des Cantilevers reflektiert und gelangt über einen oder mehrere Ablenkspiegel in einen Photodetektor. Dieser ist, je nach Gerät, in 2 oder 4 Segmente unterteilt. Im Detektor wird die Lichtintensität in den einzelnen Segmenten verglichen, was für die jeweilige Cantilverbiegung zu einem ganz bestimmten Ausgangssignal führt. Mit den in den neuen Geräten verwendeten viergeteilten Photodioden kann sowohl die vertikale als auch die horizontale Verbiegung des Cantilevers gemessen werden, so dass neben den Normalkräften auch laterale Reibungskräfte gemessen werden können.

Mit dem Ausgang des Photodetektors ist eine Feedbackschleife verbunden, die über die Kontrollelektronik während des Rasterns das z-Piezoelement in der Höhe nachregelt.

Allgemein gilt für alle Abbildungsmodi des AFM, dass die Spitze durch das x,y-Piezoelement Zeile für Zeile über das zu untersuchende Objekt gerastert und dabei über die Feedbackschleife das z-Piezoelement so nachgeregelt wird, dass das vorgegebene Detektorsignal (Setpoint) konstant bleibt. Das Setpoint-Signal entspricht einem festen Abstand zwischen z-Piezoelement und Probenoberfläche, so dass man durch Auftragen der absoluten z-Position des Piezoelementes entlang der Rasterrichtung ein dreidimensionales Bild der Oberflächentopographie erhält.

Im idealen Fall, dass eine Wechselwirkung nur zwischen dem vordersten Atom der Spitze und einem Oberflächenatom der Probe besteht, kann dies durch ein Lennard-Jones-Potential beschrieben werden. Die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte sind demnach proportional zu  $r^{-6}$  und die auf dem Pauli-Prinzip beruhenden repulsiven Kräfte proportional zu  $r^{-12}$ . Die Kraft, vor allem im repulsiven Bereich, ist also eine sehr empfindliche Abstandssonde und erlaubt die Detektion von Höhenunterschieden bis in den Sub-Picometer-Bereich.

Es muss jedoch betont werden, dass ein Lennard-Jones-Potential nur einen idealisierten Fall darstellt. In der Realität finden Wechselwirkungen zwischen vielen Atomen der Spitze und der Probenoberfläche statt. Dadurch kann sich der Potentialverlauf für die weitreichenden attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen bei verschiedenen Wechselwirkungsgeometrien erheblich ändern. Mit der einfachsten Annahme, dass die einzelnen Wechselwirkungsenergien zwischen zwei Atomen in zwei makroskopischen Körpern unabhängig voneinander sind und sich diese Paarpotentiale additiv zum gesamten Wechselwirkungspotential zusammensetzen (Hamaker-Näherung),

ergibt sich für die Wechselwirkungsenergie zwischen einem Atom und einer planaren Oberfläche ein Van-der-Waals-Term  $E_{\text{pot}} \sim 1/r^3$ . Für die Wechselwirkungsgeometrie zwischen einer Kugel und einer planaren Oberfläche ergibt sich theoretisch ein attraktiver Potentialterm  $E_{\text{pot}} \sim 1/r$ .

Ferner dürfen weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Oberflächen, wie sie oft in Flüssigkeiten auftreten, und kurzreichende Solvationskräfte nicht unberücksichtigt bleiben.

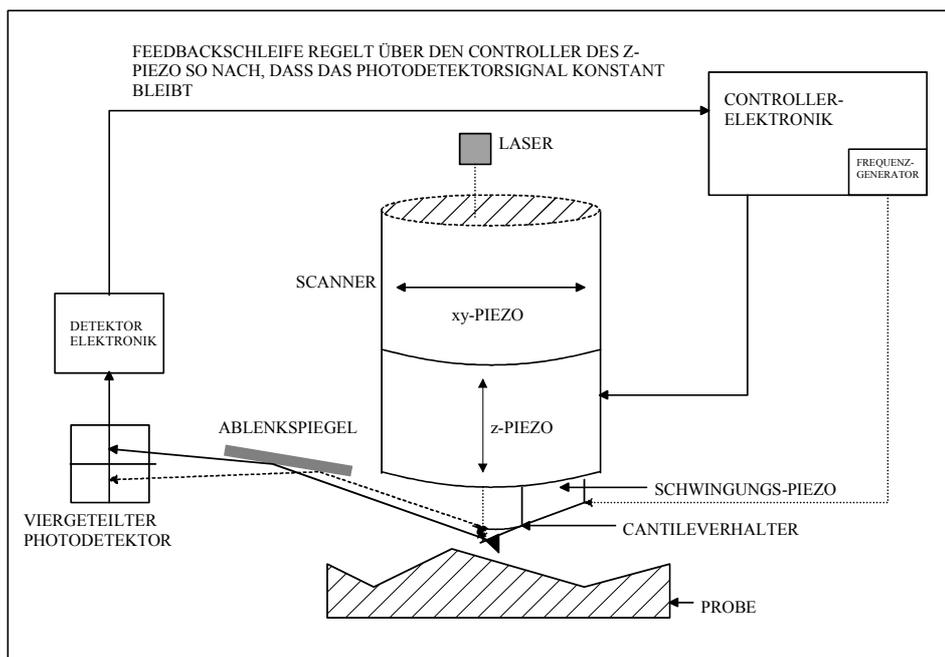


Abb. 9: Funktionsprinzip eines Atomkraftmikroskops.

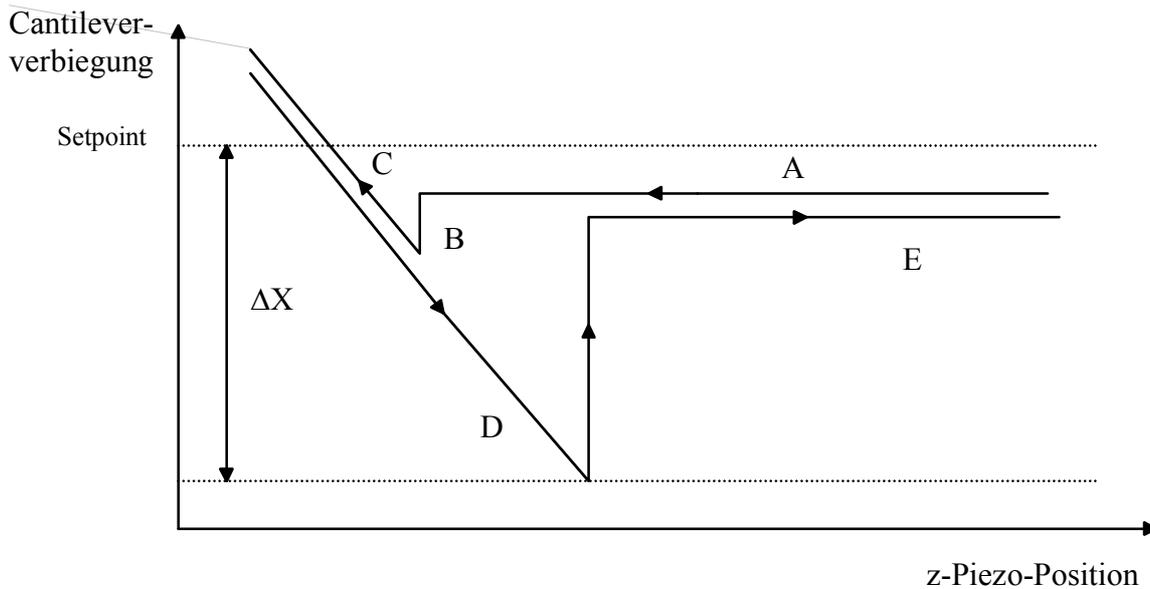
### 2.3.3 Abbildungsmethoden des AFM

#### 2.3.3.1 Kontakt-Modus

Im Kontakt-Modus wird die AFM Spitze in physikalischen Kontakt mit der Oberfläche gebracht, bis die Cantileververbiegung den vorgegebenen Setpoint-Wert erreicht hat, d.h. bis eine bestimmte Kraft zwischen Oberfläche und Spitze wirkt. Die vertikale Cantileververbiegung wird im Photodetektor aus den Lichtintensitäten in den einzelnen Segmenten bestimmt.

Beim Rastern über die Probenoberfläche verändert sich aufgrund von Topographieunterschieden die Verbiegung des Cantilevers. Beim Arbeiten im sogenannten Constant-Force-Modus werden diese Abweichungen vom Setpoint durch Höhenänderungen des z-Piezoelements, das über die Regelschleife gesteuert wird, wieder ausgeglichen, so dass bei annähernd konstanter Kraft abgebildet wird. Im Constant-Force-Modus wird die Rastergeschwindigkeit durch die Zeit, die von der Regelschleife benötigt wird, um reagieren zu können, eingeschränkt, aber die Kraft zwischen Spitze und Probenoberfläche kann gut kontrolliert werden. Es ist auch möglich, die Regelschleife auszuschalten und bei konstanter Höhe des z-Piezoelements abzubilden (Constant-Height-Modus), wobei dann direkt die Cantileververbiegung in Abhängigkeit der x,y-Position aufgetragen wird. Dies kann aber bei harten und sehr rauen Proben zum Abbrechen der Spitze führen. Von großem Nachteil ist dieser Modus aber besonders bei Abbildungen von weichen Proben, die durch die dauernde Änderung der momentanen Auflagekraft stark deformiert oder sogar zerstört werden können. Der Constant-Height-Modus wird oft verwendet, um Abbildungen im atomaren Maßstab von atomar glatten Oberflächen zu erhalten, da dabei wegen der horizontalen Drift

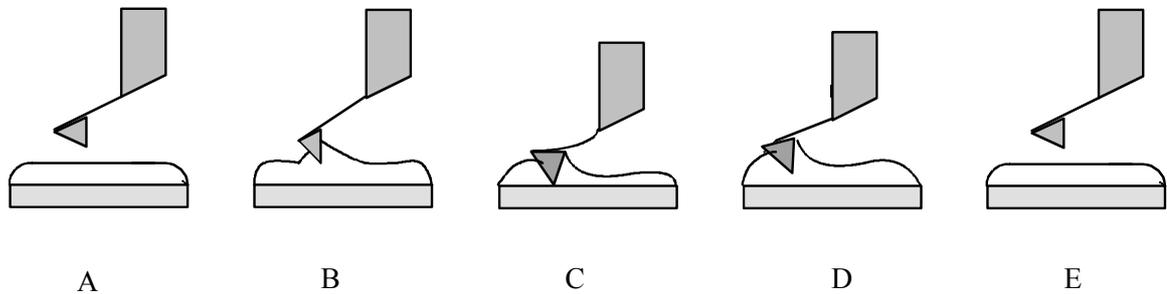
des Systems mit sehr hohen Rastergeschwindigkeiten gearbeitet werden muss. Die Änderung der Cantilverbiegung und somit die Variation der Auflagekraft bleibt bei solchen Proben sehr klein.



*Abb. 10: Typische Kraft-Abstandskurve an Luft auf einer harten Oberfläche.*

Die vertikale Auflagekraft kann anhand von Kraft-Abstandskurven bestimmt werden. Kraft-Abstands-Kurven erhält man durch Auftragen der Cantilverbiegung gegen die z-Piezo-Position während die AFM-Spitze sukzessive auf die Oberfläche zubewegt und wieder von ihr weggezogen wird. Im realen Experiment sehen die Kraft-Abstandskurven oft sehr komplex aus und sind stark vom untersuchten System abhängig. Die hier diskutierte Kurve in Abbildung 10 stellt eine Vereinfachung der realen Kurven dar, zeigt aber trotzdem den charakteristischen Verlauf, wie er für das Arbeiten in Luft typisch ist. In Abbildung 11 ist die Wechselwirkung zwischen Spitze

und Probenoberfläche an den in Abbildung 10 markierten Stellen nochmals verdeutlicht.



*Abb. 11: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Oberfläche an Luft.*

An Luft ist die Probenoberfläche immer durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm belegt, der je nach Luftfeuchtigkeit in seiner Dicke stark variieren kann. Dies ist verantwortlich für den Verlauf der Kraft-Abstands-Kurve: An Punkt A ist die Spitze noch weit weg von der Oberfläche und das detektierte Signal in der Photodiode entspricht der Verbiegung des freien Cantilevers. Solange sich das z-Piezoelement der Oberfläche annähert bleibt die Cantileververbiegung bis zum Punkt B konstant. An diesem Punkt ist die Spitze der Oberfläche so nahe gekommen, dass sich zwischen ihr und der Oberfläche ein Wassermeniskus ausbilden kann, was zu einer stark attraktiven Kapillarkraft führt welche die Spitze mit der Oberfläche in Kontakt bringt und den Cantilever nach unten verbiegt (jump to contact). Bei weiterem Annähern des z-Piezoelementes wird der Cantilever annähernd linear nach oben verbogen (Bereich C). Die Nettokraft in diesem Bereich ist repulsiv. Nach maximaler Auslenkung des Piezoelementes wird die Spitze wieder zurückgezogen, wobei im

repulsiven Bereich, abgesehen von einer eventuellen Piezo-Hysterese, die Verbiegung den gleichen Verlauf zeigt wie beim Annähern. Im Bereich D zeigt die Kurve beim Zurückziehen allerdings einen ganz anderen Verlauf. Während das z-Piezoelement immer weiter von der Probenoberfläche wegfährt, halten die starken Kapillarkräfte die Spitze in Kontakt mit der Probe und der Cantilever wird stark in Richtung der Oberfläche verbogen. In diesem Bereich ist die Nettokraft attraktiv. Wenn die Kapillarkräfte gerade von der Rückstellkraft des Cantilevers kompensiert werden springt die Spitze von der Oberfläche weg (pull off). Bei weiterem Wegziehen bleibt die Cantileververbiegung konstant und entspricht wieder der Verbiegung des freien Cantilevers (Bereich E). Solange die Spitze mit der Oberfläche in Kontakt ist bleibt die Kapillarkraft annähernd konstant, da sich der Abstand der Spitze von der Probenoberfläche in diesem Bereich nicht ändert. Die Gesamtkraft, die während des Rasterns im Kontakt-Modus auf die Probe ausgeübt wird, setzt sich additiv aus einer konstanten Kapillarkraft und der Kraft, die durch die Verbiegung des Cantilevers entsteht, zusammen. Die Auflagekraft  $F$  lässt sich demnach über das Hooksche Gesetz folgendermaßen berechnen:

$$F = k\Delta x$$

[Gl. 32]

wobei  $k$  die Federkonstante des Cantilevers, und  $\Delta x$  die Differenz der Verbiegung zwischen dem Setpoint und dem pull-off ist.

Der Kontakt-Modus ist die einzige AFM-Technik mit der man „atomare Auflösung“ erreichen kann. Ein großer Vorteil dieses Modus ist die Möglichkeit, mit relativ hohen Rastergeschwindigkeiten arbeiten zu

können. Außerdem werden sehr raue Proben mit extremen Änderungen in der Topographie im Kontakt-Modus am besten abgebildet.

Außer den oben genannten Kapillar- und Normalkräften können im Kontakt-Modus teilweise auch sehr hohe laterale Scherkräfte auftreten, die einzelne Strukturen in der Abbildung verzerren können. Die Kombination von lateralen Kräften und hohen Normalkräften führt zu einem reduzierten Auflösungsvermögen und kann vor allem bei weichen Proben, wie biologischen Objekten oder Polymeren, zu Beschädigungen oder im Extremfall sogar zur Zerstörung während der Abbildung führen.

### **2.3.3.2 Tapping Mode AFM**

Im Tapping-Modus wird über ein Piezoelement der Cantilever und dadurch der ganze Cantilever mit der integrierten AFM-Spitze zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt und über die zu untersuchende Oberfläche gerastert. Der Photodetektor registriert wie im Kontakt-Modus die Cantileververbiegung, aus der die Detektorelektronik die Wurzel des mittleren Auslenkungsquadrates (RMS) berechnet, welches als Regelsignal für die Feedbackschleife verwendet wird. Die Schwingungsamplituden variieren typischerweise von 20 bis 100 nm, je nachdem wie groß die zu detektierenden Höhenunterschiede auf der Probe sind. Während des Rasterns wird jeweils im Amplitudenminimum einer Schwingung die Probenoberfläche von der Spitze kurz berührt. Die dabei auftretende Wechselwirkung führt zu einer gewissen Dämpfung der Cantileveramplitude, die charakteristisch für einen bestimmten Abstand zwischen z-Piezoelement und Oberfläche ist. Die

Feedbackschleife regelt das z-Piezoelement so nach, dass eine vorgegebene Setpoint-Amplitude konstant gehalten wird. Genauso wie im Kontakt-Modus kann man durch Auftragen der Höhe des z-Piezoelementes in Abhängigkeit der lateralen Position ein dreidimensionales Bild der Oberflächentopographie erhalten.

Bei der Abbildung an Luft erlaubt die Amplitude der Cantileveroszillation von bis zu 100 nm, dass die Spitze die Probenoberfläche durch die adsorbierte Flüssigkeitsschicht hindurch berührt, ohne dass sie auf der Probe hängen bleibt. Dadurch werden die im Kontakt-Modus dauernd wirkenden Adhäsionskräfte eliminiert, wodurch mit wesentlich geringeren Auflagekräften gearbeitet werden kann und Beschädigungen am abgebildeten Objekt verhindert werden. Ferner werden auch laterale Reibungskräfte bis auf ein Minimum reduziert, was auch in Flüssigkeit gegenüber dem Kontakt-Modus erhebliche Vorteile bringt. Nicht fest adsorbierte Proben können so nicht mehr so leicht verschoben oder vom Substrat heruntergekratzt werden. Aus dem gleichen Grund kann auch die laterale Auflösung bei der Abbildung von leicht beweglichen und flexiblen biologischen Objekten deutlich erhöht werden.

Ein Nachteil des Tapping-Modus besteht darin, dass mit kleineren Rastergeschwindigkeiten abgebildet werden muss, da die Regelschleife leichter zu Oszillationen neigt, wenn die Verstärkerstufen sehr hoch eingestellt werden. Dies kann bei der Verfolgung von dynamischen Prozessen am abgebildeten Objekt ein limitierender Faktor sein.

### 2.3.3.3 Nicht-Kontakt-Modus

Im Nicht-Kontakt-Modus wird der Cantilever wie im Tapping-Modus ebenfalls zur Schwingung angeregt. Allerdings arbeitet man mit sehr kleinen Amplituden von weniger als 10 nm. Die Spitze berührt dabei nie die Oberfläche der Probe, sondern oszilliert während des Rasterns über dem adsorbierten Flüssigkeitsfilm. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers wird durch die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte, die eine Reichweite von etwa 10 nm über der Flüssigkeitsschicht besitzen, zu niedrigeren Frequenzen verschoben. Diese Erniedrigung der Resonanzfrequenz führt zu einer Verringerung der Cantileveramplitude. Die Feedbackschleife regelt das z-Piezoelement so nach, dass die vorgegebene Setpoint-Amplitude konstant bleibt, wodurch wie bei den beiden anderen Abbildungsmodi ebenfalls ein Topographiebild der Oberfläche erhalten werden kann. Der große Vorteil dieser Technik besteht darin, dass keine repulsive Kraft auf die Probenoberfläche ausgeübt wird, weil die Spitze mit dieser nie in Kontakt kommt. Der Abstand zwischen Spitze und Probe limitiert allerdings die laterale Auflösung, die wesentlich schlechter ist als bei den beiden anderen Abbildungsmodi. Die Rastergeschwindigkeit muss gegenüber Kontakt- und Tapping-Modus deutlich reduziert werden, um einen eventuellen Kontakt mit dem adsorbierten Flüssigkeitsfilm zu vermeiden. Der Nicht-Kontakt-Modus kann nur für extrem hydrophobe Proben, bei denen der Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche minimal ist, angewendet werden. Wenn diese Schicht zu dick ist, kann die Spitze von ihr eingefangen werden, was zu Instabilitäten bei der Abbildung führt.

Aufgrund all dieser Nachteile sind die Anwendungsmöglichkeiten des Nicht-Kontakt-Modus sehr begrenzt.

## 2.4 Polymere und ihre Eigenschaften

### 2.4.1 Allgemeine Eigenschaften von Polymeren

Als Polymere bezeichnet man Makromoleküle, die aus einer großen Anzahl meist identischer Monomere aufgebaut sind. Die Molekülmasse ist größer als  $10^4 \text{ g/mol}$ . Die Struktur der Polymere ist von der Anzahl der Verknüpfungsstellen der Monomere abhängig. Man unterscheidet lineare Fadenmoleküle, zweidimensionale Schicht- bzw. Blattstrukturen oder dreidimensionale Raumnetze. Lineare Polymere haben keine Seitenketten, ideale Linearität wird aber nur selten erreicht. Verzweigte Polymere sind gekennzeichnet durch mehr oder weniger lange Seitenketten, die kovalent an die Hauptkette gebunden sind. Polymere mit linearem bzw. verzweigtem Aufbau sind in der Regel Thermoplaste. Bei intermolekularer Verknüpfung benachbarter Ketten spricht man von Vernetzung. Diese kann dreidimensional weitmaschig oder engmaschig erfolgen. Weitmaschig vernetzte Polymere bezeichnet man als Elastomere, engmaschig vernetzte als Duroplaste. Thermoplaste erweichen bei Temperaturerhöhung und werden dann formbar. Die Ketten lassen sich also gegeneinander verschieben. Polymere, die Schicht- oder Raumstrukturen bilden, besitzen Bindungen zwischen den Ketten, wodurch die Beweglichkeit eingeschränkt wird und die Thermoplastizität beim Erwärmen verloren geht. Durch Erwärmen eines Polymers nehmen also die Abstände zwischen den Ketten aufgrund der thermischen Bewegung zu. Zuvor kristalline Bereiche gehen in völlig amorphe Bereiche über. Oberhalb einer charakteristischen Temperatur  $T_G$ , der sog. Glas temperatur, liegt das Polymer völlig amorph vor, es verliert seine Steifheit und liegt in einem gummiartigen Zustand vor. Gerade bei amorphen Polymeren bilden

sich aufgrund konformativer Einschränkungen, wie z. B. Bindungswinkel Lücken, die nicht aufgefüllt werden können. Addiert man die Gesamtheit aller dieser Hohlräume, so erhält man das freie Volumen  $V_f$ . Die Abbildung 12 zeigt den Zusammenhang zwischen freiem Volumen und der Temperatur. Allgemein ist die Glastemperatur umso niedriger, je geringer der Vernetzungsgrad und damit je beweglicher die Polymerketten sind <sup>[18,19]</sup>.

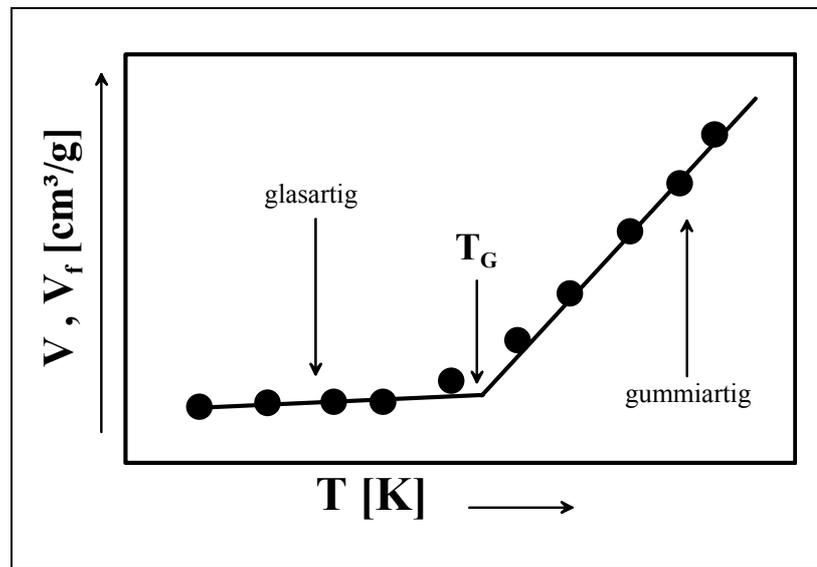


Abb. 12: Darstellung des freien Volumens in Abhängigkeit von der Temperatur.

#### 2.4.2 Beschreibung der Wechselwirkung von Polymeren mit Analytmolekülen

Die Aufnahme von Gasen oder Dämpfen in eine Polymermembran wird als Sorption bezeichnet. Durch diese Aufnahme von Gasen wird das polymere Netzwerk gestreckt. Im Gleichgewicht sind die Kräfte, die zur Quellung des Polymers führen, und die Kräfte, die das Netzwerk zusammen halten, gleich groß. Je nach Wechselwirkung, die

zwischen den Lösungsmittelmolekülen untereinander bzw. zwischen Lösungsmittel und Polymer auftreten, unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten der Sorption<sup>[18,19, 20]</sup>.

#### *Sorption nach Henry:*

Hierbei handelt es sich um den einfachsten Fall der Sorption. Für die Sorptionsisotherme ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der im Polymer sorbierten Stoffmenge  $c$  und dem Partialdruck  $p$ :

$$c = S \cdot p$$

*[Gl. 33]*

Bei der Proportionalitätskonstante  $S$  handelt es sich um die Henry-Konstante. Man beobachtet die Sorption nach Henry, wenn die Wechselwirkungskräfte zwischen Lösungsmittel-Lösungsmittel und Lösungsmittel-Polymer geringer sind als die zwischen Polymer-Polymer. Dieses Sorptionsverhalten stellt somit einen Grenzfall dar und ist für niedrige Konzentrationen von sorbiertem Gas zu beobachten.

#### *Sorption nach Langmuir:*

Mit diesem Modell werden Sorptionsverhalten beschrieben, bei denen eine Sättigung zu beobachten ist. Dies lässt sich durch die Bindungsstellen oder Mikroporen erklären, die durch das Lösungsmittel besetzt werden. Durch die Anzahl dieser Bindungsstellen oder Mikroporen ist die Stoffmenge, die

aufgenommen werden kann, begrenzt. Die Sorption nach Langmuir wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$c_p = \frac{c_H \cdot b \cdot p}{1 + b \cdot p}$$

[Gl. 34]

$c_p$  entspricht der sorbierten Konzentration an Lösungsmittel;  $c_H$  wird als Sättigungskonstante bezeichnet und entspricht der Konzentration bei vollständiger Besetzung aller Bindungsstellen bzw. Mikroporen;  $b$  entspricht der Affinitätskonstanten bzw. dem Krümmungsparameter der Langmuirfunktion, der die Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem Polymer wiedergibt.  $p$  entspricht dem Partialdruck.

Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt qualitativ die Abhängigkeit des Partialdrucks des Lösungsmittels für die vorgestellten Sorptionstypen.

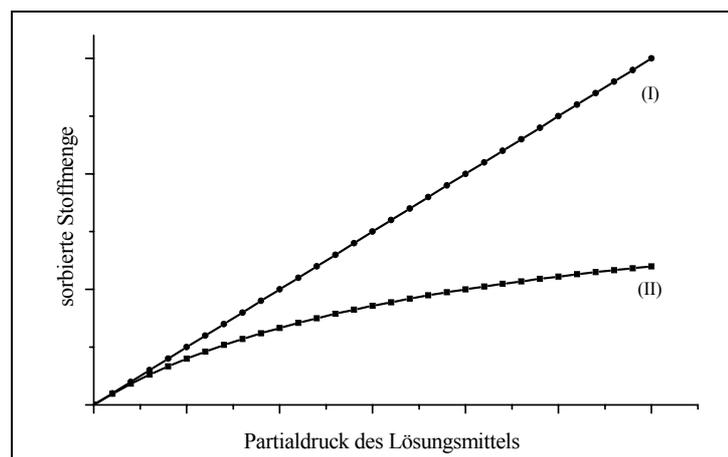


Abb. 13 : Sorptionsverhalten nach Henry (I) und Langmuir (II).

Es sei darauf hingewiesen, dass die Sorption nach Henry den Grenzfall der Langmuirfunktion für kleine Konzentrationen darstellt.

### 2.4.2.1 Kalibrierung

Polymerbasierte Sensoren zeigen unter Analyteinfluß einen Quelleffekt, der ungefähr proportional zu der zugeführten Konzentration ist. Misst man nun die Änderung der optischen Schichtdicke eines Polymerfilms bei verschiedenen Analytkonzentrationen, so erhält man eine Kalibriergerade, die spezifisch für eine Analyt/Polymerkombination ist. Die Stärke der Quellung hängt also vom verwendeten Analyten und vom Polymer ab. Bei einer bestimmten Analytkonzentration quellen die unterschiedlichen sensitiven Schichten verschieden stark auf. Ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung von gasförmigen Analytmolekülen mit Polymeren ist die Empfindlichkeit (= Sensitivität), sie ist als Steigung der Kalibrierkurve definiert. Um nun eine Diskriminierung von Analyten mit polymerbasierten Sensoren zu erreichen, ist es notwendig, dass die Sensoren unabhängig voneinander unterschiedliche Empfindlichkeiten für die Analyte aufweisen. Die Steigungen der Kalibriergeraden der einzelnen Analyte sollten sich für die einzelnen Sensoren möglichst stark unterscheiden. Nur dann ist eine qualitative und quantitative Auftrennung eines Analytgemisches möglich.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien und Materialien

- Standard(bio)chemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von Fa. Fluka Neu-Ulm, Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.
- Feinchemikalien und Lösungen wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck, Darmstadt und Fluka, Neu-Ulm bezogen.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS), Diisopropylcarbodiimid (DIC), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurden von der Fa. Fluka, Neu-Ulm erworben.
- Aminodextran (AMD) 260/10, wurde wie in [23] beschrieben hergestellt.
- Carboxymethyldextran (CMD), Molekulargewicht 200000 *Dalton* wurde von Fa. Analytik Jena erhalten.
- Diamino- und Dicarboxy-Polyethylenglycol (DA- bzw. DC-PEG) wurde von der Firma Rapp Polymere, Tübingen, erhalten.
- PBS = phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): 8.76 g (150 *mmol*) NaCl und 1.36 g (10 *mmol*)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und mit 2 M KOH auf pH = 7.4 titriert.
- Siliziumsubstrate stammen von den Firmen Wacker Chemie, Burghausen mit den Eigenschaften:

- Durchmesser: 76, 2 mm
  - Dicke: 457 +/- 15 µm
  - Typ Dotierung : p-Bor
  - Orientierung: 111
  - Fehlorientierung 4 +/- 0,5
- BK7-Glas wurde von der Firma Langenbrinck (Emmendingen) bezogen.
  - Titangranulat stammt von der Firma Balzers, Lichtenstein.
  - Verwendete Analyte für die Sensitivitätsmessungen am Ellipsometer waren:

Analyt	Hersteller	Reinheitsgrad	Dichte[g/ccm]	Siedepunkt[°C]	Dampfdruck[ppm]
Methanol	Fluka (Neu-Ulm)	puriss.p.a. ACS ;absolut ; acetonefrei	0,791	64-65	97396
Ethanol	Fluka (Neu-Ulm)	absolutiert	0,81	80	42032
1-Propanol	Fluka (Neu-Ulm)	absolutiert	0,804	96-99	13460

*Tab. 2: Verwendete Analyte für die Gassensitivitätsmessungen mit Polymeren.*

- Makrolon 2040 wurde von der Bayer AG bezogen.
- TOPAS wurde von der Firma Ticona GmbH, Kelsterbach bezogen.

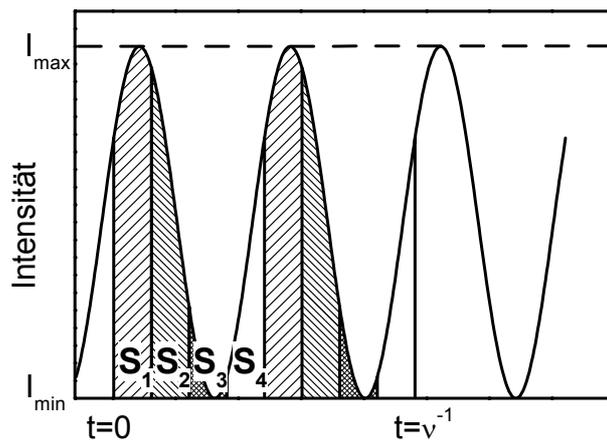
- 
- Die Keratinocyten für die Zelladhäsions- und Zellausbreitungsversuche wurden von Cascades Biologics bezogen.

## 3.2 Geräte

### 3.2.1 Ellipsometer

Die Ellipsometriemessungen wurden mit einem Spektralellipsometer ES4G der Firma Sopra und mit einem Minsearch Ellipsometer ELX-02-C enhanced, DRE, Ratzeburg durchgeführt.

Das ES4G ist ein spektroskopisches Ellipsometer mit rotierendem Polarisator und Doppelmonochromator mit Prisma und Gitter. Der Wellenlängenbereich ist zwischen 230 – 930 *nm* wählbar. Die Anordnung der optischen Komponenten ist gemäß (*Abb. 6*). Der Doppelmonochromator (Prisma und Gitter) ist nach der Probe angeordnet, was den Nachteil hat, dass die Probe permanent mit zum Teil energiereichem UV-Licht bestrahlt wird. Weil die Wellenlängen im gewählten Bereich nacheinander vermessen werden müssen ergeben sich zum Teil lange Messzeiten. Bei der Messung erhält man eine sinusförmige Intensitätsmodulation.



*Abb. 14: Intensitätsverlauf bei konstanter Analysatorposition und gedrehtem Polarisator. Dreht man die Polarisationssebene um  $360^\circ$ , so wird die ursprüngliche Lage der Polarisationssebene zweimal durchlaufen, weshalb man für die Intensität zwei Sinusdurchgänge erhält.*

Die Intensitäten werden für  $t/8$ -Intervalle integriert und mit einer Fourierreihe ausgewertet (siehe Gl. 24-26).

Bei dem ELX-02-C handelt es sich um ein polarisationsmoduliertes Ellipsometer. Als Lichtquelle kommt ein HeNe-Laser zum Einsatz. Für die Datenauswertung kann zwischen der harmonischen Analyse des Intensitätsprofils oder einem Algorithmus zur Minimumsuche gewählt werden. Durch die Messung wird die Ellipse, welche durch den E-Feldvektor nach der Reflexion beschrieben wird, bestimmt.

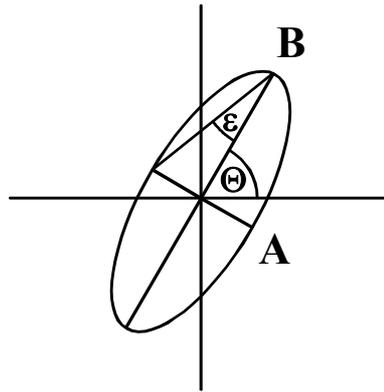


Abb. 15: Ellipse, welche durch den E-Feldvektor beschrieben wird. Die Ellipse kann durch Elliptizität  $\varepsilon$  und Orientierung  $\Theta$  beschrieben werden. A und B sind die Hauptachsen.

Die ellipsometrischen Winkel lassen sich nach folgenden Gleichungen berechnen:

$$\begin{pmatrix} 1 \\ \chi_r \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \tan \Psi \cdot e^{-i\Delta} \end{bmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ \chi_i \end{pmatrix}$$

[Gl. 35]

$$\chi_{r,i} = \frac{\tan \Theta_{r,i} + i \tan \varepsilon_{r,i}}{1 - i \tan \Theta_{r,i} \cdot \tan \varepsilon_{r,i}}$$

[Gl. 36]

$r$  = reflektiertes,  $i$  = eingestrahktes Licht

Da bei der Messung zuerst die Lage und Intensität des Minimums A gemessen und danach die Intensität am Punkt B bestimmt wird, bezeichnet man diesen Ellipsometertyp auch als *Minsearch-Ellipsometer*.

### 3.2.2 Gasmischanlage

Die Gasmischanlage funktioniert nach dem Prinzip der dosierten Zumischung von gasförmigem Analyt zu lösungsmittelfreier Luft. Die Regelung der Durchflussmenge der Analyte und der synthetischen Luft und damit die Einstellung der gewünschten Konzentrationsverhältnisse erfolgt mittels Massenflussreglern (Typ MFR 1259, Firma MKS Instruments Deutschland GmbH, München, BRD). Angesteuert werden die Massenflussregler über ein Steuergerät (Typ MGC 147 B, Firma MKS Instruments Deutschland GmbH), das über eine serielle Schnittstelle eines Computers angesprochen wird.

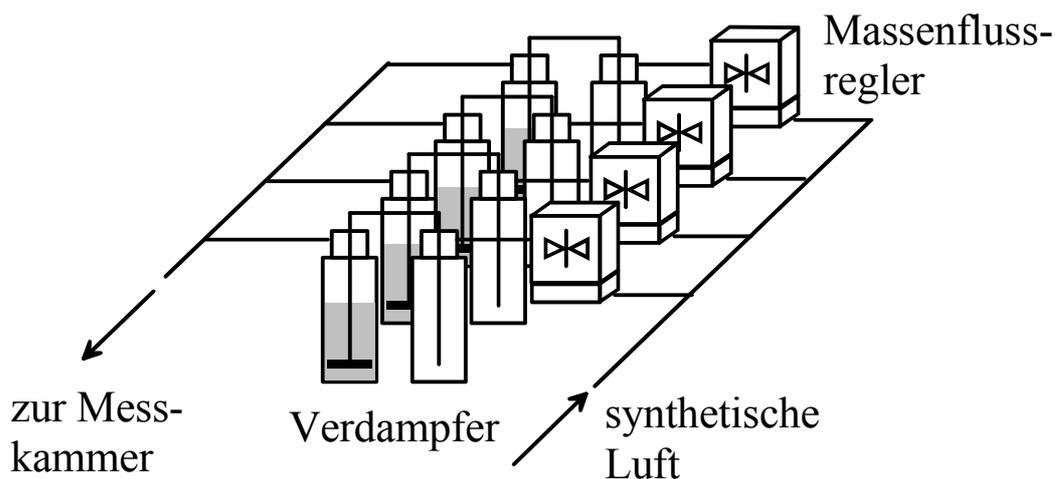


Abb. 16: Schematischer Aufbau der Gasmischanlage.

### 3.2.3 Spin-Coater

Zur Präparation der Polymerschichten wurde ein Spin-Coater des Typs Spincoater Convac 1001, Convac, Wiernsheim verwendet.

---

### 3.2.4 Atomkraftmikroskop

Für die AFM-Abbildungen wurde ein Multimode™ SPM-Gerät der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA, verwendet.

### 3.2.5 Lichtmikroskop

Für die lichtmikroskopischen Abbildungen wurde ein Lichtmikroskop Typs BX 60 von Olympus verwendet.

### 3.2.6 Weitere Geräte

- Kontaktwinkelgerät CAM 200, KSV, Helsinki.
- Oberflächenprofilometer, Alphastep 500, Tencor Instruments, Mountain View, Kalifornien.
- Plasmaverascher 100-E Plasma System, TePla Technics Plasma GmbH, Kirchheim b. München.

## 3.3 Reinigung der Substrate

### *Glas und Silizium:*

Die Reinigung der Substrate geschah in einer Mischung aus konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3:1) 15 *min* lang im Ultraschallbad. Danach wurde mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

## TOPAS

Die TOPAS-Slides wurden mit Isopropanol und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die TOPAS-Slides 5 *min.* im Plasmaverascher bei einem Sauerstoffdruck von 0.8 *mbar* und einer Leistung von 300 *Watt* gereinigt.

### *Glimmeroberflächen für die AFM-Messungen*

Eine frische Glimmeroberfläche wurde durch manuelles Abziehen der obersten, meist verschmutzten Glimmerschicht mit einem Klebestreifen erzielt.

## 3.4 Schichtpräparation

### 3.4.1 Präparation der Polymerschichten

#### *Makrolon*

Es wurden Makrolonlösungen in Chloroform, Dichlorethan, Dichlorbenzol, Toluol, Xylol, Toluol/Chloroform (3/1) und Chloroform/Dichlorbenzol (3/1, 2/1 und 1/1) zwischen 0.5 und 2.5 Gew.-% hergestellt und per Spin-Coating aufgetragen. Dabei wurden 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Lösung auf die  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  großen, wie oben beschrieben gereinigten Siliziumwafer aufpipetiert und dann mit Umdrehungszahlen von 2000-5000 *rpms* aufgeschleudert.

### 3.4.2 Präparation der dentalen Implantatschichten

#### *Präparation der Titan- und Titandioxidschichten*

Nachdem die Glassubstrate wie oben beschrieben gereinigt wurden, wurde die Titanschicht per Elektronenstrahlverdampfung in einer Pfeiffer-Vakuum-Aufdampfanlage des Typs PLS 570 aufgebracht. Die Aufdampfrate und die Schichtdicke wurden über einen Quarzmonitor beobachtet und die Aufdampfparameter betragen:

- Gasdruck:  $10^{-7}$  mbar,
- Anodenpotential: 10 kV,
- Anodenstrom: 75 – 95 mA,
- Aufdampfrate von 0.3-0.4 nm/s
- Schichtdicke ca. 250 nm (ellipsometrisch bestimmt).

Die Titandioxidschichten wurden bei einem Sauerstoffdruck von 0.8 mbar und einer Leistung von 300 Watt durch eine Sauerstoffplasmaveraschung generiert. Die Veraschungszeiten betragen von 5, 15 und 30 Minuten.

#### *Präparation des organischen, bioaktiven Schichtsystems*

Die Titandioxidschichten wurden dann mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan silanisiert und anschließend mit einer PEG (2000 Da) Lösung in Dimethylformamid (DMF) zur kovalenten Anbindung des PEGs behandelt. Aktivierung der PEG Monolage wurde durch eine N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid in einer DMF-gesättigten Atmosphäre erreicht und anschließend wurde das Fibronectin an die aktivierte PEG-Oberfläche gekoppelt, indem man

eine gepufferte PBS-Lösung bei pH 7.4 des Fibronectins auf die aktivierte Oberfläche tropfte.

Zur Kontrolle der Zelladhäsion wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt von Scheideler et al., des Zahnmedizinischen Institutes der Tübinger Universitätsklinik. Dazu wurden Zellkulturen des menschlichen Hautkeratinocyten (HEKn, Cascades Biologics) auf der biofunktionalisierten Titanoberfläche aufgebracht in einer Dichte von  $2-5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Nach 30, 60 und 90 Minuten wurde der Adhäsionsprozess durch Abspülen gestoppt, und die anheftenden Zellen wurden cytochemisch markiert. Die Anzahl der anheftenden Zellen und der prozentuelle Anteil der sich ausbreitenden Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Der Einfluß von Blutkomponenten, die an der Implantatoberfläche kleben, auf die Zelladhäsion und –ausbreitung wurden nach einer Inkubation der Oberflächen über eine Stunde auf einem Schütteltisch durch entweder frisches menschliches Blut (anticoaguliert durch 1 IU/ml Heparin oder EDTA) oder durch menschliches Serum bestimmt.

### 3.4.3 Präparation der Bioschichten

#### *Präparation der AMD-, PEG- und CMD-Schichten*

##### Silanisierung der SiO<sub>2</sub>-Substrate

Nach der Reinigung der SiO<sub>2</sub>-Substrate, wie oben beschrieben, wurden auf die Substrate in einer leeren, trockenen Glaskammer 15 µL GOPTS pipettiert und mit einem zweiten Substrat-Chip abgedeckt („Sandwich-Technik“). Nach einer Stunde Inkubationszeit in

verschlossener Kammer wurden die Transducer-Chips gut mit getrocknetem Aceton (Wassergehalt  $\leq 0,1\%$ ) abgespült, wobei auf Rückstände von GOPTS geachtet werden musste und die Schichten wegen Luftfeuchtigkeit zügig weiterverarbeitet werden mussten.

#### Umsetzung mit Polymer

**CMD:** Die silanisierten Chips wurden mit 20  $\mu\text{L}$  CMD-Lösung einer Verdünnung von 1:5 (1 mg CMD in 5  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser) pipettiert und wie bei der Silanisierung mit einem zweiten Chip abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer wurden die Chips gründlich mit bidest. Wasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

**DA-PEG:** Die silanisierten Chips wurden in einer offenen Schale mit 20  $\mu\text{L}$  einer DA-PEG-Lösung (4 mg DA-PEG in 1 mL Dichlormethan) pipettiert und anschließend in einem 70°C warmen Ofen gelegt. Nach einer Inkubationszeit über Nacht wurden die Transducer gründlich mit bidestilliertem Wasser abgespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

#### *Präparation der DNA/PNA Schichten auf Silizium*

Die Silizium-Wafer wurden per Wafersäge auf 1,5\*1,5 cm große Stücke zerschnitten und eine SiO<sub>2</sub>-Schicht von ca. 270 nm thermisch aufgedampft. Diese Schicht bewirkt eine Signalverbesserung bei den ellipsometrischen Messungen<sup>[23]</sup>. Reinigung dieses Substrates wie oben beschrieben. Der Schichtaufbau erfolgte zuerst durch Anbringung einer Silanschicht. Dazu wurden die Substrate absolut wasserfrei mit 40  $\mu\text{l}$  GOPTS (3-Glycidyloxypropyl-trimethoxy-silan) 1h

lang in einer Trockenkammer inkubiert. Danach wurde schnell mit trockenem Aceton ( $\leq 0.1\%$  H<sub>2</sub>O-Anteil) abgespült und sofort im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Diese Oberfläche muß wegen der Luftfeuchtigkeit sofort mit dem AMD-Polymer umgesetzt werden. Das geschieht im Sandwichverfahren. Die Substrate wurden mit 30  $\mu$ l AMD-Lösung (1 mg AMD in 2  $\mu$ l Bidest. H<sub>2</sub>O) inkubiert, mit einem zweiten Substratplättchen bedeckt und über Nacht in eine Feuchtigkeitskammer gelegt. Nach 24 h wurden die Sandwiche vorsichtig auseinander gezogen und mit bidest. H<sub>2</sub>O sorgfältig gespült und im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

Für die kovalente Immobilisierung der PNA/DNA wurden die mit AMD modifizierten Substratoberflächen mit einer Lösung von 2 mg/ $\mu$ l Glutarsäureanhydrid in DMF 6 h lang in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer inkubiert und anschließend mit DMF und bidest. Wasser gespült. Die jetzt carboxylierte Oberfläche wurde mit einer Lösung aus 1 M N-Hydroxysuccinimid und 1.5 M DCC in trockenem DMF in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 4 h lang aktiviert. Nach dem Spülen mit trockenem DMF und Trocknen im N<sub>2</sub>-Strom wurde die PNA/DNA auf die Oberfläche getropft. Die anschließende Hybridisierung wurde über Auftropfen der PNA/DNA Lösung per Pipette durchgeführt und anschließend mit trockenem DMF gespült und im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

---

### *Photoimmobilisierung von DNA auf TOPAS*

500  $\mu\text{l}$  DNA-Puffer-Lösung (20  $\mu\text{M}$  aminofunktionalisierter DNA) wurde mit 2  $\mu\text{l}$  einer DMF-Lösung von Benzoylbenzoesäure-NHS-Aktivester (110  $\text{mM}$ ) versetzt. Diese Lösung wurde 2 Std. auf den Rütteltisch bei Raumtemperatur gerührt, der Niederschlag anschließend abzentrifugiert. Die „Ethanol-fällung“ der DNA wurde durch Lösen der DNA in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Die Immobilisierung der DNA geschah durch Spotten der DNA-Lösung mit der Microdropanlage, wobei jedes TOPAS-Plättchen mit 2 Standard-Spots (runder Spot mit ca. 3  $\text{mm}$  Durchmesser) nebeneinander, leicht überlappend, bedruckt wurde. Die TOPAS-Slides wurden teilweise doppelt bedruckt, um eine vollständige Oberflächenbelegung zu garantieren. Zur Photoimmobilisierung wurden die Plättchen für 30  $\text{min}$  im UV-Crosslinker bestrahlt. Zum anschließenden Blocken der Oberfläche mit BSA im Sandwichverfahren, wurde eine BSA-Lösung (1  $\text{mg/ml}$ ) zur 15 minütigen Inkubation aufgeben. Die Reinigung nach der Inkubation erfolgte durch Abspülen mit PBS und Trockenblasen mit  $\text{N}_2$ . Zur Hybridisierung mit komplementärer Cy5-markierter DNA wurde DNA-Lösung (1,4  $\mu\text{M}$ ) im Sandwichverfahren aufgeben und 30 Minuten inkubiert. Die nicht hybridisierte DNA wurde mit PBS abgespült und die Plättchen mit  $\text{N}_2$  trockengeblasen. Zur Kontrolle der Hybridisierung wurde ein Fluoreszenzscan im Bioscan durchgeführt.

### *Präparation der Biotin/Streptavidin Schichten auf TOPAS*

Photodextran wurde auf die TOPAS-Oberfläche gegeben und dann per UV-Strahlung an die Oberfläche kovalent gebunden. Anschliessend wurde das Biotin als Aktivester wie in [23] an das AMD kovalent gebunden. Blocken mit BSA geschah wie bei den DNA-

Schichten, anschließend wurde ebenfalls wie in [23] ein Cy-5-markiertes Streptavidin auf die geblockte Biotinschicht zur Affinitätsreaktion gegeben.

## 4 Ergebnisse

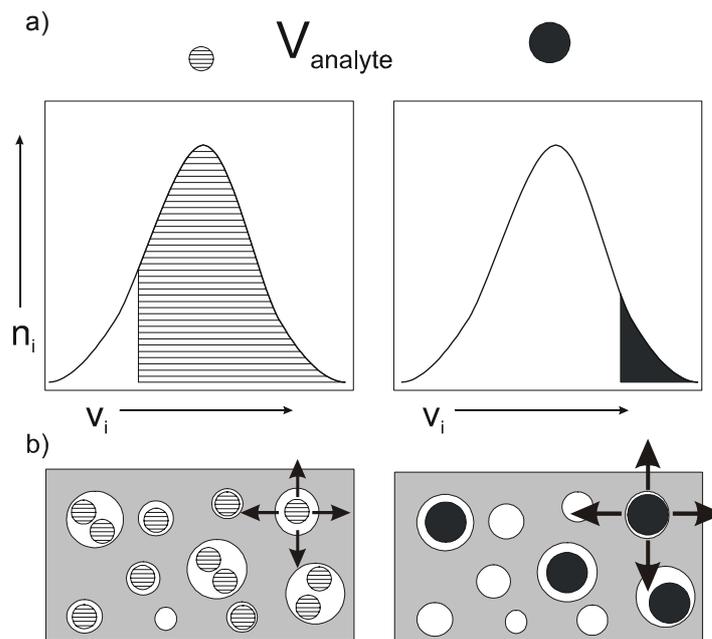
### 4.1 Mikroporöse Polymere

Die Trennung von Gasen durch eine Polymermembran kann zum einen über die Größe der Analytmoleküle und zum anderen über die Polarisierbarkeit der Analytmoleküle erfolgen.

Während bei gummiartigen Siloxanen oder ähnlichen Polymeren eine Selektivität hauptsächlich von der Polarität bzw. Polarisierbarkeit der Analyte abhängt, liegt bei den mikroporösen Polymeren ein anderes Erkennungskriterium zugrunde. Bei diesen sehr harten, glasartigen, mikroporösen Polymeren können Analyte anhand ihrer Teilchengröße getrennt werden. Dieser Effekt wird als Molsiebeffekt bezeichnet und ist abhängig von der Anzahl und der Größe der Mikroporen innerhalb des Polymernetzwerks. Die beobachtete größenselektive Trennung kann über einen Lösungs-Diffusions-Mechanismus erklärt werden.

Der Stofftransport durch eine Membran spielt sich in drei Schritten ab: Adsorption-Diffusion-Desorption. Eine wichtige Größe, die Einfluss auf die Selektivität der Polymere nimmt, ist das bereits definierte freie Volumen. Teilchen, die einen kleineren Moleküldurchmesser als die vorhandenen Mikroporen haben, können ungehindert durch die Membran transportiert werden. Je größer die Analytmoleküle sind, desto stärker wird deren Diffusion gehindert. Um also den Molsiebeffekt zu nutzen, müssen solche Materialien als sensitive Schichten verwendet werden, die sich durch eine definierte Porengröße auszeichnen. Der Einfluss der Porengrößenverteilung und

der Analytgröße auf die Sorption in mikroporösen Systemen findet sich in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Durch die definierte Porenstruktur der mikroporösen Polymere geht hervor, dass die Anzahl besetzbarer Lücken mit zunehmendem Volumen der Analytmoleküle, wie es Abbildung 17 graphisch darstellt, abnimmt <sup>[21]</sup>.



*Abb. 17: Schematische Darstellung des Einflusses der Porengrößenverteilung und der Analytgröße auf die Sorption. a) zugängliches  $V_f$  bei kleinem Analytmolekül b) zugängliches  $V_f$  bei großem Analytmolekül.*

Bei amorphen Polymeren unterscheidet man je nach Größe der vorliegenden Hohlräume zwischen ultramikro-, mikro-, meso- und makroporösen Systemen

	ultramikroporös	mikroporös	mesoporös	makroporös
d [nm]	< 0,7	0,7 – 2	2 – 50	> 50

*Tab. 3: Klassifizierung der Porengröße.*

Der kinetische Durchmesser  $\sigma_{kin}$  kann zur Abschätzung der Analytgröße herangezogen werden, da die Transporteigenschaften von Analytmolekülen in Polymermembranen mikroporöser Systeme mit dem kinetischen Durchmesser  $\sigma_{kin}$  korreliert sind.

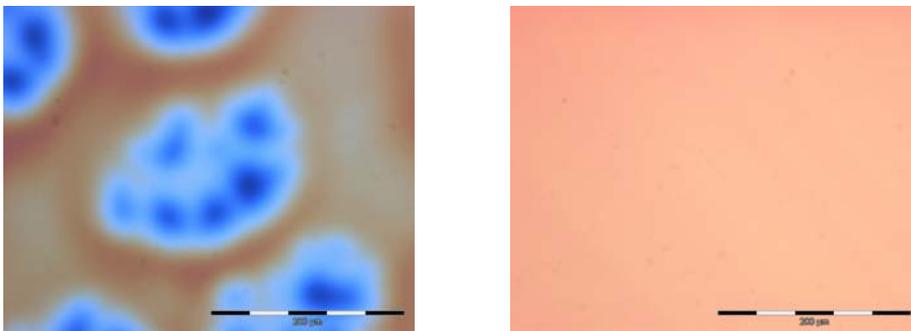
$\sigma_{kin}$  kann über die Van-der-Waalsparameter, die kritische Temperatur, den kritischen Druck, das Lennard-Jones-Potential sowie für polare Moleküle mit dem Stockmayer-Potential abgeschätzt werden.

#### 4.1.1 Makrolon

Makrolon ist ein kommerziell erhältliches, mikroporöses Polycarbonat. Die industriellen Anwendungen sind sehr vielfältig und reichen von der Schutzbeschichtung von CD-ROM Datenträgern über Sportsonnenbrillengläser, Autoscheinwerfer bis hin zur Verwendung als Verschiebungen und Überdachungen im Bau. Mit einer Porengröße von  $0.1 \text{ nm}^3$  [22] kann das Makrolon allerdings auch in der Chemosensorik zur gröÙenselektiven, quantitativen Konzentrationsbestimmung von z. B. homologen Reihen von Alkoholen, Freonen oder Molekülen mit ähnlicher Größe genutzt werden.

#### 4.1.1.1 Charakterisierung der Schichtpräparation

Um optimale, homogene Schichten jeglicher Schichtdicke bis zu 500 nm für die sensorische Anwendung präparieren zu können, müssen die Einflüsse der Präparationsparameter (Lösungsmittel und Spin-Coating-Parameter) auf die Schichteigenschaften Schichtdicke, Brechungsindex und Homogenität, charakterisiert werden. Dabei ist herauszufinden, welcher Präparationsparameter auf welche Schichteigenschaft Einfluß hat.



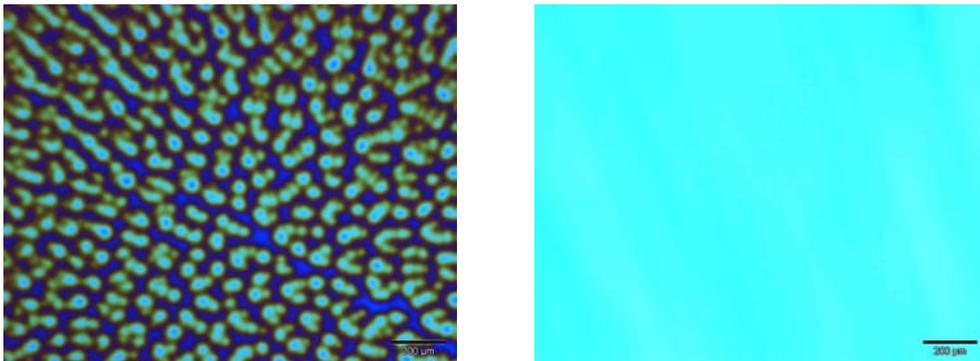
*Abb. 18: Links: Makrolon-Schicht mit 10 sekundiger Verzögerung zwischen Aufpipetieren und Start des Spin-Coating Prozesses, rechts: ohne Verzögerung.*

Es wurden Lösungen zwischen 0.5 und 2.5% (Gew.Prozent) in Chloroform, 1,2-Dichlorethan, 1,2-Dichlorbenzol, Toluol, Xylol und in Gemischen von Chloroform/1,2-Dichlorbenzol (1:1, 1:2 und 1:3) Toluol/Chloroform (1:3) hergestellt und zwischen 2000 und 5000 rpms per Spin-Coating auf die Silizium Substrate aufgebracht. Nach ersten lichtmikroskopischen Untersuchungen der so hergestellten Schichten konnte festgestellt werden, dass zeitliche Verzögerungen zwischen dem Aufbringen der Makrolonlösung und Start des Spin-Coating

---

Prozesses zu einer deutlichen Verschlechterung der Oberflächenhomogenität führt (Abb. 18). Dies kann dadurch erklärt werden, dass während der zeitlichen Verzögerung das Lösungsmittel auf dem Substrat vereinzelt anfängt zu verdampfen und damit eine inhomogene Verteilung des Makrolons im Lösungsmittel hervorruft, was schlussendlich zu einer inhomogenen Makrolonschicht führt. Schon eine kurze Verzögerung von 10 Sekunden zeigte diesen Effekt. Desweiteren spielt das Lösungsmittel selbst eine Rolle. Es stellte sich heraus, dass das Lösungsmittelgemisch Chloroform/1,2-Dichlorbenzol die homogensten Schichten hervorbrachte, was zum einen den hervorragenden Lösungseigenschaften des Chloroforms gegenüber Makrolon zuzuschreiben ist, zum anderen aber auch dem 1,2-Dichlorbenzol, das mit einem Siedepunkt von  $178^{\circ}\text{C}$  den mit Abstand höchsten Siedepunkt aller ausgewählten Lösungsmittel hat. Das hat zur Folge, dass während dem Spin-Coaten das Lösungsmittelgemisch mehr Zeit benötigt, um abzukochen und somit dem Polymer mehr Zeit zur Verfügung steht, um sich auf der Substratoberfläche zu ordnen.

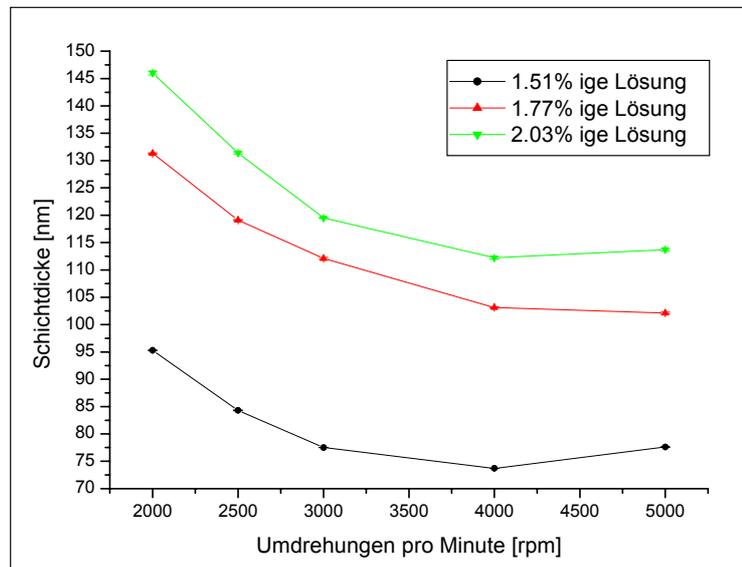
Es stellte sich also heraus, dass die Makrolonlösungen in Chloroform/1,2-Dichlorbenzol die homogensten Schichten von den betrachteten Lösungsmitteln ergeben. Als nächstes wurden die Einflüsse der Spin-Coating-Parameter auf die Schichteigenschaften Schichtdicke und Homogenität untersucht. Es wurden Lösungen von 0.5%-2.5% Makrolon in Chloroform/1,2-Dichlorbenzol (1:1) hergestellt und dann auf Siliziumwaferstücke ( $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$ ) mit folgenden Parametern aufgebracht: Coating Zeit 90 Sekunden, damit jegliches Lösungsmittelverdampfen kann und Schleuderumdrehungszahlen von 2000 – 5000 *rpms* in 500er Schritten. Diese Schichten wurden dann



*Abb. 19: Links: Makrolon-Schicht aus Chloroform Lösung, rechts: Makrolon-Schicht aus Chloroform/1,2-Dichlorbenzol (1:1), gleiche Konzentration der Lösungen und gleiche Spin-Coating-Parameter.*

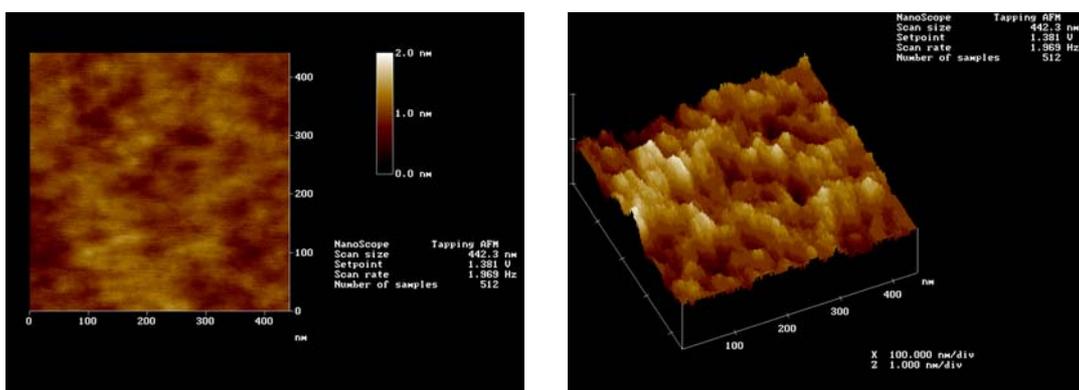
ellipsometrisch mit dem ES4G-Ellipsometer unter einem Einstrahlwinkel von  $70^\circ$  und im Wellenlängenbereich von 400 – 800 *nm* vermessen. Auswertung erfolgte mit der FilmWizzard 32 Software von SCI unter der Annahme von homogenen Schichten, also Cauchy-Parameterisierung der Polymerschichten. Bei allen Lösungen stellte sich heraus, dass mit zunehmender Umdrehungszahl bis hin zu 4000 *rpms* die Schichtdicke abnimmt, dann aber konstant bleibt, die Homogenität der Schichten nimmt mit zunehmender Umdrehungszahl zu (Abb. 20).

Die Schichtdickenabnahme kann man mit zunehmender Umdrehungszahl durch die mit der Umdrehungszahl zunehmende Zentrifugalkraft erklären. Hierdurch wird zunehmend Polymerlösung von der Substratoberfläche abgeschleudert, ohne das Polymer auf der Oberfläche aufzucoaten, wobei bei 4000 *rpms* das Maximum erreicht wird und nicht mehr Polymerlösung abgeschleudert werden kann und somit trotz zunehmender Umdrehungszahlen die Schichtdicke einen



*Abb. 20: Abnahme der Schichtdicke mit zunehmender Umdrehungszahl.*

konstanten Wert annimmt. Die mit der Umdrehungszahl zunehmende Zentrifugalkraft nimmt auch Einfluss auf die Schichthomogenität, da die sie die Polymerstränge in geordnetere Strukturen „zieht“.



*Abb. 21: Repräsentative AFM-Aufnahmen der optimierten Makrolonschicht.*

Abb. 21 zeigt eine repräsentative AFM-Aufnahme einer optimierten Makrolon-Schicht mit einer Höhenskala von 2 nm. Die Mikroporen mit einem errechneten lateralen Durchmesser von 2 nm konnten noch nicht aufgelöst werden, jedoch kann man „Löcher“ an der Oberfläche mit einem Durchmesser von 20 - 50 nm erkennen. Diese Löcher können durch die Oberflächenrauigkeit entstehen. Diese Oberflächenrauigkeit macht auch eine Auflösung der Poren sehr schwierig, da nicht unterschieden werden kann, ob es sich bei einer Struktur um Oberflächenrauigkeit oder tatsächlich um eine Pore handelt.

#### 4.1.1.2 Charakterisierung der Quelleigenschaften

Um die Quelleigenschaften des Makrolons unter Analyteinfluß zu charakterisieren, wurden vier Makrolonschichten der Schichtdicken 35 nm, 70 nm, 170 nm und 250 nm mit den Alkoholen Methanol, Ethanol und 1-Propanol vermessen. Methanol hat einen Brechungsindex von 1.329 und eine Größe von  $0.068 \text{ nm}^3$ , also kleiner wie das durchschnittliche Porenvolumen des Makrolon. Ethanol hat einen Brechungsindex von 1.361 und eine Größe von  $0.097 \text{ nm}^3$ , was ungefähr dem durchschnittlichen Porenvolumen des Makrolon entspricht. 1-Propanol hat einen Brechungsindex von 1.385 und eine Größe von  $0.125 \text{ nm}^3$  und ist somit größer als das durchschnittliche Porenvolumen. Es wurden Konzentrationen von  $0 - 0.12 p_i / p_{i0}$  in 8 Konzentrationschritten in unregelmässiger Reihenfolge jeweils dreifach gemessen. Dabei wurden die Analyte in einer Gasflusszelle über die sensitiven Schichten geleitet und nach Einstellen des Gleichgewichtes zwischen Gasphase und sensitiver Schicht

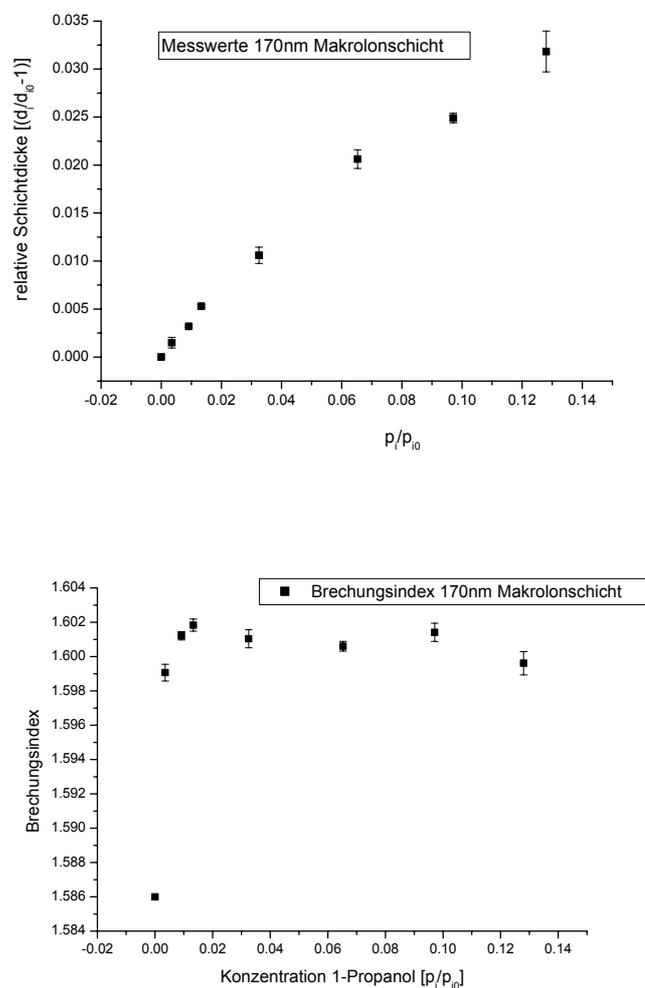
ellipsometrisch vermessen und so Schichtdicke und Brechungsindex der Schicht unter der jeweiligen Analytkonzentration bestimmt.

Das verwendete Schichtmodell baute sich folgendermassen auf. Als Substrat wurde Silizium als NK-File angepasst, genauso die darauf gebildete native Siliziumdioxid Schicht mit einer Schichtdicke von 2 nm. Die aufgecoatete Makrolonschicht wurde mittels einer Cauchy-Parametrisierung als homogenes Medium simuliert, trotz der mit Luft gefüllten Mikroporen. Es hat sich herausgestellt, dass die Simulationen der Makrolonschicht als homogenes Medium bessere Ergebnisse lieferte als die Parametrisierung mit einer EMA-Parametrisierung, bei der die Luft als eingeschlossenes Medium in die Mikroporen berücksichtigt wurde. Dies kann man darauf zurückführen, dass die Form der Mikroporen sehr inhomogen ist aber die EMA-Parametrisierung eine homogene Partikelform für die Simulation voraussetzt. So wurde die Makrolonschicht als eine homogene Schicht angenommen. Ebenso erfolgte die Simulation der Makrolonschicht im Gleichgewicht unter Analyteinfluß, was dann in einer Brechungsindexzunahme resultieren musste, da die Luft mit Brechungsindex 1 durch die Analyte mit höherem Brechungsindex verdrängt wurden (Abb. 22).



Abb. 22: Schichtmodell der Quellung.

In Abb. 23 ist das Brechungsindexverhalten und die Schichtdickenänderung einer 170 nm dicken Makrolonschicht mit zunehmender 1-Propanolkonzentration in der Gasphase zu sehen. Bei kleinen Konzentrationen ist eine starke Zunahme des Brechungsindex von 1.586 bis hin zu 1.602 zu beobachten. Bei kleinen Konzentrationen werden die Poren mit Analyt gefüllt, der die Luft mit einem Brechungsindex von 1 aus diesen verdrängt und es somit zu einer Brechungsindexzunahme kommt. Die Schichtdicke ändert sich



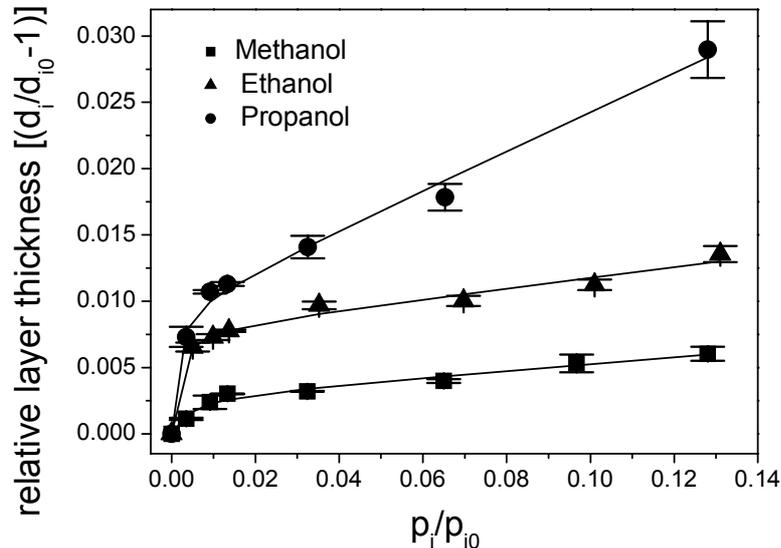
*Abb. 23: 170 nm Makrolonschicht mit 1-Propanol, oben Schichtdickenänderung, unten Brechungsindexänderung mit zunehmender Analytkonzentration.*

---

jedoch durch die Einlagerung der Analyte in die Poren kaum. Bis zur Sättigung der Poren mit Analyt nimmt der Brechungsindex weiter zu bis zu einem Maximum, bei Erreichen der Sättigung. Bei noch höheren Konzentrationen beginnt eine Sorption der Analytmoleküle in die Polymermatrix, die ein Quellverhalten nach Henry hervorruft. Diese Sorption sorgt aber auch für eine leichte Abnahme des Brechungsindex auf 1.600, da das Polymer anfängt zu Quellen und jetzt zwischen den Polymersträngen Analytmoleküle mit einem geringeren Brechungsindex als das Polymer eingelagert werden.

Um alle vier Schichten von 35 *nm* bis 280 *nm* miteinander vergleichen zu können wurde bei den folgenden Untersuchungen der Brechungsindex konstant gehalten, da unter einer Schichtdicke von 100 *nm* die zu simulierenden Parameter Schichtdicke und Brechungsindex sehr stark korrelieren und nicht mehr unabhängig voneinander bestimmt werden können. Das heißt, dass sowohl Änderungen des Brechungsindexes wie auch Änderungen der Schichtdicke in den folgenden beiden Abbildungen durch eine Schichtdickenänderung ausgedrückt werden. Abb. 24 zeigt die 170 *nm* Schicht unter dem Einfluß der drei Alkohole. 1-Propanol, der größte der drei Analyte, zeigt, dass der Langmuiranteil der Kurve und somit die Füllung der Poren bei den niedrigsten Analytkonzentrationen ( $0.008 \ p_i/p_{i0}$ ) nachlässt, dafür aber die größte relative Schichtdickenänderung hervorruft. Da das 1-Propanol mit einer Größe von 1.25 *nm*<sup>3</sup> über dem durchschnittlichen Porenvolumen des Makrolons liegt, waren diese Ergebnisse zu erwarten, da am wenigsten Poren zur Verfügung stehen, und diese durch die 1-Propanolmoleküle sehr gut ausgefüllt werden und es zu einer starken Wechselwirkung kommt. Methanol zeigt, dass der Langmuiranteil bei

den höchsten Analytkonzentrationen ( $0.013 p_i/p_{i0}$ ) nachlässt und die geringste relative Schichtdickenänderung hervorruft. Diese Ergebnisse waren genauso zu erwarten, da Methanol mit einer Größe von  $0.068 \text{ nm}^3$  weit unter dem durchschnittlichen Porenvolumen liegt und somit sehr viele Poren füllen kann, es aber durch die geringe Größe es zu wenig Wechselwirkungskontakt zwischen Methanolmolekül und Porenwand kommt. Ethanol liegt erwartungsgemäß zwischen 1-Propanol und Methanol. Betrachtet man die Henryanteile der drei Analyte bei höheren Konzentrationen, so zeigt 1-Propanol die größte Steigung und Methanol die geringste, was wiederum auf die Analytgröße und die Wechselwirkung diesmal mit der Polymermatrix zurückzuführen ist.



*Abb. 24: Relative Schichtdickenänderung einer 170 nm Makrolonschicht unter dem Einfluß von Methanol, Ethanol und 1-Propanol.*

Abb. 25 zeigt die vier unterschiedlich dicken Schichten unter Methanoleinfluss. Die 35 nm Schicht zeigt die stärkste Schichtdickenänderung im Langmuirteil sowie das Nachlassen des Langmuirteils bei der niedrigsten Konzentration. Da bei der 35 nm Schicht die Poren einen erheblich größeren Einfluß im Verhältnis zum Bulk haben, kann man diese Beobachtung auf den größeren Poreneinfluß zurückführen. Die große Steigung des Henryanteils wird durch Lösungserscheinungen des Polymerfilms durch den Analyten hervorgerufen. Bei zunehmender Schichtdicke ist zu beobachten, dass der Langmuiranteil durch die größere Anzahl der zur Verfügung stehenden Poren zu immer größeren Konzentrationen wandert, die relative Schichtdickenquellung aber durch das immer größer werdende Bulkverhältnis abnimmt. Ebenso kommt es zu keinen Lösungserscheinungen bei den dickeren Schichten, da diese durch mehr Bulk in der Lage sind, mehr Analytmoleküle in ihren Poren wie auch in der Matrix aufzunehmen, ohne sich dabei durch den Analyten aufzulösen.

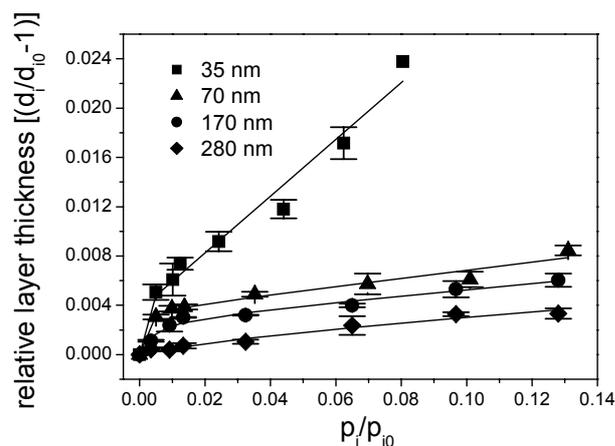


Abb. 25: Relative Schichtdickenänderungen unterschiedlich dicker Makrolon-Schichten unter dem Einfluss von Methanol.

## 4.2 Biosensorische Schichtsysteme

Die Wechselwirkungsprinzipien biosensorischer Schichtsysteme beruhen im Allgemeinen auf „Schlüssel-Schloß“-Wechselwirkungsmechanismen wie z. B.: Antigen-Antikörper-, spezifische Peptid-Protein- oder Protein-Enzym-Wechselwirkungen, bei denen es über Proteinspezifische Bindungsstellen an der Enzymoberfläche zur molekularen Erkennung kommt. DNA-DNA-Wechselwirkungen beruhen auf dem Prinzip der Hybridisierung, bei der die Basenpaare entweder für ein „match“, im Fall vom zusammenpassenden Basenpaar, oder für ein „mismatch“, im Fall von nicht komplementären Basenpaaren, sorgen.

Diese biosensorischen Wechselwirkungen können entweder markiert über Fluoreszenzmethoden (TIRF oder FRET) quantifiziert werden oder unmarkiert über Brechungsindexänderungen reflektometrisch (z. B. mit RlfS) oder refraktometrisch (z. B. mit Gitterkopplern).

Allen diesen qualitativen und quantitativen biosensorischen analytischen Methoden liegt eine definierte und reproduzierbare Oberflächenchemie zugrunde. Um die Charakterisierung dieser biosensorischen Schichten handelt es sich in diesem Kapitel.

## 4.1.2 Charakterisierung der Anbindungsmethoden und der Wechselwirkung biosensitiver Schichtsysteme

### 4.1.2.1 Anbindungsmethoden auf SiO<sub>2</sub>

#### Charakterisierung der AMD-, CMD- und PEG-Schichten

Die verwendete Oberflächenchemie wird zu großen Teilen auf Glas etabliert, da bei der reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie (RIfS) „von unten“ her durch das Substrat, welches mit einer Interferenzschicht bestehend aus TaO<sub>5</sub> modifiziert ist, hindurchgemessen wird. Durch die Verschiebung des Interferenzspektrums wird die Änderung der optischen Schichtdicke der sensitiven Schicht bestimmt (Abb. 26). Diese Änderung ist der Analytkonzentration proportional<sup>[23]</sup>.

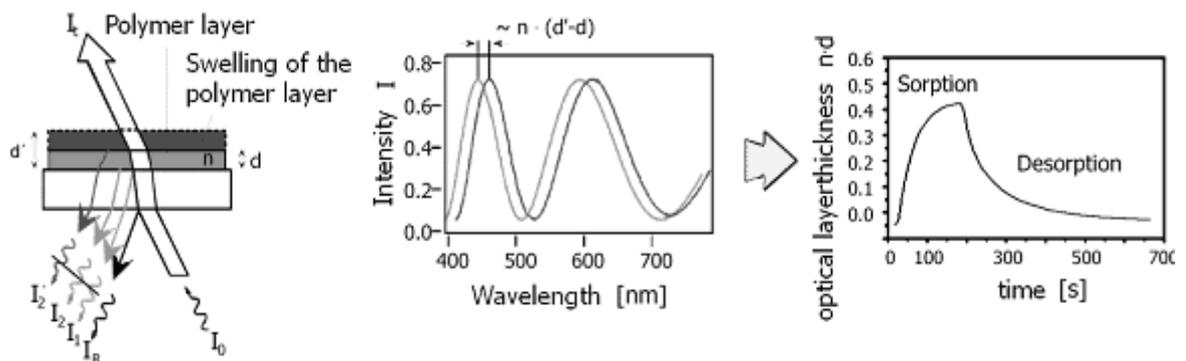


Abb. 26: RIfS-Methode.

Um genügend Interferenzhub bei der zu detektierenden Wechselwirkung des Analyten mit der sensitiven Schicht zu erlangen, muß der sensitive Bestandteil, z. B. Antikörper, Biotin oder Einzelstrang-DNA, durch eine ausreichend dicke „Trägerschicht“ an

die Glas/Substratoberfläche gebunden werden, da diese Bioschichten im Allgemeinen weit unter 100 *nm* Schichtdicke liegen <sup>[23]</sup>. Die erforderliche Schichtdicke, um ein entsprechendes auswertbares Interferenzmuster zu erlangen, liegt aber zwischen 300 *nm* und einigen  $\mu\text{m}$ . Um die Mindestschichtdicke von 300 *nm* zu erreichen wird als Substrat Glas verwendet, auf das eine Interferenzschicht bestehend aus Tantalpentoxid aufgebracht ist, die eine Schichtdicke von 10 *nm* hat. Tantalpentoxid wird verwendet, da es einen hohen Brechungsindex von 2.36 hat. Um nun die Bioschicht an das Substrat zu binden und um die Verschiebung des Interferenzspektrums durch den Effekt der Quellung zu verstärken, werden als „Trägerschichtenschichten“ der Biorezeptoren Polyethylenglykolschichten oder Dextranschichten verwendet. Diese Schichten haben den Vorteil, dass eine kovalente Anbindung der sensitiven Bestandteile der Schicht einfach durchzuführen ist und dass nichtspezifische Wechselwirkungen gehindert werden. Für diese Anwendung muß aber auch gewährleistet sein, dass diese AMD-, CMD- und PEG-Schichten eine definierte Oberflächenchemie haben, d. h. die Schichten müssen eine reproduzierbare Schichtdicke und Homogenität aufweisen. Dies wurde durch spektrale Ellipsometrie und Atomkraftmikroskopie untersucht. Da für ellipsometrische Messungen die Reflektivität des Substrates eine entscheidende Rolle spielt wurden die AMD-, CMD-, und PEG-Schichten auf Silizium-Wafer-Substraten analog den Glastransducern aufgebracht.

### PEG-Schichten

Polyethylenglykol bildet bedingt durch seine Kettenstruktur (Abb. 27) im Idealfall eine Monolage auf dem Substrat aus und ordnet sich ebenfalls im Idealfall als „Polymerrasen“ auf der Oberfläche an. Dies ergibt eine optimale Oberflächenbeladung der biosensitiven Rezeptoren von maximal einer weiteren Monolage, die an das PEG angebunden werden können. Dies führt zu einer sehr guten Eignung dieser Schichten zur Bestimmung von Wechselwirkungskinetiken, da alle Rezeptorenstellen gleich gut zugänglich sind. Ebenso zeigen diese Schichten eine hervorragende Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen <sup>[23]</sup>.

Polyethylenglykol gibt es in verschiedenen Daltongewichten und somit in unterschiedlichen Kettenlängen (siehe Abb. 27). In dieser Arbeit wurden PEG-Polymere mit 2000, 3000, 6000 und 10000 *Dalton* verwendet, die somit eine theoretische, errechnete Kettenlänge von respektive 20, 30, 60 und 100 *nm* haben.

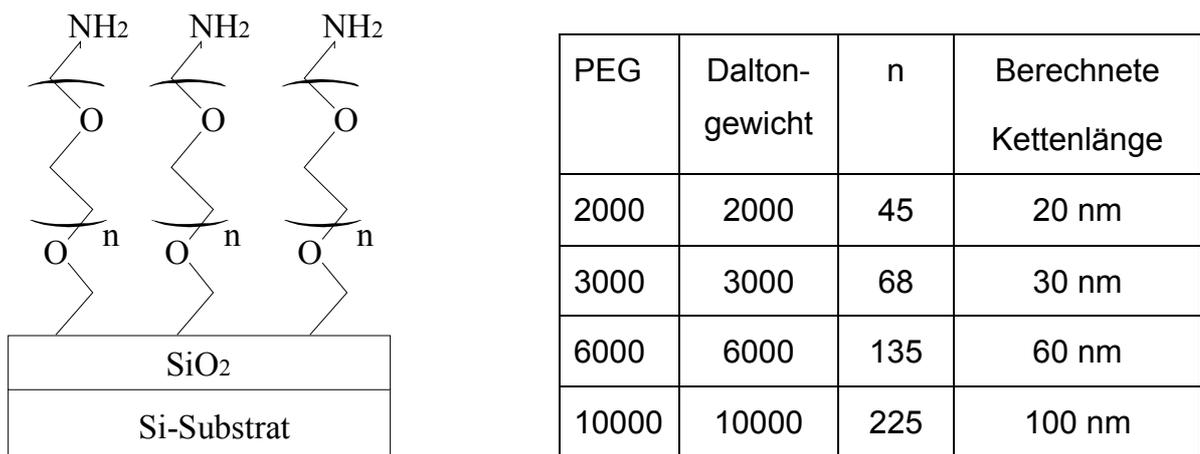
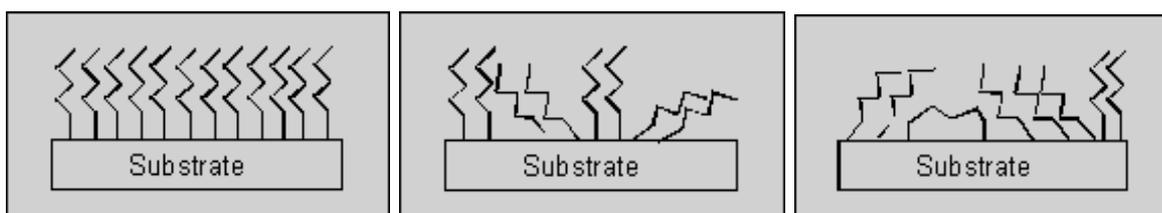


Abb. 27: Verwendete PEG-Polymere.

Es stellte sich dabei die Frage, wie die Monolage der PEG-Schichten strukturiert ist bzw. wie die PEG-Ketten sich an der Oberfläche anordnen. Es gibt verschiedene denkbare Möglichkeiten, wie das PEG sich an der Oberfläche anordnen kann (Abb. 28):

- Es bildet sich ein durchgängig homogener Polymerrasen.
- Es bildet sich ein Polymerrasen mit unterschiedlicher Ausrichtung der PEG-Ketten.
- Es kommt zu einer Inselbildung oder Knäuelbildung dadurch, dass manche der Ketten mit beiden Enden an die Oberfläche binden. Sie hindern so auf ihrer Länge andere Ketten daran auf der Oberfläche anzubinden und bieten Anhäufungsorte für andere PEG-Ketten.

Zu diesen drei Möglichkeiten der Oberflächenbelegung kommt die Frage wie sich die PEG-Schichten in Abhängigkeit der Kettenlänge anordnen.



*Abb. 28: Mögliche Oberflächenbelegungen der PEG-Ketten.*

Diese Schichten wurden mittels Spektraler Ellipsometrie an Luft und unter PBS vermessen zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindices in den entsprechenden Medien. Es wurden pro

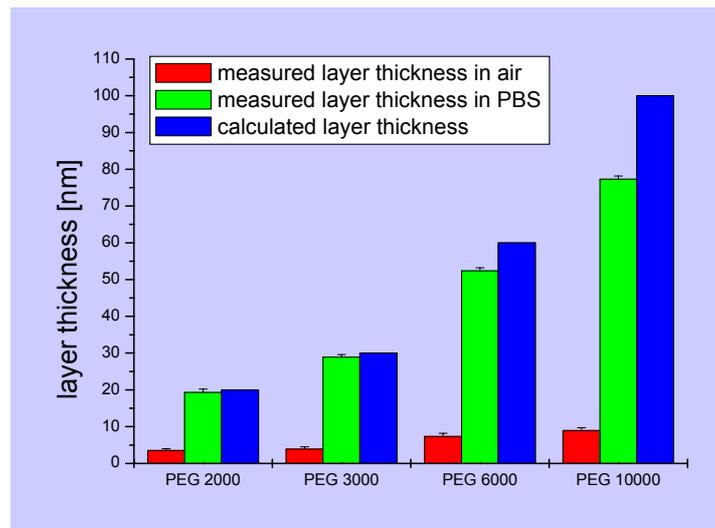
---

PEG-Art 5 Schichten präpariert und dreifach an unterschiedlichen Stellen vermessen.

Abb. 29 zeigt die Simulationsergebnisse der ellipsometrisch gemessenen Schichten in Luft (roter Balken), in PBS (grüner Balken) und die berechnete Kettenlänge (blauer Balken). Für die Simulation der PEG-Schicht in Luft wurde ein Cauchy-Model verwendet und der Brechungsindex laut Literatur auf  $n = 1.52$  konstant gesetzt <sup>[9, 23]</sup>. In PBS wurde ebenfalls ein Cauchy-Model angesetzt mit einem konstanten Brechungsindex von 1.37 <sup>[9, 23]</sup>, unter der Annahme, dass die PBS-Flüssigkeit die PEG-Ketten stabilisiert und durch eine Quellung aufrichtet. Da bei der ellipsometrischen Messung über den gesamten Messspot gemittelt wird, verursachen jegliche Inhomogitäten oder eine Domänenbildung eine Erniedrigung der Schichtdicke, während die Schichtdicke eines homogenen Polymerrasen der berechneten Kettenlänge nahe kommen müsste, dadurch, dass sich die Ketten zu ihrer vollen Länge aufrichten können.

In Luft fallen alle Schichten in sich zusammen und bilden Schichten die eine Dicke von 3-7 nm ergeben. Aufschlussreicher sind die Schichtdicken, die die PEG-Schichten in PBS erreichen, wie oben schon erwähnt. PEG 2000 und PEG 3000 erreichen mit 19nm ( $\pm 1\text{nm}$ , PEG 2000) und 28 nm ( $\pm 2\text{nm}$ , PEG 3000) an gemessener Schichtdicke sehr gut ihre berechneten Kettenlängen. Diese Schichten bilden somit eine sehr homogene rasenartige Oberfläche, ohne dabei Domänen oder Inseln auszubilden. Ebenso kann man davon ausgehen, dass sehr wenige dieser PEG-Ketten mit beiden Enden an die Oberfläche binden. Die PEG-6000 und PEG-10000 Schichten erreichen ihre berechnete Kettenlänge mit Schichtdicken von 52 nm ( $\pm$

4 nm, PEG-6000) und 76 nm ( $\pm 5$  nm, PEG-10000) nicht mehr. Mit zunehmender Kettenlänge binden die PEG-Ketten mit beiden Enden an und bedingen somit eine Inselbildung oder Domänenbildung, die verursacht, dass diese Schichten sich nicht mehr homogen zu ihrer vollen Kettenlänge aufrichten können.



*Abb. 29: Gemessene Schichtdicken der PEG-Schichten an Luft (roter Balken), in PBS (grüner Balken) und berechnete Kettenlänge (blauer Balken).*

Abb. 30 zeigt eine repräsentative AFM-Aufnahme (Tapping Mode) der PEG-2000 Schichten an Luft. Die durchgängige wolkenartige Verteilung der PEG-Stränge stimmt sehr gut mit der Schichtdickenbestimmung der ellipsometrischen Messungen an Luft überein. Das AFM-Bild zeigt eine sehr gute Oberflächenbelegung, die Wolkenstruktur kommt durch das Zusammenfallen der PEG-Ketten zustande (rote Kästen: PEG, die blauen Kästen umschliessen nicht bedeckte Oberfläche). Anhand dieser gleichmässigen Verteilung der PEG-2000 Ketten auf der Oberfläche kann es auch zu einer sehr

guten Quellung in flüssiger Phase kommen, was die ellipsometrischen Messungen in PBS bestätigen.

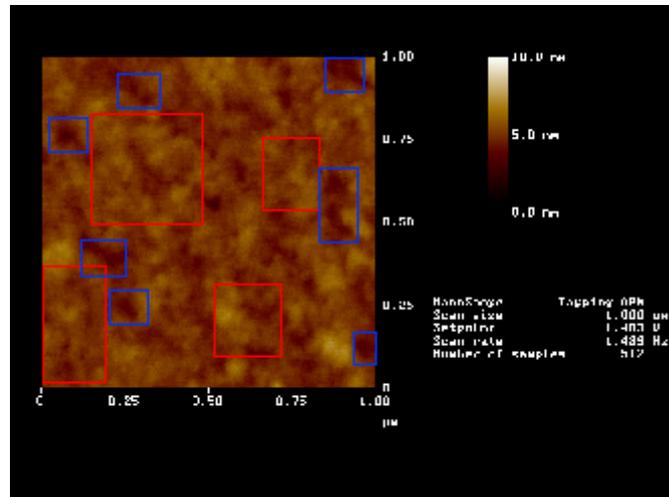


Abb. 30: Repräsentative AFM-Aufnahme der PEG-2000-Schicht.

Geht man zu den PEG-3000-Ketten so erhält man analoge Ergebnisse wie bei den PEG-2000-Ketten. Die ellipsometrischen Messungen an Luft zeigen eine Schichtdicke von 5 nm. Es ergibt sich eine höhere Schichtdicke als bei den PEG-2000 Schichten durch die 10 nm längeren Ketten.

In Abb. 31 ist ein repräsentatives AFM-Bild der PEG-3000 Schichten gezeigt, ebenfalls im Tapping Mode an Luft aufgenommen. Es zeigt wie die PEG-2000 Schichten gute Übereinstimmung mit den ellipsometrischen Messungen an Luft, was die Schichtdicke betrifft. Hier wird allerdings schon eine Akkumulierung der PEG-Ketten erkenntlich (rote Kästen). Die gelben Kästen markieren Verunreinigungen durch Staubpartikel.

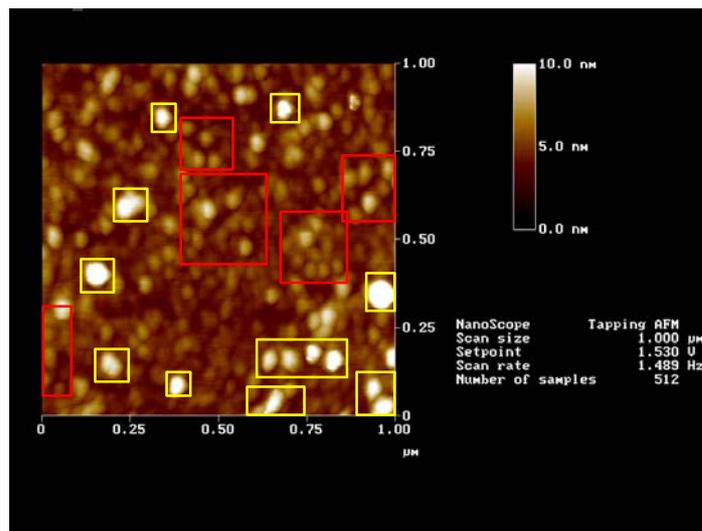


Abb. 31: Repräsentatives AFM-Bilder der PEG 3000-Schicht.

Geht man nun zu den längeren PEG-Ketten, PEG-6000 und PEG-10000, so erkennt man anhand der ellipsometrischen Messungen, dass an Luft die Schichtdicke nicht wesentlich im Vergleich zu den PEG-2000 und -3000 Schichten zunimmt. Diese geringe Schichtdicke kommt durch eine schlechte Oberflächenbelegung durch gegenseitige Hinderung der Ketten zustande und durch Anbindung der Ketten an beiden Enden. Dies wird auch bei den Messungen dieser Schichten in flüssiger Phase deutlich, da diese die berechnete Kettenlänge durch Quellung nicht mehr erreichen.

Die AFM-Bilder der PEG-6000 Schichten (Abb. 32) und PEG-10000 Schichten (Abb. 33, jeweils Tapping Mode in Luft) zeigen wieder gute Übereinstimmung mit den ellipsometrischen Messungen an Luft. Es sind aber deutliche Akkumulation der PEG-Ketten zu „Häufchen“ (rote Kästen) zu beobachten, was zu einer geringeren Quellfähigkeit dieser Schichten im Verhältnis zu ihren berechneten Kettenlängen führt. Mit gelben Umrandungen wurden wieder Verunreinigungen markiert, mit den blauen nicht oder kaum belegte Oberfläche. Vergleicht man die

Akkumulationen (gelbe Umrandungen) aus Abb. 32 mit denen aus Abb. 33 so erkennt man, dass die „Häufchen“ in Abb. 33 erwartungsgemäß größer sind.

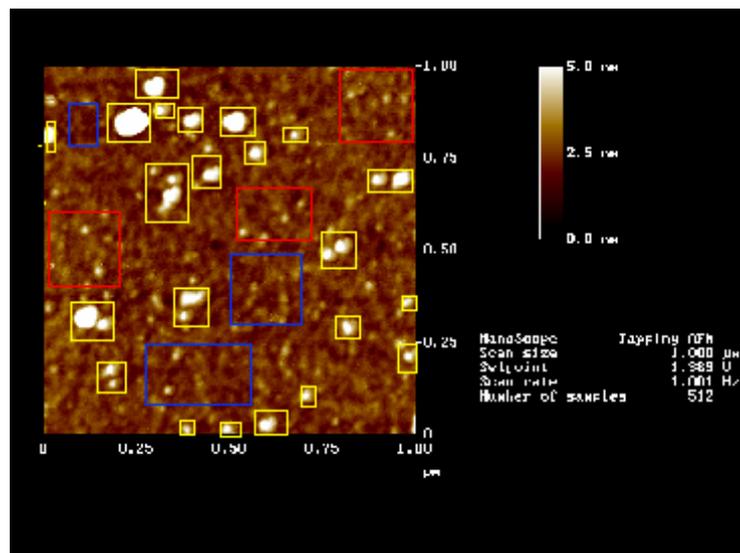


Abb. 32: Repräsentatives AFM-Bild der PEG-6000-Schicht.

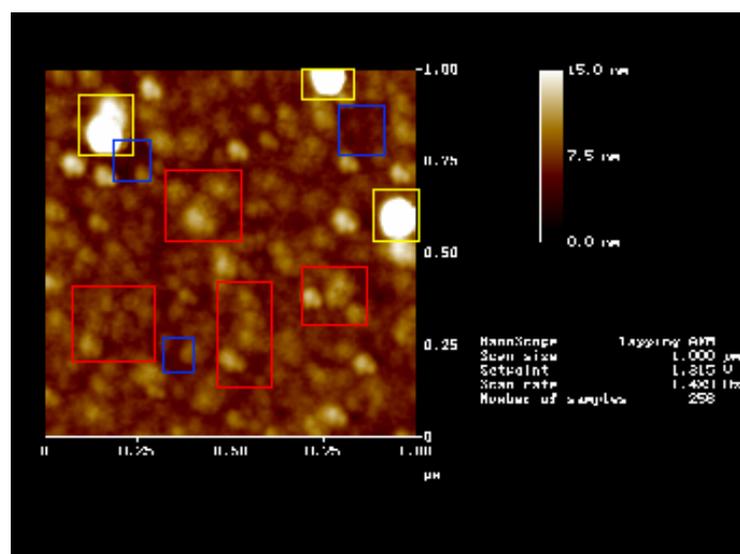


Abb. 33: Repräsentatives AFM-Bild der PEG-10000-Schicht.

Für die sensorische Anwendung bei RfS werden hauptsächlich die PEG-2000 Schichten verwendet, die eine regelmässige und reproduzierbare Oberflächenbelegung zeigten. Ebenso kann von einer geringen Anzahl an Ketten ausgegangen werden, die an beiden Enden an die Oberfläche binden, so dass die PEG-2000 Schichten eine gute Oberfläche bieten um eine weitere Monolage anzubringen, die dann z. B. aus biosensitiven Rezeptoren besteht.

Weitere Untersuchungen zur Stabilität und Formation der PEG-Schichten findet sich in [24, 25].

### *Dextran-Schichten*

Die Dextranschichten sind flexible, nicht quervernetzte Hydrogele. Werden diese Hydrogele verwendet, um biosensitive Rezeptoren anzubinden, so findet eine Detektion der biosensitiven Wechselwirkung im Bulk dieses Hydrogels statt, da sich die Anbindungsstellen über das gesamte Volumen und die Oberfläche der Dextranschicht verteilen. Dies bringt den Vorteil einer hohen Anzahl von Bindungsstellen, aber auch den Nachteil, dass nicht alle Bindungsstellen dieselbe Zugänglichkeit besitzen. Somit können die auf Hydrogel basierten biosensitiven Schichten eher für thermodynamische Messungen verwendet werden.



*Abb. 34: Modell der Dextran-Schicht mit Rezeptoren an der Oberfläche und im Bulk.*

Für diese Messungen wurden Aminodextran und Carboxymethyldextran verwendet. Es wurden von beiden Dextranen 6 Schichten präpariert und jede Schicht sowohl an Luft wie auch in flüssiger Phase an 3 unterschiedlichen Stellen ellipsometrisch vermessen. Es wurde zur Simulation der Schichtdicke ein Cauchy-Model verwendet, wobei an Luft ein Brechungsindex von  $n = 1.52$  <sup>[9, 23]</sup> konstant gesetzt wurde und in PBS von  $n = 1.38$  unter der Annahme, dass ein hoher Anteil an PBS-Lösung das Hydrogel zum Quellen bringt.

In Abb. 35 sind die ellipsometrischen Ergebnisse dargestellt. Bei CMD wie auch bei AMD wurde eine Schichtdicke von 4-6 nm an Luft bestimmt. Unter PBS verhalten sich aber beide Schichten deutlich unterschiedlich. CMD zeigt eine Quellung bis zu 150 nm während AMD bis zu 65 nm aufquillt. Da das verwendete CMD eine geringere Anzahl an Bindungsstellen hat wie das AMD, ist das CMD mit weniger Bindungsstellen an die Oberfläche gebunden als das AMD. Dadurch kann das CMD zu einer höheren Schichtdicke quellen als das AMD. Die Reproduzierbarkeit der Quellung liegt innerhalb 2 nm, was durch 3 wiederholte Messungen der Quellung der AMD- und CMD-Schichten bestimmt wurde.

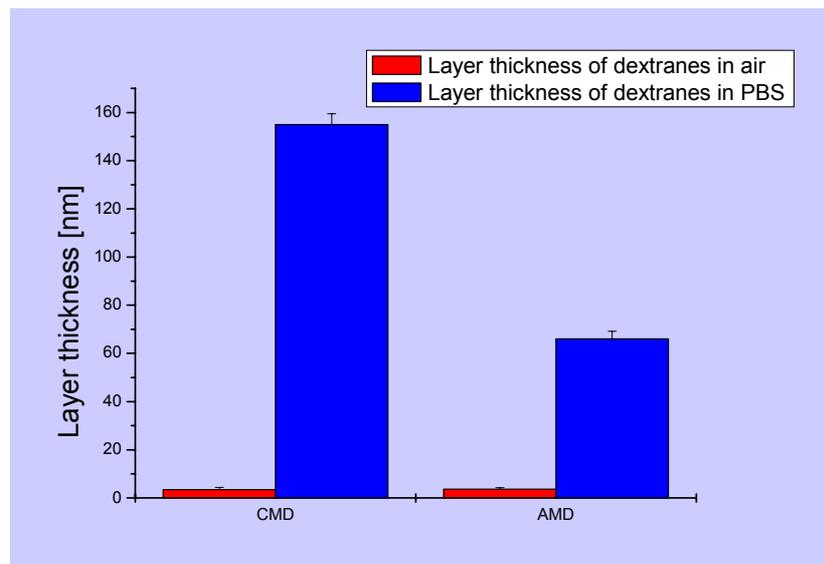


Abb. 35: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Dextran-Schichten an Luft (rot) und in PBS (blau).

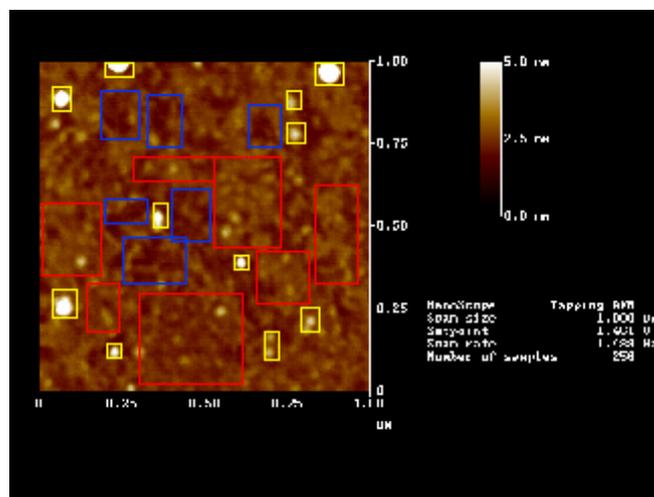


Abb. 36: Repräsentatives AFM-Bild der AMD-Schicht.

Abb. 36 und 37 sind AFM-Aufnahmen der AMD und CMD Oberflächen (Tapping Mode, in Luft). Abb 36. zeigt, dass das AMD sich mehr auf

der Oberfläche verteilt, obwohl es auch zu einer Patch-Bildung kommt. Die roten Umrandungen markieren dabei AMD-Patches, gelbe Verunreinigungen durch Staubpartikel, blaue nicht belegte Oberfläche. Durch die geringere Anzahl an Bindungsstellen weist das CMD eine deutlichere Akkumulation und Patch-Bildung an der Oberfläche auf als das AMD (rote Umrandungen in Abb. 37). Die AFM-Aufnahmen zeigen somit eine gute Übereinstimmung mit den ellipsometrischen Ergebnissen.

Die Dextranschichten haben eine gute Homogenität in flüssiger Phase, wenn sie auch an Luft eine nicht homogene Oberflächenbelegung durch Akkumulation zeigen, bedingt durch ihre Struktur und Anzahl an Bindungsstellen.

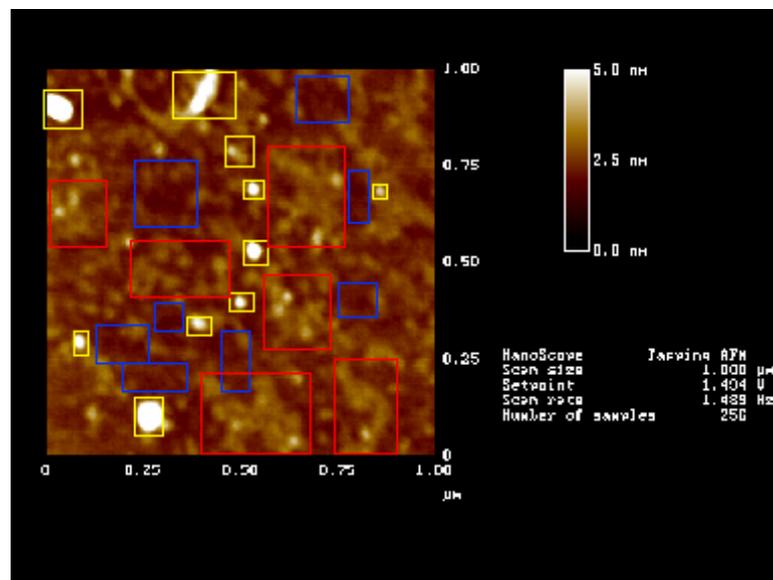


Abb. 37: Repräsentatives AFM-Bild der CMD-Schicht.

Aufgrund dieser Untersuchungen zur Homogenität und Reproduzierbarkeit der „Trägerschichten“ AMD, CMD und PEG

konnten anschliessend unterschiedliche biosensitive Schichtsysteme charakterisiert werden.

### *Charakterisierung von DNA-PNA-Wechselwirkungen auf SiO<sub>2</sub>*

Der Schichtaufbau der biosensorischen Schicht zur match-mismatch Bestimmung von 20-mer DNA-Strängen ist in Abb. 38 beschrieben. Weitere Untersuchungen zu diesem Schichtsystem und DNA/PNA-Wechselwirkungen findet sich in [26, 27]. Peptidnukleinsäure hat im Vergleich zu DNA ein ungeladenes aus Peptiden aufgebautes Rückgrat und ist hydrophober als DNA. Es weist jedoch als Ankermolekül auf Sensoroberflächen eine erheblich längere Oberflächenstabilität von 16 Wochen bis zu einem halben Jahr im Vergleich zu 2 Wochen bei DNA-Ankermolekülen auf. Im Folgenden wurden PNA- wie auch DNA-Ankermoleküle auf AMD-Sensoroberflächen immobilisiert und mit den entsprechenden DNA- und PNA-Strängen hybridisiert. Jeder Präparationsschritt wurde ellipsometrisch charakterisiert und die biosensorischen Schichten wurden dann unter PBS-Puffer, wie bei den RfS-Messungen, vermessen. Ebenso wurde mit der Hybridisierung verfahren.

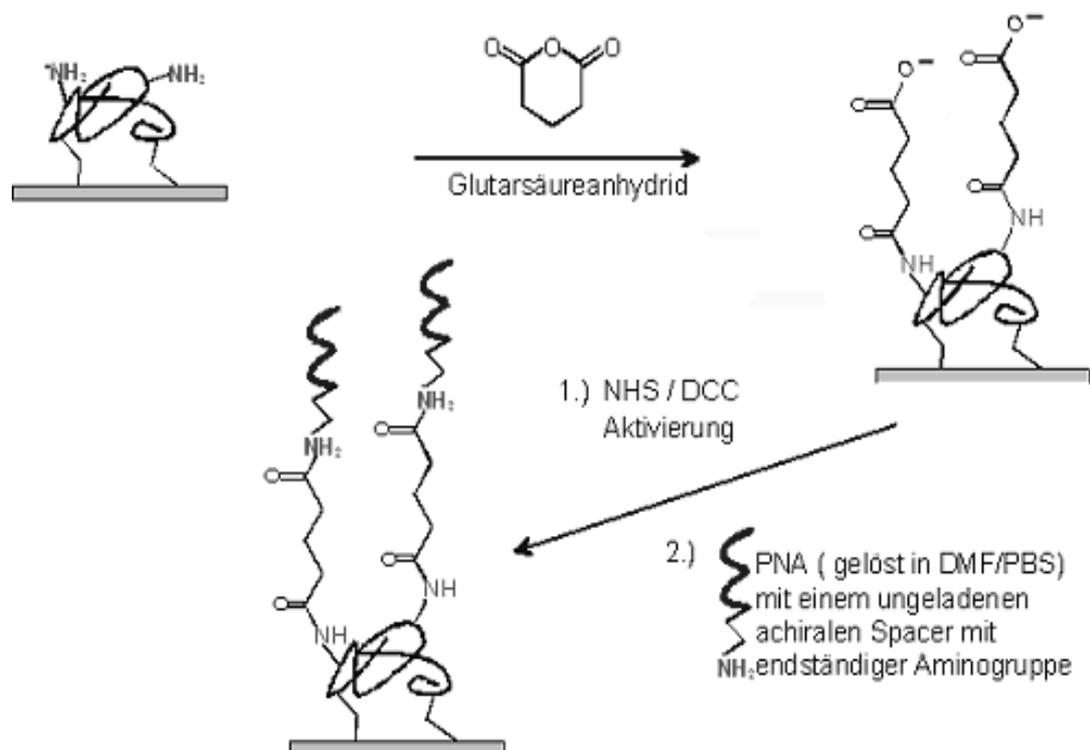
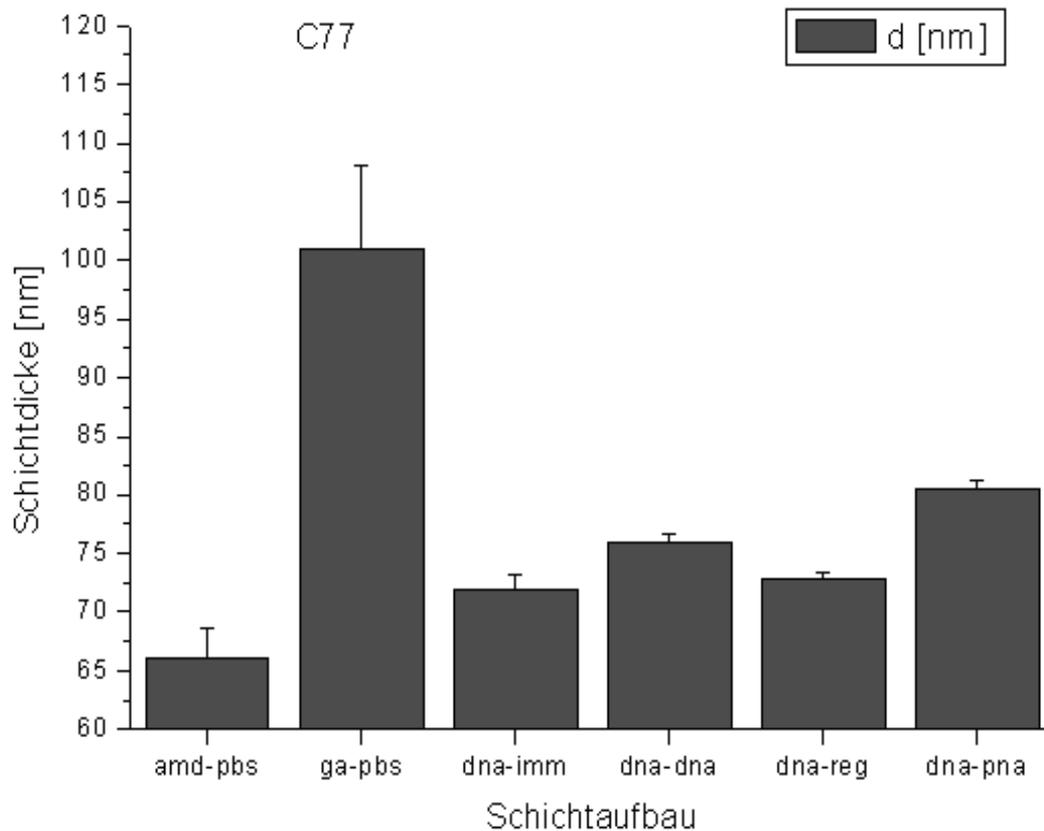


Abb. 38: Schichtaufbau zur DNA-match-mismatch-Bestimmung.

Die sensitive Schicht wurde als homogene Schicht mit einem Cauchy-Model parametrisiert. Wegen des hohen Korrelationskoeffizienten zwischen Brechungsindex und Schichtdicke bei Schichten unter hundert Nanometern wurde der Brechungsindex mit 1.44 vorgegeben [28, 29, 30] und die Änderung der optischen Eigenschaften  $n$  und  $d$  nur über eine Änderung der Schichtdicke simuliert.

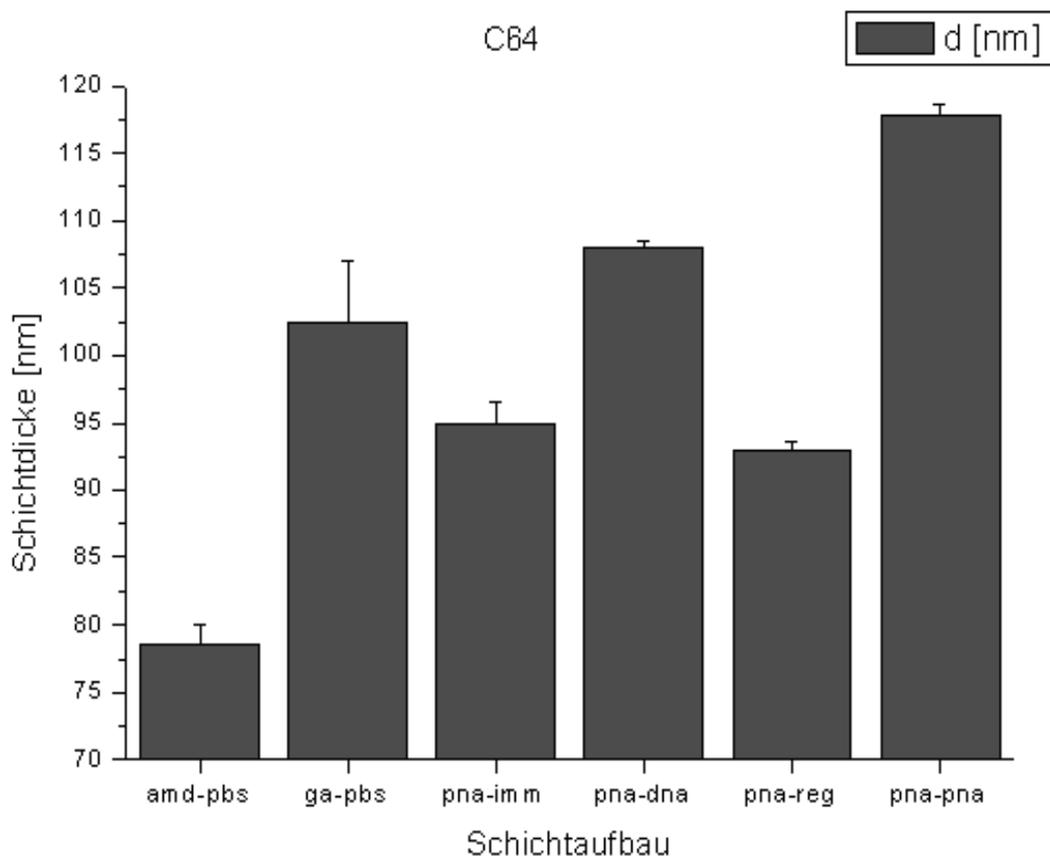


*Abb. 39: Ellipsometrische Messungen des Schichtaufbaus eines DNA-Chips.*

Die Abb. 39 zeigt Messungen auf einem DNA-Chip, Abb. 40 Messungen auf einem PNA-Chip. Die Messungen wurden in einer mit PBS gefüllten Messkammer durchgeführt, so dass der Quellungsstatus der Schichten mit dem bei RfS-Messungen verglichen werden konnte.

Die Dextranoberflächen ergaben je nach Charge Schichtdicken im wässrigen Zustand zwischen 60 und 80 nm. Nach der Umsetzung der Aminogruppen der Dextranschicht mit Glutarsäureanhydrid wurde in allen Fällen ein starker Anstieg der Schichtdicke beobachtet. Auf

Grund der Einführung der negativen Carboxygruppen auf der Oberfläche, welche sich voneinander abstießen, konnte eine starke Quellung der Dextranschicht beobachtet werden. Auf Polyethylenglykolschichten war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, da diese nur Monolagen ausbilden. Nach der Aktivierung



*Abb. 40: Ellipsometrische Messungen des Schichtaufbaus eines PNA-Chips.*

der Schicht mit NHS/DIC und der Anbindung der DNA bzw. PNA sank die Schichtdicke wieder, da viele der negativ geladenen Carboxygruppen jetzt mit der DNA bzw. PNA oder nicht umgesetzten

NHS/DIC abgesättigt waren. Die Hybridisierung der DNA an die immobilisierten DNA- oder PNA-Moleküle konnte ebenfalls mit Ellipsometrie vermessen werden. Die Hybridisierung von DNA auf DNA Oberflächen ergab eine Änderung um  $5\text{ nm}$ , während die Hybridisierung von DNA an die PNA-Oberfläche eine Änderung von mehr als  $10\text{ nm}$  ergab. Wegen dem negativ geladenen Rückgrat der DNA kommt es bei der DNA-DNA- Wechselwirkung aufgrund des ungeladenen Rückgrats der PNA zu rein elektrostatischen Abstoßungen, die bei der PNA-DNA-Wechselwirkung nicht vorkommen. Deshalb kommt es auf der PNA-Oberfläche zu einer größeren Schichtdickenzunahme bei DNA-Hybridisierung.

Nach der Regenerierung der Schicht wird die Ausgangsschichtdicke wieder erreicht. Bei DNA Oberflächen wird nach der Regenerierung exakt die Ausgangsschichtdicke vor der Hybridisierung erreicht, während bei PNA-Oberflächen eine geringere physikalische Schichtdicke als vor der Hybridisierung vermessen wird. Ein Grund ist die unvollständige Entfernung von nicht kovalent gebundenen PNA-Molekülen von der Oberfläche direkt nach der Immobilisierung. Als letzter Schritt wurde bei beiden Oberflächen die Hybridisierung mit PNA vermessen. Bei DNA Oberflächen ergab dies eine im Vergleich zur DNA/DNA Hybridisierung doppelt so große Schichtdickenänderung. Bei der PNA/PNA Hybridisierung wurde ebenfalls im Vergleich zur PNA/DNA Hybridisierung doppelt so große Schichtdickenänderung verfolgt. Die Erhöhung der Schichtdicke bei Hybridisierung von PNA auf dem DNA Chip entspricht der Hybridisierung von DNA auf PNA Oberflächen. Damit konnte die Hybridisierung von entsprechenden PNA- und DNA-Strängen auf DNA- und PNA-Sensoroberflächen charakterisiert werden.

---

#### 4.1.2.2 Anbindungsmethoden auf TOPAS

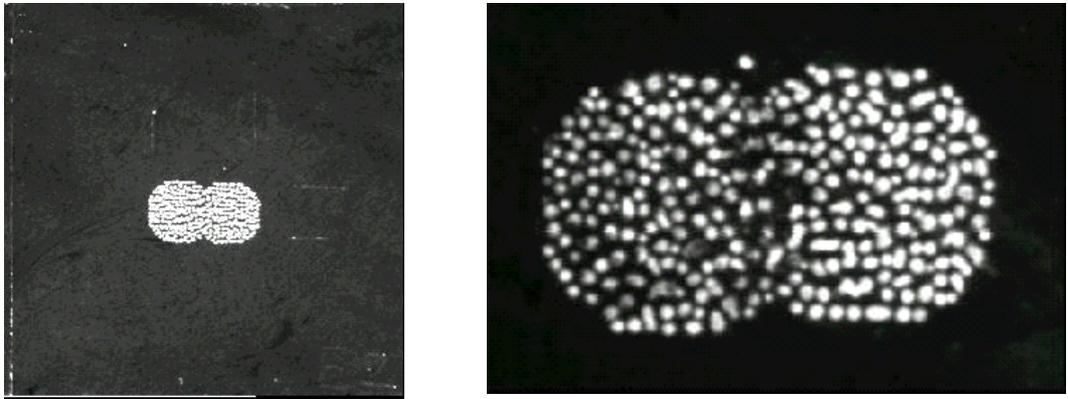
TOPAS ist ein Cycloolefin-Copolymer, das sich aus den Monomeren Ethylen und Norbornen zusammensetzt. Die Monomere wechseln sich in den Polymerketten streng regelmäßig ab. Da es sich ausschließlich aus Kohlenstoff und Wasserstoff zusammensetzt, entstehen beim Recycling oder bei der thermischen Verwertung keinerlei toxische Nebenprodukte. TOPAS gehört zu den thermoplastischen Kunststoffen und als besondere Eigenschaft ist es ein hochtransparentes Polymer ab Wellenlängen über 300 nm<sup>[31, 32]</sup>. Es ist chemisch resistent gegenüber Hydrolyse, Säuren und polaren organischen Lösungsmitteln und nimmt im Vergleich zu z. B. PMMA sehr wenig Wasser durch Quellung auf. Diese Eigenschaften machen TOPAS sehr attraktiv für lab-on-chip-Systeme oder als Substrat für biosensorische Anwendungen.

Innerhalb der BMBF-Projekte MOBA und NanoMap wurde TOPAS als Substrat für die biosensorische Anwendung aus oben genannten Gründen gewählt. Die Charakterisierung des Schichtaufbaus der biosensorischen Schicht erfolgte mit Ellipsometrie zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindices, Kontaktwinkelmessungen zur Bestimmung der Oberflächenspannungen und Oberflächenbelegungen und AFM-Messungen zur Abbildung der Oberfläche.

Da bei Kunststoff bisherige Aktivierungsschritte wie 15-minütige Bäder in Piranha-Lösung wegen seiner Empfindlichkeit nicht verwendet werden dürfen, mußte zu photochemischen Reaktionen mit an Photolinkern gebundener DNA oder AMD übergegangen werden. Die Immobilisierung geschieht dann durch Bestrahlen des Transducers mit Licht.

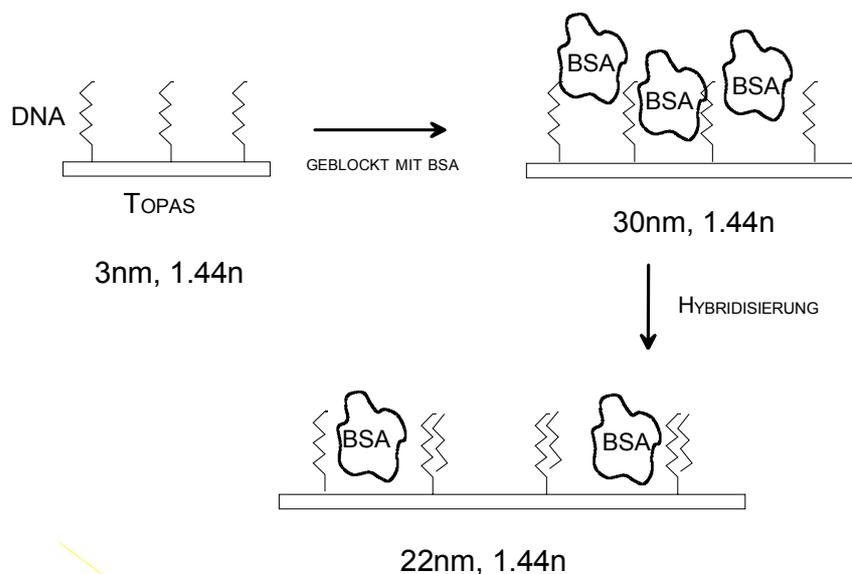
### *Charakterisierung einer DNA sensitiven Beschichtung auf TOPAS*

Die Bioschichten wurden auf schwarz eingefärbte TOPAS-Stücke (1,5\*1,5 cm Größe) per Photolinker kovalent angebunden. Die schwarze Einfärbung verhindert Reflexionverluste des Substrates bei der ellipsometrischen Messung. Bei den DNA-Schichten wurde auf die bisher übliche AMD-Schicht verzichtet, da die DNA hier direkt durch den Photolinker an die Oberfläche gebunden werden kann. Nach jedem Präparationsschritt wurde die Schicht vermessen und mit einem Cauchy-Modell die Schichtdicke und Brechungsindex simuliert. Alle Messungen wurden an Luft gemessen. Da es sich wieder um Schichten handelte, die eine Schichtdicke weit unter 100 nm haben, musste der Brechungsindex für jede Schicht konstant gehalten werden. Es wurde ein NK-File des Substrates TOPAS erstellt und anschliessend der Schichtaufbau vermessen. So ergibt sich für die photogelinkte Einzelstrang-DNA eine Schichtdicke von 3 nm unter Vorgabe des Brechungsindex von  $n = 1.44$ . Die Vorgabe des Wertes von 1.44 für den Brechungsindex ist anhand von Literaturdaten<sup>[28,29,30]</sup> üblich für Bio- und DNA-Schichten in Luft. Anschließend wird die Einzelstrang-DNA-Schicht mit dem Protein BSA geblockt, so daß nur das BSA die Hybridisierungsstellen blockiert und nicht etwa Staubpartikel oder andere störende Partikel. Diese blockierende BSA-Schicht hat eine Schichtdicke von bis zu 30 nm ebenfalls unter Vorgabe des Brechungsindex von  $n = 1.44$ . Die anschließende Hybridisierung ergab eine, durch die teilweise Verdrängung der BSA-Moleküle durch den Komplementärstrang der DNA, erwartete Schichtdickenabnahme auf 22 nm bei vorgegebenem Brechungsindex von  $n = 1.44$ .



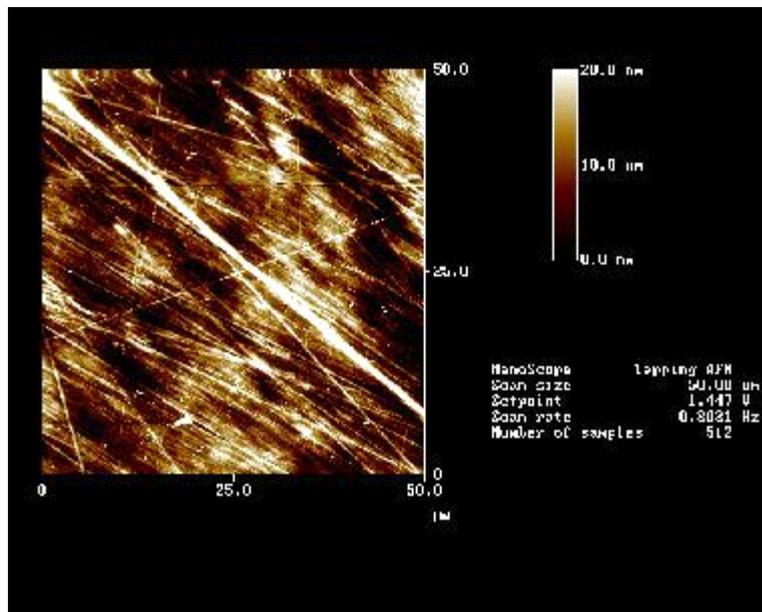
*Abb. 41: links) Fluoreszenzaufnahme des ganzen TOPAS-Slide, rechts) Fluoreszenzaufnahme des Messspots.*

Abb. 41 zeigt Fluoreszenzaufnahmen der per Mikrodropverfahren aufgetragenen DNA-Schicht, wobei sowohl das ganze TOPAS-Slide wie auch nur der eigentlichen Messspot gezeigt ist. Abb. 42 zeigt das Schichtmodell und die ellipsometrisch simulierten Ergebnisse.



*Abb. 42: Schichtmodell und Ergebnisse der ellipsometrischen Messungen von DNA auf TOPAS*

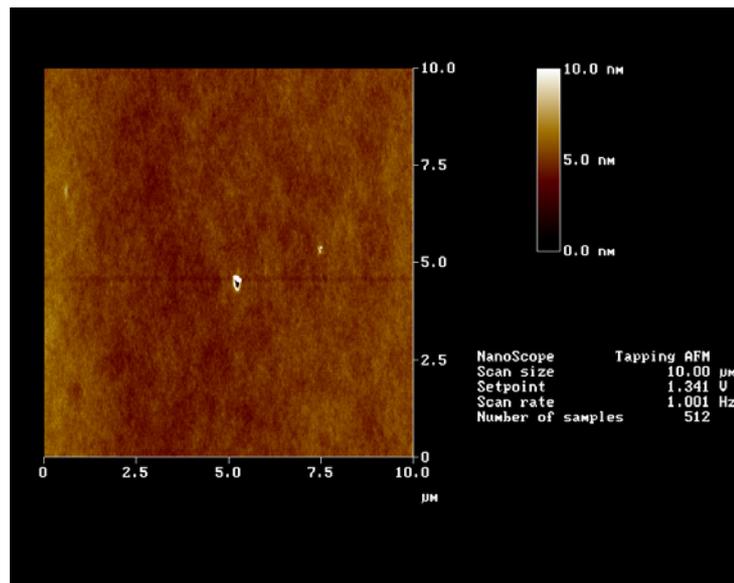
Zur Oberflächencharakterisierung des Schichtaufbaus wurden AFM-Aufnahmen der jeweils aufgetragenen Schichten gemacht. Das im Spritzgussverfahren hergestellte TOPAS Substrat (Abb. 43) zeigt dabei eine raue und unregelmäßige Oberflächentopographie auf der ein weiterer Schichtaufbau mit DNA-Einzelsträngen nicht mehr auflösen ist.



*Abb. 43: AFM-Aufnahme von TOPAS-Substrat, hergestellt im Spritzgussverfahren.*

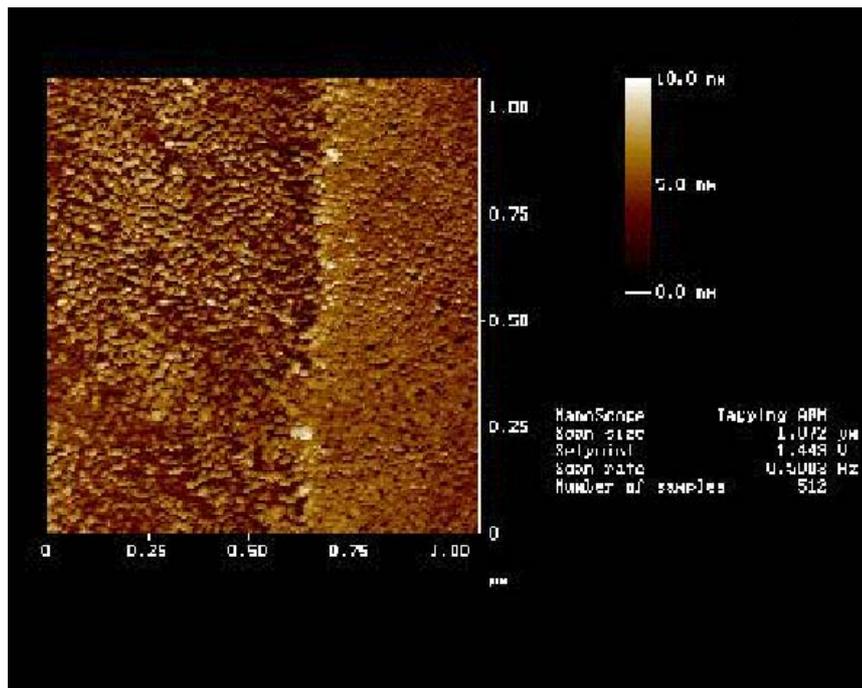
Um eine homogenere TOPAS-Oberfläche für die AFM-Aufnahmen zu gewährleisten, wurde eine 5%-ige TOPAS-Lösung in Toluol hergestellt und per Spin-Coating auf Glimmer aufgebracht (Abb. 44). Um sicher zu gehen, dass die gecoatete TOPAS-Schicht tatsächlich auf dem Glimmer haftet, wurden Kontaktwinkelmessungen mit bidestilliertem Wasser als Prüfflüssigkeit durchgeführt. Glimmer ist sehr hydrophil. Deshalb konnte kein Kontaktwinkel bestimmt werden, da der Tropfen sofort spreitete. Der Kontaktwinkel von Spritzguß-TOPAS lies sich zu

$92^\circ \pm 2^\circ$  bestimmen, also ist TOPAS sehr hydrophob, was in sehr guter Übereinstimmung zu seiner Unlöslichkeit in polaren Lösungsmitteln steht. Die gecoatete TOPAS-Schicht auf Glimmer wies ebenfalls einen Kontaktwinkel von  $92^\circ \pm 2^\circ$  auf und somit wurde die TOPAS-Schicht erfolgreich auf Glimmer aufgezogen.



*Abb. 44: Spin-gecoatetes TOPAS.*

Auf diese auf Glimmer aufgezogenen TOPAS-Schichten wurde DNA immobilisiert nach der gleichen Präparationsvorschrift wie bei den im Spritzgussverfahren hergestellten TOPAS-Slides. Kontaktwinkelmessungen dieser mit DNA beschichteten TOPAS-Substrate ergaben jeweils einen Kontaktwinkel von  $32^\circ (\pm 2^\circ)$ . Auf beiden Substraten ist somit die DNA erfolgreich per Photolinker kovalent angebunden worden, da DNA im Vergleich zu TOPAS sehr hydrophil ist. Durch die Anbindung der DNA wird somit eine hydrophilere Oberfläche geschaffen und der Kontaktwinkel sinkt bis auf die bestimmten  $32^\circ (\pm 2^\circ)$  ab. In Abb. 45 - 47 sind AFM-Aufnahmen der DNA-bespotteten gecoateten TOPAS-Schichten abgebildet. Die Abbildungen zeigen



*Abb. 45: 1\*1 μm, DNA-Spot.*

eine Kante eines DNA Spots, der ca einen Durchmesser von 100 μm hat und der Abstand von Spot zu Spot beträgt ca. 100 μm. Die Spots werden mit einer Mikrodromanlage auf das gecoatete TOPAS aufgebracht und dann per UV-Bestrahlung photogelinkt. Abb. 45 zeigt eine Aufnahme der Kante über einen Scanbereich von 1 μm\*1 μm.

Die Kante verläuft nicht scharf, obwohl ein deutlicher Oberflächenbelegungsunterschied links und rechts der Kante erkannt werden kann. Diese unscharfe Kante kann durch das Aufspotten entstehen, wenn die DNA-Lösung auf das Substrat geschossen wird.

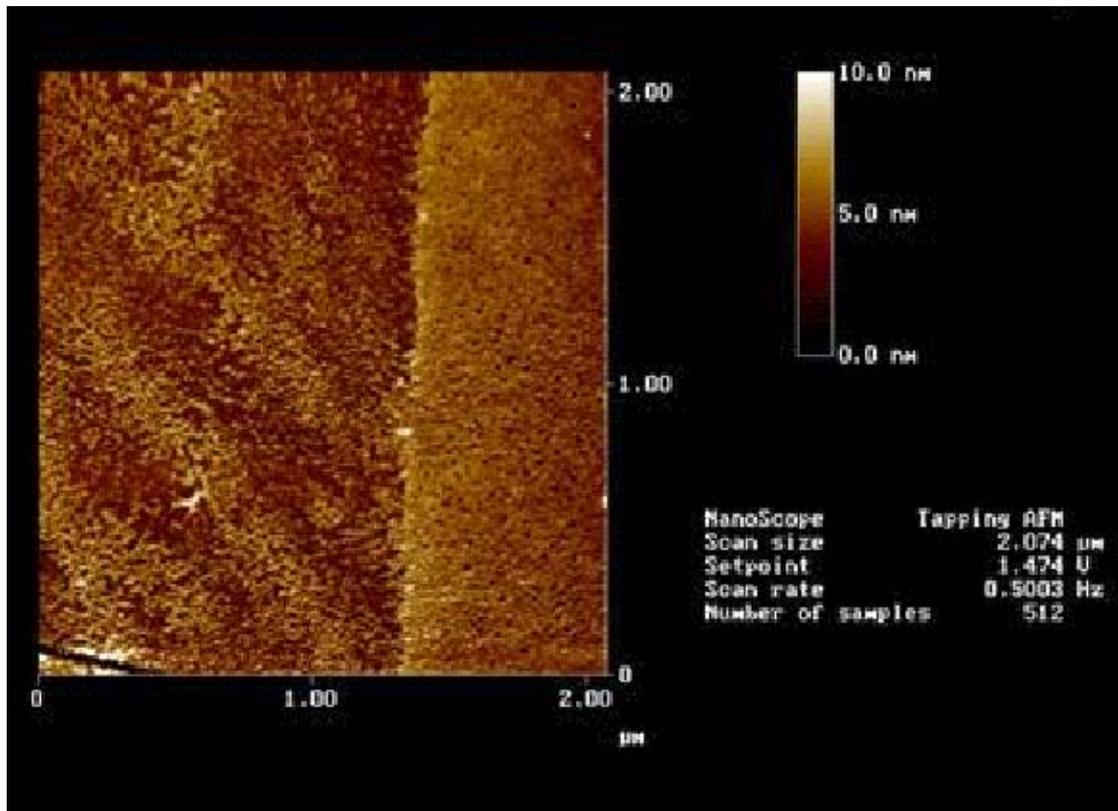
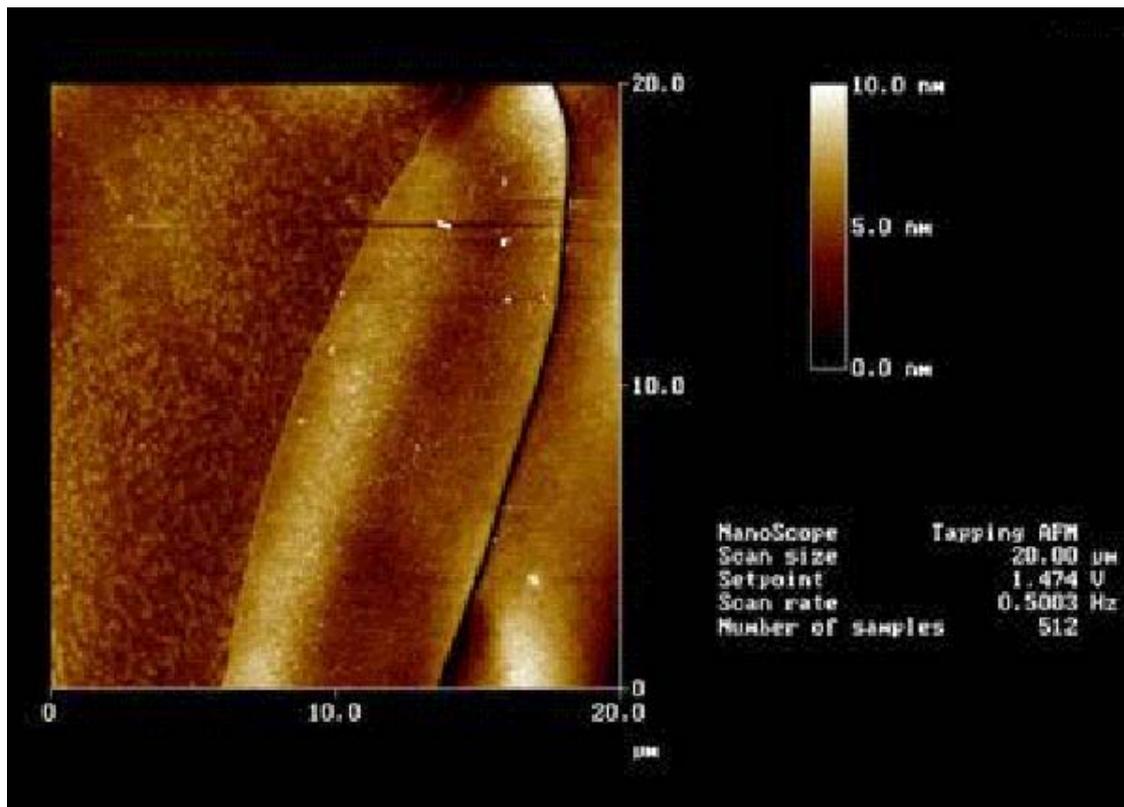


Abb. 46: 2\*2  $\mu\text{m}$ , DNA-Spot.

Beim Aufprall des Tropfens werden DNA-Moleküle in der Nähe des Spot-Tropfens über die Oberfläche geschleudert und dadurch wird die Kante unscharf. Ausserdem kann die AFM-Spitze beim Abbilden im Tapping Mode nicht kovalent angebundene DNA-Moleküle aufnehmen und über die Kante hinaustragen und dort durch Kontakt mit der Oberfläche wieder absetzen. Abb. 47 zeigt deutlich die Krümmung des Spots. In einem Abstand von ca. 5  $\mu\text{m}$  von der Kante nimmt dann die Oberflächenkontamination mit DNA-Strängen außerhalb des eigentlichen DNA - Spots ab (oberer linker Rand, Abb. 47).



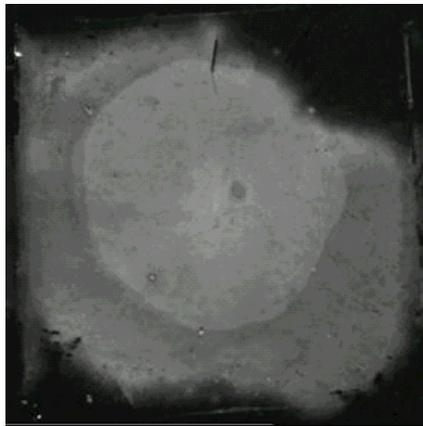
*Abb. 47: 20\*20 μm, DNA-Spot, links oben nimmt die Belegung mit DNA-Molekülen ausserhalb des Spots ab.*

Der schwarze Graben, der sich durch quer den DNA – Spot in Abb. 47 zieht, rührt von dem Substrat Glimmer her. Der Glimmer ist nur in Domänen atomar flach und durch diese Domänengrenzen kann es zu Gräben oder Rissen kommen. Ein solcher Riss ist in Abb. 47 zu sehen.

---

### *Charakterisierung einer Biotin – Streptavidin – Schicht auf TOPAS*

Um die Oberflächenchemie auf TOPAS der auf Silizium anzupassen, wurde versucht AMD ebenfalls per Photolinker kovalent an die Oberfläche zu binden. Anschließend wurde die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung auf dieser AMD-Schicht untersucht. Der Schichtaufbau wurde wieder nach jeder neuen Schichtpräparation ellipsometrisch charakterisiert. Zuerst wurde ein NK-File des TOPAS-

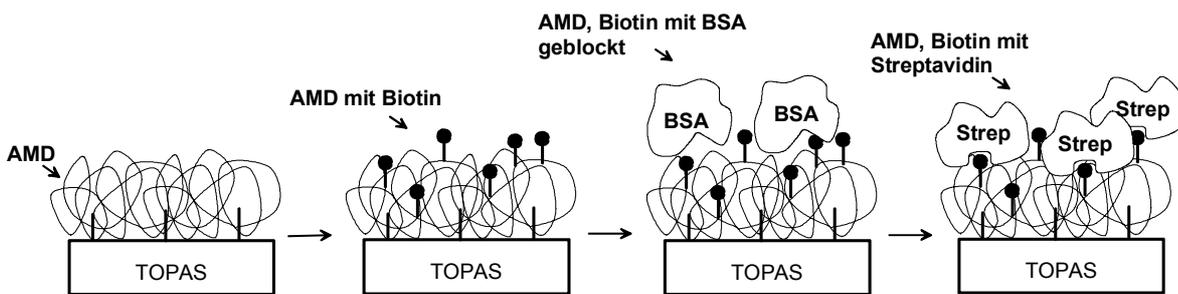


*Abb. 48: Fluoreszenzbild von Cy5-markierter Streptavidin-Bindung auf biotinyliertem AMD.*

Substrates mit der Filmwizard 32 Software erstellt, wie oben schon erwähnt. Jede weitere Schichtmodifikation wurde als homogene Schicht mit eine Cauchy-Parametrisierung simuliert, wobei der Brechungsindex bei 1.44 festgesetzt wurde, siehe oben. Nur die Schichtdicke wurde zur Anpassung freigegeben. Für die photogelinkte AMD-Schicht ergab sich so eine Schichtdicke von 2.7 nm, die biotinylierte AMD-Schicht ergab eine Schichtdickenzunahme von 0.9 nm. Die biotinylierte AMD-Schicht wurde ebenfalls mit BSA, aus

denselben Gründen wie bei den DNA- Schichten geblockt (siehe oben). Da das AMD aber eine sehr gute Hinderung der unspezifischen Wechselwirkung zeigt, ist hier die Schichtdickenzunahme durch das BSA, im Vergleich zur Schichtdickenzunahme bei den DNA-Schichten, sehr gering. Die anschließende Bindung des Cy5-markierten Peptides Streptavidins an die biotinylierte AMD-Schicht (Abb. 49) ergab eine starke Schichtdickenzunahme auf 16-20 nm.

### Schichtaufbau



### Schichtmodell und Ergebnisse

AMD, Cauchy, n=1.44, d=2.7nm	AMD-Biotin, Cauchy, n=1.44, d=3.6nm	AMD-Biotin-BSA, Cauchy, n=1.44, d=4.1nm	AMD-Biotin-Strep., Cauchy, n=1.44, d=16-20nm
TOPAS	TOPAS	TOPAS	TOPAS

Abb. 49: Schichtaufbau und Schichtmodell der Biotin-Streptavidin-biosensitiven Schicht.

---

## 4.2 Charakterisierung des Schichtaufbaus zur Optimierung einer bioaktiven zahnmedizinischen Beschichtung

Titan ist eines der erfolgreichsten Materialien in der Implantattechnologie. Die Mechanismen, die zu der hervorragenden Biokompatibilität des Titans beitragen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Der allgemeine Mechanismus, der die Implantatintegration in den menschlichen Körper bisher erklärt, ist folgender: nachdem das Implantat mit dem menschlichen Gewebe in Kontakt gekommen ist adsorbieren Proteine auf der Implantatoberfläche innerhalb von Sekunden <sup>[33]</sup>. Anschließend kommt es zu einer Wechselwirkung von Zellen mit der adsorbierten Proteinschicht auf dem Implantat. Die Biokompatibilität eines Implantats wird also maßgeblich durch die Eigenschaft bestimmt, wie gut Proteine auf der Implantat Oberfläche adsorbieren können. Diese Eigenschaft des Implantats kann man durch die Beschichtung des Implantats mit einer bioaktiven Schicht beeinflussen.

Das umgebende Zellgewebe bildet die biologische, organische Abdichtung zwischen der potentiell schädlichen oralen Kavität und dem Körper. Der schnelle Aufbau einer undurchlässigen Abdichtung durch Zahnfleischfibroblasten und Zellgewebe mit dem Implantat ist besonders ausschlaggebend für die Langzeitstabilität und erfolgreichen Einbau des Implantats. Unterschiedliche Eigenschaften der Implantatoberfläche können nun zu unterschiedlichen Ansprechverhalten auf zelluläre Ebene führen. Deshalb wurde auf diesem Gebiet in letzter Zeit sehr viele Untersuchungen durchgeführt <sup>[34, 35, 36]</sup>.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Verbesserung der Zelladhäsion und des Zellwachstums auf Implantatoberflächen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Implantatoberfläche zu mikrostrukturieren und durch rein mechanische Wechselwirkung, auch „Contactguidance“ genannt, die Zellanheftung positiv zu beeinflussen. Unterschiedliche Zelltypen, z. B.: Fibroblasten, Gewebezellen und Makrophagen, und deren Reaktionen zu unterschiedlichen Oberflächentopographien wurden in [38, 39] untersucht. Die Mechanismen, die hinter diesen Reaktionen stehen, wurden jedoch noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist jedoch die Tatsache, daß sie von Zelltyp zu Zelltyp variieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Implantatoberfläche mit einer bioaktiven Schicht zu beschichten. Dies war unser Ansatz innerhalb eines DFG-Projektes in Zusammenarbeit mit dem Institut für Prosthodontik der Zahnmedizinischen Klinik. Diese bioaktive Schicht soll eine zellfreundliche Oberfläche auf dem Implantat generieren und somit die Zellanheftung und deren Wachstum fördern. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Titanoberfläche nicht strukturiert werden muß und die kovalente Anbindung der bioaktiven Schicht sehr einfach zu erreichen ist. Als bioaktive Komponente der Beschichtung der Titanoberflächen wurde Fibronectin gewählt. Fibronectin ist ein adhesives, großes Glykoprotein, das spezifische Bindungsstellen für Rezeptoren von Zelloberflächen oder anderen matrixbildenden Molekülen besitzt. Um die bioaktive Beschichtung der Titanoberflächen zu charakterisieren und zu optimieren wurden alle Präparationsschritte mittels AFM untersucht. Die Präparation der Titan- und Titandioxidschicht mittels Elektronenstrahlverdampfung und

Plasmaveraschung wurden mit AFM und Spektraler Ellipsometrie untersucht.

#### 4.2.1 Das Substrat

Als Substrat wurde Glas verwendet, da die gleichen Transducer für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet wurden. In Abb. 50 sind Abbildungen von ungereinigtem und gereinigtem Glassubstrat zu sehen. Die Kristallite auf dem ungereinigten Glassubstrat stammen von dem Herstellungsprozess der Glasslides, die auf einem Kupferblech ausgezogen werden. Daher ist es gut möglich, dass sich Kupferkristalle an der Glasoberfläche bilden. Diese werden durch Reinigung in Piranha im Ultraschallbad entfernt.

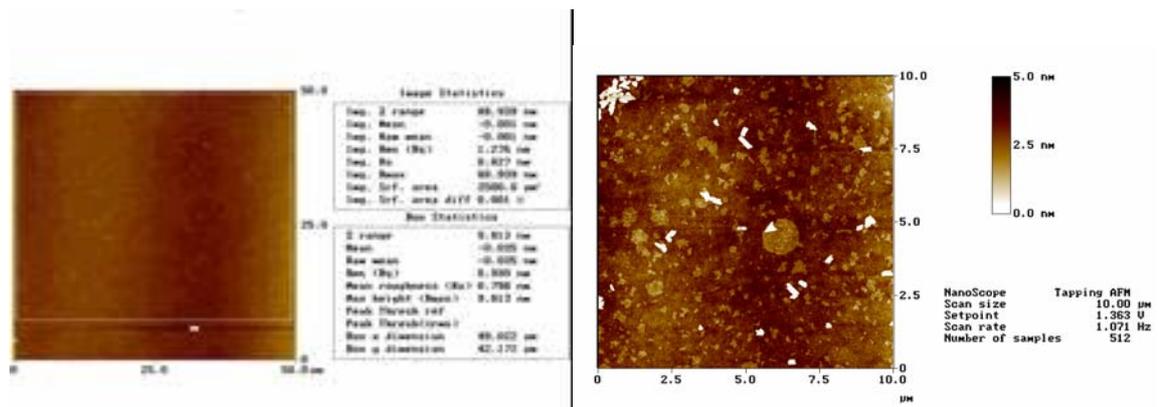


Abb. 50: links: ungereinigtes Glas, rechts: nach der Reinigung.

#### 4.2.2 Die Titan/Titandioxidschicht

Die Titanoberfläche wurde gewählt, da sie das am häufigsten verwendete und erfolgreichste Implantatmaterial darstellt. Die durchschnittliche Oberflächenrauigkeit von 4 nm, die durch AFM-Aufnahmen bestimmt wurde (Abb. 51), ist durch den Aufdampfprozess gegeben. Die Titanschicht wurde mit einer Schichtdicke von ca. 251 nm aufgebracht. Die Schichtdicke wurde über Spektrale Ellipsometrie

bestimmt, wobei die Titanschicht durch ein NK-File parametrisiert wurde. Anschließend wurden die Titanschichten in einem Sauerstoffplasma verascht. Dies hat den gewünschten Effekt, dass zum einen die Schicht von Staubpartikeln gereinigt wird und zum anderen wird eine Titandioxidschicht generiert, die für die kovalente Anbindung der PEG-Schicht benötigt wird, welche als Linker für das Fibronectin dient.

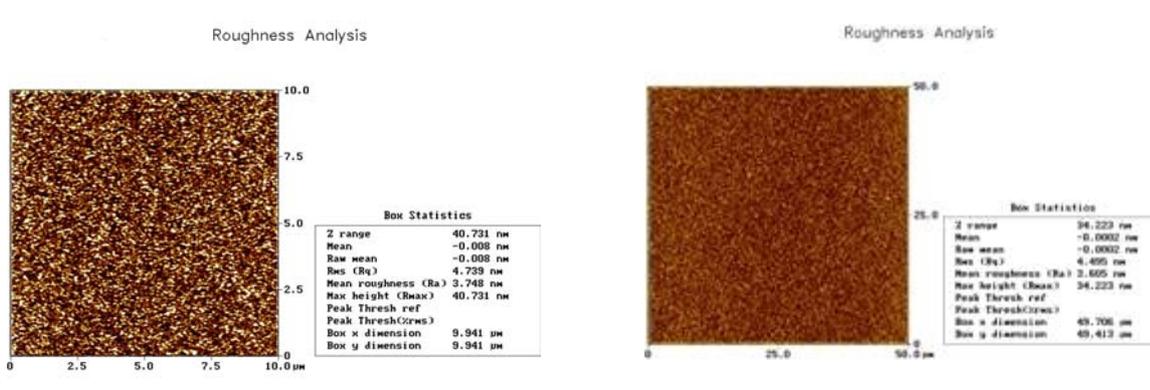
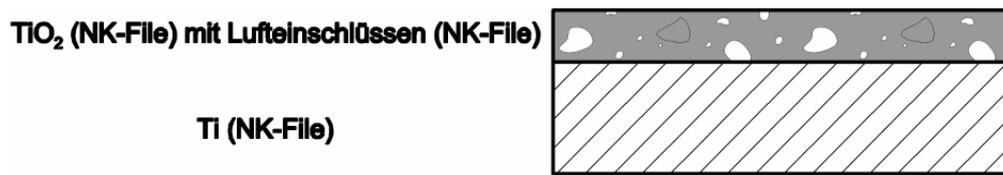
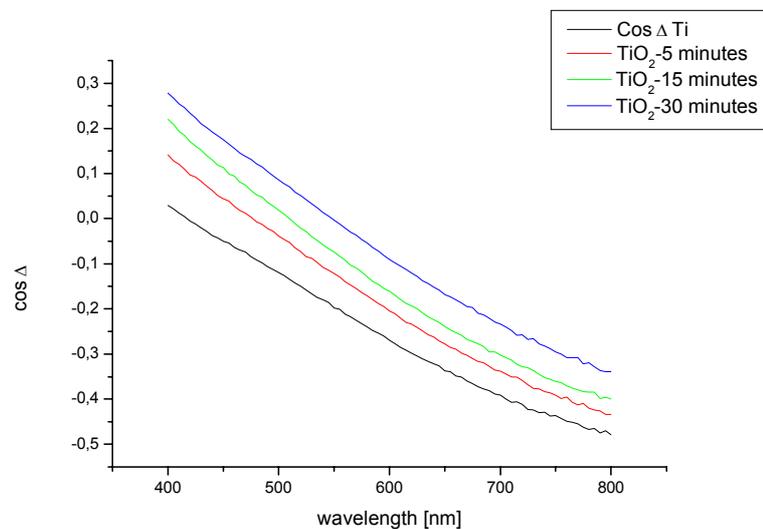


Abb. 51: repräsentative AFM-Aufnahmen, links Titanschicht nach dem Aufdampfprozess, rechts Titandioxidschicht, 5 Minuten verascht.

Titan kann unterschiedliche Oxide bilden,  $\text{TiO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  und andere, aber es ist bekannt, dass das an der Oberfläche durch Lufteinfluß gebildete Titanoxid hauptsächlich aus  $\text{TiO}_2$  besteht [41, 42, 43, 44, 45]. Der weitere Oxidationsprozess und das Wachstum der Oxidschicht in die Titanschicht hinein wurden mit Spektraler Ellipsometrie und AFM beobachtet. Zur Simulation und Parametrisierung des Wachstums der Titandioxidschicht wurde diese als  $\text{TiO}_2$ -Schicht mit einem NK-File parametrisiert und des weiteren angenommen, dass es während der Oxidation zu Sauerstoffeinschlüssen in der Titandioxidschicht kommt. Dies wurde ebenfalls in der Parametrisierung berücksichtigt, siehe Abb. 52.

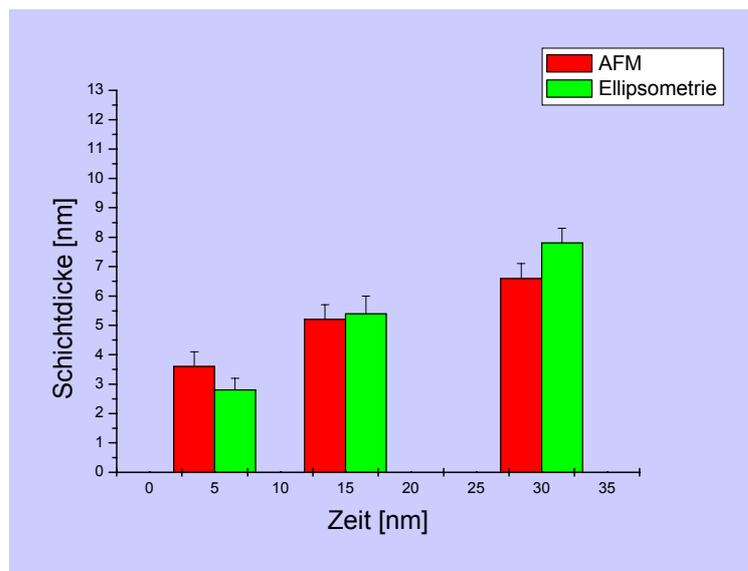


*Abb.52: Schichtmodell zur Simulation der Ellipsometrischen Messungen<sup>[46]</sup>.*



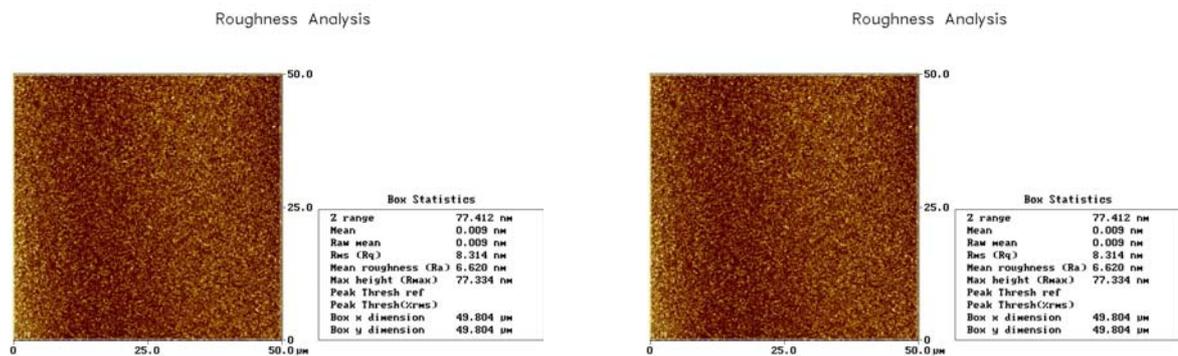
*Abb.53: Cos Delta Wert der ellipsometrischen Messungen zur Beobachtung des Wachstums der Titandioxidschicht in die Titanschicht hinein.*

Die AFM-Messungen der veraschten Titandioxidschichten zeigen eine Zunahme der mittleren Rauigkeit von 3,6 nm nach 5 Minuten, zu 5,2 nm nach 15 Minuten bis zu 6,6 nm nach 30 Minuten (siehe Abb. 55). Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den ellipsometrischen Ergebnissen (Schichtmodell wie in Abb. 52, Vergleich AFM mit Ellipsometrie Abb. 54). Dort ergibt sich für 5 Minuten veraschen eine Schichtdicke der Titandioxidschicht von 2 nm,



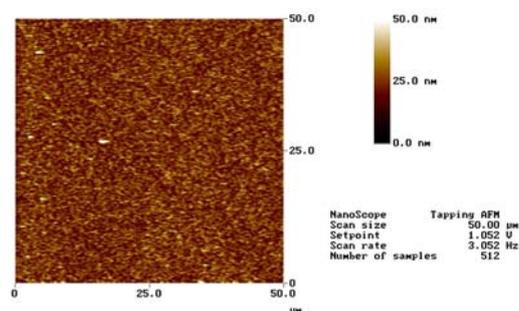
*Abb.54: Vergleich der mit AFM und Ellipsometrie bestimmten Schichtdicken der  $TiO_2$ -Schicht.*

nach 15 Minuten von 5.4 *nm* und nach 30 Minuten von 7.8 *nm*, wobei sich jeweils ein Anteil von Sauerstoffschlüssen zu 52% berechnen lässt. Beide Messergebnisse ergeben ein verlangsamtes Wachstum der Oxidschicht mit zunehmender Oxidationszeit und Oxidschichtdicke, was eine bekannte Erscheinung ist, da der aktive Sauerstoff erst durch die Oxidschicht diffundieren muß, um an nicht oxidiertes Titan zu gelangen.



*Abb. 55: Repräsentative AFM-Aufnahmen, links Titandioxidschicht 15 Minuten verascht, rechts 30 Minuten verascht.*

Für die weiteren Präparationsschritte wurden jeweils die 30 minütig veraschten Titandioxidschichten verwendet. Abb. 56 zeigt eine mit PEG modifizierte Titandioxidschicht. Da das PEG in Luft eine Schichtdicke von ca. 3 nm hat, war zu erwarten, dass keine großen Unterschiede zu den Titandioxidschichten zu erkennen sind. Ellipsometrisch ist die PEG-Schicht auch nicht mehr zu vermessen, da sie in der Rauzigkeit der Titandioxidschichten „untergeht“.



*Abb. 56: Repräsentative AFM-Aufnahmen, PEG-gecoatete Titandioxidschicht, die 30 Minuten verascht wurde.*

### 4.2.3 Modifizierung der Schicht zur Biokompatibilität

Abb. 57 zeigt Fibronectin in 10-facher Verdünnung auf Glimmer, Abb. 58 zeigt Fibronectin auf einer PEG-modifizierten Titan-dioxidschicht in der verwendeten Konzentration, Abb. 59 zeigt Fibronectin in gleicher Konzentration auf Glimmer und Abb. 60 zeigt Fibronectin in 10-Facher Konzentration wie verwendet auf Glimmer. In 10-Facher Verdünnung neigt Fibronectin zur Akkumulation, was man mit größeren Anziehungskräften der Peptide untereinander als zur Glimmerober

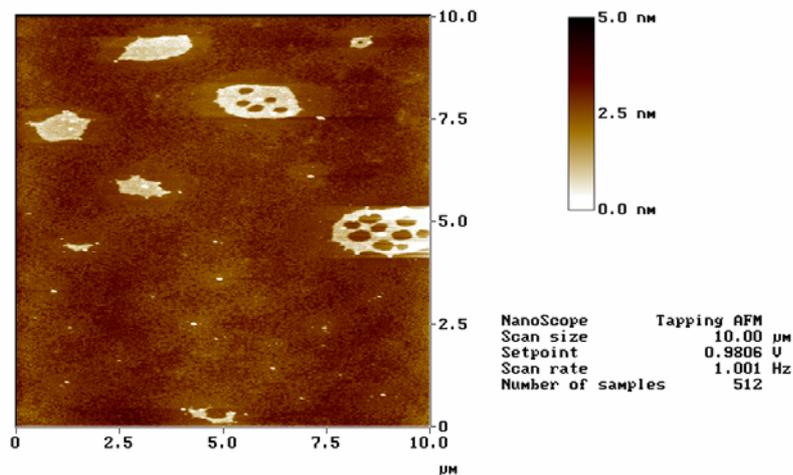
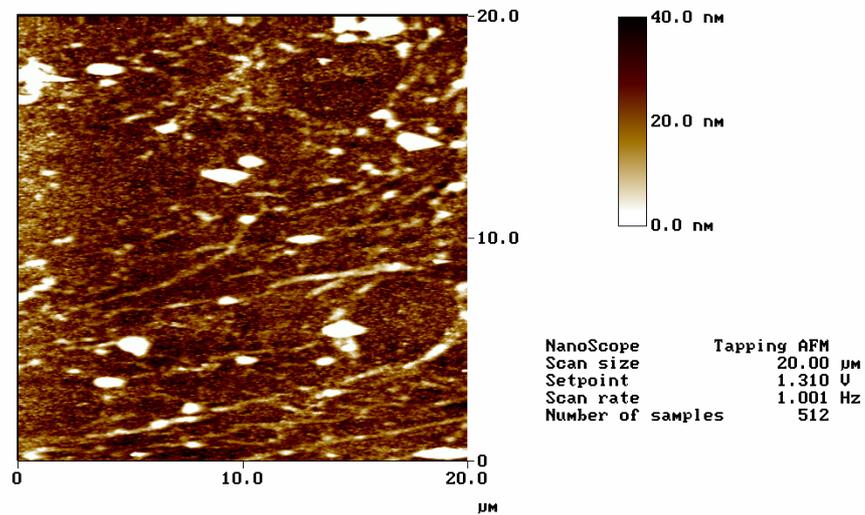


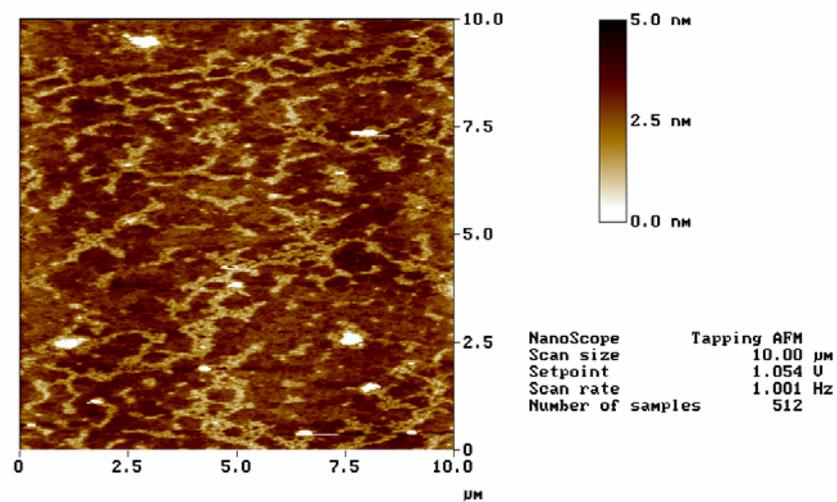
Abb. 57: Fibronectin auf Glimmer, zehnfache Verdünnung.

- fläche erklären kann. In der verwendeten Konzentration zeigt Fibronectin auf Glimmer eine netzartige Oberflächenbelegung bis zu einer Höhe von 2-3 nm. 10-fach höhere Konzentration (Abb. 60) zeigt sehr deutlich die netzartige Oberflächenbelegung des Fibronectins. Diese Struktur ist auf dem PEG-modifizierten Titandioxidsubstrat nicht mehr zu erkennen, hier neigt das Fibronectin wiederum eher zu einer

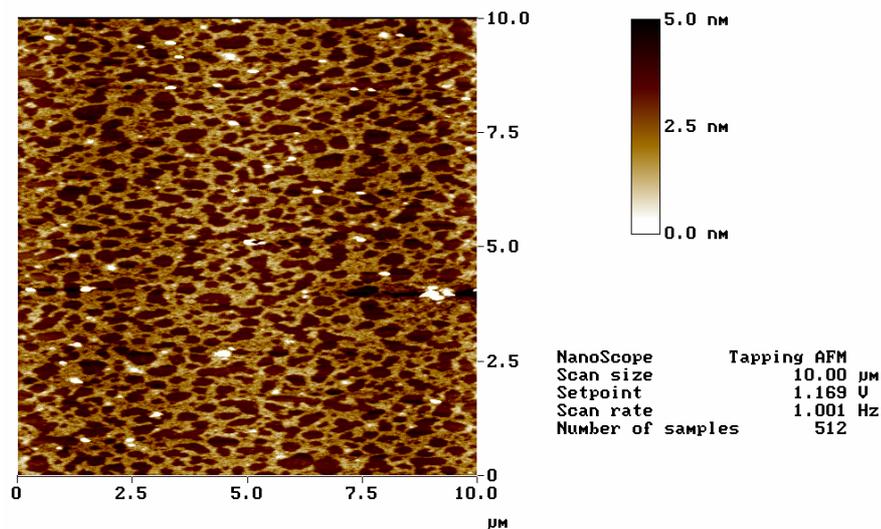
Akkumulation und Fadenbildung (Abb. 58). Dieses Verhalten ist auf die Oberflächenrauigkeit des Substrates zurückzuführen.



*Abb. 58: Fibronectin auf PEG-modifizierter Titandioxidschicht.*



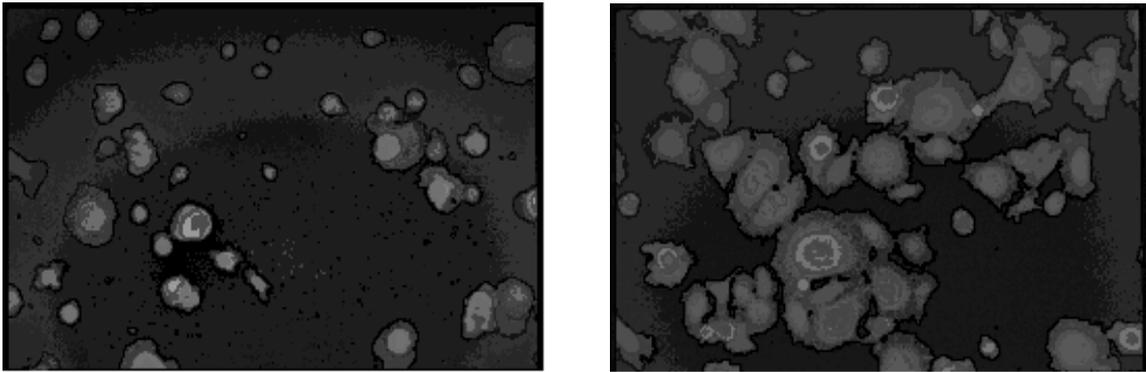
*Abb. 59: Fibronectin auf Glimmer.*



*Abb. 60: Fibronectin auf Glimmer, 10-fach höhere Konzentration wie auf der Titandioxidoberfläche.*

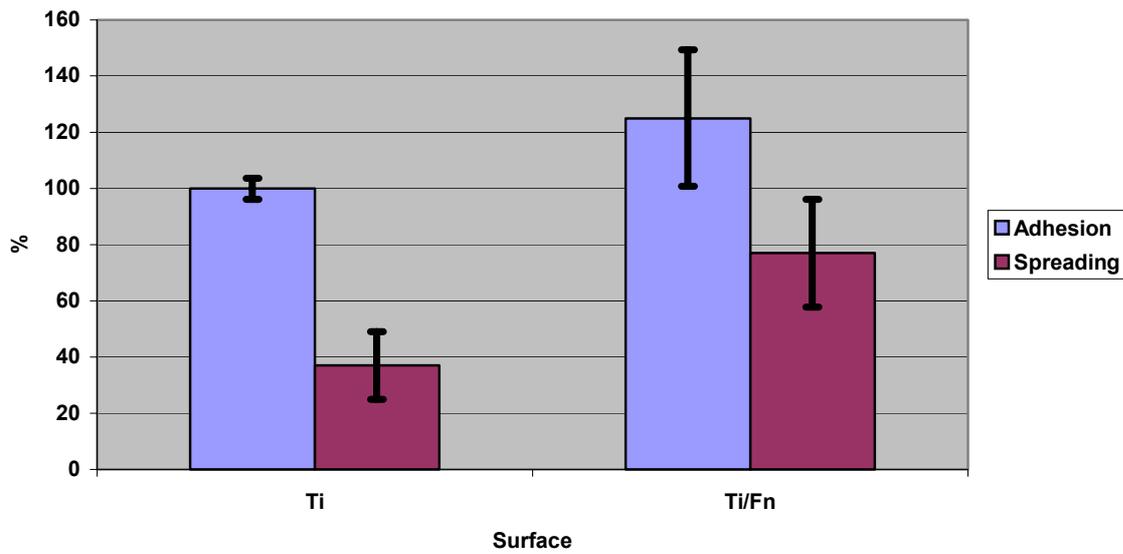
Der Effekt der kovalent gekoppelten Fibronectinbeschichtung auf die Zellanheftung und auf das Zellwachstum wurde von Scheideler et al. mit menschlichen Keratinocyten untersucht. Abb. 61 zeigt den Einfluß der Fibronectinbeschichtung auf die Adhäsion von Keratinocyten nach einer Adhäsionszeit von 90 Minuten. (Abb. 61 links) zeigt ein Fluoreszenzmikroskopbild einer nicht beschichteten Titandioxidschicht, (Abb. 61 rechts) mit Fibronectinbeschichtung. Die Zelladhäsion und das Wachstum wurden durch die Fibronectinbeschichtung verbessert.

Abb. 62 zeigt das Ergebnis von weiteren Adhäsionsversuchen der Gruppe Scheideler et.al. Hier wurde die durchschnittliche Zellenanzahl von 4 unabhängigen Adhäsionsversuchen mit Keratinocyten auf reinen Titandioxidreferenzen und auf fibronectinbeschichteten Oberflächen in Abb. 62 dargestellt. Im Vergleich zur Titandioxidreferenz wurde die durchschnittliche Zellenanzahl, die an der beschichteten Oberfläche



*Abb. 61: Fluoreszenzmikroskopbilder der Adhäsionsversuche. Mit freundlicher Genehmigung von Scheideler et.al. links: Adhäsionsversuch ohne Beschichtung, rechts: mit Fibronectinbeschichtung.*

anheften nach 90 minütiger Inkubation, auf 125% erhöht (95% Konfidenzintervall = 101-149%). Das Wachstum der Keratinocyten wurde sogar noch signifikanter erhöht. Während sich nur 37% der Zellen auf der Titandioxidreferenz ausbreiteten, waren es auf der beschichteten Oberfläche bereits 77% (KI = 58-96%). Ähnliche Resultate wurden mit Lamininbeschichtungen erreicht<sup>[47]</sup>. Bioaktiv beschichtete Proben, die mit Blut präinkubiert wurden, um klinische Bedingungen während der Implantation zu simulieren, haben ihre adhäsionsverbessernden Eigenschaften bestätigt<sup>[48]</sup>, während andererseits Pellikulabildung verhindert wurde<sup>[49]</sup>. Die Kombination dieser begünstigenden Eigenschaften deutet darauf hin, dass diese Beschichtungen durchaus den Heilprozess und den Gewebeeinbau des Implantats positiv beeinflussen können.



*Abb. 62: Anheftungsversuche jeweils mit Referenzmessung (mit freundlicher Genehmigung von Scheideler et.al.).*

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Themenbereiche bearbeitet. Im Bereich der chemosensitiven Schichten wurde Makrolon als grössenselektive, mikroporöse Polymerbeschichtung charakterisiert und die grössenselektive Wechselwirkung mit Analyten unterschiedlicher Grösse verifiziert.

Der Schichtaufbau der biosensitiven Schichten auf unterschiedlichen Substraten wurde Schritt für Schritt charakterisiert beginnend mit den Trägerpolymeren AMD, CMD und PEG. Nachdem die Eigenschaften der Trägerpolymere bezüglich Schichtdicke, Homogenität und Reproduzierbarkeit charakterisiert wurden, konnten die Eigenschaften der biosensitiven Schicht bestimmt werden.

Zuletzt wurde der Schichtaufbau einer bioaktiven dentalen Beschichtung zur Verbesserung der Zellanheftung charakterisiert.

In Kapitel 4.1 wurden die Schichteigenschaften Schichtdicke, Brechungsindex, Homogenität und Reproduzierbarkeit der Makrolonschichten in Abhängigkeit der Präparationsparameter, wie Spin-Coating-Parameter, Lösungsmittel und Konzentration der Makrolonlösungen, charakterisiert. Es stellte sich dabei heraus, dass ein Gemisch aus Chloroform und 1,2-Dichlorbenzol die homogensten und reproduzierbarsten Schichten lieferten. Eine Verzögerung beim Spin-Coating-Prozess führte zu Verschlechterungen der Schichthomogenität. Die Umdrehungszahlen beim Spin-Coating

spielen in so fern eine Rolle, dass höhere Umdrehungszahlen geringere Schichtdicken erzielen und für die Homogenität der Schichten förderlich sind. Den grössten Einfluss auf die Homogenität der Schichten hat jedoch die Wahl des Lösungsmittels.

Anschließend wurde die grössenselektive Wechselwirkung anhand der Analyte Methanol, Ethanol und 1-Propanol untersucht. Durch die mikroporöse Eigenschaft des Makrolons kommt es zu einem Langmuir-Henry'schen Quellungsverhalten, wobei mit zunehmender Schichtdicke der Makrolonschichten der Einfluss des Bulks immer größer wird, was sich in einer Abnahme des Langmuiranteils niederschlägt.

1-Propanol zeigte dabei als größtes Analytmolekül eine Besetzung der Poren bei kleineren Konzentrationen im Verhältnis zu Methanol, was sich im Langmuiranteil der Quellungskurve und im Brechungsindexverhalten der Schicht niederschlug. Methanol, als kleinstes der verwendeten Analytmoleküle zeigte dabei einen Langmuiranteil zu höheren Konzentrationen im Verhältnis zu 1-Propanol. Ethanol ordnete sich erwartungsgemäß zwischen 1-Propanol und Methanol ein. Hieran kann in Zukunft angeknüpft werden und mehrere Polymere mit unterschiedlichen Porengrößen könnten als Array in der Chemosensorik Anwendung finden.

In Kapitel 4.2 wurden die biosensitiven Schichtsysteme charakterisiert. Dabei wurde die Charakterisierung in zwei Gruppen getrennt in Abhängigkeit vom Substrat. Zum einen wurde der Schichtaufbau auf Siliziumwafer substraten untersucht. Hier ist es notwendig eine Trägerschicht für die biosensitiven Schichten anzubringen wie die

PEG-, AMD- und CMD-Schichten. Die Präparation der Trägerschichten wurde mittels Ellipsometrie und AFM charakterisiert. Dabei wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Molekulargewichte bei den PEG-Schichten auf Schichtdicke, Brechungsindex, Homogenität der Oberflächenbelegung und Reproduzierbarkeit der Schichten auswirkt. Bei den Dextranschichten ging es um den Einfluss unterschiedlicher funktionaler Gruppen auf die Schichtparameter.

Nachdem die Homogenität und Reproduzierbarkeit der Trägermaterialien charakterisiert und bestätigt wurden konnte der Schichtaufbau eines DNA/PNA-Hybridisierungs-Chips ellipsometrisch bestimmt werden.

Zum anderen wurde der Schichtaufbau auf TOPAS-Polymer-Substraten ebenfalls mit Ellipsometrie, AFM und mit Kontaktwinkelmessungen charakterisiert. Bei diesem Substrat ist es möglich, die sensitiven Rezeptoren per Photolinker direkt auf das Substrat aufzubringen.

Hier wurden zwei Schichtsysteme untersucht. Zum einen eine mit DNA-Strängen bespottete TOPAS-Oberfläche zur Detektion von DNA-DNA-Wechselwirkungen. Hier bestand die besondere Herausforderung in der Abbildung der DNA-Spots mit der Atomkraftmikroskopie, da die Spots bis zu  $100\mu\text{m}$  auseinander lagen und der zuverlässige Scanbereich des AFM-Gerätes bei  $50\mu\text{m}$  lag. Da DNA-Moleküle eine laterale Grösse von ca.  $0,5\text{ nm}$  haben bei einer Länge von  $20\text{ nm}$  ist es nicht möglich einzelne Stränge abzubilden sondern nur grössere Akkumulationen oder Spots.

Zum anderen wurde der Schichtaufbau für eine Biotin-Streptavidin sensitive Oberfläche auf TOPAS untersucht. Hier wurde versucht den

Schichtaufbau dem der Siliziumwafersubstrate anzupassen, indem eine AMD-Schicht per Photolinker auf das TOPAS aufgebracht wurde und dann das Biotin kovalent an das AMD gebunden wurde.

In Kapitel 4.3 wurde dann die Biofunktionalisierung eines dentalen Implantates charakterisiert. Hier wurde zuerst das Titan/Titandioxidsubstrat mittels AFM auf Oberflächenrauigkeit untersucht und das Wachstum der Titandioxidschicht während des Veraschungsprozesses durch ellipsometrischen Untersuchungen charakterisiert. Die anschließende Biofunktionalisierung mit Fibronectin wurde mittels AFM abgebildet und die Verbesserung des Zellanheftungsverhaltes wurde mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von Scheideler et al. bestätigt.

## 6 Abkürzungen

A	Amplitude
Abb.	Abbildung
A,B,C	Cauchy-, Hartmann-Parameter
AFM	Atomkraftmikroskopie
AMD	Aminodextran
B	magnetische Feldstärke
BK7	Glastyp
BSA	Albumin aus Rinderserum
d	Dicke
DA-PEG	Diaminopolyethylenglycol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
E	elektrische Feldstärke, Energie
e	Elementarladung
EMA	Effektive Medien Approximation
FRET	Fluoreszenz Resonanter Energie Transfer
Gl.	Gleichung
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
I	Intensität, Volumenstrom
i	imaginäre Einheit
$\tilde{n}$	Komplexer Brechungsindex

---

n	Realteil des Brechungsindex
NHS	N-Hydroxysucciniimid
$m_e$	Elektronenmasse
k	Imaginärteil des Brechungsindex
k	komplexer Wellenzahlenvektor
k	Extinktionskoeffizient
$n_e$	Elektronendichte
NK-File	Datei, in der der reale Brechungsindex n und der imaginäre Brechungsindex k in Abhängigkeit der Wellenlänge tabellarisch aufgeführt wird.
p	parallel
PBS	Phosphate Buffered Saline
Piranha	heißes Gemisch aus 3 Teilen konz. Schwefelsäure und einem Teil 30%iger Wasserstoffperoxidlösung.
PNA	Peptidnukleinsäure (eng. acid)
SPR	Oberflächenplasmonen-Resonanz (eng. Surface plasmon resonance)
Tab.	Tabelle
r	Reflektionskoeffizienten
R	Reflexionsgrad
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
s	Orthogonal
T	Transmissionsgrad
t	Transmissionskoeffizienten
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
v	Geschwindigkeit
z	Eindringtiefe

---

$x$	Raumpunkt
$\alpha$	Absorptionskoeffizient
$\beta$	Filmphasendicke
$\Delta$	ellipsometrischer Winkel
$\varepsilon_{\infty}$	Dielektrische konstante eines Kristallverbandes
$\varepsilon$	Energie
$\varepsilon$	Dielektrizitätszahl
$\Theta$	Kontaktwinkel
$\lambda$	Vakuumwellenlänge
$\lambda_m$	Wellenlänge im Medium m
$\nu$	Frequenz
$\nu$	Dämpfung
$\nu_n$	Bandbreite des Lorentzoszillators
$\xi$	Phasenwinkel
$\phi$	Winkel
$\phi_e$	Einfallswinkel
$\phi_r$	Reflexionswinkel
$\phi_B$	Brewsterwinkel
$\Psi$	ellipsometrischer Winkel
$\omega_p$	Plasmafrequenz
$\omega$	Kreisfrequenz

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Hecht, „Optik“, Addison-Wesley Publishing Company, 1989
- [2] Olaf Stenzel, „Das Dünnschichtspektrum“, Akademie Verlag, 1995
- [3] Bergmann, Schaefer, „Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, Optik, 9. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1993
- [4] Harland G. Tompkins, „A User`s Guide to Ellipsometry“, Academic Press, Inc.1993
- [5] D.E. Aspès, J.B. Theeten, F. Hottier, Investigations of effective-medium models of microscopic surface roughness by spectroscopic ellipsometry, Phys. Rev. B, 20, 3292, 1979
- [6] D.a.G. Bruggemann, Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen: I Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten der Mischkörper aus isotropen Substanzen, Annalen der Physik, 24, 636, 1935
- [7] M.V. Klein, T.E. Furtak, Optik, Springer-Verlag Berlin, 1988.
- [8] A. Vasicek, „Optics of thin films“, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1960
- [9] K. Hehl, „Untersuchung dünner polymerer Filme und deren Wechselwirkung mit Analyten mit spektraler Ellipsometrie“, Dissertation an der Universität Tübingen, 1998

- 
- [10] R.M.A. Azzam, N.M. Bashara, „Ellipsometry and polarized light“, North-Holland Physics Publishing, 1988
- [11] A. Roesler, Infrared Spectroscopic Ellipsometry, Akademie-Verlag, Berlin 1990
- [12] D.W. Marquardt, An Algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters, Soc. Ind. Appl. Math. J., 11, 431, 1963
- [13] Gerd Wedler, „Lehrbuch der Physikalischen Chemie“, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1985
- [14] W. Göpel, Chr. Ziegler, „Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie“, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Leipzig, 1994
- [15] Roland Wiesendanger, „Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy“, Cambridge University Press, 1994
- [16] N. Magonov, Myung-Hwan Whangbo, „Surface Analysis with STM and AFM“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996
- [17] R. Wiesendanger, „Scanning Probe Microscopy“, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998
- [18] M. Herold, „Modifikation von SiO<sub>2</sub>-Oberflächen und ihre Charakterisierung durch spektrale Ellipsometrie und Festkörper-NMR-Spektroskopie“, Diplomarbeit an der Universität Tübingen, 1997
- [19] C. Betsch, „Chemosensoren für Freone“, Wissenschaftliche Arbeit an der Universität Tübingen, 2001
- [20] N. Toshima, „Polymers for Gas Separation“, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992

- 
- [21] Christelle M. Laot, "Gas Transport properties in Polycarbonate- Influence of the cooling rate, physical aging and orientation", Dissertation an dem Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2001
- [22] G. Dlubek, A. Clarke, H. Fretwell, S.B. Dugdale, M.A. Alam, *Physica Status Solidi a* 157 (1996) 351
- [23] J. Piehler, Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation, Tübingen, 1997
- [24] K.C. Popat, S. Sharma, T.a. Desai, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 5185-5188
- [25] S. Sharma, R.W. Johnson, T.A. Desai, *Langmuir*, 2004, 20, 348-356
- [26] Jensen K.K., Orum H., Nielsen P.E., Norden B. (1997) Kinetics for Hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA Studied with the BIAcore Technique *Biochemistry* 36 (16), 5072-5077.
- [27] Jung A (2003) *Parallele markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an miniaturisierten Array* Dissertation Universität Tübingen.
- [28] R.M. Ostroff, D. Maul, G.R. Bogart, S. Yang, J. Christian, D. Hopkins, D. Clark, B. Trotter, G. Moddel, *Clinical Chemistry*, 44:9, 2031-2035, (1998)
- [29] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 8916-8920

- 
- [30] D.E. Gray, S.c. Case-Green, T.S. Fell, D.J. Dobson, E.M. Southern, *Langmuir*, 1997, 13, 2833-2842.
- [31] R. Weihofen, Informationsdienst Wissenschaft, Hoechst AG
- [32] G. Khanarian, *Opt. Eng.* 40, 1024, 2001
- [33] T.A. Horbett, B.D. Ratner, J.M. Schakenraad, F.J. Schoen; *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*; Academic Press, San Diego, CA, 1996: Chapter 3.
- [34] D. Buser, et. al., Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants, A histomophometric study in miniature pigs, *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 889-902
- [35] D.L. Cochran, J. Simpson, H.P. Weber, D. Bruser, *Int. J. Oral maxillofac. Implants* 9 (1994) 289-297.
- [36] D.M. Brunette, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 3 (1988) 231-246.
- [37] D.M. Brunette, *Exp. Cell Res.* 167 (1986) 203-217.
- [38] J. Meyle, K. Gültig, W. Nisch, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 81-88.
- [39] A. Curtis, C. Wilkinson, *Biochem. Soc. Symp.* 65 (1999) 15-26.
- [40] P. Cacciafesta, A.D.L. Humphries, K.D. Jandt, M.J. Miles, *Langmuir* 16 (2000) 8167-8175
- [41] J. Meyle, H. Wolburg, A. F. Von Recum, *J. Biomat. Appl.* 7 (1993) 362-374.
- [42] W.B. Pearson, *Handbook of Lattice Spacings and Structures of Metals and Alloys*, Pergamon Press, London, (1967); Vol 2.
- [43] V.E. Henrich, P.A. Cox, *The Surface Science of Metal Oxides*; (1994), Cambridge University Press; Cambridge, U.K..

- [44] B.J. Kasemo, J. Prosthet. Dent. 49 (1983) 832.
- [45] J. Lausmaa, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 81 (1996) 343
- [46] M. Herold, Modifikation von Festkörperoberflächen und ihre Charakterisierung durch Ellipsometrie, Dissertation, Tübingen 2001
- [47] Scheideler L., Kröger, K., Jährling, J., Frank, R., Gauglitz, G., Geis-Gerstorfer J., Biomaterialien 4 (2) (2003) 146
- [48] Scheideler L., Kröger K., Jaehrling J., Frank R., Gauglitz G., Wendel H.-P., Geis- Gerstorfer J. (2003) Proceedings of 18<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, 1- 4<sup>th</sup> Oct. 2003, Stuttgart, P76
- [49] Länge K., Herold M., Scheideler L., Geis-Gerstorfer J., Wendel H.-P., Gauglitz G. Dental Materials (2004), in press.

## 8 Anhang

### 8.1 Publikationsliste

Mutschler, T.; Kieser, B.; Frank, R.; Gauglitz, G. **Characterization of thin polymer and biopolymer layers by ellipsometry and evanescent field technology.** Analytical and Bioanalytical Chemistry (2002), 374(4), 658-664.

Rathgeb, F.; Reichl, D.; Herold, M.; Mader, O.; Mutschler, T.; Gauglitz, G. **Dyeless optical detection of ammonia in the gaseous phase using a pH-responsive polymer - characterization of the sorption process.** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry (2000), 368(2-3), 192-195.

T. Mutschler, J. Jaehrling, R. Frank, L. Scheideler, J. Geis-Gerstorfer, H-P. Wendel, G. Gauglitz, **Characterization of the Layersystem of a Bioactive Implant Surface by AFM and Spectral Ellipsometry,** Submitted.

**Poster**

Makrolon als gröÙenselektive Sensorbeschichtung-Charakterisierung des Quellverhaltens mittels SPR, Ellipsometrie und RfS, Anakon 2003, Konstanz, Deutschland.

Survey of the selectivity of the homologous series of alcohols on macrolonlayers by spectral ellipsometry, WISE 2001, Mons, Belgien.

**Vorträge**

Makrolon als mikroporöses Polymer in der Chemosensorik, Workshop Ellipsometrie 2002, Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Berlin, Deutschland.

Characterization of chemo- and biosensitive Surfaces, Colorado State University 2004, Fort Collins, USA.

---

## 8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel<sup>†</sup>,  
G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack<sup>†</sup>,  
A. Kovar, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. Maier, H.-  
J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug,  
G. Pausewang, H. Pommer, A. Rieker, V. Schurig, F.F. Seelig,  
J. Strähle, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

### 8.3 Lebenslauf

Name:	Tina Mutschler
Geburtsdatum:	06. Januar 1976
Geburtsort:	Reutlingen
Familienstand:	ledig
1995	Abitur am Bildungszentrum Nord, Reutlingen
1995 – 2001	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
03.2001 – 08.2001	Diplomarbeit  Charakterisierung von Polymeren für die Chemosensorik und integriert optisch wellenleitenden Schichten, betreut von Prof. Dr. G. Gauglitz
10.2001 – 10.2004	Promotion  Chrakterisierung von bio- und chemosensitiven Schichten mit Ellipsometrie und Atomkraftmikroskopie, betreut von Prof. Dr. G. Gauglitz