



Hochschule Rhein-Main  
University Of Applied Sciences  
Studienbereich – Angewandte Physik



in Kooperation mit dem  
Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz

## Diplomarbeit

Charakterisierung von Protein gestützten Festkörpermembranen auf  
oxidischen Oberflächen durch Wellenleitermoden-Spektroskopie

vorgelegt von

Pascal Debersac

Referent: Prof. Dr. Uwe Langbein  
Korreferent: Dipl. Ing. Bernhard Menges

Mainz, den 18.06.2010



*„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf höherem Niveau“*

*Enrico Fermi*



Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig unter der Anleitung des Referenten und des Korreferenten durchgeführt und nur die angegebenen Hilfsmittel und Referenzen verwendet zu haben.

-----  
(Ort, Datum, Unterschrift)



## **Abstract**

In this work the protein tethered bilayer lipid membrane (ptBLM) system was characterised with respect to the orientation during the membrane forming process. For characterisation, waveguide mode spectroscopy (WaMS) was used. The waveguide modes were excited by optical grating couplers integrated in the thin high refractive waveguiding dielectric films. The high sensitivity of the evanescent electric magnetic field was used to characterise the optical anisotropy and the refractive index of the transmembraneproteine Cytochrom c Oxidase (CcO) by using transversal electric and transversal magnetic polarised waveguide modes. Assoziation constants of the binding from the CcO histidin tag and tris(carboxymethyl)amin were investigated by binding the CcO on two different dielectric surfaces. The dissipation of the waveguide modes were used to detect changes in form or orientation of the forming lipid bilayer.



# Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Motivation .....	1
1.2	Wellenleitermoden-Spektroskopie .....	2
1.3	Biologische Membranen .....	3
1.4	Künstliche Membransysteme .....	4
1.5	Cytochrom c Oxidase .....	5
1.6	His-Tag-Technologie .....	6
2	Theorie .....	7
2.1	Elektromagnetische Wellen in Materie .....	7
2.1.1	Wechselwirkung von Licht und Materie .....	8
2.1.2	Ausbreitung ebener elektromagnetischer Wellen in optisch anisotropen Medien .....	9
2.1.3	Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen .....	11
2.1.4	Totalreflexion .....	12
2.2	Wellenleitung .....	14
2.2.1	Geführte Moden in planaren Schichtwellenleitern .....	15
2.2.2	Transversal-elektrische-Moden .....	16
2.3	Vier-Schicht-Modell und Transfermatrix-Methode .....	18
2.4	Kopplungsmöglichkeiten: Gitterkopplung .....	20
2.5	Verlustmechanismen in planaren Wellenleitern .....	22
2.6	Bestimmen von Bindungskonstanten .....	23
3	Messmethoden: .....	26
3.1	Wellenleitermoden-Spektroskopie (WaMS) .....	26
3.2	Kontaktwinkelmessung .....	28
3.3	Raster-Kraft-Mikroskopie .....	29
3.4	Step-Profiler .....	31
3.5	Aufbau und Sensoren .....	32
3.5.1	Wellenleitersensitivität und Anisotropie-Faktor .....	38
3.5.2	Die Flusszelle .....	41
4	Experimente & Diskussion der Ergebnisse .....	44
4.1	Probenpräparation .....	44
4.2	Membranbildung .....	44
4.2.1	Stabilität des Sensors .....	44
4.2.2	Funktionalisierung der Sensoroberfläche .....	45
4.2.3	Proteinanbindung .....	49
4.2.4	Doppel-Lipidschicht Formung .....	59

5	Zusammenfassung .....	65
6	Abkürzungs-/Symbolverzeichnis .....	67
7	Abbildungsverzeichnis .....	69
8	Tabellenverzeichnis.....	72
9	Literaturverzeichnis.....	73
10	Anhang .....	76
11	Danksagungen .....	88

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Künstliche Membransysteme stehen schon seit langer Zeit im Fokus der Wissenschaft, da durch sie neue Erkenntnisse über biologische Vorgänge in und außerhalb von Zellen gewonnen werden können. Das Untersuchen von Membranvorgängen in definierter Umgebung hilft einzelne Prozesse näher zu charakterisieren [2]. Ein Problem beim Einsatz in der Bio-Sensorik ist die kurze Lebenszeit der meisten Membransysteme. In den letzten Jahren wurde die Stabilität einzelner Membransysteme von wenigen Minuten auf mehrere Tage erhöht [3]. Dies wurde durch die Entwicklung von Festkörpergestützten Membranen erreicht, welche auf einem festen Substrat verankert sind. In dieser Arbeit wird der Aufbau einer Protein-verankerten Bilayer Lipid Membran (ptBLM) auf oxidischen Oberflächen untersucht. ptBLMs wurden erstmals auf metallischen Oberflächen am Beispiel der Cytochrome c Oxidase realisiert [4]. Die Cytochrom c Oxidase findet sich in der Natur in der mitochondrialen Atmungskette und gehört zur Familie der Transmembranproteine. Sie ist in der Lage Protonen durch die innere Lipidmembran der Mitochondrien zu transportieren, wobei eine elektrochemische Potentialdifferenz von Protonen zwischen beiden Seiten der Membran aufgebaut wird [5, 6].

Ist die Funktion der Cytochrom c Oxidase nur eingeschränkt möglich, ist sie nicht mehr in der Lage die Energiegewinnung der Zelle zu gewährleisten und es kommt zu Störungen in der Atmungskette, was die Leistungsfähigkeit von Muskeln und Gehirn negativ beeinträchtigt. Dieser Defekt gehört zur Gruppe der Enzymerkrankungen und wird unter dem Begriff Mitochondriopathie zusammengefasst [7]. Da diese zu den vererbten Krankheiten gehören, ist man sehr daran interessiert, diese Erkrankungen zu verstehen und so ursächliche Heilungsmöglichkeiten und Therapien entwickeln zu können.

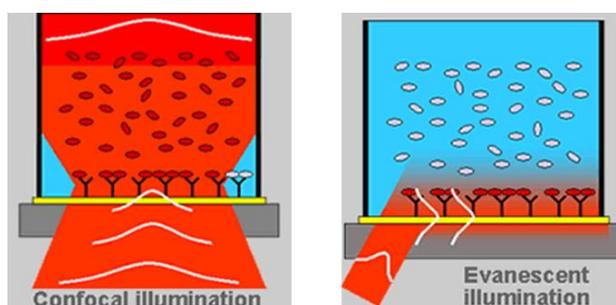
Das in dieser Arbeit verwendete Membransystem wurde am Beispiel der Cytochrome c Oxidase näher untersucht. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die Bildung des Membransystems auf metallischen Oberflächen erfolgreich ist und eine hohe Lebensdauer für weitere Untersuchungen erreicht wird [8]. Durch Elektrochemische Impedanz Spektroskopie konnte mit Funktionsfähigkeit der Cytochrom c Oxidase nachgewiesen werden. Elektrochemisch kontrollierte FTIR- und Ramanspektroskopie brachten neue Erkenntnisse über das Molekülschwingungsverhalten des Proteins. Außerdem konnte die katalytische Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden [9].

In dieser Arbeit soll die Orientierung der Proteine und der Lipid-Schicht während der Membranbildung untersucht werden. Da der Prozess an einer oxidischen Oberfläche durchgeführt wird, steht mit der Wellenleitermoden-Spektroskopie eine

Oberflächensensitive Messmethode, die zur Untersuchung von Molekülorientierungen genutzt werden kann [10], zur Verfügung.

## 1.2 Wellenleitermoden-Spektroskopie

Die evaneszente Optik wird genutzt um Phänomene an Grenzflächen zu untersuchen und zu beschreiben. Dafür werden die Eigenschaften von evaneszenten elektromagnetischen Feldern genutzt, welche meist durch Totalreflektion an einer Grenzfläche entstehen und etwa  $\lambda/2$  in die zu detektierende Umgebung hineinragen. Die ersten evaneszenten Messungen wurden von Raether et al. im Jahre 1968 durchgeführt [12] und wurden seitdem kontinuierlich weiter entwickelt [13].



**Fig. 1: Vergleich von konfokaler (links) und evaneszenter (rechts) Beleuchtung. Die Störsignale des Analyten im Volumen werden durch die evaneszente Beleuchtung minimiert (<http://www.res-tec.de/>).**

Der Vorteil von evaneszenten Untersuchungsmethoden ist, dass nur die Vorgänge an der Oberfläche detektiert werden und eventuelle Störsignale der Umgebung weniger erfasst werden, wie dies beispielsweise bei konfokalen Messungen der Fall ist (Fig. 1), dies führt zu einem besseren Signal-zu-Rauschverhältnis.

Die evaneszente Optik gehört zu den zerstörungsfreien Untersuchungsmethoden und kann mit geringen Lichtleistungen von  $< 5$  mW durchgeführt werden. Dadurch wird sie zu einer häufig genutzten Methoden, wenn es um das detektieren von biologischen Prozessen geht [8, 14-18].

Da die Messungen nicht im Vakuum durchgeführt werden müssen, wie Beispielsweise bei der Neutronenstreuung [19], eignet sich diese Methode für kommerzielle Anwendungen, da erforderliche Umgebungsbedingungen für die Messungen, wie Beispielsweise Pufferlösungen oder Temperaturbereiche, mit minimalem Aufwand zu realisieren sind.

Das evaneszente Feld kann genutzt werden um Vorgänge an Oberflächen, mit hoher Sensitivität (Auflösungsgrenze für adsorbierte Masse:  $< 1\text{ng/cm}^2$  [20]), in Echtzeit zu detektieren. Es wird verwendet um kleine Volumina für Mikroskopiezwecke zu beleuchten [21], oder in Kombination mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS), für die Detektion der Dynamik von Partikeln an Grenzflächen [22].

### 1.3 Biologische Membranen

Die Zellmembran eines Lebewesens besteht im Wesentlichen aus einer semipermeablen Lipid-Doppelschicht, welche das Zellinnere (Zytoplasma) umgibt und diese so vor äußeren Einflüssen schützt.

Die Lipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe, welche sich zur extrazellulären Flüssigkeit ausrichten, während die hydrophobe Schwanzgruppe sich zum Zytoplasma und damit in das Innere der Zelle ausrichtet.

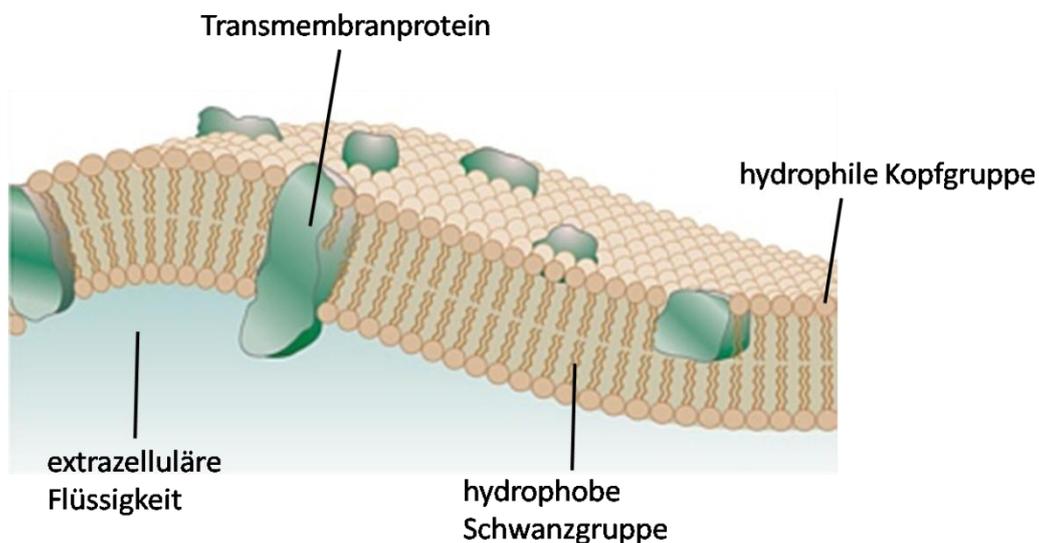


Fig. 2: Membranmodell nach Singer-Nicholson [23] (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/phys/memmod.jpg>)

Die Lipid-Doppel-Schicht wird von Proteinen durchzogen, den so genannten Transmembranproteinen. Sie sorgen als eine Art Tunnel dafür, dass der Stoffaustausch zwischen Zellinneren und Außenwelt geregelt abläuft, ebenso können sie einen definierten chemischen Gradienten zwischen Zellinnern und Zelläußern aufrecht erhalten. Eine weitere Aufgabe der Transmembranproteine ist die Energiegewinnung durch biochemische Reaktionen um die Zelle am Leben zu halten, sowie die Kommunikation mittels chemischer Botenstoffe zwischen den Zellen selbst. Diese große Vielfalt an Aufgaben und Funktionen machen die Proteine für die Forschung interessant. Fig. 2 zeigt einen schematischen Membranaufbau.

## 1.4 Künstliche Membransysteme

Da es durch die enorme Komplexität von Zellsystemen nahezu unmöglich ist die Funktion einzelner Zellkomponenten in natürlicher Umgebung zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren einige Modellmembrane entwickelt um einzelne Teile des Membransystems (Doppel-Lipid-Schicht mit Membranproteinen) und deren Funktionen bei biologischen Prozessen, zu untersuchen. Zu den ersten entwickelten Systemen gehören die „Schwarze Lipid Membran“ [24], sowie die „Lipid-Vesikel-Membran“ [25]. Diese waren durch ihre fehlende Stabilität (Lebensdauer: wenige Stunden), nur bedingt geeignet für längere Untersuchungen oder kommerzielle Anwendungen.

Ein weiteres und sehr vielversprechendes Modell sind die Festkörpergestützten Membranen

In diesem Modell wird ein Teil der Membran an eine Festkörperoberfläche gebunden die so für zusätzliche Stabilität sorgt [26]. Diese Stabilität und Verankerung auf einem festen Substrat machen sie besonders attraktiv für kommerzielle Sensoranwendungen. Bei dieser Anbindungskonfiguration muss zwischen zwei Anbindungsprozessabläufen unterschieden werden.

Beim Modell der „tethered Bilayer Lipid Membran“ (tBLM) werden die Lipide mit einer Ankergruppe an der Oberfläche angebunden und anschließend die Proteine inkorporiert. Meist findet die Anbindung des Membransystems auf einer Goldoberfläche statt. Der Nachteil hierbei ist, dass je nach Größe des Proteins, der Submembranraum durch die Länge der Ankermoleküle eingeschränkt sein kann, was die Funktionalität der Proteine negativ beeinflusst [27, 28].

Die andere Methode besteht darin, zuerst die Proteine per Ankermolekül an die Oberfläche anzubinden und anschließend die Lipidschicht um die Proteine herum anzubinden.

Der Vorteil hierbei ist, dass sich der ideale Submembranraum, welcher teilweise für die Funktionalität der Proteine verantwortlich ist, durch die Proteinanbindung definiert wird. Das System der „protein-tethered Bilayer Lipid Membran“ (ptBLM) wurde am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in der Abteilung für Materialforschung entwickelt [11].

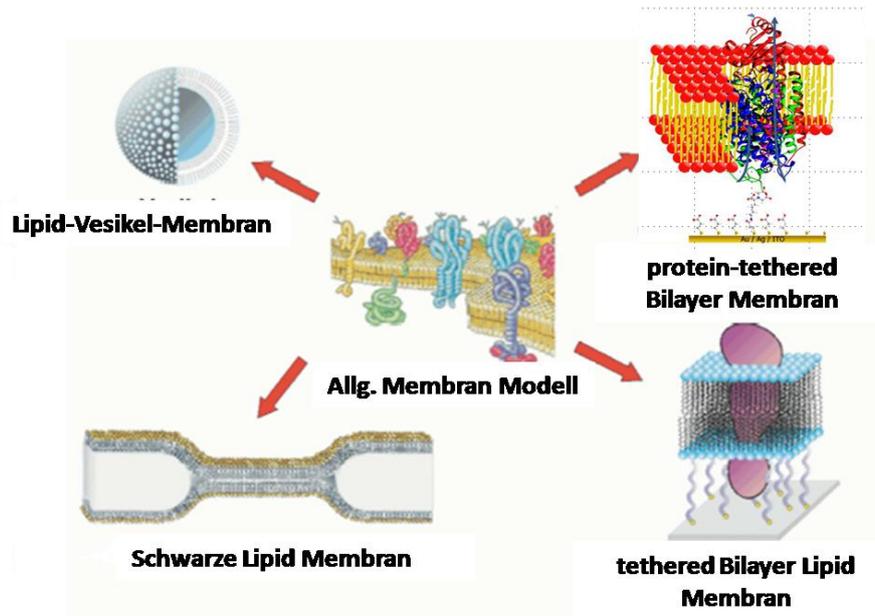


Fig. 3: Etablierte künstliche Membransysteme ausgehend vom allgemeinem Membran-Mosaik-Modell [29].

## 1.5 Cytochrom c Oxidase

Das in dieser Arbeit verwendete Protein ist die Cytochrom c Oxidase (CcO), sie gehört zu einem der am besten charakterisierten Membranproteine und wird in diesem Membransystem als Integralprotein verwendet. Durch die Röntgenstrukturanalyse sind seine Dimensionierungen bekannt [30]. Es wurde mit einer Auflösung von  $2\text{\AA}$  bestimmt und entspricht in seinem Aufbau einem Quader mit einer Kantenlänge von ca. 9nm (Fig. 5). Durch die Kenntnis über den strukturellen Molekülaufbau des Proteins wurde durch elektro-statische Berechnungen ein theoretisches elektrisches Dipol-Moment für dieses Molekül berechnet [31].

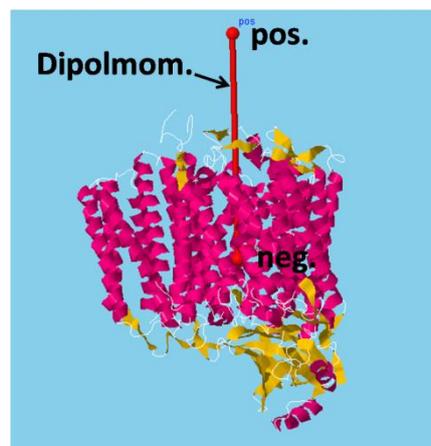
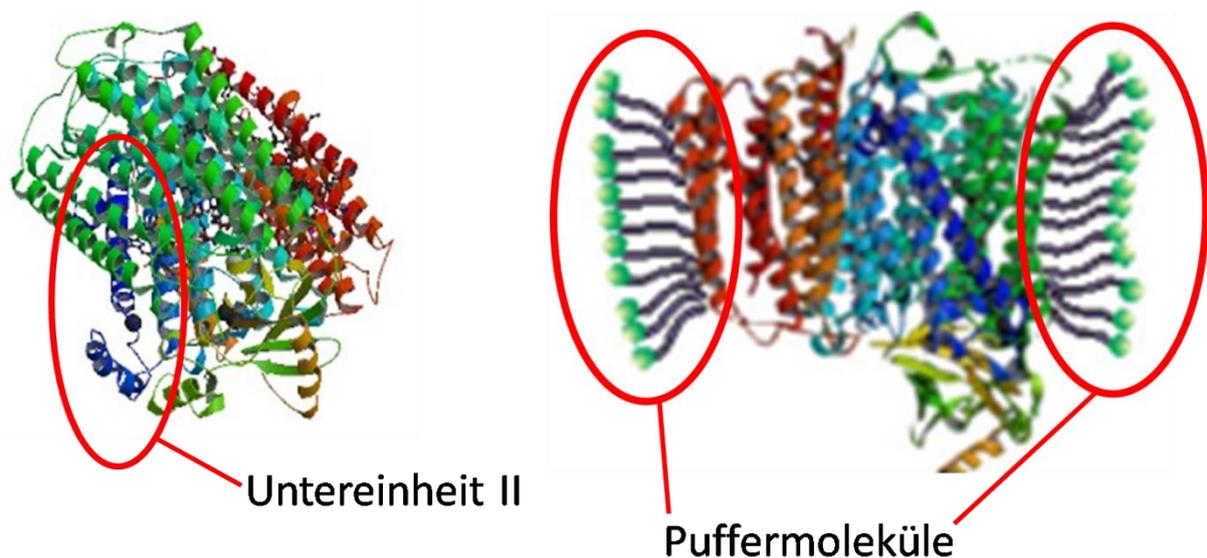


Fig. 4: Berechnetes Dipolmoment der genutzten Cytochrom c Oxidase. (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/dipol/>)

Eine Aufgabe der Cytochrom c Oxidase in der Natur findet sich in der Atmungskette. Sie ist verantwortlich für die Reduktion des Sauerstoffmoleküls zu Wasser [32]. Die natürliche Struktur ist in Fig. 5 zu sehen. Für den Fall das es in einer Pufferlösung mit n-Dodecyl-b-D-maltese (DDM) Zusatz vorliegt, setzen sich die DDM-Moleküle an die hydrophoben Stellen der Cytochrom c Oxidase. Bei folgenden Bildern der CcO, werden die anhaftenden Moleküle, für eine übersichtlichere Darstellung, nicht berücksichtigt.



**Fig. 5:** Molekülaufbau der Cytochrom c Oxidase. Aufgelöst mit der Röntgenstruktur Analyse mit einer Auflösung von 2 Å (links). Rechts: Cytochrom c Oxidase in DDM-Pufferlösung, die DDM-Puffermoleküle setzen sich an die freien Stellen der CcO fest [11]. Das für die Anbindung notwendige Histidinmolekül, befindet sich an der Untereinheit II des Proteins.

## 1.6 His-Tag-Technologie

Diese Technik wurde 1988 von Hochuli entwickelt [33, 34]. Es handelt sich dabei um ein kurzkettiges Affinitätspeptid, welches aus fünf oder sechs Histidinen besteht, dem so genannten „His-Tag“. Der His-Tag wechselwirkt stark mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Metall-Chelat-Komplexen und kann mit diesen eine komplexe Verbindung eingehen. Die Histidinen können theoretisch an jede Untereinheit eines Moleküls angebracht werden, je nach Verwendungszweck. Im Falle der von uns genutzten Cytochrom c Oxidase, befindet sich der His-Tag-Anker an der Untereinheit I (Fig. 5). Dies soll sicherstellen, dass nach dem Adsorbieren das Proteins seine volle Funktionalität behält. Ein Ziel dieser Arbeit besteht unter anderem darin, zu überprüfen, ob die His-Tag-Technologie eine ausreichende Orientierung des Proteins gewährleistet, oder eine Nachorientierung während der Lipid-Schicht Formung stattfindet.

## 2 Theorie

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen erläutert, welche für die Anfertigung dieser Arbeit notwendig waren.

Eine eingehendere Beschäftigung mit dieser Thematik kann nachgelesen werden in[35].

### 2.1 Elektromagnetische Wellen in Materie

In diesem Abschnitt betrachten wir das Verhalten von Licht in Materie und deren Wechselwirkungen und das Verhalten Grenzflächen. Die Axiome des Elektromagnetismus sind in den Maxwell-Gleichungen zusammengefasst.

In ihnen wird das elektrische Feld  $E$ , sowie das magnetische Feld  $H$  in makroskopischen Systemen beschrieben. Für unsere Betrachtungen gehen wir davon aus, dass keine freien Ladungsträger oder ein Stromfluss vorhanden sind. Unsere Materialien nehmen wir als homogen an. Damit folgt aus den Maxwell Gleichungen:

$$\nabla \cdot \vec{E}(\vec{r}, t) = 0 \quad (\text{Gl. 1})$$

$$\nabla \cdot \vec{E}(\vec{r}, t) = -\mu_0 \mu_r \frac{\delta \vec{H}(\vec{r}, t)}{\delta t} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$\nabla \cdot \vec{H}(\vec{r}, t) = 0 \quad (\text{Gl. 3})$$

$$\nabla \cdot \vec{H}(\vec{r}, t) = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\delta \vec{E}(\vec{r}, t)}{\delta t} \quad (\text{Gl. 4})$$

Wobei es sich bei  $\mu_0$  um die magnetische- und bei  $\varepsilon_0$  um die elektrische Feldkonstante handelt.

$\mu_r/\varepsilon_r$  beschreiben jeweils den materialabhängigen Permeabilitätskoeffizienten/Dielektrizitätskoeffizienten für ein homogenes Medium. Es wird angenommen, dass  $\mu_r=1$  ist. Unter Berücksichtigung dieser Parameter und Annahmen, kommen wir auf die dispersionsfreie Wellengleichung für das elektrische Feld:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \varepsilon_r \frac{\delta^2 \vec{E}}{\delta t^2} = 0 \quad (\text{Gl. 5})$$

Aus dieser geht als eine spezielle Lösung, die Gleichung für ebene (monochromatische) Wellen hervor:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 \cdot e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad (\text{Gl. 6})$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}_0 \cdot e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad (\text{Gl. 7})$$

wobei  $\vec{k}$  den Wellenvektor der sich ausbreitenden Welle und  $\omega$  die Kreisfrequenz beschreibt.

### 2.1.1 Wechselwirkung von Licht und Materie

Wird Materie in ein externes elektrisches Feld eingebracht, so reagiert diese auf die E-Felder. In der Materie werden positive und negative Ladungen zueinander verschoben, die so genannte Verschiebungspolarisation. Dabei werden die Elektronen so verschoben, dass der Ladungsschwerpunkt der negativen Elektronen nicht mehr mit dem Schwerpunkt der positiven Ladungen übereinstimmt (Fig. 6). Sie wird Elektronenpolarisation genannt und tritt in jeder Art von Materie auf, sowohl unpolarer (kein permanentes Dipolmoment), wie auch polarer (permanentes Dipolmoment).

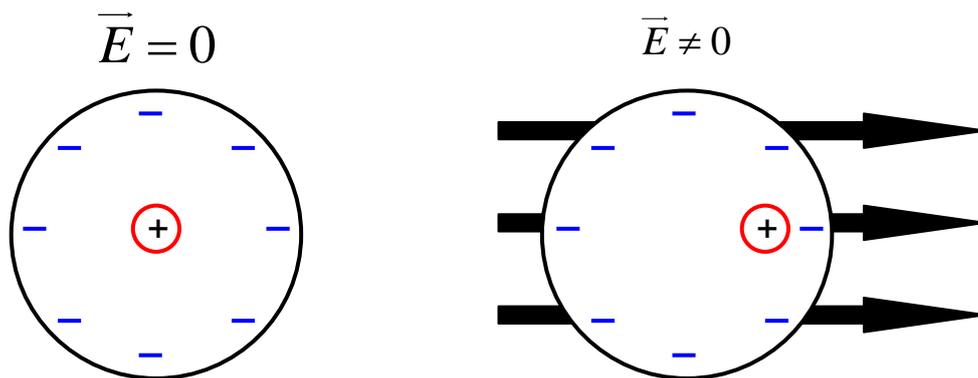


Fig. 6: Ladungsverschiebung bei anlegen eines externen elektrischen Feldes.

Die Beziehung von induziertem Dipol  $\vec{p}_{ind}$  und lokalem E-Feld  $\vec{E}_{lokal}$  kann durch

$$\vec{p}_{ind} = \kappa * \vec{E}_{lokal} \quad (\text{Gl. 8})$$

angegeben werden.  $\kappa$  nennt man die Hyperpolarisierbarkeit. Existiert in Materie ein permanenter Dipol wie beispielsweise in Wassermolekülen oder in Kristallgittern wird nicht nur Ladung verschoben, sondern sie orientiert sich durch das externe E-Feld und wird deshalb auch Orientierungspolarisation genannt. Diese kommt durch die Anregung von Ionen zustande. Da Ionen im Vergleich zu Elektronen ungleich massereicher sind, können diese bei hohen Frequenzen (Bsp.: Licht) der Schwingung des externen E-Feldes nicht mehr folgen, während die schnelleren Elektronen damit kein Problem haben. Deshalb gehen wir hier auch nur auf die Verschiebungspolarisation ein, denn sie ist verantwortlich für den Brechungsindex.

Die Beziehung von Brechungsindex  $n$  und Polarisierbarkeit  $\alpha$  kann beschrieben werden durch den Lorentz-Lorenz Ausdruck [36]:

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} * \frac{M}{\rho} = \frac{1}{3} \frac{N_A}{\epsilon_0} \alpha \quad (\text{Gl. 9})$$

hierbei steht  $N_A$  für die Avogadro'sche Zahl,  $\epsilon_0$  für die elektrische Feldkonstante,  $M$  für die Molmasse und  $\rho$  für die Dichte.

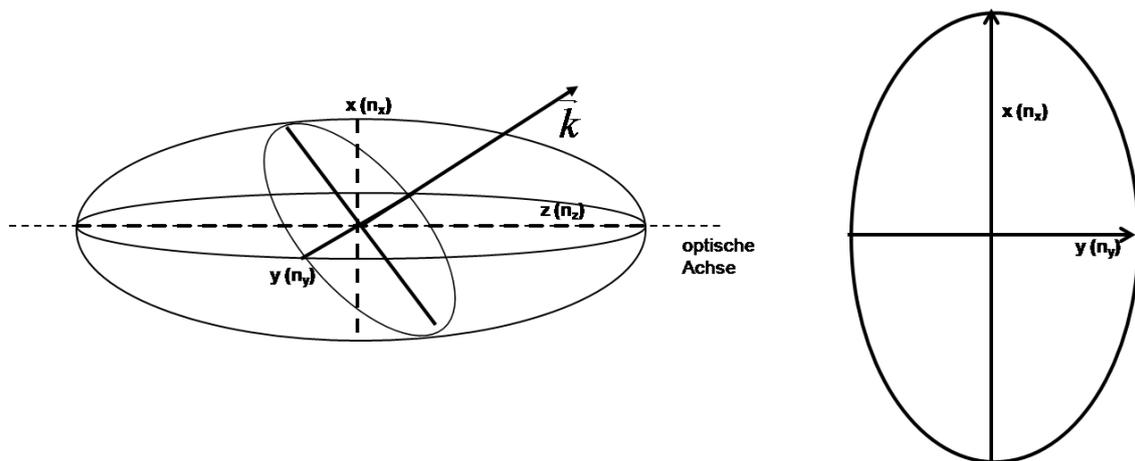
Aus (Gl. 9) geht hervor, dass mit höherer Polarisierbarkeit auch der Brechungsindex größere Werte annimmt.

### **2.1.2 Ausbreitung ebener elektromagnetischer Wellen in optisch anisotropen Medien**

Bisher haben wir ausschließlich optisch isotrope Medien betrachtet, in denen sich elektromagnetische Wellen ungeachtet ihrer Polarisierung mit gleicher Geschwindigkeit fortbewegen.

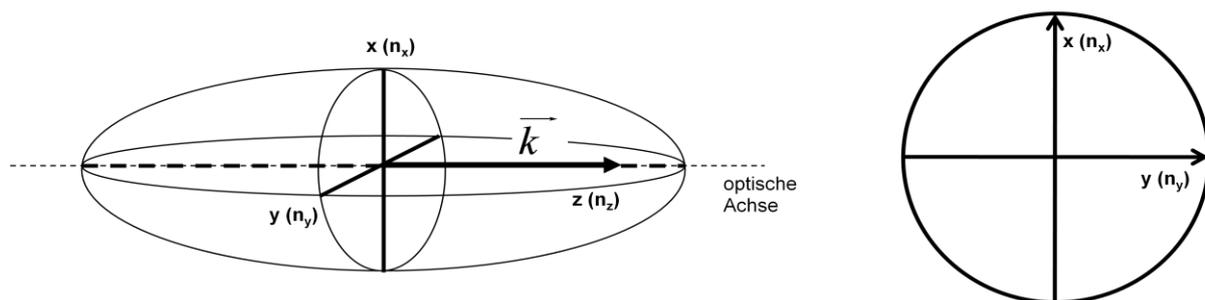
Da die Auswertungen dieser Arbeit auf dem Prinzip der optischen Anisotropie von Ausbreitungsmedien beruht, wollen wir hier einen genaueren Blick auf die Auswirkungen der Anisotropie auf elektromagnetische Wellen und deren Ausbreitungseigenschaften werfen.

Als optisch anisotrop wird ein Medium bezeichnet, dessen Brechungsindex je nach Raumrichtung unterschieden werden muss. Eines der bekanntesten anisotropen Materialien sind doppelbrechende Kristalle [37]. Diese spalten einen einfallenden Lichtstrahl in einen so genannten ordentlichen Strahl und einen außerordentlichen Strahl, wobei beide jeweils einen unterschiedlichen Brechungsindex erfahren [38]. Dieser Sachverhalt wird verdeutlicht durch das Indikatrix Ellipsoid. Es beschreibt die Brechungsindexverhältnisse der drei Raumrichtungen in einem Kristall. Legt man durch das Indikatrix Ellipsoid eine Ebene, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle liegt (definiert durch den Wellenvektor  $\vec{k}$ ), so erhält man das Brechungsindex Ellipsoid. Mit diesem kann das Verhältnis der Brechungsindizes unterschiedlicher Polarisierungen verdeutlicht werden (Fig. 7).



**Fig. 7:** Links: Indikatrix Ellipsoid mit eingezeichneter Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahls. Rechts: Dazugehöriges Brechungsindex Ellipsoid, der Brechungsindex in  $x$ - ist größer als in  $y$ -Richtung.

Liegt die Ausbreitungsrichtung der Welle parallel zur optischen Achse des Kristalls, so sind die Brechungsindizes beider Raumrichtungen gleich und das Brechungsindex Ellipsoid wird zu einem Kreis. In diesem Fall sprechen wir von optisch isotrop (Fig. 8).



**Fig. 8:** Links: Indikatrix-Ellipsoid mit sich, parallel zur optischen Achse des Kristalls, ausbreitender Welle. Rechts: Das Brechungsindex Ellipsoid wird zum Kreis, Polarisationen in beide Raumrichtungen erfahren denselben Brechungsindex.

Im Fall der Kristalle resultiert die optische Anisotropie aus dem Aufbau der Gitteratome, diese schwingen, solange sie nicht kubisch aufgebaut sind, in eine bestimmte Vorzugsrichtung.

Aber auch Moleküle können den Effekt der optischen Anisotropie aufweisen, wenn sie über einen permanenten Dipol verfügen. Fällt linear polarisiertes Licht auf ein Molekül, so ist dieses in Richtung des Dipols leichter polarisierbar als senkrecht dazu. Dadurch entsteht im Falle eines Moleküls ebenfalls ein Brechungsindex Ellipsoid. Je leichter ein Molekül in eine Richtung zu polarisieren ist, desto höher ist der Brechungsindex in diese Richtung. Diese orientierungsspezifische Moleküleigenschaft wird in dieser Arbeit genutzt um zu überprüfen, wie die untersuchten Moleküle zur Anbindungsoberfläche orientiert sind.

### 2.1.3 Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen

Als nächstes betrachten wir die Effekte die auftreten, wenn elektromagnetische Wellen auf ebene Grenzflächen treffen. Trifft eine Welle aus Medium 1 mit dem Brechungsindex  $n_1$  unter dem Winkel  $\varphi$  auf ein Medium 2 mit Brechungsindex  $n_2$ , so erfährt diese zwei Effekte.

Ein Teil der Welle wird unter  $\varphi_r$  reflektiert, der andere wird unter  $\varphi_t$  transmittiert.

Das Snelliussche-Brechungsgesetz beschreibt hierbei unter welchem Winkel die Transmission stattfindet:

$$n_1 * \sin(\varphi_e) = n_2 * \sin(\varphi_t) \quad (\text{Gl. 10})$$

Transmission und Reflexion sind dabei abhängig von der Polarisierung des Lichtes. Man unterscheidet zwischen TE- und TM-Polarisierung.

Bei TE polarisiertem Licht steht der elektrische Feldstärkevektor senkrecht auf der Einfallsebene, wohingegen bei TM Polarisation der elektrische Feldstärkevektor parallel zur Einfallsebene schwingt (Fig. 9). Deshalb trifft man häufig auf die Bezeichnungen (senkrecht) s- bzw. (parallel) p-polarisiert. Diese Unterscheidung ist wichtig, da sie für die Übergangsbedingung wichtig ist, sie verlangt dass an einer Grenzfläche die Tangentialkomponenten elektrischer Feldstärke  $\vec{E}$  und magnetische Feldstärke  $\vec{H}$  stetig sein müssen.

Die Transmissions- und Reflektionskoeffizienten für beide Polarisierungsrichtungen können mit Hilfe der Fresnel'schen Formeln bestimmt werden [39]:

$$r_{TE} = \frac{n_1 \cos(\varphi_e) - n_2 \cos(\varphi_t)}{n_1 \cos(\varphi_e) + n_2 \cos(\varphi_t)} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$t_{TE} = \frac{2n_1 \cos(\varphi_e)}{n_1 \cos(\varphi_e) + n_2 \cos(\varphi_t)} \quad (\text{Gl. 12})$$

$$r_{TM} = \frac{n_1 \cos(\varphi_t) - n_2 \cos(\varphi_e)}{n_1 \cos(\varphi_t) + n_2 \cos(\varphi_e)} \quad (\text{Gl. 13})$$

$$t_{TM} = \frac{2n_1 \cos(\varphi_e)}{n_1 \cos(\varphi_t) + n_2 \cos(\varphi_e)} \quad (\text{Gl. 14})$$

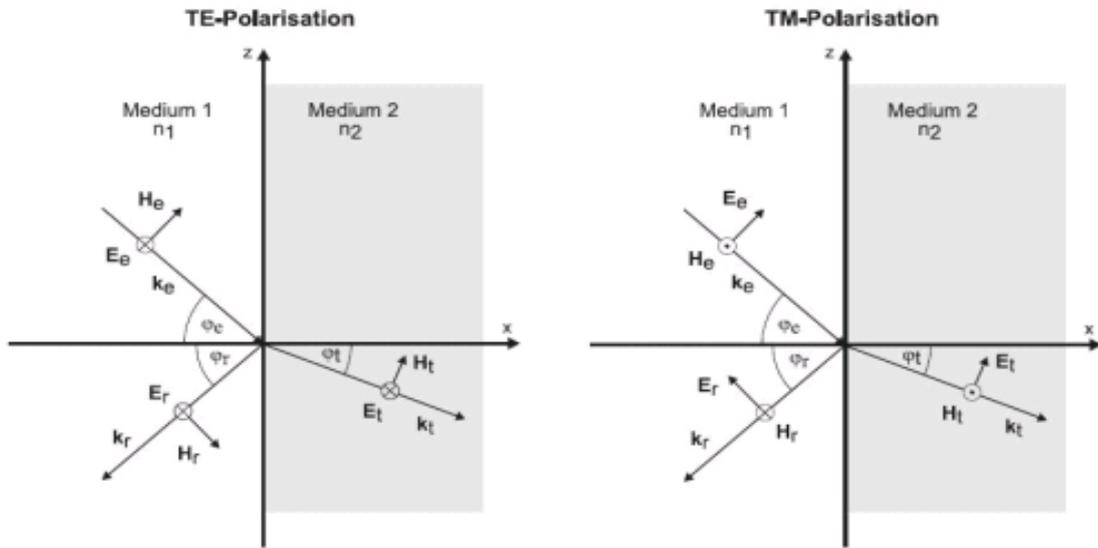


Fig. 9: Darstellung des Snelliuschen Brechungsgesetz für TE- und TM-Polarisation. Die Tangentialkomponenten müssen beim Übergang von Medium 1 in Medium 2 stetig sein.

### 2.1.4 Totalreflexion

Trifft eine elektromagnetische Welle aus einem Medium mit höherem Brechungsindex auf ein Medium mit einem niedrigeren Brechungsindex, so tritt ab einem bestimmten Winkel  $\varphi_{\text{total}}$  Totalreflexion auf.

Dies bedeutet, dass das gesamte Licht an der Grenzfläche reflektiert wird und dementsprechend kein Licht mehr transmittiert und in Medium 2 eintritt.

Der kritische Winkel der Totalreflexion kann bestimmt werden aus den Snelliuschen Formeln, wenn davon ausgegangen wird, dass  $\varphi_t = 90^\circ$  ist.

Betrachtet man die Totalreflexion genauer so fällt auf, dass der Endpunkt des einfallenden Strahls nicht mit dem Startpunkt des reflektierten Strahls übereinstimmt. Es entsteht ein Versatz an der Grenzfläche, welcher als Goos-Hähnchen-Versatz bekannt ist. Um die strahlenoptische Betrachtung beizubehalten muss man sich die Grenzfläche um einen gewissen Betrag ins Medium 2 verschoben vorstellen.

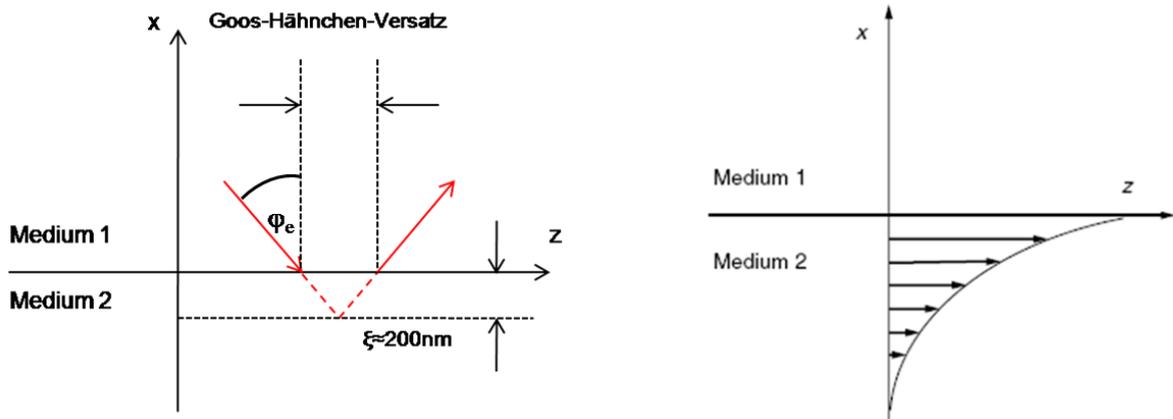


Fig. 10: Links: Strahlenoptische Betrachtung der Eindringtiefe einer evaneszenten Welle, erzeugt durch Totalreflektion. Rechts: Wellenoptische Darstellung der exponentiell abfallenden evaneszenten Feldanteils.

Wellenoptisch betrachtet dringt die einfallende Welle in das Medium 2 ein und fällt dort exponentiell ab. Dieser abfallende Feldanteil wird evaneszente Welle genannt. Man definiert ihre Eindringtiefe in das Medium 2 durch den Punkt an dem ihr Feldanteil auf den  $\frac{1}{e}$ -ten Teil abgeklungen ist. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes wird mit Hilfe von (Gl. 15) definiert:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2(\varphi_e) - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (\text{Gl. 15})$$

Evaneszente Wellen reagieren sehr sensitiv auf Änderungen der optischen Eigenschaften des Eindringmediums.

## 2.2 Wellenleitung

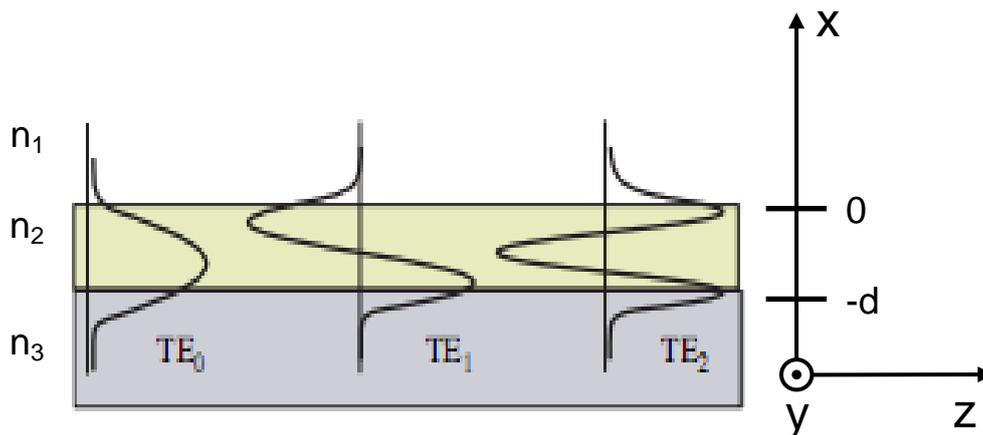
Betrachten wir nun ein isotropes Schichtsystem, welches aus zwei Grenzflächen und drei verschiedenen Brechungsindizes besteht.

Sollte die mittlere Schicht den höchsten Brechungsindex aufweisen und die angrenzenden Schichten einen geringeren Brechungsindex haben, so können in der mittleren Schicht Wellen geführt werden, wenn an beiden Grenzflächen Totalreflexion auftritt.

In diesem Fall ist das Licht in der mittleren Schicht „gefangen“.

Bei geeignetem Einfallswinkel bildet sich eine stehende Welle, welche in z-Richtung durch den Wellenleiter propagiert. Je nach Einfallswinkel können mehrere Ordnungen von stehenden Wellen, sie werden Wellenleitermoden genannt. Eine Mode repräsentiert die elektrische Feldverteilung in der wellenleitenden Schicht, die durch (Gl. 16) beschrieben werden kann [40]:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(x)e^{-j(k_0 * N_{eff}^{(\mu)} * z - \omega t)} \quad (\text{Gl. 16})$$



**Fig. 11: Elektromagnetische Feldverteilung der ersten drei TE-Moden in einem asymmetrischen planaren Wellenleiter [1].**

Durch die Totalreflektion bilden sich an beiden Grenzflächen evaneszente Felder in den Nachbarmedien. Diese sorgen dafür, dass die Mode nicht allein den Brechungsindex von Medium 2 spürt, sondern ein „Brechungsindex-Gemisch“ aus allen drei Medien, dem sogenannten effektiven Brechungsindex  $N_{eff}$ .

$$N_{eff} = \frac{\beta_m}{k_0} \quad (\text{Gl. 17})$$

Wobei die Ausbreitungskonstante  $\beta$  für jede Mode unterschiedlich ist, auch wenn es sich um dasselbe Schichtsystem handelt. Erklären kann man dies damit, dass jede Mode

unterschiedlich tief in die jeweiligen Nachbarmedien hineinragt und sich so für jede Mode ein individueller effektiver Brechungsindex ergibt.

### 2.2.1 Geführte Moden in planaren Schichtwellenleitern

Planare Schichtwellenleitersysteme stellen die einfachste Konfiguration eines Wellenleiters dar. In ihnen propagieren die elektro-magnetischen Wellen nur in einer Dimension. In Fig. 11 ist das einfachste mögliche Schichtsystem dargestellt. Es lässt sich darstellen durch [35]:

$$\begin{aligned} \text{Medium 1:} & \quad x \geq 0 & \quad n(x)=n_1 \\ \text{Medium 2:} & \quad 0 \geq x \geq -d & \quad n(x)=n_2 \\ \text{Medium 3:} & \quad -d \geq x & \quad n(x)=n_3 \end{aligned}$$

Da wir von einem optisch isotropen Medium ausgehen gilt  $n_i(x) = n_i$ , desweiteren gilt die Translationssymmetrie, dadurch lässt sich (Gl. 5 vereinfachen zu:

$$\frac{\delta^2 \vec{E}_j(x)}{\delta x^2} + (k_0^2 n_j^2 - \beta^2) \vec{E}_j(x) = 0 \quad (\text{Gl. 18})$$

Der Indize j nummeriert die einzelnen Schichten.

Zur Vereinfachung werden noch folgende Abkürzungen eingeführt:

$$u^2 = k_0^2 n_2^2 - \beta^2 \quad (\text{Gl. 19})$$

$$v^2 = -(k_0^2 n_1^2 - \beta^2) \quad (\text{Gl. 20})$$

$$w^2 = -(k_0^2 n_3^2 - \beta^2) \quad (\text{Gl. 21})$$

Damit können die Gleichungen für die drei Medien folgendermaßen notiert werden:

$$\text{Medium 1: } \frac{\delta \vec{E}_1(x)}{\delta x^2} - v^2 \vec{E}_1(x) = 0 \quad (\text{Gl. 22})$$

$$\text{Medium 2: } \frac{\delta \vec{E}_2(x)}{\delta x^2} + u^2 \vec{E}_2(x) = 0 \quad (\text{Gl. 23})$$

$$\text{Medium 3: } \frac{\delta \vec{E}_3(x)}{\delta x^2} + w^2 \vec{E}_3(x) = 0 \quad (\text{Gl. 24})$$

Die Translationssymmetrie  $\frac{\delta}{\delta y} = 0$ , des Wellenleiters in y-Richtung, erlaubt die Zerlegung der sich im Wellenleiter ausbreitenden Felder in transversal elektrische Moden (TE) mit einem senkrecht zur Ausbreitungsrichtung polarisiertem Feldstärkevektor und in transversal magnetische Moden (TM), bei denen der Feldstärkevektor parallel zur Ausbreitungsrichtung verläuft.

$$\text{TE-Moden: } E_z = E_x = H_y = 0$$

$$\text{TM-Moden: } H_z = H_x = E_y = 0$$

## 2.2.2 Transversal-elektrische-Moden

Um die elektrische Feldstärkeverteilung der TE-Moden für  $E_y$  zu bestimmen benutzen wir folgenden Lösungsansatz:

$$E_{y1} = A * e^{-vx} \quad (\text{Gl. 25})$$

$$E_{y2} = B * \cos(ux) + C * \sin(ux) \quad (\text{Gl. 26})$$

$$E_{y3} = D * e^{+wx} \quad (\text{Gl. 27})$$

Aus den Gleichungen ((Gl. 25) und ((Gl. 27) kann man den exponentiell abfallenden evaneszenten Feldanteil in den Nachbarmedien erkennen. (Gl. 26 beschreibt das stehende Wellenfeld (Mode) in der wellenleitenden Schicht. An den Grenzflächen muss die Übergangsbedingung der Tangentialkomponenten erfüllt sein, das heißt für  $x = 0$  gilt  $D = B$  und für  $x = -d$  gilt:

$$A * e^{-vd} = B * \cos(ud) - C * \sin(ud) \quad (\text{Gl. 28})$$

Für  $H_z$  muss die Tangentialkomponente ebenfalls stetig übergehen. Wenn man den gleichen Ansatz wie für  $E_y$  verwendet, kommt als Lösung für die H-Feld Komponente  $H_z$ :

$$v * A * e^{-vd} = u(B * \sin(ud) + C * \cos(ud)) \quad (\text{Gl. 29})$$

Formt man die Gleichungen (Gl. 28) und (Gl. 29) um, so erhält man als Bedingung für geführte Moden in Medium 2:

$$\tan(ud) = \frac{u(v + w)}{u^2 - vw} \quad (\text{Gl. 30})$$

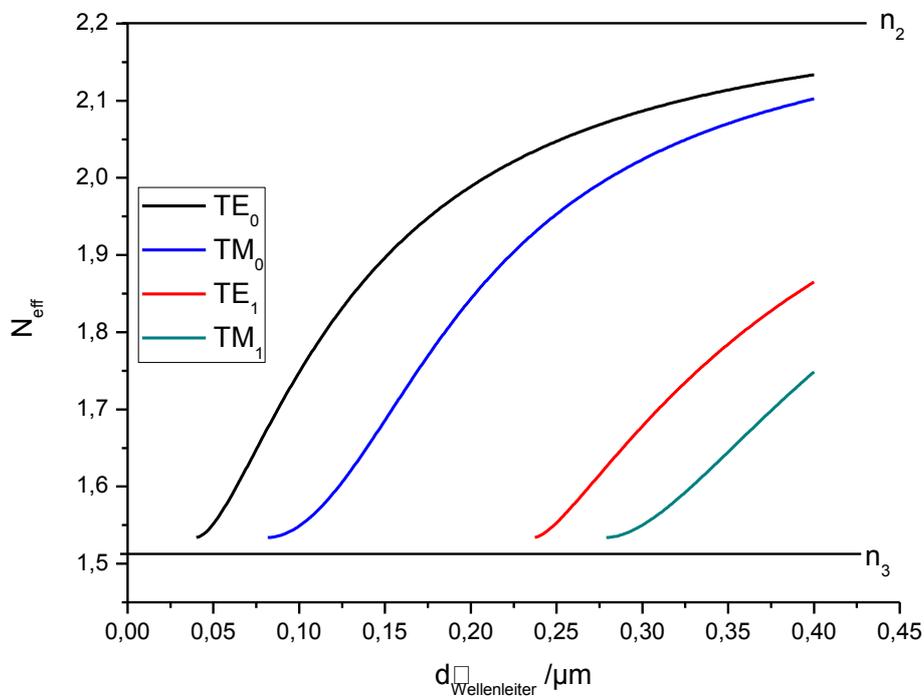
(Gl. 30 wird auch Dispersionsrelation genannt. Damit eine Mode geführt werden kann, muss ihre Ausbreitungskonstante  $\beta$  diese Funktion erfüllen, wobei höhere Moden durch die Periodizität der Tangens-Funktion beschrieben werden ( $\tan(du+v\pi)$ ), wobei  $v$  für die Modennummer steht.

Analog kann mit dem gleichem Ansatz die Dispersionsrelation für die geführten TM-Moden berechnet werden. Verfolgt man diesen Ansatz, so kommt man auf:

$$\tan(ud) = \frac{\frac{u}{n_2^2} \left\{ \frac{v}{n_1^2} - \frac{w}{n_3^2} \right\}}{\frac{u}{n_2^4} - \frac{v}{n_1^2} * \frac{w}{n_3^2}} \quad (\text{Gl. 31})$$

Da für beide Polarisierungen die Dispersionsrelation unterschiedlich ausfällt, weisen TE- und TM-Moden jeweils einen unterschiedlichen effektiven Brechungsindex  $N_{\text{eff}}$  auf, dieser liegt zwischen den Brechungsindizes von  $n_2$  und  $n_3$  so das gilt:

$$n_3 < N_{\text{eff}} < n_2 \quad (\text{Gl. 32})$$



**Fig. 12: Modendispersion für die ersten vier geführten Moden eines Schicht-Wellenleiters. Aufgetragen wurde der effektive Brechungsindex der Moden in Abhängigkeit der Wellenleiterdicke. Simulationsparameter:  $n_3=1,534$ ;  $n_2=2,22$ ;  $n_1=1$ ;  $d_3=\infty$ ;  $d_2=160\text{nm}$ ;  $d_1=\infty$ ;  $\lambda=633\text{nm}$**

## 2.3 Vier-Schicht-Modell und Transfermatrix-Methode

Bisher sind wir von einem Drei-Schichten-Modell ausgegangen, für das noch eine analytische Lösung für Wellenleitung gefunden werden kann. Dies gilt noch bis zu einem Vierschichtsystem [35], alle Systeme mit mehr als vier Schichten können nur numerisch gelöst werden. Die Transfermatrix-Methode gehört zu einem der numerischen Verfahren, mit dem man ein beliebiges Schichtsystem auf seine Ausbreitungseigenschaften bestimmen kann. Jede Schicht wird als homogen angenommen, kann aber eine beliebige Schichtdicke  $d$  und Brechungsindex  $n$  besitzen. Die Felder jeder einzelnen Schicht werden in eine Überlagerung einer hinlaufenden und einer rücklaufenden Welle zerlegt, welche eine positive und eine negative  $x$ -Komponente besitzen. Die hinlaufende Welle wird mit einem  $+$  und die rücklaufende Welle mit einem  $-$  gekennzeichnet.

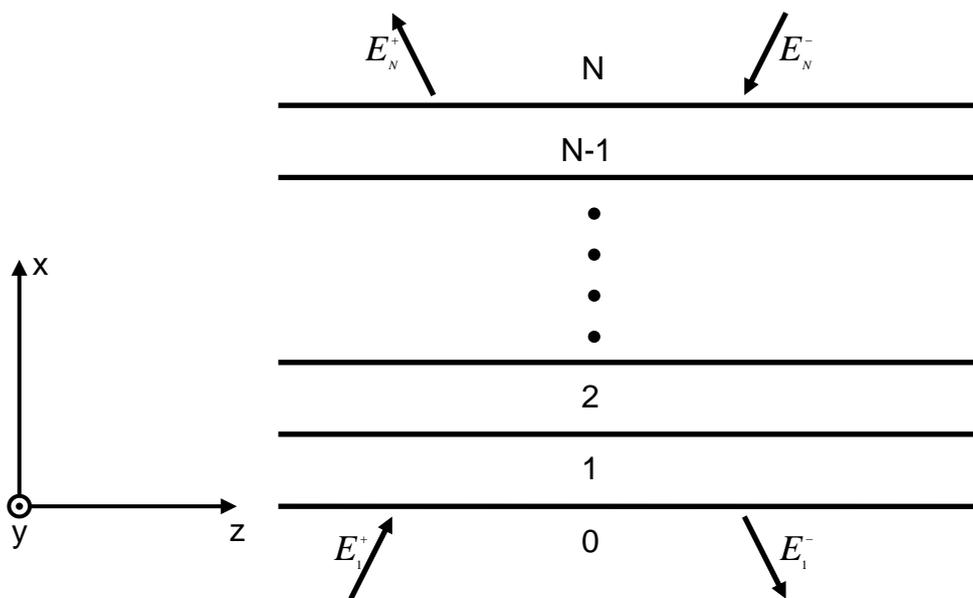


Fig. 13: Schichtaufbau für einen Vielschicht-Wellenleiter. In jeder der  $N$  Schichten existiert eine Welle mit einer positiven und einer negativen  $x$ -Komponente.

So dass in jeder Schicht gilt:

$$\vec{E}_j = \vec{E}_j^+ + \vec{E}_j^- \quad (\text{Gl. 33})$$

$$\vec{H}_j = \vec{H}_j^+ + \vec{H}_j^- \quad (\text{Gl. 34})$$

Wie schon erwähnt, gilt beim Übergang an einer Grenzschicht die so genannte Stetigkeitsbedingung. Diese verlangt dass die tangentialen Feldstärkekomponenten stetig bleiben müssen.

Die Feldausbreitung in x-Richtung in jeder beliebigen Schicht j kann bestimmt werden durch:

$$\begin{pmatrix} E_j^+ \\ E_j^- \end{pmatrix}_o = P_j \begin{pmatrix} E_j^{+'} \\ E_j^{-'} \end{pmatrix}_u \quad (\text{Gl. 35})$$

Dabei stehen auf der linken Seite der Gleichung die Feldanteile am oberen Rand der j-ten Schicht und auf der rechten Seite die untere Feldanteil der j-ten Schicht.

Bei  $P_j$  handelt es sich um die Ausbreitungsmatrix. Diese ist gegeben durch:

$$P_j = \begin{pmatrix} e^{-ik_{xj} d_j} & 0 \\ 0 & e^{ik_{xj} d_j} \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 36})$$

wobei  $k_{xj}$  für den Wellenvektor in x-Richtung steht und  $d_j$  die Dicke der jeweiligen Schicht angibt.

Fällt nun ein Feld aus Schicht j auf die Grenzfläche zu j+1, müssen dessen Tangentialkomponenten bestimmt werden, welche stetig an den unteren Rand der j+1ten Schicht übergehen.

$$\begin{pmatrix} E_{yj} \\ H_{zj} \end{pmatrix} = D_j \begin{pmatrix} E_{yj}^+ \\ E_{yj}^- \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 37})$$

Hierbei handelt es sich bei  $D_j$  um die Übergangsmatrix, welche Polarisationsabhängig durch folgende Beziehungen verknüpft werden kann.

$$D_j^{TE} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \frac{k_{xj}}{\omega\mu} & -\frac{k_{xj}}{\omega\mu} \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 38})$$

Nach dem Übergang in die angrenzende Schicht muss wieder das Gesamtfeld ermittelt werden, das sich anschließend in dieser Schicht weiter in x-Richtung ausbreiten kann.

Dabei wird  $D^{-1}$  als Rücktransformationsmatrix beschrieben und ist die inverse Übergangsmatrix von  $D_j$ .

$$\begin{pmatrix} E_{yj+1}^+ \\ E_{yj+1}^- \end{pmatrix}_o = P_{j+1} D_{j+1}^{-1} D_j \begin{pmatrix} E_{yj}^+ \\ E_{yj}^- \end{pmatrix}_u \quad (\text{Gl. 39})$$

Die Feldanteile in Schicht N können mit den Feldanteilen in Schicht 1 über folgende Beziehung verknüpft werden:

$$\begin{pmatrix} E_{y1}^+ \\ E_{y1}^- \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a & b \\ c & d \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_{yN}^+ \\ E_{yN}^- \end{pmatrix} \quad (\text{Gl. 40})$$

Dabei beschreibt die Schichtmatrix alle Übergänge zwischen der 0-ten und der N-ten Schicht und ist gegeben durch:

$$\begin{pmatrix} a & b \\ c & d \end{pmatrix} = D_0^{-1} \left\{ \prod_{j=1}^{N-1} D_j P_j D_j^{-1} \right\} D_N \quad (\text{Gl. 41})$$

Da Wellenleitung im Schichtsystem nur dann möglich ist, wenn in den angrenzenden Schichten ausschließlich ein evaneszenter Feldanteil vorhanden ist, bedeutet es dass die zum Schichtsystem hinlaufenden Feldanteile ( $E_{1+}$ ;  $E_{N-}$ ) verschwinden müssen. Damit folgt aus (Gl. 41) dass  $a = 0$  erreicht werden muss um dieses Kriterium zu erfüllen.

## 2.4 Kopplungsmöglichkeiten: Gitterkopplung

Zum Anregen einer Mode in einem Wellenleiter muss die Voraussetzung erfüllt sein, dass die Ausbreitungskonstante  $\beta_e$  des einfallenden Strahls gleich der Ausbreitungskonstante  $\beta_m$  der propagierenden Mode im Wellenleiter entspricht (Gl. 42 und (Gl. 43):

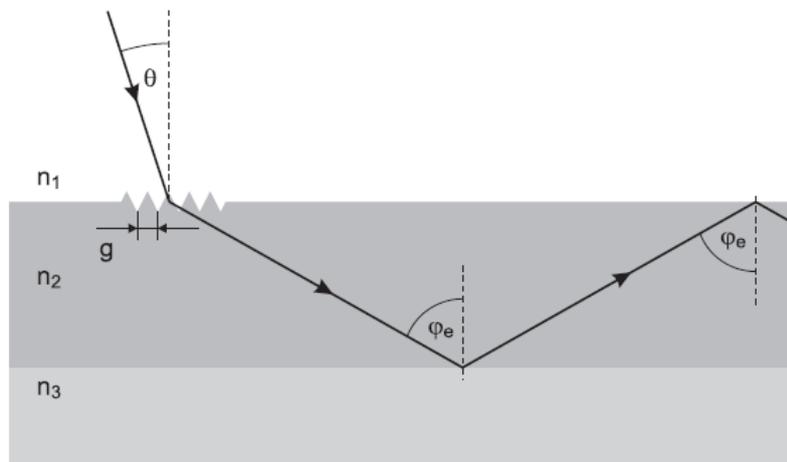
$$\beta_e = \beta_m \quad (\text{Gl. 42})$$

$$\beta_e = k_e * \sin(\theta) \quad (\text{Gl. 43})$$

wobei  $k_e$  der Wellenvektor und  $\theta$  der Einfallswinkel des einfallenden Strahls ist.

Da die einfallende Welle aus dem Medium Luft kommt, ist ihr Wellenvektor zu kurz um eine Mode anregen zu können, muss dieser verlängert werden. Hierfür stehen derzeit drei etablierte Verfahren zur Verfügung: Die Gitter-, die Prismen und die Stirnflächenkopplung [41]. Da in dieser Arbeit ausschließlich die Gitterkopplung genutzt wird, wird auf die zwei anderen Methoden hier nicht weiter eingegangen.

Bei der Gitterkopplung wird der Effekt der Beugung an periodischen Strukturen genutzt. Dazu wird ein Beugungsgitter mit einer Gitterkonstante  $G$  in die wellenleitende Schicht eingebracht. Trifft nun eine elektro-magnetische Welle auf die Struktur, so wird sie gebeugt und so der Wellenvektor verlängert, indem ein ganzzahliges Vielfaches der Gitterkonstante addiert (positive Beugungsordnung) oder subtrahiert (negative Beugungsordnung) wird.



**Fig. 14: Prinzip der Gitterkopplung anhand eines einfachen zwei-Schicht Systems. Die periodische Gitterstruktur verlängert den Wellenvektor, so dass Totalreflektion an Grenzflächen möglich ist.**

Es gilt:

$$\beta_m = k_e * \sin(\theta) \pm m * \frac{2\pi}{g} \quad (\text{Gl. 44})$$

wobei  $m$  für die Beugungsordnung des Gitters steht.

Mit dieser Methode ist eine selektive Modenanregung möglich, da jede Mode bei einem diskreten Winkel eingekoppelt wird.

Der effektive Brechungsindex der Mode lässt sich mit Hilfe von (Gl. 45) bestimmen

$$N_{eff} = n_1 * \sin(\theta) \pm m \frac{\lambda_e}{g} \quad (\text{Gl. 45})$$

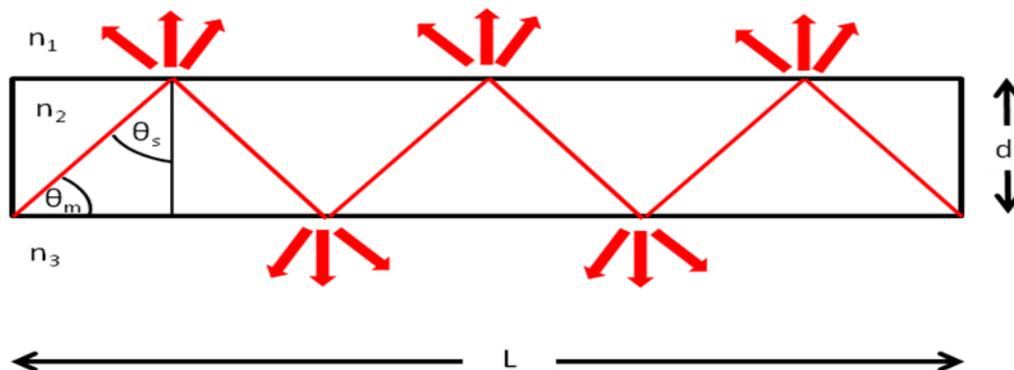
Dabei steht  $n_c$  für den Brechungsindex des Umgebungsmediums,  $\theta$  beschreibt den Winkel unter dem der Strahl auf das Gitter fällt,  $m$  repräsentiert die Beugungsordnung des Gitters,  $G$  die Gitterkonstante und  $\lambda_e$  steht für die Wellenlänge der einfallende Welle.

Der eindeutige Vorteil der Gitterkopplung besteht darin, dass die Gitterkonstante dem Wellenleiterdesign angepasst werden kann und so ein möglichst optimales Winkelspektrum realisiert werden kann. Bei der Prismenkopplung ist der Koppelwinkelbereich vom Brechungsindex des Prismas abhängig und erlaubt damit eine geringere Flexibilität der Koppelwinkel.

## 2.5 Verlustmechanismen in planaren Wellenleitern

Läuft eine geführte Mode durch einen Wellenleiter, ist sie drei Verlustmechanismen ausgesetzt. Der dominanteste ist der Streuverlust, gefolgt vom Absorptionsverlust und dem Strahlungsverlust. Da in unserem Fall alle Mechanismen, bis auf den Streuverlust, vernachlässigbar sind, wird hier auch nur auf diesen eingegangen. Die Streuverluste teilen sich ebenfalls auf in Oberflächenstreuung und Volumenstreuung. Die Volumenstreuung wird im Wellenleiter selbst verursacht durch Fehlstellen im Kristallgitter oder Fremdatome in der wellenleitenden Schicht. Da die heutigen genutzten Dielektrika mit einem Minimum an Fehlstellen hergestellt werden können, ist dieser Effekt nur von Bedeutung, wenn die Mode einen langen Weg in einem Wellenleiter zurücklegt ( $10^3$  m). In unserem Fall ist er vernachlässigbar und wird um ein Vielfaches von der Oberflächenstreuung übertroffen, weshalb wir diese hier ausführlicher behandeln wollen. Streuung an der Oberfläche kommt durch die Rauigkeit der Oberfläche zustande. Je rauer die Oberfläche, desto größer ist der Streuverlust an dieser. Dabei kommt der Streuverlust immer dann zustande, wenn das Licht an der Grenzfläche des Wellenleiters Totalreflektiert wird, wenn man die Wellenleitung Strahlenoptisch betrachtet. Die Anzahl an Reflexionen in einem Wellenleiter kann bestimmt durch [42]:

$$N_R = \frac{L}{2d * \cos(\theta_m)} \quad (\text{Gl. 46})$$



**Fig. 15: Oberflächenstreuung an planaren Wellenleitern nach dem Zig-Zag Modell. Bei jeder Reflexion an einer der beiden Grenzflächen wird Lichtleistung durch Oberflächeninhomogenitäten in die Umgebungsmedien gestreut.**

Daraus ist ersichtlich dass die Anzahl der Reflexionen mit kleineren Koppelwinkeln (höhere Modenordnung) zunimmt, was Wellenoptisch mit der tieferen Eindringtiefe der höheren Moden in die Umgebungsmedien erklärt werden kann.

Der Verlust in einem Wellenleiter in dB/cm kann berechnet werden mit

$$\mathcal{L} \left[ \frac{dB}{cm} \right] = 4,3\alpha [cm^{-1}] \quad (\text{Gl. 47})$$

wobei der Verlustfaktor  $\alpha$  durch den Ausdruck

$$\alpha_S = A^2 \left( \frac{\cos^3(\theta_r)}{2\sin(\theta_r)} \right) \left( \frac{1}{t_g + \left(\frac{1}{p}\right) + \left(\frac{1}{q}\right)} \right) \quad (\text{Gl. 48})$$

beschrieben wird.

Wobei  $p$  und  $q$  die Adsorptionskoeffizienten der angrenzenden Schichten ist und  $\theta_r$  dem Reflexionswinkel im Wellenleiter entspricht.

$A$  kann ausgedrückt werden durch

$$A = \frac{4\pi}{\lambda_S} (\sigma_{12}^2 + \sigma_{23}^2)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 49})$$

Hier beschreibt  $\lambda_S$  die Wellenlänge im Wellenleitermedium und  $\sigma_{12/23}$  die Oberflächenrauigkeit der Schichten bedeutet.

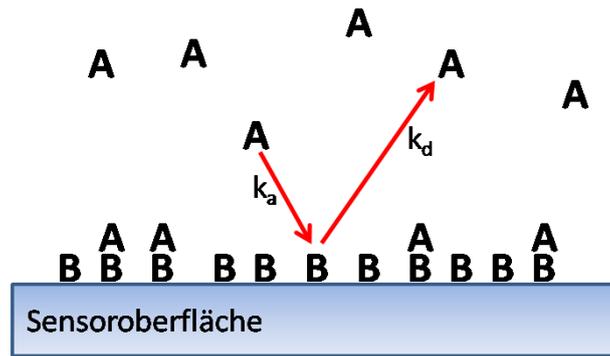
Erhöht sich die Rauigkeit ( $\sigma_{12}$ , oder  $\sigma_{23}$ ) zwischen der Wellenleiterschicht und einem der Umgebungsmedien, Beispielsweise durch Anlagerungen von Molekülen oder Polymerketten, erhöht sich der Oberflächenstreuverlust der geführten Mode. Dies macht sich in einer geringeren Modenintensität der propagierenden Mode bemerkbar.

## 2.6 Bestimmen von Bindungskonstanten

Für die Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen ist es möglich eine Bindungskonstante zwischen zwei Molekülen zu bestimmen [43]. Hierfür liegt ein Molekül  $A$  in einer Lösung vor und bindet aus dieser heraus an ein Molekül  $B$  an (Fig. 16), welches an eine Oberfläche gebunden ist. Daraus ergibt sich die Reaktionsgleichung (Gl. 50, für den reversiblen Prozess:



dabei beschreibt  $k_a$  die Assoziationskonstante (Anbinden der Moleküle) und  $k_d$  die Dissoziationskonstante (Ablösen der Moleküle).



**Fig. 16: Schematisches Prinzip eines Anbindungsprozesses. Molekül B ist auf der Sensoroberfläche angebunden. Durch Anziehende Wechselwirkungen zwischen Molekül A und B gehen diese eine Verbindung ein (AB).**

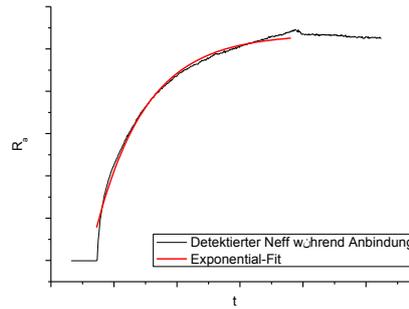
Der zeitliche Verlauf des Anbindungsprozess wird durch (Gl. 51 beschrieben:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (\text{Gl. 51})$$

Der Bestimmung von Bindungskonstanten liegt das Anbindungsmodell der Langmuir-Anbindung zugrunde. Dieses setzt folgenden Sachverhalt voraus:

- a) Es wird nur ein Monolayer angebunden
- b) Alle Anbindungsplätze, sind gleichwertig
- c) Keine Wechselwirkung der Anbindungsmoleküle untereinander
- d) Jedes Molekül A kann nur ein Molekül B binden

Aus diesen Bedingungen resultiert der charakteristische exponentielle Verlauf einer Langmuir-Anbindung [44]. Zu Beginn des Anbindungsprozess sind genügend freie Stellen an der Oberfläche vorhanden und die ersten Moleküle finden ohne langes Suchen einen Anbindungspartner. Schnell werden die freien Stellen weniger und die verbliebenen noch in Lösung befindlichen Moleküle brauchen länger bis sie eine noch freie Stelle zum Anbinden finden [44]. Fig. 17 zeigt den üblichen zeitlichen Verlauf einer Oberflächenbelegungsmessung, wie sie mit der Oberflächenplasmonenresonanz oder der Wellenleitermoden-Spektroskopie aufgenommen wird.



**Fig. 17: Aufgenommenes Spektrum während eines Anbindungsprozesses. Die Anbindungssteigung lässt sich durch eine Exponential-Funktion darstellen und erfüllt damit die Kriterien einer Langmuir-Anbindung.**

Handelt es sich bei dem Anbindungsprozess, um einen, der die Langmuir-Bedingungen erfüllt, lässt sich das aufgenommene Spektrum mit Hilfe einer Exponential-Funktion anfiten. Aus (Gl. 52 der Exponential-Funktion lässt sich die Assoziationskonstante bestimmen [45-47]:

$$\frac{d[AB]}{dt} = R_a e^{(k_a * t)} \quad (\text{Gl. 52})$$

Da die Versuche eine reproduzierbare Bindungskonstante der Cytochrom c Oxidase zu bestimmen, bisher fehlschlagen, soll in dieser Arbeit versucht werden eine Bindungskonstante auf oxydischen Oberflächen zu berechnen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Protein auf oxydischen Oberflächen weniger stark sind als auf Metallen und so weniger Störfaktoren das Langmuir-Modell stören.

### 3 Messmethoden:

In diesem Abschnitt werden die Funktionsprinzipien der bei dieser Arbeit verwendeten Messmethoden erläutert.

#### 3.1 Wellenleitermoden-Spektroskopie (WaMS)

Bei dieser Methode werden planare asymmetrische Wellenleitersensoren genutzt. Diese sind so beschaffen, dass mindestens die zwei Grundmoden beider Polarisierungen geführt werden können.

Die Moden werden durch einen Laser, welcher auf eine periodische Gitterstruktur fällt bei diskreten Winkeln angeregt.

Jede Mode erfährt beim Propagieren durch den Wellenleiter einen individuellen effektiven Brechungsindex, welcher durch den Einkoppelwinkel  $\theta$  der Mode bestimmt werden kann.

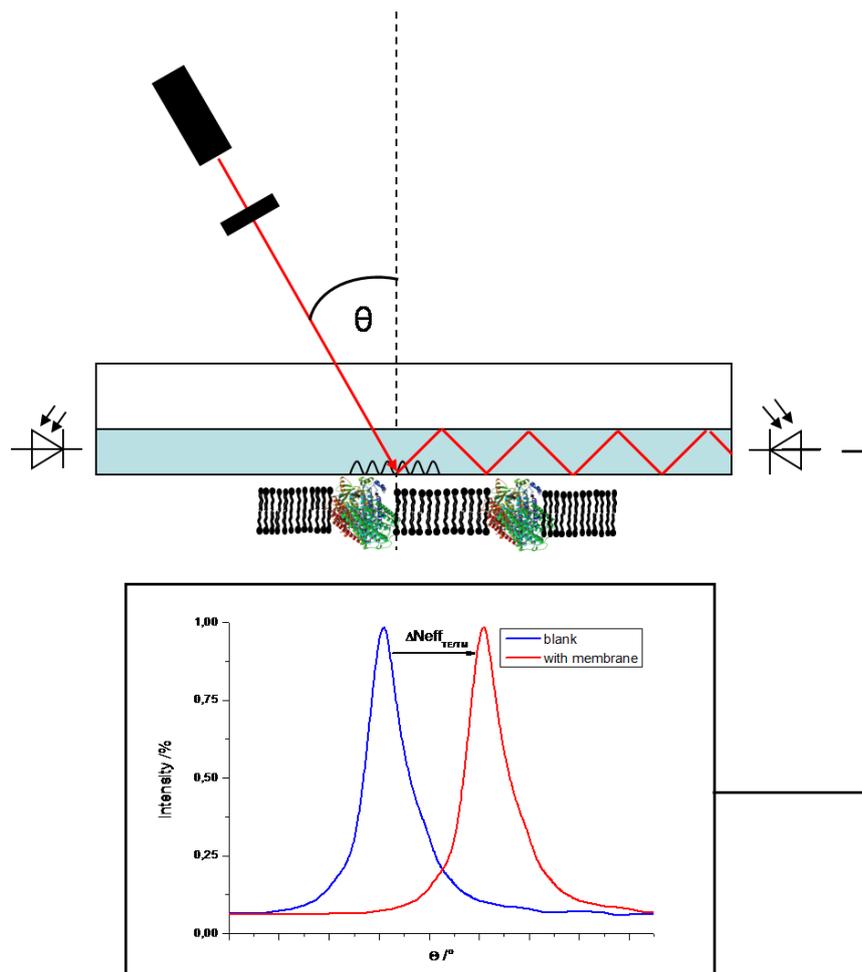


Fig. 18: Setup für die Wellenleitermoden-Spektroskopie mit Gitterkoppler. Die Mode durchläuft den Wellenleiter und wird am Ende durch eine Fotodiode detektiert.

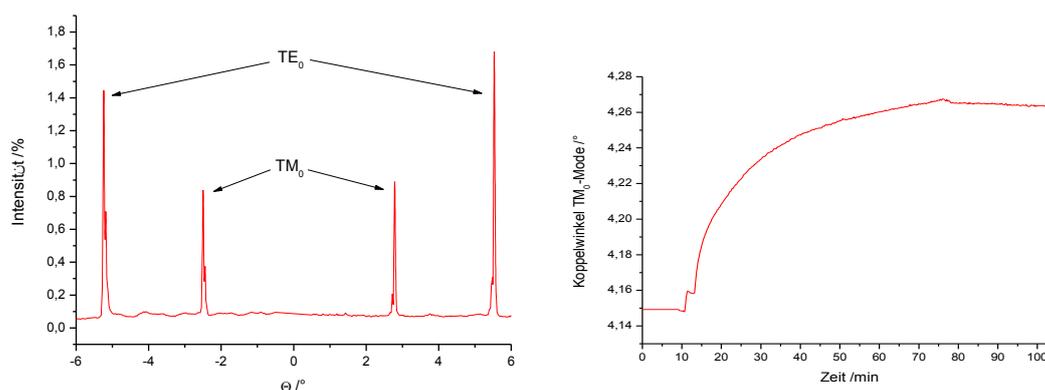
Wird nun eine Schicht auf die wellenleitende Schicht aufgebracht, oder ändert sich das Umgebungsmedium des Wellenleiters, so ändert sich auch der effektive Brechungsindex jeder propagierenden Mode. Diese Änderung kann durch die Änderung im Koppelwinkel detektiert und quantifiziert werden. Der Vorteil dieser Methode ist im Gegensatz zur Oberflächenplasmonenresonanz (Surface Plasmon Resonance SPR) ist, dass hier durch mindestens zwei Grundmoden Brechungsindex und Dicke einer Schicht genau bestimmt werden können, während bei SPR-Messungen nur eine Messgröße ermittelt werden kann, da nur ein Koppelwinkel (Plasmonenkoppelwinkel) detektiert wird. Auch ist die Sensitivität der Wellenleitermoden-Spektroskopie um ein Vielfaches höher als die der SPR-Messungen.

Die Sensitivität wird dabei maßgeblich durch die Divergenz des Laserstrahls und die Auflösung des Koppelwinkels bestimmt, je divergenter der Laserstrahl, desto breiter wird die zu detektierende Mode.

Theoretisch sind damit Auflösungen im Sub-Angström Bereich möglich, so dass auch einzelne Atomlagen detektiert werden können [48], praktisch wird die Auflösung durch die Winkelauflösung der Messinstrumente und der Lasergeometrie limitiert.

In dieser Arbeit wurde ein Goniometer der Firma Huber für die Winkeldetektion genutzt, welches mit einer minimalen Schrittweite von  $10^{-3}^\circ$  angesteuert werden kann.

Für Messungen stehen uns zwei Modi zur Verfügung. Für die quantitative Bestimmung von Schichtdicken und Brechungsindex wurde der Winkelscan genutzt. Hierbei werden die Koppelwinkel aller fuhrbaren Moden bestimmt. Durch Detektieren der positiven und negativen Winkelpositionen kann die Nullpunktjustage und so eine große Fehlerquelle vermieden werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eine Messung relativ lange dauert. Die aufzuwendende Zeit steigt mit der Anzahl der zu detektierenden Moden und ihrer gewünschten Auflösung. Dadurch ist sie nicht dazu geeignet schnelle Vorgänge ( $\approx 30\text{min}$ ), wie zum Beispiel Proteinanbindungen zu charakterisieren. Die zweite Variante besteht darin eine Modenposition anzufahren und den Koppelwinkel der Moden zeitaufgelöst zu detektieren. Da bei dieser Methode eine minimale zeitliche Auflösung von 7s erreicht wird, wird sie verwendet um schnelle dynamische Vorgänge verfolgen zu können. Der Nachteil ist, dass zu jedem Zeitpunkt nur ein Koppelwinkel bekannt ist und dadurch keinerlei Aussage getroffen werden kann hinsichtlich der Änderungen von Schichtdicke, Brechungsindex oder Anisotropie.



**Fig. 19: WaMS Methoden. Links ein komplettes Modenspektrum. Rechts eine Modenverfolgung (Kinetik) einer  $TM_0$ -Mode während eines Adsorptionsvorgangs.**

## 3.2 Kontaktwinkelmessung

Eine große Bedeutung für biologische Vorgänge an Oberflächen kommt der Oberflächenenergie des Mediums zu. Die Oberflächenenergie einer Oberfläche kann bestimmt werden, indem man ihre Wechselwirkung mit Wasser beobachtet (auch andere Flüssigkeiten können verwendet werden). Dieses Verfahren ist schnell und einfach durchzuführen und liefert viele Informationen über die Festkörperoberfläche.

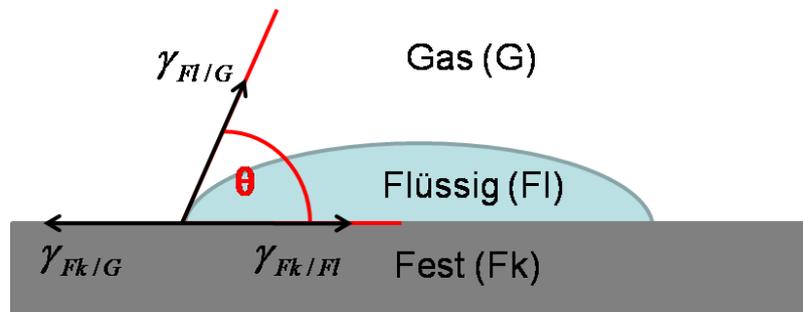


Fig. 20: Spannungsverteilungen bei Messung des Oberflächen-Kontaktwinkels.

Der Kontaktwinkel des Tropfens auf der Festkörperoberfläche ergibt sich aus der Minimierung der freien Enthalpie, die durch die Oberflächenenergien der Flüssigkeit und des Festkörpers bestimmt wird. Vergrößert sich die Kontaktfläche des Tropfens mit dem Festkörper, so bedeutet dies ein Anwachsen der freien Enthalpie an der Grenzfläche von Festkörper-Flüssigkeit um  $\gamma_{Fk-Fl}$ , bei gleichzeitiger Abnahme an der Grenzfläche Festkörper-Gas um  $\gamma_{Fk-G}$ .

Je attraktiver die Wechselwirkung von Flüssigkeit und Festkörper, umso größer der Energiegewinn und damit die Spreitung des Tropfens auf der Oberfläche und umso kleiner ist der gemessene Kontaktwinkel  $\theta$ . Verknüpft werden diese Sachverhalte durch (Gl. 53)

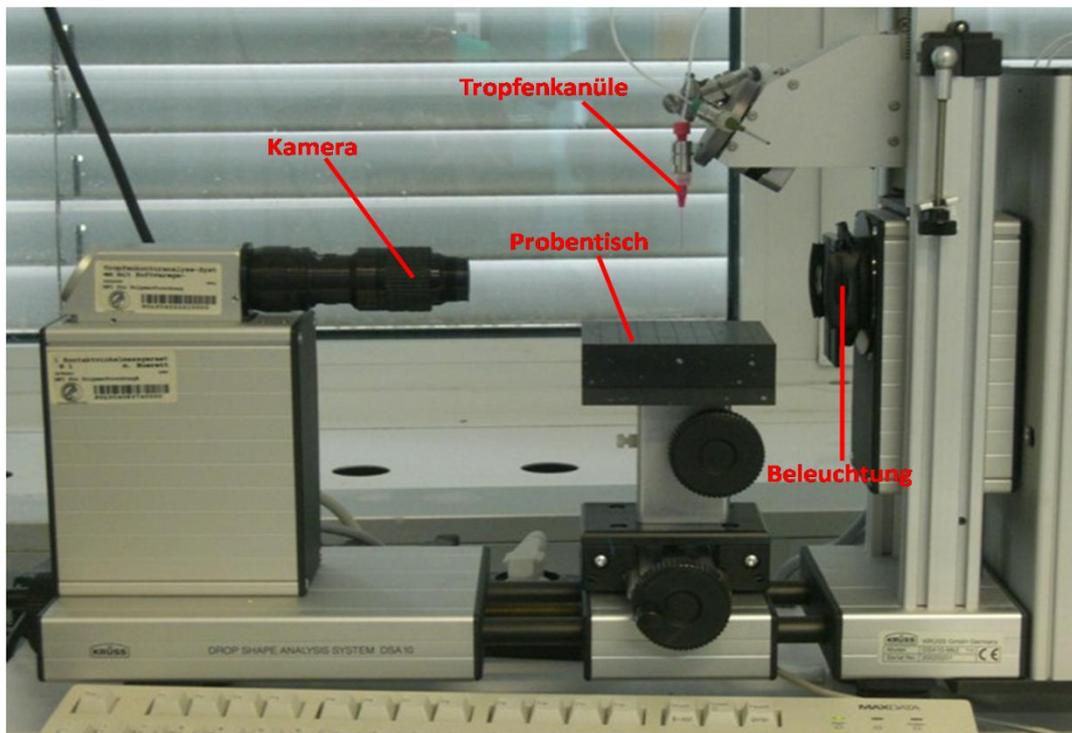
$$\gamma_{Fl/G} * \cos(\theta) = \gamma_{Fk/Fl} \quad (\text{Gl. 53})$$

Sie verknüpft die Oberflächenenergie der flüssigen und der festen Phase mit der Grenzflächenspannung zwischen den Phasen und dem gebildetem Kontaktwinkel  $\theta$ , der als tangentialer Winkel des Tropfens zur Oberfläche gemessen wird. Verhält sich die Oberfläche hinsichtlich ihrer Rauigkeit und Homogenität annähernd ideal, so stellt sich ein stabiles thermodynamisches Gleichgewicht ein, was zu einem festen Kontaktwinkel führt. Ist die Oberfläche rau und inhomogen, so führt dies zu einem höheren Abweichen der Messwerte und damit zu einem höheren Fehler.

Für Wasser als Analyseflüssigkeit kann der Kontaktwinkel von  $<10^\circ$  (super Hydrophil) bis zu  $110^\circ$  (hydrophob) annehmen [44].

Diese Methode spielt eine wichtige Rolle, da sie schnell angewendet werden kann um zum Beispiel nach dem Plasma-Ätzen zu prüfen ob die Silanisierungs-Monolage effektiv

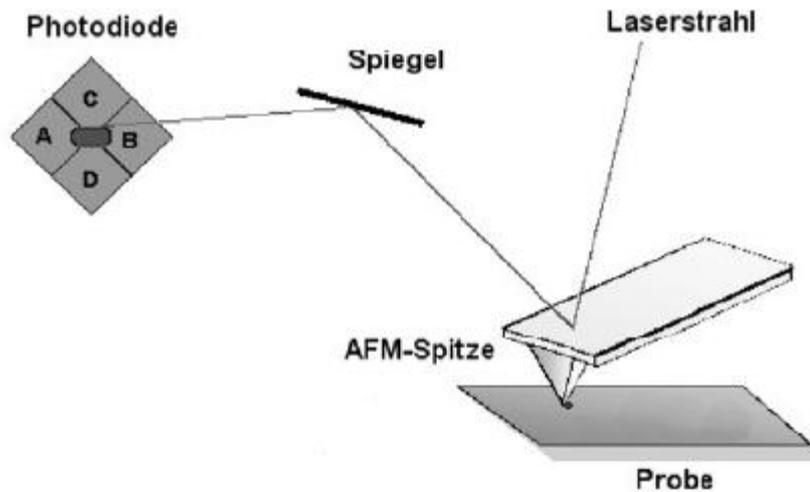
entfernt oder aufgebracht wurde. Der Kontaktwinkel ändert sich dabei von  $\approx 30^\circ$  (gereinigtes Glassubstrat) auf  $\approx 90^\circ$  für die funktionalisierte Glasoberfläche. Der Kontaktwinkel wurde mit einem Drop Shape Analysis System (DSA) 10 der Firma Krüss gemessen (Fig. 21). Dabei wurde die Probe auf einen Probenstisch gelegt, von hinten beleuchtet und von vorne mit einer Videokamera das Tropfenprofil aufgenommen. Der Tropfen wird über einen Steuerrechner in Mengen von  $0,5\mu\text{L}$ - $10\mu\text{L}$  mit Hilfe der Tropfenkanüle aufgebracht. Ein an die Videokamera angeschlossener Messrechner berechnet den Kontaktwinkel von Oberfläche zu Tropfen.



**Fig. 21: Drop Shape Analysis System der Firma Krüss zum bestimmen von Kontaktwinkeln zwischen Oberflächen und Wasser.**

### 3.3 Raster-Kraft-Mikroskopie

Die Raster-Kraft-Mikroskopie ist ein Verfahren zur zerstörungsfreien Darstellung von dreidimensionalen Oberflächenstrukturen. Im Englischen als Atomic-Force-Microscopy bezeichnet, leitet sich daher die häufig genutzte Abkürzung AFM ab. Ein Vorteil von AFM-Messungen ist, dass keine leitenden Oberflächen benötigt werden und dennoch hohe Auflösungen im Angström Bereich erreicht werden können. Sie eignet sich hervorragend für Untersuchungen von Oberflächenrauigkeiten und damit auch periodischer Strukturen auf Oberflächen.



**Fig. 22: Schematischer Aufbau eines Raster-Kraft-Mikroskops**

Das Rasterkraftmikroskop besteht aus einer Spitze, welche meist aus  $\text{SiO}_x$  gefertigt wird, Diese sitzt am Ende einer Feder (Cantilever). Probe oder Feder werden auf einem Piezo-gesteuerten Halter angebracht, welcher in alle drei Raumrichtungen verschiebbar ist. Auf der Rückseite der Feder wird ein Laserstrahl reflektiert und an einen empfindlichen Photodetektor weitergeleitet und so die jeweilige Bewegung oder Verdrehung der Feder detektiert. Das Mikroskop kann in zwei Modi betrieben werden. Im Kontaktmodus berührt die Spitze die Oberfläche und wird dadurch ausgelenkt. Diese Auslenkung wird durch den Laser detektiert und vom Piezo-Positionierer korrigiert. Die Kraft die dabei von Feder auf die Oberfläche wirkt beträgt etwa 100nN, was schon ausreicht, um empfindliche Oberflächenstrukturen zu zerstören. Um dies zu vermeiden kann der Tapping-Modus verwendet werden. Hierbei handelt es sich um eine dynamische Messmethode bei der die Spitze mit einer Oszillationsfrequenz, geringfügig niedriger als ihre Eigenfrequenz, zum Schwingen angeregt wird. Anschließend wird der Abstand von Oberfläche-Spitze so gewählt, dass bei maximaler Auslenkung die Probenoberfläche nur leicht berührt wird. Verändert sich nun die Oberflächentopographie, so verschiebt sich, durch attraktive Wechselwirkungen, die Eigenfrequenz der Feder in höhere Bereiche, was zu einem Abfallen der Schwingungsamplitude führt. Der Piezo-Positionierer gleicht durch Heben oder Senken der Probe/Feder die Schwingungsamplitude wieder an. Für die AFM-Messungen dieser Arbeit wurde ein AFM der Dimension 3100 CLSerie verwendet. Die Messungen wurden von Helma Burg am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchgeführt.

### 3.4 Step-Profiler

Der Step-Profiler, auch als Alpha-Stepper bezeichnet, ist von seiner Funktionsweise mit dem AFM zu vergleichen. Auch bei dieser Methode wird eine feine Spitze über die Oberfläche bewegt und ihre Auslenkungen gemessen. Im Gegensatz zum AFM liegen hier die Messbereiche im makroskopischen Bereich, so können ganze Substrate auf ihre Oberfläche hin charakterisiert werden, während beim AFM maximal ein Raster von  $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$  abgetastet werden kann. Dadurch ist es möglich Randeffekte, welche bei Probenpräparationen auftreten können (z.B. Randberge beim Aufschleudern dünner Schichten) zu detektieren.

Der vertikale Messbereich reicht von  $<10\text{nm}$  bis zu  $1\text{mm}$ . Dadurch können auch große Stufenübergänge genau erfasst werden.

Zum Charakterisieren von Polymerschichtdicken, werden diese mit Hilfe einer Nadel bis zum Trägersubstrat aufgekratzt und dieser Graben dann vermessen. Alternativ kann auch schon bei der Probenherstellung ein Referenzsubstrat teilweise abgeklebt werden, um nach der Beschichtung einen sauberen Übergang zum Messen verwenden zu können.

In dieser Arbeit wurde der Step-Profiler genutzt um die Oberflächenrauigkeiten der verschiedenen Wellenleitersensoren zu untersuchen.

### 3.5 Aufbau und Sensoren

Der Wellenleitersensor wird in einen, im Rahmen der Diplomarbeit konstruierten Halter eingespannt, welcher auf einem Huber Goniometer installiert ist. Ein polarisierter HeNe-Laser wird durch zwei Glan-Thompson-Polarisatoren auf eine einheitliche Intensität eingestellt. Anschließend kann die Polarisation des einfallenden Laserstrahls durch einen Fresnel-Rhombus gewählt werden. Die Intensität der propagierenden Mode wird an den Sensorendflächen von Fotodioden detektiert und über einen Log-In Verstärker an den Messrechner weitergeleitet, wo die Signale verarbeitet werden. Die erforderliche Flusszelle wird durch Federn gegen die wellenleitende Schicht gedrückt.

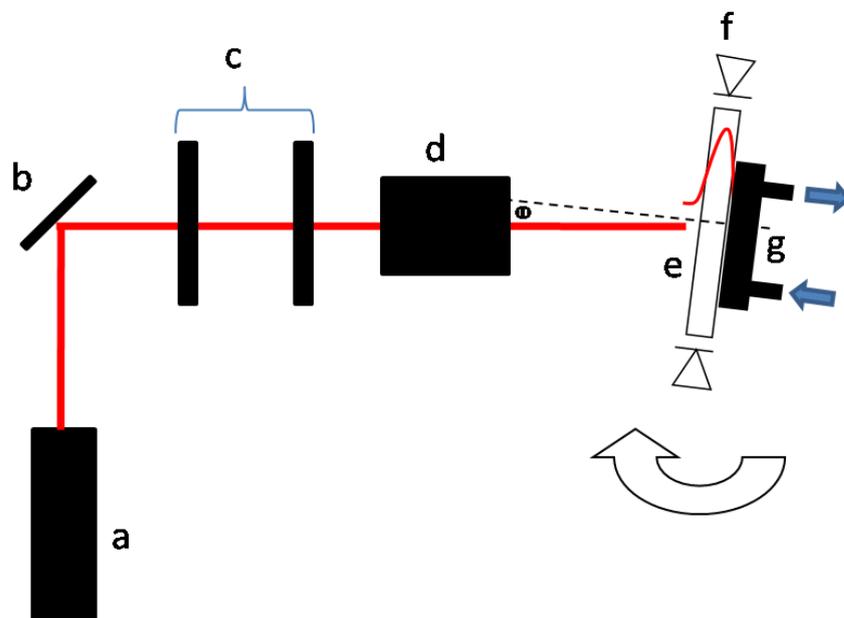


Fig. 23: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie. a) HeNe-Laser; b) Spiegel; c) Polarisatoren; d) Fresnel-Rhombus; e) Wellenleiter-Sensor; f) Fotodiode; g) Flusszelle

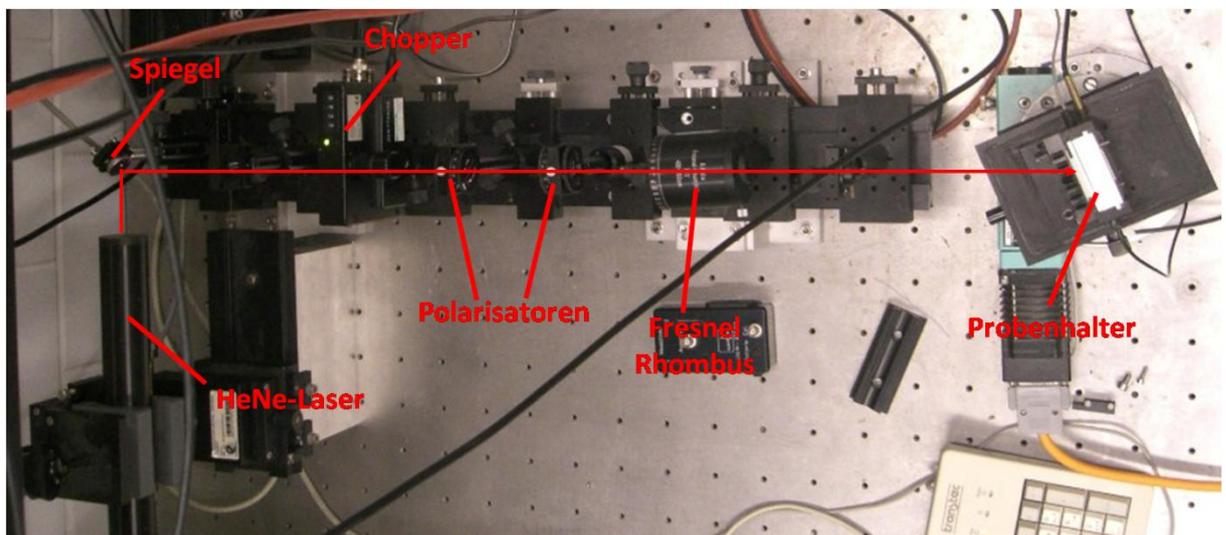
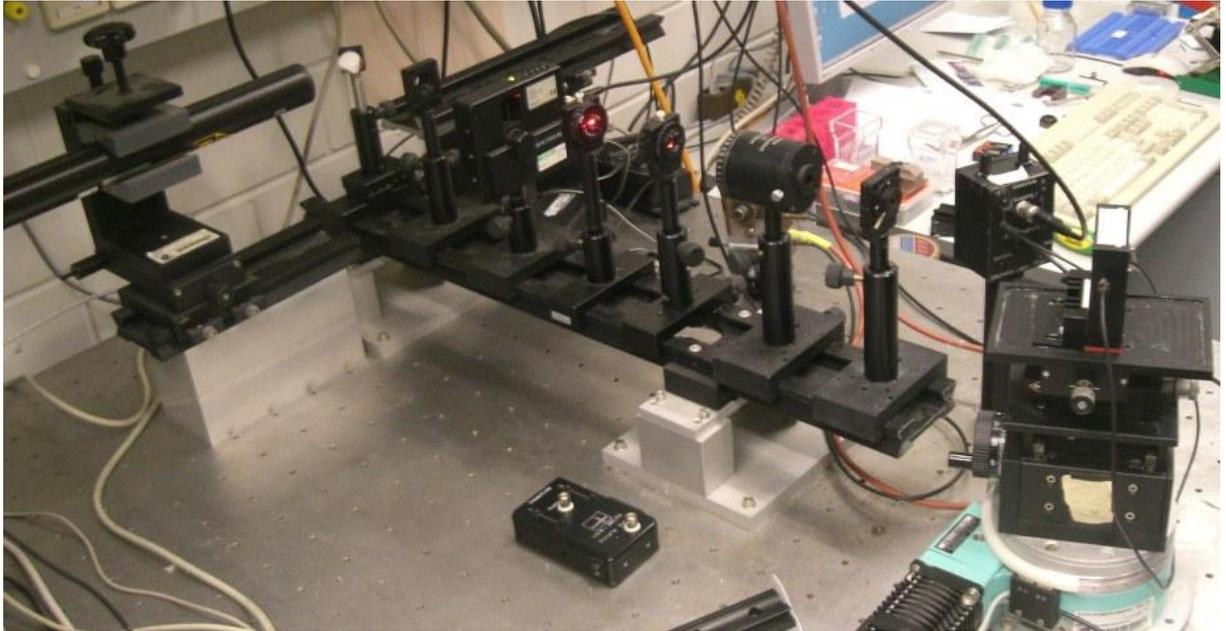


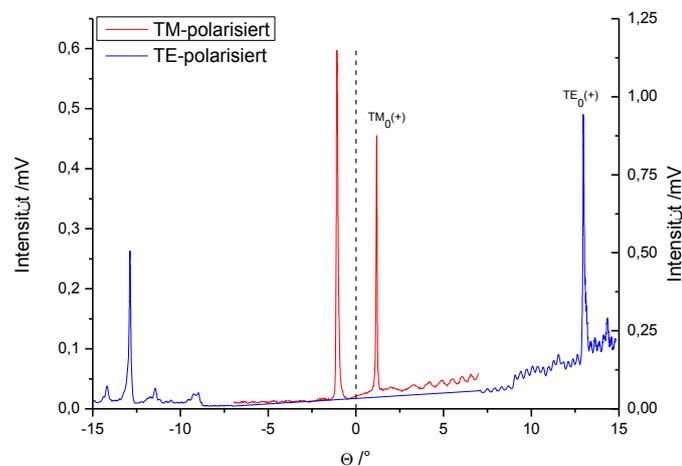
Fig. 24: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie von oben.



**Fig. 25: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie von der Seite.**

Für diese Arbeit wurden zwei Arten von Wellenleitersensoren benutzt. Für die qualitative Anisotropie Bestimmung wurden Singlemode Wellenleiter eingesetzt, welche jeweils die erste TM-, sowie TE-Mode führen können. Sie bestehen aus einem Glassubstrat mit einem Brechungsindex von 1,524\* auf das durch Sputtern eine etwa 160nm dicke Tantalpent-Oxid ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) Schicht mit einem Brechungsindex von 2,22 aufgebracht wurde. Darauf wurde mittig durch Ionen-Strahl-Ätz-Verfahren ein optisches Beugungsgitter, mit einer Gitterkonstante von 745nm und einer Tiefe von 5nm, in die Mitte des Substrats geätzt.

In dieser Konfiguration wird die 2. Beugungsordnung des Gitters zum Einkoppeln genutzt.



**Fig. 26: Aufgenommenes Modenspektrum eines  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  Singlemode Wellenleiters**

\* Alle Brechungsindizes dieser Arbeit sind für eine Laserwellenlänge von 632,8 nm angegeben

Da für die spätere Auswertung (Transfer-Matrix) das Modell der homogenen Schichten vorausgesetzt wird, dürfen die Gitter nicht tiefer als 1/10 der wellenleitenden Schicht sein. Sind die Gitter zu tief im Substrat, wird dieses Modell gestört und die spätere Auswertung ist nicht mehr zuverlässig, da der verwendete Transfer-Matrix-Algorithmus mit den ermittelten effektiven Brechungsindizes, zu keiner allgemein gültigen Lösung mehr kommt.

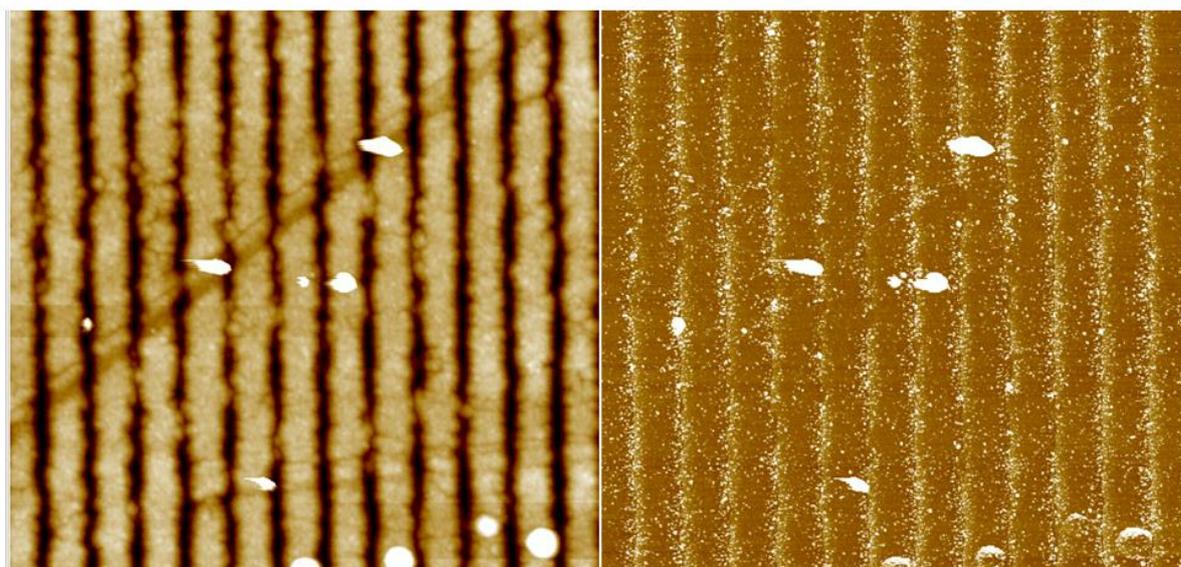


Fig. 27: Aufgenommenes AFM-Bild der Gitterstruktur im TiO<sub>x</sub>-Welleneitersensor. Die Scanfläche beträgt 5µm\*5µm, der Scan wurde mit einem Cantilever des Typs OMCL-AC160TS-W2 von Olympus im „non-contact mode“, von Helma Burg durchgeführt.

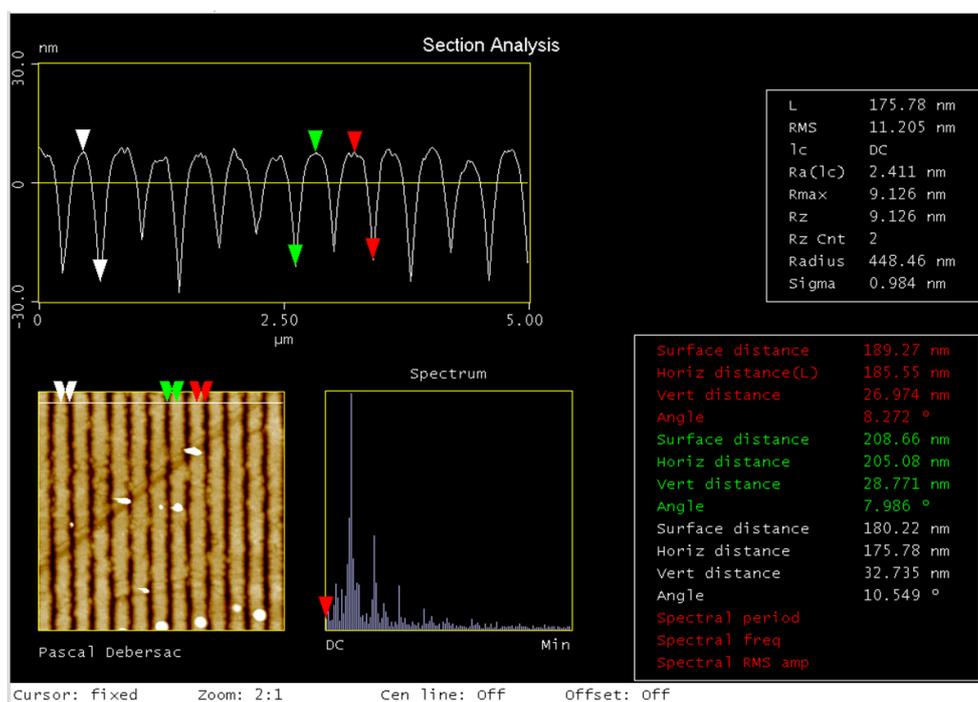


Fig. 28: Auswertung des AFM-Bildes aus Fig. 27. Die Gitterstruktur wurde an drei Punkten vermessen. Die Ergebnisse sind rechts aufgeführt. Der Mittelwert aller drei Messungen beträgt 28,8nm±3,9nm.

Die Multimode-Sensoren bestehen aus einem Quarzglassubstrat mit einem Brechungsindex von 1,46 auf das eine Titanoxidschicht ( $\text{TiO}_x$ ) gesputtert wurde. Die Dicke liegt bei etwa 350nm und kann jeweils die ersten zwei Moden beider Polarisierungen führen.

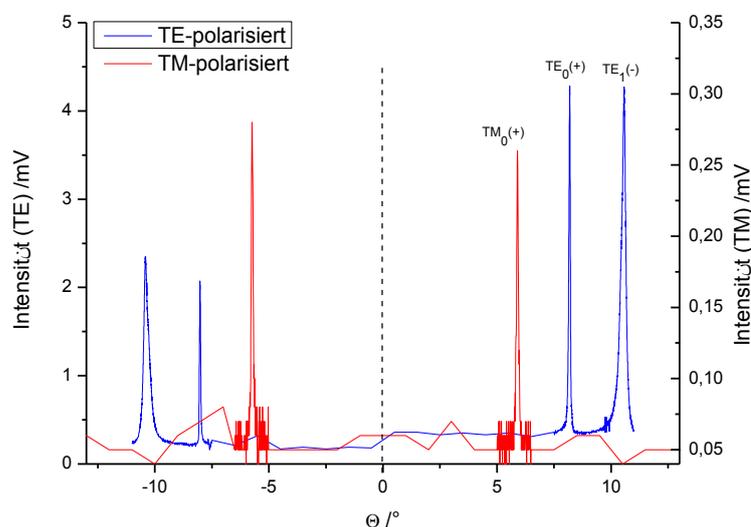
Die beschichteten Sensoren wurden von Leica hergestellt und das Gitter nachträglich per Holographie und Ionen-Strahl-Ätz-Verfahren im Reinraum des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung eingebracht.

Durch eine gewählte Gitterkonstante von 340 nm ist es möglich drei Moden in einem Winkelspektrum von  $\theta < 20^\circ$  anzuregen, da es bei höheren Winkeln zu streifendem Lichteinfall auf den Halter kommt, was zu einer hohen Ungenauigkeit der Messungen führt.

Für diese Arbeit wurden folgende Wellenleitersensoren genutzt:

**Tab. 1:** Für diese Arbeit verwendete Wellenleitersensoren, mit dazugehörigen Kenndaten.  $n_s$ : Brechungsindex des Substrats;  $n_{WL}$ : Brechungsindex der wellenleitenden Schicht;  $d_{WL}$ : Dicke der wellenleitenden Schicht;  $g$ : Gitterkonstante des Koppelgitters

Material	Typ	$n_s$	$n_{WL}$	$d_{WL}$ /nm	Moden	$g$ /nm
$\text{Ta}_2\text{O}_5$	Singlem.	1,534	$2,226 \pm 0,001$	$159,4 \pm 0,1$	$\text{TE}_0/\text{TM}_0$	$745 \pm 1$
$\text{Ta}_2\text{O}_5$	Singlem.	1,534	$2,227 \pm 0,001$	$158 \pm 0,1$	$\text{TE}_0/\text{TM}_0$	$745 \pm 1$
$\text{Ta}_2\text{O}_5$	Singlem.	1,534	$2,225 \pm 0,001$	$160,9 \pm 0,1$	$\text{TE}_0/\text{TM}_0$	$745 \pm 1$
$\text{TiO}_x$	Multim.	1,46	$2,122 \pm 0,005$	$359,2 \pm 0,5$	$\text{TE}_{0/1}/\text{TM}_{0/1}$	$337 \pm 1$



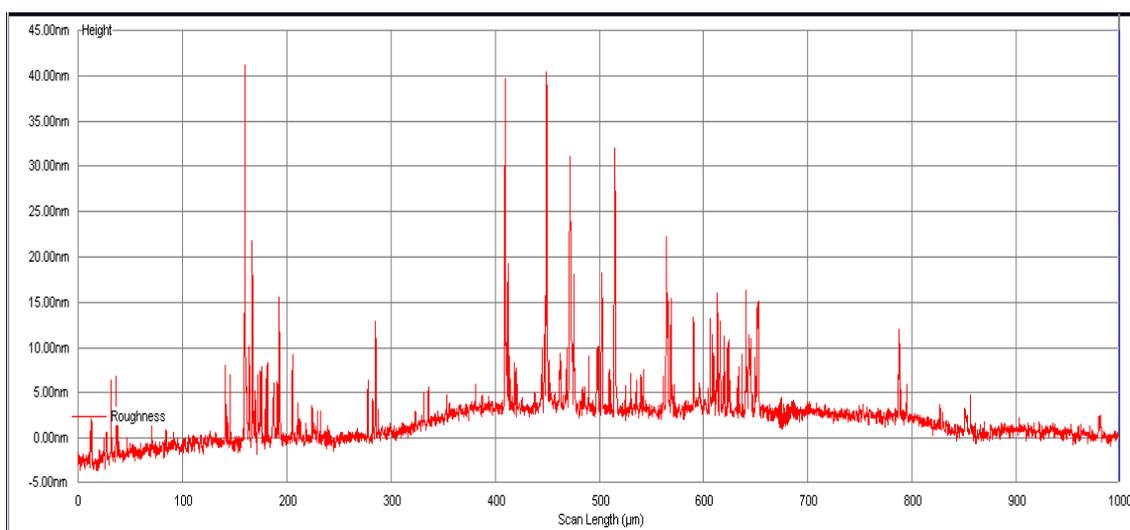
**Fig. 29:** Aufgenommenes Modenspektrum eines  $\text{TiO}_x$  Multimode Wellenleiters

Die Singlemode Sensoren wurden genutzt um die allgemeine Anisotropie bei Proteinanbindung und Lipid-Schicht Formung zu detektieren (beschrieben in Kap. 0), da hier die Aufnahme eines kompletten Winkelspektrums etwa um den Faktor 2,5, gegenüber den Multimodesensoren, verkürzt ist. Da mehr zu detektierende Moden, sowie das verwenden von positiver und negativer Beugungsordnung des Koppelgitters die

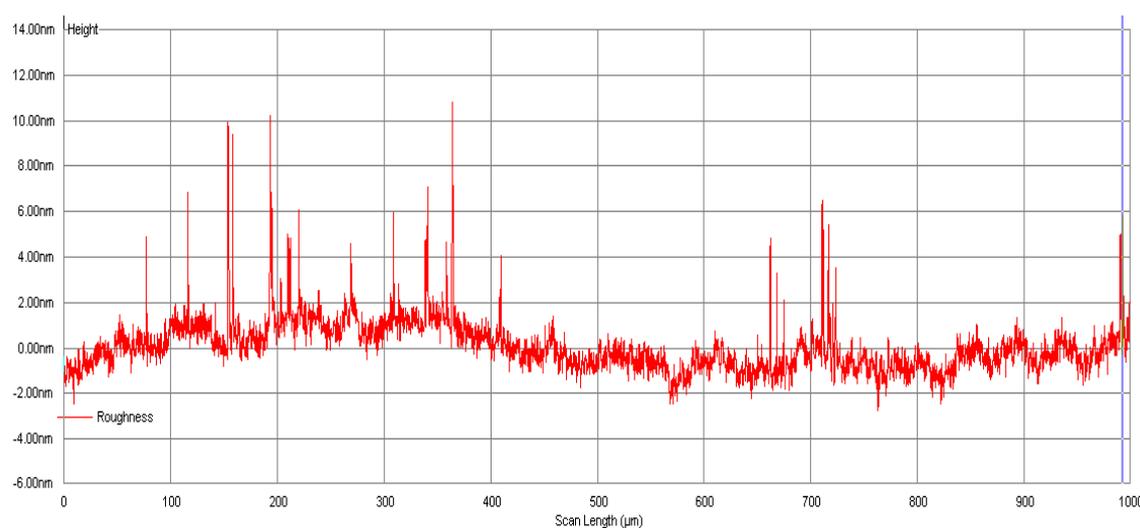
Messzeit und -aufwand erhöhen. Die Sensitivität liegt im Vergleich zu den Multimodesensoren um den Faktor 2 höher.

Die Multimodesensoren wurden hergestellt um aus den Informationen von drei Moden den Protein-Brechungsindex für die TE- sowie der TM-Polarisation zu ermitteln und vergleichende Anbindungen auf unterschiedlichen Oberflächen durchzuführen.

Da für die späteren Messungen eine möglichst glatte Oberfläche benötigt wird, wurden die Oberflächen der verwendeten Sensoren mit einem Step-Profiler der Firma PLA Tencor P-16+ auf ihre Rauigkeit hin charakterisiert.



**Fig. 30: Oberflächenprofil des Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Wellenleitersensors. Scanlänge: 1mm; Scanspeed: 10µm/sec; Gerät: PLA Tencor P-16+**



**Fig. 31: Gemessenes Oberflächenprofil des TiO<sub>x</sub> Wellenleitersensors. Scanlänge: 1mm; Scanspeed: 10µm/sec; Gerät: PLA Tencor P-16+**

Die Oberflächenrauigkeit der Sensoren sollte einen Wert von 10nm nicht überschreiten, da bei höheren Rauigkeiten die später anbindenden Proteine gestresst werden und damit

zum denaturieren neigen [49, 50] und so keine repräsentative Anbindung möglich ist. Die Oberflächenrauigkeit wurde für den Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Sensor mit  $\approx 3\text{nm}$  (Fig. 30) und für den TiO<sub>x</sub> Multimode Sensor mit  $\approx 1,5\text{nm}$  (Fig. 31) bestimmt, indem der Quadratische Mittelwert der oben gezeigten (Fig. 30 & Fig. 31) Oberflächenprofile gebildet wurde. Dies wurde von der Software des PLA Tencor P-16+ übernommen.

### 3.5.1 Wellenleitersensitivität und Anisotropie-Faktor

Mit dem Anisotropie-Faktor eines Wellenleitersensors kann, bei aufbringen eines Adlayers auf dem Sensor, dessen bevorzugte Polarisationsrichtung bestimmt werden. Der Anisotropie-Faktor berechnet sich aus der Geometrie und den optischen Parametern des Sensors. Er leitet sich direkt aus der Sensitivität der Moden verschiedener Polarisation, eines Wellenleiters ab. Die Sensitivität bestimmt die Änderung der effektiven Brechungsindizes von TE- und TM-Mode bei aufbringen eines isotropen Adlayers in Abhängigkeit der Schichtdicke der wellenleitenden Schicht (Fig. 33).

Für eine bestimmte Schichtdicke des Wellenleiters, ändern sich die effektiven Brechungsindizes von TE- und TM-Mode in einem festen Verhältnis zueinander.

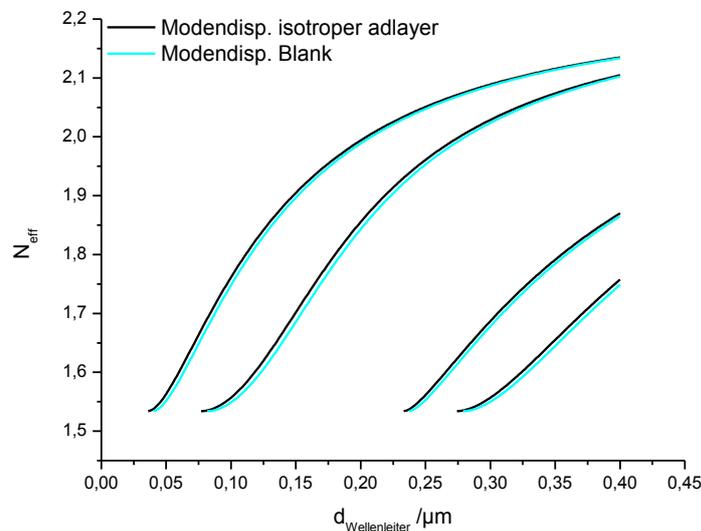


Fig. 32: Modendispersionen eines Wellenleiters ohne (türkis) und mit isotropem Adlayer (schwarz).

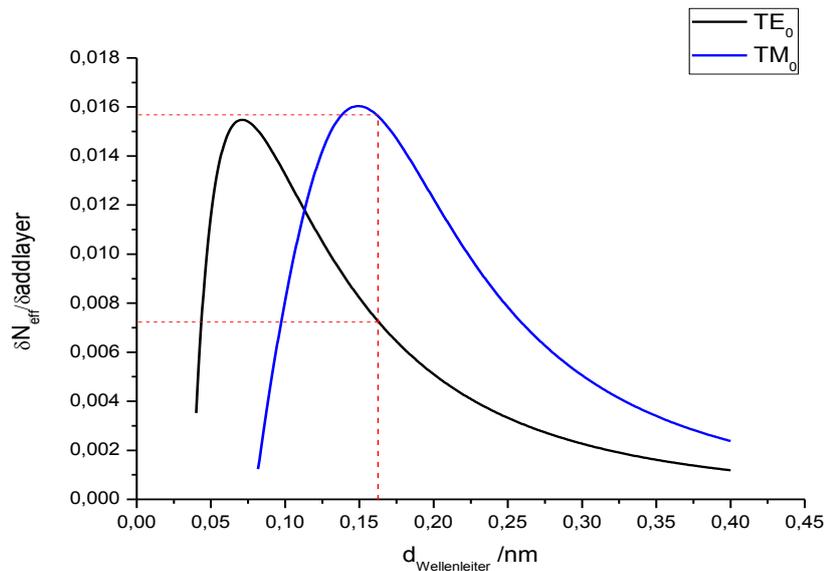
Dieses individuelle Verhältnis kann durch eine Simulation, welche den Transfer-Matrix-Algorithmus nutzt, bestimmt werden, wenn der Sensorchip hinreichend ( $n_{\text{Substrat}}$ ,  $n_{\text{Wellenleiter}}$ ,  $d_{\text{Wellenleiter}}$ ) bekannt ist. In dieser Arbeit wurde hierfür das Simulationsprogramm ATSOS verwendet. Aus den bekannten Daten des Sensors werden die effektiven Brechungsindizes in Abhängigkeit der Schichtdicke der wellenleitenden Schicht, für die TE<sub>0</sub>- und TM<sub>0</sub>-Mode bestimmt. Anschließend wird die Berechnung der effektiven Brechungsindizes wiederholt, für den Fall das auf dem Sensor eine optisch isotrope Schicht aufgebracht wurde. Aus beiden Berechnungen wird so die Änderung der effektiven Brechungsindizes bestimmt, indem die Differenz beider Berechnungen gebildet wird. Fig. 32 zeigt die Berechnungen der effektiven Brechungsindizes mit und ohne Adlayer, die zugehörigen Simulationsdaten sind in Tab. 2 und Tab. 3 zu finden.

**Tab. 2: Simulationsparameter für effektive Brechungsindex Berechnung eines Tantalpentoxid Wellenleitersensors. Umgebungsmedium: Luft**

Nr	Material	n	Dicke /nm	Absorption
1	Corning	1,534	$\infty$	0
2	Ta2O5	2,2	0-400	0
3	Luft	1	$\infty$	0

**Tab. 3: Simulationsparameter für effektive Brechungsindex Berechnung eines Tantalpentoxid Wellenleitersensors mit Protein-Adlayer. Umgebungsmedium: Luft**

Nr	Material	n	Dicke /nm	Absorption
1	Corning	1,534	$\infty$	0
2	Ta2O5	2,2	0-400	0
3	Protein	1,4	9	0
4	Luft	1	$\infty$	0



**Fig. 33: Änderungen des effektiven Brechungsindex für beide Grundmoden, durch Aufbringen einer isotropen Zusatzschicht, in Abhängigkeit der Ta2O5-Wellenleiterschichtdicke.**

Für eine definierte Schichtdicke des Wellenleitersensors kann aus der effektiven Brechungsindexänderung der beiden Moden das Verhältnis von  $\Delta N_{\text{eff}_{\text{TE}}}$  zu  $\Delta N_{\text{eff}_{\text{TM}}}$  bestimmt werden. Dieses Verhältnis definieren wir als Sensitivitätsfaktor  $S$  (Gl. 54):

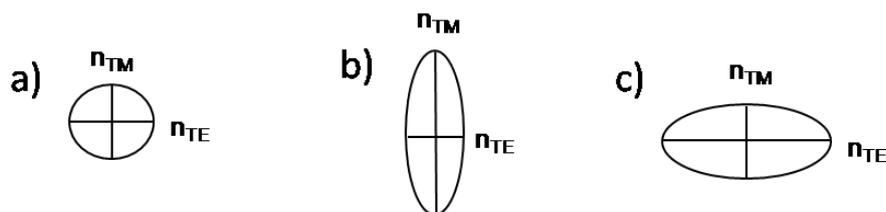
$$S = \frac{\delta N_{\text{eff}_{\text{TM}}}}{\delta N_{\text{eff}_{\text{TE}}}} \quad (\text{Gl. 54})$$

Bei den von uns genutzten Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Wellenleitersensoren liegt die Sensitivität bei 1,8. Der auf eins normierte Anisotropie-Faktor ergibt sich dann aus (Gl. 55):

$$AI = \frac{\delta N_{eff_{TM}}}{\delta N_{eff_{TE}} * S} \quad (\text{Gl. 55})$$

Da der Anisotropie-Faktor auf eins normiert wurde, müssen folgende Fälle unterschieden werden (Fig. 34):

- a)  $AI = 1$ : Das Molekül lässt sich in beide Richtungen gleich polarisieren (optisch isotrop). Das Brechungsindexellipsoid nimmt so die Form eines Kreises an.
- b)  $AI > 1$ : Die Polarisierbarkeit durch die TM-Mode (senkrecht zur Wellenleitersensoroberfläche) ist höher.
- c)  $AI < 1$ : Die bevorzugte Polarisationsrichtung des Moleküls liegt in der Schwingungsrichtung der TE-Mode (parallel zur Sensoroberfläche)



**Fig. 34: Fallunterscheidung für den Anisotropie-Faktor und die jeweiligen Brechungsindex Ellipsoide.**

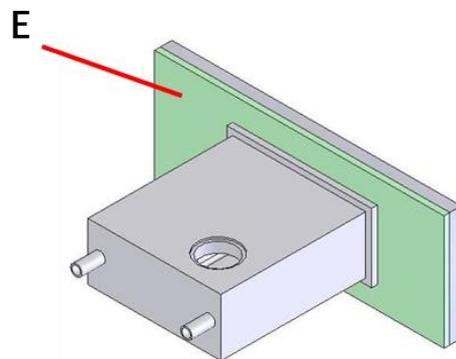
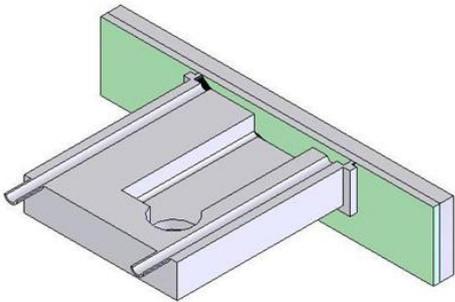
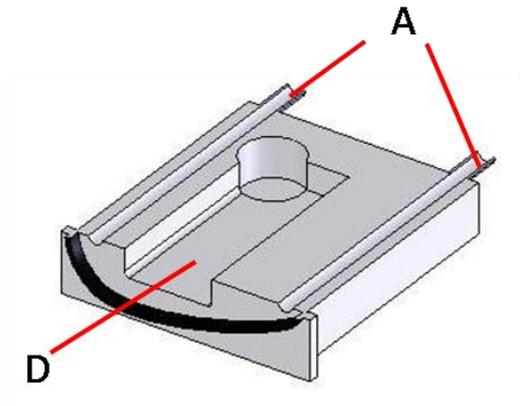
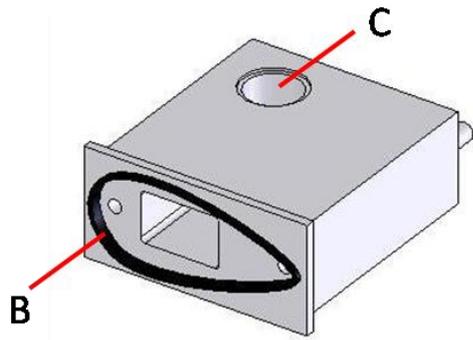
### 3.5.2 Die Flusszelle

Die Flusszelle in dieser Arbeit dient dazu eine Anbindung eines Membransystems auf der Sensoroberfläche zu verwirklichen. Sie wird gegen die wellenleitende Schicht (E) des Sensor gedrückt und mit verschiedenen Lösungen oder Puffern durch das Kanalsystem (A) geflutet. Der Dichtungsring (B) zwischen Flusszelle und Sensor verhindert das Auslaufen von Flüssigkeiten. Die Spritzen-Öffnung (C) ermöglicht einen Austausch des Puffers, dem Einbringen zusätzlicher Moleküle, oder der Biobeads in das Zellreservoir (D) ohne das Benutzen des Kanalsystems. Dadurch kann die Fließgeschwindigkeit an der Sensoroberfläche verringert werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Flusszelle wurde den speziellen Anforderungen nach konstruiert, dabei mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- a) Großes Zellvolumen um denaturieren der Proteine, durch hohe Fließgeschwindigkeiten, zu verhindern.
- b) Die Maße (23x9,9)mm durften nicht überschritten werden, damit der vorhandene einheitliche Probenhalter genutzt werden konnte.
- c) Es musste ein separater Zugang zur Wellenleiteroberfläche vorhanden sein, zum Einbringen der Proteine oder Biobeads.
- d) Das Fertigungsmaterial muss stabil sein gegen basische Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 9,8.
- e) Das Fließverhalten an der Wellenleitersensoroberfläche muss laminar sein um eine gleichmäßige Verteilung der Proteine an der Wellenleitersensoroberfläche zu garantieren.

Die Zelle wurde aus Plexiglas gefertigt um eine Beobachtung der Vorgänge (ausspülen der Biobeads) zu ermöglichen und wurde in der Feinmechanischen Werkstatt des Max-Planck-Institut für Polymerforschung hergestellt.



**Fig. 35: Ansicht der neu konstruierten Flusszelle. Oben: Zelle ohne Wellenleitersensor. Unten: Zelle mit Wellenleitersensor. (A):Kanalsystem zum spülen; (B):Dichtungsring; (C):Öffnung zum einbringen der Biobeads; (D):Kammer für Biobeads; (E):Wellenleitende Schicht des Wellenleitersensors**

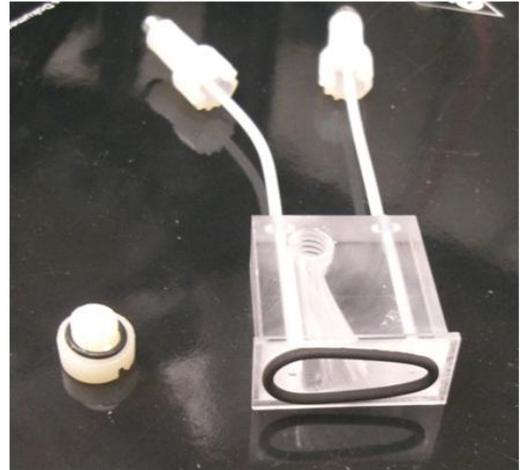
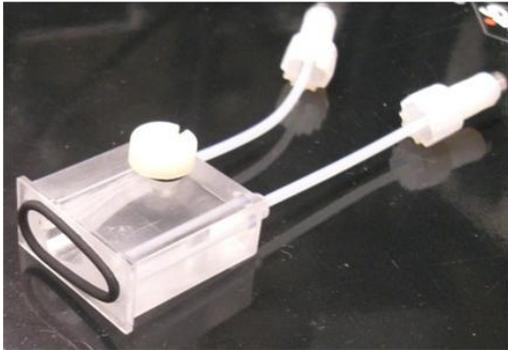


Fig. 36: Neu konstruierte Flusszelle aus Plexiglas.

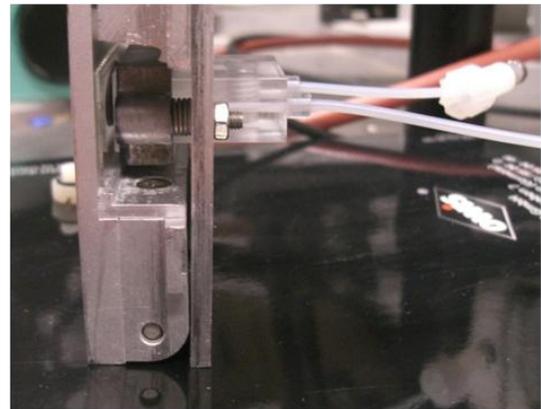
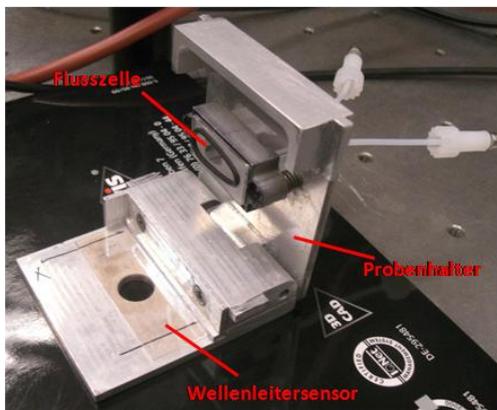


Fig. 37: In den Probenhalter eingebaute Flusszelle (links). Die Flusszelle wird gegen den Wellenleitersensor gedrückt, der Dichtungsring verhindert ein auslaufen der Flüssigkeit (rechts).

## 4 Experimente & Diskussion der Ergebnisse

In diesem Kapitel wird der der Membranformungsprozess einer Protein gestützten Festkörpermembran dargestellt, sowie die zu jedem Schritt gehörenden Kinetik- und Scannmessungen. Desweiteren werden die Messergebnisse interpretiert und diskutiert. Fig. 38 gibt einen Überblick über die notwendigen Schritte zur Formung einer Protein gestützten Festkörpermembran.

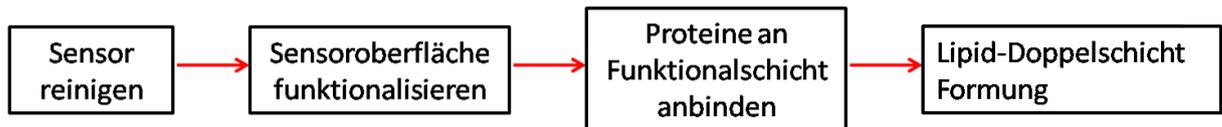


Fig. 38: Flussdiagramm der Prozessschritte zur Formung einer Protein gestützten Festkörpermembran

### 4.1 Probenpräparation

Bevor mit der Probenpräparation begonnen werden kann, müssen die Sensoroberflächen gründlich gereinigt werden. Die Reinigung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Reinigen in 2%iger Helmanex Lösung (50°C) und 5 min Ultraschall zum entfernen von Schmutzrückständen
- Spülen mit Milli-Q Wasser (Widerstand: 18,2 MΩ)
- Spülen mit Isopropanol und trockenblasen mit Stickstoff
- Plasmareinigung (300W; 10min; Ar/O<sub>2</sub>: 0,8/0,2; p:1mBar) zum Entfernen vorheriger Funktionalisierungsrückstände (Plasma System 200-G, der Firma Technics Plasma GmbH)

### 4.2 Membranbildung

#### 4.2.1 Stabilität des Sensors

Um die Stabilität des Tantalpentoxid-Wellenleitersensors zu überprüfen, wurde ein Wellenleitersensor für 72h in eine ANTA-Lösung (pH 9,8) gestellt. Nach 1h, 16h und 72h wurde jeweils das Modenspektrum des Sensors aufgenommen um durch eine mögliche Änderung der effektiven Brechungsindizes eine Änderung des wellenleitenden Films zu detektieren. Wie in Fig. 39 gezeigt, ist der Sensor zu Beginn der ANTA Anbindung noch nicht stabilisiert. Der effektive Brechungsindex der wellenleitenden Schicht wird im ANTA verringert. Der Sensor erreicht jedoch nach spätestens 16h einen stabilen Zustand und ändert sich ab diesem Zeitpunkt nicht weiter. Da derselbe Sensor für mehrere Anbindungen genutzt

wurde und sich die Schichtdicke der wellenleitenden Schicht bei den folgenden Referenzmessungen nicht geändert hat, muss das ANTA in den ersten 16h den Brechungsindex der Oberfläche verringert haben. Da der Sensor vor jeder Proteinanbindung für 48h in ANTA stehen muss, können wir sicher sein, beim Messen einen stabilen Sensor zu verwenden.

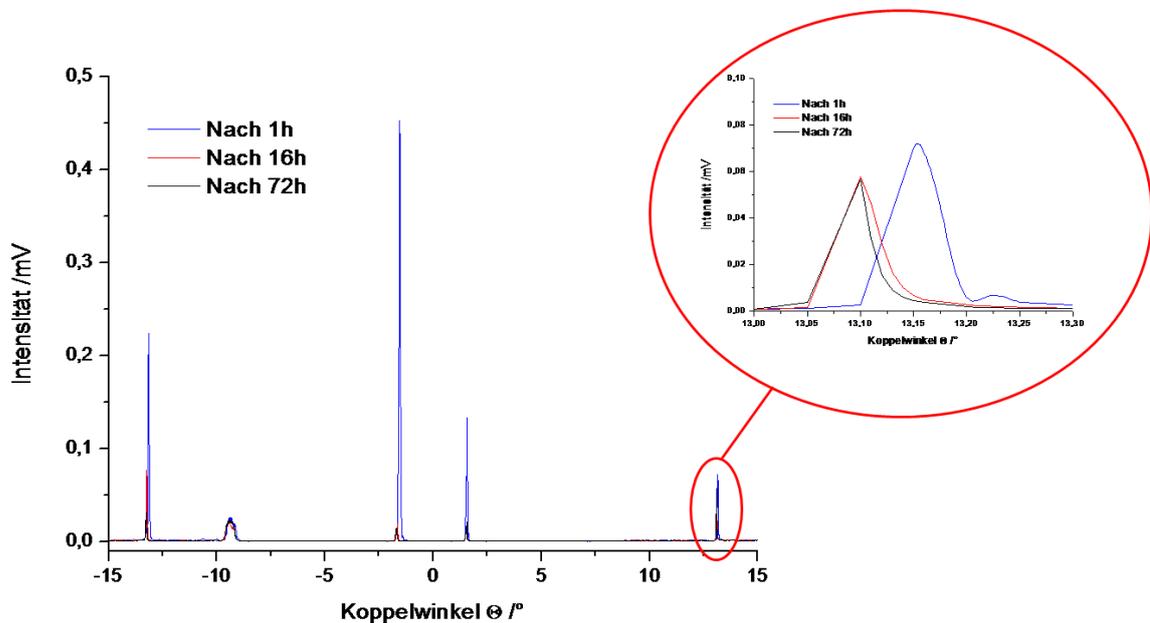


Fig. 39: Scannmessungen eines Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Wellenleitersensors der für 72h in einer ANTA-Lösung mit pH=9,8 stand. In den ersten 16h scheint ANTA in die Oberfläche zu diffundieren und den Brechungsindex zu verringern.

#### 4.2.2 Funktionalisierung der Sensoroberfläche

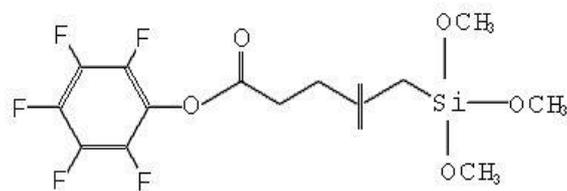
Vor Beginn der Proteinanbindung muss die Sensoroberfläche funktionalisiert werden, damit eine spezifische Proteinadsorption an der Sensoroberfläche stattfinden kann. In diesem Abschnitt wird die Funktionalisierung der Sensoroberfläche beschrieben.

Während bei metallischen Oberflächen, wie in vorherigen Arbeiten verwendet, die Thiol-Chemie angewendet wurde [11], werden oxidische Oberflächen über eine Silan-Anbindung funktionalisiert.

Bei dieser Methode wird eine selbstadsorbierende Monolage Silan auf die oxidische Sensoroberfläche gebracht. Es besitzt eine Ankergruppe, die aus einem Siliziumatom besteht und von einem organischen Rest umgeben ist, mit der sie eine kovalente Bindung mit den Sauerstoffatomen des Dielektrikums (Sensoroberfläche) eingeht. Die Kopfgruppe des Silans kann je nach Anwendungsgebiet unterschiedlich ausfallen. In dieser Arbeit wurde das

11 – Pentafluorophenylundecanoatrimethoxysilane (Fa. Sikemia) (Fig. 40) genutzt. Charakteristisch für dieses Silan ist sein hoher Siedepunkt von  $\approx 150^\circ\text{C}$  durch seine langen Kohlenstoffketten. Es existieren zwei gängige Präparationsmethoden für die Silanisierung, die Gasphasenabscheidung und die Flüssigphasenabscheidung. In dieser

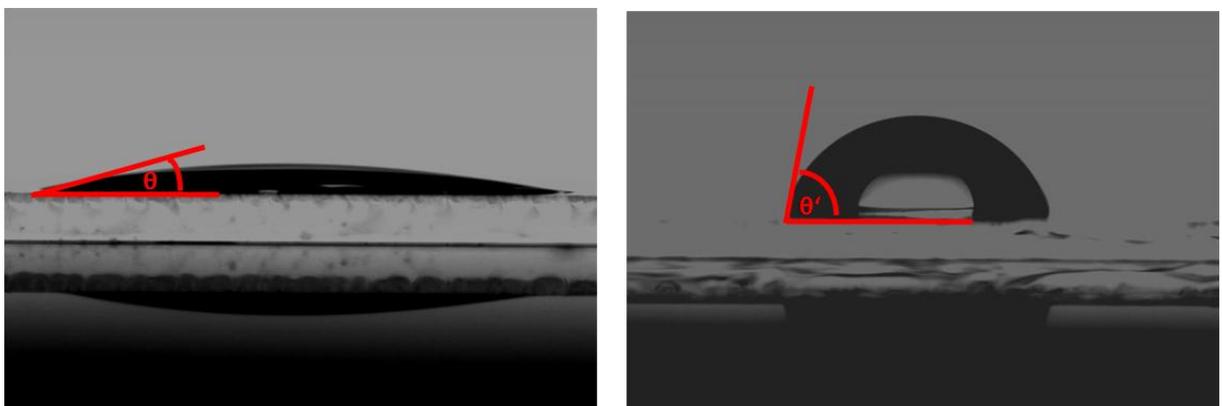
Arbeit wurden beide Methoden benutzt und ihre Effizienz überprüft, indem nach dem Silanisieren, Nitrilotriessigsäure (ANTA) an die reaktive Kopfgruppe angebunden wurde und dieser Prozess durch eine zeitaufgelöste Koppelwinkelmessung aufgenommen wurde. Je höher die Sensoroberflächenbelegung mit 11 – Pentafluorophenylundecanoatetrimethoxysilane, desto mehr ANTA kann am Silan adsorbieren. Dementsprechend höher ist die Änderung des effektiven Brechungsindex der detektierten Mode. Die Gasphasensilanisierung wurde bei 150°C und mit einer Dauer von 90 Minuten in einem Vakuumofen der Firma xx durchgeführt. Für die Flüssigphasensilanisierung wurde der Wellenleitersensor für 90 Minuten und bei Raumtemperatur in eine 1%ige methanolische Lösung gestellt.



**Fig. 40:** Verwendetes Silan (11 – Pentafluorophenylundecanoatetrimethoxysilane, Firma: Sikemia). Das Silan bildet eine selbstorganisierende Monolage, indem die Si-Kopfgruppe an die Sauerstoffatome des Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Wellenleitersensors anbinden.

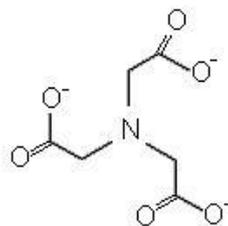
Wie in Fig. 43 zu sehen ist, führt eine Gasphasensilanisierung zu einer vielfach höheren Belegungsichte. Zusätzlich, wird der Kontaktwinkel der Sensoroberfläche vor und nach der Silanisierung gemessen.

Vor der Funktionalisierung ist die Oberfläche des Sensors sehr hydrophil (Kontaktwinkel < 10°), nach der Silanisierung steigt der Kontaktwinkel auf ≈ 85° (Fig. 41). Damit ist die Wellenleitersensoroberfläche funktionalisiert.

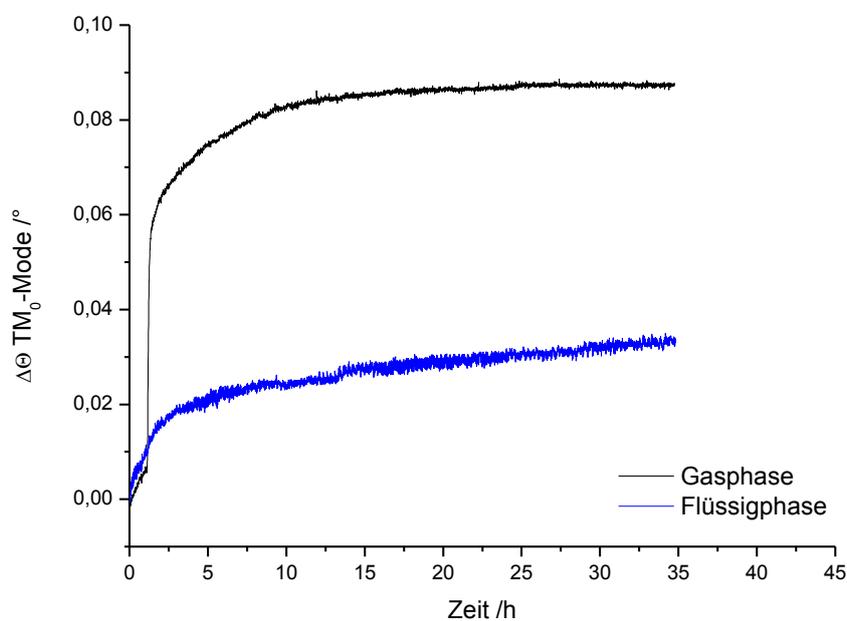


**Fig. 41:** Messung des Kontaktwinkels vor (links) und nach (rechts) der Beschichtung mit 11 – Pentafluorophenylundecanoatetrimethoxysilane. Gemessen wurde mit einem Kontaktwinkelmessgerät der Firma Krüss, Modell: DAS 10-Mk2.

Nach der Silanisierung wird der Sensor für 48h in eine 0,15 molare Nitrilotriessigsäure-Lösung (ANTA) (Fig. 42) mit einem pH-Wert von 9,8 gelegt. In dieser Zeit bildet sich so ein Silan-ANTA-Adukt.



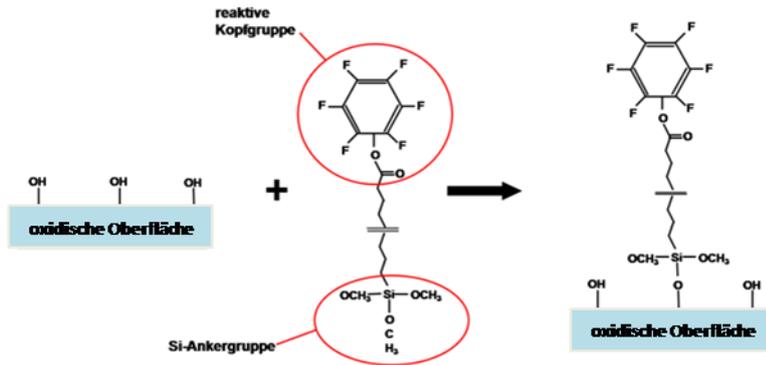
**Fig. 42: Nitrilotriessigsäure-Lösung (ANTA)**



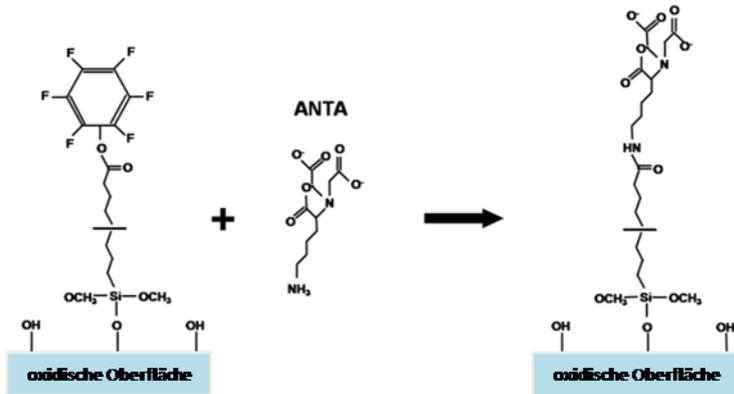
**Fig. 43: ANTA Anbindung an funktionalisierte Tantalpentoxid-Sensoroberfläche nach einer Gasphasensilanisierung (schwarz) und einer Flüssigphasensilanisierung (blau).**

Da die Anker-moleküle der Cytochrom c Oxidase eine starke Affinität zu Nickel-Chelat Komplexen aufweisen, wird der Sensor abschließend für 20min in eine 40nM Nickel-Lösung gestellt, wo die Ni<sup>2+</sup>-Ionen eine Komplexbindung mit den ANTA Liganden eingehen. Anschließend kann mit der Immobilisierung der Proteine begonnen werden.

1) Silanisierung:



2) ANTA Anbindung:



3) Komplex Bildung:

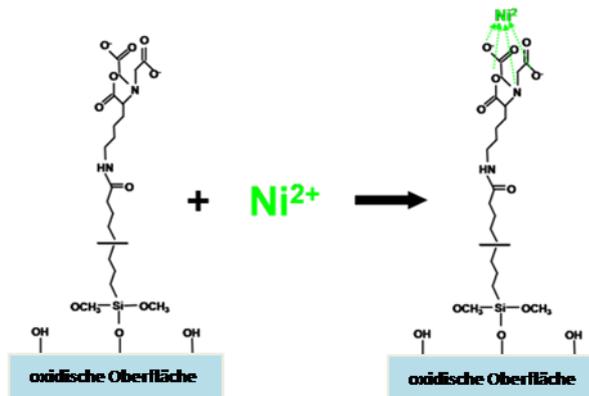
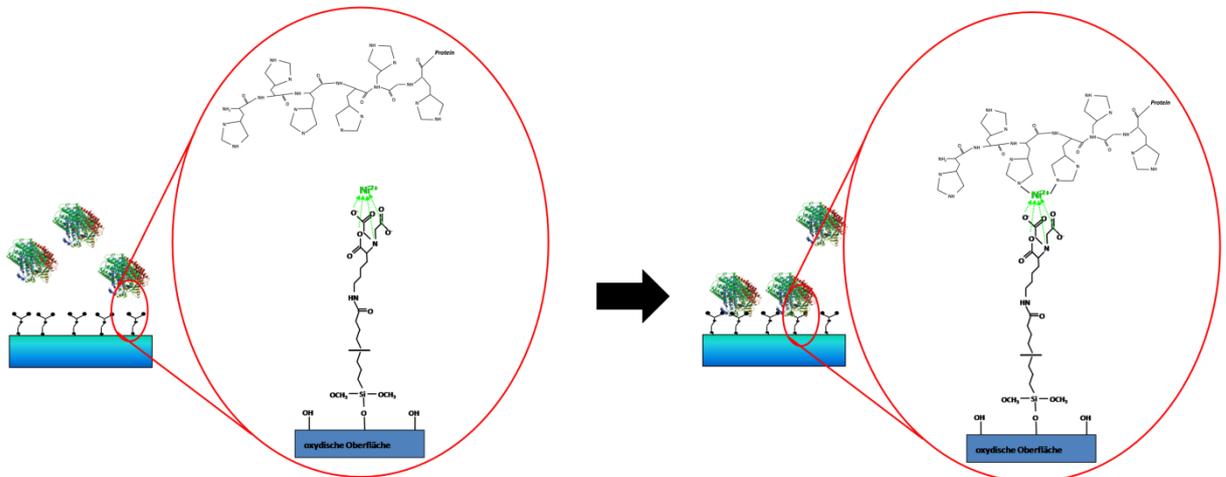


Fig. 44: Reaktionsprozesse der Funktionalisierung einer oxidischen Sensoroberfläche, durch Silanisierung (1), anschließender ANTA Anbindung an das Silan (2) und abschließender Komplexbildung durch Ni<sup>2+</sup>-Ionen mit ANTA (3)

### 4.2.3 Proteinanbindung



**Fig. 45: Cytochrom c Oxidase Proteinanbindung. Der His-Tag-Anker der Proteine weist eine hohe Affinität zu den  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplex auf und bindet dort an.**

Vor Beginn der Proteinanbindung müssen folgende Lösungen vorhanden sein:

- 1) Phosphatgepufferte Salzlösung pH=8 (PBS)
- 2) n-Dodecyl-b-D-maltoside –Lösung pH=9,8 (DDM)
- 3) Diphytanoylphosphatidyl choline in DDM (Diphy-PC: Lipid-Lösung)

Die genauen Stoffmengen und Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind im Anhang zu finden.

Um die zu erwartende effektive Brechungsindex Änderung der  $\text{TM}_0$ -Mode während der Proteinimmobilisierung abschätzen zu können, wurde eine Simulation, für den Fall einer 90%igen Proteinbelegung auf der Sensoroberfläche, durchgeführt. Diese wurde mit dem Programm ATSOS berechnet, welches den Transfermatrix-Algorithmus nutzt. Aus der Simulation geht hervor, dass eine Änderung des Neff der  $\text{TM}_0$ -Mode von  $\Delta\text{Neff} = 3,8 \cdot 10^{-3}$  erwartet wird. Dies entspricht in unserer Wellenleitersensorkonfiguration einer Winkelverschiebung von etwa  $0,1^\circ$ . Die Simulationsdaten sind im Anhang zu finden.

Vor Beginn der Proteinimmobilisierung wird der funktionalisierte Sensor in den Probenhalter eingebracht. Die Flusszelle wird auf die Sensoroberfläche gedrückt und mit DDM-Puffer gespült.

Anschließend wird das Winkelspektrum des funktionalisierten Sensors aufgenommen um dieses als Referenzmessung für die spätere Schicht-Charakterisierung zu verwenden. Um die Anbindungskinetik aufzunehmen, wird der Koppelwinkel einer Mode (Fig. 46), während der Adsorption der Proteine verfolgt. Für Anbindungen auf dem  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -Sensor wählen wir die  $\text{TM}_0$ -Mode, da diese durch das gegebene Sensordesign die Sensitivste ist

(etwa doppelte Sensitivität der  $TE_0$ -Mode; siehe Kap. 0), da die  $TM_0$ -Mode eine höhere Feldverstärkung an der Grenzfläche aufweist.

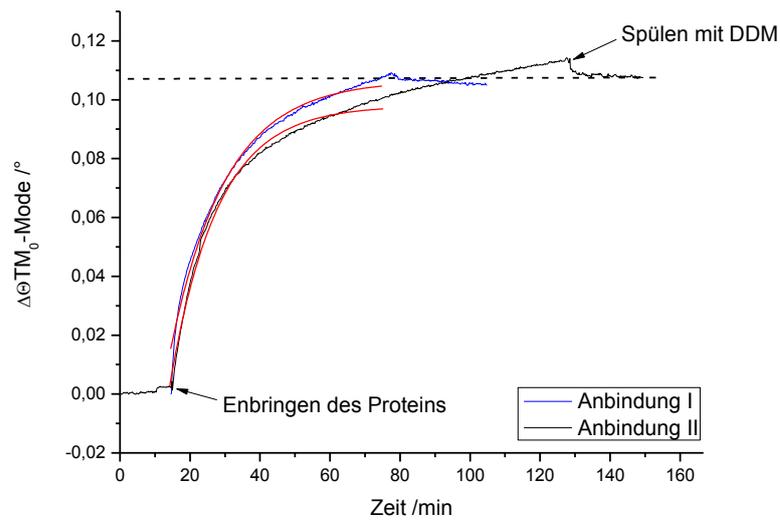
Das Protein wird kurz vor dem Experiment aufgetaut, indem es in DDM-Puffer gelöst wird. Das Protein sollte erst kurz vor Verwendung aufgetaut werden, da dieses mit längerer Aufbewahrung bei Raumtemperatur seine Mobilität verliert [51]. Als Protein wird die Cytochrom c Oxidase aus der Charge „Fergusson-Miller 09“ verwendet, welches in Einheiten von 10 $\mu$ L mit einer Konzentration von 20 $\mu$ M vorlag. Dieses wurde in 2mL DDM gelöst und somit eine Konzentration von 150 $\mu$ M eingestellt, welche für eine erfolgreiche Anbindung notwendig ist [11], danach wird die Proteinlösung mit einer Spritze in die Zelle eingebracht, dabei darf die Spritzenöffnung im Durchmesser nicht < 0,5mm sein um größere Flussgeschwindigkeiten zu vermeiden, da dies zu Stress für das Protein und damit ebenfalls zum Denaturieren führen kann [52]. Nach erfolgreicher Immobilisierung wird die Zelle mit DDM-Pufferlösung gespült.

Aus der Anbindungskinetik (Fig. 46) lässt sich erkennen, dass die Anbindungsprozesse, auf demselben Sensor mit gleicher Funktionalisierung, unterschiedliche zeitliche Verläufe zeigen, bei gleicher Änderung des effektiven Brechungsindex der  $TM_0$ -Mode.

Aus dem Exponential-Fit beider Kinetiken kann man schließen, dass der Anfangsbereich der Immobilisierung (bis 60. min) mit dem Langmuir-Modell gefittet werden kann. In diesem Anbindungsmodell wird vorausgesetzt, dass folgende Annahmen gelten [53]:

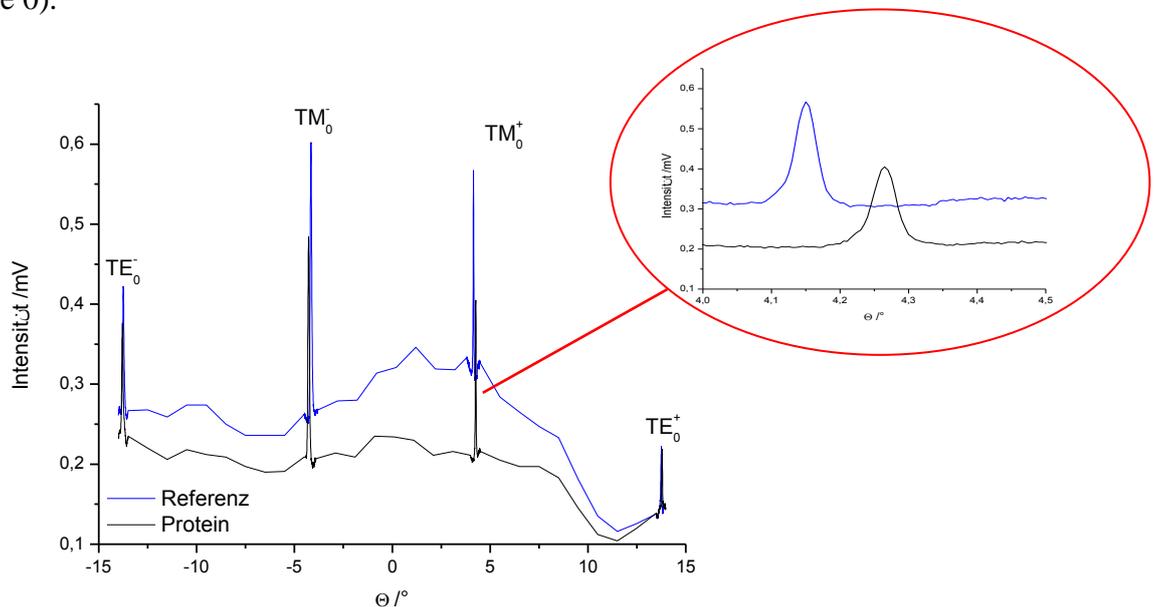
- a) Es wird nur ein Monolayer adsorbiert
- b) Alle Sorptionsplätze, sowie Oberfläche sind gleichwertig
- c) Keine Wechselwirkung der Adsorbanten untereinander

Die oben genannten Punkte a) und b) werden bei Beginn der Anbindung der Oxidase erfüllt, im späteren Verlauf, wenn die Sensoroberfläche nur noch wenige freie funktionalisierte Stellen für das Protein aufweist, überwiegt der unspezifische Anbindungsmechanismus und Punkt c) wird nicht mehr erfüllt, was deutlich wird da die aufgenommene Kinetik sich immer weiter von der perfekten Anbindungsisotherme entfernt (Exponential fit). Die unspezifische Anbindung resultiert aus den anziehenden Wechselwirkungen der Proteine untereinander und mit der Sensoroberfläche [54]. Auch kann man aus Fig. 46 folgern, dass während dem Spülvorgang mit DDM die unspezifischen Bindungen wieder gelöst werden. Das wird ersichtlich, durch den Vergleich der Änderungen des effektiven Brechungsindex beim Spülen. Dauert die Anbindung länger und bildet so mehr unspezifische Bindungen, so ist beim spülen  $\Delta n_{eff}$  größer als bei kürzeren Anbindungsdauern. Aus der Kinetik wird ersichtlich, dass bei Anbindungen länger als 50 Minuten keine Immobilisierungen des Proteins an der Sensoroberfläche mehr stattfindet, sondern nur noch unspezifische Bindungen zwischen den Proteinmolekülen vorliegen.



**Fig. 46: Kinetiken (Modenverfolgung) der TM<sub>0</sub>-Mode während Proteinimmobilisierung auf einem funktionalisiertem Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Wellenleitersensor, bei gleichen Funktionalisierungsparametern**

Nach erfolgreicher Anbindung und spülen mit DDM-Lösung, wird erneut das Koppelwinkel-Spektrum aufgenommen (Fig. 47), damit auch die Winkelverschiebung der TE<sub>0</sub>-Mode detektiert wird. Aus den Winkelverschiebungen beider Moden während der Immobilisierung des Proteins wird anschließend der Anisotropie-Faktor bestimmt (siehe 0).



**Fig. 47: Koppelwinkel für beide Grundmoden. Aufnahme vor (blau) und nach Proteinanbindung (schwarz). Im Ausschnitt ist die Verschiebung zu erkennen.**

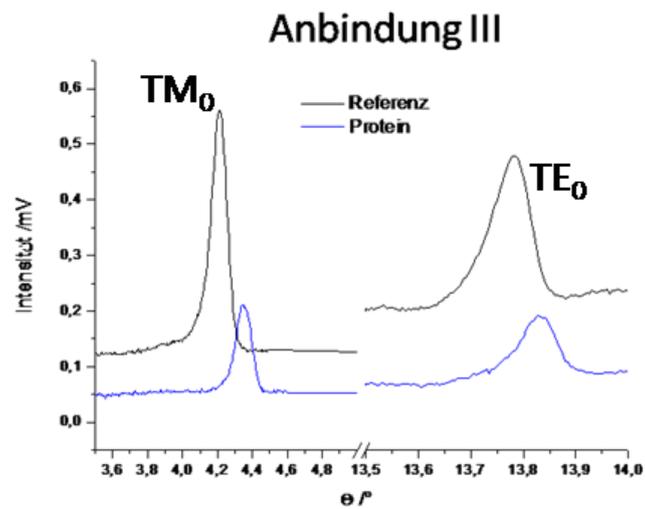
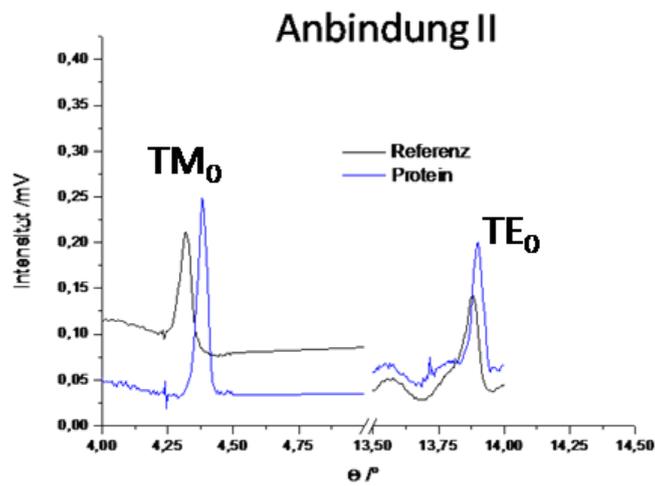
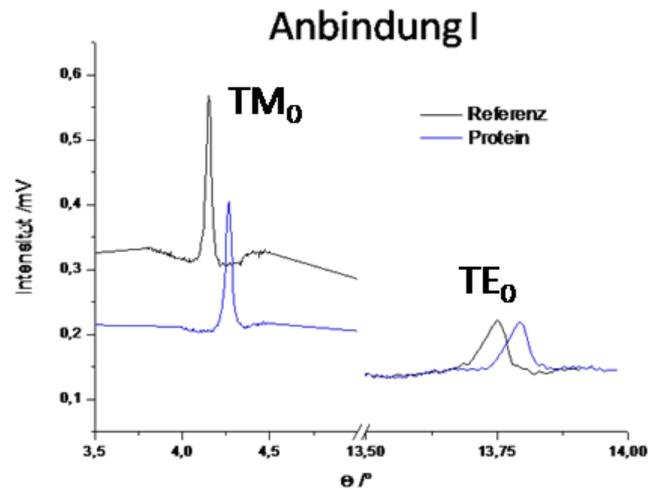
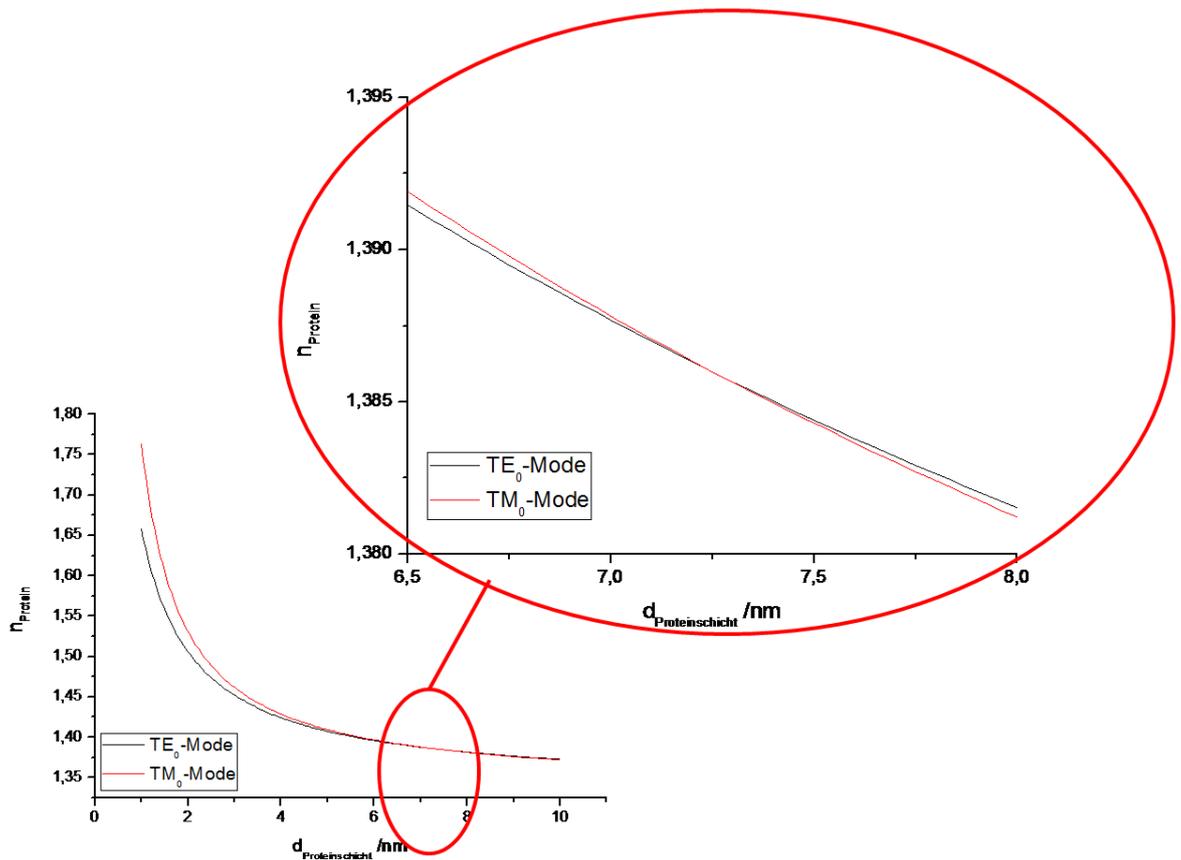


Fig. 48: Modenspektren der Referenzmessungen (schwarz) und nach erfolgreicher Proteinimmobilisierung (blau) auf funktionalisiertem Ta2O5-Sensoren.

**Tab. 4: Koppelwinkel und effektiver Brechungsindex der zwei Grundmoden vor und nach Proteinimmobilisierungen auf funktionalisiertem Ta2O5-Sensor**

Anbindung	Mode	$\theta_{\text{Referenz}} / ^\circ$	$N_{\text{eff,Referenz}}$	$\theta_{\text{Protein}} / ^\circ$	$N_{\text{eff,Protein}}$	$\Delta N_{\text{eff}}$
I	TE	$13,748 \pm 10^{-3}$	$1,936442 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$13,791 \pm 10^{-3}$	$1,937173 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,000730
	TM	$4,152 \pm 10^{-3}$	$1,771194 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$4,27 \pm 10^{-3}$	$1,773253 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,002057
II	TE	$13,79 \pm 10^{-3}$	$1,937156 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$13,835 \pm 10^{-3}$	$1,937924 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,000767
	TM	$4,219 \pm 10^{-3}$	$1,772363 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$4,352 \pm 10^{-3}$	$1,774669 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,002304
III	TE	$13,774 \pm 10^{-3}$	$1,936881 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$13,806 \pm 10^{-3}$	$1,937434 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,000552
	TM	$4,196 \pm 10^{-3}$	$1,771956 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	$4,296 \pm 10^{-3}$	$1,773702 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,001745

Mit den detektierten Neffs für beide Grundmoden sind wir in der Lage eine isotrope Auswertung der Proteinschicht durchzuführen. Dazu nutzen wir ein grafisches Auswertprogramm (Multiwave), welches auf dem Transfermatrix-Algorithmus basiert. Dieses löst die Modengleichung, für ein Schichtsystem mit beliebig vielen Schichten, für jede Mode einzeln und zeigt den Verlauf des Brechungsindex in Abhängigkeit der Dicke der zu berechnenden Schicht. Der Brechungsindex des Umgebungsmediums (DDM-Lösung) von 1,332 wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Der Schnittpunkt der beiden Kurven ergibt die Lösung für eine optisch isotrope Schicht.



**Fig. 49:** Auswertung einer Proteinschicht auf einem funktionalisiertem Ta2O5-Sensor, mit Hilfe des grafischen Auswerteprogramms „Multiwave“. Dargestellt wird der effektive Brechungsindex jeder Mode, in Abhängigkeit der Schichtdicke des Proteins.

Sind die Werte für Brechungsindex und Dicke der Proteinschicht bekannt, kann aus diesen die adsorbierte Proteinmasse pro Flächeneinheit  $M$  nach (Gl. 56) bestimmt werden [55]:

$$M = \frac{(n_{Prot}^2 - n_{Umgbg}^2)}{dn/dc} * d_{Prot} \quad (Gl. 56)$$

wobei  $dn/dc$  die Brechungsindexerhöhung des Umgebungsmediums in Abhängigkeit der darin enthaltenen Proteinkonzentration angibt,  $n_{Prot}$  und  $n_{Umgbg}$  stehen für die Brechungsindizes des Proteins und des Umgebungsmediums und  $d_{Prot}$  gibt die Dicke der Proteinschicht an. Für die verwendete Cytochrom c Oxidase ist der genaue Wert nicht bekannt, jedoch kann für Proteinlösungen ein Wert von  $0,182 \text{ g/cm}^3$  angenommen werden [16].

In Tab. 5 sind die ausgewerteten Daten von drei Proteinimmobilisierungen gezeigt:

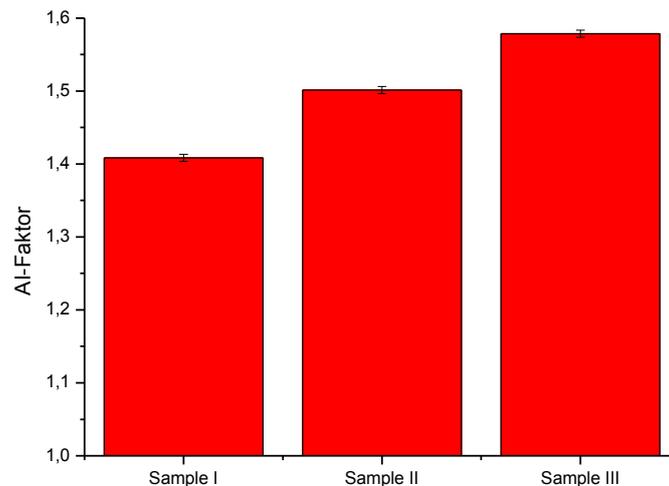
**Tab. 5:** Schichtdicke, Brechungsindex, Oberflächenbelegung und Anisotropie-Faktor der Cytochrom c Oxidase Immobilisierung auf funktionalisiertem Ta2O5-Wellenleitersensor

Anbindung	$d_{\text{Protein}} / \text{nm}$	$n_{\text{Protein}}$	Belegung / $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$	AI-Faktor
I	$7,3 \pm 0,1$	$1,389 \pm 10^{-4}$	622	$1,41 \pm 0,02$
II	$10,9 \pm 0,1$	$1,388 \pm 10^{-4}$	912	$1,5 \pm 0,02$
III	$11,6 \pm 0,1$	$1,376 \pm 10^{-4}$	760	$1,58 \pm 0,02$

Betrachten wir den berechneten Anisotropie-Faktor, von jeder der drei Anbindungen, so fällt auf, dass alle AI-Faktoren  $> 1$  sind.

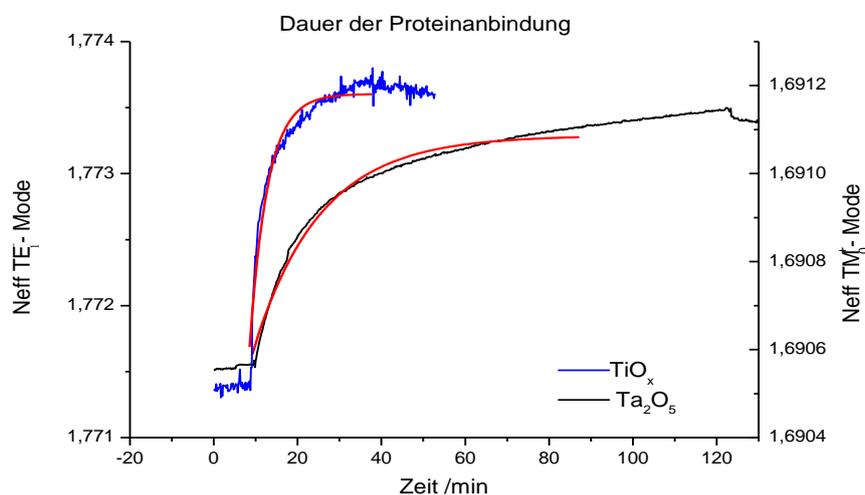
Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine nach ihrer Immobilisierung eine Vorzugs-Orientierung haben.

Das ist ein Hinweis, dass die Proteine an ihrem His-Tag-Anker adsorbieren und dieser nach dem Anbinden nur wenig Bewegung zulässt. Der ermittelte isotrope Brechungsindex der Cytochrom c Oxidase Schicht liegt bei etwa 1,38. Der Anisotropie-Faktor korreliert nicht mit der Masse des immobilisierten Proteins auf der Sensoroberfläche. Die bestimmten Werte für Brechungsindex und Schichtdicke des Proteins dürfen nicht als Absolutwerte angesehen werden, da sie stark fehlerbehaftet sind. Der hohe Fehler kommt durch die isotrope Auswertung einer nachweislich anisotropen Schicht ( $AI \approx 1,5$ ) zustande [56].



**Fig. 50: Anisotropie-Faktor von drei Proteinanbindungen. Alle Werte sind  $>1$ , daraus lässt sich schließen, dass das Protein eine bevorzugte Anbindungsorientierung besitzt**

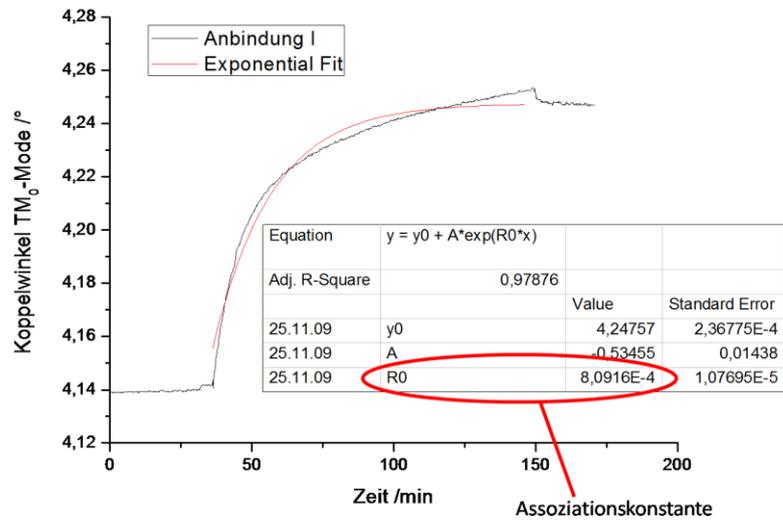
Da bekannt ist dass Titanoxid durch eine höhere Hydrophilität eine höhere Bindungsaffinität zu biologischen Systemen aufweist [50], wurden ebenfalls Proteinanbindungen auf den  $\text{TiO}_x$ -Multimode-Sensoren durchgeführt und diese mit den Anbindungen auf  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  verglichen (Fig. 51). Auch hier wurden beide Sensortypen mit den gleichen Parametern funktionalisiert und präpariert. Aus der Kinetik wird deutlich,



**Fig. 51: Modenverfolgung während Proteinanbindung auf  $\text{TiO}_x$ -Sensor (blau) und  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  (schwarz), bei gleichen Funktionalisierungsparametern.**

dass die Proteinanbindung auf der  $\text{TiO}_x$  Oberfläche wesentlich schneller abläuft im Vergleich zu  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ . Ebenfalls wird auf  $\text{TiO}_x$  eher das Kriterium einer Langmuir-Anbindung erfüllt, da bei solch kurzen Anbindungsdauern die schwächere unspezifische Bindung der um ein vielfaches stärkeren kovalenten Bindung unterliegt und so ein weiteres Kriterium des Langmuir-Modells erfüllt wird. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sensitivitäten der Wellenleitersensoren sind die Änderungen der effektiven Brechungsindizes von TE- und TM-Mode auf beiden Sensoren gleich, was auf eine etwa gleich hohe prozentuale Belegungsdichte von  $\approx 90\%$  schließen lässt.

Wie in Kap. 2.6 beschrieben, ist es möglich aus einer aufgenommenen Anbindungskinetik die dazugehörigen Assoziationskonstanten zu bestimmen.



**Fig. 52:** Kinetik einer Proteinimmobilisierung (schwarz) auf einem Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Wellenleitersensor und der dazugehörige Exponentialfit (rot). Die Assoziationskonstante wird der Fit-Gleichung entnommen.

Die in dieser Arbeit aufgenommenen Kinetiken wurden auf ihre Bindungskonstanten hin ausgewertet. Tab. 6 zeigt die ermittelten Bindungskonstanten für Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und TiO<sub>x</sub> Oberflächen. Die Anbindungen auf Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Oberflächen sind reproduzierbarer als die auf TiO<sub>x</sub> Oberflächen. Dies könnte an der homogeneren Struktur und der höheren Stabilität, gegen die Puffer-Lösungen, der Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Sensoren liegen. Wie man sieht sind die Messergebnisse mit großen Fehlern behaftet, was darauf zurück zu führen ist, dass zu viele Parameter die spätere Anbindung beeinflussen.

**Tab. 6:** Berechnete Bindungskonstanten der Proteinimmobilisierung auf zwei verschiedenen oxidischen Oberflächen.

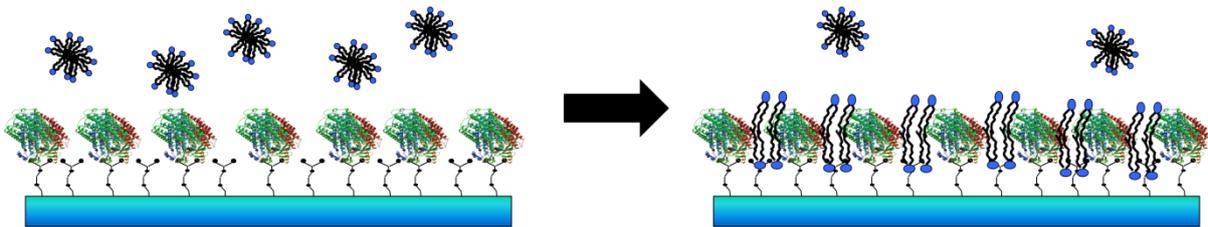
Nr.	Mat.Sensor	Messmode	$k_a / s^{-1} M^{-1} / *10^{-3}$
1	Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	TM <sub>0</sub>	0,809±0,01
2	Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	TM <sub>0</sub>	0,894±0,2
3	TiO <sub>x</sub>	TE <sub>1</sub>	3,95±0,1
4	TiO <sub>x</sub>	TE <sub>1</sub>	1,76±0,4

Vergleicht man die ermittelten Assoziationskonstanten mit denen anderer Immobilisierungen (Tab. 7), so sieht man das es sich bei der Anbindungsreaktion zwischen Cytochrom c Oxidase und dem ANTA/Ni<sup>2+</sup>-Liganden um eine sehr langsame Anbindungsreaktion handelt, da die Differenz zwischen den Assoziationskonstanten bis zu 10<sup>9</sup> beträgt.

**Tab. 7:** Ermittelte Assoziationskonstanten verschiedener Liganden-Rezeptoren-Anbindungen

<b>Gruppe</b>	<b>Methode</b>	<b>Molekül</b>	<b><math>k_a/s^{-1}M^{-1}</math></b>	<b>T /°C</b>
Myszka et al. [57]	SPR	D1D2-mAB	$1,2 \cdot 10^6$	25
Myszka et al. [47]	SPR	CA II-CBS	$4,8 \cdot 10^4$	25
Myszka et al. [47]	SFF	CA II-DNSA	$3,8 \cdot 10^5$	-
Karlsson et al. [14]	SPR	Myoglobin-anti-Myoglobin	$2,6 \cdot 10^5$	25
Markgren et al. [15]	SPR	HIV-1/BEA-268	$2,8 \cdot 10^6$	25

#### 4.2.4 Doppel-Lipidschicht Formung

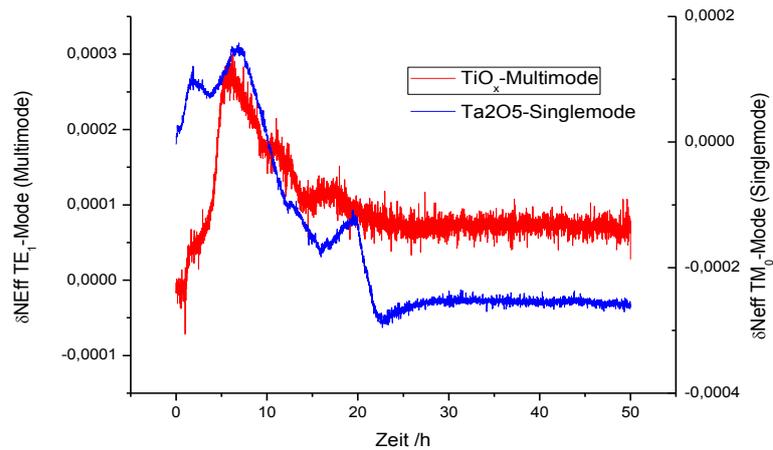


**Fig. 53: Lipid-Doppelschicht Formung: Die Lipide ordnen sich um die Proteinschicht herum an und bilden so die Lipid-Doppelschicht.**

Um die Funktionalität der Proteine nach dem Immobilisieren zu gewährleisten, muss innerhalb von 24 mit der Formung einer Lipid-Doppelschicht begonnen werden, da die Proteine ansonsten mit der Denaturierung beginnen [58]. Die Lipid Lösung wird mit einer Spritze durch die Spritzen-Öffnung der Flusszelle an die Sensoroberfläche gebracht. Die Zelle wird anschließend mit Biobeads aufgefüllt. Auch diese müssen nah an die Oberfläche gebracht werden um ihre volle Funktionalität zu gewährleisten [59]. Die Lipide liegen als Lipid-DDM Mycellen vor und sind in einem PBS-Puffer, mit einem pH von 8, gelöst. Die Mycellen sinken Anfangs (ca. 6-7h) auf die Sensoroberfläche und verursachen einen Massenzuwachs, welcher in der Modenkinetik durch einen steigenden effektiven Brechungsindex detektiert wird (Fig. 54). Die Biobeads adsorbieren das DDM aus der Lösung und reißen damit die Lipid-DDM Mycellen auseinander. Die freigewordenen Lipide beginnen nun die offenen DDM Stellen an der Cytochrom c Oxidase zu besetzen und formen so durch ihre Affinitätsstruktur die Lipid-Doppelschicht.

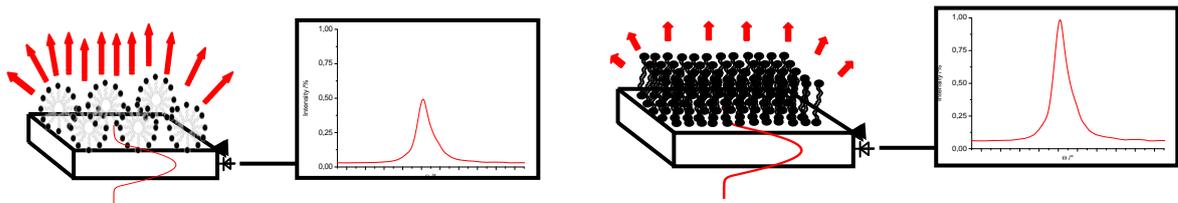
Der gesamte Formungsprozess dauert zwischen vierundzwanzig und achtundvierzig Stunden.

Während dieser Zeit treten drei Effekte auf, die in der Kinetik (Fig. 54) detektiert werden. Erstens sinkt durch das Entfernen der DDM-Detergenz der Brechungsindex des Umgebungsmediums, was sich durch eine negative Neff-Änderung bemerkbar macht. Der zweite Effekt ist der Massenzuwachs durch die Lipide während ihrer Adsorption, was durch eine positive Änderung von Neff detektiert wird. Außerdem tritt der Effekt der Umorientierung auf, dieser wird bestimmt durch das Verschiebungsverhältnis von  $N_{\text{eff}_{\text{TM}}}$  zu  $N_{\text{eff}_{\text{TE}}}$ . Da sich alle drei Effekte im effektiven Brechungsindex aufsummieren und nur eine der beiden Modenpositionen in der Kinetik detektiert werden kann, ist es nicht möglich aus einer Modenkinetik, eine Aussage über die Anisotropie-Änderung des Membransystems zu treffen.



**Fig. 54: Kinetik einer Lipidschicht Formung.** Es wurde die  $TM_0$ -Mode (blau) eines  $Ta_2O_5$ -Sensors, sowie die  $TE_1$ -Mode (rot) eines  $TiO_x$ -Sensors detektiert

Um weitere Informationen über das System zu erhalten, wird die Intensität der Mode analysiert. Dazu wird die Intensität im Modenmaximum als Funktion der Zeit aufgetragen. Durch die Änderung der Modenintensität, kann auf die Dissipation des Schichtsystems geschlossen werden. Das Prinzip der Dissipation wird bei Messungen mit QCM-D verwendet [60]. Im Falle von propagierenden Moden, gibt die Intensität Aufschluss über die Oberflächenstreuverluste beim propagieren durch den Wellenleiter. Besitzt der Adsorbant eine Sphärische Form, so erhöhen sich die Streuverluste gegenüber denen einer Filmstruktur.



**Fig. 55: Prinzip der Dissipation.** Links: Sphärische Objekte verursachen einen hohen Oberflächen-Streuverlust, die Modenintensität sinkt. Rechts: Homogenere Filmstruktur verringert die Streuverluste, die Modenintensität steigt.

Zum Überprüfen dieses Sachverhaltes wurde die Dissipation einer bekannten Vesikel-Fusion getestet. Hierfür wurden DOPC- Lipidvesikel mit einem Durchmesser von 100 nm in PBS-Puffer (pH=7,85) gelöst ( $c=20\text{mM}$ ), und durch die Flusszelle an die Sensoroberfläche gebracht. Sind die Wechselwirkungen zwischen Sensoroberfläche und Vesikel hoch genug, reißen die Vesikel auf und bilden einen Lipid-Bilayer [61, 62] (Fig. 56).

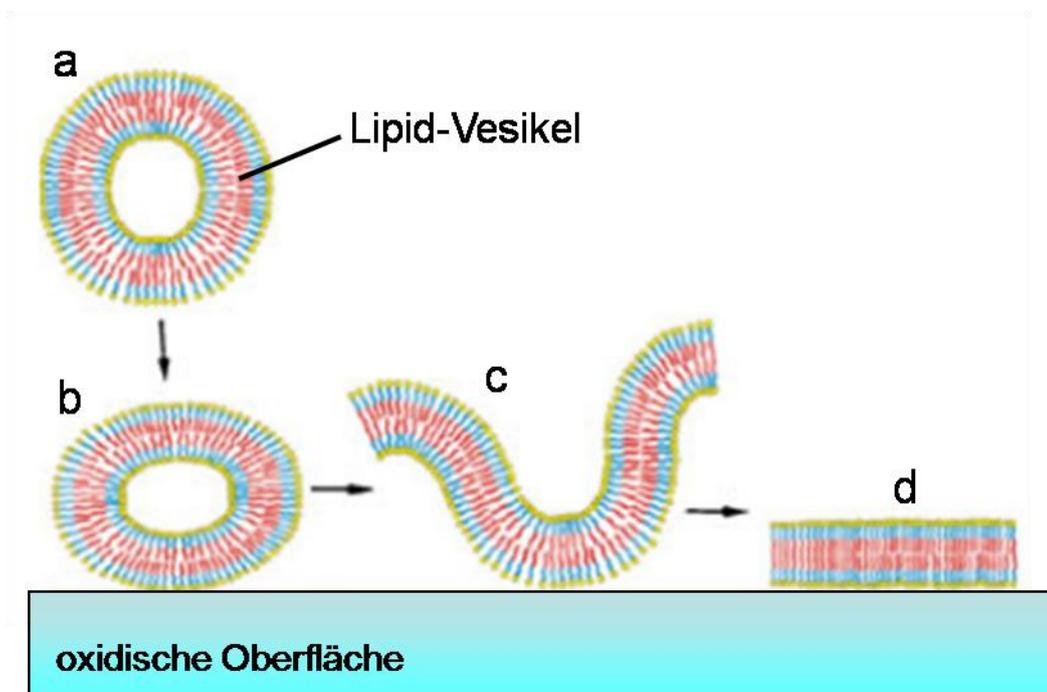
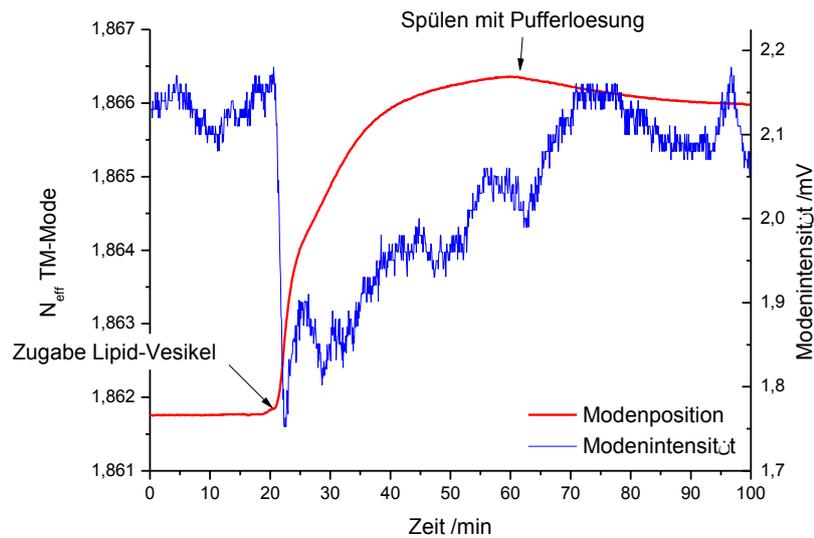


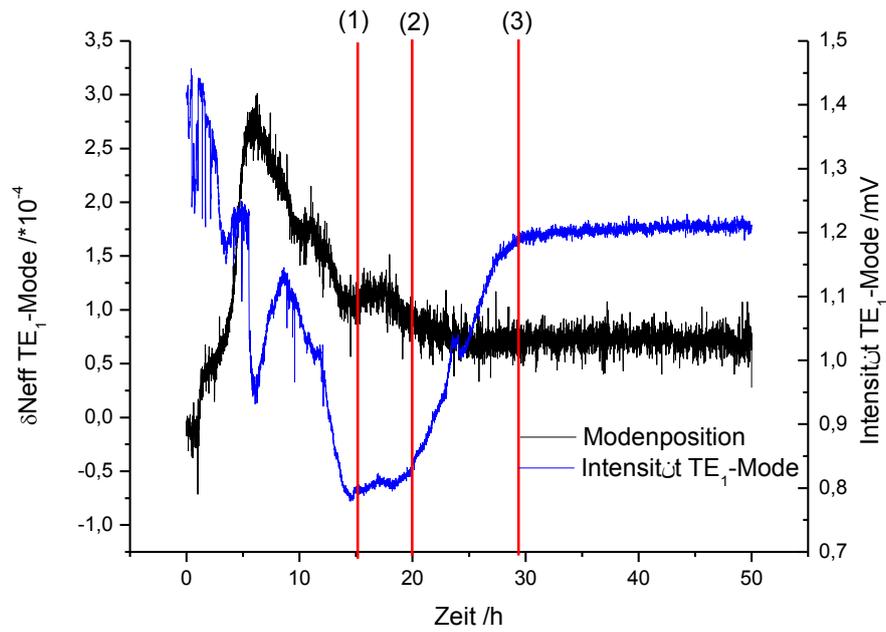
Fig. 56: Formung einer Lipid-Doppelschicht. Die Lipid-Vesikel sinken auf die Oberfläche (a) und adsorbieren dort (b). Sind die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Lipid-Vesikel ausreichend groß, reißen die Vesikel auf (c) und bilden die Lipid-Doppelschicht (d). [63]

In der Intensitäts -Kinetik (Fig. 57) ist zu sehen, wie anfangs der effektive Brechungsindex steigt, während die Intensität abfällt. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Sphärischen Vesikel beim Adsorbieren auf der Sensoroberfläche einen Massenzuwachs verursachen und gleichzeitig die Oberflächenstreuung erhöhen. Ab der 20. Minute sieht man einen deutlichen Anstieg in der Modenintensität, verursacht durch das Aufreißen und Filmbilden der Lipidvesikel. Dieser Film führt zu einer homogeneren Adlayer Struktur und damit zu einem sinken der Streuverluste.



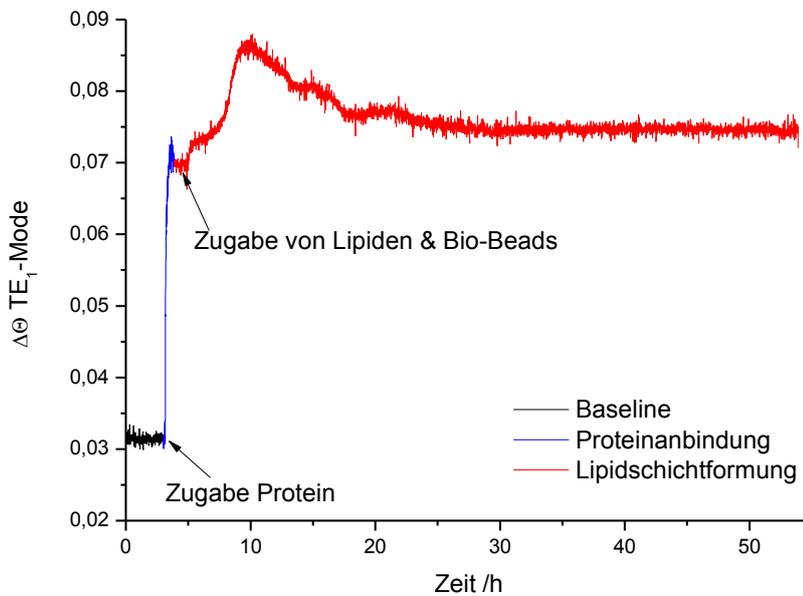
**Fig. 57: Kinetik der Dissipation einer Vesikelfusion zu einem Lipid-Bilayer, auf einer hydrophilen Oberfläche. Die rote Kurve zeigt den Neff der Mode und die blaue Kurve die jeweilige dazugehörige Modenintensität.**

Betrachtet man nun die Intensität-Kinetik eines Lipid-Bilayer Formungsprozess einer Protein gestützten Festkörpermembran (Fig. 58), können so weitere Informationen über den Formungsprozess gewonnen werden. Aus der Kinetik kann darauf geschlossen werden, dass innerhalb der ersten 15h (1) ein sedimentieren der Lipid-Mycellen stattfindet, hier als Massenzuwachs (Ansteigen des effektiven Brechungsindex) bei gleichzeitigem Intensitätsverlust der propagierenden Mode zu erkennen. Ab 15h findet kein Massenzuwachs mehr statt, dennoch steigt die Modenintensität von 20h (2) bis 30h (3) stetig an. Dies ist ein klares Indiz für eine reine Formationsänderung, bei gleichbleibender Masse des Membransystems, hin zu einem homogeneren Lipid-Bilayer und damit zu geringeren Streuverlusten der detektierten Mode.

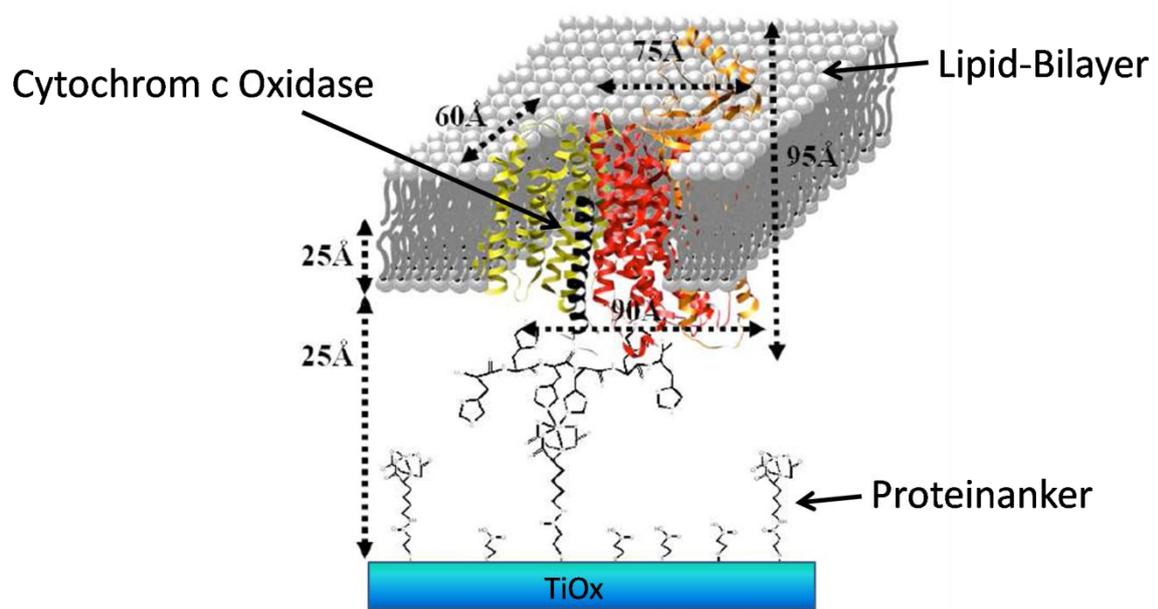


**Fig. 58:** Änderung des Neff (schwarz) und der Intensität (blau) der zugehörigen TE1-Mode während des Lipidschicht Formungsprozesses

Für eine bessere Übersicht der zeitlichen Verläufe der Membranformung, zeigt Fig. 59 die Kinetik eines kompletten Membranaufbaus auf dem  $\text{TiO}_x$  Multimode Wellenleiter.



**Fig. 59:** Komplette Kinetik des gesamten Membranaufbaus auf einem  $\text{TiO}_x$ -Wellenleitersensor. Die TE1 Mode wurde zur Detektion genutzt



**Fig. 60: Kompletter Aufbau inklusive Dimensionen des Protein gestützten Membransystems**

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bildung einer Protein-verankerten Bilayer Lipid Membran untersucht und charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die Wellenleitermoden-Spektroskopie durch das Detektieren von mehr als einem Parameter (Vergleich:SPR), dazu geeignet ist Membranbildungsprozesse zu verfolgen. Durch das Messen mit zwei Polarisationsrichtungen war es möglich eine bevorzugte Orientierung der Cytochrom c Oxidase auf der Oberfläche nachzuweisen. Diese liefert eine höhere Polarisierbarkeit des Proteinmoleküls senkrecht zur Anbindungsoberfläche. Anhand der Reproduzierbarkeit der Orientierung kann darauf geschlossen werden, dass die His-Tag Technologie zuverlässig arbeitet.

Für den zeitlichen Verlauf der Protein-Kinetik auf einer Tantalpentoxid Sensoroberfläche konnte eine Anbindungskonstante von  $0,87 * 10^{-3} \frac{1}{M*s}$  ermittelt werden. Durch den Vergleich mit Anbindungen auf Titanoxid Sensoroberflächen wird deutlich dass die Dauer der Proteinimmobilisierung Abhängig ist von den Wechselwirkungen zwischen Protein und Sensoroberfläche. Je schneller die Immobilisierung abläuft, desto besser lässt sich die dazugehörigen Kinetik mit dem Langmuir-Anbindungsmodell fitten und liefert so exaktere Ergebnisse für die zu ermittelnden Bindungskonstanten.

Der Brechungsindex der Cytochrom c Oxidase wurde, mit einem relativ großen Messfehler, mit  $n = 1,38 \pm 0,025$  bestimmt. Man muss jedoch berücksichtigen, dass es sich nicht um eine reine Proteinschicht handelt, da die Proteinzwischenräume mit Pufferlösung mit einem Brechungsindex von 1,332 gefüllt sind.

Auch konnte gezeigt werden, dass die Proteine bei der Bildung der Lipid-Doppel-Schicht keine Änderung ihrer Orientierung erfahren, da die Proteine schon dicht gepackt vorliegen ( $\approx 90\%$ ) und sich die Lipide in die vorhandenen Leerräume „zwängen“. Durch das Messen der Wellenleiter-Dissipation konnte jedoch eine bessere Vorstellung über den zeitlichen Ablauf der Lipid-Doppel-Schicht Bildung gewonnen werden. Durch diese wurde nachgewiesen, dass die Lipid-Myzellen anfangs auf der Protein-Schicht adsorbiert werden und erst dann aufreißen, wenn mit Hilfe der Dialyse das Detergenz (DDM) aus der Pufferlösung entfernt wird. Anschließend bilden die Lipidmoleküle in den Zwischenräumen der CcO-Moleküle die Lipid-Doppel-Schicht, indem sie die freigebliebenen DDM Stellen an der Cytochrom c Oxidase einnehmen. Die Bildung der Lipid-Schicht dauert etwa 48h, davon sind ungefähr 28h ein reiner Orientierungsprozess, bei dem keine Massenzuwächse auf der Sensoroberfläche detektiert werden.

Eine quantitative Bestimmung des polarisationsabhängigen Brechungsindex der Cytochrom c Oxidase war mit den vorhandenen Titanoxid Multimode Wellenleitersensoren nicht möglich. Die Auswertung der ermittelten Koppelwinkel nach der Immobilisierung des Proteins lieferte keine Lösung.

Ein Vorteil wäre es, wenn die Möglichkeit bestehen würde während einer Kinetik alle Koppelwinkel jeder fuhrbaren Mode zu detektieren. Dies würde zu einem besseren Verständnis der zeitaufgelösten Anisotropie bei Formungsprozessen führen. Dafür wäre es eine Möglichkeit die Moden über die Stirnflächenkopplung anzuregen, über das optische Gitter auszukoppeln und durch eine CCD-Zeile die Modenpositionen zu bestimmen.

Ein weiterer großer Schritt für die Charakterisierung von Membransystemen wäre die Ausstattung des Sensors mit einer Elektrode, beispielsweise eine dünne aufgesputterte ITO-Schicht, zum durchführen von zusätzlichen Elektrochemischen Messungen. So wäre es möglich über das Anlegen eines elektrischen Feldes die Proteine zum Elektronentransport anzuregen und durch gleichzeitiges Messen der Anisotropie und der Wellenleiter-Dissipation, Aussagen zu treffen, über das Orientierungsverhalten der Cytochrom c Oxidase beim Elektronentransport. Das Einbringen einer Elektrode erwies sich jedoch als zu Zeitaufwendig, als das diese noch in dieser Arbeit hätte realisiert werden können.

## 6 Abkürzungs-/Symbolverzeichnis

TE	Transversal-Elektrisch
TM	Transversal-Magnetisch
E	elektrische Feldstärke
H	magnetische Feldstärke
$c_0$	Vakuumlichtgeschwindigkeit $2,998 \cdot 10^8$ m/s
c	Lichtgeschwindigkeit
$\lambda$	Wellenlänge
W	Watt
CcO	Cytochrom c Oxidase
t	Zeit
r	Ortsvektor
$\epsilon_0$	elektrische Feldkonstante $8,854 \cdot 10^{12}$ As/Vm
$\epsilon_r$	Dielektrizitätskoeffizient
$\mu_0$	magnetische Feldkonstante $4\pi \cdot 10^{-7}$ VS/Am
$\mu_r$	Permeabilitätskoeffizient
$\omega$	Kreisfrequenz
k	Wellenzahlvektor
$\kappa$	Hyperpolarisierbarkeit
p	Dipol
$\varphi_e$	Einfallswinkel
$\varphi_t$	Transmissionswinkel
$\varphi_r$	Reflektivitätswinkel
n	Brechungsindex
$N_{\text{eff}}$	effektiver Brechungsindex
$\beta$	Ausbreitungskonstante
d	Dicke
G	Gitterkonstante
m	Beugungsordnung
$\theta$	Koppelwinkel
L	Länge
S	Sensitivität
AI	Anisotropie-Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DDM	n-Dodecyl-b-D-maltoside
Diphy-PC	Diphytanoylphosphatidyl choline
ANTA	Nitrilotriessigsäure-Lösung

L	Liter
M	Molar
Å	Angström
$\gamma$	Oberflächenspannung
N	Newton
ITO	Indiumzinnoxid
TiO <sub>x</sub>	Titanoxid
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Tantalpentoxid
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
$dn/dc$	Konzentrationsabhängige Brechungsindexänderung

## 7 Abbildungsverzeichnis

Fig. 1: Vergleich von konfokaler (links) und evaneszenter (rechts) Beleuchtung. Die Störsignale des Analyten im Volumen werden durch die evaneszente Beleuchtung minimiert ( <a href="http://www.res-tec.de/">http://www.res-tec.de/</a> ). .....	2
Fig. 2: Membranmodell nach Singer Nicholson [23] ( <a href="http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/phys/memmod.jpg">http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/phys/memmod.jpg</a> ) .....	3
Fig. 3: Etablierte künstliche Membransysteme ausgehend vom allgemeinem Membran-Mosaik-Modell [29]. .....	5
Fig. 4: Berechnetes Dipolmoment der genutzten Cytochrom c Oxidase. ( <a href="http://bioinfo.weizmann.ac.il/dipol/">http://bioinfo.weizmann.ac.il/dipol/</a> ) .....	5
Fig. 5: Molekülaufbau der Cytochrom c Oxidase. Aufgelöst mit der Röntgenstruktur Analyse mit einer Auflösung von 2 Å (links). Rechts: Cytochrom c Oxidase in DDM-Pufferlösung, die DDM-Puffermoleküle setzen sich an die freien Stellen der CcO fest [11]. Das für die Anbindung notwendige Histidinmolekül, befindet sich an der Untereinheit II des Proteins.....	6
Fig. 6: Ladungsverschiebung bei anlegen eines externen elektrischen Feldes. ....	8
Fig. 7: Links: Indikatrix Ellipsoid mit eingezeichneter Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahls. Rechts: Dazugehöriges Brechungsindex Ellipsoid, der Brechungsindex in x- ist größer als in y-Richtung.....	10
Fig. 8: Links: Indikatrix-Ellipsoid mit sich, parallel zur optischen Achse des Kristalls, ausbreitender Welle. Rechts: Das Brechungsindex Ellipsoid wird zum Kreis, Polarisationen in beide Raumrichtungen erfahren denselben Brechungsindex. ....	10
Fig. 9: Darstellung des Snelliuschen Brechungsgesetz für TE- und TM-Polarisation. Die Tangentialkomponenten müssen beim Übergang von Medium 1 in Medium 2 stetig sein. ....	12
Fig. 10: Links: Strahlenoptische Betrachtung der Eindringtiefe einer evaneszenten Welle, erzeugt durch Totalreflektion. Rechts: Wellenoptische Darstellung der exponentiell abfallenden evaneszenten Feldanteils. ....	13
Fig. 11: Elektromagnetische Feldverteilung der ersten drei TE-Moden in einem asymmetrischem planaren Wellenleiter [1].....	14
Fig. 12: Modendispersion für die ersten vier geführten Moden eines Schicht-Wellenleiters. Aufgetragen wurde der effektive Brechungsindex der Moden in Abhängigkeit der Wellenleiterdicke. Simulationsparameter: $n_3=1,534$ ; $n_2=2,22$ ; $n_1=1$ ; $d_3=\infty$ ; $d_2=160\text{nm}$ ; $d_1=\infty$ ; $\lambda=633\text{nm}$ .....	17
Fig. 13: Schichtaufbau für einen Vielschicht-Wellenleiter. In jeder der N Schichten existiert eine Welle mit einer positiven und einer negativen x-Komponente. ....	18
Fig. 14: Prinzip der Gitterkopplung anhand eines einfachen zwei-Schicht Systems. Die periodische Gitterstruktur verlängert den Wellenvektor, so dass Totalreflektion an Grenzflächen möglich ist. ....	21
Fig. 15: Oberflächenstreuung an planaren Wellenleitern nach dem Zig-Zag Modell. Bei jeder Reflektion an einer der beiden Grenzflächen wird Lichtleistung durch Oberflächeninhomogenitäten in die Umgebungsmedien gestreut. ....	22
Fig. 16: Schematisches Prinzip eines Anbindungsprozesses. Molekül B ist auf der Sensoroberfläche angebunden. Durch Anziehende Wechselwirkungen zwischen Molekül A und B gehen diese eine Verbindung ein (AB).....	24
Fig. 17: Aufgenommenes Spektrum während eines Anbindungsprozesses. Die Anbindungssteigung lässt sich durch eine Exponential-Funktion darstellen und erfüllt damit die Kriterien einer Langmuir-Anbindung. ....	25
Fig. 18: Setup für die Wellenleitermoden-Spektroskopie mit Gitterkoppler. Die Mode durchläuft den Wellenleiter und wird am Ende durch eine Fotodiode detektiert. ....	26

Fig. 19: WaMS Methoden. Links ein komplettes Modenspektrum. Rechts eine Modenverfolgung (Kinetik) einer $TM_0$ -Mode während eines Adsorptionsvorgangs. ....	27
Fig. 20: Spannungsverteilungen bei Messung des Oberflächen-Kontaktwinkels. ....	28
Fig. 21: Drop Shape Analysis System der Firma Krüss zum bestimmen von Kontaktwinkeln zwischen Oberflächen und Wasser. ....	29
Fig. 22: Schematischer Aufbau eines Raster-Kraft-Mikroskops .....	30
Fig. 23: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie. a) HeNe-Laser; b) Spiegel; c) Polarisatoren; d) Fresnel-Rhombus; e) Wellenleiter-Sensor; f) Fotodiode; g) Flusszelle .....	32
Fig. 24: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie von oben. ....	32
Fig. 25: Aufbau für die Wellenleitermoden-Spektroskopie von der Seite. ....	33
Fig. 26: Aufgenommenes Modenspektrum eines $Ta_2O_5$ Singlemode Wellenleiters. ....	33
Fig. 27: Aufgenommenes AFM-Bild der Gitterstruktur im $TiO_x$ -Welleneitersensor. Die Scanfläche beträgt $5\mu m * 5\mu m$ , der Scan wurde mit einem Cantilever des Typs OMCL-AC160TS-W2 von Olympus im „non-contact mode“, von Helma Burg durchgeführt. ....	34
Fig. 28: Auswertung des AFM-Bildes aus Fig. 27. Die Gitterstruktur wurde an drei Punkten vermessen. Die Ergebnisse sind rechts aufgeführt. Der Mittelwert aller drei Messungen beträgt $28,8nm \pm 3,9nm$ . ....	34
Fig. 29: Aufgenommenes Modenspektrum eines $TiO_x$ Multimode Wellenleiters. ....	35
Fig. 30: Oberflächenprofil des $Ta_2O_5$ Wellenleitersensors. Scanlänge: 1mm; Scanspeed: $10\mu m/sec$ ; Gerät: PLA Tencor P-16+ .....	36
Fig. 31: Gemessenes Oberflächenprofil des $TiO_x$ Wellenleitersensors. Scanlänge: 1mm; Scanspeed: $10\mu m/sec$ ; Gerät: PLA Tencor P-16+ .....	36
Fig. 32: Modendispersionen eines Wellenleiters ohne (türkis) und mit isotropem Addlayer (schwarz). ....	38
Fig. 33: Änderungen des effektiven Brechungsindex für beide Grundmoden, durch Aufbringen einer isotropen Zusatzschicht, in Abhängigkeit der $Ta_2O_5$ -Wellenleitersensorschichtdicke. ....	39
Fig. 34: Fallunterscheidung für den Anisotropie-Faktor und die jeweiligen Brechungsindex Ellipsoide. ....	40
Fig. 35: Ansicht der neu konstruierten Flusszelle. Oben: Zelle ohne Wellenleitersensor. Unten: Zelle mit Wellenleitersensor. (A):Kanalsystem zum spülen; (B):Dichtungsring; (C):Öffnung zum einbringen der Biobeads; (D):Kammer für Biobeads; (E):Wellenleitende Schicht des Wellenleitersensors .....	42
Fig. 36: Neu konstruierte Flusszelle aus Plexiglas. ....	43
Fig. 37: In den Probenhalter eingebaute Flusszelle (links). Die Flusszelle wird gegen den Wellenleitersensor gedrückt, der Dichtungsring verhindert ein auslaufen der Flüssigkeit (rechts). ....	43
Fig. 38: Flussdiagramm der Prozessschritte zur Formung einer Protein gestützten Festkörpermembran. ....	44
Fig. 39: Scanmessungen eines $Ta_2O_5$ -Wellenleitersensors der für 72h in einer ANTA-Lösung mit $pH=9,8$ stand. In den ersten 16h scheint ANTA in die Oberfläche zu diffundieren und den Brechungsindex zu verringern. ....	45
Fig. 40: Verwendetes Silan (11 – Pentafluorophenylundecanoatrimethoxysilane, Firma: Sikemia). Das Silan bildet eine selbstorganisierende Monolage, indem die Si-Kopfgruppe an die Sauerstoffatome des $Ta_2O_5$ -Wellenleitersensors anbinden. ....	46
Fig. 41: Messung des Kontaktwinkels vor (links) und nach (rechts) der Beschichtung mit 11 – Pentafluorophenylundecanoatrimethoxysilane. Gemessen wurde mit einem Kontaktwinkelmessgerät der Firma Krüss, Modell: DAS 10-Mk2. ....	46
Fig. 42: Nitrilotriessigsäure-Lösung (ANTA). ....	47

Fig. 43: ANTA Anbindung an funktionalisierte Tantalpentoxid-Sensoroberfläche nach einer Gasphasensilanisierung (schwarz) und einer Flüssigphasensilanisierung (blau).....	47
Fig. 44: Reaktionsprozesse der Funktionalisierung einer oxidischen Sensoroberfläche, durch Silanisierung (1), anschließender ANTA Anbindung an das Silan (2) und abschließender Komplexbildung durch Ni <sup>2+</sup> -Ionen mit ANTA (3).....	48
Fig. 45: Cytochrom c Oxidase Proteinanbindung. Der His-Tag-Anker der Proteine weist eine hohe Affinität zu den Ni <sup>2+</sup> -Komplex auf und bindet dort an. ....	49
Fig. 46: Kinetiken (Modenverfolgung) der TM <sub>0</sub> -Mode während Proteinimmobilisierung auf einem funktionalisiertem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Wellenleitersensor, bei gleichen Funktionalisierungsparametern .....	51
Fig. 47: Koppelwinkel für beide Grundmoden. Aufnahme vor (blau) und nach Proteinanbindung (schwarz). Im Ausschnitt ist die Verschiebung zu erkennen.....	51
Fig. 48: Modenspektren der Referenzmessungen (schwarz) und nach erfolgreicher Proteinimmobilisierung (blau) auf funktionalisiertem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Sensoren.....	52
Fig. 49: Auswertung einer Proteinschicht auf einem funktionalisiertem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Sensor, mit Hilfe des grafischen Auswerteprogramms „Multiwave“. Dargestellt wird der effektive Brechungsindex jeder Mode, in Abhängigkeit der Schichtdicke des Proteins. ....	54
Fig. 50: Anisotropie-Faktor von drei Proteinanbindungen. Alle Werte sind >1, daraus lässt sich schließen, dass das Protein eine bevorzugte Anbindungsorientierung besitzt.....	55
Fig. 51: Modenverfolgung während Proteinanbindung auf TiOx-Sensor (blau) und Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (schwarz), bei gleichen Funktionalisierungsparametern.....	56
Fig. 52: Kinetik einer Proteinimmobilisierung (schwarz) auf einem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Wellenleitersensor und der dazugehörige Exponentialfit (rot). Die Assoziationskonstante wird der Fit-Gleichung entnommen.....	57
Fig. 53: Lipid-Doppelschicht Formung: Die Lipide ordnen sich um die Proteinschicht herum an und bilden so die Lipid-Doppelschicht.....	59
Fig. 54: Kinetik einer Lipidschicht Formung. Es wurde die TM <sub>0</sub> -Mode (blau) eines Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Sensors, sowie die TE <sub>1</sub> -Mode (rot) eines TiOx-Sensors detektiert.....	60
Fig. 55: Prinzip der Dissipation. Links: Sphärische Objekte verursachen einen hohen Oberflächen-Streuverlust, die Modenintensität sinkt. Rechts: Homogenere Filmstruktur verringert die Streuverluste, die Modenintensität steigt.....	60
Fig. 56: Formung einer Lipid-Doppelschicht. Die Lipid-Vesikel sinken auf die Oberfläche (a) und adsorbieren dort (b). Sind die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Lipid-Vesikel ausreichend groß, reißen die Vesikel auf (c) und bilden die Lipid-Doppelschicht (d). [63]....	61
Fig. 57: Kinetik der Dissipation einer Vesikelfusion zu einem Lipid-Bilayer, auf einer hydrophilen Oberfläche. Die rote Kurve zeigt den Neff der Mode und die blaue Kurve die jeweilige dazugehörige Modenintensität. ....	62
Fig. 58: Änderung des Neff (schwarz) und der Intensität (blau) der zugehörigen TE <sub>1</sub> -Mode während des Lipidschicht Formungsprozesses .....	63
Fig. 59: Komplette Kinetik des gesamten Membranaufbaus auf einem TiOx-Wellenleitersensor. Die TE <sub>1</sub> Mode wurde zur Detektion genutzt .....	63
Fig. 60: Kompletter Aufbau inklusive Dimensionen des Protein gestützten Membransystems .....	64

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Für diese Arbeit verwendete Wellenleitersensoren, mit dazugehörigen Kenndaten. $n_s$ : Brechungsindex des Substrats; $n_{WL}$ : Brechungsindex der wellenleitenden Schicht; $d_{WL}$ : Dicke der wellenleitenden Schicht; $g$ : Gitterkonstante des Koppelgitters .....	35
Tab. 2: Simulationsparameter für effektive Brechungsindex Berechnung eines Tantalpentoxid Wellenleitersensors. Umgebungsmedium: Luft .....	39
Tab. 3: Simulationsparameter für effektive Brechungsindex Berechnung eines Tantalpentoxid Wellenleitersensors mit Protein-Adlayer. Umgebungsmedium: Luft.....	39
Tab. 4: Koppelwinkel und effektiver Brechungsindex der zwei Grundmoden vor und nach Proteinimmobilisierungen auf funktionalisiertem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Sensor .....	53
Tab. 5: Schichtdicke, Brechungsindex, Oberflächenbelegung und Anisotropie-Faktor der Cytochrom c Oxidase Immobilisierung auf funktionalisiertem Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -Wellenleitersensor....	54
Tab. 6: Berechnete Bindungskonstanten der Proteinimmobilisierung auf zwei verschiedenen oxidischen Oberflächen.....	57
Tab. 7: Ermittelte Assoziationskonstanten verschiedener Liganden-Rezeptoren-Anbindungen .....	57

## 9 Literaturverzeichnis

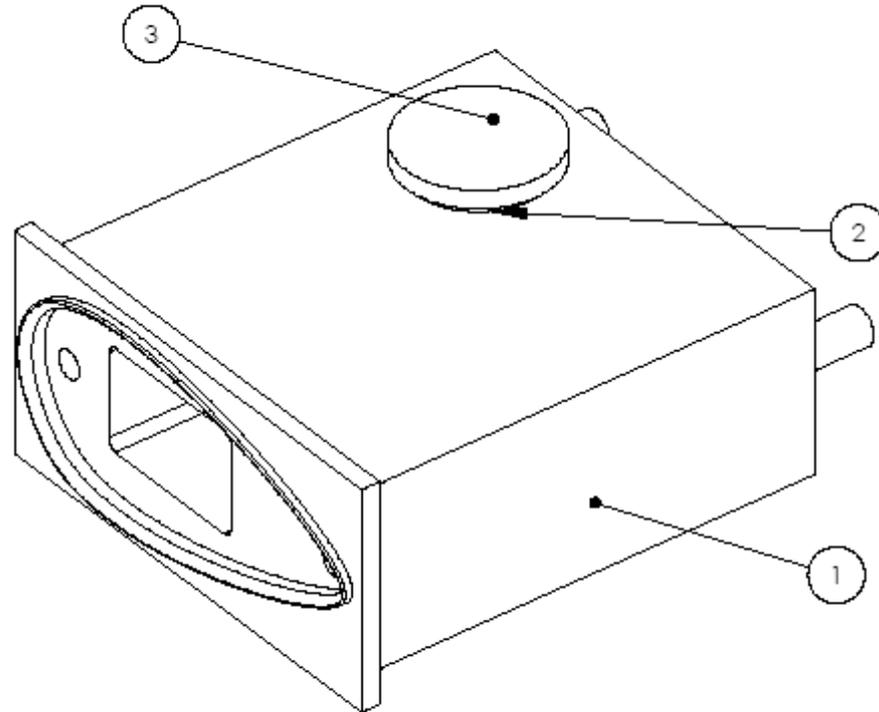
1. Menges, B. and S. Mittler, *Evanescent Waves as Nanoprobes for Surfaces and Interfaces: From Waveguide Technology to Sensor Application*, in *Frontiers in surface nanophotonics*, D. Andrews and Z. Gaburro, Editors. 2007, Springer.
2. Lipowsky, R. and E. Sackmann, *Handbook of biological physics*. Volume 1B: Structure and dynamics of membranes-Generic and specific interactions Elsevier, Amsterdam, 1995.
3. Sackmann, E., *Supported membranes: scientific and practical applications*. Science, 1996. **271**(5245): p. 43.
4. Giess, F., et al., *The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane*. Biophysical Journal, 2004. **87**(5): p. 3213-3220.
5. Wikstrom, M., *Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria*. 1977.
6. Wikström, M. and H. Saari, *The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome c oxidase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1977. **462**(2): p. 347-361.
7. Smeitink, J. and U. Wendel, *Mitochondriopathie*. Pädiatrie: p. 388-398.
8. Salamon, Z., M.I. Brown, and G. Tollin, *Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions within membranes*. Trends in Biochemical Sciences, 1999. **24**(6): p. 213-219.
9. Friedrich, M.G., et al., *Activity of membrane proteins immobilized on surfaces as a function of packing density*. Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(10): p. 3193-3201.
10. Salamon, Z. and G. Tollin, *Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: Coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape*. Biophysical Journal, 2001. **80**(3): p. 1557-1567.
11. Naumann, R.L.C. and W. Knoll, *Protein tethered lipid bilayer: An alternative mimic of the biological membrane (Mini Review)*. Biointerphases, 2008. **3**(2): p. FA101-FA107.
12. Kretschmann, E. and H. Raether, *Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light(Surface plasma waves excitation by light and decay into photons applied to nonradiative modes)*. ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG, TEIL A, 1968. **23**: p. 2135.
13. Ramsden, J.J., *Optical biosensors*. Journal of Molecular Recognition, 1997. **10**(3): p. 109-120.
14. Karlsson, R. and A. Fält, *Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors*. Journal of immunological methods, 1997. **200**(1-2): p. 121-133.
15. Markgren, P., et al., *Determination of Interaction Kinetic Constants for HIV-1 Protease Inhibitors Using Optical Biosensor Technology\* I*. Analytical biochemistry, 2001. **291**(2): p. 207-218.
16. Ramsden, J.J., *Concentration scaling of protein deposition kinetics*. Physical review letters, 1993. **71**(2): p. 295-298.
17. Salamon, Z., et al., *Plasmon-waveguide resonance studies of lateral segregation of lipids and proteins into microdomains (rafts) in solid-supported bilayers*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(12): p. 11175-11184.
18. Zhang, Z., et al., *Surface plasmon resonance studies of protein binding on plasma polymerized di(ethylene glycol) monovinyl ether films*. Langmuir, 2003. **19**(11): p. 4765-4770.

19. Higgins, J. and H. Benoît, *Polymers and neutron scattering*. 1997: Oxford University Press, USA.
20. Vörös, J., et al., *Optical grating coupler biosensors*. *Biomaterials*, 2002. **23**(17): p. 3699-3710.
21. Axelrod, D., *Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology*. *Traffic*, 2001. **2**(11): p. 764-774.
22. Plum, M., et al., *Probing dynamics at interfaces: resonance enhanced dynamic light scattering*. *Opt. Express*, 2009. **17**: p. 10364-10371.
23. Singer, S. and G. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, 1972. **175**(23): p. 720-731.
24. Mueller, P., et al., *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1963. **67**(2): p. 534-535.
25. Bangham, A., M. Standish, and J. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. *Journal of molecular biology*, 1965. **13**(1): p. 238-252.
26. Dimitrov, D. and R. Jain, *Membrane stability*. *BBA-Reviews on Biomembranes*, 1984. **779**(4): p. 437-468.
27. Schiller, S., et al., *Thiolipids for tethered bilayer membranes*. *Papers of the American Chemical Society*, 2003. **225**.
28. Terrettaz, S., M. Mayer, and H. Vogel, *Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins*. *Langmuir*, 2003. **19**(14): p. 5567-5569.
29. Roskamp, R., *Tethered Bilayer Lipid Membranes auf Aluminiumoxid*.
30. Iwata, S., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans**. *Nature*, 1995. **376**(6542): p. 660-669.
31. Felder, C., et al., *A server and database for dipole moments of proteins*. *Nucleic Acids Research*, 2007. **35**(Web Server issue): p. W512.
32. Babcock, G.T. and M. Wikström, *Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration*. 1992.
33. Hochuli, E., et al., *Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent*. *Nature Biotechnology*, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
34. Hochuli, E., H. Döbeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. *Journal of Chromatography A*, 1987. **411**: p. 177-184.
35. Karthe, W. and R. Müller, *Integrierte Optik*. 1991: Geest & Portig.
36. Born, M., E. Wolf, and A. Bhatia, *Principles of optics*. 1964.
37. Pockels, F., *Lehrbuch der Kristallogoptik*. 1906: Leipzig.
38. Schürmann, H. and P. Farwig, *Zur Optik elektrisch und magnetisch anisotroper Medien*. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 1967. **206**(2): p. 189-204.
39. Hecht, E., *Optik*. 2005: Oldenbourg Wissenschaftsverlag.
40. Yeh, P., *Optical waves in layered media*. 1988: Wiley New York.
41. Ulrich, R. and R. Torge, *Measurement of thin film parameters with a prism coupler*. *Applied Optics*, 1973. **12**(12): p. 2901-2908.
42. Hunsperger, R., *Integrated optics: theory and technology*. 2009: Springer.
43. Florin, E., V. Moy, and H. Gaub, *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. *Science*, 1994. **264**(5157): p. 415.
44. Adamson, A. and A. Gast, *Physical chemistry of surfaces*. 1990: Wiley New York.
45. Brookst, I., *Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods*. *Analytical biochemistry*, 1993. **212**: p. 457-468.

46. Morton, T., D. Myszka, and I. Chaiken, *Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration*. Analytical biochemistry, 1995. **227**(1): p. 176-185.
47. Myszka, D., et al., *Kinetic analysis of ligand binding to interleukin-2 receptor complexes created on an optical biosensor surface*. Protein Science: A Publication of the Protein Society, 1996. **5**(12): p. 2468.
48. Tiefenthaler, K. and W. Lukosz, *SENSITIVITY OF GRATING COUPLERS AS INTEGRATED-OPTICAL CHEMICAL SENSORS*. Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics, 1989. **6**(2): p. 209-220.
49. Cremer, P. and S. Boxer, *Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(13): p. 2554-2559.
50. Hofer, R., *Surface modification for optical biosensor applications*. 2000, SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH.
51. Petit, V. and M. Edidin, *Lateral phase separation of lipids in plasma membranes: effect of temperature on the mobility of membrane antigens*. Science, 1974. **184**(4142): p. 1183.
52. Buchner, J. and T. Kiefhaber, *Protein folding handbook*. 2005: Wiley-VCH.
53. Langmuir, I., *Surface Chemistry*. Chemical Reviews, 1933. **13**(2): p. 147-191.
54. Hlady, V. and J. Buijs, *Protein adsorption on solid surfaces*. Current Opinion in Biotechnology, 1996. **7**(1): p. 72-77.
55. Vörös, J., *The density and refractive index of adsorbing protein layers*. Biophysical Journal, 2004. **87**(1): p. 553-561.
56. Horvath, R. and J.J. Ramsden, *Quasi-isotropic analysis of anisotropic thin films on optical waveguides*. Langmuir, 2007. **23**(18): p. 9330-9334.
57. Myszka, D., et al., *Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor*. Biophysical chemistry, 1997. **64**(1-3): p. 127-137.
58. Plum, M. and F. Physik, *Orientierungsspezifische Studie der Cytochrom-c-Oxidase in einer biomimetischen Architektur auf Metalloberflächen*.
59. Rigaud, J., et al., *Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins*. Journal of structural biology, 1997. **118**(3): p. 226-235.
60. Höök, F., et al., *A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. **24**(2): p. 155-170.
61. Reviakine, I. and A. Brisson, *Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy*. Langmuir, 2000. **16**(4): p. 1806-1815.
62. Läger, P., *Künstliche Lipidfilme als Modelle biologischer Membranen*. Naturwissenschaften, 1970. **57**(10): p. 474-480.
63. Horn, N. and M. Kreiter, *Plasmon Spectroscopy: Methods, Pitfalls and How to Avoid Them*. Plasmonics: p. 1-15.

## **10 Anhang**

### **Konstruktionszeichnungen der Flusszelle**



**PROPRIETARY AND CONFIDENTIAL**  
 THE INFORMATION CONTAINED IN THIS DRAWING IS THE SOLE PROPERTY OF <INSERT COMPANY NAME HERE>. ANY REPRODUCTION IN PART OR AS A WHOLE WITHOUT THE WRITTEN PERMISSION OF <INSERT COMPANY NAME HERE> IS PROHIBITED.

		UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:		NAME	DATE	
		DIMENSIONS ARE IN INCHES				TITLE:
		TOLERANCES:	DRAWN			
		FRACTIONAL: ±	CHECKED			
		ANGULAR: MACH ± BEND ±	ENG APPR.			
		TWO PLACE DECIMAL ±	MFG APPR.			
		THREE PLACE DECIMAL ±	G.A.			
		INTERPRET GEOMETRIC TOLERANCING PER:	COMMENTS:			
		MATERIAL:				SIZE DWG. NO. REV
		FINISH:				<b>A</b> Zelle komplett
NEXT ASSY	USED ON					
APPLICATION		DO NOT SCALE DRAWING				SCALE: 2:1 WEIGHT: SHEET 1 OF 1

5

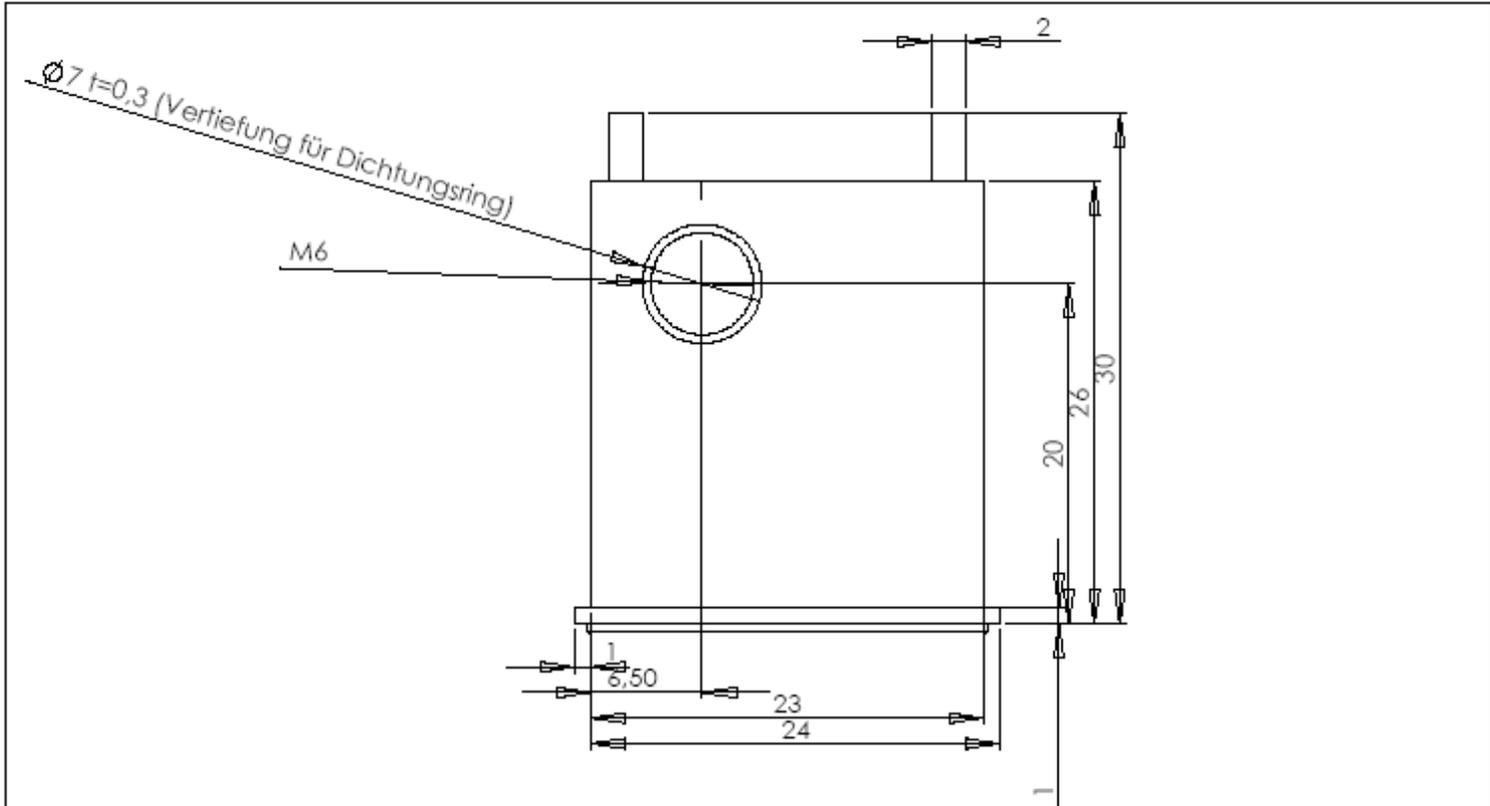
4

3

2

1





**PROPRIETARY AND CONFIDENTIAL**  
 THE INFORMATION CONTAINED IN THIS DRAWING IS THE SOLE PROPERTY OF <INSERT COMPANY NAME HERE>. ANY REPRODUCTION IN PART OR AS A WHOLE WITHOUT THE WRITTEN PERMISSION OF <INSERT COMPANY NAME HERE> IS PROHIBITED.

		UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:		NAME	DATE			
		DIMENSIONS ARE IN INCHES				TITLE:		
		TOLERANCES:	DRAWN					
		FRACTIONAL ±	CHECKED					
		ANGULAR: MATCH ± BEND ±	ENG APPR.					
		TWO PLACE DECIMAL ±	MFG APPR.					
		THREE PLACE DECIMAL ±						
		INTERPRET GEOMETRIC TOLERANCING PER:						
		MATERIAL	COMMENTS:			SIZE	DWG. NO.	REV
		FINISH				<b>A</b>	Zelle oben	
NEXT ASSY	USED ON					SCALE: 2:1	WEIGHT:	SHEET 1 OF 1
APPLICATION		DO NOT SCALE DRAWING						

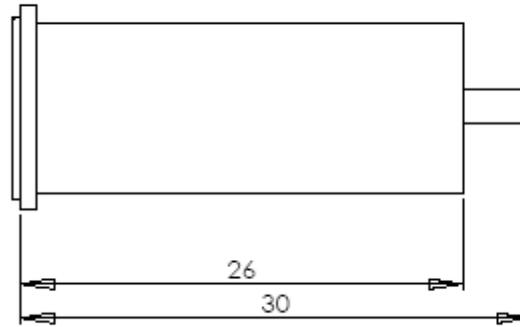
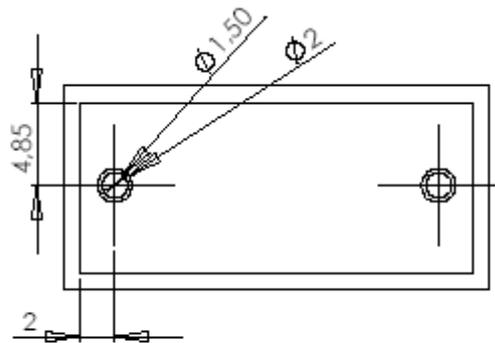
5

4

3

2

1



**PROPRIETARY AND CONFIDENTIAL**  
 THE INFORMATION CONTAINED IN THIS DRAWING IS THE SOLE PROPERTY OF <INSERT COMPANY NAME HERE>. ANY REPRODUCTION IN PART OR AS A WHOLE WITHOUT THE WRITTEN PERMISSION OF <INSERT COMPANY NAME HERE> IS PROHIBITED.

		UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:		NAME	DATE	
		DIMENSIONS ARE IN INCHES				TITLE:
		TOLERANCES:	DRAWN			
		FRACTIONAL ±	CHECKED			
		ANGULAR: MACH ± BEND ±	ENG APPR.			
		TWO PLACE DECIMAL ±	MFG APPR.			
		THREE PLACE DECIMAL ±				
		INTERPRET GEOMETRIC TOLERANCING PER:				
		MATERIAL	COMMENTS:			
		FINISH				SIZE DWG. NO. REV
NEXT ASSY	USED ON					<b>A</b> zelle Seite/hinten
APPLICATION		DO NOT SCALE DRAWING				SCALE: 2:1 WEIGHT: SHEET 1 OF 1

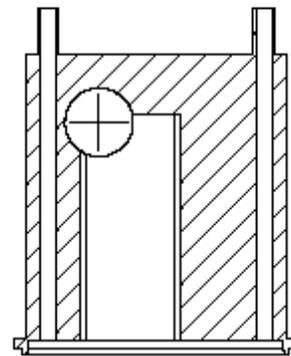
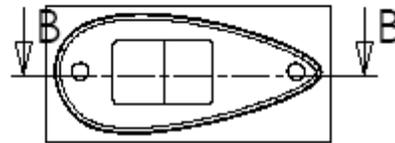
5

4

3

2

1



SCHNITTDARSTELLUNG B-B

**PROPRIETARY AND CONFIDENTIAL**  
 THE INFORMATION CONTAINED IN THIS DRAWING IS THE SOLE PROPERTY OF <INSERT COMPANY NAME HERE>. ANY REPRODUCTION IN PART OR AS A WHOLE WITHOUT THE WRITTEN PERMISSION OF <INSERT COMPANY NAME HERE> IS PROHIBITED.

		UNLESS OTHERWISE SPECIFIED:		NAME	DATE	
		DIMENSIONS ARE IN INCHES				TITLE:
		TOLERANCES:	DRAWN			
		FRACTIONAL ±	CHECKED			
		ANGULAR: MACH ± BEND ±	ENG APPR.			
		TWO PLACE DECIMAL ±	MFG APPR.			
		THREE PLACE DECIMAL ±				
		INTERPRET GEOMETRIC TOLERANCING PER:				
		MATERIAL	COMMENTS:			
		FINISH				SIZE DWG. NO. REV
	NEXT ASSY	USED ON				<b>A</b> Zelle Schnitt
	APPLICATION					SCALE: 2:1 WEIGHT: SHEET 1 OF 1
		DO NOT SCALE DRAWING				

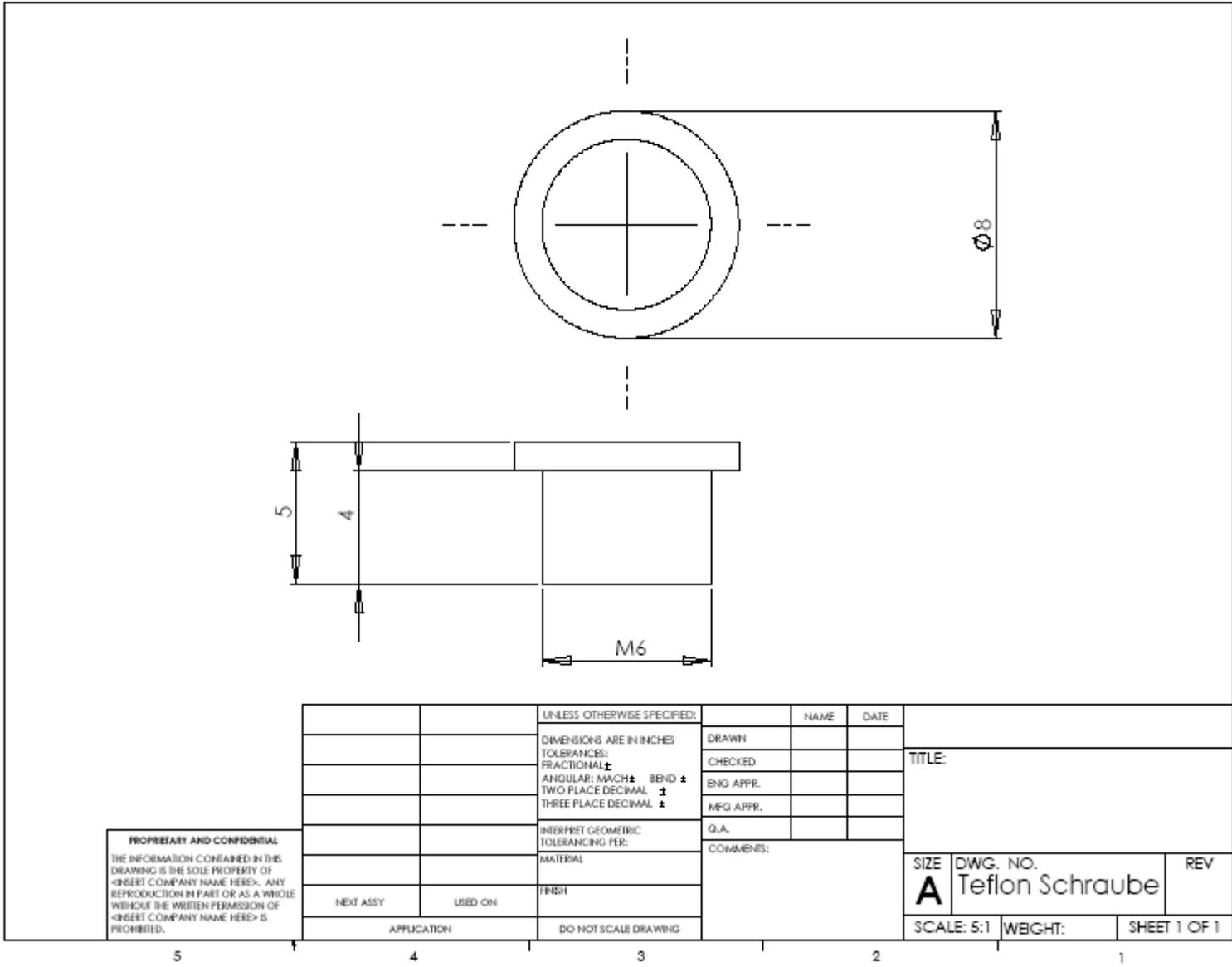
5

4

3

2

1



## Fehlerrechnung

In diesem Abschnitt wird die Fehlerbetrachtung durchgeführt, um den Fehler, des bestimmten effektiven Brechungsindex, des Messaufbaus zu ermitteln.

Der effektive Brechungsindex wurde mit (Gl. 45) berechnet:

$$N_{eff} = \sin(\theta) + m \frac{\lambda_e}{g} \quad (\text{Gl. 45})$$

Der Koppelwinkel  $\theta$ , die Gitterkonstante  $g$ , und die Laserwellenlänge  $\lambda_e$  wurden als die fehlerbehafteten Größen angenommen. Da der Fehler der Laserwellenlänge im Vergleich zu den anderen Fehlergrößen gering ist, wurde dieser vernachlässigt. Die Beugungsordnung  $m$  ist, für den Fall der Tantalpentoxid-Wellenleitersensoren, 2. Der absolute Fehler ergibt sich aus (Gl. 57):

$$\Delta N_{eff} = \sqrt{\left(\frac{\partial N_{eff}}{\partial \theta}\right)^2 * \Delta \theta^2 + \left(\frac{\partial N_{eff}}{\partial g}\right)^2 * \Delta g^2} \quad (\text{Gl. 57})$$

Setzen wir (Gl. 45) in (Gl. 57) ein, erhalten wir:

$$\Delta N_{eff} = \sqrt{(\cos(\theta) * \Delta \theta)^2 + \left(-\frac{2 * \lambda_e * \Delta g}{g^2}\right)^2} \quad (\text{Gl. 58})$$

In (Gl. 58) werden folgende Werte eingesetzt um den absoluten Fehler zu erhalten:

$\Delta \theta = \pm 0,001^\circ$  (Aus Datenblatt des Huber-Goniometers)

$\Delta g = \pm 1 \text{ nm}$

$\theta_{TM} / \theta_{TE} = 4,152^\circ / 13,748^\circ$  (

Tab. 4)

$\lambda_e = 633 \text{ nm}$

$g = 745 \text{ nm}$

$$\Rightarrow \Delta N_{eff_{TM}} = 0,0023$$

$$\Rightarrow \Delta N_{eff_{TE}} = 0,0023$$

Der relative Fehler ergibt sich aus (Gl. 59):

$$\frac{\Delta N_{eff}}{N_{eff}} \quad (\text{Gl. 59})$$

Für  $N_{eff}$  der TM- und der TE-Mode setzen wir ein und erhalten als relativen Fehler:

$N_{eff_{TM}} = 1,773253$ ;  $N_{eff_{TE}} = 1,937173$  (

Tab. 4)

$$\Rightarrow \frac{\Delta N_{eff_{TM}}}{N_{eff_{TM}}} = 0,001 = 0,1\%$$

$$\Rightarrow \frac{\Delta N_{eff_{TE}}}{N_{eff_{TE}}} = 0,001 = 0,1\%$$

Hierbei handelt es sich um den Fehler des Messaufbaus. Da bei der Auswertung die Gitterkonstante jedoch als systematischer Fehler kontinuierlich weiterverfolgt wird, kann diese in der Fehlerbetrachtung vernachlässigt werden und als einziger Fehler die Goniometersteuerung angenommen werden. Dadurch vereinfacht sich (Gl. 58) zu:

$$\Delta N_{eff} = \sqrt{(\cos(\theta) * \Delta\theta)^2} \quad (\text{Gl. 60})$$

Setzen wir die oben genannten Werte ein, so erhalten wir für den absoluten und den relativen Fehler:

$$\Delta N_{eff} = 1,7 * 10^{-5}$$

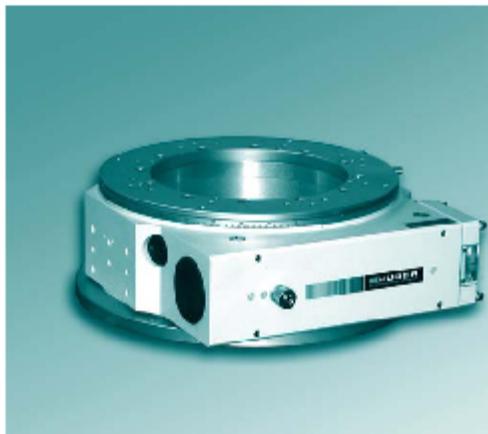
$$\frac{\Delta N_{eff}}{N_{eff}} = 9,8 * 10^{-6} = 9,8 * 10^{-4}\%$$

Eine Unterscheidung von TM- und TE-Mode wurde hier nicht mehr durchgeführt, da die Abweichungen nicht signifikant sind.

Setzt man die ermittelten Fehler in das Auswerteprogramm Multiwave ein, so erhält man als Fehler für den Brechungsindex  $n$  und Schichtdicke  $d$  der zu berechnenden Schicht:

$$\underline{\Delta n = +10^{-4}}$$

$$\underline{\Delta d = +0,1nm}$$



## Modular individuell konfigurierbar

- vom Einstiegsmodell bis hin zum High-End-System
- zu mehrachsigen Systemen
- mit frei wählbarer Durchgangsöffnung
- mit individuellem Bohrmuster

## Applikationsspezifische Ausführungen:

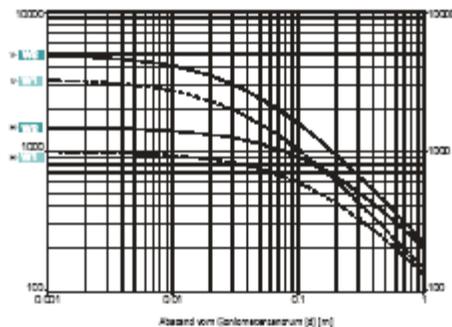
- vakuumtauglich
- antimagnetisch
- strahlungsbeständig
- schwarze Optik

## Vier Präzisionsklassen zur Wahl:

**X1** **X2** **X3** **XE**

## Zwei Belastungsklassen zur Wahl:

**W1** **W2**



Goniometer-Achse vertikal (W1, W2)  
 Goniometer-Achse horizontal (W1, W2)

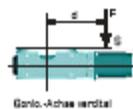
## Max. Belastung

**W1** **W2**

3300 N 5000 N

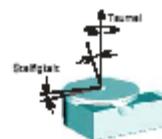
**W1** **W2**

1000 N 1500 N



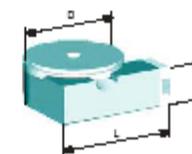
## Spezifikation

Verfahrbereich [°]:	360
Material (Gehäuse/Schneckenrad):	Aluminium/Bronze
Übersetzung:	360:1
Auflösung [°]:	0,001 (Goniometer, 1000 Bohr./U.) 0,00005 minimum
M <sub>min</sub> (min) [Nm]:	1,0
M <sub>max</sub> (max) [Nm]:	40
Steifigkeit [µrad/Nm]:	0,2
Gewicht [kg]:	33
Flanschgröße [mm]:	82
Durchgangsöffnung [mm]:	190 (Standard)



	<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>X3</b>	<b>XE</b>
Genauigkeit [°]:	40	25	12	0,1...
WDH (unidir.) [°]:	4	2	2	0,1...
Umkehrfehler [°]:	8	4	3	0,1...
Exzentrizität [µm]:	5	3	2	2
Taumelfehler [°]:	8	3	3	3

## Dimension [mm]



D:	L:	H:
290	294	105

## Zubehör

Motor:	2-/3-/5-Ph. Servo/DC
Handrad:	0083
Getriebe:	2083.05 2083.10 2083.20
Endschalter:	inklusive
Nullpunktkontrolle:	9100
Encoder <b>XE</b> :	inkremental, absolut
Steuerung:	9300

## Mengen/Inhaltsangaben der verwendeten Lösungen

### **Vorbereiten der ANTA-Lösung:**

- 1ml H<sub>2</sub>O (10ml)
- 44mg ANTA (667mg)
- 66,7mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1000mg)

Die Mischung wird mit HCL auf pH=9,8 titriert-

### **Vorbereiten der Nickel-Lösung:**

- 500ml H<sub>2</sub>O
- 1,5ml Essigsäure
- 4,75g NiCL<sub>2</sub>

Die Lösung wird mit KOH auf pH=5, titriert.

### **Vorbereiten des PBS-Puffers:**

- 8,7g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 7,46g KCL
- mit 1000ml H<sub>2</sub>O auffüllen

Lösung wird mit HCL auf pH=8 titriert. Lösung im Kühlschrank aufbewahren!

### **Vorbereiten der DDM-Lösung [0,1 gewichtsprozentig]:**

- 250mg DDM
- 250ml PBS-Puffer

Rühren bis alles DDM gelöst ist und gekühlt lagern!

### **Vorbereiten der Lipid-Stammlösung:**

Gefäß muss vorher 3x mit Ethanol ausgespült werden.

- 2mg DiphyPC
- 1ml PBS-Puffer

Über Nacht in Ultraschallbad lösen und einfrieren!

### **Vorbereiten der Lipidlösung:**

- 0,5ml Lipid-Stammlösung
- 100ml DDM-Lösung [0,1 gewichtsprozentig]

In Ultraschallbad lösen.

### **Reinigung der Biobeads:**

Ein Greiner-Röhrchen wird mit Ethanol ausgespült und mit Biobeads gefüllt. Mit Ethanol auffüllen und Sedimentation abwarten. Anschließend 15 Minuten in Ultraschallbad und das Ethanol abschütten. Diesen Vorgang 3x wiederholen. Anschließend dieselbe Prozedur 2x mit Wasser und 1x mal mit PBS.

Abschließend die Biobeads in PBS-Puffer im Kühlschrank lagern.

## 11 Danksagungen

Ich danke all denen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Hr. Bernhard Menges für die gute und freundliche Unterstützung und Projektbetreuung seitens des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung. Sowie für die Hilfe beim Lösen der auftretenden Probleme während der Diplomarbeit.

Der Dank geht an Fr. Naumann für die Hilfe bei biologischen und chemischen Problemen, sowie der Korrekturhilfe.

Ich danke Asmoron Kibrom für die Einführung in das System der Cytochrom c Oxidase und die Hilfe bei der Oberflächenchemie. Außerdem danke ich Mark Großbrüschekamp und Denise Schach für ihre Beratung und Hinweise zum Umgang mit der Cytochrome c Oxidase.

Mein Dank geht auch an Markus Plum und Natalie Horn für die hilfreichen aufschlussreichen und aufmunternden Gespräche im Büro, sowie der Mittagsessensgruppe Andreas Unger, Alexander Lotz, Max Port und Jennifer Kroth.

Für die schnelle und professionelle Fertigung der mechanischen Komponenten danke ich Achim Gerstenberg und der gesamten Belegschaft der Feinmechanischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung.

Ebenso geht mein Dank an Hr. Dirk Richter und den Rest der Elektroniklabor Belegschaft für die schnelle Hilfe bei Problemen mit Detektoren.

Für die Anfertigung der AFM Bilder danke ich Helma Burg.

Ansonsten geht mein Dank an die gesamte Knoll Gruppe des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung, für die freundliche und hilfsbereite Aufnahme und das angenehme internationale Arbeitsklima.