# Destruktive und konstruktive laserbasierte Verfahren zur lokalen Biofunktionalisierung organischer Monoschichten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

### Anja Schröter

geboren am 21. Mai 1984 in Essen

Fakultät für Chemie Universität Duisburg-Essen August 2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2009 bis Juli 2013 in der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von PD Dr. Nils Hartmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckart Hasselbrink angefertigt.

Tag der Disputation: 31. Oktober 2013

Gutachter: PD Dr. Nils Hartmann Prof. Dr. Eckart Hasselbrink Vorsitzender: Prof. Dr. Oliver J. Schmitz

# Inhaltsverzeichnis

1 Ein	NLEITUNG	1
2 Gr	RUNDLAGEN	5
2.1	SAMs	5
	2.1.1 Thiol-SAMs auf Gold	6
	2.1.2 Silan-SAMs auf Siliciumoxid/Silicium	8
	2.1.3 Funktionalisierte SAMs	9
2.2	Strukturierung von SAMs	12
	2.2.1 Etablierte Verfahren	13
	2.2.2 Photothermische Laserstrukturierung	14
2.3	Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen	19
	2.3.1 Backfilling	19
	2.3.2 Chemische Lithographie	21
	2.3.3 Pfropfen von Polymeren	22
	2.3.4 Strukturen aus Nanopartikeln	24
2.4	Biofunktionalisierung	24
	2.4.1 Adsorption von Proteinen	25
	2.4.2 Immobilisierung von DNA	29
3 Exp	PERIMENTELLES	33
3.1	Nasschemie zur Probenvor- und nachbereitung	33
	3.1.1 Verwendete Chemikalien und Substrate	33
	3.1.2 Vorbehandlung der Siliciumsubstrate	35
	3.1.3 Vorbehandlung der Goldsubstrate	36
	3.1.4 Herstellung organischer Monoschichten	36
	3.1.5 Funktionalisierung von ODS-Monoschichten	38
	3.1.6 Nasschemisches Ätzen von Gold	40
	3.1.7 Immobilisierung von DNA	40
	3.1.8 Adsorption von Proteinen	43

3.2	2 Laserstrukturierung	43
	3.2.1 Der Laseraufbau	44
	3.2.2 Strukturierungsexperimente	46
3.3	3 Charakterisierung	49
	3.3.1 Rasterkraftmikroskopie	49
	3.3.2 Lichtmikroskopie	50
	3.3.3 Rasterelektronenmikroskopie	52
	3.3.4 Sonstige Verfahren	53
4 Er	RGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1	1 Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs zur Herstellung von Protein-M	Aicroarrays 55
	4.1.1 Herstellung und Charakterisierung PEG-terminierter SAMs auf S	iO <sub>2</sub> /Si 56
	4.1.2 Selektive Adsorption von Proteinen auf strukturierten PEG-Silan	-SAMs 59
4.2	2 Lokale Immobilisierung von DNA auf strukturierten SAMs	73
	4.2.1 Herstellung DNA-funktionalisierter Thiol-SAMs auf Au/Glas	74
	4.2.2 Anbindung von ssDNA an SAMs auf SiO <sub>2</sub> /Si	88
4.3	3 Laserinduzierte Anbindung von Polymeren an azidterminierte SAMs	92
	4.3.1 Laserinduzierte Anbindung von Polystyrol	95
	4.3.2 Laserinduzierte Anbindung von PNIPAAm	101
	4.3.3 Laserinduzierte Anbindung von P(MMA-co-FCA)	105
	4.3.4 Laserinduzierte Anbindung von Polyethylenglycol	106
4.4	4 Laserinduzierte Herstellung von Goldnanopartikelstrukturen	111
5 Zı	USAMMENFASSUNG	119
6 A	NHANG	123
6.1	1 Abbildungen	123
6.2	2 Bestimmung der Beugungsmaßzahl des Laserstrahls nach ISO 11146	127
6.3	3 Verwendete Abkürzungen	130
6.4	4 Verwendete Symbole	132
6.5	5 Veröffentlichungen	134
7 Lr	TERATURVERZEICHNIS	135

### **1 E**INLEITUNG

Als Biochip oder Bio-Array wird eine systematische Anordnung von biomolekularen Sonden auf einer planaren Oberfläche aus Glas, Metall oder Kunststoffen bezeichnet [1, 2]. Durch charakteristische molekulare Interaktionen, wie die sequenzspezifische Hybridisierung von Nukleinsäuren oder die spezifische Bindung von Proteinen, können bestimmte Biomoleküle erkannt und nachgewiesen werden. Auf einem Chip befinden sich dabei hunderte oder sogar tausende verschiedene Detektorsonden. Durch diese hochgradige Parallelisierung ist eine simultane Analyse einer großen Anzahl von Biomolekülen oder biologisch relevanten Molekülen in einem Experiment möglich. Biochips werden in der biomedizinischen und biotechnologischen Forschung und der Diagnostik eingesetzt. DNA-Chips ermöglichen die Expressions- oder Sequenzanalyse von Nukleinsäuren, wodurch die Funktion oder auch Mutation von Genen untersucht und aufgeklärt werden kann [1, 3-5]. Proteinchips erlauben die parallele Detektion und Untersuchung von Proteinen und anderen biologisch relevanten Molekülen. Sie sind interessant für die klinische Diagnostik, etwa durch Identifizierung von Biomarkern, und für die Wirkstoffentwicklung [6-9].

Verfahren zur Herstellung derartiger Arrays erfordern eine Kombination aus Strukturierung und Biofunktionalisierung der Oberfläche. Sehr häufig werden Druckverfahren eingesetzt, mit denen Proteine oder Oligonukleotide auf dem Träger angeordnet werden [1, 10, 11]. Die Durchmesser der gedruckten Spots liegen im Bereich von 75-500 µm [10]. Ziele bei der Weiterentwicklung von Biochips sind die Miniaturisierung der Systeme und die Reduktion von Herstellungskosten. Eine Miniaturisierung von Bio-Arrays erlaubt eine schnellere und genauere Analyse. Weitere Vorteile sind, dass bei der Herstellung des Chips weniger Material verwendet wird und es bei der Analyse einer geringeren Menge der zu untersuchenden Probe bedarf. Zur Immobilisierung der Biomoleküle auf der Oberfläche müssen Methoden verwendet werden, bei denen die biologische Funktion der Moleküle nicht beeinträchtigt wird. Vor allem die Bindung von Proteinen an die Oberfläche, unter Erhalt ihrer nativen Konformation, ist eine große Herausforderung [12].

Laserverfahren eignen sich hervorragend zur kostengünstigen Miniaturisierung biofunktionalisierter Template. Bei diesen werden fokussierte Laserstrahlen eingesetzt, um Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich auf der Oberfläche zu erzeugen [13]. Laserstrukturierungsverfahren überzeugen durch einen geringen experimentellen Aufwand, die Strukturierung kann unter ambienten Bedingungen durchgeführt werden, und durch kurze Bearbeitungszeiten, wodurch auch große Flächen schnell strukturiert werden können. Die Fokussierung des Laserstrahls ist ultimativ beugungslimitiert und auf die Größenordnung der Wellenlänge des Lichts beschränkt. Daher besteht der Trend, Strahlungsquellen mit immer kürzeren Wellenlängen zu verwenden, um kleinere Strukturdurchmesser zu erreichen. Alternativ besteht die Möglichkeit nichtlineare Effekte auszunutzen, um die laterale Strukturauflösung zu erhöhen. Basiert die Strukturerzeugung nicht auf einem photochemischen, sondern auf einem photothermischen Prozess, können, aufgrund der nichtlinearen Abhängigkeit der Kinetik von der Temperatur, Strukturen erzeugt werden, die deutlich kleiner sind als der zur Strukturierung verwendete Laserspot [14-17]. Beispielsweise konnten mit einem 1/e<sup>2</sup>-Laserspotdurchmesser von 2.8 µm Strukturen mit Durchmessern von etwa 250 nm geschrieben werden [15].

Als Ausgangspunkt für die Herstellung strukturierter und funktionalisierter Oberflächen bieten sich selbstorganisierte Monoschichten (*Self-Assembled Monolayers*, SAMs) an [18-20]. Diese hochgeordneten Schichten bilden sich aus amphiphilen organischen Molekülen spontan durch Selbstorganisation auf einer Festkörperoberfläche. Die Bildung von SAMs kann bei verschiedenen Adsorbat/Substrat-Systemen beobachtet werden. Thiolbasierte SAMs eignen sich zur Funktionalisierung von Münzmetallen [21, 22]; oxidische Substrate, wie oxidierte Siliciumsubstrate oder Glas, lassen sich durch silanbasierte SAMs modifizieren [18, 23]. Durch die Wahl geeigneter Precursormoleküle oder eine nachträgliche nass-chemische Funktionalisierung, ermöglichen SAMs eine gezielte Einstellung der chemischen Affinität des Substrats. Zusammen mit einer lateralen Strukturierung bietet sich die Möglichkeit, die Eigenschaften der Oberfläche lokal maßgeschneidert zu verändern, weswegen SAMs vielseitig für den Aufbau komplexer Oberflächenstrukturen verwendet werden können [12, 18, 20, 24].

In dieser Arbeit wurde die serielle Laserstrukturierung als flexibles Werkzeug zur Strukturierung von SAMs eingesetzt mit dem Ziel, Verfahren zur Biofunktionalisierung in den Nanometerbereich zu übertragen. SAMs wurden hierzu mit Licht der Wellenlänge von 532 nm strukturiert. Die Strukturerzeugung erfolgte sowohl destruktiv, durch Abtrag des SAMs, als auch konstruktiv, durch Modifikation des SAMs. Anschließend wurden Routinen zur Immobilisierung von Proteinen und Oligonukleotiden auf den strukturierten Oberflächen angewendet und so das Potential laserstrukturierter SAMs in der Anwendung als biochemische Template demonstriert.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Herstellung von Templaten zur selektiven Adsorption von Proteinen durch photothermische Strukturierung von Polyethylenglycol-terminierten (PEG-terminierten), silanbasierten Monoschichten auf oxidierten Siliciumsubstraten. Hierzu wurden zunächst Verfahren entwickelt, um SAMs aus PEG-terminierten Alkylsilanen herzustellen. Derartige SAMs sind in der Lage die unspezifische Adsorption von Proteinen zu verhindern [25, 26]. Durch einen lokalen Abtrag des SAMs können Muster auf die Oberfläche geschrieben werden, die eine selektive Adsorption von Proteinen ermöglichen. Bei der gängigen Herstellung von Protein-Arrays mit Druckverfahren, muss die unspezifische Adsorption von Proteinen in der Umgebung nachträglich durch eine Adsorption von Blockierungsmitteln unterbunden werden [12]. Diese Notwendigkeit besteht bei der Strukturierung einer bereits proteinresistenten Oberfläche nicht. Nachträglich adsorbierte Blockierungsmitteln wirken nur über einen sehr begrenzten Zeitraum [27], daher ist eine strukturierte Oberfläche, an die PEG kovalent gebunden ist, der Blocking-Methode deutlich überlegen. Die Verhinderung der unspezifischen Proteinadsorption ist essentiell für die Leistungsfähigkeit eines Protein-Arrays, da die Detektion sonst durch ein hohes Hintergrundsignal und ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis erschwert wird [12].

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden verschiedene Strategien erkundet, um strukturierte SAMs zur lokalen Anbindung von Oligonukleotiden zu nutzen. Hierbei kamen sowohl Thiol-SAMs auf goldbeschichteten Glassubstraten zum Einsatz als auch Alkylsiloxan-SAMs auf oxidierten Siliciumsubstraten. Erstere wurden photothermisch mit dem Laser abgetragen und durch eine nachträgliche, zweite Funktionalisierung der bearbeiteten Bereiche mit DNA modifiziert. Alkylsiloxan-SAMs wurden mit dem von Klingebiel et al. entwickelten Verfahren [28] lokal bromiert und anschließend zur kovalenten Anbindung von DNA verwendet.

Als äußerst flexible und vielseitig einsetzbare Methode zum Aufbau funktionaler Strukturen wurde ein Verfahren zur lokalen Immobilisierung von dünnen Polymerfilmen entwickelt. Durch Einsatz eines azidterminierten SAM als thermisch aktivierbare, reaktive Zwischenschicht, konnte in den bestrahlten Bereichen ein beliebiges Polymer kovalent an ein Siliciumsubstrat angebunden werden. Polymere mit diversen Funktionen, zum Beispiel Schaltvermögen oder Bioaffinität, konnten so zum Aufbau biotechnologisch interessanter Strukturen verwendet werden.

Schließlich wird ein Verfahren beschrieben, das es ermöglicht, in einem Prozessschritt Goldnanopartikel herzustellen und auf einer Oberfläche gezielt abzuscheiden. Hierdurch wird die sonst häufig eingesetzte Strategie, einen SAM zunächst zu strukturieren und funktionalisieren, um anschließend Goldnanopartikel zu adsorbieren, entscheidend vereinfacht. Goldnanopartikel lassen sich nachträglich durch Ligandenaustausch mit den gewünschten Oberflächeneigenschaften funktionalisieren [29]. Damit stellen die mittels Laserstrukturierung hergestellten Nanopartikelstrukturen Template für eine anschließende Biofunktionalisierung dar. Da Nanopartikel ein große Oberfläche aufweisen, versprechen diese Strukturen eine hohe Signalintensität und damit Empfindlichkeit bei einem Einsatz in Sensoranwendungen.

In dieser Arbeit konnte damit erstmals gezeigt werden, dass die Herstellung lokal biofunktionalisierter Oberflächen mit Strukturdurchmessern im Nanometerbereich mit photothermischen Laserverfahren möglich ist. Diese überzeugen durch eine schnelle und kostengünstige Strukturierung mit geringem experimentellen Aufwand und stellen so einen sehr vielversprechenden Ansatz zur Miniaturisierung biotechnologischer Arrays dar.

## **2** Grundlagen

#### 2.1 SAMs

Selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) sind hochgeordnete, zweidimensionale Strukturen, die sich durch Selbstorganisation von meist langkettigen, amphiphilen organischen Molekülen auf verschiedenen Substratoberflächen bilden. Zur Herstellung von SAMs können simple experimentelle Verfahren genutzt werden. Üblicherweise erfolgt die Beschichtung aus einer Lösung oder aus der Gasphase [30], in manchen Fällen auch mit der reinen Substanz [31, 32]. SAMs eignen sich nicht nur zur Funktionalisierung flacher Oberflächen, auch anders geformte, gekrümmte Substrate, wie etwa Nanopartikel, können beschichtet und so in ihren Oberflächeneigenschaften modifiziert werden [21, 33].

Wie in Abbildung 2.1 skizziert, bestehen SAMs im Wesentlichen aus drei funktionellen Einheiten [23, 30]. Die Kopfgruppe weist eine Affinität zum Substrat auf und bindet durch Chemisorption an dieses an. Das Molekülgerüst trägt zur Ordnung und Stabilität der Schicht bei. Hierbei spielen vor allem intermolekulare Wechselwirkungen, beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte zwischen Alkylketten eine Rolle. IR-Untersuchungen verschiedener SAMs aus Precursoren mit bis zu 18 C-Atomen zeigten, dass Stabilität und Packungsdichte der Schicht tendenziell mit der Kettenlänge des Adsorbatmoleküls zunehmen [22, 34]. Maßgebliche Eigenschaften der Oberfläche werden durch die Endgruppe der Moleküle bestimmt.

Obwohl SAMs nur sehr dünn sind, etwa 1-3 nm, eignen sie sich sehr gut, um die Oberflächeneigenschaften eines Substrats gezielt zu verändern. Beispielsweise können sie zum Schutz vor Korrosion [35], zur Veränderung der Haftreibung [36] oder zum Einstellen



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines SAMs.

des Benetzungsverhaltens [37] einer Oberfläche verwendet werden. Auch das chemische Reaktionsverhalten und die Bioaffinität [38, 39] der Oberfläche lassen sich durch die Wahl der Endgruppe steuern.

Verschiedene Verfahren erlauben eine laterale Strukturierung von SAMs, wodurch sich diverse Anwendungsmöglichkeiten in der Nano- und Mikrofabrikation bieten [40]. Ein wichtiges Beispiel ist ihr Einsatz als Ätzmasken [41, 42]. Durch selektives nasschemisches Ätzen lassen sich in einen SAM geschriebene Strukturen in das darunterliegende Substrat übertragen. Eine Kombination von Strukturierung und Funktionalisierung ermöglicht den Aufbau komplexer Oberflächenstrukturen. Hierdurch sind SAMs für diverse Anwendungen attraktiv, wie etwa für die Mikrofluidik [43] oder die Herstellung von Bio-Arrays [44, 45].

Charakterisierung von dünnen organischen Schichten Zur stehen eine Reihe unterschiedlicher Techniken zur Auswahl, durch die jeweils spezifische Teilinformationen über die Schicht gewonnen werden können. Daher wird zur Charakterisierung von SAMs stets eine Kombination mehrerer Verfahren eingesetzt [46, 47]. Die chemische Zusammensetzung kann bspw. durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS), Augerelektronenspektroskopie (AES) oder Sekundärionenmassenspektroskopie (SIMS) bestimmt werden. Die IR-Spektroskopie liefert Informationen über die Molekülpackung und -orientierung sowie über im SAM vorhandene funktionelle Gruppen. Kontaktwinkelmessungen geben Aufschluss über das Benetzungsverhalten und die Oberflächenrauheit. Die Bestimmung der Schichtdicke ist mittels Ellipsometrie möglich. Rastersondentechniken, wie die Rastertunnelmikroskopie (Scanning Tunneling Microscopy, STM) und die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) eignen sich zur Aufklärung der Struktur. AFM-Messungen liefern Informationen zur Topographie und bei zusätzlicher Aufnahme des Reibungs- oder Phasenkonstrastsignals ggf. über lateral unterschiedliche chemische Terminierungen.

Die am besten untersuchten SAMs sind thiolbasierte SAMs auf Gold und silanbasierte SAMs auf Siliciumoxid/Silicium. Diese beiden Adsorbat/Substrat-Systeme werden auch in dieser Arbeit verwendet und daher in den folgenden zwei Kapiteln detaillierter beschrieben.

#### 2.1.1 Thiol-SAMs auf Gold

Organoschwefelverbindungen, wie etwa Alkanthiole, Dialkandisulfide oder Dialkansulfide, bilden auf Münzmetallen, wie Gold, Silber oder Kupfer, organische Monoschichten aus. Nuzzo und Allara waren in den 1980er Jahren die ersten, die die Adsorption von organischen Disulfiden auf Goldoberflächen beschrieben [48]. Seitdem haben sich Alkanthiolschichten auf Au(111)-Oberflächen zu den wohl am meisten untersuchten Adsorbat/Substrat-Systemen entwickelt. Thiol-SAMs können mit geringem Aufwand aus Lösung hergestellt werden. Sie bilden sich durch Eintauchen eines Goldsubstrats in eine Lösung eines Thiols, zum Beispiel in Ethanol, mit einer Konzentration von wenigen Millimol pro Liter. Die Adsorption der Thiolmoleküle findet dabei in zwei Phasen statt [23, 30]. In der ersten Phase, die nur einige Minuten dauert, wird schnell eine Schicht ausgebildet, deren Kontaktwinkel und Schichtdicke bei etwa 80-90 % der finalen Werte liegen. Diese erste Phase kann als diffusionskontrollierte Langmuiradsorption beschrieben werden und ist stark von der Konzentration der Lösung abhängig. In der zweiten Phase, die wesentlich länger andauert, bildet sich eine hochgeordnete, zweidimensionale Struktur aus. Die zweite Phase kann als Kristallisation bezeichnet werden.

Die Chemisorption des Alkanthiols an der Goldoberfläche lässt sich mit folgender Reaktionsgleichung beschreiben:

$$R-S-H$$
 +  $Au \rightarrow R-S-Au$  +  $1/2 H_2$ 

Es handelt sich formal um eine oxidative Addition der S-H-Bindung an die Goldoberfläche, gefolgt von einer reduktiven Eliminierung von Wasserstoff. Die Alkanthiolmoleküle werden über eine kovalente S-Au-Bindung fest an die Oberfläche angebunden. Die homolytische Bindungsstärke liegt bei etwa 200 kJ/mol [21]. Außerdem leisten die Alkylketten durch Vander-Waals-Wechselwirkungen einen Beitrag zur Stabilität des SAMs, dieser beträgt etwa 6 kJ/mol pro Methylen-Gruppe [49]. Die Packungsdichte eines Alkanthiol-SAMs auf Gold beträgt bei vollständiger Bedeckung etwa 4.5 · 10<sup>14</sup> Moleküle/cm<sup>2</sup> [50].

Untersuchungen der thermischen Desorption von Alkanthiol-SAMs ergaben, dass diese, je nach Packungsdichte, mit unterschiedlichen Mechanismen erfolgen kann. Bei hoher Packungsdichte desorbieren die Moleküle als Disulfide mit einer Aktivierungsenergie von etwa 126 kJ/mol. Aus einer Schicht mit geringem Bedeckungsgrad verläuft die Desorption über Thiolradikale und es wird eine höhere Aktivierungsenergie von 167 kJ/mol benötigt [51].

Als Substrate zur Herstellung von Thiol-SAMs eignen sich goldbeschichtete Silicium oder Glassubstrate. Diese werden mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (*Physical Vapor Deposition*, PVD) hergestellt, wobei vor der Goldbeschichtung eine dünne Titanschicht (< 5 nm) als Haftvermittler auf der Silicium- oder Glasoberfläche aufgebracht wird. Derartige Goldfilme sind polykristallin und bestehen aus Goldinseln oder Goldclustern in der Größenordnung von 5 bis 100 nm.

#### 2.1.2 Silan-SAMs auf Siliciumoxid/Silicium

Silanbasierte SAMs können auf hydroxylierten, oxidischen Substraten, wie zum Beispiel oxidiertem Silicium oder Glas, hergestellt werden. Dieser Typ SAM wurde erstmalig von Sagiv beschrieben, der die Bildung geordneter Organosilanmonoschichten auf Glassubstraten beobachtete [52]. Als Precursoren für Silan-SAMs werden üblicherweise langkettige Alkylsilane verwendet. Zur Anbindung an das Substrat können verschiedene Kopfgruppen eingesetzt werden. Unter anderem werden Trichlorsilane, Trimethoxysilane oder Triethoxysilane verwendet. Diese Kopfgruppen unterscheiden sich in ihrer Reaktivität. Von den drei genannten sind Trichlorsilane am reaktivsten, Trialkoxysilane sind weniger reaktiv [24].

Eine hohe Dichte an Silanolgruppen auf den zur Beschichtung verwendeten Substraten ist für die Qualität der Schicht essentiell. Die Silanolgruppenkonzentration auf einem Siliciumsubstrat mit nativer Oxidschicht nach 30 minütiger Piranha-Behandlung beträgt etwa  $5 \cdot 10^{14}$  cm<sup>-2</sup> [53]. Die gängigste Methode zur Beschichtung ist das Eintauchen des Substrats in eine millimolare Lösung des Precursors. Die Bildung des SAMs erfolgt über eine Hydrolyse der Kopfgruppe durch Restwasser in der Lösung oder durch an der Substratoberfläche adsorbiertes Wasser und anschließende Anbindung des hydrolysierten Silans an die Hydroxygruppen der Oberfläche (Abbildung 2.2) [54]. Durch Polymerisationsreaktionen entsteht ein Si-O-Si-Netzwerk, das sowohl die Moleküle des



**Abbildung 2.2:** Bildungsmechanismus eines Alkylsiloxan-SAMs auf einer hydroxylierten Siliciumoberfläche.

SAMs horizontal untereinander verknüpft als auch die Schicht vertikal an das Substrat bindet, wobei der Grad der vertikalen Verknüpfung in einer dicht gepackten Schicht nur 10-20 % betragen und damit relativ gering sein kann [55]. Der Mechanismus der Schichtbildung ist kompliziert, viel diskutiert und hängt vom verwendeten Precursor und den experimentellen Parametern, wie etwa der Temperatur, der Beschichtungszeit, dem Restwassergehalt und dem Alter der Beschichtungslösung, ihrer Konzentration und dem verwendeten Lösungsmittel, ab. Es können zwei Wachstumsmodi auftreten, zum einen ein homogenes Wachstum, zum anderen ein Inselwachstum, bei dem bereits bei geringen Bedeckungsgraden Bereiche mit hoher Packungsdichte vorliegen. Letzteres kann dadurch erklärt werden, dass Precursormoleküle in der Lösung hydrolysieren und geordnete Aggregate bilden, die dann auf der Oberfläche immobilisieren [18, 23].

Im Vergleich zu Alkanthiol-SAMs auf Gold sind Alkylsiloxan-SAMs weniger geordnet. Diese Tatsache wird dem starren Si-O-Si-Netzwerk zugeschrieben. Die Packungsdichte einer vollständigen Alkylsiloxanschicht ist mit der eines Alkanthiol-SAMs auf Gold vergleichbar. Alkylsiloxanschichten zeichnen sich durch eine hohe thermische, chemische und mechanische Stabilität aus. Anhand der Untersuchung der photothermischen Zersetzung eines ODS-SAMs (Octadecylsiloxan-SAM) auf SiO<sub>2</sub>/Si wurde hierfür eine Aktivierungsenergie von 425 kJ/mol bestimmt [14]. Damit liegt sie deutlich höher als die der Zersetzung eines Alkanthiol-SAMs auf Gold [51].

#### 2.1.3 Funktionalisierte SAMs

Wie bereits erwähnt, werden viele Eigenschaften der Oberfläche eines SAMs durch dessen Endgruppen bestimmt. Besonders hydrophobe Oberflächen erhält man durch den Einsatz fluorierter Alkylgruppen, hydrophile Oberflächen hingegen zum Beispiel durch Hydroxyoder Carbonsäure-Gruppen [56]. Brom- oder Vinylgruppen bieten einen guten Ausgangspunkt für chemische Reaktionen und ermöglichen so die Weiterfunktionalisierung zu zahlreichen anderen funktionellen Gruppen [57, 58]. Auch die Azidgruppe ist aufgrund ihrer Reaktivität vielseitig zur Weiterfunktionalisierung oder Anbindung verschiedener Materialien einsetzbar [59, 60]. Werden endständige Polyethylenglycol-Gruppen (PEG-Gruppen) verwendet, können proteinresistente Oberflächen hergestellt werden [61, 62], Carbonsäure-, Amino- oder Epoxidgruppen eignen sich gut zur Anbindung von Biomolekülen [39].

Um Monoschichten mit der gewünschten Funktionalisierung zu erhalten, stehen grundsätzlich zwei verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung. Zum einen kann zur Herstellung des SAMs direkt ein ω-funktionalisiertes Precursormolekül mit der

entsprechenden funktionellen Endgruppe verwendet werden, zum anderen können die Endgruppen der Monoschicht nachträglich durch nasschemische Verfahren modifiziert werden.

#### Einsatz w-funktionalisierter Precursormoleküle

Funktionalisierte SAMs können aus ω-funktionalisierten Alkylsilanen oder Alkanthiolen hergestellt werden. Bei der Herstellung von Alkylsiloxanmonoschichten auf Siliciumoxid/Silicium ist die Auswahl möglichen funktionellen an Endgruppen eingeschränkt, denn diese müssen mit der reaktiven Silankopfgruppe kompatibel sein [24]. Da die Thiolkopfgruppe weniger reaktiv ist, ist dieses Problem bei Alkanthiol-SAMs auf Gold von geringerer Bedeutung [23].

Ein weiterer Nachteil der Verwendung ω-funktionalisierter Precursoren ist, dass die Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen oder eine Affinität der Endgruppe zum Substrat sich negativ auf die Packungsdichte und Ordnung des SAMs auswirken [63, 64]. Relevant sind Wechselwirkungen zwischen End- und Kopfgruppe, zwischen Endgruppen untereinander und zwischen der Endgruppe und dem Substrat. Natürlich spielt auch der Platzbedarf der Endgruppe eine Rolle. Trägt der Precursor eine Endgruppe, die sterisch anspruchsvoller als die Alkylgruppe ist, kann kein SAM entstehen, der genauso dicht gepackt ist, wie ein SAM aus unfunktionalisierten Alkylketten. SAMs mit zahlreichen verschiedenen funktionellen Gruppen können auf diese Weise hergestellt werden. Neben einfachen Terminierungen, wie etwa Vinyl- [58], Halogen- [65], Amino- [66] oder Carbonsäuregruppen [56], können auch komplexere funktionelle Endgruppen, wie Biotin [67] oder PEG [61, 62], eingesetzt werden.

#### Post-Funktionalisierung

Alternativ können funktionelle Gruppen nachträglich durch Oberflächenreaktionen eingeführt oder verändert werden. Hierdurch können geordnete SAMs mit funktionellen Gruppen erhalten werden, deren Anwesenheit beim direkten Herstellungsweg stören würde. Allerdings ist nicht jede, in Lösung gut funktionierende, Reaktion auch auf einem festen Substrat erfolgreich. Sterische Hinderung, Transportbeschränkungen, Solvatisierungseffekte, Ladungs- und Dipoleinflüsse können die Reaktivität der immobilen Reaktanden einschränken [68]. Dennoch wird ein weites Spektrum chemischer Reaktionen an der Oberfläche in der Literatur beschrieben [56, 69, 70]. Natürlich muss darauf geachtet werden, dass die Reaktionsbedingungen nicht zu einer Beschädigung von SAM oder Substrat führen.

Dieser Aspekt ist vor allem bei Thiol-SAMs auf Gold zu beachten, die, in dieser Hinsicht, im Vergleich zu Alkylsiloxanschichten auf Siliciumoxid/Silicium wesentlich empfindlicher sind. Eine Möglichkeit, nachträglich funktionelle Gruppen in eine Alkylsiloxanmonoschicht einzuführen, ist die radikalische Halogenierung [71, 72]. Ein Alkylsiloxan-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si lässt sich durch Photobromierung in einen bromterminierten SAM umwandeln [72, 73]. Hierzu wird eine Probe in eine Lösung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff getaucht, wobei die beschichtete Seite in Richtung einer Glühlampe ausgerichtet und von dieser bestrahlt wird. Bromide sind gute Abgangsgruppen, daher können bromterminierte SAMs durch nukleophile Substitutionsreaktionen gut in andere funktionelle Endgruppen, wie bspw. Azid-, Amino- oder Thiolgruppen, umgewandelt werden [73, 74].

In Abbildung 2.3 ist ein Reaktionsschema zur nasschemischen Funktionalisierung eines Alkylsiloxan-SAMs schematisch dargestellt. Nach der Photobromierung kann durch nukleophile Substitution mit Natriumazid eine azidterminierte Schicht erhalten werden. Anschließend können die Azidgruppen durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid zu Aminogruppen reduziert werden. Diese Reaktionen wurden anhand von Kontaktwinkelmessungen und XPS verfolgt und nachgewiesen [73].



**Abbildung 2.3:** Reaktionsschema der Funktionalisierung eines Alkylsiloxan-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si.

#### 2.2 Strukturierung von SAMs

Eine laterale Strukturierung von SAMs kann durch sehr unterschiedliche Verfahren realisiert werden. In diesem Kapitel wird, gestützt auf verschiedene Übersichtsartikel, die in den letzten Jahren erschienen sind, ein grober Überblick über gängige Strukturierungsverfahren gegeben [18, 21, 40, 75, 76]. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der in dieser Arbeit verwendeten photothermischen Laserstrukturierung.

Allgemein wird zwischen parallelen und seriellen Verfahren unterschieden. Bei parallelen Verfahren wird ein vorhandenes Muster, zum Beispiel durch Einsatz einer Maske oder eines Stempels, vervielfältigt. Hierbei werden hohe Qualitätsanforderungen an das zuvor gefertigte Muster gestellt, da sich auch jeder Defekt vervielfacht. Parallele Verfahren ermöglichen eine sehr schnelle Strukturierung, sind jedoch wenig flexibel. Bei seriellen Verfahren dagegen, wird eine Struktur auf der Oberfläche schrittweise erzeugt. Serielle Verfahren sind dadurch langsamer, dafür jedoch sehr flexibel in der Gestaltung von Strukturen.

Weiterhin kann zwischen destruktiven und konstruktiven Verfahren unterschieden werden. Bei destruktiven Verfahren wird eine Struktur durch lokale Zersetzung oder Abtragung der Schichtmoleküle erzeugt. Dagegen spricht man von einem konstruktiven Verfahren, wenn die Schicht bei der Strukturierung entweder an der Oberfläche modifiziert wird, oder eine Struktur erzeugt wird, indem die Schicht aufgebaut oder etwas an diese angebunden wird. Diese Unterscheidung ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der Unterscheidung zwischen konstruktiver und destruktiver Strukturierung.

#### 2.2.1 Etablierte Verfahren

Zur Strukturierung von SAMs werden häufig die Photolithographie [24, 42, 77, 78], das Mikrokontaktdrucken [79-81], die Elektronenstrahllithographie [82-85] oder Rastersondenlithographietechniken [86-89] eingesetzt. Diese Methoden werden im Folgenden kurz erläutert.

Die Photolithographie von SAMs wird meistens als paralleles Verfahren eingesetzt, bei dem der SAM durch eine Maske mit Licht im UV-Bereich bestrahlt wird. Im einfachsten Fall wird dadurch die Schicht photooxidiert und damit zersetzt oder kann anschließend vom Substrat abgelöst werden. Zur destruktiven Strukturierung eines Alkanthiol-SAMs auf Gold ist eine Wellenlänge von 250 nm ausreichend. Die Bestrahlung führt allerdings nicht zur Zersetzung der Alkylketten, sondern zur Oxidation der Thiole zu Sulfonaten, die sehr viel schwächer an die Goldoberfläche gebunden sind und so eine Entfernung des SAMs mit Lösungsmitteln ermöglichen [90]. Zur Zersetzung der Alkylketten werden kürzere Wellenlängen (< 200 nm) benötigt [24]. Die großflächige Strukturierung von Alkylsiloxanmonoschichten auf Siliciumsubstraten bei einer Wellenlänge von 172 nm wurde von Sugimura et. al. beschrieben [91]. Die bei der Photolithographie erreichbare Strukturauflösung hängt von den im Einzelfall verwendeten optischen Elementen ab und ist schließlich beugungslimitiert. Beispielsweise konnten bei einer Wellenlänge von 193 nm mit Hilfe eines Interferenzmusters Linien mit einer Breite von nur 100 nm in einen Alkanthiol-SAM auf Gold geschrieben werden [92]. Über die Zersetzung von SAMs hinaus kann die Photolithographie auch als konstruktives Verfahren eingesetzt werden, indem spezielle, im SAM vorhandene, funktionelle Gruppen gezielt durch photochemische Reaktionen verändert werden [24]. Die zur Übertragung des Musters eingesetzte Maske kann bei der Strukturierung zum einen verwendet werden, um das Muster mit einem optischen System auf die Oberfläche zu projizieren (Projektionslithographie), zum anderen kann die Maske direkt auf der zu strukturierenden Oberfläche befestigt werden (Kontaktphotolithographie) [76]. Die Projektionslithographie wird vorwiegend in der Halbleiterindustrie zur Strukturierung von Photolacken eingesetzt.

Beim Mikrokontaktdrucken (*Micro Contact Printing*,  $\mu$ CP) wird eine Struktur aufgebaut, indem Moleküle selektiv mittels eines Stempels auf das Substrat gedruckt werden. Es handelt sich um ein paralleles, konstruktives Verfahren. Ein Stempel, der in der Regel aus Polydimethylsiloxan (PDMS) gefertigt ist, wird mit chemischer "Tinte", die Precursormoleküle enthält, benetzt und auf die Substratoberfläche gedrückt. Hierdurch wird lokal in den Bereichen, in denen der Stempel mit der Oberfläche in Kontakt kommt, ein SAM ausgebildet. Als Adsorbat/Substrat-Systeme können die üblichen zur Herstellung von SAMs geeigneten Kombinationen verwendet werden, vor allem werden so Thiol-SAMs auf Münzmetalle gedruckt. Auf diese Weise können sehr schnell Flächen von bis zu 100 cm<sup>2</sup> strukturiert werden. Die erreichten Strukturbreiten liegen üblicherweise im Mikrometerbereich, in einigen Fällen konnten auch Breiten unterhalb von 100 nm erreicht werden [21].

Bei der Elektronenstrahllithographie (*E-Beam Lithography*, EBL), die meistens als serielles Verfahren eingesetzt wird, wird ein fokussierter Elektronenstrahl verwendet, um lokal Strukturen in einem SAM zu erzeugen. Auch hierbei kann der SAM entweder abgetragen (destruktive Strukturierung) oder chemisch verändert werden (konstruktive Strukturierung). Die Durchmesser der erzeugten Strukturen sind in der Regel nicht viel größer als der Spotdurchmesser des Elektronenstrahls. Außerdem hängen sie von der Energie der Elektronen ab, diese liegt allgemein zwischen 10 eV und 50 keV. Die Breite der erzeugten Strukturen liegt üblicherweise im Bereich von etwa 20 nm [82, 85], es konnten auch Strukturbreiten unterhalb von 10 nm erreicht werden [93, 94]. Nachteile der Methode sind langsame Schreibgeschwindigkeiten und ein hoher experimenteller Aufwand, da die Strukturierung im Hochvakuum erfolgen muss.

Rastersondentechniken lassen sich auf verschiedene Weise zur seriellen Lithographie einsetzen. Eine destruktive Strukturierung von SAMs kann durch die mechanische Abtragung mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops erreicht werden [75]. Vielfältig zur konstruktiven Strukturierung eingesetzt wird die *Dip-Pen*-Nanolithographie (DPN) [87], bei der von einer Rasterkraftmikroskop-Spitze, ähnlich wie beim µCP, eine Tinte von amphiphilen Molekülen auf ein Substrat übertragen wird und so lokal ein SAM aufgebaut werden kann. Weiterhin können Rastersondentechniken auch konstruktiv eingesetzt werden, um einen SAM lokal zu verändern [95, 96]. Die Strukturauflösung von Rastersondentechniken ist sehr hoch, es können Strukturbreiten von unter 10 nm erreicht werden, allerdings ist hier die sehr niedrige maximale Schreibgeschwindigkeit ein großer Nachteil [86].

#### 2.2.2 Photothermische Laserstrukturierung

Die von Hartmann et al. entwickelte photothermische Laserstrukturierung ist ein serielles Verfahren, bei dem ein hochfokussierter Laserstrahl zur Strukturerzeugung auf der Probenoberfläche eingesetzt wird [14-17]. Zur Strukturierung wird Licht eines cw-Lasers (*Continuous Wave*-Laser, Dauerstrich-Laser) im sichtbaren Bereich verwendet, z. B. Licht eines Argon-Ionen-Lasers bei einer Wellenlänge von 514 nm oder eines diodengepumpten Festkörper-Lasers (*Diode Pumped Solid State*-Laser, DPSS-Laser) bei einer Wellenlänge von

532 nm. Ein kontinuierlicher Laserstrahl wird auf die Probenoberfläche fokussiert und diese in der fokalen Ebene bewegt, um Strukturen zu erzeugen. Es können sowohl Linienmuster als auch Punktmuster durch definiertes An- und Ausschalten des Laserstrahls geschrieben werden. Auf diese Weise wurden ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si [14, 16] und Hexadecanthiol-SAMs (HDT-SAMs) auf Au/Si [17] strukturiert. In Abbildung 2.3 ist das Prinzip der photothermischen Laserstrukturierung und ein mittels AFM abgebildetes Punktmuster in einem ODS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si gezeigt.



**Abbildung 2.3: a)** Schematische Darstellung der Laserstrukturierung eines SAMs, **b**) AFM-Aufnahme (Topographie) eines strukturierten ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si [55].

Die Strukturerzeugung basiert auf einem photothermischen Prozess. Das Licht wird im Substrat absorbiert, wodurch dieses sich lokal erwärmt. Durch die Temperaturerhöhung wird im bestrahlten Bereich eine chemische Reaktion, wie etwa die Zersetzung eines SAMs, induziert, wodurch Strukturen auf der Oberfläche entstehen. Aufgrund der nichtlinearen Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten einer chemischen Reaktion von der Temperatur, können Strukturen erzeugt werden, die weitaus kleiner sind als der Durchmesser des zur Strukturierung verwendeten Laserspots und sogar kleiner als die Wellenlänge des zur Strukturierung verwendeten Lichts. Die minimal erreichten Linienbreiten bei der Strukturierung eines ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si bei einer Wellenlänge von 514 nm liegen bei etwa 200 nm, obwohl der 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser des verwendeten Laserspots 2.5 µm betrug [14]. Der experimentelle Aufwand zur Strukturierung ist verhältnismäßig gering. Die Strukturierung kann unter ambienten Bedingungen durchgeführt werden. Durch den Einsatz eines DPSS-Lasers, ist der zur Strukturierung verwendete optische Aufbau außerdem sehr kompakt und kann auf einer Fläche von weniger als 1 m<sup>2</sup> installiert werden. Der Einsatz hoher Schreibgeschwindigkeiten von bis zu 15 mm/s ermöglicht eine schnelle Strukturierung größerer Probenbereiche.

Die Laserstrukturierung ist flexibel einsetzbar, nicht nur zur destruktiven Strukturierung, sondern auch als konstruktives Verfahren. Die Möglichkeit der konstruktiven Strukturierung

wurde durch die lokale, laserinduzierte Oxidation eines H-terminierten Si-Substrats demonstriert [98]. Wird ein derartiges, strukturiertes Templat mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) beschichtet, so bildet sich der ODS-SAM nur selektiv in den strukturierten Bereichen, während die umliegenden H-terminierten Bereiche frei bleiben.

#### Berechnung der Temperaturprofile

Bei einem photothermischen Prozess ist die räumliche Temperaturverteilung an der Substratoberfläche von besonderem Interesse [14, 15]. Die radialen Temperaturprofile können anhand der analytischen Lösung der zu Grunde liegenden Wärmeleitungsgleichung, die die optischen und thermischen Eigenschaften des Substrats berücksichtigt, berechnet werden [13]. Bei der Strukturierung einer Alkylsiloxanschicht auf einem Siliciumsubstrat mit nativer Oxidschicht kann angenommen werden, dass das Laserlicht vollständig im Siliciumsubstrat absorbiert und in Wärme umgewandelt wird. Der Einfluss der organischen Monoschicht und der Oxidschicht sind hierbei vernachlässigbar, da beide Schichten zum einen sehr dünn sind und zum anderen eine geringe Absorbtivität im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Obwohl sehr hohe Temperaturen im Zentrum des bestrahlten Bereichs erreicht werden, kann die Wärmeleitung und -abstrahlung an die Umgebungsluft vernachlässigt werden. Der aufgeheizte Bereich ist im Wesentlichen nicht größer als der Laserspot. Auch die Verbrennungsenthalpie, die durch die Zersetzung der Monoschicht freigesetzt wird, ist vernachlässigbar, da es sich um eine äußerst geringe Stoffmenge handelt [14]. Die bei der Bestrahlung mit dem Laserspot entstehenden Temperaturprofile können auf Grundlage der folgenden Wärmeleitungsgleichung berechnet werden [13, 99]:

$$\rho c_{p} \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla (\kappa \nabla T) + \alpha I , \qquad 2.1$$

wobei  $\rho$  die Dichte,  $c_{\rho}$  die spezifische Wärmekapazität,  $\kappa$  die thermische Leitfähigkeit,  $\alpha$  der Absorptionskoeffizient und *I* die eingestrahlte Laserintensität ist.

Bei den thermischen Eigenschaften von Silicium und einem Laserspotdurchmesser von 2.5 µm bildet sich das Temperaturprofil in weniger als 100 ns aus. Liegt die Belichtungszeit im Millisekundenbereich, ist diese also im Vergleich zu der Zeit, die zum Aufwärmen und Abkühlen des Substrats benötigt wird, viel größer. Daher kann von einem stationären Temperaturprofil ausgegangen werden [14].

Unter Annahme eines gaußförmigen Laserintensitätsprofils und bei Vernachlässigung der Temperaturabhängigkeit von thermischer Leitfähigkeit und Reflektivität, kann man die lokale Temperaturänderung mit folgender Gleichung berechnen [13, 99]:

$$\Delta T(r) = T_{max} I_0 \left( \left( \frac{r}{\omega_{2e}} \right)^2 \right) \exp \left( - \left( \frac{r}{\omega_{2e}} \right)^2 \right) , \qquad 2.2$$

hierbei ist  $I_0$  die modifizierte Besselfunktion 0. Ordnung, r der radiale Abstand zum Zentrum des Laserspots,  $\omega_{2e}$  der 1/e<sup>2</sup>-Radius des Laserspots und  $T_{max}$  der maximale Temperaturanstieg. Dieser lässt sich folgendermaßen berechnen [14]:

$$T_{max} = \frac{P(1-R)}{\sqrt{2\pi\kappa\omega_{2e}}} , \qquad 2.3$$

mit *P* als eingestrahlte Laserleistung und der Reflektivität *R* des Substrats. Bislang wurde nicht berücksichtigt, dass die thermische Leitfähigkeit von Silicium temperaturabhängig ist und mit zunehmender Temperatur stark abnimmt. Daher ist das in Realität vorliegende Temperaturprofil deutlich schmaler und es wird eine höhere Maximaltemperatur erreicht. Um die Temperaturabhängigkeit der thermischen Leitfähigkeit zu berücksichtigen, werden die mit Gleichung 2.2 berechneten Temperaturprofile anschließend durch die sogenannte Kirchhoff-Transformation korrigiert [13, 99]:

$$T(r) = T_k + (T_0 - T_k) \exp\left(\frac{\Delta T(r)}{T_0 - T_k}\right)$$
 2.4

Hierbei entspricht  $T_0$  der Grundtemperatur des Substrats von 300 K.  $T_k$  ist ein empirischer Fit-Parameter, der aus experimentellen Daten zur Temperaturabhängigkeit der Wärmeleitfähigkeit bestimmt wird und im Falle von Silicium 99 K beträgt [13].

#### Thermokinetische Analyse

Bei Kenntnis der Temperaturprofile kann anhand der Daten zur Abhängigkeit der Strukturgrößen von den verwendeten Strukturierungsparametern (Laserleistung und Belichtungszeit) eine einfache thermokinetische Analyse durchgeführt werden [14, 15]. Bei der photothermischen Laserstrukturierung findet, wenn der Laserspot die Oberfläche belichtet, eine chemische Reaktion statt. Diese stoppt abrupt sobald der Laser ausgeschaltet oder weiterbewegt wird. Die Reaktionszeit entspricht der Belichtungszeit. Daher entstehen mit kürzer werdenden Pulslängen oder schneller werdenden Schreibgeschwindigkeiten, was jeweils einer abnehmenden Reaktionszeit entspricht, immer kleinere Strukturen. Die Strukturbreiten werden auf halber Höhe der Schichtdicke gemessen, hier entspricht die Reaktionszeit der Halbwertszeit der induzierten Reaktion.

Die Temperaturabhängigkeit der Halbwertszeit wird durch folgende Gleichung beschrieben [100]:

$$\tau_{1/2} = A \exp\left(\frac{E_A}{R_{Gas}T}\right) , \qquad 2.5$$

mit dem präexponentiellen Faktor *A*, der Aktivierungsenergie der initiierten Reaktion  $E_A$  und der allgemeinen Gaskonstante  $R_{Gas}$ .

Die Halbwertszeit einer Reaktion ist invers proportional zu ihrer Geschwindigkeitskonstanten *k* [100]. Für eine Reaktion erster Ordnung ist:  $\tau_{1/2} = ln2/k$ . Es gilt die Arrhenius-Gleichung:

$$k = v \exp\left(\frac{-E_A}{R_{Gas}T}\right) , \qquad 2.6$$

mit dem Frequenzfaktor v.

Anhand der berechneten radialen Temperaturprofile kann jeder Halbwertszeit eine Temperatur zugeordnet werden. Gemäß Gleichung 2.5 können die Daten in einem



**Abbildung 2.6:** Radiales Intensitätsprofil des Lasersstrahls, Temperaturprofil auf der Substratoberfläche und Profil der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten am Beispiel der photothermischen Laserstrukturierung von ODS auf SiO<sub>2</sub>/Si. Parameter für die Berechnung:  $\omega_{2e} = 1 \ \mu m$ , R = 0.38,  $\kappa = 1.5 \ W/cm \ K$ ,  $T_0 = 300 \ K$ ,  $T_k = 99 \ K$ ,  $P = 180 \ mW$ ,  $E_A = 425 \ kJ/mol$  und  $\nu = 10^{17.9} \ s^{-1}$ .

Arrhenius-Diagramm aufgetragen werden. Bei einer Auftragung der experimentellen Daten in der Form  $ln(\tau_{1/2})$  gegen 1/T zeigt sich ein linearer Zusammenhang. Mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden lassen sich die effektive Aktivierungsenergie des Prozesses und der präexponentielle Faktor bestimmen. Erstere ergibt sich aus der Steigung der Geraden, letzterer aus ihrem Achsenabschnitt.

Mit den experimentell ermittelten, kinetischen Parametern kann das radiale Profil der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten der bei der Strukturierung ablaufenden Reaktion berechnet werden. Dieses ist in Abbildung 2.6 am Beispiel der photothermischen Laserstrukturierung eines ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si gezeigt. Außerdem sind das Intensitätsprofil des Laserstrahls und das Temperaturprofil, das durch die Bestrahlung der Substratoberfläche resultiert, dargestellt. Die Berechnung wurde für einen 1/e<sup>2</sup>-Spotradius von 1 µm durchgeführt, als kinetische Parameter für die Zersetzung von ODS wurde eine Aktivierungsenergie von 425 kJ/mol und ein Frequenzfaktor von 10<sup>17.9</sup> s<sup>-1</sup> angenommen [14]. Während das Temperaturprofil in etwa dem Intensitätsprofil des Lasers folgt, ist das Profil der Geschwindigkeitskonstanten, das zeigt, in welchem Bereich die Zersetzung der Monoschicht stattfindet, sehr viel schärfer. Diese nichtlineare Abhängigkeit erklärt, warum Strukturen erzeugt werden können, die deutlich kleiner sind als der zur Strukturierung verwendete Laserspot. Der Effekt ist umso größer, je höher die Aktivierungsenergie des initiierten Prozesses ist.

#### 2.3 Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen

SAMs stellen einen geeigneten Ausgangspunkt für den Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen dar. Zu deren Aufbau können verschiedene Strategien verfolgt und unterschiedliche Materialen eingesetzt werden. Es bedarf stets einer Kombination aus einem Verfahren zur Erzeugung von Strukturen und einer Methode zur Funktionalisierung der Monoschicht. In diesem Kapitel werden verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung funktionaler Strukturen vorgestellt.

#### 2.3.1 Backfilling

Durch Backfilling wird ein bifunktionaler SAM in zwei Schritten aufgebaut. Zunächst wird ein strukturierter SAM hergestellt und anschließend die durch die Strukturierung entstandenen Lücken in der Schicht mit einem anderen Precursormolekül aufgefüllt. So können topographisch flache Oberflächen, die lateral unterschiedliche Endgruppen und damit unterschiedliche Eigenschaften an der Oberfläche aufweisen, erhalten werden. Ob ein Auffüllen der Lücken in der strukturierten Schicht jedoch überhaupt möglich ist, hängt von dem zur Strukturierung verwendeten Verfahren ab. Werden zur Strukturerzeugung konstruktive Verfahren, wie µCP, eingesetzt, ist das Backfilling unproblematisch. Denn bei diesen Verfahren werden die freien Bereiche, in denen durch Backfilling eine Monoschicht ausgebildet werden soll, bei der Strukturierung nicht verändert. In verschiedenen Arbeiten wurde diese Strategie zur Herstellung bifunktionaler SAMs verfolgt, zum Beispiel um Oberflächen mit lateralen Kontrasten im Benetzungsverhalten [101] oder Template zur lokalen Adsorption von Proteinen herzustellen [102].

Ein Backfilling nach destruktiven Strukturierungsmethoden ist nicht immer möglich. Zwar wird die Monolage lokal entfernt, die Oberfläche in den strukturierten Bereichen ist allerdings nicht notwendigerweise für eine erneute Chemisorption von Precursormolekülen geeignet. Bei der Strukturierung verbleibende Rückstände [24], als Nebeneffekt auftretende Veränderungen des Substrats [14, 103] oder dessen Kontamination [82], können dazu führen, dass eine Chemisorption der Precursoren in den strukturierten Bereichen nicht möglich ist.

Bei der EBL wird die Oberfläche während der Strukturierung oft mit Kohlenstoff kontaminiert [82]. Dennoch ist es Harnett et. al. gelungen mit geringen Elektronenenergien strukturierte Bereiche in Alkan-SAMs auf Gold- und Siliciumsubstraten erfolgreich durch Backfilling mit aminoterminierten Precursoren zu funktionalisieren [84].

Bei der Photolithographie wird die Schicht teilweise nur unvollständig zersetzt, so dass Fragmente der Schichtmoleküle in den strukturierten Bereichen zurückbleiben können [24]. Während ein Backfilling nach der photothermischen Laserstrukturierung von Alkylsiloxanschichten auf Siliciumsubstraten mit nativer Oxidschicht nicht zum Erfolg geführt werden konnte, ist diese Strategie bei anderen SAM/Substrat-Systemen anwendbar. Beispielsweise konnten Alkylsilan-SAMs auf H-terminierten Siliciumsubstraten nach der photothermischen Strukturierung mit 10-Undecynoylfluorid aufgefüllt und zur lokalen Immobilisierung von DNA verwendet werden [104]. Hierbei musste die Oberfläche nach der Strukturierung erneut durch Ätzen in einer Ammoniumfluorid-Lösung vorbehandelt werden. Auch nach der photothermischen Strukturierung von Thiol-SAMs auf Gold konnten die Bereiche, in denen der SAM abgetragen worden ist, mit einem weiteren Thiol aufgefüllt werden [105, 106].

#### 2.3.2 Chemische Lithographie

Der wohl eleganteste Weg zum Aufbau chemischer Template ist die chemische Lithographie. Hiermit werden konstruktive Verfahren bezeichnet, bei denen die Monolage durch den Strukturierungsprozess nicht abgetragen, sondern chemisch modifiziert wird. So ist die Fabrikation einer bifunktionalen Oberfläche in nur einem Schritt möglich.

Bei der Strukturierung können funktionelle Gruppen der Schichtmoleküle zum einen modifiziert oder zum anderen mit einem externen Reaktionspartner zur Reaktion gebracht werden. Ersteres kann zum Beispiel photochemisch oder durch Elektronenbeschuss erreicht werden. So konnten mittels EBL Biphenylthiol-SAMs auf Gold lokal quervernetzt werden [107, 108]. Die bei der Photolithographie induzierten photochemischen Reaktionen sind sehr vielfältig [24]. Beispiele sind das lokale Freilegen von mit photolabilen Gruppen geschützten Aminogruppen zum sukzessiven Aufbau von Peptid-Arrays [109] oder die lokale Umwandlung von Chlormethylphenylgruppen in Carbonsäuregruppen, die anschließend zur Immobilisierung von DNA genutzt werden konnten [110].

Eine chemische Strukturierung mit externem Reaktionspartner kann beispielsweise mittels  $\mu$ CP durchgeführt werden. Die Methode beruht darauf, Moleküle mit einer Oberfläche in Kontakt zu bringen, damit sie mit dieser reagieren. Das  $\mu$ CP kann sehr vielseitig eingesetzt werden, nicht nur zum Aufbau strukturierter SAMs, sondern auch zur Anordnung komplexerer Strukturen [111]. Beispielsweise konnten hierdurch Microarrays mit Kohlenhydraten [112] oder Peptiden [113] aufgebaut werden.

Die Laserstrukturierung bietet optimale Voraussetzungen, um eine chemische Strukturierung mit externen Reaktionspartnern zu realisieren. Sie ist nicht auf eine Strukturierung an Luft oder im Vakuum beschränkt. Die photothermische Strukturierung von ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si in Bromgasatmosphäre wurde von Klingebiel et. al. entwickelt [28, 114]. Während Licht der Wellenlänge 514 nm in der Gasphase zur Dissoziation von Brommolekülen führt, wird die Oberfläche gleichzeitig lokal erwärmt, so dass in den bestrahlten Bereichen eine radikalische Bromierung der ODS-Moleküle stattfindet.

Licht kann transparente Medien durchdringen. Daher ist es möglich mit einem Laser eine Oberfläche zu adressieren, die sich in einem reaktiven Gas oder einer Lösung befindet oder sogar von einer transparenten Schicht verdeckt wird. Diese Flexibilität der Laserstrukturierung wird in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt. So wird die Laserstrukturierung nicht nur zur destruktiven Strukturierung organischer Monoschichten eingesetzt, sondern auch zur konstruktiven Strukturierung von SAMs, die von einem Polymerfilm verdeckt sind oder sich in wässriger Lösung befinden.

#### 2.3.3 Pfropfen von Polymeren

Die Immobilisierung von Polymeren an festen Oberflächen ist ein sehr attraktiver Weg zum Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen [115-120]. Zum einen sind Polymere kostengünstig und zum anderen in einer großen Auswahl verschiedener Eigenschaften und Funktionalitäten kommerziell erhältlich. SAMs stellen eine geeignete Plattform für die Immobilisierung von Polymeren dar, da durch sie die gewünschten funktionellen Gruppen zur Anbindung auf der Oberfläche bereitgestellt werden können. Zur kovalenten Anbindung an die Oberfläche kann ein grafting-from-Ansatz oder ein grafting-to-Ansatz gewählt werden (s. Abbildung 2.7). Beim grafting-from werden zunächst spezielle Initiatormoleküle an der Oberfläche angebracht. Dann wird die Oberfläche in eine Lösung, die Monomere und einen Katalysator enthält, getaucht, wobei eine Polymerisationsreaktion an der Oberfläche stattfindet. Die Polymerketten wachsen also an der Oberfläche auf. Grafting-from ist experimentell anspruchsvoll, dafür erhält man definierte Polymerfilme, in denen die Kettenmoleküle nur an einem Ende an die Oberfläche angebunden sind. Die Länge der Ketten lässt sich mit den Reaktionsbedingungen einstellen. Es wurden verschiedene oberflächeninitiierte Polymerisationsroutinen entwickelt. Die größte Bedeutung hat die radikalische Polymerisation unter Atomtransfer (Atom Transfer Radical Polymerisation, ATRP) erlangt [121, 122].

Bei einem *grafting-to*-Ansatz dagegen werden fertige Polymerketten nachträglich an die Oberfläche angebunden. Bei vielen Methoden findet eine Reaktion zwischen den in Polymerketten vorhandenen funktionellen Gruppen mit auf der Oberfläche verankerten funktionellen Gruppen statt. Es ist aber nicht immer nötig das Polymer gezielt zu



**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung der Polymerpfropfung mittels grafting-to und grafting-from. F steht für eine funktionelle Gruppe, In für ein Initiatormolekül und M für ein Monomer.

funktionalisieren, teilweise kann eine reaktive Gruppe an der OberflŠche auch mit CH-Gruppen im Polymer reagieren. *Grafting-to-*AnsŠze sind experimentell einfach durchzuführen, aber häufig durch sterische Hinderung limitiert. Sind einige Polymerketten an die OberflŠche angebunden, blockieren sie den Zugang zu freien Bindungsstellen fŸr weitere Ketten. Das kann zu Polymerfilmen mit einer geringen Pfropfdichte f\vec{H}r en [123].

#### Azidfunktionalisierte OberflŠchen zum Pfropfen von Polymeren

Eine Mğlic hkeit Polymere mittels *grafting-to* kovalent an die OberflŠche anzubinden, ohne dass eine spezielle funktionelle Gruppe im Polymer erforderlich ist, ist ein Pfropfen an einen azidterminierten SAM [59, 124-128]. Die Reaktion, die hierbei ablĚf t, wird als eine Insertion des Azids in eine CH-Gruppe des Polymers beschrieben. Die Azidgruppe kann photochemisch oder thermisch aktiviert werden und bildet unter Abspaltung von Stickstoff ein Nitren. Dieses kann in eine C-H-Bindung einer Polymerkette insertieren, was zur kovalenten Anbindung des Polymers an die Monoschicht flür t. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.8 skizziert.



**Abbildung 2.8:** Reaktionsschema der Polymerpfropfung an ein organisches Azid.

In der Literatur wird die Polymerpfropfung an SAMs aus aromatischen Precursoren mit einer Perfluorphenylazid- [59, 124, 126-128] oder einer Sulfonylazid-Endgruppe [125] beschrieben. Diese Azide wurden gew**Š**lt, da sie sich bei niedrigen Temperaturen aktivieren lassen, sie sind allerdings sehr aufwendig zu synthetisieren. Da keine spezielle funktionelle Gruppe im Polymer benötigt wird, um es an die Oberfl**Š**che anzubinden, und C-H-Bindungen in allen organischen Polymeren vorhanden sind, ist die Polymerpfropfung an azidfunktionalisierte Oberflächen sehr flexibel und erm**ğ**l icht die Anbindung einer Vielzahl verschiedener Polymere.

#### 2.3.4 Strukturen aus Nanopartikeln

Nanopartikel spielen eine bedeutende Rolle bei der Funktionalisierung von Festkörperoberflächen. Aufgrund ihrer Größe besitzen sie spezielle optoelektronische [129] und elektronische Eigenschaften [130], was sie für diverse Anwendungen in der Nanotechnologie sehr interessant macht [131, 132]. Speziell Goldnanopartikel können sehr vielseitig in chemischen und biologischen Sensoranwendungen eingesetzt werden [133-135]. Für viele Anwendungen werden Verfahren benötigt, um die Nanopartikel gezielt auf der Oberfläche zu deponieren.

Goldnanopartikel können mit unterschiedlichen Methoden hergestellt werden. Eine etablierte Synthese ist die Citrat-Methode [136]. Hierbei wird zu einer Lösung von Tetrachlorgoldsäure Natriumcitrat gegeben. Dieses dient zum einen als Reduktionsmittel, zum anderen werden die gebildeten Nanopartikel durch Citrat-Hüllen stabilisiert. Die Größe der resultierenden Partikel hängt vom eingesetzten Stoffmengenverhältnis von Citrat und Gold ab [137].

Gut geeignet, um Goldnanopartikel lokal an einer Oberfläche anzubinden, sind zuvor strukturierte und funktionalisierte SAMs. Thiol- oder Cyanogruppen können hierzu eingesetzt werden, da sie Goldnanopartikel kovalent anbinden können [138, 139]. Zur Immobilisierung citratstabilisierter Goldnanopartikel sind auch aminoterminierte SAMs gut geeignet. Die durch die Citrat-Hüllen an der Oberfläche negativ geladenen Nanopartikel binden elektrostatisch an die protonierten Aminogruppen an [131].

Bspw. zeigten Dahlhaus et. al. und Klingebiel et. al., wie strukturierte, lokal aminoterminierte ODS-SAMs auf Siliciumoxid/Silicium zur lokalen Anbindung von citratstabilisierten Goldnanopartikeln genutzt werden können [28, 140]. Hierbei wurden SAMs zunächst strukturiert und nasschemisch aminofunktionalisiert. Die Adsorption der Goldnanopartikel erfolgte in einem weiteren Schritt, durch Eintauchen des strukturierten Substrats in eine Lösung der zuvor synthetisierten Nanopartikel.

#### 2.4 Biofunktionalisierung

Für biotechnologische Anwendungen, wie etwa die Produktion von Biochips, ist die Entwicklung von Methoden zur Biofunktionalisierung von Oberflächenstrukturen nötig [1, 6, 12, 19, 116, 141-143]. Die Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen kann durch kovalente oder nichtkovalente Anbindung erfolgen. Je nach Anwendung werden DNA, Proteine, Antikörper, Enzyme etc. auf der Oberfläche verankert. Die Herstellung von ProteinArrays ist komplexer als die von DNA-Arrays, da Proteine empfindlicher sind und bei der Anbindung eher ihre biologische Funktion verlieren [12].

#### 2.4.1 Adsorption von Proteinen

Befindet sich ein Festkörper in einer proteinhaltigen Lösung, so wird eine Adsorption der Proteine an der Oberfläche beobachtet [144, 145]. Proteine adsorbieren auf fast allen Oberflächen, ein proteinresistentes Verhalten einer Oberfläche ist die Ausnahme. Aufgrund des komplexen Aufbaus und der Anwesenheit vieler verschiedener funktioneller Gruppen im Proteinmolekül sind bei der Adsorption aus wässriger Lösung verschiedene Prozesse und unterschiedliche Wechselwirkungen zu der festen Grenzfläche von Relevanz. Die Triebkräfte haben sowohl enthalpischen als auch entropischen Charakter [146].

Um die auftretenden Wechselwirkungen zu erläutern, wird zunächst kurz der Aufbau eines Proteinmoleküls betrachtet. Proteinmoleküle haben eine sehr komplexe Struktur, die auf verschiedenen Betrachtungsebenen beschrieben wird [147]. Ein Protein besteht aus meistens mehreren hundert Aminosäuren, die über Peptidbindungen zu einer Polypeptidkette zusammengesetzt sind. Die Primärstruktur bezeichnet die Sequenz der Aminosäuren aus denen sich das Protein zusammensetzt. Die räumliche Anordnung der benachbarten Aminosäuren bzw. der Polypeptidketten wird durch die Sekundär- und der ihr übergeordneten Tertiärstruktur beschrieben. Der Durchmesser eines Proteinmoleküls liegt im Bereich weniger Nanometer, beispielsweise wurde für Albumin aus Rinderserum (Bovine Serum Albumin, BSA) ein hydrodynamischer Radius von 3.39 nm bestimmt [148]. Die Proteine, die in Lebewesen vorkommen, setzen sich aus 20 verschiedenen Aminosäuren zusammen. Diese tragen Seitenketten mit unterschiedlichen Eigenschaften. Man unterscheidet zwischen Aminosäuren mit unpolaren, hydrophoben Seitenketten, Aminosäuren mit polaren, hydrophilen Seitenketten und Aminosäuren mit positiv oder negativ geladenen Seitenketten.

Befindet sich ein Proteinmolekül in der Nähe einer Oberfläche treten Van-der-Waals-Wechselwirkungen auf. Diese leisten einen relativ kleinen, aber nicht zu vernachlässigenden Beitrag zur Verringerung der freien Enthalpie des Adsorptionsprozesses [146]. Da geladene funktionelle Gruppen im Protein vorhanden sind, liefern elektrostatische Wechselwirkungen einen weiteren Beitrag. Dieser hängt zum einen von der Ladungsdichte im Protein, also der Anzahl der geladenen Gruppen im Molekül, aber auch von der elektrolytischen Umgebung, bspw. von der Pufferlösung und der Ladungsdichte der Oberfläche auf der die Adsorption stattfindet, ab [149]. Eine sehr bedeutende Rolle spielen hydrophobe Wechselwirkungen [146]. Proteine weisen teilweise hydrophobe Seitenketten an der Oberfläche auf. In wässriger Lösung werden hydrophobe Oberflächen von einer hochgeordneten Wasserstruktur umgeben, die im Englischen als *low-entropy water* bezeichnet wird [146]. Diese Wasserstruktur kommt dadurch zustande, dass Wechselwirkungen polarer Gruppen untereinander (in diesem Fall Wasser-Wasser) und Wechselwirkungen unpolarer Gruppen begünstigt sind. Wird das Protein an der Oberfläche adsorbiert, so wird dieses geordnete Oberflächenwasser freigesetzt, was zu einer starken Entropieerhöhung führt. Vor allem bei der Proteinadsorption auf hydrophoben Oberflächen leistet dieser Effekt einen großen Beitrag, da dann auch das Oberflächenwasser der festen Grenzfläche freigesetzt wird. Diese hydrophoben Wechselwirkungen sind eine Erklärung dafür, dass Proteine zu hydrophoben Oberflächen eine besonders große Affinität aufweisen [150].

Weiterhin verändert ein Protein bei der Adsorption auf der Oberfläche häufig seine Konformation, um die Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu maximieren. Adsorbierte Proteine haben in vielen Fällen zumindest partiell ihre Tertiär- und Sekundärstruktur verloren, sie sind denaturiert [151, 152]. Diese Veränderung der Struktur führt zu einer Erhöhung der Konformationsentropie. Auch wenn sich ein Protein auf der Oberfläche nur teilweise entfaltet, kann dieser entropische Beitrag die entscheidende Triebkraft zur Adsorption des Proteins an der Oberfläche darstellen [146].

Die Adsorption von Proteinen ist in den meisten Fällen ein irreversibler Prozess, die Proteine verbleiben auf der Oberfläche, auch wenn diese in eine proteinfreie Lösung bewegt wird [149]. Proteine stoßen sich in Lösung gegenseitig ab und bilden keine Aggregate. Für globuläre Proteine, also kugelförmige Proteine, entspricht die Menge des auf der Oberfläche adsorbierten Proteins üblicherweise etwa dem, was als dicht-gepackte Monolage bezeichnet werden kann, oder weniger [149]. Adsorbierte Proteine zu verhindern. Zum Blockieren unspezifischer Proteinadsorption ist der Einsatz von BSA oder Casein weit verbreitet [153]. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist jedoch, dass der Effekt nicht lange anhält und an der Oberfläche ein Austausch der blockierenden, adsorbierten Proteine gegen Proteine, deren Adsorption verhindert werden soll, stattfinden kann [27, 149].

Mit dem Verlust von Tertiär- und Sekundärstruktur können Proteine auch ihre biologische Funktion verlieren. Das ist natürlich bei biotechnologischen Anwendungen unerwünscht, da eben diese genutzt werden soll. Um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern, ist eine gezieltere Strategie als die unspezifische Adsorption zur Immobilisierung des Proteins auf der Oberfläche erforderlich. Von Interesse sind eine homogene Orientierung der Proteine auf der Oberfläche und ein Abstand zwischen Protein und Oberfläche, um die Wechselwirkungen, die zur Denaturierung führen, zu minimieren [12]. Diese Anforderungen können zum Beispiel durch eine kovalente Anbindung des Proteins an die Oberfläche über spezielle funktionelle Gruppen und Cross-Linker erfüllt werden. Eine andere häufig eingesetzte Strategie nutzt die spezifische Bindung von Biotin zu den Proteinen Avidin oder Streptavidin.

#### Der Biotin-Streptavidin-Komplex

Das Protein Streptavidin ist aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut, die jeweils aus einer Sequenz von 159 Aminosäuren bestehen. Jede dieser Untereinheiten verfügt über eine spezifische Bindungstasche für Biotin. Das Molekül Biotin, auch als Vitamin B<sub>7</sub> bezeichnet, ist ein wasserlösliches Vitamin. Der Biotin-Streptavidin-Komplex ist sehr stabil, die Komplexbildungskonstante liegt bei  $K = 10^{15} M^{-1}$  [154]. Damit kann die Komplexbildung als irreversibel angesehen werden. Mit einer Bindungsenthalpie von 134 kJ/mol ist die Biotin-Streptavidin-Bindung eine der stärksten bekannten, nichtkovalenten, biologischen Bindungen [155].

Auch Avidin verfügt über vier spezifische Bindungstaschen für Biotin. Die Biotin-Avidin-Bindung ist im Vergleich sogar noch etwas stärker, jedoch wird Streptavidin gegenüber Avidin bevorzugt verwendet, da in Avidin Glykoaminosäuren vorhanden sind, die eine unerwünschte, unspezifische Adsorption hervorrufen können [156].

Der Biotin-Streptavidin-Komplex wird häufig zum Aufbau von Proteinchips eingesetzt [12]. Hierbei wird üblicherweise, wie in Abbildung 2.9 skizziert, eine gestapelte



**Abbildung 2.9:** Strategie zur Immobilisierung von Biomolekülen mit einem gestapelten Biotin/Streptavidin/Biotin-Aufbau **a**) auf einem biotinylierten SAM und **b**) auf adsorbiertem, biotinyliertem BSA.

Biotin/Streptavidin/Biotin-Anordnung angewendet. Das Streptavidin wird nicht direkt auf der Oberfläche immobilisiert, sondern spezifisch an auf der Oberfläche immobilisiertes Biotin angebunden. Eine Anbindung von Biotin an die Oberfläche kann durch Adsorption eines biotinylierten Proteins erfolgen oder auch durch kovalente Anbindung eines biotinfunktionalisierten Moleküls (z. B. Thiols). Durch die spezifische Bindung an die Biotin-Schicht entsteht eine höher geordnete Streptavidin-Schicht als bei unspezifischer Adsorption. Zwei der vier Bindungstaschen sind zum an der Oberfläche gebundenen Biotin orientiert und binden an dieses an. Die zwei anderen Bindungstaschen stehen an der Oberfläche zur spezifischen Anbindung eines weiteren biotinylierten Biomoleküls zur Verfügung [12].

#### Proteinresistente Oberflächen

Eine viel genutzte Möglichkeit, um einer Oberfläche proteinresistentes Verhalten zu verleihen, ist die Modifizierung mit PEG. Hierbei handelt es sich um ein wasserlösliches Polymer. Es ist nicht giftig und zeigt keine protein- oder zellschädigende Wirkung. Daher ist der Einsatz von PEG in biomedizinischen und biotechnologischen Anwendungen weit verbreitet [157].

Das proteinresistente Verhalten von PEG-modifizierten Oberflächen kann mit sterischer Repulsion erklärt werden [146, 158]. Dieser Begriff beschreibt einen osmotisch-entropischen Prozess, bei dem die Beweglichkeit der in die Wasserphase ragenden Polymerketten und das zwischen den Ketten befindliche Wasser eine Rolle spielen. Nähert sich ein Protein der PEG-Oberfläche, werden die Polymerketten zusammengedrückt. Diese Kompression führt zu einer Verringerung der Konformationsentropie der Polymerketten und einem Verlust von Wasser zwischen den Ketten und somit einem lokalen Anstieg der Konzentration des Polymers und des osmotischen Drucks im Polymer. Es folgt die Abstoßung des Proteins von der Oberfläche. Hierdurch wird die verlorene Konformationsentropie der Polymerketten wiedergewonnen und der osmotische Druck durch Diffusion von Wassermolekülen zwischen die komprimierten Polymerketten ausgeglichen.

Die Modifizierung einer Oberfläche mit PEG kann durch Pfropfen des Polymers an die Oberfläche realisiert werden. Beispielsweise wurde Oligoethylenglycolmethacrylat (OEGMA), ein PEG-ähnliches und mit ATRP kompatibles Monomer, mittels oberflächeninitiierter ATRP auf Gold- und Siliciumoberflächen gepfropft [159-161]. Untersuchungen der Proteinresistenz derartiger Filme haben gezeigt, dass der aufgepfropfte OEGMA-Film eine Dicke von mindestens 10 nm aufweisen muss, um die Adsorption von Proteinen effektiv zu verhindern [159]. Filme von PEG zeigen bereits bei deutlich geringeren Schichtdicken ein proteinresistentes Verhalten. Die Immobilisierung von PEG durch Pfropfen an epoxid- [162], azid- [128] oder aminofunktionalisierte SAMs [163] ist in der Literatur beschrieben. Während zur Anbindung von PEG an Epoxid- oder Azidgruppen keine spezielle funktionelle Gruppe in die Polymerkette eingebracht werden muss, wurde das PEG zur Anbindung an die Aminogruppen zunächst mit Trifluorethansulfonylchlorid aktiviert.

Zur Modifizierung einer Oberfläche mit PEG stellen PEG-terminierte SAMs eine Alternative zu gepfropften Polymerfilmen dar. Es stehen PEG-funktionalisierte Precursormoleküle mit Thiol-, Silan- oder Alkenkopfgruppen kommerziell zur Verfügung. Diese eignen sich zur Präparation von PEG-terminierten SAMs auf Gold [25, 26], oxidierten [164, 165] oder H-terminierten Siliciumsubstraten [61, 164].

Die Proteinresistenz von PEG-Thiol-SAMs auf Gold wurde systematisch untersucht [25, 26, 166]. Es wurden SAMs verschiedener Oligoethylenglycolthiole unter Variation der Anzahl der Ethylenglycol-Einheiten (EG-Einheiten), der Endgruppe im Precursor und der Packungsdichte der PEG-SAMs durch Herstellung gemischter PEG/Alkanthiol-SAMs betrachtet. Außerdem wurden diese mit SAMs aus Precursoren mit PEG-ähnlichen Gruppen, wie zum Beispiel einem Oligopropylenthiol, verglichen. Hierbei hat sich gezeigt, dass verschiedene Faktoren einen Einfluss auf das proteinresistente Verhalten dieser SAMs haben. Es ist notwendig, dass das Innere des SAMs hydrophil ist. Hierfür spricht, dass SAMs eines hydrophoben Oligopropylenthiols im Gegensatz zum hydrophilen Oligoethylenglycol kein proteinresistentes Verhalten zeigen [26]. Außerdem begünstigen eine geringere laterale Packungsdichte der Oligoethylenglycole, Unordnung und die Anwesenheit von Defekten in der Monoschicht die Proteinresistenz [25, 26]. Aus diesen Beobachtungen wird geschlossen, dass es eine große Rolle spielt, dass Wasser gut zwischen die Molekülketten eindringen kann. Die Proteinresistenz des SAMs nimmt tendenziell mit der Anzahl der im Precursor vorhanden EG-Einheiten zu, wobei mindestens zwei EG-Einheiten vorhanden sein müssen, um die Adsorption von Proteinen an der Oberfläche zu verhindern [25, 26]. Weiterhin ist die Benetzbarkeit der Oberfläche relevant. SAMs mit hydrophilen Endgruppen (z. B. Hydroxy-) sind proteinresistenter als SAMs mit hydrophoben Endgruppen (z. B. Buthoxy-), allerdings wurde kein signifikanter Unterschied zwischen hydroxy- und methoxyterminierten SAMs festgestellt [25].

#### 2.4.2 Immobilisierung von DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA) ist ein Biomolekül, das in allen Lebewesen vorkommt und die genetischen Informationen trägt. DNA liegt normalerweise in Form einer Doppelhelix vor, die aus zwei Oligonukleotiden, auch bezeichnet als ssDNA (*single-stranded DNA*), aufgebaut ist (s. Abbildung 2.10). Ein Nukleotid besteht aus einem



Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Aufbaus der DNA-Doppelhelix, b nach [167].

Phosphatrest, dem Zucker Desoxyribose und einer von vier heterozyklischen Basen (Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) oder Cytosin (C)). Adenin und Thymin, und Guanin und Cytosin können jeweils spezifisch über Wasserstoffbrücken aneinander binden. Die Desoxyribose trägt an 1'-Position die Base, an 3'-Position eine OH-Gruppe und an 5'-Position den Phosphatrest. Jedes Oligonukleotid besitzt somit ein 3'-Ende und ein 5'-Ende. In einer Doppelhelix liegen zwei komplementäre Oligonukleotide in entgegengesetzter Richtung. Am 5'-Ende des einen Strangs befindet sich das 3'-Ende des anderen. Die Ringebenen der Base stehen senkrecht zur Achse der Helix. Der Abstand der aufeinanderfolgenden Basen beträgt 0.34 nm. Neben den Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der komplementären Stränge tragen auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aufeinandergestapelten Basen zur Stabilisierung der Helix bei [168].
Zur Immobilisierung von DNA auf einer Oberfläche können unterschiedliche Wege gewählt werden [39, 141, 169]. Physisorption ist die einfachste Möglichkeit, da hierzu keine Modifizierung der DNA nötig ist. Hierbei wird die DNA durch schwache nichtkovalente Wechselwirkungen immobilisiert. Dazu zählen Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, spezifische Wechselwirkungen zu Proteinen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkungen. Es kann ausgenutzt werden, dass die im Molekülgerüst vorhandenen Phosphatgruppen negativ geladen sind. Daher werden häufig kationische Oberflächen zur Immobilisierung verwendet [170, 171].

Eine kovalente Anbindung von ssDNA ermöglicht es, DNA an der Oberfläche zu verankern und dabei ihre biologische Aktivität, wie die Möglichkeit der Hybridisierung eines komplementären DNA-Strangs und die Bioaffinität, vollständig zu erhalten [169]. Üblicherweise wird ein Oligonukleotid an die Oberfläche gebunden. Dieses kann anschließend durch Hybridisierung einen komplementären Strang immobilisieren. Zur kovalenten Anbindung von ssDNA an Oberflächen werden DNA-Stränge verwendet, die an einem Ende mit einer speziellen funktionellen Gruppe modifiziert sind. Zur Anbindung von DNA an funktionalisierte Oberflächen, unter anderem SAMs, können bifunktionale Cross-Linker verwendet werden [117, 172-175]. Das sind Moleküle, die an ihren beiden Enden funktionelle Gruppen tragen, die dazu geeignet sind, auf der einen Seite mit der Oberfläche und auf der anderen Seite mit der am DNA-Strang angebrachten Ankergruppe zu reagieren. Ein sehr prominentes Beispiel hierfür ist EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), das eine Verknüpfung von Aminen mit Carbonsäuregruppen ermöglicht und häufig zur Kopplung von Biomolekülen eingesetzt wird [20, 141].

DNA kann auch direkt, ohne vorherige Funktionalisierung des Substrats, an dieses gebunden werden. Hierzu eignet sich besonders thiolmodifizierte DNA, denn die Thiolgruppe weist bekanntlich eine große Affinität zu Gold auf [176]. Außerdem wird der bereits thematisierte Avidin-Biotin-Komplex gerne zur Immobilisierung von DNA genutzt. Zuvor auf der Oberfläche adsorbiertes Avidin kann zur Anbindung von biotinylierter DNA eingesetzt werden [177].

Sofern die Funktionalität der auf der Oberfläche immobilisierten DNA-Stränge erhalten geblieben ist, können diese mit einem komplementären DNA-Strang hybridisiert werden. Eine sehr häufig zur Detektion der immobilisierten DNA genutzte Methode ist die Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür werden DNA-Stränge verwendet, die mit Fluoreszenz-farbstoffen markiert sind. Sind der an die Oberfläche gebundene und ein komplementärer DNA-Strang mit geeigneten Fluorophoren markiert, kann Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) stattfinden. Als FRET wird ein Quantenphänomen bezeichnet, das bei bestimmten

Bedingungen zwischen zwei Fluorophoren auftreten kann. Dieser Energietransfer findet von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein Akzeptor-Fluorophor durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ohne Übertragung eines Photons statt. Hierdurch wird die Fluoreszenz des Donors gequencht, der Akzeptor dagegen angeregt und dessen Fluoreszenz beobachtet [178, 179].

Die Transferrate von einem Donor zu einem Akzeptor hängt von drei Faktoren ab, dem räumlichen Abstand der Fluorophore voneinander, der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und der Orientierung der Dipolmomente der Fluorophore zueinander. FRET wird nur beobachtet, wenn der Abstand zwischen den Fluorophoren klein genug ist. Er darf maximal etwa 10 nm betragen. Die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung ist maximal, wenn die Dipolmomente der beiden Fluorophore parallel zueinander orientiert sind. Stehen sie senkrecht zueinander, findet kein Energietransfer statt.

FRET wird häufig bei Experimenten mit Biomolekülen, wie etwa ssDNA, ausgenutzt, um deren Interaktion zu untersuchen [180, 181]. Aufgrund der Abstandsabhängigkeit der Energieübertragung kann die Detektion von FRET als "molekulares Lineal" verwendet werden, um Abstände im Bereich von 0.5-10 nm mit großer Präzision zu messen [182]. Komplementäre DNA-Stränge, die mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert sind, können als FRET-System eingesetzt werden. Hierzu wird ein Strang am 3'-Ende mit dem Donor und der andere am 5'-Ende mit dem Akzeptor markiert. Bilden die beiden Stränge durch Hybridisierung eine Doppelhelix, werden die Fluorophore einander angenähert, so dass FRET beobachtet und die Hybridisierungsreaktion nachgewiesen werden kann.

# **3 E**XPERIMENTELLES

# 3.1 Nasschemie zur Probenvor- und nachbereitung

## 3.1.1 Verwendete Chemikalien und Substrate

Als Siliciumsubstrate wurden handelsübliche, einseitig polierte Si(100)-Wafer (p-dotiert, 1-20  $\Omega$  cm) verwendet. Die Wafer (Durchmesser: 200 mm, Dicke: ca. 0.75 mm) wurden zur Probenpräparation in quadratische Stücke von (10 x 10) mm<sup>2</sup> geschnitten.

Als Goldsubstrate wurden goldbeschichtete Objektträger aus Borosilikatglas oder Si(100)-Wafer, beide mit einer Haftschicht aus Titan (ca. 3 nm), verwendet. Goldsubstrate mit einer Goldschichtdicke von 10 nm und 30 nm wurden bei der Fa. Albert PVD, Substrate mit einer Goldschichtdicke von 50 nm bei der Fa. PHASIS erworben. Zur Probenpräparation wurden die Substrate in quadratische Stücke von etwa (8 x 8) mm<sup>2</sup> geschnitten.

Entionisiertes Wasser wurde einem Reinstwassersystem (Modell Simplicity, Fa. Millipore) entnommen und hatte einen spezifischen Widerstand von 18.2 M $\Omega$  cm.

Für die Vorbehandlung der Substrate wurde Ethanol (p.a., Fa. VWR Prolabo), konzentrierte Schwefelsäure (suprapur, Fa. Merck) und Wasserstoffperoxidlösung (30 % in H<sub>2</sub>O, Fa. AppliChem) verwendet.

Zur Herstellung der Silan-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si wurden *n*-Octadecyltrichlorsilan (OTS, 95 %, Fa. ABCR Chemicals), 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APS, 96 %, Fa. ABCR Chemicals), 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trichlorsilan (PEGCl, 90 %, 6-9 EG-Einheiten, Fa. ABCR Chemicals), 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilan (PEGMeO, 90 %, 6-9 EG-Einheiten, Fa. ABCR Chemicals) und 11-Bromundecyltrichlorsilan (BrUTS, 95 %, Fa. ABCR Chemicals) verwendet. Toluol (p.a., Fa. Acros Organics) wurde über Natrium destilliert und unter Argon (Reinheit 5.0) in einer Glove-Box (Modell GP[concept], Fa. Jacomex) gelagert.

Zur Herstellung von Thiol-SAMs auf Au-Substraten wurden 1-Hexadecanthiol (HDT, > 95 %, Fa. Fluka), 16-Mercaptohexadecansäure (MHDS, 90 %, Fa. Aldrich), 11-Mercapto-1undecanol (MUD, 97 %, Fa. Aldrich) und 11-Azido-1-undecanthiol (ADT, 96 %, Fa. Aldrich) verwendet. Ethanol p.a. wurde für ca. 5 min mit Argon entgast und in einer Glove-Box gelagert. Der Beschichtungslösung für MHDS-SAMs wurde konzentrierte Essigsäure (p.a., Fa. Fisher Scientific) zugegeben.

Zur Funktionalisierung der ODS-Schichten wurden Brom (p.a., Fa. Janssen Chimica), Natriumazid (> 99.5 %, Fa. Sigma Aldrich), Lithiumaluminiumhydrid (> 97 %, Fa. Sigma Aldrich) und Salzsäure (p.a., > 37 %, Fa. Riedel de Haen) verwendet. Für die Bromierung wurde Tetrachlorkohlenstoff (> 99.8 %, Fa. Carl Roth KG) verwendet. Die Lösungsmittel *N*,*N*-Dimethylformamid (DMF, > 99 %, Fa. AppliChem) und Diethylether (p.a., Fa. Fisher Scientific) wurden über Molekularsieb (0.3 nm, Fa. Merck) getrocknet und unter Argon gelagert.

Für die Experimente zur Proteinadsorption wurde phosphatgepufferte Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) verwendet. Zur Herstellung der PBS (0.01 M Gesamt-Phosphat, 0.0027 M Kaliumchlorid, 0.137 M Natriumchlorid in H<sub>2</sub>O) wurden PBS-Tabletten (Fa. Sigma Aldrich) verwendet. Als Proteine wurden Albumin aus Rinderserum (*Bovine Serum Albumin*, BSA, M = 66.5 kDa, Dimensionen: (14.1 x 4.2 x 4.2) nm<sup>3</sup> [183]) und Streptavidin (M = 52.8 kDa, Dimensionen: (5.8 x 5.4 x 4.8) nm<sup>3</sup> [184]) eingesetzt. Es wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor555 markiertes BSA (3-6 mol Farbstoff pro mol Albumin, Fa. Molecular Probes) und Streptavidin (2-4 mol Farbstoff pro mol Streptavidin, Fa. Molecular Probes), biotinyliertes BSA (8-16 mol Biotin pro mol Albumin, Fa. Sigma Aldrich) und mit Goldclustern markiertes Streptavidin (NANOGOLD-Streptavidin-Konjugat, 80 µg/L in PBS, Fa. Molecular Probes) verwendet. Als Tensid wurde Triton X-100-Lösung (10 % in H<sub>2</sub>O, Fa. Sigma Aldrich) verwendet.

Zum nasschemischen Ätzen von Gold wurden Kaliumhydroxid (p.a., Fa. Merck), Kaliumhexacyanoferrat(III) (> 99 %, Fa. Sigma Aldrich). Kaliumhexacyanoferrat(II) (> 99 %, Fa. Riedel de Haen) und Kaliumthiosulfat (> 98 %, Fa. Fluka) verwendet.

Zur Funktionalisierung mit DNA wurden Oligonukleotide der Fa. IBA verwendet. Zur Immobilisierung wurden Stränge der Sequenz 5'-CCA CGG ACT ACT TCA AAA CTA-3' verwendet. Diese waren am 5'-Ende über einen C6-Spacer amino- oder thiolmodifiziert und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) markiert. Zur Hybridisierung wurde ein zum ersten Strang komplementärer Strang der Sequenz 5'-TAG TTT TGA AGT AGT CCG TGG-3', der am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert war, verwendet. Die Oligonukleotide wurden als wässrige Lösung mit einer Konzentration von 0.1 nmol/µL geliefert. Durch Verdünnung von 20x konzentrierter Standard Natriumchlorid/Natriumcitrat-Pufferlösung (*Saline Sodium Citrate*, SSC, 20x = 3 M Natriumchlorid, 0.3 M Natriumcitrat in H<sub>2</sub>O, Fa. Sigma Aldrich) wurden SSC-Pufferlösungen verschiedener Konzentrationen erhalten.

Außerdem wurden Natriumlaurylsulfat (SDS, > 99 %, Fa. Sigma Aldrich), *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 98 %, Fa. Aldrich), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid·Hydrochlorid (EDC, > 98 %, Fa. Fluka), eine Glutaraldehydlösung (25 % in H<sub>2</sub>O, Fa. Sigma Aldrich), Magnesiumchlorid (> 98 %, Fa. Sigma) und eine Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (0.1 M in H<sub>2</sub>O, pH = 8.5, Fa. Sigma) eingesetzt.

Als Polymere zur laserinduzierten Anbindung wurden Polystyrol (PS,  $M_w$  = 200000 g/mol, Fa. Acros Organics), Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm,  $M_w$  = 19000-30000 g/mol, Fa. Aldrich), Poly[(methylmethacrylat)-*co*-(7-(4-trifluormethyl)cumarinacrylamid)] (P(MMA-*co*-FCA), 25 mol%, Fa. Sigma Aldrich) und Polyethylenglycol (PEG,  $M_n$  = 16000-24000 g/mol, Fa. Sigma) verwendet. Als Lösungsmittel kamen Toluol (p.a., Fa. Acros Organics), Ethanol (p.a., Fa. VWR Prolabo) und Dichlormethan (p.a., Fa. Fisher Chemical) zum Einsatz.

Für die Herstellung citratstabilisierter Nanopartikel wurde Gold(III)chloridlösung (30 % in HCl 99.99 %, Fa. Aldrich) und Trinatriumcitrat·Dihydrat (> 99 %, Fa. Fluka) verwendet.

# 3.1.2 Vorbehandlung der Siliciumsubstrate

Vor der Beschichtung der Siliciumsubstrate mit Silanen, erfolgte eine mehrstufige Vorbehandlung der Substrate. Die Substrate wurden zunächst für 5 min in Ethanol im Ultraschallbad behandelt, dann wurden sie mit einem fusselfreien Tuch mit Ethanol abgewischt. Anschließend wurden die Substrate einer Piranha-Behandlung unterzogen. Hierzu wurden die Substrate auf den Boden eines Becherglases gelegt und in dem Becherglas eine Mischung aus Wasserstoffperoxidlösung (30 % in H<sub>2</sub>O) und konzentrierter Schwefelsäure im Verhältnis 1:3 angesetzt. Die Lösung wurde für etwa 30 min zum Sieden erhitzt. Danach wurde die Lösung abdekantiert, die Substrate sehr gründlich mit Millipore-Wasser gespült und im Argonstrom getrocknet.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden zum einen Siliciumwafer mit einer nativen Oxidschicht von etwa 1-2 nm und zum anderen thermisch oxidierte Substrate mit einer Oxidschicht von etwa 100 nm Dicke verwendet. Letztere wurden hergestellt, indem die Substrate nach Reinigung mit Ethanol in einem offenen Rohrofen für 6 h auf etwa 1200 °C erhitzt wurden. Anschließend wurde die Piranha-Behandlung wie oben beschrieben durchgeführt.

Thermisch oxidierte Substrate sind für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen besser geeignet. Durch die dickere Oxidschicht wird der Abstand zwischen dem sich auf der Oberfläche befindenden Fluorophors zum Silicium vergrößert. Hierdurch wird ein Quenching der Fluoreszenz durch das Silicium verhindert, was die Detektion der Fluoreszenz erleichtert [185].

# 3.1.3 Vorbehandlung der Goldsubstrate

Vor der Beschichtung von Goldsubstraten mit Thiolen wurden die Substrate in zwei Schritten gereinigt. Zunächst wurden die Substrate für 5 min in Ethanol mit Ultraschall behandelt und dann im Argonstrom getrocknet. Anschließend wurden die Substrate einer Piranha-Behandlung unterzogen. Hierzu wurden die Substrate auf den Boden eines Becherglases gelegt und in dem Becherglas eine Mischung aus Wasserstoffperoxidlösung (30 % in H<sub>2</sub>O) und konzentrierter Schwefelsäure im Verhältnis 1:3 angesetzt. Die Substrate wurden für etwa 5 min in der Lösung belassen, dann die Piranha-Lösung abdekantiert, die Substrate sehr gründlich mit Millipore-Wasser gespült und schließlich im Argonstrom getrocknet.

# 3.1.4 Herstellung organischer Monoschichten

Die Herstellung organischer Monoschichten auf den, wie unter Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, vorbehandelten Substraten erfolgte durch unterschiedliche Verfahren. Je nach Precursormolekül wurde das Substrat durch Dip-Coating, aus der Gasphase oder durch Aufbringen der reinen Substanz beschichtet. Die einzelnen Verfahren werden im Folgenden beschrieben.

## Herstellung von ODS-Monoschichten

Für die Herstellung vollständiger ODS-Monoschichten wurde in einer Glove-Box unter Argon eine 2.5 mM Lösung von OTS in trockenem Toluol in einem Iodzahlkolben frisch angesetzt. Die vorbehandelten Siliciumsubstrate wurden mit Hilfe einer speziellen Glashalterung vollständig in die Lösung eingetaucht und der Kolben verschlossen. Der verschlossene Kolben wurde ausgeschleust und für 18 h im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben zunächst mit Toluol, dann mit Ethanol gespült und zuletzt im Argonstrom getrocknet. Messungen des statischen Wasserkontaktwinkels auf den beschichteten Proben ergaben Werte um 108°.

## Herstellung von APS-Monoschichten

Die Herstellung von APS-Monoschichten erfolgte aus der Gasphase. Die vorbehandelten Siliciumsubstrate wurden auf einem Drahtnetz in einer speziell angefertigten Beschichtungskammer platziert. Abbildung 3.1 zeigt eine Skizze der verwendeten Beschichtungskammer. Unten in die Kammer wurde ein kleines offenes Gefäß mit 10 µL APS gestellt. Es wurde 30 min lang Argon durch die Kammer geleitet. Der APS-SAM bildet sich durch Adsorption

aus der Gasphase. Auf den mit APS beschichteten Proben wurde ein statischer Wasserkontaktwinkel von etwa 50° gemessen.



Abbildung 3.1: Skizze der Kammer zur APS-Beschichtung.

## Herstellung von PEGMeO-Monoschichten

Zur Herstellung von PEGMeO-Monoschichten wurde eine Schicht von PEGMeO auf ein vorbehandeltes Siliciumsubstrat mittels Spin-Coating aufgebracht. Hierzu wurden 40 µL PEGMeO in Ruhe auf das Substrat gegeben und das Substrat etwa 5 s lang mit 2500 rpm abrotiert. Dann wurde das Substrat für 10 min auf einem Metallteller auf eine Heizplatte mit einer Temperatur von 70 °C gelegt. Anschließend wurde das nicht angebundene PEGMeO durch mehrfaches Spülen mit Ethanol entfernt. Zuletzt wurde die Probe im Argonstrom getrocknet. Auf den mit PEGMeO beschichteten Proben wurde ein statischer Wasserkontakt-winkel von etwa 33° gemessen.

#### Herstellung von PEGCI-Monoschichten

Zur Herstellung von PEGCI-Monoschichten wurde eine Beschichtungskammer bestehend aus 2 Glasobjektträgern und einem vitonbeschichteten O-Ring verwendet. Der O-Ring wurde auf einen Objektträger gelegt und eine vorbehandelte Siliciumprobe innerhalb des O-Rings platziert. 40 µL PEGCI wurden direkt auf die Probe getropft, so dass die Oberfläche benetzt ist. Der zweite Objektträger wurde auf den O-Ring gelegt, um die Kammer zu schließen. Nach einer Einwirkzeit von 4 h wurde die Probe gründlich mit Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet. Messungen des statischen Wasserkontaktwinkels auf den mit PEGCI beschichteten Proben ergaben Werte um 38°.

## Herstellung von HDT-Monoschichten

Zur Herstellung von HDT-Monoschichten wurde in einem Iodzahlkolben eine 1 mM Lösung von HDT in entgastem Ethanol in einer Glove-Box unter Argon hergestellt und etwa 5 min gerührt. Die vorbehandelten Goldsubstrate wurden in eine spezielle Glashalterung gestellt und in die Lösung eingetaucht, der Kolben verschlossen und die Lösung unter Rühren für 18 h in der Glove-Box aufbewahrt. Anschließend wurde der Kolben mitsamt den Proben ausgeschleust und die Proben mit Ethanol gereinigt. Schließlich wurden die Proben im Argonstrom getrocknet. Messungen des statischen Wasserkontaktwinkels auf den mit HDT beschichteten Proben ergaben Werte um 109°.

## Herstellung von MHDS-Monoschichten

Die Herstellung von MHDS-Monoschichten nach [186] erfolgte aus einer Lösung von MHDS in Ethanol unter Zusatz von Essigsäure. In einer Glove-Box wurde eine Lösung von 14.4 mg MHDS in 47.5 mL entgastem Ethanol in einem Iodzahlkolben hergestellt, der Kolben verschlossen und ausgeschleust. Dann wurden 2.5 mL konzentrierte Essigsäure hinzugegeben, die Proben in einer speziellen Glashalterung in die Lösung eingetaucht und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur im verschlossenen Kolben gerührt. Dann wurden die Proben gründlich mit Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet. Der statische Wasserkontaktwinkel auf den mit MHDS beschichteten Proben lag unter 15°.

#### Herstellung von ADT-Monoschichten

Zur Präparation von ADT-SAMs auf Goldsubstraten wurde in einer Glove-Box in einem Iodzahlkolben eine 1 mM Lösung von ADT in entgastem Ethanol hergestellt. Die vorbehandelten Goldsubstrate wurden in einer speziellen Glashalterung in die Lösung eingetaucht und die Lösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde der Kolben ausgeschleust, die Proben mit Ethanol gereinigt und im Argonstrom getrocknet. Auf mit ADT beschichteten Proben wurde ein statischer Wasserkontaktwinkel von 76° gemessen.

#### 3.1.5 Funktionalisierung von ODS-Monoschichten

Durch nasschemische Verfahren können in die Alkylketten der ODS-Monoschicht funktionelle Gruppen eingebracht bzw. diese verändert werden. Die zur laserinduzierten Anbindung von Polymeren verwendeten azidterminierten SAMs wurden durch Bromierung und anschließende Azidierung von ODS-SAMs erhalten. Zur lokalen Immobilisierung von aminomodifizierter DNA auf strukturierten ODS-SAMs wurden mittels laserinduzierter Bromierung strukturierte SAMs anschließend nasschemisch azidiert und aminiert.

# Bromierung von ODS-SAMs

Zur Bromierung von ODS-SAMs kann die radikalische Bromierung genutzt werden. Hierzu wurden 50 µL Brom in 50 mL Tetrachlorkohlenstoff in einem 100 mL-Rundkolben gelöst. Eine mit OTS beschichtete Probe wurde mit der beschichteten Seite nach unten in einen Probenhalter aus Teflon eingeklemmt und in die Lösung eingetaucht. Der Kolben wurde über einer 200 W Glühlampe platziert und für 7 h bestrahlt. Der Abstand zwischen dem Kolben und der Glühlampe betrug hierbei etwa 4 cm. Dann wurde die Probe mit Ethanol gereinigt und im Argonstrom getrocknet. Auf bromierten ODS-SAMs wurde ein statischer Wasserkontaktwinkel von 82° gemessen.

Alternativ wurden bromterminierte SAMs unter Verwendung eines bromfunktionalisierten Precursors hergestellt. In einem Iodzahlkolben wurde in einer Glove-Box eine Lösung von 40 µL BrUTS in 40 mL trockenem Toluol angesetzt. Vorbehandelte Siliciumsubstrate wurden in einer speziellen Glashalterung in die Lösung eingetaucht und der Kolben verschlossen. Der Kolben wurde ausgeschleust und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurden die Proben mit Toluol und Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet. Der statische Wasserkontaktwinkel auf den BrUTS-SAMs betrug 85°.

# Azidierung bromierter ODS-SAMs

Eine bromterminierte ODS-Monoschicht kann durch eine nukleophile Substitutionsreaktion in eine azidterminierte Monoschicht umgewandelt werden. Hierzu wurde in einem 100 mL Zweihalskolben eine Lösung von 200 mg Natriumazid in 50 mL DMF unter Argon angesetzt. Eine Probe mit einer bromterminierten Monoschicht wurde in einer speziellen Glashalterung in den Kolben gehangen. Der Kolben wurde mit einem Trockenrohr verschlossen und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Probe in Ethanol gründlich gespült und im Argonstrom getrocknet. Der statische Wasserkontaktwinkel auf den azidierten ODS-SAMs betrug 72°.

# Aminierung azidierter ODS-SAMs

Eine azidterminierte ODS-Schicht kann durch eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in eine aminoterminierte ODS-Schicht umgewandelt werden. Hierzu wurden 200 mg Lithiumaluminiumhydrid in einem 100 mL Dreihalskolben mit aufgesetztem Trockenrohr unter Argon zu 50 mL trockenem Diethylether gegeben. Die Suspension wurde 1 h gerührt. Dann wurde eine Probe mit einer azidterminierten ODS-Schicht in einer speziellen Glashalterung in die Lösung eingetaucht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Probe zunächst mit Diethylether, dann mit 10 %iger wässriger Salzsäurelösung und schließlich mit Millipore-Wasser gespült und im Argonstrom getrocknet. Auf aminierten ODS-SAMs wurde ein statischer Wasserkontaktwinkel von 60° gemessen.

# 3.1.6 Nasschemisches Ätzen von Gold

Für das nasschemische Ätzen von Gold wurde eine wässrige alkalische Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(II) und (III) und Kaliumthiosulfat nach [187] verwendet. In einem braunen Schraubdeckelglas wurden 2.8 g Kaliumhydroxid, 165 mg Kaliumhexacyanoferrat(III), 21 mg Kaliumhexacyanoferrat(II) und 952 mg Kaliumthiosulfat eingewogen. Das Gefäß wurde mit 50 mL Millipore-Wasser aufgefüllt und die Lösung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde eine strukturierte Probe für eine von der Goldschichtdicke des Substrats abhängige Ätzzeit in die Lösung eingetaucht, gründlich mit Millipore-Wasser gespült und im Argonstrom getrocknet. Zur Bestimmung der jeweiligen Ätzzeit wurde eine mit HDT beschichtete Probe großflächig mit dem Laser strukturiert und automatisiert, stufenweise in die Ätzlösung eingetaucht, so dass auf einer Probe verschiedene Einwirkzeiten getestet werden konnten. Die Ätzzeit wurde so gewählt, dass der Goldfilm in den strukturierten Bereichen vollständig entfernt, eine Verbreiterung der Strukturen durch isotropes Ätzen jedoch minimal ist. Die verwendeten Ätzzeiten sind abhängig vom Substrattyp in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

verschiedene Goldsubstrattypen.			
Substrattyp	Ätzzeit [min]		
10 nm-Au/Glas	8		

15

17

30 nm-Au/Glas

50 nm-Au/Glas

**Tabelle 3.1:** Einwirkzeiten der Ätzlösung für verschiedene Goldsubstrattypen.

3.1.7	Immobilisierung von	DNA
	minio on sicilari si von	

Mit DNA funktionalisierte Oberflächenstrukturen wurden zum einen ausgehend von HDT-Monoschichten auf goldbeschichteten Glassubstraten hergestellt. Hierbei wurde zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgegangen. Ausgangspunkt war in beiden Fällen eine laserstrukturierte HDT-Monoschicht. Zum anderen wurde DNA auf lokal aminofunktionalisierten ODS-SAMs und APS-SAMs auf oxidierten Siliciumsubstraten immobilisiert. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte zum Aufbau der DNA-funktionalisierten Oberflächenstrukturen beschrieben.

# Anbindung thiolmodifizierter ssDNA ausgehend von HDT-SAMs auf Au/Glas

Ein HDT-SAM auf 50 nm-Au/Glas wurde hergestellt und mit dem Laser strukturiert. Dann wurden die strukturierten Bereiche in Anlehnung an [188] mit thiolmodifizierter ssDNA aufgefüllt. Diese war zur Anbindung an die Goldoberfläche am 3'-Ende thiolmodifiziert und zur Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie am 5'-Ende mit FAM markiert. Es wurde 1 mL einer 1 µM Lösung von ssDNA in 5x SSC-Puffer in einem Rundboden-Röhrchen hergestellt und ein Goldsubstrat für 4 h bei Raumtemperatur darin eingetaucht. Dann wurde die Probe mit 1x SSC-Pufferlösung, 1 %iger wässriger SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Ethanol gespült. Zur Erhöhung der Packungsdichte wurde die ssDNA-Monoschicht anschließend mit MUD aufgefüllt. Hierzu wurde eine Lösung von 2 mg MUD in 50 mL Ethanol hergestellt und die Probe über Nacht unter Rühren darin eingetaucht. Dann wurde die Probe mit Millipore-Wasser und Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet.

# Anbindung aminomodifizierter ssDNA ausgehend von HDT-SAMs auf Au/Glas

Es wurde zunächst ein bifunktionaler SAM auf 50 nm-Au/Glas durch Laserstrukturierung eines HDT beschichteten Substrats und anschließendes Auffüllen der strukturierten Bereiche mit MHDS aufgebaut. Ein derartiges chemisches Templat wurde zur Anbindung von aminomodifizierter ssDNA mittels EDC/NHS Kopplungschemie verwendet.

# Aktivierung der COOH-Gruppe mit EDC/NHS

Die endständigen COOH-Gruppen wurden nach [189] mittels EDC/NHS zu NHS-Estergruppen umgesetzt. Hierzu wurde in einer Glove-Box eine Lösung von EDC und NHS mit einer Konzentration von jeweils 20 mM in Ethanol angesetzt und in ein Rundboden-Röhrchen gefüllt. Eine COOH-terminierte Probe wurde über Nacht in diese Lösung eingetaucht. Dann wurde die Probe gründlich mit Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet.

#### Anbindung aminomodifizierter ssDNA an eine NHS-aktivierte Oberfläche

Zur Anbindung wurde ein Oligonukleotid verwendet, das am 3'-Ende aminomodifiziert und am 5'-Ende mit FAM markiert war. Es wurde eine 20 µM Lösung von ssDNA in 5x SSC-Puffer hergestellt und ein Tropfen von 100 µL dieser Lösung für 4 h auf die aktivierte Probe gegeben. Anschließend wurde die Probe gründlich mit 1x SSC-Pufferlösung, 1 %iger wässriger SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet. Um ein Eintrocknen des Flüssigkeitstropfens auf der Probenoberfläche zu verhindern, wurde die Funktionalisierung in einer Atmosphäre mit hohem Wassergehalt durchgeführt. Hierzu wurde die Probe in eine Petrischale gelegt. Diese wurde in eine weitere mit Millipore-Wasser gefüllte Petrischale mit größerem Durchmesser gestellt, welche mit einem Deckel abgedeckt wurde.

#### Anbindung aminomodifizierter ssDNA an einen aminoterminierten SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si

Aminomodifizierte ssDNA wurde zum einen an einen laserstrukturierten APS-SAM und zum anderen an einen lokal aminofunktionalisierten ODS-SAM angebunden. Es wurde ein Oligonukleotid verwendet, das am 3'-Ende aminomodifiziert und am 5'-Ende mit FAM markiert war. Zur Anbindung nach [190] wurde der homobifunktionale Cross-Linker Glutaraldehyd eingesetzt. Ein Tropfen von 40 µL einer 25 %igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd wurde für 15 min auf die Probenoberfläche gegeben, um die endständigen NH<sub>2</sub>-Gruppen zu aktivieren. Anschließend wurde die Probe intensiv mit Millipore-Wasser gespült. Dann wurde ein Tropfen von 100 µL einer 20 µM Lösung der ssDNA in 5x SSC-Puffer auf die Oberfläche gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 4 h wurde die Probe gründlich mit 1x SSC-Pufferlösung, 1 %iger wässriger SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet. Um ein Eintrocknen des Flüssigkeitstropfens auf der Probenoberfläche zu verhindern, wurde die Probe in eine Petrischale gelegt. Diese wurde in eine weitere mit Millipore-Wasser gefüllte Petrischale mit größerem Durchmesser gestellt, welche mit einem Deckel abgedeckt wurde.

#### Hybridisierung

Auf strukturierten Substraten immobilisierte ssDNA wurde mit einem komplementären DNA-Strang hybridisiert. Der komplementäre Strang war am 3'-Ende mit TAMRA markiert. Zur Hybridisierung wurden 880 µL einer 10 µM Lösung von ssDNA in 5x SSC-Puffer in einem Rundboden-Röhrchen angesetzt und die Probe über Nacht unter Lichtausschluss darin eingetaucht. Anschließend wurde die Probe gründlich mit 1x SSC-Pufferlösung, 1 %iger wässriger SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet.

# 3.1.8 Adsorption von Proteinen

Auf strukturierten, mit PEG funktionalisierten Proben wurden Experimente zur Adsorption von Proteinen durchgeführt. Die hierzu eingesetzten Proteine, die Konzentrationen der in den Experimenten verwendeten Lösungen und die jeweiligen Einwirkzeiten sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Die experimentellen Parameter wurden in Anlehnung an in beschriebene zur Proteinadsorption der Literatur Experimente an Oberflächen [128, 191, 192] und die Anwendungshinweise der Fa. Molecular Probes gewählt. In einem Experiment zur Adsorption wurde ein Tropfen von 100 µL einer proteinhaltigen Lösung auf die Probenoberfläche aufgebracht. Um ein Eintrocknen des Flüssigkeitstropfens auf der Probenoberfläche zu verhindern, wurde die Adsorption in einer Atmosphäre mit hohem Wassergehalt durchgeführt. Hierzu wurde die Probe in eine Petrischale gelegt. Diese wurde in eine weitere mit Millipore-Wasser gefüllte Petrischale mit größerem Durchmesser gestellt, welche mit einem Deckel abgedeckt wurde. Zur Adsorption von biotinyliertem BSA wurde die proteinhaltige Lösung in ein Rundboden-Röhrchen gefüllt und die Probe darin eingetaucht. Nach Ablauf der jeweiligen Einwirkzeit wurde die Probe mit PBS und Millipore-Wasser gründlich gespült und im Argonstrom getrocknet.

Protein	c [µg/mL]	t [h]
AlexaFluor555-BSA	250	1
biotinyliertes BSA	500	18
AlexaFluor555-Streptavidin	50	4
Goldcluster-Streptavidin	80	4

**Tabelle 3.2:** Experimentelle Parameter der Versuche zurAdsorption der verschiedenen Proteine.

# 3.2 Laserstrukturierung

In diesem Kapitel wird zunächst der zur Strukturierung verwendete Aufbau beschrieben. Anschließend folgt die Beschreibung eines typischen Strukturierungsexperiments. In dieser Arbeit wurde die Laserstrukturierung in unterschiedlichen Medien durchgeführt. Diese speziellen Strukturierungsexperimente werden am Ende dieses Kapitels erläutert.

# 3.2.1 Der Laseraufbau

Bei der photothermischen Laserstrukturierung wird ein Laserstrahl auf die Probenoberfl**Š**che fokussiert und die Probe in der fokalen Ebene bewegt, um Strukturen zu erzeugen. Der zur Strukturierung verwendete Aufbau ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Um Schwingungen des Aufbaus zu vermeiden, befand sich dieser auf einer auf Gummif**§**n gelagerten Marmorplatte.



Abbildung 3.2: Skizze des zur Laserstrukturierung verwendeten optischen Aufbaus.

Zur ErlŠuterung des Aufbaus wird der Weg des Laserstrahls vom Laser bis zur ProbenoberflŠche beschrieben. Als Lichtquelle wurde ein DPSS-Laser (Modell Ventus, Fa. Laser Quantum) verwendet. In diesem entsteht Laserstrahlung der WellenlŠ ge 1064 nm, indem ein Nd:YAG-Kristall von einer GaAlAs-Laserdiode mit der WellenlŠge von 808 nm gepumpt wird. Durch Frequenzverdopplung wird Laserlicht im sichtbaren Bereich mit einer WellenlŠge von 532 nm erzeugt. Der emittierte Laserstrahl hat einen 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser von etwa 1.8 mm, ein gaußförmiges Intensitätsprofil und eine maximale Leistung von 750 mW. Die Beugungsma§ahl  $M^2$  des Laserstrahls betrŠgt 1.17.<sup>a</sup>

Zur Modulation der Intensit**Š** wurde ein temperaturstabilisierter akusto-optischer Filter (*Acousto Optical Tunable Filter*, AOTF, Modell AOTFnc vis, Fa. AA Opto-Electronic) eingesetzt. In einem AOTF wird mittels eines Erregerpiezos ein Feld hochfrequenter Schallwellen in einem optisch transparenten TeO<sub>2</sub>-Kristall erzeugt. Die Schallwellen

a Die Beugungsma**§**ahl des Laserstrahls wurde nach der ISO-Norm 11146 bestimmt (s. Anhang 6.2).

verursachen eine periodische Dichtevariation im Kristallgitter, was zur Beugung einer in den Kristall eintretenden Lichtwelle führt. Durch eine externe Spannungsquelle (0-10 V) kann die Intensität der Schallwellen variiert werden, wodurch sich die Intensität des gebeugten Lichtstrahls stufenlos regulieren lässt.

Der aus dem AOTF austretende Laserstrahl wurde durch eine optische Diode gelenkt. Diese besteht aus einem Strahlteilerwürfel und einem  $\lambda/4$ -Plättchen. Die optische Diode wurde verwendet, um das von der Probe reflektierte Licht aus dem Strahlengang zu entfernen, damit es nicht zurück in den Laser gelangt und somit eine Beeinflussung der Laserleistung durch Rückkopplung ausgeschlossen wird. Der von der Probe reflektierte Strahl konnte auf einen weißen Schirm gelenkt und als Justagehilfe beim Strukturierungsexperiment genutzt werden.

Hinter der optischen Diode wurde der Laserstrahl durch einen gallileischen Strahlaufweiter aufgeweitet. Hierbei handelte es ich um einen 4-fach Strahlaufweiter, zusammengesetzt aus einer plankonkaven Streulinse (f = -20 mm) und einer plankonvexen Sammellinse (f = 80 mm). Beide Linsen waren für die verwendete Wellenlänge antireflex-beschichtet (Optikwerkstatt der Universität Duisburg-Essen). Der Abstand der Linsen wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube so justiert, dass der Laserstrahl hinter dem Strahlaufweiter kollimiert war. Hierbei wurde eine Shear-Plate (Fa. Melles-Griot) zur Kontrolle eingesetzt, welche die Kollimation des Laserstrahls durch ein Interferenzmuster anzeigt.

Der aufgeweitete Laserstrahl wurde mit einem Spiegel in Richtung eines konventionellen Mikroskopobjektivs abgelenkt und mit diesem auf die Probe fokussiert. Zur Strukturierung konnte zwischen zwei Objektiven gewählt werden. Zum einen konnte ein Objektiv mit einer numerischen Apertur NA = 0.25 und zum anderen eines mit NA = 0.4 (beide Fa. Olympus) eingesetzt werden. Beide Objektive waren an einem Objektivrevolver montiert, der an einem mit einem Schrittmotor (Modell PLS85, Fa. Micos) betriebenen Linear-Verschiebetisch befestigt war. So konnten die Objektive in z-Richtung bewegt werden, um den Fokus auf die Probenoberfläche zu justieren.

Zur Strukturierung wurde eine Probe auf einen Probenhalter aufgeklebt, der mit Hilfe von Magneten auf einem durch Mikrometerschrauben in zwei Achsen kippbaren Tisch fixiert wurde. Durch Verkippung des Tischs konnte die Probe mit einer Genauigkeit von unter 1 µm parallel zur Fokusebene ausgerichtet werden. Der kippbare Tisch war auf zwei im Winkel von 90° versetzten Linear-Verschiebetischen montiert, die von Schrittmotoren (Modell PLS85, Fa. Micos) betrieben wurden. Zur Motorsteuerung wurde der Controller SMC hydra (Fa. Micos) verwendet. So wurde eine Bewegung der Probe in der fokalen Ebene mit einer Geschwindigkeit von maximal 15 mm/s über eine Fläche von (32 x 32) mm<sup>2</sup> ermöglicht.

Der Durchmesser des zur Strukturierung verwendeten Laserspots wurde mit einem Messgerät (Modell Beam Master BM-3, Fa. Coherent) nach der Knife-Edge-Methode bestimmt. Bei Verwendung des Objektivs mit NA = 0.25 wurde der 1/e<sup>2</sup>-Spotdurchmesser zu 2.8 µm bestimmt, der 1/e<sup>2</sup>-Spotdurchmesser des Objektivs mit NA = 0.4 betrug 2 µm. Zur Messung der Intensität des aus dem Mikroskopobjektiv austretenden Laserstrahls wurde ein digitales Powermeter (Modell Fieldmaster GS, Fa. Coherent) mit angeschlossenem pyroelektrischen Sensor (Modell PM3Q, Messbereich: 0.2 mW - 2 W, relative Genauigkeit ± 1 % oder Modell LM-2, Messbereich: 10 nW - 50 mW, Genauigkeit ± 5 %, Fa. Coherent) verwendet.

Zur Steuerung des Laseraufbaus wurde eine in LabView programmierte Software auf einem PC-System verwendet, diese ist in [193] detailliert beschrieben. Die Software ermöglicht die programmgesteuerte Ausführung von relativen und absoluten Bewegungen der drei Verschiebetische mit wählbarer Geschwindigkeit und Beschleunigung in einer Sequenz und das Ansprechen eines Pulsgenerators (Modell 33522, Fa. Agilent), dessen Signal wiederum als Steuersignal für den AOTF verwendet wurde, zum An- und Ausschalten und zur Regulierung der Intensität des Laserstrahls. Da die Ansprechzeit des AOTF im Bereich weniger Mikrosekunden liegt, entspricht die Bestrahlungszeit der Probe der Dauer des vom Pulsgenerator ausgegebenen Pulses. Dieser Aufbau ermöglicht eine einfache Strukturierung der Proben mit komplexen Linien- und Punktmustern.

# 3.2.2 Strukturierungsexperimente

Für ein Strukturierungsexperiment wurde ein Substrat auf dem Probentisch des Laseraufbaus montiert. Bevor ein Muster auf die Probe geschrieben werden konnte, musste diese zunächst durch Verkippung des Probentischs in der Fokusebene ausgerichtet werden. Hierzu wurde der von der Probenoberfläche reflektierte und auf einen weißen Schirm gelenkte Laserstrahl genutzt. Der Durchmesser des auf dem Schirm erscheinenden Spots durchläuft ein Minimum, wenn die Probenoberfläche durch die Fokusebene bewegt wird. Bei konstanter z-Position wurden die jeweils gegenüberliegenden Ränder der Probe angefahren und gleichzeitig der Spot auf dem weißen Schirm beobachtet. Verändert sich dessen Durchmesser, so liegt die Probe nicht parallel zur Fokusebene. Die Neigung der Probenoberfläche wurde mit den Mikrometerschrauben des kippbaren Probentisches ausgeglichen, bis bei der Bewegung der Probe in x- und y-Richtung keine Veränderung des Durchmessers des projizierten Spots mehr zu beobachten war.

Nachdem die Probe auf diese Weise parallel zur Fokusebene ausgerichtet worden ist, wurde die z-Position des Objektivs bestimmt, bei der die Probe sich im Fokus des Laserspots befindet. Um diese zu finden, wurde das Anschmelzen des Substrats zur Orientierung verwendet. Das Schmelzen des Substrats ist durch ein Flackern des vom Substrat reflektierten Lichts zu erkennen. Die zum Schmelzen benötigte Leistung hängt empfindlich vom Durchmesser des Laserspots auf der Probenoberfläche ab. Befindet sich die Probenoberfläche etwas außerhalb der Fokusebene, wird eine höhere Leistung zum Schmelzen benötigt. Zur Bestimmung der Fokusebene wurde die Probe zunächst grob anhand der Beobachtung des Spots auf dem weißen Schirm in die Fokusebene gebracht. Dann wurde die Laserleistung langsam erhöht, bis ein Flackern das Anschmelzen des Substrats anzeigte. Nun wurde das Objektiv einige Mikrometer nach oben bewegt, der Laser bei gleicher Laserleistung angeschaltet und das Objektiv in kleinen Schritten nach unten gefahren, bis wieder ein Anschmelzen zu erkennen war. Diese z-Position wurde notiert und die Vorgehensweise in der entgegengesetzten Richtung wiederholt. Der Mittelwert der beiden so ermittelten z-Werte entspricht der z-Position, bei der sich die Probenoberfläche in der Fokusebene befindet. Anschließend wurde in der Fokusebene die Laserleistung gemessen, die zum Anschmelzen des Substrats benötigt wurde.

Nach der Ausrichtung der Probe wurde das eigentliche Strukturierungsexperiment durchgeführt. Hierbei wurden zunächst durch Anschmelzen des Substrats Markierungslinien auf die Probe geschrieben. Diese sind im Lichtmikroskop zu erkennen und ermöglichen es, die strukturierten Bereiche wiederzufinden. Anschließend wurden die Proben mit Punkt- und Linienmustern unter Variation von Laserleistung und Pulslänge bzw. Schreibgeschwindigkeit strukturiert.

Der von der Probenoberfläche reflektierte und auf den weißen Schirm projizierte Spot konnte auch zur Orientierung auf einer bereits mit Schmelzlinien markierten Probe genutzt werden. Die der Markierung dienenden Schmelzlinien sind auf dem Schirm erkennbar. Daher konnten mehrstufige Strukturierungsexperimente durchgeführt werden, bei denen die Probe zwischenzeitlich aus dem Laseraufbau ausgebaut wurde.

# Laserinduzierte Anbindung von Polymeren an azidterminierte SAMs

Zur lokalen Anbindung eines Polymers an eine azidterminierte Schicht, wurde zunächst ein ODS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si hergestellt (s. Kapitel 3.1.4 ). Dieser wurde, wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben, zuerst bromiert und anschließend azidiert. Auf den azidterminierten SAM wurde mittels Spin-Coating ein etwa 40 nm dicker Polymerfilm aufgebracht. Die hierzu verwendeten Polymerlösungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Ein Tropfen der Polymerlösung wurde in Ruhe auf die Probe gegeben und diese bei 2500 rpm für etwa 5 s abrotiert. Die polymerbeschichtete Probe wurde in den Laseraufbau verbracht und wie oben beschrieben strukturiert. Nach der Laserstrukturierung wurde das überschüssige Polymer, das

nicht an die Monoschicht angebunden war, mit einem geeigneten Lösungsmittel im Ultraschallbad entfernt. So wurden die an der Oberfläche angebundenen Polymerfilme freigelegt. Abschließend wurde die Probe mit Ethanol gespült und im Argonstrom getrocknet.

Polymer	Lösungsmittel	c [g/L]
PS	Toluol	10
PNIPAAm	Ethanol	5
P(MMA-co-FCA)	Toluol	10
PEG	Chloroform	10

**Tabelle 3.3:** Beim Spin-Coating verwendete Polymer-lösungen.

# Laserinduzierte Bromierung von ODS-SAMs

Zur laserinduzierten Bromierung einer ODS-Schicht nach [193] wurde eine spezielle Reaktionszelle verwendet, die die Laserstrukturierung eines Substrats unter Bromgasatmosphäre ermöglicht. Ein, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, mit OTS beschichtetes Siliciumsubstrat wurde in die Reaktionszelle verbracht. Die Zelle wurde evakuiert und mit Bromgas bis zu einem Druck von etwa 200 mbar gefüllt. Dann wurde die Reaktionszelle in den Laseraufbau integriert und die Strukturierung der ODS-Schicht unter Bromgasatmosphäre durchgeführt. Zur Strukturierung unter Bromgasatmosphäre wurde ein Argon-Ionen-Laser bei einer Wellenlänge von 514 nm verwendet.

#### Laserinduzierte Bildung von Goldnanopartikeln

Zur laserinduzierten, lokalen Bildung von Goldnanopartikeln wurde eine mit APS beschichtete Siliciumprobe in einer wässrigen Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat mit dem Laser strukturiert. Hierzu wurde eine, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, mit APS beschichtete Probe mittels einer Teflonhalterung in einer Küvette mit einer Innenhöhe von 5 mm und einer Innenbreite von 18.5 mm aus optischem Glas (Fa. Hellma) montiert (s. Abbildung 3.3). Der Abstand zwischen der Probenoberfläche und der Innenwand der Küvette betrug etwa 500 µm. Die Küvette wurde mit einer Lösung von Goldsäure und befüllt. Natriumcitrat in Millipore-Wasser Es wurden Lösungen verschiedener Stoffmengenverhältnisse von Goldsäure und Natriumcitrat hergestellt. Die Konzentrationen der bei den Strukturierungsexperimenten verwendeten Lösungen können Tabelle 3.4 entnommen werden. Die Werte orientieren sich an bei der nasschemischen Synthese von



**Abbildung 3.3:** Skizze der verwendeten Halterung zur Montage eines Substrats in der Küvette zwecks Laserstrukturierung in Lösung.

Goldnanopartikeln angewendeten Konzentrationen [137]. Die Küvette wurde im Laseraufbau fixiert, der Laserstrahl auf die Probenoberfläche fokussiert und die Strukturierung in Lösung durchgeführt. Nach der Strukturierung wurde die Probe mit Millipore-Wasser gespült und im Argonstrom getrocknet.

**Tabelle 3.4:** Bei der Strukturierung verwendete,<br/>wässrige Lösungen von Goldsäure und Natrium-<br/>citrat.

c <sub>Au</sub> [mmol/L]	c <sub>Ci</sub> [mmol/L]	n <sub>Au</sub> :n <sub>Ci</sub>
0.236	1.361	0.17
0.307	0.953	0.32
0.355	0.653	0.54

# 3.3 Charakterisierung

# 3.3.1 Rasterkraftmikroskopie

Zur Charakterisierung der strukturierten Proben mittels AFM standen zwei Geräte zur Verfügung. Zum einen ein Autoprobe CP-Research (Fa. Thermomicroscopes) mit einem 100 µm Scanner, zum anderen ein NanoScope Multimode mit IIIa Controller (Fa. Veeco), dessen maximaler Scanbereich 15 µm beträgt. Beide Geräte waren mit einem Lichtmikroskop zur Probenpositionierung ausgestattet.

Die Messungen am Autoprobe CP-Research wurden im Contact Mode durchgeführt. Hierfür wurden handelsübliche, rechteckige Cantilever (Modell ORC8, Fa. Bruker) aus Siliciumnitrid

verwendet. Diese Cantilever haben Federkonstanten zwischen 0.02 und 0.36 N/m, der Radius der Messspitze beträgt laut Hersteller etwa 15 nm. Neben dem Topographiesignal wurde auch das Reibungskontrastsignal aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden mit einer digitalen Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten aufgenommen. Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde die Software Image Processing 2.1 (Fa. Thermomicroscopes) verwendet.

Die Messungen am NanoScope Multimode wurden im Tapping Mode durchgeführt. Hier wurden handelsübliche, rechteckige Cantilever (Modell RTESPA, Fa. Bruker) aus Silicium eingesetzt. Diese haben eine Resonanzfrequenz um 300 kHz, der Radius der Messspitze beträgt nominell 8 nm. Zusätzlich zum Topographiesignal wurde auch das Phasenkontrastsignal aufgenommen. Die digitale Auflösung der Bilder betrug 512 x 512 Bildpunkte. Zur nachträglichen Bildbearbeitung wurde die Software NanoScope 6.12r1 (Fa. Veeco) verwendet.

Für AFM-Messungen unter Wasser wurde eine Flüssigzelle (Modell MTFML, Fa. Veeco) verwendet. Die Messungen wurden im Tapping Mode mit einem Cantilever (Modell ORC8, Fa. Bruker) mit einer Resonanzfrequenz um 12 kHz durchgeführt. Die Flüssigzelle wurde während der Messung kontinuierlich mit temperiertem Wasser durchspült, um eine definierte Temperatur der Probe zu gewährleisten.

# 3.3.2 Lichtmikroskopie

Für lichtmikroskopische Aufnahmen stand ein kommerzielles Auf- und Durchlichtmikroskop (BX41TS, Fa Olympus) zur Verfügung. Dieses ermöglichte Aufnahmen mit bis zu 1000facher Vergrößerung. Als Lichtquelle wurde eine Hg-Dampflampe (X-Cite 120, Fa. ExFo) verwendet. Zur Bilddokumentation war das Mikroskop mit einer CCD-Kamera (ColorViewII, Fa. Olympus) mit einer digitalen Auflösung von 3.2 MPixel ausgestattet. Diese wurde mit der Software AnalySIS 5.0 gesteuert.

Diese Software wurde auch zum Ausmessen von Strukturdurchmessern verwendet. Die auf diese Weise anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen ermittelten Durchmesser wurden mit aus AFM-Daten ermittelten Durchmessern verglichen. Für diesen Vergleich wurden laserstrukturierte HDT-SAMs auf Au/Glas-Substraten nach dem Ätzen herangezogen. Es wurde festgestellt, dass bis zu einer minimalen Strukturgröße von etwa 1 µm, die anhand von Lichtmikroskopie und AFM ermittelten Durchmesser weniger als 5 % voneinander abwichen.

Unter dem Lichtmikroskop wurden auch Kondensationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Peltier-Elements mit Temperatur-

steuerung abgekühlt. So kann ein lateral unterschiedliches Benetzungsverhalten der Probenoberfläche anhand der Kondensation von Wassertropfen visualisiert werden.

Das Lichtmikroskop konnte für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eingesetzt werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Farbstoffe FAM, TAMRA, AlexaFluor555 und FCA detektiert. Die Absorptions- und Emissionsmaxima dieser Farbstoffe sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Farbstoff	$\lambda_{\text{Absorption}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Emission}}$ [nm]
FAM	496	516
TAMRA	546	579
AlexaFluor555	555	565
FCA	331	418

 Tabelle 3.5:
 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Die genannten Farbstoffe wurden durch die Verwendung abgestimmter Filtersätze detektiert. Die Spezifikationen der eingesetzten Filtersätze bestehend aus Anregungsfilter (AF), dichroitischem Spiegel (DS) und Emissionsfilter (EF) können Tabelle 3.6 entnommen werden. So konnten die Farbstoffe selektiv angeregt und identifiziert werden (s. Abbildung 3.4). Die Belichtungszeit  $t_l$  wurde in Abhängigkeit der beobachteten Fluoreszenzintensität gewählt. Sie lag im Bereich von wenigen Sekunden bis zu maximal 100 s.

Während bei den in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen zur deutlicheren Darstellung der Kontrast angepasst worden ist, wurden für die erstellten Balkendiagramme und Linienprofile aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen stets die Rohdaten bzw. Farbauszüge aus diesen verwendet.

Farbstoff	$\lambda_{\text{AF}}$ [nm]	$\lambda_{\text{DS}}$ [nm]	$\lambda_{\text{EF}}$ [nm]
FAM	470-490	500	> 520
TAMRA, AlexaFluor555	532-554	562	570-613
FCA	330-385	400	> 420

**Tabelle 3.6:** Spezifikationen der zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzten Filtersätze.



**Abbildung 3.4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eingetrockneten Tropfen der verwendeten Lösungen von fluoreszenzmarkierter ssDNA auf einem thermisch oxidierten Siliciumsubstrat zum Test der Selektivität der eingesetzten Fluoreszenzfiltersätze, **a**)  $\lambda_{AF} = 470-490 \text{ nm}, \ \lambda_{EF} = > 520 \text{ nm}, \ \mathbf{b}) \ \lambda_{AF} = 532-554 \text{ nm}, \ \lambda_{EF} = 570-$ 613 nm.

# 3.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Lokal mit Goldnanopartikeln dekorierte Proben wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert. REM-Untersuchungen wurden an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt. Zum einen wurde das Gerät ESEM Quanta 400 (Fa. FEI Company) genutzt, zum anderen das Gerät JSM-7500F (Fa. Jeol)<sup>a</sup>.

REM-Aufnahmen mit dem Gerät ESEM Quanta 400 wurden im High Vacuum Mode bei einem Druck  $< 6 \cdot 10^{-4}$  Pa durchgeführt. Als Beschleunigungsspannung wurde 15 kV oder 20 kV gewählt. Es wurde ein konventioneller Everhart-Thornley-Detektor zur Detektion der Sekundärelektronen verwendet.

REM-Aufnahmen am Gerät JSM-7500F wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV aufgenommen. Zur Detektion der Sekundärelektronen war dieses Gerät mit einem Inlens-Detektor ausgestattet.

REM-Aufnahmen am ESEM Quanta 400 wurden gemeinsam mit Frau U. Giebel, AK Prof. Epple, Aufnahmen am JSM-7500F gemeinsam mit Herrn M. Meseth, AK Prof. Schmechel, beide Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

# 3.3.4 Sonstige Verfahren

Zur Charakterisierung der SAMs wurden statische Wasserkontaktwinkel mit Hilfe eines Kontaktwinkelmessgeräts (SURFTENS universal, Fa. OEG) gemessen. Es wurden mindestens drei Wassertropfen auf der Probenoberfläche betrachtet und der Kontaktwinkel beidseitig mit der Software SURFTENS unter Verwendung der Polynom-Fitmethode bestimmt.

Zur Messung von Infrarotspektren der SAMs wurde die Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) genutzt. IRRAS-Spektren wurden mit einem Infrarotspektrometer (Vertex 70, Fa. Bruker), ausgestattet mit einem Modul zur Reflektionsmessung (A513 + A121) und einem LN-MCT-Detektor, aufgenommen. Die Spektren wurden mit p-polarisiertem Licht bei einem Einfallswinkel von 85° bezogen auf die Oberflächennormale gemessen. Es wurden 1024 Scans mit einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> aufgenommen. Zur Aufnahme eines Hintergrundspektrums wurde ein gereinigtes Substrat verwendet.

Zur Messung von UV/Vis-Spektren stand ein UV/Vis-Spektrometer (Modell Lambda 950, Fa Perkin Elmer) zur Verfügung. Die Spektren wurden in einem Scan mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen. Als Hintergrundspektrum wurde ein Spektrum von Luft bzw. einer leeren Küvette aufgenommen.

Ein lokal immobilisierter PS-Film wurde mittels XPS untersucht. Die Aufnahmen wurden von der Fa. Physical Electronics mit dem Gerät VersaProbe II Scanning XPS Microprobe gemacht. Dieses ermöglicht eine ortsaufgelöste Charakterisierung der Oberfläche. XPS-Spektren an verschiedenen Positionen auf der Probe, im strukturierten Bereich (immobilisierter PS-Films) und im unstrukturierten Hintergrund (azidterminierter SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si), wurden mit einem Röntgenstrahl mit einem Durchmesser von 20 µm und einer Leistung von 4.5 W aufgenommen.

Zur Bestimmung von Schichtdicken auf Siliciumsubstraten stand ein Ellipsometer (Modell ELX-02C, Fa. Dr. Riss Ellipsometerbau) zur Verfügung. Die Schichtdickenbestimmung erfolgte durch mindestens 3 Messungen bei einer Wellenlänge von 632.8 nm und einem Einfallswinkel von 70°. Zur Berechnung der Schichtdicke wurde ein planares, isotropes Dreischichtmodell mit den optischen Konstanten von n = 1 für Luft, n = 1.45 für den SAM und SiO<sub>2</sub> und n = 3.88 + i0.019 für das Si-Substrat verwendet.

# **4** Ergebnisse und Diskussion

der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren zum Aufbau biofunktionaler In Oberflächenstrukturen durch Strukturierung organischer Monoschichten mit einem fokussierten Laserstrahl bei einer Wellenlänge von 532 nm entwickelt. Hierzu wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Funktionale Oberflächenstrukturen wurden sowohl durch konstruktive als auch durch destruktive Strukturierung erhalten. In den folgenden Kapiteln werden die entwickelten Verfahren zum Aufbau verschiedenartiger biofunktionaler Strukturen diskutiert. Zunächst wird in Kapitel 4.1 die Herstellung von Protein-Microarrays durch destruktive Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs auf Siliciumsubstraten diskutiert. In Kapitel 4.2 werden verschiedene laserbasierte Strategien zur lokalen Funktionalisierung von SAMs auf Gold- und Siliciumoberflächen mit DNA vorgestellt. In Kapitel 4.3 wird die lokale Anbindung dünner Polymerfilme an azidterminierte SAMs durch einen laserinduzierten grafting-to-Prozess diskutiert. Abschließend wird in Kapitel 4.4 ein Laserverfahren beschrieben, das es ermöglicht, in einem einzigen Arbeitsschritt Goldnanopartikel herzustellen und lokal auf einem beschichteten Siliciumsubstrat abzuscheiden.

# 4.1 Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs zur Herstellung von Protein-Microarrays

In diesem Kapitel wird die Herstellung von Protein-Microarrays durch Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs auf Siliciumsubstraten beschrieben. Zur Präparation der SAMs wurden methoxyterminierte PEG-Silane mit 6-9 EG-Einheiten pro Molekül verwendet. Diese lassen ein proteinresistentes Verhalten erwarten. Es wurden zunächst Verfahren zur Herstellung der PEG-terminierten SAMs unter Verwendung zweier verschiedener Precursormoleküle, eines PEG-Trichlorsilans und eines PEG-Trimethoxysilans, entwickelt. Oxidierte Siliciumsubstrate wurden mit PEGMeO oder PEGCI beschichtet. Diese proteinresistenten SAMs wurden mit einem fokussierten Laserstrahl bei einer Wellenlänge von 532 nm strukturiert und anschließend für Experimente zur Adsorption von verschiedenen Proteinen verwendet. Mittels Laserstrukturierung kann die proteinresistente Monoschicht lokal in Punkt- oder

Linienmustern abgetragen werden. In den Bereichen, wo die Monoschicht entfernt worden ist, kann selektiv die Adsorption von Proteinen erfolgen. Der experimentelle Ablauf zur hier beschriebenen Herstellung von Protein-Microarrays ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Um die Proteinadsorption auf den strukturierten Proben zu identifizieren, wurden zum einen fluoreszenzmarkierte Proteine verwendet, die mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können, und zum anderen ein mit Goldclustern markiertes Protein, das es ermöglicht, die mit Proteinen belegten Bereiche durch REM-Aufnahmen abzubilden. Darüber hinaus wurden AFM-Messungen zur Charakterisierung der Strukturen eingesetzt.

In den folgenden Kapiteln wird zunächst die Herstellung und Charakterisierung der verwendeten PEG-Silan-SAMs auf Silicium diskutiert und anschließend deren Strukturierung und Verhalten in Versuchen zur unspezifischen und spezifischen Adsorption von Proteinen.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Laserstrukturierung zur Herstellung von Protein-Microarrays.

# 4.1.1 Herstellung und Charakterisierung PEG-terminierter SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si

Zur Herstellung PEG-terminierter SAMs auf oxidierten Siliciumsubstraten wurden die Precursormoleküle PEGMeO und PEGCl verwendet. Die Strukturformeln dieser beiden Precursormoleküle sind in Abbildung 4.2a gezeigt. Bei beiden Precursoren handelt es sich um Oligoethylenglycole mit 6-9 EG-Einheiten pro Molekül und einer Methoxygruppe als Endgruppe. Die verwendeten Precursoren unterscheiden sich lediglich in ihrer Kopfgruppe, über die eine Anbindung an das Substrat stattfindet. PEGCl trägt eine Trichlorsilangruppe als Kopfgruppe, PEGMeO trägt die weniger reaktive Trimethoxysilangruppe. In beiden Fällen wird die Kopfgruppe hydrolysiert und bindet, wie in Abbildung 4.2b skizziert, über ein horizontal verknüpftes Si-O-Si-Netzwerk an das Siliciumsubstrat an. In der Realität kann der



Abbildung 4.2: a) Strukturformeln der zwei verwendeten Precursormoleküle, b) schematische Darstellung eines PEG-terminierten SAMs auf einem oxidierten Siliciumsubstrat.

Grad der horizontalen und vertikalen Verknüpfung geringer sein als in der gezeigten Darstellung, außerdem können unvollständig hydrolysierte Kopfgruppen vorliegen.

Für beide Precursoren wurden nasschemische Verfahren zur Herstellung der PEGterminierten Monoschichten auf Siliciumsubstraten entwickelt. Zur Schichtherstellung wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt und die Proben anschließend durch Messung der statischen Wasserkontaktwinkel und AFM-Messungen charakterisiert. Anhand von AFM-Messungen laserstrukturierter Proben wurden auch die Schichtdicken bestimmt. Hierzu wurde die Schicht zunächst lokal mit dem Laser abgetragen und die erzeugten Linien anschließend mittels AFM abgebildet. Die Linientiefe der erzeugten Struktur entspricht der Dicke der Schicht.

Durch das Eintauchen vorbehandelter Siliciumsubstrate in eine millimolare Lösung von PEGCI oder PEGMeO in Toluol oder Ethanol konnten keine definierten Schichten erhalten werden. Als eine geeignete Methode zur Schichtherstellung erwies sich die Benetzung der Substratoberfläche mit den reinen Precursoren. PEGCI-SAMs konnten auf diese Weise bei Raumtemperatur erhalten werden. Da durch die Benetzung der Substratoberfläche mit PEGMeO bei Raumtemperatur nur eine sehr geringe Schichtdicke (< 0.5 nm) erreicht werden konnte, wurde die benetzte Probe erhitzt. So konnten PEGMeO-SAMs mit einer Schichtdicke von etwa 1 nm erhalten werden. Zwischen PEGMeO-SAMs, die bei Temperaturen von 70 °C und 100 °C präpariert wurden, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Präparation von PEGMeO-SAMs für die weiteren Experimente erfolgte bei der niedrigeren Temperatur von 70 °C. An den zur Herstellung verwendeten Methoden zeigt sich die unterschiedliche Reaktivität der in den Precursormolekülen vorhandenen Kopfgruppen. Während die Trichlorsilangruppe bei Raumtemperatur mit dem Silicium-

substrat reagiert, ist eine höhere Temperatur nötig, um eine Reaktion des Trimethoxysilans mit der Oberfläche hervorzurufen.

Abbildung 4.3 zeigt AFM-Aufnahmen (Topographie) von mittels Laserstrukturierung erzeugten Linien in einem PEGMeO- und einem PEGCI-SAM und deren Höhenprofile. Beide Linien sind etwa 1 nm tief, allerdings weist die strukturierte PEGMeO-Schicht schärfere Kanten auf. Die gemessenen Eigenschaften der hergestellten PEG-SAMs sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Es wurden hydrophile Monoschichten mit Schichtdicken von etwa 1 nm erhalten. Damit sind die Eigenschaften der in dieser Arbeit hergestellten Schichten mit in der Literatur beschriebenen Schichten von PEG-terminierten SAMs vergleichbar [164, 165].

Alternativ wurden PEGMeO-SAMs auch nach [165] durch Eintauchen eines vorbehandelten Siliciumsubstrats in eine Lösung von 40 µL PEGMeO und 32 µL konzentrierter Salzsäure in 40 L Toluol für 18 h hergestellt. Nach dieser Vorschrift präparierte PEGMeO-SAMs wiesen ebenfalls Wasserkontaktwinkel von etwa 30° und eine Schichtdicke von etwa 1 nm auf, AFM-Messungen zeigten jedoch eine stärkere Verunreinigung der Oberfläche.



**Abbildung 4.3:** AFM-Aufnahmen (Topographie) und gemittelte Höhenprofile zur Messung der Schichtdicke der hergestellten SAMs von PEGMeO (**a** und **c**) und PEGCl (**b** und **d**). Der SAM wurde mit dem Laser lokal abgetragen, die Linientiefe entspricht der Dicke des SAMs.

Precursor	Schichtdicke	Wasserkontaktwinkel
PEGMeO	~1 nm	33°
PEGCI	~1 nm	38°

**Tabelle 4.1:**Eigenschaften der hergestellten PEG-<br/>terminierten SAMs.

## 4.1.2 Selektive Adsorption von Proteinen auf strukturierten PEG-Silan-SAMs

Die mit PEG-terminierten SAMs beschichteten Substrate wurden mit dem Laseraufbau mit Punkt- und Linienmustern strukturiert und für Experimente zur Adsorption von Proteinen verwendet. Die Adsorption von Proteinen kann unspezifisch oder spezifisch durch Verwendung eines spezifischen Bindungspaares erfolgen. In einem typischen Experiment zur Adsorption wurde die strukturierte Oberfläche für eine definierte Zeit einer Lösung eines Proteins in PBS-Pufferlösung ausgesetzt, anschließend mit PBS-Pufferlösung und Millipore-Wasser intensiv gespült und schließlich im Argonstrom getrocknet. Im Folgenden werden zunächst Experimente zur unspezifischen Adsorption zweier verschiedener Proteine, BSA und Streptavidin, diskutiert, bevor auf die spezifische Adsorption von Streptavidin unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Komplexes eingegangen wird.

## Unspezifische Adsorption von Proteinen

Zur unspezifischen Proteinadsorption wurde mit AlexaFluor555 markiertes BSA, mit AlexaFluor555 markiertes Streptavidin und mit Goldclustern markiertes Streptavidin verwendet. Die Charakterisierung der Proben erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie, AFM und REM. Im Folgenden wird das Adsorptionsverhalten der verschiedenen Proteine auf strukturierten PEGMeO- und PEGCI-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si beschrieben, verglichen und eine quantitative Auswertung der Strukturgrößen durchgeführt.

Es wurden Siliciumsubstrate mit PEGMeO beschichtet und mit dem Laser strukturiert. Anschließend wurde die unspezifische Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA und mit AlexaFluor555 markiertem Streptavidin untersucht. Um ein Quenching des Fluoreszenzsignals durch das Silicium zu vermeiden, wurden für Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen thermisch oxidierte Siliciumsubstrate mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm verwendet.

In Abbildung 4.4 werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur unspezifischen Adsorption der zwei verschiedenen Proteine BSA und Streptavidin gegenübergestellt. Die Aufnahmen zeigen einen strukturierten PEGMeO-SAM auf einem thermisch oxidierten Siliciumsubstrat nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA bzw. Streptavidin. Die Unterschiede der relativen Fluoreszenzintensitäten in den strukturierten Bereichen und im unstrukturierten Hintergrund sind durch ein Balkendiagramm verdeutlicht. Es ist klar zu erkennen, dass die Proteine selektiv in den strukturierten Bereichen adsorbieren und kaum in der Umgebung. Die Adsorption von BSA erfolgte aus einer Lösung mit einer Proteinkonzentration von 250 µg/mL in PBS-Puffer für 1 h und die Adsorption von



**Abbildung 4.4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von strukturierten PEGMeO-SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si nach der selektiven Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA (**a**) und Streptavidin (**b**),  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 2$  s. Im Balkendiagramm (**c**) sind die gemittelten, relativen Fluoreszenzintensitäten der Strukturen und des Hintergrunds der Aufnahmen **a** und **b** aufgetragen.

Streptavidin aus einer Lösung mit einer Proteinkonzentration von 50 µg/mL in PBS-Puffer für 4 h. Bei Verwendung dieser Adsorptionszeiten und Konzentrationen der proteinhaltigen Lösungen zeigten die Proben bei der anschließenden Charakterisierung vergleichbare Intensitäten im Fluoreszenzmikroskop.

# Vergleich zwischen PEGMeO- und PEGCI-SAMs

Experimente zur Proteinadsorption wurden auf SAMs aus den zwei verschiedenen Precursoren, PEGMeO und PEGCl, durchgeführt. In Abbildung 4.5 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen strukturierter PEGMeO- und PEGCl-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA gezeigt. Auch hier sind die relativen Fluoreszenzintensitäten zum Vergleich in einem Balkendiagramm dargestellt. Auf beiden SAMs wird eine selektive Adsorption in den strukturierten Bereichen beobachtet. Bei einem Vergleich der Aufnahmen a und b fällt auf, dass die Fluoreszenzintensität des markierten BSA auf einer PEGMeO-Schicht mehr als doppelt so groß ist als auf einer PEGCl-Schicht, obwohl zur Abbildung der PEGCl-Schicht eine etwas längere Belichtungszeit verwendet worden ist. Dieser Unterschied wurde auch beim Vergleich der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem Streptavidin auf strukturierten PEGMeO- und PEGCl-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si beobachtet und wird an späterer Stelle diskutiert.

Der Einfluss der Oxidschicht auf das Fluoreszenzsignal ist bei einem Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von strukturierten PEGMeO-SAMs auf einem Siliciumsubstrat mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm und einem Siliciumsubstrat mit einer nativen Oxidschicht (1-2 nm) nach der Adsorption von mit AlexaFluor 555



**Abbildung 4.5:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **a**) einem PEGMeO-SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si, **b**) einem PEGCI-SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si und **c**) einem PEGMeO-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si (native Oxidschicht mit einer Dicke von 1-2 nm) jeweils nach Laserstrukturierung und Adsorption von mit AlexaFluor 555 markiertem BSA,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 2 s$  (**a**), 5 s (**b**), 20 s (**c**). Im Balkendiagramm (**d**) sind die gemittelten relativen Fluoreszenzintensitäten jeweils einer Linie und des Hintergrunds (gemittelt über jeweils einen Zwischenraum) der Aufnahmen **a**, **b** und **c** aufgetragen.

markierten BSA (Abbildung 4.5a und c) sehr deutlich erkennbar. Obwohl Bild 4.5c mit einer zehnfach längeren Belichtungszeit aufgenommen worden ist (2 s in Abbildung 4.5a, 20 s in Abbildung 4.5c), sind die Linien viel schwächer zu sehen. Bei den verwendeten Belichtungszeiten beträgt die relative Fluoreszenzintensität der Linien auf dem thermisch oxidierten Siliciumsubstrat etwa das Achtfache.

Es wurde der Einfluss der zur Strukturierung verwendeten Laserparameter auf die resultierenden Strukturgrößen untersucht. Hierzu wurden PEGMeO-SAMs und PEGCI-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si mit Punktmustern unter Variation von Laserleistung und Pulslänge strukturiert. Die Fluoreszenzmikroskopie ist geeignet, um Strukturgrößen bis zu einem minimalen Durchmesser von 1 µm auszumessen (vergl. Kapitel 3.3.2). Zwar sind die gemessenen Durchmesser bei kleineren Strukturen zunehmend ungenau, dennoch werden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu einer Auswertung der Durchmesser der erzeugten Strukturen herangezogen, um einen einfachen Vergleich der aus den verschiedenen Precursormolekülen hergestellten und strukturierten SAMs zu ermöglichen. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Durchmesser der proteinbelegten Bereiche ausgemessen. Zur Auswertung wurden Aufnahmen, die mit gleicher Belichtungszeit erhalten worden sind, herangezogen. So lassen sich die Tendenzen der Parameterabhängigkeit der Strukturgrößen zuverlässig abbilden. In Abbildung 4.6 sind die Durchmesser der mit Protein belegten Strukturen auf einem strukturierten PEGMeO- und PEGCI-SAM nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA in Abhängigkeit der Laserparameter aufgetragen. Die Strukturdurchmesser werden mit zunehmender Laserleistung und zunehmender Pulslänge größer. Was die Abhängigkeit der Strukturdurchmesser von den Strukturierungsparametern betrifft, ist kein Unterschied



**Abbildung 4.6:** Abhängigkeit der Durchmesser der proteinbelegten Bereiche von den zur Strukturierung verwendeten Laserparametern auf einem strukturierten PEGCI- (**a**) und PEGMeO-(**b**) SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si. Die Auswertung erfolgte aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Linien dienen nur zur Orientierung.

zwischen den beiden verwendeten Precursormolekülen feststellbar. Da die vorliegende Monoschicht unabhängig vom verwendeten Precursormolekül die gleiche chemische Struktur aufweisen sollte und in beiden Fällen ein photothermischer Abtrag dieses SAMs stattfindet, ist ein Unterschied zwischen den strukturierten PEGCI- und PEGMeO-Schichten auch nicht zu erwarten.

Eine genauere Betrachtung des Hintergrunds, also der beschichteten Bereiche neben den mit dem Laser auf der Probe erzeugten Mustern zeigt, dass sich die hergestellten PEGMeO- und PEGCI-SAMs signifikant in ihrer Eigenschaft Proteine abzuweisen unterscheiden. Zu einer quantitativen Abschätzung der auf den SAMs erfolgten Proteinadsorption wurden Bereiche mit einer Fläche von 400 µm<sup>2</sup> eines PEGMeO-SAMs und eines PEGCI-SAMs betrachtet. Um das fluoreszenzmarkierte BSA auf den Aufnahmen besser hervorzuheben, wurden die Aufnahmen in Graustufenbilder umgewandelt, invertiert und der Kontrast verstärkt (Abbildung 4.7). Die Aufnahmen zeigen fluoreszierende Punkte etwa gleicher Größe und Intensität, was dafür spricht, dass es sich um einzelne Proteine handelt. Auf beiden Aufnahmen wurden die erkennbaren Proteine abgezählt. Während auf einer Fläche von 400 µm<sup>2</sup> der PEGMeO-Monoschicht nur 7 adsorbierte Proteine zu sehen sind, finden sich auf einer gleich großen Fläche der PEGCI-Monoschicht 362 Proteine. Die verwendeten PEGMeO-SAMs sind also deutlich resistenter gegenüber der Adsorption von Proteinen als die PEGCI-SAMs. Diese Beobachtung lässt keinen Rückschluss auf die Qualität des SAMs zu. Bekanntlich hat die Packungsdichte des SAMs einen Einfluss auf die Eigenschaft die Proteinadsorption zu verhindern (vergl. Kapitel 2.4.1). Allerdings kann sowohl eine hohe als auch eine zu geringe Packungsdichte zu einer Verschlechterung der Proteinresistenz führen.



**Abbildung 4.7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines PEGMeO- (**a**) und eines PEGCl- (**b**) SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm. Die Aufnahmen wurden invertiert und der Kontrast verstärkt.

Daher ist nicht eindeutig, ob der hergestellte PEGCI-SAM im Vergleich zum PEGMeO-SAM dichter, weniger dicht, defektreicher oder -ärmer ist.

Um die Adsorption von BSA und die entstehenden Strukturen detaillierter zu charakterisieren, wurde eine strukturierte PEGMeO-Monoschicht auf einem thermisch oxidierten Siliciumsubstrat nach der Laserbehandlung und nach der anschließenden Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA mittels AFM abgebildet. Diese AFM-Aufnahmen können mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen derselben Strukturen verglichen werden.

In Abbildung 4.8 sind AFM-(jeweils Topographie und Phasenkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines bei einer Laserleistung von 278 mW und Pulslängen zwischen 10 ms und 50 ms strukturierten PEGMeO-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si vor und nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA zusammengestellt. Außerdem ist ein gemitteltes, durch die Zentren der Strukturen verlaufendes, Linienprofil der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme gezeigt. Die mit dem Laser erzeugten Strukturen sind als leichte Vertiefungen in der Topographie-Aufnahme (Abbildung 4.8a) erkennbar, im Phasenkontrast (Abbildung 4.8b) erscheinen diese Bereiche heller als die Umgebung. Auf den AFM-Aufnahmen nach der Proteinadsorption sind die Proteine, die nun auf den strukturierten Bereichen liegen, eindeutig in der Topographie-Aufnahme zu sehen (Abbildung 4.8c). Ein Vergleich der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme mit den AFM-Aufnahmen erlaubt zu beurteilen, bei welchen im AFM-Bild erkennbaren Partikeln, es sich tatsächlich um Proteine handelt. Auf den sechs Strukturen rechts im Bild ist eine größere



**Abbildung 4.8:** AFM- (Topographie und Phasenkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines strukturierten PEGMeO-SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si vor (**a** und **b**) und nach (**c** bis **e**) der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA, **e**)  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 10$  s. Laserparameter: P = 278 mW,  $\tau = 10$  ms, 25 ms und 50 ms (von links nach rechts),  $d_{2e} = 2.8 \ \mu$ m. Das Linienprofil (**f**) ist ein Mittelwert aus den drei jeweils durch die Zentren der Strukturen verlaufenden Profile der Intensität.

Anzahl von Proteinen adsorbiert AFM-Aufnahme Abbildung 4.8c), im (s. Fluoreszenzmikroskopie-Bild sind die Bereiche entsprechend mit einer hohen Fluoreszenzintensität erkennbar (Abbildung 4.8e). Auf den Strukturen am linken Bildrand dagegen sind nur wenige Proteine im AFM-Bild auszumachen, die Fluoreszenzintensität in diesen Bereichen ist im Fluoreszenzmikroskopie-Bild dementsprechend signifikant geringer.

In Abbildung 4.9 sind AFM- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines bei einer höheren Laserleistung strukturierten PEGMeO-SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si vor und nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA zusammengestellt. Die hier gezeigten Strukturen sind bei einer Laserleistung von 292 mW und Pulslängen zwischen 10 ms und 50 ms entstanden. Auch die bei dieser Laserleistung erzeugten Strukturen erscheinen in der Topographie-Aufnahme als Vertiefungen (Abbildung 4.9a). Im Phasenkontrast sind hier allerdings zwei unterschiedliche Bereiche in den Strukturen erkennbar (Abbildung 4.9b). Der äußere Bereich erscheint, wie die Strukturen in Abbildung 4.8b, etwas heller als die Umgebung, im Zentrum der Strukturen tritt hier jedoch ein dunklerer innerer Bereich auf. Die Aufnahmen der Strukturen nach der Proteinadsorption zeigen, dass die Proteine lediglich in den äußeren Bereichen der Strukturen adsorbieren, wodurch ringförmige, proteinbelegte Bereiche entstehen (Abbildung 4.9c, d und e). Diese ringförmigen Strukturen treten bei höheren Laserleistungen und langen Pulslängen auf.

Derartige ringförmige Strukturen werden nur bei der Verwendung von thermisch oxidierten Siliciumsubstraten beobachtet. Auch bei den höchsten zur Strukturierung von PEGterminierten SAMs auf Siliciumsubstraten mit nativer Oxidschicht verwendeten Laserleistungen sind bei den längsten Belichtungszeiten keine ringförmigen Strukturen, sondern nur vollständig mit Proteinen belegte Bereiche zu finden. Abbildung 4.10 stellt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines strukturierten PEGMeO-SAMs auf einem Siliciumsubstrat mit einer thermischen Oxidschicht mit einer Dicke von etwa 100 nm und einer nativen Oxidschicht mit einer Dicke von 1-2 nm nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA gegenüber. Die gezeigten Strukturen sind bei einer Pulslänge von 25 ms und 50 ms entstanden und bei einer Laserleistung von 372 mW auf nativem Oxid bzw. 355 mW auf thermischem Oxid. Das entspricht den längsten in den Strukturierungsexperimenten verwendeten Pulslängen und den höchsten Laserleistungen (aufgrund der unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Siliciumsubstrate mit verschiedenen Oxidschichtdicken sind zur Strukturierung der SAMs unterschiedliche Leistungsbereiche nötig). Während bei diesen Laserparametern ringförmige Strukturen auf dem thermisch oxidierten Substrat entstehen, adsorbiert das BSA auf dem Substrat mit nativer Oxidschicht in einem geschlossenen kreisförmigen Bereich.



**Abbildung 4.9:** AFM- (Topographie und Phasenkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines strukturierten PEGMeO-SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si vor (**a** und **b**) und nach (**c** bis **e**) der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA, **e**)  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 10$  s. Laserparameter: P = 292 mW,  $\tau = 10$  ms, 25 ms und 50 ms (von links nach rechts),  $d_{2e} = 2.8 \ \mu$ m. Das Linienprofil (**f**) ist ein Mittelwert aus den drei jeweils durch die Zentren der Strukturen verlaufenden Profile der Intensität.


**Abbildung 4.10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines strukturierten PEGMeO-SAMs auf thermisch oxidiertem Silicium (**a**) und nativ oxidiertem Silicium (**b**) nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm, **a**)  $t_L = 10$  s, **b**)  $t_L = 50$  s. Laserparameter: **a**) P = 355 mW, **b**) P = 372 mW,  $\tau = 25$  und 50 ms,  $d_{2e} = 2.8 \ \mu m$ . Die Linienprofile (**c** und **d**) sind ein Mittelwert aus den fünf jeweils durch die Zentren der Strukturen verlaufenden Profile der Intensität.

Die Adsorption von Proteinen in einem ringförmigen Bereich kann verschiedene Ursachen haben. Das Entstehen von Bereichen unterschiedlicher Oberflächeneigenschaften in den Strukturen, kann zu diesem Verhalten führen. Eine weitere mögliche Ursache ist das Auftreten von Trocknungseffekten, die bei Adsorptionsexperimenten aus wässriger Lösung spielen Rolle können. Bei der Herstellung von Protein-Microarrays eine aus Subnanolitertropfen einer proteinhaltigen, wässrigen Lösung wurde beobachtet, dass das Protein während des Eintrocknens des Tropfens auf der Oberfläche an die Ränder des Tropfens transportiert werden kann und so ringförmige Strukturen entstehen [194]. Um derartige Trocknungseffekte auszuschließen, wurde der wässrigen, proteinhaltigen Lösung das Tensid Triton X-100 zugesetzt, das die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzt und so Trocknungseffekte, die dazu führen, dass Proteine an den Rand der Strukturen gedrängt werden, unterbindet [194]. Durch Zugabe von Triton X-100 wurde keine Veränderung im

Adsorptionsverhalten festgestellt. Dieses Tatsache und das Auftreten verschiedener Bereiche im Phasenkontrastsignal der AFM-Messungen sprechen dafür, dass bei der Laserstrukturierung von PEG-terminierten SAMs auf thermisch oxidierten Siliciumsubstraten bei hohen Leistungen und langen Pulslängen im Zentrum der proteinaffinen Strukturen ein Bereich entsteht, in dem die Oberfläche proteinresistent ist.

Was bei der Laserstrukturierung der SAMs auf thermisch oxidierten Substraten im Zentrum der bestrahlten Bereiche passiert und hier zu einer proteinresistenten Oberfläche führt, konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht geklärt werden. Zwar treten bei der Verwendung thermisch oxidierter Substrate auch ringartige Strukturen auf, dennoch konnte gezeigt werden, dass mit diesem Strukturierungsverfahren, unabhängig vom verwendeten Substrattyp, die Herstellung homogener, strukturierter Bereiche möglich ist.

In Abbildung 4.11 sind AFM-Aufnahmen (Topographie und Phasenkontrast) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einzelner Strukturen auf einem PEGMeO-SAM und einem PEGCI-SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA gezeigt. Die Aufnahmen des strukturierten PEGMeO-SAMs lassen sich eindeutig interpretieren. Es sind zwei bei unterschiedlicher Laserleistung erzeugte Strukturen gezeigt. Die Proteine sind im AFM-Bild als Partikel zu erkennen, die im strukturierten Bereich liegen, bei niedriger Leistung in einem geschlossenen kreisförmigen Bereich und bei einer höheren Laserleistung in einem ringförmigen Bereich (Abbildung 4.11a und d).

Die Aufnahmen der strukturierten PEGCI-Schicht hingegen sind weitaus weniger eindeutig. Während die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ähnliche Strukturen zeigen, je nach verwendeten Strukturierungsparametern eine kreis- oder ringförmige Struktur (Abbildung 4.11i und I), die allerdings im Vergleich zu den Aufnahmen eines PEGMeO-SAMs mit geringerer Intensität fluoreszieren, unterscheiden sich die AFM-Aufnahmen stark von denen eines PEGMeO-SAMs. Überraschenderweise zeigt die Topographie-Aufnahme (Abbildung 4.11g und j) eine Erhöhung im strukturierten Bereich, die Proteine sind als Partikel nicht eindeutig zu erkennen.

Offensichtlich sind die aus den verschiedenen Precursormolekülen hergestellten Monoschichten trotz der Ähnlichkeit der Precursoren sehr verschieden. Diese Unterschiede sind erst nach der Proteinadsorption deutlich erkennbar. Auf den AFM-Aufnahmen nach der Laserstrukturierung werden zwar unterschiedlich scharfe Kanten beobachtet, in beiden Fällen ist der Abtrag der Schicht jedoch als eine Vertiefung von etwa 1 nm zu erkennen (Abbildung 4.3). Die bei PEGCI-SAMs beobachtete Erhöhung der strukturierten Bereiche nach der Proteinadsorption muss also bei dem Adsorptionsexperiment entstehen. Es ist



**Abbildung 4.11:** AFM-Aufnahmen (Topographie und Phasenkontrast) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines strukturierten PEGMeO- (**a-f**) und PEGCI- (**g-l**) SAMs nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA, **c**, **f**, **i**, **l**)  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-$ 613 nm. Laserparameter: **a-c**) P = 286 mW,  $\tau = 1$  ms, **d-f**) P = 299 mW,  $\tau = 0.5$  ms, **g-i**) P = 300 mW,  $\tau = 0.05$  ms, **j-l**) P = 300 mW,  $\tau = 10$  ms,  $d_{2e} = 2.8$  µm.

denkbar, dass bei der Strukturierung reaktive Rückstände von nicht umgesetzten Trichlorsilan oder von Verunreinigungen des verwendeten Precursors verbleiben. Diese könnten mit den in Lösung vorliegenden Proteinen reagieren und deren Struktur stark verändern. Als Folge könnte sich die entstehende Substanz in den Strukturen ablagern. Das Vorliegen dieser Substanz auf den strukturierten Bereichen bewirkt außerdem eine Minderung der Fluoreszenzintensität der adsorbierten Proteine.

Es lässt sich festhalten, dass PEGMeO-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si zur Herstellung von Protein-Microarrays mittels photothermischer Laserstrukturierung besser geeignet sind als PEGCI-SAMs. Zum einen zeichnen sich PEGMeO-SAMs gegenüber den PEGCI-SAMs durch ein effektiveres proteinresistentes Verhalten aus, zum anderen lässt sich auf der Basis der AFM-Daten vermuten, dass sie rückstandsfreier strukturiert werden können, so dass bei der Detektion der adsorbierten, fluoreszenzmarkierten Proteine eine höhere Intensität beobachtet werden kann.

# Quantitative Auswertung der Strukturgrößen

Fluoreszenzmarkierte Proteine eignen sich hervorragend zur Untersuchung der lokalen Proteinadsorption auf strukturierten Oberflächen, da die Charakterisierung der Proben einfach und schnell durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgen kann. Allerdings ist für die Charakterisierung kleiner Strukturen, wie sie in dieser Arbeit hergestellt worden sind, ein bildgebendes Verfahren höherer Auflösung notwendig. Um eine quantitative Auswertung der Strukturdurchmesser zu ermöglichen, eignet sich die Verwendung eines mit Goldclustern markierten Proteins und die anschließende Charakterisierung der Strukturen mittels REM. Siliciumsubstrate mit einer nativen Oxidschicht wurden mit PEGMeO beschichtet und mit dem Laser strukturiert. Anschließend wurde die strukturierte Probe einer wässrigen Lösung



**Abbildung 4.12:** REM- (**a**) und AFM-Aufnahmen (Topographie, **b** und **c**) eines strukturierten PEGMeO-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si nach der Adsorption von mit Goldclustern markiertem Streptavidin. Laserparameter: P = 390 mW,  $\tau = 10 \text{ ms}$ , 25 ms und 50 ms (von links nach rechts),  $d_{2e} = 2.8 \mu m$ .

von mit Goldclustern markiertem Streptavidin ausgesetzt. Die entstandenen und mit Goldcluster-Streptavidin belegten Strukturen wurden mittels REM und AFM untersucht. In diesen Experimenten wurden Siliciumsubstrate mit einer nativen Oxidschicht verwendet, da eine dickere Oxidschicht zur elektrischen Aufladung der Probe im REM führt, was die Abbildungsqualität verschlechtert. Die REM-Aufnahmen können mit AFM-Aufnahmen der gleichen Strukturen verglichen werden. In Abbildung 4.12 sind eine REM-Aufnahme und AFM-Aufnahmen (Topographie) eines mit einer Laserleistung von 390 mW und Pulslängen zwischen 10 ms und 50 ms strukturierten PEGMeO-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si nach der Adsorption von mit Goldclustern markiertem Streptavidin gegenübergestellt. Es werden geschlossene kreisförmige, mit Proteinen belegte Bereiche beobachtet. Die Goldcluster haben laut Spezifikation einen Durchmesser von etwa 1.4 nm. Die Auflösung des verwendeten REMs reicht nicht aus, um die einzelnen auf den Strukturen befindlichen Goldcluster abzubilden. Der mit Goldclustern dekorierte Bereich erscheint im REM heller als die Umgebung. Auf den AFM-Aufnahmen dagegen sind einzelne Partikel erkennbar. Wie bereits anhand der zuvor beschriebenen Experimente zur Adsorption von fluoreszenzmarkierten Proteinen zu erwarten war, wurden bei der Strukturierung von PEGMeO-SAMs auf Siliciumsubstraten mit nativer Oxidschicht und anschließender Adsorption von mit Goldclustern markiertem Streptavidin auch bei hohen Laserleistungen und langen Belichtungszeiten nur geschlossene kreisförmige und keine ringförmigen Strukturen erhalten.



**Abbildung 4.13:** Abhängigkeit der Strukturduchmesser von den Laserparametern bei der Strukturierung eines PEGMeO-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si. Die Auswertung erfolgte anhand von REM-Aufnahmen der mit Goldcluster-Streptavidin belegten Bereiche. Die Linien dienen nur zur Orientierung.

Anhand der REM-Aufnahmen wurden die Durchmesser der proteinbelegten Bereiche bestimmt, um den Einfluss der Laserparameter auf die Strukturgrößen zu untersuchen. In Abbildung 4.13 sind die Strukturdurchmesser in Abhängigkeit von der verwendeten Laserleistung und Pulslänge aufgetragen. Die kleinsten Strukturen haben einen Durchmesser um 300 nm. Das liegt im Bereich dessen, was bei einem photothermischen Strukturierungsprozess mit einem 1/e<sup>2</sup>-Laserspotdurchmesser von 2.8 µm erwartet werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass die photothermische Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs auf Silicium eine geeignete Methode ist, um sehr kleine proteinfunktionalisierte Strukturen unter geringem experimentellen und zeitlichen Aufwand herzustellen.

## Spezifische Adsorption von Proteinen

Eine unspezifische Adsorption von Proteinen an Festkörperoberflächen führt in vielen Fällen zu einer Denaturierung des Proteins, wodurch die Biofunktionalität des Proteins verloren geht [151, 152]. Durch spezifische Proteinadsorption kann die Biofunktionalität der immobilisierten Proteine erhalten werden, was für den Aufbau von Biochips sehr wichtig ist [12]. Daher wurden Experimente zur spezifischen Adsorption von Proteinen unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Komplexes durchgeführt. Das Protein Streptavidin weist vier spezifische Bindungsstellen für Biotin auf und kann daher spezifisch an bereits auf der Oberfläche immobilisiertes Biotin anbinden.

In den Experimenten zur spezifischen Adsorption wurde zunächst biotinyliertes BSA durch selektive unspezifische Adsorption auf der Oberfläche immobilisiert. Dieses ermöglicht die spezifische Anbindung von Streptavidin. BSA ist gut zum Blockieren unspezifischer Proteinadsorption geeignet [153], daher wird gleichzeitig die unspezifische Adsorption anderer Proteine, die keine spezifische Bindungsstelle für Biotin aufweisen, verhindert. Zur spezifischen Anbindung wurde mit AlexaFluor555 markiertes Streptavidin verwendet und zur Charakterisierung der Proben die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

In Abbildung 4.14 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur spezifischen Proteinadsorption gezeigt. Die Unterschiede der relativen Fluoreszenzintensitäten der strukturierten Bereiche und des Hintergrunds sind in einem Balkendiagramm verdeutlicht. Ein oxidiertes Siliciumsubstrat wurde mit PEGMeO beschichtet und mit dem Laser strukturiert. Die strukturierte Probe wurde zunächst in eine Lösung mit biotinyliertem BSA eingetaucht. Nach anschließendem Eintauchen dieser Probe in eine Lösung von mit AlexaFluor555 markierten BSA, sind die Linien nur schwach zu erkennen (Bild a). Es ist also nur eine geringe Menge fluoreszenzmarkiertes BSA adsorbiert. Hingegen sind die Linien auf



**Abbildung 4.14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines laserstrukturierten PEGMeO-SAMs auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si nach Eintauchen der Oberfläche in **a**) 1. Biotinyliertes BSA, 2. AlexaFluor555-BSA und **b**) 1. biotinyliertes BSA, 2. AlexaFluor555-Streptavidin,  $\lambda_{AF} = 532$ -554 nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 2$  s. Im Balkendiagramm (**c**) sind die gemittelten, relativen Fluoreszenzintensitäten jeweils einer Linie und des Hintergrunds (gemittelt über jeweils einen Zwischenraum) der Aufnahmen **a** und **b** aufgetragen. BSA wird von auf der Oberfläche immobilisiertem, biotinyliertem BSA geblockt, Streptavidin dagegen wird spezifisch an das Biotin angebunden.

einer strukturierten Probe, die zunächst in eine Lösung von biotinyliertem BSA und anschließend in eine Lösung von mit AlexaFluor555 markiertem Streptavidin eingetaucht worden ist, deutlich zu erkennen (Bild b). Die Adsorption von Streptavidin in den strukturierten Bereichen wird beobachtet, da es spezifisch an das Biotin anbinden kann. Da Streptavidin zwei weitere Bindungstaschen für Biotin aufweist, besteht die Möglichkeit anschließend ein weiteres biotinyliertes Biomolekül spezifisch unter Erhalt seiner biologischen Funktion anzubinden. So können die strukturierten Proben zum Aufbau von Biosensoren mit einer gestapelten Biotin/Streptavidin/Biotin-Anordnung genutzt werden.

# 4.2 Lokale Immobilisierung von DNA auf strukturierten SAMs

In diesem Kapitel werden verschiedene Laserverfahren zur Herstellung DNAfunktionalisierter Oberflächenstrukturen auf Gold- und Siliciumsubstraten vorgestellt. Ausgangspunkt hierzu waren zum einen Alkanthiolmonoschichten auf goldbeschichteten Glassubstraten und zum anderen Alkylsiloxanmonoschichten auf oxidierten Siliciumsubstraten.

Zur Funktionalisierung der Oberfläche mit DNA wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Stränge verwendet. So kann die Immobilisierung der DNA an der Oberfläche mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Es wurden DNA-Stränge mit 21 Basenpaaren verwendet. Zur Anbindung an die Oberfläche wurde ssDNA verwendet, die am 5'-Ende über einen C6Linker mit einer Amino- oder Thiolgruppe funktionalisiert und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert war. Ein zweiter komplementärer DNA-Strang, der mit TAMRA am 5'-Ende markiert war, wurde zur Hybridisierung des bereits an der Oberfläche angebunden Strangs verwendet. Bei dieser Kombination von Fluoreszenzmarkern am 5'bzw. 3'-Ende ist ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) möglich.

Im Folgenden wird zunächst in Kapitel 4.2.1 die Strukturierung und Immobilisierung von ssDNA auf goldbeschichteten Glassubstraten beschrieben. Im Anschluss folgt eine Diskussion der Immobilisierung von ssDNA auf Siliciumsubstraten in Kapitel 4.2.2.

# 4.2.1 Herstellung DNA-funktionalisierter Thiol-SAMs auf Au/Glas

Zum Aufbau von DNA-funktionalisierten Oberflächenstrukturen auf Goldsubstraten wurden HDT-SAMs auf goldbeschichteten Glassubstraten verwendet. Zur Herstellung multifunktionaler Thiol-SAMs auf Gold eignet sich eine experimentelle Vorgehensweise, bei der die Monoschicht zunächst lokal abgetragen und im Anschluss mittels Backfilling eine gezielte Funktionalisierung der strukturierten Bereiche realisiert wird. Die photothermische Laserstrukturierung von HDT-Schichten auf Au/Si-Substraten ist bereits etabliert [15] und wurde in dieser Arbeit auf Au/Glas-Substrate übertragen.

Der allgemeine experimentelle Ablauf zum Aufbau lokal DNA-funktionalisierter SAMs, ausgehend von einem HDT-SAM auf Au/Glas, ist in Abbildung 4.15 skizziert. Ein mit Ethanol und Piranha-Lösung gereinigtes Au/Glas-Substrat wurde mit HDT beschichtet und mit dem Laser strukturiert. Hierdurch wurde der Thiol-SAM lokal entfernt. Die nun freiliegenden Goldbereiche können mit einem weiteren Thiol aufgefüllt werden. So können Thiol-SAMs, die lateral eine unterschiedliche Terminierung aufweisen, erhalten werden.



**Abbildung 4.15:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Herstellung von DNA-Microarrays auf goldbeschichteten Glassubstraten.

Zur lokalen Immobilisierung von ssDNA auf Au/Glas, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Beide Methoden basieren auf der Laserstrukturierung HDTbeschichteter Goldsubstrate, sie unterscheiden sich in der anschließenden Funktionalisierung mittels Backfilling. In einem Verfahren wurden die strukturierten Bereiche mit Mercaptohexadecansäure (MHDS) aufgefüllt und aminomodifizierte ssDNA über EDC/NHS-Kopplungschemie angebunden. In einem zweiten Verfahren wurden die strukturierten Bereiche direkt mit einem thiolmodifizierten DNA-Strang aufgefüllt. Anschließend kann die auf der Oberfläche immobilisierte ssDNA mit einem komplementären Strang hybridisiert werden.

Im Folgenden wird zunächst kurz die Strukturierung von HDT-SAMs auf Au/Glas-Substraten diskutiert, dann werden die zwei verschiedenen Verfahren zur Funktionalisierung der strukturierten Substrate mit DNA vorgestellt.

## Laserstrukturierung von HDT-Monoschichten auf Au/Glas-Substraten

Es wurden HDT-SAMs auf goldbeschichteten Glassubstraten hergestellt und mit einem fokussierten Laserstrahl bei einer Wellenlänge von 532 nm strukturiert. Zur besseren Haftung der Goldschicht auf dem Glassubstrat wurden Substrate mit einer dünnen Titanschicht verwendet. Die Substrate wurden mit Ethanol und Piranha-Lösung gereinigt und anschließend aus einer Lösung von HDT in Ethanol über Nacht beschichtet. Die so hergestellten HDT-SAMs wiesen einen statischen Wasserkontaktwinkel von 109° auf. Ein IRRAS-Spektrum eines HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas ist in Abbildung 4.16 gezeigt. Die



**Abbildung 4.16:** IRRAS-Spektrum eines HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas.

**Tabelle 4.2:** Zuordnung der Peaks des in Abbildung 4.16 gezeigten IRRAS-Spektrums eines HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas [195]. (ip steht für in-plane, FR bezeichnet Schwingungen, die infolge von Fermi-Resonanz aufgespalten sind.)

Schwingung	Position [cm <sup>-1</sup> ]
$\mathbf{\tilde{v}}_{as}(CH_3)_{ip}$	2964
$\widetilde{\mathbf{v}}_{s}(CH_{3})_{FR}$	2937
$\tilde{\mathbf{v}}_{as}(CH_2)$	2920
$\boldsymbol{\tilde{\nu_s}}(CH_3)_{FR}$	2877
$\tilde{\mathbf{v}_s}(CH_2)$	2850

Lage der Peaks der antisymmetrischen und symmetrischen CH-Streckschwingungen bei 2964 cm<sup>-1</sup> und 2850 cm<sup>-1</sup> deuten auf einen hoch geordneten SAM hin [195].

Mit dem Laser wurden Punktmuster auf die beschichteten Substrate geschrieben. Die Experimente wurden stets mit frisch hergestellten Proben durchgeführt, damit keine Alterung der Monoschicht eintritt. Zur Vereinfachung der Charakterisierung der entstandenen Strukturen wurde das Muster durch nasschemisches Ätzen in einer Hexacyanoferrat-Lösung in den Goldfilm übertragen. Eine schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs ist in Abbildung 4.17 gezeigt. Nach dem Ätzen können die Strukturen mittels Lichtmikroskopie oder AFM charakterisiert werden.

Die Strukturierung der HDT-SAMs wurde auf Au/Glas-Substraten mit unterschiedlicher Goldschichtdicke durchgeführt. Diese hat einen großen Einfluss auf das an der Oberfläche ausgebildete Temperaturprofil und damit auf die Abhängigkeit der resultierenden Strukturgrößen von den zur Strukturierung verwendeten Laserparametern. Generell waren für



**Abbildung 4.17:** Schemazeichnung der Strukturierung eines HDT-SAMs auf Au/Glas mit anschließender Übertragung des Musters in den Goldfilm durch nasschemisches Ätzen.

die photothermische Strukturierung von HDT-SAMs auf goldbeschichteten Glassubstraten nur relativ geringe Laserleistungen erforderlich. Auf Au/Glas-Substraten mit einer Goldschichtdicke von 50 nm wurden Laserleistungen im Bereich von 20-35 mW zur Strukturierung benötigt. Auf Substraten mit einer Goldschichtdicke von 10 nm, reichte bereits eine Laserleistung von nur 10 mW zur Strukturierung der Monoschicht aus. Eine ausführliche Diskussion der Strukturierung von HDT-SAMs auf unterschiedlichen Au/Glas-Substraten ist in [196] zu finden.

In den Experimenten zur Immobilisierung von DNA wurden ausschließlich Substrate mit einer Goldschichtdicke von 50 nm verwendet. Daher wird hier nur auf den Einfluss der Laserparameter auf die Strukturgrößen für genau diese Substrate eingegangen. In Abbildung 4.18 ist der Durchmesser der Strukturen für verschiedene Laserleistungen gegen die zur Strukturierung verwendete Pulslänge für ein 50 nm-Au/Glas-Substrat aufgetragen. Die Strukturdurchmesser nehmen mit der Pulslänge und der zur Strukturierung verwendeten Laserleistung zu. Bei der Strukturierung mit einem 1/e<sup>2</sup>-Spotdurchmesser von 2.8 µm lagen die kleinsten Strukturdurchmesser bei 600-700 nm.



**Abbildung 4.18: a**) Auflichtmikroskopiebild eines strukturierten HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas nach dem Ätzen. **b**) Abhängigkeit der Durchmesser der entstandenen Strukturen von den Laserparametern. Die Linien dienen nur zur Orientierung.

# Herstellung lokal COOH-terminierter Thiolschichten

Bifunktionale Thiolschichten können aus einer Kombination der photothermischen Laserstrukturierung mit anschließendem Backfilling hergestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, flache Oberflächen, die lokal unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweisen,



**Abbildung 4.19:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Herstellung bifunktionaler Thiol-SAMs.

zu erhalten. Eine allgemeine schematische Darstellung zur Herstellung derartiger chemischer Template mit diesem experimentellen Ansatz ist in Abbildung 4.19 skizziert.

Die Herstellung chemischer Template durch Laserstrukturierung und anschließendem Backfilling mit MHDS wurde bereits von Mathieu für HDT-SAMs auf Au/Si beschrieben [197]. Die Vorgehensweise wurde auf HDT-SAMs auf Au/Glas-Substraten übertragen. Strukturierte HDT-SAMs wurden über Nacht in einer Lösung von MHDS in Ethanol beschichtet. So können bifunktionale SAMs hergestellt werden, die lokal eine COOH-Terminierung aufweisen. Die lateral unterschiedliche Funktionalisierung kann durch Rasteraugerelektronenspektroskopie (*Scanning Auger Electron Spectroscopy*, SAES) nachgewiesen werden [105]. Die Unterschiede des Benetzungsverhaltens der verschieden terminierten Bereiche lassen sich durch Kondensationsexperimente visualisieren. Hierzu wurde eine Probe unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe eines Peltier-Elements definiert abgekühlt. Bei Abkühlung des Substrats kondensiert Wasserdampf aus der Umgebung bevorzugt in den hydrophilen COOH-terminierten Bereichen zu Tropfen. Abbildung 4.20 zeigt Lichtmikroskopie-Aufnahmen von kondensierten Wassertropfen auf einem strukturierten HDT-SAM auf 50 nm-Au/Glas, der lokal mit MHDS aufgefüllt worden ist.

In dieser Arbeit wurden derartige Template als Ausgangspunkt für die Anbindung aminomodifizierter ssDNA mittels EDC/NHS-Kopplungschemie genutzt. Da die COOH-Gruppen der MHDS-Moleküle für eine nasschemische Weiterfunktionalisierung genutzt werden, ist die Qualität des MHDS-SAMs von besonderem Interesse. Es ist einfach, MHDS an eine Goldoberfläche anzubinden. Durch Eintauchen eines gereinigten Goldsubstrats in eine Lösung von MHDS in Ethanol adsorbieren die MHDS-Moleküle an der Oberfläche. Allerdings bilden sich auf diese Weise Monoschichten, in denen die COOH-Gruppen deprotoniert vorliegen, was eine Unordnung in der Schicht und das Ausbilden von Doppellagen begünstigt [186]. Der statische Wasserkontaktwinkel von MHDS-

1	a	0	0	0	0	0	b	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
шĦ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Abbildung 4.20:** Auflichtmikroskopie-Aufnahmen kondensierter Wassertropfen auf einem strukturierten und mit MHDS aufgefüllten HDT-SAM auf 50 nm-Au/Glas. Die Aufnahmen **a** bis **c** zeigen die Probe in chronologischer Reihenfolge während des Abkühlvorgangs, zwischen Aufnahme **a** und **c** liegen nur wenige Sekunden.

Monoschichten, die aus reinem Ethanol hergestellt wurden, lag bei 60°, was auf eine ungeordnete Schicht hinweist.

Durch die Zugabe von Essigsäure zur Beschichtungslösung können höher geordnete MHDS-SAMs erhalten werden, in denen die COOH-Gruppen protoniert vorliegen [186]. Auf aus mit Essigsäure versetztem Ethanol hergestellten MHDS-Monoschichten wurde ein statischer Wasserkontaktwinkel von < 15° gemessen. Ein derart niedriger Kontaktwinkel weist auf eine geordnete MHDS-Monoschicht mit protonierten, endständigen COOH-Gruppen hin.

Daher erfolgte bei der Herstellung der chemischen Template, die zur Anbindung von ssDNA eingesetzt wurden, das Backfilling mit MHDS über Nacht aus einer Lösung von MHDS in Ethanol unter Zusatz von Essigsäure, um einen lokal COOH-funktionalisierten SAM mit möglichst hoher Ordnung zu erhalten.

#### Anbindung aminomodifizierter ssDNA über EDC/NHS-Kopplungschemie

Die EDC/NHS-Kopplung ist eine etablierte Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen, wie etwa ssDNA. Sie ermöglicht die Kopplung zwischen Aminogruppen und Carbonsäuregruppen. Bei der EDC/NHS-Kopplung wird die COOH-Gruppe durch EDC aktiviert. Mit NHS wird das durch die Reaktion von EDC mit der COOH-Gruppe gebildete Intermediat in einen NHS-Ester überführt. Dieser ist hydrolysestabil, wodurch eine höhere Lebensdauer der aktivierten Oberfläche erreicht wird.

Zum Aufbau DNA-funktionalisierter Oberflächenstrukturen auf Au/Glas-Substraten wurden zunächst bifunktionale SAMs, die lokal COOH-terminierte Bereiche in einer Matrix aus HDT enthalten, hergestellt. Diese wurden zur lokalen Anbindung aminomodifizierter ssDNA mittels EDC/NHS-Kopplung genutzt. Das experimentelle Schema ist in Abbildung 4.21 skizziert. Zur Aktivierung der COOH-Gruppen an der Oberfläche wurde das chemische



**Abbildung 4.21:** Schematische Darstellung des Reaktionschemas zur lokalen Funktionalisierung eines Thiol-SAMs mit aminomodifizierter ssDNA.

Templat über Nacht in eine Lösung von EDC und NHS in Ethanol getaucht. Anschließend wurde die Probe mit Ethanol gespült und getrocknet. Ethanol wurde bei dieser Reaktion als Lösungsmittel gewählt, da hiermit im Vergleich zu Experimenten in wässriger Lösung eine weniger verunreinigte Oberfläche erhalten werden konnte. Bei Versuchen, die Aktivierung in wässriger Lösung durchzuführen, wurden mittels Lichtmikroskopie auf der Probenoberfläche, vor allem in den strukturierten Bereichen, starke Verunreinigungen festgestellt. Diese ließen sich auch durch ein sehr intensives Spülen der Probe in verschiedenen Lösungsmitteln im Ultraschallbad nicht vollständig entfernen. Zur Anbindung der aminomodifizierten ssDNA an den NHS-Ester wurde die aktivierte Probe mit einer Lösung der ssDNA in SSC-Pufferlösung benetzt. Abschließend wurde die Probe gründlich gespült und im Argonstrom getrocknet.

Die Aktivierung des COOH-terminierten SAMs mit EDC/NHS wurde durch Aufnahme eines IRRAS-Spektrums nachgewiesen. Hierzu wurde ein Au/Glas-Substrat vollständig mit einem MHDS-SAM beschichtet und die COOH-Gruppen mit EDC/NHS in NHS-Gruppen umgewandelt. Im IRRAS-Spektrum sind eindeutig charakteristische Schwingungen der NHS-Gruppe erkennbar (s. Abbildung 4.22).

Zur lokalen Funktionalisierung eines HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas wurde dieser mit einem Linienmuster strukturiert, mit MHDS aufgefüllt und mit EDC/NHS aktiviert. An die NHS-aktivierte Oberfläche wurde anschließend aminomodifizierte, mit FAM markierte ssDNA angebunden. Zur Charakterisierung wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Nach der



**Abbildung 4.22:** IRRAS-Spektrum eines NHS-terminierten Thiol-SAMs auf 50 nm-Au/Glas. Der MHDS-SAM wurde mit EDC/NHS in Ethanol aktiviert.

**Tabelle 4.3:** Zuordnung der Peaks des in Abbildung 4.22 gezeigten IRRAS-Spektrums eines NHS-terminierten Thiol-SAMs auf 50 nm-Au/Glas [198]. (<sup>a</sup>C=O-Streckschwingung des Esters, <sup>b</sup>symmetrische und asymmetrische Streckschwingung der Carbonylgruppen des Succinimids.)

Schwingung	Position [cm <sup>-1</sup> ]
$\tilde{\mathbf{v}}_{as}(CH_2)$	2920
$\tilde{\mathbf{v}}_{s}(CH_{2})$	2850
$\tilde{\mathbf{v}}(C=O)^a$	1821
$\tilde{\mathbf{v}}_{s}(C=O)^{b}$	1795
$\boldsymbol{\tilde{v}}_{as}(C{=}O)^{b}$	1749
$\tilde{\mathbf{v}}(C-O)$	1217, 1080

Anbindung der mit FAM markierten ssDNA war das Linienmuster kaum auszumachen. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass nur eine geringe Funktionalisierungsdichte erreicht wurde, oder dass ein Quenching der Fluoreszenz durch das Gold stattfindet, da die DNA-Stränge ungeordnet und teilweise flach auf der Oberfläche lagen und daher nur ein geringer Abstand zwischen der Goldoberfläche und dem Farbstoff bestand. Erst nach der Hybridisierung der immobilisierten ssDNA mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang, konnten die Linien identifiziert werden. Ein hybridisiertes Linienmuster, das mit zwei unterschiedlichen Laserleistungen geschrieben wurde, zeigt



**Abbildung 4.23:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines DNA-Linienmusters auf Au/Glas. Gezeigt ist das Muster nach der Immobilisierung aminomodifizierter ssDNA und der Hybridisierung mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 100$  s. Laserparameter: **a**) P = 23.5 mW, **b**) P = 27.1 mW,  $v = 5000 \mu m/s$ ,  $d_{2e} = 2.8 \mu m$ .

Abbildung 4.23. Auf der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme sind die mit DNA funktionalisierten Linien zu erkennen, sie werden bei zunehmender Laserleistung breiter.

Da das Fluoreszenzsignal der funktionalisierten Bereiche nur sehr schwach war, was auf eine geringe Funktionalisierungsdichte schließen lässt, wurden diverse Versuche unternommen, ein besseres Ergebnis zu erzielen. Eine Verlängerung der Reaktionszeiten der unterschiedlichen Funktionalisierungsschritte führte nicht zu einer Verbesserung. Im beschriebenen Verfahren erfolgte die Funktionalisierung in zwei Schritten. Die Oberfläche wurde zunächst in einer Lösung mit NHS aktiviert und anschließend in einer anderen mit ssDNA umgesetzt. Alternativ wurde in Anlehnung an [199] eine lokal COOH-terminierte Probe in eine Lösung von EDC und aminomodifizierter ssDNA in SSC-Pufferlösung gegeben, um die Funktionalisierung in nur einem Schritt durchzuführen und eine zwischenzeitliche Degradation der aktivierten Oberfläche zu vermeiden. Außerdem wurden Versuche unternommen, die Reaktion der aminomodifizierten ssDNA mit der NHS-Ester aktivierten Oberfläche durch Einsatz anderer Pufferlösungen zu optimieren. Locket et al. beschreiben eine pH-Wert Abhängigkeit dieser Reaktion und erzielten den höchsten Umsatz bei einem pH-Wert von 9 [200]. Daher wurde zur Benetzung der aktivierten Oberfläche alternativ eine Lösung von aminomodifizierter ssDNA in einer 0.1 M Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (pH = 8.5) verwendet. Die in der Lösung enthaltenen Kationen haben einen Einfluss auf die Konformation des DNA-Strangs. Während auch Na<sup>+</sup>-Ionen den Gyrationsradius von ssDNA in Lösung verringern und bei der Immobilisierung einen positiven Einfluss auf die Funktionalisierungsdichte haben, ist der Einfluss divalenter

Kationen, wie Mg<sup>2+</sup> im Vergleich noch größer [201]. Deshalb wurde auch versucht, eine Verbesserung zu erzielen, indem die aktivierte Oberfläche mit einer Lösung von aminomodifizierter ssDNA und MgCl<sub>2</sub> (20 mM) benetzt wurde. Keiner dieser Optimierungsversuche führte zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals der funktionalisierten Linien.

## Funktionalisierung mit thiolmodifizierter ssDNA

In einem zweiten Verfahren wurde die lokale Funktionalisierung von Goldsubstraten durch Backfilling mit einem thiolmodifizierten ssDNA-Strang realisiert. Das experimentelle Schema hierzu ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Ein HDT-SAM auf 50 nm-Au/Glas wurde mit dem Laser strukturiert. Anschließend wurden die strukturierten Bereiche direkt mit thiolmodifizierter ssDNA aufgefüllt. Hierdurch entsteht lokal ein ssDNA-Thiol-SAM. Derartige ssDNAterminierte Thiol-SAMs weisen aufgrund des sterisch sehr anspruchsvollen DNA-Strangs eine geringe Packungsdichte auf. Durch Wechselwirkung des DNA-Strangs mit der Goldoberfläche ist die Ordnung gering und die DNA-Stränge können auch teilweise flach auf dem Substrat liegen [176, 188].



**Abbildung 4.24:** Schematische Darstellung des Reaktionschemas zur lokalen Funktionalisierung eines Thiol-SAMs mit thiolmodifizierter ssDNA.

Es wurde ein am 3'-Ende mit FAM markierter DNA-Strang zur Anbindung verwendet und die erzeugten Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. In den wenig geordneten ssDNA-Thiol-SAMs befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff teilweise in direkter Nähe zur Goldoberfläche. Das führt durch Quenching der Fluoreszenz zu einem nur sehr geringen Fluoreszenzsignal.



**Abbildung 4.25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines strukturierten HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas nach anschließender Funktionalisierung mit DNA. Das Linienmuster wurde zum einen mit thiolmodifizierter, mit FAM markierter ssDNA aufgefüllt (**a**), dann mit MUD aufgefüllt (**b**) und mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang hybridisiert (**c**) und zum anderen mit thiolmodifizierter, mit FAM markierter ssDNA aufgefüllt (**d**) und direkt mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang hybridisiert (**e**). **a**, **b**, **d**)  $\lambda_{AF} = 470-490$  nm,  $\lambda_{EF} = > 520$  nm, **c**, **e**)  $\lambda_{AF} = 532-$ 554 nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 100$  s. In **f** und **g** sind Linienprofile der jeweiligen Aufnahmen gezeigt. Die Profile wurden den Rohdaten entnommen und über eine Breite von 5 µm gemittelt.

Eine Verbesserung des Fluoreszenzsignals kann durch ein erneutes Auffüllen des SAMs mit einem weiteren Thiol erreicht werden. Mercaptoundecanol (MUD) ist zu diesem Zweck geeignet [188]. Durch Eintauchen der DNA-funktionalisierten Probe in eine Lösung von MUD in Ethanol wird eine höhere Packungsdichte der zuvor ungeordneten Bereiche der Monolage erreicht. Das führt dazu, dass sich die DNA-Stränge aufrichten und sich der Fluoreszenzfarbstoff somit weiter von der Goldoberfläche entfernt. Nun wird das Fluoreszenzsignal weniger durch Quenching geschwächt und die DNA-modifizierten Bereiche sind eindeutig zu identifizieren. In Abbildung 4.25 sind Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen DNA-funktionalisierter Proben dargestellt. Ein mit FAM-markierter ssDNA funktionalisiertes Linienmuster ist vor und nach dem Auffüllen mit MUD gezeigt (Abbildung 4.25a und b). Es ist deutlich sichtbar, dass durch das Auffüllen mit MUD ein höheres Fluoreszenzsignal erhalten wird. Anhand der gezeigten Linienprofile können die Intensitäten der verschiedenen Aufnahmen gut miteinander verglichen werden. Die Profile der Bilder a und d liegen in etwa übereinander, nach dem Auffüllen mit MUD (Bild c) ist die Intensität ca. doppelt so hoch. Das Auffüllen hat natürlich keinen Einfluss auf die Funktionalisierungsdichte der DNA-modifizierten Bereiche. Daher liefern eine nicht nachträglich aufgefüllte Probe und eine nachträglich mit MUD aufgefüllte Probe nach der Hybridisierung mit einem zweiten, mit TAMRA markierten DNA-Strang keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (Abbildung 4.25c und e).

Um den Einfluss der Laserparameter auf die Durchmesser der entstehenden Strukturen zu untersuchen, wurden Punktmuster unter Variation von Laserleistung und Pulslänge in den HDT-SAM geschrieben und mit DNA funktionalisiert. Abbildung 4.26a zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Punktstrukturen, die durch Strukturierung eines HDT-SAMs bei unterschiedlichen Pulslängen entstanden sind, nach der Funktionalisierung mit FAM-markierter, thiolmodifizierter ssDNA, auffüllen mit MUD und anschließender Hybridisierung mit einem mit TAMRA markierten DNA-Strang. Es ist eindeutig erkennbar, dass die Durchmesser der Strukturen mit zunehmender Pulslänge größer werden. Die Abhängigkeit der Durchmesser von den Laserparametern ist in Abbildung 4.26b gezeigt. Zum Vergleich zeigen die gestrichelten Linien in dieser Darstellung die Parameterabhängigkeit der Strukturdurchmesser eines laserstrukturierten HDT-SAMs nach Übertragung des Musters in den darunter liegenden Goldfilm durch nasschemisches Ätzen (vergl. Abbildung 4.18). Die Auftragung zeigt, dass die Durchmesser der DNAfunktionalisierten Bereiche weitgehend mit den Durchmessern der in den Goldfilm übertragenen Strukturen übereinstimmen.



**Abbildung 4.26: a**) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines DNA-Punktmusters in einem HDT-SAM auf 50 nm-Au/Glas. Gezeigt ist das Muster nach der Funktionalisierung mit thiolmodifizierter, mit FAM markierter ssDNA, dem Auffüllen des SAMs mit MUD und der Hybridisierung mit komplementärer, mit TAMRA markierter ssDNA,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 100$  s. Laserparameter: P = 31 mW,  $\tau = 0.1-10$  ms (zunehmend von oben nach unten),  $d_{2e} = 2.8$  µm. **b**) Abhängigkeit der Durchmesser der entstandenen Strukturen von den Laserparametern. Die Linien zeigen zum Vergleich die Abhängigkeit der Strukturdurchmesser eines laserstrukturierten HDT-SAMs nach Übertragung des Musters in den Goldfilm durch nasschemisches Ätzen (vergl. Abbildung 4.18).

Die mit DNA funktionalisierten Bereiche wurden auch mittels AFM charakterisiert. Die in Abbildung 4.27 zusammengestellten Aufnahmen zeigen einen belichteten Bereich, in dem thiolmodifizierte DNA-Stränge angebunden sind. Die Aufnahmen wurden von einer ssDNAfunktionalisierten Probe erstellt, die nicht mit MUD aufgefüllt worden ist. Bei hoher Vergrößerung sind sogar einzelne DNA-Stränge auf der Topographie-Aufnahme erkennbar. Diese haben einen Durchmesser von etwa 1.5-2 nm (gemessen aus der Höhe von auf der Goldoberfläche aufliegenden Strängen), was gut mit dem zu erwartenden Durchmesser eines DNA-Strangs übereinstimmt.

#### Vergleich der Methoden zur Funktionalisierung von Thiol-SAMs auf Au/Glas

Die Experimente haben gezeigt, dass auf beiden beschrittenen, experimentellen Wegen, eine Funktionalisierung des strukturierten HDT-SAMs mit DNA prinzipiell möglich ist. Allerdings wiesen die über Backfilling mit thiolmodifizierter ssDNA erhaltenen Strukturen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf als die durch EDC/NHS-Kopplung mit aminomodifizierter ssDNA funktionalisierten Strukturen. Die DNA-funktionalisierten Bereiche waren bei Verwendung der EDC/NHS-Kopplung erst nach der Hybridisierung der immobilisierten



**Abbildung 4.27:** AFM-Aufnahmen (Topographie und Phasenkontrast) eines strukturierten HDT-SAMs auf 50 nm-Au/Glas nach dem Auffüllen mit thiolmodifizierter, mit FAM markierter ssDNA. In **f** ist ein Höhenprofil gezeigt, die Höhe eines auf dem Goldsubstrat aufliegenden DNA-Strangs beträgt 1.5-2 nm.

ssDNA mit einem mit TAMRA markierten DNA-Strang zu identifizieren, während beim Backfilling mit einem thiolmodifizierten DNA-Strang die Strukturen bereits vor der Hybridisierung sehr gut zu erkennen waren. Diese Tatsache lässt vermuten, dass bei der Immobilisierung thiolmodifizierter ssDNA eine höhere Funktionalisierungsdichte erreicht werden konnte. Neben dieser Tatsache ist ein Vorteil dieser Strategie, dass zur Funktionalisierung weniger Arbeitsschritte nötig sind und sie mit einem geringeren experimentellen Aufwand durchgeführt werden kann.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Fluoreszenzintensität der DNA-funktionalisierten Strukturen stark mit der jeweils verwendeten Charge der ssDNA-Lösung schwankte. Das deutet darauf hin, dass sich die Chargen im Markierungsgrad unterschieden. Daher lassen sich die auf verschiedenen Substraten detektierten Fluoreszenzintensitäten nur bedingt miteinander vergleichen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente erlauben daher keine quantitative Aussage über die erreichten Funktionalisierungsdichten. Um dieses in weiterführenden Experimenten zu ermöglichen, müsste gewährleistet sein, dass ssDNA-Lösungen mit gleichem Markierungsgrad in den verschiedenen Experimenten verwendet werden. Alternativ könnte eine Quantifizierung der auf der Oberfläche immobilisierten DNA mit einer Methode vorgenommen werden, die nicht auf einer Markierung der DNA-Stränge beruht. Hierzu eignet sich zum Beispiel eine Charakterisierung der Proben mittels XPS.

# 4.2.2 Anbindung von ssDNA an SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si

Auch SAMs auf Siliciumsubstraten wurden im Rahmen dieser Arbeit lokal mit DNA funktionalisiert. Als Ausgangspunkt wurden hierfür aminoterminierte Alkylsiloxanschichten gewählt. Es wurden zum einen strukturierte APS-SAMs und zum anderen lokal aminofunktionalisierte ODS-SAMs verwendet. Zur Anbindung von ssDNA an den aminoterminierten SAM wurde Glutaraldehyd als homobifunktionaler Cross-Linker eingesetzt. Dieser ermöglicht es, einen aminomodifizierten DNA-Strang kovalent an eine endständige Aminogruppe der Monoschicht anzubinden.

Um die Anbindung eines aminomodifizierten DNA-Strangs an eine aminoterminierte Monoschicht zu etablieren, wurden zunächst Experimente mit APS-beschichteten Siliciumsubstraten durchgeführt. Dieses Funktionalisierungsverfahren wurde dann zur Herstellung von DNA-Microarrays auf lokal aminofunktionalisierte ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si-Substraten übertragen. Es wurde mit fluoreszensmarkierten DNA-Strängen gearbeitet und die Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie abgebildet.

Der Reaktionsmechanismus bei der Verwendung von Glutaraldehyd als Cross-Linker zur Verbindung zweier Aminogruppen ist nicht eindeutig geklärt. Glutaraldehyd liegt in wässriger Lösung in unterschiedlichen Konformationen vor, und es ist noch immer in der Diskussion, in welcher Form das Glutaraldehyd an der Reaktion teilnimmt und wie das verknüpfte Reaktionsprodukt genau beschrieben werden kann [202]. In Abbildung 4.28 ist das Reaktionsschema zur Funktionalisierung eines aminoterminierten SAMs mit aminomodifizierter ssDNA gezeigt. Die Zeichnung stellt eine wahrscheinliche Variante der



**Abbildung 4.28:** Reaktionsschema zur Anbindung von aminomodifizierter ssDNA an einen aminoterminierten SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si mit Glutaraldehyd als Cross-Linker.

Reaktion von Glutaraldehyd dar, die tatsächliche Struktur der Moleküle kann von der Darstellung abweichen. Es ist allerdings unumstritten, dass Glutaraldehyd in der Lage ist, zwei aminofunktionalisierte Moleküle miteinander zu verbinden.

## Anbindung von ssDNA an APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si

Strukturierte APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si wurden mit DNA funktionalisiert. Um ein besseres Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurde mit thermisch oxidierten Siliciumsubstraten mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm gearbeitet. Diese wurden gereinigt, mit Piranha-Lösung vorbehandelt und über die Gasphase mit APS beschichtet. So wurden aminoterminierte Monoschichten mit einem statischen Wasserkontaktwinkel von 50° und einer Schichtdicke von etwa 0.5 nm (Ellipsometrie) erhalten. Diese SAMs wurden mit dem Laser photothermisch strukturiert. Im Anschluss wurden die SAMs mit Glutaraldehyd aktiviert und ein aminomodifizierter, mit FAM markierter DNA-Strang angebunden. Abschließend erfolgte die Hybridisierung der an der Probenoberfläche angebundenen ssDNA mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang.

In Abbildung 4.29 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines strukturierten und DNA-funktionalisierten APS-SAMs zusammengestellt. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach der Anbindung des mit FAM markierten DNA-Strangs mit dem hierfür geeigneten Filtersatz (Bild a) und nach der Hybridisierung mit einem mit TAMRA markierten DNA-Strang sowohl mit dem für TAMRA (Bild b) als auch mit dem für FAM geeigneten Filtersatz (Bild c). Die beiden verwendeten Filtersätze regen die jeweiligen Farbstoffe selektiv an (vergl. Abbildung 3.4 in Kapitel 3.3.2). Bei der Abbildung des hybridisierten Punktmusters mit dem für FAM geeigneten Filtersatz, wird eine Fluoreszenz von TAMRA detektiert. Aufgrund der Selektivität der Filter ist diese Tatsache ein deutlicher Hinweis darauf, dass FRET zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen stattfindet. Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenz-intensitäten anhand der mit dem zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskop gewonnenen Daten war jedoch nicht möglich.



**Abbildung 4.29:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer strukturierten und mit DNA funktionalisierten APS-Monoschicht. Gezeigt ist das Muster nach der Anbindung von aminomodifizierter, mit FAM markierter ssDNA mit dem Anregungsfilter für FAM (**a**,  $\lambda_{AF} = 470-490$  nm,  $\lambda_{EF} = 520$  nm,  $t_L = 10$  s) und nach der Hybridisierung mit komplementärer, mit TAMRA markierter ssDNA mit dem Anregungsfilter für TAMRA (**b**,  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 200$  ms) und dem Anregungsfilter für FAM (**c**,  $\lambda_{AF} = 470-490$  nm,  $\lambda_{EF} = 520$  nm,  $t_L = 5$  s).

#### Anbindung von ssDNA an lokal aminofunktionalisierte ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si

Zur Herstellung lokal mit DNA funktionalisierter SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si eignet sich die von Klingebiel et al. entwickelte Funktionalisierung von ODS-Monoschichten mittels laserinduzierter Bromierung [28]. Durch eine Laserstrukturierung in Bromgasatmosphäre werden in den belichteten Bereichen lokal Bromgruppen in die ODS-Schicht eingeführt. Diese können in zwei Schritten durch nasschemische Verfahren in Aminogruppen umgewandelt werden. Nun kann die so erhaltene, lokal aminoterminierte Monoschicht zur Anbindung von aminomodifizierter ssDNA mittels Glutaraldehyd als Cross-Linker verwendet werden. Um ein Quenching des Fluoreszenzsignals zu verhindern, wurden auch diese Experimente auf thermisch oxidierten Siliciumsubstraten mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm durchgeführt. Die laserinduzierte lokale Funktionalisierung von ODS auf SiO<sub>2</sub>/Si wurde von Klingebiel ausführlich untersucht [193]. Klingebiel beschreibt unter anderem die laserinduzierte Bromierung von ODS-SAMs auf thermisch oxidierten Siliciumsubstraten mit einem fokussierten Laserstrahl mit einem 1/e<sup>2</sup>-Spotdurchmesser von 3 µm bei einer Wellenlänge von 514 nm. Hierbei konnten Strukturen mit Durchmessern im Bereich von



**Abbildung 4.30:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer lokal mit DNA funktionalisierten ODS-Monoschicht auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si. Die ODS-Schicht wurde lokal mit dem Laser bromiert und aminofunktionalisiert. Gezeigt sind bei unterschiedlichen Laserparametern entstandene Punktmuster nach der Anbindung von aminomodifizierter, mit FAM markierter ssDNA (**a** und **c**,  $\lambda_{AF}$  = 470-490 nm,  $\lambda_{EF}$  = > 520 nm,  $t_{L}$  = 20 s) und nach der Hybridisierung mit komplementärer, mit TAMRA markierter ssDNA (**b** und **d**,  $\lambda_{AF}$  = 532-554 nm,  $\lambda_{EF}$  = 570-613 nm,  $t_{L}$  = 5 s). Laserparameter: **a** und **b**) P = 150 mW,  $\tau$  = 0.5 ms, **c** und **d**) P = 250 mW,  $\tau$  = 20 ms,  $d_{2e}$  = 3 µm,  $p_{Br}$  = 200 mbar.

3-50 µm hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren als erster Schritt zur lokalen Funktionalisierung eines ODS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si mit DNA angewendet.

Ein thermisch oxidiertes Siliciumsubstrat wurde gereinigt, mit Piranha-Lösung vorbehandelt und über Nacht bei 4 °C in einer Lösung von OTS in trockenem Toluol vollständig beschichtet. Der ODS-SAM wurde mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 514 nm lokal bromiert und die Bromgruppen nasschemisch zu Aminogruppen weiterfunktionalisiert. Anschließend wurden die Aminogruppen mit Glutaraldehyd aktiviert und ein Tropfen einer Lösung von aminomodifizierter, mit FAM markierter ssDNA in SSC-Puffer auf die aktivierte Oberfläche gegeben. Abschließend wurde die immobilisierte ssDNA mit einem komplementären, mit TAMRA markierten DNA-Strang hybridisiert.

Abbildung 4.30 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines lokal DNA-In funktionalisierten ODS-SAMs gezeigt. Die Aufnahmen zeigen einen bei unterschiedlichen Laserparametern bromfunktionalisierten ODS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si sowohl nach der Anbindung eines mit FAM markierten DNA-Strangs als auch nach der Hybridisierung mit TAMRA markierter ssDNA. Bei niedrigen Laserleistungen wurden geschlossene kreisförmige, DNAfunktionalisierte Bereiche erhalten. Bei Verwendung höherer Laserleistungen bzw. längerer Pulslängen trat eine Zersetzung der Monoschicht im Zentrum der Strukturen ein, was zu donutförmigen Strukturen führte. Die beschriebene Vorgehensweise erlaubt die Herstellung Strukturen auf DNA-funktionalisierter Siliciumsubstraten mit Strukturgrößen im Mikrometerbereich.

# 4.3 Laserinduzierte Anbindung von Polymeren an azidterminierte SAMs

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit sind Polymere ein sehr beliebtes Material zum Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen, insbesondere auch zum Aufbau biofunktionalisierter Oberflächen. In diesem Kapitel wird ein Laserverfahren beschrieben, das es ermöglicht, lokal einen dünnen Polymerfilm an ein beschichtetes Siliciumsubstrat anzubinden. Hierzu wird die Polymerpfropfung an einen azidterminierten SAM lokal mit dem Laser induziert. Als azidterminierte Schicht wurde ein einfaches Alkylazid verwendet, das schnell in zwei Schritten nasschemisch aus einem ODS-SAM erhalten werden kann [73].

In den Experimenten zur lokalen Polymerpfropfung wurden zunächst Siliciumsubstrate mit OTS beschichtet. Der ODS-SAM wurde nasschemisch funktionalisiert und in eine azidterminierte Schicht umgewandelt. Dieser azidterminierte SAM diente als reaktive Zwischenschicht zur Anbindung eines Polymers. Durch thermische Aktivierung spaltet das Azid Stickstoff ab und es bildet sich ein Nitren. Dieses kann mit einer CH-Gruppe eines



**Abbildung 4.31:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur lokalen laserinduzierten Anbindung dünner Polymerfilme an azidterminierte SAMs.

Polymers reagieren, so dass die Polymerkette kovalent an die Monoschicht angebunden wird.

Der experimentelle Ablauf des Verfahrens zur laserinduzierten Polymeranbindung ist in Abbildung 4.31 skizziert. Durch Spin-Coating wurde ein etwa 40 nm dicker Polymerfilm auf die azidterminierte Oberfläche aufgebracht und die bedeckte Oberfläche durch den Polymerfilm hindurch mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 532 nm strukturiert (s. Abbildung 4.32). Bei der Verwendung von Laserlicht einer Wellenlänge von 532 nm ist keine photochemische Modifizierung des durchstrahlten Polymerfilms zu erwarten. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass optische Verfahren als einzige Strukturierungsmethoden in der Lage sind, eine verdeckte Grenzfläche zu adressieren. Durch die Bestrahlung mit dem



**Abbildung 4.32:** Bei der Laserstrukturierung wird die vom Polymerfilm verdeckte reaktive Zwischenschicht adressiert.

fokussierten Laserstrahl wird die Oberfläche lokal erwärmt, das Azid aktiviert und somit lokal eine kovalente Anbindung des Polymers an die azidterminierte Monoschicht ausgelöst (s. Abbildung 4.33). Nach der Laserstrukturierung wurde die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gründlich gespült, um nicht angebundenes Polymer von der Oberfläche zu entfernen. So konnten Oberflächen hergestellt werden, an denen lokal ein etwa 1-6 nm dünner Polymerfilm angebunden ist.

Da bei diesem Verfahren keine spezielle funktionelle Gruppe im Polymer vorhanden sein muss, um dieses an den SAM anzubinden, ist es extrem flexibel. Es ermöglicht eine sehr vielseitige Funktionalisierung der Oberfläche, da Polymere mit zahlreichen unterschiedlichen Eigenschaften kommerziell erhältlich sind. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Polymere zur Anbindung an die Oberfläche verwendet. Zunächst wurden Experimente mit Polystyrol (PS) durchgeführt, um das Verfahren zu entwickeln und zu optimieren. Anschließend wurden verschiedene Polymere mit speziellen Eigenschaften verwendet, um funktionale Oberflächenstrukturen herzustellen und zu zeigen, dass die Funktionalität des



**Abbildung 4.33:** Schematische Darstellung des Konzepts der laserinduzierten, lokalen Polymerpfropfung an einen azid-terminierten SAM.

Polymers durch das Laserverfahren nicht beeinträchtigt wird. Verwendet wurden das thermoresponsive Polymer Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), das fluoreszierende Copolymer Poly[(methylmethacrylat)-*co*-(7-(4-trifluormethyl)cumarinacrylamid)] (P(MMA-*co*-FCA)) und das proteinabweisende Polymer Polyethylenglycol (PEG).

Zur Präparation azidterminierter SAMs wurden auch alternativ BrUTS-SAMs an Stelle von photobromierten ODS-SAMs eingesetzt. Diese wurden nasschemisch azidiert und zur laserinduzierten Polymerpfropfung eingesetzt. Eine Polymerpfropfung an einen azid-terminierten SAM ist auch auf Goldsubstraten möglich. Mit dem azidfunktionalisierten Precursor ADT wurden SAMs auf Au/Si-Substraten hergestellt und für Experimente zur laserinduzierten Polymerpfropfung verwendet. Die Aktivierungsenergie des Abtrags eines Thiol-SAMs (145 kJ/mol [15]) ist deutlich geringer als die des Abtrags eines Alkylsiloxan-SAMs (425 kJ/mol [14]). Daher kann zur Polymerpfropfung an einen Thiol-SAM auf Au/Si nur ein deutlich schmalerer Laserparameterbereich verwendet werden, da eine Zersetzung des Thiol-SAMs bereits bei kleineren Leistungen und Pulslängen eintritt.

## 4.3.1 Laserinduzierte Anbindung von Polystyrol

Zur Anbindung von PS wurde ein Film von PS mittels Spin-Coating auf ein mit einem azidterminierten SAM beschichtetes Siliciumsubstrat aufgebracht. Hierzu wurde eine Lösung von PS in Toluol mit einer Konzentration von 10 g/L verwendet und mit 2500 rpm abrotiert. Die Dicke des Polymerfilms wurde mittels AFM bestimmt. Zu diesem Zweck wurde mit einer spitzen Pinzette ein Kratzer in den Polymerfilm eingebracht und die Kante des Kratzers mit dem AFM abgebildet. Wie in Abbildung 4.34 gezeigt ist, beträgt die Dicke des Films etwa 40 nm.



**Abbildung 4.34:** AFM-Aufnahme (Topographie, **a**) und gemitteltes Höhenprofil (**b**) der Kante eines Kratzers in einer PS-Schicht zur Bestimmung der Schichtdicke.

Zur lokalen Anbindung des Polymers wurde die Probe mit dem Laser strukturiert. Nach der Laserstrukturierung wurde die Probe gründlich mit Toluol und Ethanol gespült. Hierdurch ließ sich das PS in der nicht strukturierten Umgebung ablösen. In den strukturierten Bereich verblieben nach dem Spülen Strukturen, was eine kovalente Anbindung von PS in den belichteten Bereichen vermuten lässt.

Um Informationen über die chemische Struktur des laserinduziert angebundenen PS-Films zu erhalten, wurden Messungen mittels Scanning-XPS durchgeführt. Hierzu wurde auf einer Probe lokal in einem Bereich von etwa (100 x 100) µm<sup>2</sup> ein homogener PS-Film angebunden. Das wurde erreicht, indem auf die Probe ein Punktmuster mit einem Punktabstand etwas unterhalb des Strukturdurchmessers geschrieben wurde. Die XPS-Messung wurde auf dieser strukturierten Fläche durchgeführt, in der das PS angebunden ist (Bereich A), und zum Vergleich in einem unstrukturierten Bereich, in dem nur der



**Abbildung 4.35:** XPS-Spektren eines mittels laserinduzierter Polymerpfropfung an einen azidterminierten SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si gebundenen PS-Films und des unstrukturierten SAMs zum Vergleich.

**Tabelle 4.4:** Zuordnung der Peaks der in Abbildung 4.35 gezeigten XPS-Spektren eines gepfropften PS-Films und eines azidterminierten SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si.

Bereich	Position [eV]	Fläche [%]	Zuordnung [203]
А	284.80	86.35	C-C/C-H
А	286.09	9.43	C-N
А	291.66	4.21	$\pi \rightarrow \pi^*$
В	284.84	72.45	C-C/C-H
В	286.45	18.84	C-N
В	287.92	8.71	C=O/O-C-O/N-C=O

azidterminierte SAM nach Ablösen des ungebundenen PS vorliegt (Bereich B). Die XPS-Spektren sind in Abbildung 4.35 gezeigt. Die XPS-Messung auf dem PS-Film zeigt einen C<sub>1s</sub>-Peak, der hauptsächlich C-C- und C-H-Bindungen und einen geringen Anteil von C-N-Bindungen aus dem azidierten SAM aufweist. Außerdem ist der für Polystyrol charakteristische Shake-up-Peak bei 291.7 eV, der durch  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge im aromatischen System hervorgerufen wird [204], zu sehen. Im Spektrum des azidterminierten SAMs ist dieser Shake-up-Peak nicht vorhanden. Auch hier kann der C<sub>1s</sub>-Peak hauptsächlich C-C- und C-H-Bindungen zugeordnet werden. Weiterhin sind C-N-Bindungen zu sehen. Ein geringer Anteil an C=O-, O-C-O- und/oder N-C=O-Bindungen kann auf eine Oxidation des azidterminierten SAMs zurückgeführt werden. Die XPS-Daten zeigen, dass die chemische Struktur von PS bei der laserinduzierten Anbindung nicht zerstört wird.

Die laserinduzierte Anbindung wurde unter Variation von Pulslänge und Laserleistung durchgeführt, um den Einfluss der Laserparameter auf die resultierenden Strukturen zu untersuchen. In Abhängigkeit von den verwendeten Laserparametern wurden verschiedene Strukturen erhalten. In Abbildung 4.36 sind AFM-Aufnahmen von Strukturen bei verschiedenen Laserparametern und die zugehörigen Höhenprofile gezeigt. Die in Abbildung 4.36a gezeigte Struktur wurde bei einer niedrigen Laserleistung von 138 mW



**Abbildung 4.36:** AFM-Aufnahmen (Topographie, **a**-**c**) und Höhenprofile (**d**-**f**) von mittels laserinduzierter Polymerpfropfung an einen azidterminierten SAM angebundenen PS-Strukturen. Laserparameter: **a**) P = 138 mW,  $\tau = 50 \text{ ms}$ , **b**) P = 258 mW,  $\tau = 1 \text{ ms}$ , **c**) P = 313 mW,  $\tau = 1 \text{ ms}$ ,  $d_{2e} = 2.8 \mu \text{m}$ .

#### Ergebnisse und Diskussion

erhalten, die AFM-Aufnahme zeigt eine geschlossene kreisförmige Struktur. Im bestrahlten Bereich fand geschlossen eine Anbindung des Polymers statt. Die Dicke des immobilisierten PS-Films beträgt etwa 4 nm. Bei höheren Leistungen kann es zum Abtrag des Polymerfilms oder auch der Monoschicht im Zentrum der bestrahlten Bereiche kommen, was zu donutförmigen Strukturen führt. Derartige Strukturen zeigen die AFM-Aufnahmen in Abbildung 4.36b und c. Bei Strukturierung mit einer mittleren Laserleistung von 258 mW ist im Zentrum der Struktur ein Loch im Polymerfilm erkennbar, hier wurde das Polymer im Zentrum des bestrahlten Bereichs abgetragen (Bild b). Bei einer höheren Laserleistung von 313 mW trat im Inneren der Struktur noch ein weiterer Bereich auf, in dem eine Vertiefung vorliegt (Bild c). Eine plausible Erklärung hierfür ist ein Abtrag des SAMs im Zentrum des bestrahlten Bereichs.



**Abbildung 4.37:** AFM-Aufnahmen (Topographie, **a**, **c**, **d** und **f**) und Höhenprofile (**b** und **e**) von durch laserinduzierte Polymerpfropfung an einen azidterminierten SAM entstandenen PS-Strukturen vor (**a** und **d**) und nach (**c** und **f**) Entfernung des nicht angebundenen Polymers. Laserparameter: **a**-**c**) P = 117 mW,  $\tau = 400 \text{ ms}$ , **d**-**f**) P = 151 mW,  $\tau = 1000 \text{ ms}$ ,  $d_{2e} = 2.0 \mu \text{m}$ .

Durch die Bestrahlung mit dem Laser wurde der native PS-Film lokal teilweise abgetragen. Vor dem Ablösen des ungebundenen PS sind die entstandenen Löcher im nativen PS-Film auch im Lichtmikroskop erkennbar. AFM-Aufnahmen der strukturierten Bereiche, die direkt nach der Laserstrukturierung und nach der Entfernung des überschüssigen, nicht angebundenen Polymers erstellt worden sind, geben Aufschluss über die Topographie (s. Abbildung 4.37). In den bestrahlten Bereichen ist eine Vertiefung im PS-Film zu erkennen, die von einem aufgewölbten Randbereich umgeben ist. Je nach Morphologie der resultierenden, angebundenen PS-Strukturen (kreis- oder donutförmig) weisen bereits die Vertiefungen im nativen PS-Film Unterschiede in der Topographie auf. Während der native PS-Film bei niedrigen Laserleistungen nicht bis hinunter zum Siliciumsubstrat entfernt wurde, ist bei hoher Laserleistung in den Vertiefungen ein ebener Boden erkennbar, was auf einen vollständigen Abtrag des nativen PS-Films hinweist.

Um den Einfluss des azidterminierten SAMs auf die Polymeranbindung zu demonstrieren, wurden Experimente zur Polymerpfropfung ohne SAM durchgeführt. Anstatt auf eine reaktive, azidterminierte Monoschicht wurde PS direkt auf ein gereinigtes Siliciumsubstrat aufgebracht. Diese Experimente zeigen, dass der SAM maßgeblich zur kovalenten Anbindung des Polymers beiträgt. Zwar waren auch bei der Strukturierung ohne azidterminierten SAM Strukturen von angebundenem PS erkennbar, diese entstanden aber nur in einem Bereich von vergleichsweise hohen Laserleistungen und langen Pulslängen. Außerdem waren die immobilisierten PS-Filme deutlich dünner (nur etwa 1 nm im Vergleich zu sonst etwa 4 nm).

Es wurden Punktmuster unter Variation von Laserleistung und Pulslänge erzeugt, um den Einfluss der zur Strukturierung verwendeten Laserparameter auf die Durchmesser der resultierenden Strukturen zu untersuchen. Die Strukturierung wurde mit einem Laserspot mit einem 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser von 2 µm durchgeführt. Die Durchmesser der PS-Strukturen wurden aus AFM-Aufnahmen bei halber Höhe bestimmt und in Abhängigkeit der zur Strukturierung verwendeten Laserparameter aufgetragen (s. Abbildung 4.38). Die Strukturen durchmesser nahmen mit steigender Laserleistung und Pulslänge zu. Die kleinsten Strukturen hatten Durchmesser von etwa 700 nm.

Anhand dieser Daten kann eine einfache thermokinetische Analyse durchgeführt werden. Hierzu wurden die stationären radialen Temperaturprofile berechnet, die Temperaturen an den Rändern der Strukturen bestimmt und in einem Arrhenius-Diagramm der Logarithmus der zur Strukturierung verwendeten Pulslänge gegen den Kehrwert der zugehörigen Temperatur aufgetragen (s. Abbildung 4.39). Aus der Steigung der Ausgleichsgerade erhält man die effektive Aktivierungsenergie des Prozesses. Die aus den experimentellen Daten



**Abbildung 4.38: a**-**c**) AFM-Aufnahmen (Topographie) lokal immobilisierter PS-Filme auf einem azidterminierten SAM, Laserparameter: P = 117 mW,  $\tau = 100 \text{ ms}$ , 400 ms und 700 ms,  $d_{2e} = 2.0 \mu \text{m}$ . **d**) Auftragung der Strukturdurchmesser in Abhängigkeit von den Laserparametern. Die Linien dienen nur zur Orientierung. Gefüllte Symbole stehen für kreisförmige, nicht gefüllte für donutförmige Strukturen.

berechnete Aktivierungsenergie beträgt 79.2 kJ/mol. Die Aktivierungsenergie zur Anbindung von PS an einen Sulfonylazid-SAM liegt bei 68 kJ/mol [125]. Bei in Lösung vorliegenden organischen Aziden ist die Aktivierungsenergie zur thermischen Zersetzung eines Alkylazids etwa 40 kJ/mol höher als die eines Sulfonylazids [205]. Ein derart deutlicher Unterschied wurde bei dem hier betrachteten Prozess nicht beobachtet. Dennoch wurde, wie zu erwarten, gefunden, dass die Anbindung von PS an einen Alkylazid-SAM etwas höher aktiviert ist als dessen Anbindung einen Sulfonylazid-SAM. Eine höhere an



**Abbildung 4.39:** Arrhenius-Auftragung der Daten aus Abbildung 4.38 zur Bestimmung der effektiven Aktivierungsenergie. Parameter für die Berechnung der radialen Temperaturprofile: R = 0.38,  $\kappa = 1.5$  W/cm K,  $T_0 = 300$  K und  $T_k = 99$  K.

Aktivierungsenergie ist bei dem hier verwendeten Laserstrukturierungsverfahren von Vorteil, da bei der photothermischen Laserstrukturierung die Strukturauflösung umso größer ist, je höher die effektive Aktivierungsenergie des zu Grunde liegenden Prozesses ist.

Von einer Bestimmung des präexponentiellen Faktors aus den experimentellen Daten wurde abgesehen, da die jeweils zu einer Laserleistung gehörigen Werte stark parallel verschoben sind. Diese Verschiebung kann durch eine Veränderung der Reflektivität des Substrats während der Strukturierung erklärt werden. Die Reflektivität der verwendeten Siliciumsubstrate beträgt ca. 0.38, durch Beschichtung mit dem Polymer verringert sich der Wert auf ca. 0.22. Während der Strukturierung wird der Polymerfilm partiell abgetragen (s. Abbildung 4.37), woraus eine Änderung der Reflektivität resultiert.

## 4.3.2 Laserinduzierte Anbindung von PNIPAAm

Stimuli-responsive Polymere eröffnen die Möglichkeit, schaltbare Oberflächenstrukturen herzustellen. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur Anbindung dünner Polymerfilme an azidterminierte SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si wurde eingesetzt, um PNIPAAm lokal auf der Oberfläche zu immobilisieren. PNIPAAm ist ein thermoresponsives Polymer mit einer

unteren kritischen Lösungstemperatur (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST) von 32 °C. Unterhalb dieser Temperatur liegt das Polymer in Wasser gequollen vor. Wird die Temperatur über die LCST erhöht, so kollabieren die Polymerstränge. Betrachtet man eine dünne Schicht PNIPAAm auf einem festen Substrat, so ist zu erwarten, dass bei einer Erhöhung der Temperatur über die LCST eine Verringerung der Schichtdicke beobachtet wird.

Auf einen azidfunktionalisierten ODS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si wurde mittels Spin-Coating eine PNIPAAm-Schicht aufgebracht. Für das Spin-Coating wurde eine Lösung von PNIPAAm in Ethanol mit einer Konzentration von 5 g/L verwendet. Anschließend wurde die Probe unter Variation von Laserleistung und Pulslänge mit dem Laser strukturiert. Um die kovalent angebundenen PNIPAAm-Strukturen freizulegen, wurde die Probe gründlich mit Wasser und Ethanol gespült. Die erhaltenen PNIPAAm-Strukturen waren in ihrer Morphologie mit den



**Abbildung 4.40:** Schematische Darstellung des Schaltverhaltens eines lokal immobilisierten PNIPAAm-Films (**a**). In Wasser bei verschiedenen Temperaturen unter- und oberhalb der LCST (32 °C) erstellte AFM-Aufnahmen (Topographie, **b** und **c**) und über den markierten Bereich gemittelte Höhenprofile (**d** und **e**) einer mittels laserinduzierter Polymerpfropfung an einen azidterminierten SAM erhaltenen PNIPAAm-Struktur.
bereits beschriebenen PS-Strukturen vergleichbar. Abhängig von den verwendeten Laserparametern entstanden kreis- oder donutförmige Strukturen. Lediglich die Schichtdicke der immobilisierten PNIPAAm-Filme war mit etwa 2 nm geringer als die der immobilisierten PS-Filme (etwa 4 nm). Diese Tatsache lässt sich vermutlich auf die unterschiedlichen molaren Massen der verwendeten Polymere zurückführen. Es wurde PS mit einer molaren Masse von  $M_w$  = 250000 g/mol und PNIPPAm mit  $M_w$  = 19000-30000 g/mol verwendet. Kim et al. zeigten, dass die Verwendung von PS unterschiedlicher Molmasse einen Einfluss auf die Schichtdicke des immobilisierten Polymerfilms hat [124]. Dieser Zusammenhang deutet sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten an.

Um das Schaltverhalten der PNIPAAm-gepfropften Bereiche zu beobachten, wurden AFM-Messungen in einer Flüssigzelle unter Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Abbildung 4.40 zeigt zwei Aufnahmen der gleichen Struktur bei einer Temperatur unterhalb und einer Temperatur oberhalb der LCST und die zugehörigen Höhenprofile. Es ist deutlich erkennbar, dass die Schichtdicke bei Erhöhung der Temperatur abnimmt. Der Prozess ist reversibel. Die Messung zeigt, dass die Funktionalität des Polymers durch den Strukturierungsprozess nicht beeinträchtigt wurde.

Anhand der stoffspezifischen Eigenschaften von PNIPAAm und der mittels AFM ermittelten Dicke des Polymerfilms kann die effektive Pfropfdichte des angebundenen PNIPAAm-Films bestimmt werden. Die Pfropfdichte  $\sigma$  lässt sich mit Gleichung 4.1 berechnen [206]:

$$\sigma = \frac{h_P \rho N_A}{M_w} , \qquad 4.1$$

wobei  $h_P$  die Schichtdicke des immobilisierten Polymerfilms,  $\rho$  die Dichte und  $M_w$  die molare Masse des Polymers und  $N_A$  die Avogadro-Zahl ist.

Mittels AFM wurde für einen trockenen PNIPAAm-Film eine Schichtdicke von 2 nm gemessen. Ausgehend von einer molaren Masse von 25000 g/mol und einer Dichte von 1.269 g/cm<sup>3</sup> für einen trockenen PNIPAAm-Film [207] liegt die Pfropfdichte nach Gleichung 4.1 bei 0.06 nm<sup>-2</sup>.

Bei gepfropften Polymerfilmen in Lösung spricht man von Polymerbürsten, wenn der Abstand  $D = \sigma^{-1/2}$  zwischen den einzelnen Ankerpunkten der Polymerketten wesentlich kleiner als die Dimension der Kette ist [208]. In diesem Zustand sind die Ketten gezwungen sich vom Substrat wegzustrecken. In einem guten Lösungsmittel entspricht der Radius einer Polymerkette dem Flory-Radius  $R_F$  [209]:

$$R_F = b N^{3/5}$$
, 4.2

103

wobei *b* die effektive Segmentlänge (für ein NIPAAm-Monomer wird eine Länge von 0.3 nm angenommen [210] und *N* die durchschnittliche Anzahl der Segmente in einer Kette ist. Es gilt  $N = M_w/M_0$  mit der molaren Masse eines NIPAAm-Monomers von  $M_0 = 113$  g/mol. Somit wird für das verwendete PNIPAAm ein Flory-Radius von 7.7 nm angenommen. Bei der berechneten Pfropfdichte von 0.06 nm<sup>-2</sup> beträgt der Abstand zwischen den Ankerpunkten der Ketten 4.1 nm und ist im Vergleich zur Dimension einer PNIPAAm-Kette in einem guten Lösungsmittel deutlich geringer. Die gepfropften PNIPAAm-Filme befinden sich nach dieser Abschätzung also in einem guten Lösungsmittel (z. B. Wasser unterhalb der LCST) im Bürstenregime.

Bei den bisherigen Überlegungen wurde davon ausgegangen, dass jede Polymerkette über nur einen Ankerpunkt an die Oberfläche angebunden ist. Da die Anbindung des Polymers durch eine Reaktion mit einer CH-Gruppe, die in jeder Kette mehrfach vorhanden ist, stattfindet, ist es denkbar, dass mehr als eine C-H-Bindung pro Polymerkette mit dem azidterminierten SAM reagiert und die Kette somit mehrfach mit der Oberfläche verknüpft wird. Die Anzahl der Ankerpunkte pro Polymerkette lässt sich anhand des beobachteten Schaltverhaltens der PNIPAAm-Filme in Wasser abschätzen. Im gequollenen Zustand liegen die Polymerketten ausgestreckt vor. Die theoretische Kettenlänge L der gequollenen PNIPAAm-Bürsten lässt sich mit folgender Gleichung berechnen [210]:

$$L = \frac{M_w}{M_0} b \left(\frac{b}{D}\right)^{2/3} .$$
 4.3

Ausgehend von einem Kettenabstand *D* von 4.1 nm erhält man für die gequollenen PNIPAAm-Bürsten mit  $M_w = 25000$  g/mol eine theoretische Länge von L = 11.6 nm. Die theoretische Länge der Bürsten ist also deutlich größer als die mittels AFM gemessene Höhe im gequollenen Zustand. Dieser Unterschied kann durch eine multiple Anbindung der Polymerketten hervorgerufen werden. Anhand eines Vergleichs von theoretischer und gemessener Bürstenlänge lässt sich abschätzen, wie lang die beweglichen, angebundenen Kettenfragmente sind und somit an wie vielen Stellen eine Polymerkette an der Oberfläche verankert ist. Gleichung 4.3 beschreibt einen linearen Zusammenhang zwischen der molaren Masse der Polymerketten und der Länge der Bürsten und lässt bei bekannter Bürstenlänge einen Rückschluss auf die molare Masse der angebundenen Kettenfragmente 6900 g/mol, was etwa 30 % der molaren Masse des zur Pfropfung verwendeten PNIPAAms entspricht. Es ist auch zu berücksichtigen, dass eine Polymerkette nicht notwendigerweise an ihren Enden, sondern an einer beliebigen Position entlang der

Kette mit der Oberfläche reagieren kann, und dass sich bei mehrfacher Anbindung einer Kette Schlaufen bilden. Anhand dieser Überlegungen lässt das beobachtete Quellverhalten vermuten, dass das Polymer durchschnittlich an zwei Ankerpunkten pro Kette mit der Oberfläche verknüpft ist.

Analog zu den Experimenten zur laserinduzierten Immobilisierung von PS wurde auch für die Anbindung von PNIPAAm der Einfluss der Laserparameter auf die entstehenden Strukturen untersucht. Die bei verschiedenen Laserleistungen und Pulslängen entstandenen Strukturen wurden mittels AFM abgebildet, deren Durchmesser bestimmt und eine thermokinetische Analyse durchgeführt. Für die Anbindung von PNIPAAm an die azidterminierte Monoschicht wurde die effektive Aktivierungsenergie zu 72.4 kJ/mol bestimmt. Der Wert entspricht in etwa der anhand der Daten zur Anbindung von PS bestimmten Aktivierungsenergie. Die Übereinstimmung deutet darauf hin, dass die Kinetik des Prozesses maßgeblich von der Aktivierung der Azidschicht bestimmt wird und nicht von der Art des eingesetzten Polymers abhängig ist.

#### 4.3.3 Laserinduzierte Anbindung von P(MMA-co-FCA)

Zur laserinduzierten Polymeranbindung wurde auch ein fluoreszierendes Polymer verwendet: das Copolymer P(MMA-*co*-FCA) mit einem Stoffmengenverhältnis von 3:1. Das Anregungsmaximum des Fluorophors liegt bei einer Wellenlänge von 311 nm und das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 418 nm. Um ein Quenching der Fluoreszenz durch das Silicium zu vermeiden, wurden die Experimente auf thermisch oxidierten Siliciumsubstraten mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm durchgeführt.



**Abbildung 4.41:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Punktmusters von lokal immobilisiertem P(MMA-co-FCA),  $\lambda_{AF} = 330$ -385 nm,  $\lambda_{EF} = > 420$  nm,  $t_L = 10$  s. Laserparameter: **a**) P = 39 mW, **b**) P = 67 mW,  $\tau = 100$  ms, 400 ms, 700 ms, 1000 ms,  $d_{2e} = 2.8 \ \mu$ m.

Es wurde ein azidterminierter SAM auf einem thermisch oxidierten Siliciumsubstrat hergestellt und mittels Spin-Coating eine Schicht von P(MMA-*co*-FCA) auf der Probe aufgebracht. Hierzu wurde eine Lösung von P(MMA-*co*-FCA) in Toluol mit einer Konzentration von 10 g/L verwendet. Anschließend wurde die Oberfläche mit dem Laser strukturiert. Die Probe wurde mit einem Punktmuster unter Variation von Laserleistung und Pulslänge beschrieben. Nach der Laserstrukturierung wurde die Probe gründlich mit Toluol und Ethanol gespült. Die Charakterisierung der Strukturen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und AFM. Abbildung 4.41 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Punktmusters von immobilisiertem P(MMA-*co*-FCA). Abhängig von den verwendeten Laserparametern sind kreis- oder donutförmige Strukturen erkennbar. Die Tatsache, dass eine Fluoreszenz des angebundenen Polymers detektiert werden kann, demonstriert, dass das Verfahren die Anbindung von P(MMA-*co*-FCA) ermöglicht, ohne die chemische Struktur des Fluorophors zu zerstören. Mit dem AFM lässt sich die Schichtdicke des angebundenen Polymerfilms bestimmen. Sie beträgt etwa 6 nm (Abbildung 4.42).



**Abbildung 4.42:** AFM-Aufnahme (Topographie, **a**) und Höhenprofil (**b**) eines lokal immobilisierten P(MMA-co-FCA)-Films.

#### 4.3.4 Laserinduzierte Anbindung von Polyethylenglycol

Zur Herstellung biofunktionaler Polymerstrukturen eignet sich besonders das proteinresistente Polyethylenglycol. Wird PEG lokal an eine Oberfläche angebunden, so entstehen Bereiche, in denen keine Proteinadsorption stattfindet, während Proteine in der Umgebung adsorbieren können. Durch die lokale Anbindung von PEG können Oberflächen zur gezielten Proteinadsorption maßgeschneidert werden. In diesem Kapitel wird die laserinduzierte Anbindung von PEG an einen azidterminierten SAM auf einem Siliciumsubstrat beschrieben. Lokal mit PEG modifizierte Oberflächen wurden anschließend in Experimenten zur selektiven Adsorption von fluoreszenzmarkierten Proteinen eingesetzt.

Auf einem azidfunktionalisierten ODS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si wurde mittels Spin-Coating ein Film von PEG aufgebracht. Hierzu wurde eine Lösung von PEG in Chloroform mit einer Konzentration von 10 g/L verwendet. Da die Identifizierung der Proteinadsorption mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wurden auch für diese Experimente thermisch oxidierte Siliciumsubstrate mit einer Oxidschichtdicke von etwa 100 nm verwendet, um ein gutes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Die Proben wurden mit dem Laser strukturiert, es wurden Punktmuster unter Variation von Laserleistung und Pulslänge erzeugt. Nach der Laserstrukturierung wurde nicht kovalent angebundenes PEG durch gründliches Spülen der Probe mit Chloroform, Millipore-Wasser und Ethanol entfernt. Die lokal mit PEG funktionalisierten Substrate wurden in Experimenten zur unspezifischen Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA eingesetzt. Die Strukturen wurden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie und AFM charakterisiert.

Abbildung 4.43 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines PEG-Punktmusters nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA. Es ist eindeutig zu erkennen, dass das BSA selektiv in der Umgebung adsorbiert und in den mit PEG funktionalisierten Bereichen keine Proteinadsorption zu beobachten ist. Die Durchmesser der gezeigten Strukturen nehmen von links nach rechts, mit steigender Pulslänge, zu.

Die strukturierten Bereiche wurden nach der Laserstrukturierung und dem Ablösen des nicht kovalent gebundenen PEGs mittels AFM abgebildet. Anschließend erfolgte die selektive Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA und es wurden erneute AFM-Messungen derselben Strukturen durchgeführt. Zusätzlich wurden diese nun auch mittels



**Abbildung 4.43:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Punktmusters von lokal an einen azidterminierten SAM angebundenem PEG nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA,  $\lambda_{AF}$  = 532-554 nm,  $\lambda_{EF}$  = 570-613 nm,  $t_L$  = 1 s. Laserparameter: P = 242 mW,  $\tau$  = 0.05-5 ms (zunehmend von links nach rechts),  $d_{2e}$  = 2.8 µm.



**Abbildung 4.44:** AFM- (Topographie und Phasenkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines lokal immobilisierten PEG-Films auf einem azidterminierten SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si vor (**a** und **b**) und nach (**c** bis **e**) der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA, **e**)  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 1$  s. Laserparameter: P = 284 mW,  $\tau = 0.1$  ms,  $d_{2e} = 2.8$  µm. Das Linienprofil (**f**) ist ein Mittelwert aus den zwei durch die Zentren der Strukturen verlaufenden Profilen der Intensität.

Fluoreszenzmikroskopie abgebildet. Abbildung 4.44 zeigt eine Zusammenstellung von AFMund Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von PEG-Strukturen, die bei einer Laserleistung von 284 mW und einer Pulslänge von 0.1 ms erhalten worden sind, vor und nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA. Bei diesen Laserparametern erfolgte die Anbindung von PEG in einem geschlossenen kreisförmigen Bereich mit einem Durchmesser von etwa 1 µm. Der angebundene PEG-Film ist sehr dünn und auf der Topographie-Aufnahme nur schwach zu erkennen (Abbildung 4.44a). Allerdings weist der Phasenkontrast (Abbildung 4.44b) auf einen Materialunterschied zwischen den strukturierten Bereichen und der Umgebung hin. Auf den strukturierten Bereichen wird keine Adsorption von BSA beobachtet (Abbildung 4.44e). Der Bereich, in dem auf der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme keine Adsorption zu erkennen ist, entspricht dem Bereich, in dem der PEG-Film auf den AFM-Aufnahmen im Phasenkontrast zu erkennen ist.

In Abbildung 4.45 sind, wie in Abbildung 4.44, AFM- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von weiteren PEG-Strukturen vor und nach der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA zusammengestellt. Hier wird ein Bereich gezeigt, der bei einer etwas höheren Laserleistung von 322 mW und einer Pulslänge von 0.05 ms strukturiert worden ist. Bei diesen Strukturierungsparametern findet ein Abtrag des Polymers bzw. des darunter liegenden SAMs im Zentrum der Strukturen statt, so dass eine donutförmige PEG-Struktur resultiert. Der angebundene PEG-Film ist hier auch auf der Topographie-Aufnahme (Abbildung 4.45a) erkennbar. Die Adsorption des Proteins findet sowohl in der Umgebung, in der ein azidterminierter SAM vorliegt, als auch im Zentrum der strukturierten Bereiche statt (Abbildung 4.45e).

Durch die laserinduzierte Anbindung von PEG werden Oberflächen erhalten, die sich in den strukturierten Bereichen proteophob verhalten. Die Strukturierung ist also komplementär zu der in Kapitel 4.1 beschriebenen Herstellung von Protein-Microarrays durch Strukturierung proteinresistenter PEG-Silan-SAMs, bei der eine Adsorption von Proteinen in den strukturierten Bereichen, jedoch nicht in der Umgebung beobachtet wird.



**Abbildung 4.45:** AFM- (Topographie und Phasenkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen eines lokal immobilisierten PEG-Films auf einem azidterminierten SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si vor (**a** und **b**) und nach (**c** bis **e**) der Adsorption von mit AlexaFluor555 markiertem BSA, **e**)  $\lambda_{AF} = 532-554$  nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 1$  s. Laserparameter: P = 322 mW,  $\tau = 0.05$  ms,  $d_{2e} = 2.8$  µm. Das Linienprofil (**f**) ist ein Mittelwert aus den zwei durch die Zentren der Strukturen verlaufenden Profilen der Intensität.

### 4.4 Laserinduzierte Herstellung von Goldnanopartikelstrukturen

In diesem Kapitel wird ein Laserverfahren zur Herstellung von Oberflächenstrukturen aus Goldnanopartikeln beschrieben. Diese können als Template für eine anschließende Biofunktionalisierung dienen. Die Laserstrukturierung wurde in einer wässrigen Lösung von Natriumcitrat und Tetrachlorgoldsäure (den Ausgangstoffen zur nasschemischen Synthese von citratstabilisierten Goldnanopartikeln) durchgeführt. So werden während der Strukturierung Goldnanopartikel zum einen gebildet und zum anderen lokal auf der Substratoberfläche deponiert. Es wird also ermöglicht, in nur einem Arbeitsschritt Goldnanopartikel herzustellen und gezielt auf der Oberfläche abzuscheiden. Damit stellt dieses Verfahren eine deutlichere Verringerung des experimentellen Aufwands im Vergleich zur selektiven Adsorption von Goldnanopartikeln auf funktionalisierten, vorstrukturierten Substraten dar. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Abbildung 4.46 gezeigt.

Als Substrate wurden hierbei APS-SAMs auf Siliciumsubstraten verwendet, da aminoterminierte SAMs eine Affinität zu citratstabilisierten Goldnanopartikeln aufweisen. Siliciumsubstrate wurden gereinigt, mit Piranha-Lösung behandelt und mit APS beschichtet. Die aminoterminierten SAMs wurden mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 532 nm in einer mit einer wässrigen Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat gefüllten Küvette strukturiert. Anschließend wurden die Proben mittels REM, Lichtmikroskopie und AFM charakterisiert.



Abbildung 4.46: Schemazeichnung der laserinduzierten Bildung von Goldnanopartikeln.



**Abbildung 4.47:** REM-Aufnahmen verschiedener Nanopartikelstrukturen, die bei der Laserstrukturierung eines APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si in wässriger Lösung von Natriumcitrat und Goldsäure entstanden sind. Laserparameter: **a**) P = 150 mW,  $\tau = 400 \text{ ms}$ , **b**) P = 300 mW,  $\tau = 1000 \text{ ms}$ ,  $d_{2e} = 2.8 \mu m$ ,  $n_{Au}$ : $n_{Ci} = 0.17$ . Bild **a** wurde an den Rändern mit grau aufgefüllt.

Die Proben wurden mit Punktmustern unter Variation von Laserleistung und Pulslänge strukturiert. Es wurden Laserleistungen im Bereich von 100 bis 350 mW verwendet, die Pulslängen lagen zwischen 0.5 ms und 2000 ms. Abhängig von den verwendeten Laserparametern wurden unterschiedliche Strukturformen beobachtet. In Abbildung 4.47 sind exemplarisch zwei verschiedene Strukturen gezeigt. Hierbei handelt es sich um REM-Aufnahmen einer bei einer Laserleistung von 150 mW und einer Pulslänge von 400 ms und einer bei einer höheren Laserleistung von 300 mW und einer Pulslänge von 1000 ms erzeugte Strukturen. Bei geringen Laserleistungen wurden kreisförmige, mit Nanopartikeln belegte Bereiche erhalten, deren Durchmesser in der Größenordnung des zur Strukturierung verwendeten Laserspots liegen. Bei höheren Laserleistungen traten ringförmige Strukturen auf. Bei der gezeigten ringförmigen Struktur scheinen die Nanopartikel verschmolzen zu sein, so dass der Eindruck eines "geschlossenen" Rings aus Gold entsteht. Die Struktur hat einen Außendurchmesser von 4.4 µm und der Ring eine Breite von etwa 450 nm. Bei Verwendung höherer Laserleistungen wird die Strukturierung teilweise durch die Entstehung von Gasblasen in der Lösung, die zur Ablenkung des Laserstrahls führen, gestört. Eine Bildung von Gasblasen zeigt sich während der Strukturierung durch ein Flackern des von der Probe reflektierten Lichts. Mithilfe des von der Probenoberfläche reflektierten, auf den weißen Schirm projizierten Laserspots kann verfolgt werden, ob der Laserstrahl auf die Probenoberfläche fokussiert oder der Strahlengang durch Gasblasen verändert ist.

Im Allgemeinen nimmt der Durchmesser der mit Nanopartikeln belegten Bereiche mit der Belichtungszeit und mit der einfallenden Laserleistung zu. Diese Tendenz ist auf



**Abbildung 4.48:** Auflichtmikroskopie- (**a**) und REM-Aufnahme (**b**) verschiedener Punktmuster, die bei der Laserstrukturierung eines APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si in wässriger Lösung von Natriumcitrat und Goldsäure entstanden sind. Laserparameter: **a**)  $P = 150-350 \text{ mW}, \tau = 1-2000 \text{ ms}, n_{Au}:n_{Ci} = 0.17, \mathbf{b}) P = 100-200 \text{ mW}, \tau = 50-100 \text{ ms}, n_{Au}:n_{Ci} = 0.54, d_{2e} = 2.8 \ \mu\text{m}$ . Die Laserleistung nimmt jeweils von oben nach unten, die Pulslänge von links nach rechts, zu.

Übersichtsaufnahmen der Punktmuster mittels Lichtmikroskopie und REM erkennbar (s. Abbildung 4.48). Anhand der REM-Aufnahmen wurden die Durchmesser der geschlossenen kreisförmigen Strukturen ausgemessen. Die Abhängigkeit der Strukturdurchmesser von den zur Strukturierung verwendeten Laserparametern für die kreisförmigen Strukturen ist in Abbildung 4.49 aufgetragen.

Bei der nasschemischen Synthese von citratstabilisierten Goldnanopartikeln hängt der Durchmesser der Nanopartikel vom eingesetzten Stoffmengenverhältnis von Goldsäure und Natriumcitrat ab [137]. Daher wurde bei den Experimenten zur Laserstrukturierung dieses



**Abbildung 4.49:** Durchmesser der bei der Laserstrukturierung eines APS-SAMs in wässriger Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat entstandenen Strukturen in Abhängigkeit von den Laserparametern. Die Linien dienen nur zur Orientierung.

Stoffmengenverhältnis variiert. Es konnte zwar eine Abhängigkeit der Größe der gebildeten Nanopartikel vom in der Lösung vorliegenden Stoffmengenverhältnis festgestellt werden, allerdings war diese weniger ausgeprägt als bei der nasschemischen Synthese im Becherglas. Das liegt wahrscheinlich an den deutlich verkürzten Reaktionszeiten beim Laserstrukturierungsverfahren. Während die Partikel bei der Synthese im Becherglas in einer Zeitspanne von einigen Minuten gebildet werden [136], ist der Prozess bei der Laserstrukturierung vermutlich innerhalb von Millisekunden abgeschlossen. Insgesamt wurde festgestellt, dass die bei der Laserstrukturierung entstehenden Partikel kleiner sind als bei gleichem Stoffmengenverhältnis im Becherglas synthetisierte Partikel. Bei der Laserstrukturierung entstanden bei einem Stoffmengenverhältnis von  $n_{Au}$ : $n_{Ci} = 0.17$  Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 10 nm (gemessen mittels AFM). Im Vergleich hierzu führt dieses Stoffmengenverhältnis bei der Synthese im Becherglas zu citratstabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von ca. 16 nm [211].

Um herauszufinden, inwieweit die eingesetzten Chemikalien zum hier beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Strukturen aus Goldnanopartikeln notwendig sind, wurden Strukturierungsexperimente durchgeführt, bei denen zum einen auf den Einsatz eines APS-SAMs auf der Substratoberfläche und zum anderen auf den Einsatz von Natriumcitrat in der



**Abbildung 4.50:** REM-Aufnahmen **a**) eines in einer wässrigen Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat strukturierten APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si, **b**) eines in einer wässrigen Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat strukturierten SiO<sub>2</sub>/Si-Substrats und **c**) eines in einer wässrigen Lösung von Goldsäure strukturierten APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si. Laserparameter: P = 200 und 150 mW,  $\tau$  = 500 ms, d<sub>0</sub> = 2.8 µm, n<sub>Au</sub>:n<sub>Gi</sub> = 0.17.

Strukturierungslösung verzichtet wurde. REM-Aufnahmen zu diesen Experimenten sind in Abbildung 4.50 gezeigt. In einem Experiment wurde die Strukturierung also mit einem unbeschichteten Siliciumwafer in wässriger Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat durchgeführt. Bei Abwesenheit des APS-SAMs wurde keine Abscheidung der Nanopartikel auf der Oberfläche beobachtet (s. Abbildung 4.50b). In einem weiteren Experiment wurde eine mit APS beschichtete Siliciumprobe in einer wässrigen Lösung, die nur Goldsäure enthält, strukturiert. Auch hierbei wurde keine Abscheidung von Nanopartikeln beobachtet (s. Abbildung 4.50c). Demnach kann geschlussfolgert werden, dass für das vorgestellte Verfahren sowohl eine Oberfläche, die eine Affinität zu den entstehenden Nanopartikeln aufweist, als auch die Anwesenheit von Natriumcitrat, das als Reduktionsmittel dient und die Nanopartikel stabilisieren kann, notwendig ist.

Um den Einfluss der APS-Monoschicht auf den Prozess genauer zu untersuchen, wurde bei der Laserstrukturierung in Lösung ein vorstrukturierter APS-SAM eingesetzt. Für dieses Experiment wurde ein Siliciumsubstrat mit APS beschichtet und die Schicht mittels photothermischer Laserstrukturierung an Luft in einem Linienmuster lokal abgetragen. Anschließend wurde die Laserstrukturierung in Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat durchgeführt. Abbildung 4.51 zeigt mit Nanopartikeln belegte Bereiche, die auf einer zuvor mit einem Linienmuster strukturierten APS-Schicht erhalten worden sind. Auf dem REM-Bild ist zu erkennen, dass die zuvor in den APS-SAM geschriebenen Linien im Zentrum der kreisförmigen Bereiche nicht von Nanopartikeln belegt worden sind. An den Rändern der kreisförmigen Bereiche sind die Linien weniger klar zu erkennen, was auf Konvektion in der Lösung zurückzuführen sein könnte, die von der durch die Laserstrahlung induzierten Temperaturerhöhung hervorgerufen wurde.



**Abbildung 4.51:** a) Schemazeichnung eines zweistufigen Strukturierungsexperiments: 1. Laserstrukturierung eines APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si, 2. Laserstrukturierung in wässriger Lösung von Goldsäure und Natriumcitrat. b) REM-Aufnahme von Nanopartikelstrukturen auf einem zuvor mit einem Linienmuster strukturierten APS-SAM.

Während der Strukturierung durchquert der Laserstrahl die wässrige Lösung von Natriumcitrat und Goldsäure, bevor er auf das zu strukturierende Siliciumsubstrat trifft. Es wurde ein UV/Vis-Spektrum einer bei der Strukturierung verwendeten Lösung aufgenommen. Dieses zeigt keine Absorption im sichtbaren Bereich (s. Abbildung 4.52). Das Laserlicht wird also nicht in der Lösung, sondern praktisch ausschließlich im Siliciumsubstrat absorbiert. Daher kann angenommen werden, dass bei der Strukturierung durch den Laser eine Temperaturerhöhung auf der Substratoberfläche hervorgerufen wird, wodurch sich die Strukturierungslösung in der Nähe der Oberfläche erwärmt und so die Bildung der citratstabilisierten Goldnanopartikel induziert. Eine detaillierte Aufklärung der ablaufenden Prozesse konnte, mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, nicht erreicht werden. So bleibt unklar, ob die Bildung der Goldnanopartikel direkt an der Oberfläche stattfindet, oder die Nanopartikel zunächst in der Lösung gebildet werden und anschließend an der Oberfläche adsorbieren.



**Abbildung 4.52:** UV/Vis-Spektrum einer bei der Strukturierung verwendeten Lösung von Natriumcitrat und Goldsäure in Wasser,  $n_{Au}$ : $n_{Gi} = 0.17$ .

Die mittels Laserstrukturierung hergestellten Goldnanopartikelstrukturen können anschließend biofunktionalisiert werden. Citratliganden, die aufgrund der Herstellungsmethode an der Oberfläche von Goldnanopartikeln gebunden sind, lassen sich durch andere Moleküle austauschen [29]. Exemplarisch wurde eine Probe mit Goldnanopartikelstrukturen mit fluoreszenzmarkierter DNA funktionalisiert. Hierzu wurde zunächst thiolmodifizierte, mit FAM markierte ssDNA auf den Strukturen immobilisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einem komplementären, mit TAMRA markiertem DNA-Strang.



**Abbildung 4.53:** Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme eines DNAfunktionalisierten Punktmusters von Goldnanopartikelstrukturen auf einem APS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si. Auf den Strukturen wurde thiolmodifizierte, FAM-markierte ssDNA immobilisiert und anschließend mit TAMRA-markierter ssDNA hybridisiert,  $\lambda_{AF} = 532$ -554 nm,  $\lambda_{EF} = 570-613$  nm,  $t_L = 20$  s. Laserparameter: P = 50-100 mW,  $\tau = 5-1000$  ms,  $n_{Au}$ : $n_{CI} = 0.54$ ,  $d_{2e} = 2.8$  µm. Die Laserleistung nimmt von oben nach unten, die Pulslänge von links nach rechts, zu.

Abbildung 4.53 zeigt eine Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme der DNA-funktionalisierten Strukturen. Es wurde eine selektive Anbindung der DNA an den Goldnanopartikelstrukturen beobachtet. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Goldnanopartikelstrukturen zur lokalen Immobilisierung von Biomolekülen genutzt werden können. Damit stellt die beschriebene Lasermethode einen möglichen Weg zur Herstellung mikrostrukturierter Template dar, die sich zur Präparation lokal biofunktionalisierter Oberflächen eignen. Aufgrund ihrer sehr großen Oberfläche sind Nanopartikelstrukturen attraktiv für den Aufbau von Sensoren, da hierdurch eine hohe Signalintensität und damit Empfindlichkeit erreicht werden kann.

# **5 Z**USAMMENFASSUNG

SAMs stellen einen idealen Ausgangspunkt für den Aufbau funktionaler Oberflächenstrukturen dar [18-20]. Trotzdem sie nur sehr dünn sind, können durch die Wahl einer geeigneten Endgruppe die Oberflächeneigenschaften eines festen Substrats maßgeschneidert werden. Durch Kombination von Strukturierung und (Bio)funktionalisierung eröffnen sich vielseitige Möglichkeiten eine Oberfläche mit lateral unterschiedlichen Eigenschaften aufzubauen.

Ein äußerst flexibles Verfahren zur Strukturierung von SAMs ist die serielle Laserstrukturierung [14-17]. Ein fokussierter Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 532 nm, wird genutzt, um Strukturen auf die Oberfläche zu schreiben. Die Strukturerzeugung basiert auf einem photothermischen Prozess, der Laserstrahl erwärmt die Oberfläche und durch die Temperaturerhöhung werden chemische Reaktionen ausgelöst. Aufgrund der nichtlinearen Abhängigkeit der Kinetik von der Temperatur können so Strukturen erzeugt werden, die deutlich kleiner sind als der zur Strukturierung verwendete Laserspot. Da große Schreibgeschwindigkeiten verwendet werden können, erlaubt das Verfahren die Strukturierung großer Flächen in kurzer Zeit. Die Strukturierung kann an Luft oder auch in anderen Medien durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde die serielle Laserstrukturierung eingesetzt, um auf unterschiedliche Weise lokal biofunktionalisierte Template herzustellen. Hierbei wurde die große Flexibilität, die Laserverfahren bieten, ausgenutzt. Die Strukturierung wurde sowohl an Luft als auch in einer Lösung und an einer durch einen Feststoff verdeckten Grenzfläche durchgeführt. Zur Strukturerzeugung wurden destruktive Verfahren, die auf der lokalen Entfernung des SAMs beruhen, und konstruktive Verfahren, bei denen eine Modifizierung des SAMs oder die Anbindung von Material an den SAM vorgenommen wird, eingesetzt. An verschiedenen Beispielen wurde das Potential der Laserstrukturierung bei der Miniaturisierung biotechnologischer Arrays aufgezeigt.

Zunächst wurde die photothermische Laserstrukturierung von PEG-Silan-SAMs zur selektiven Adsorption von Proteinen untersucht. Es wurden SAMs aus zwei verschiedenen Precursoren, PEG-Trichlorsilan und PEG-Trimethoxysilan mit jeweils 6-9 EG-Einheiten, hergestellt und charakterisiert. Die hydrophilen SAMs mit einer Schichtdicke von etwa 1 nm wurden mit dem Laseraufbau unter Variation von Pulslänge bzw. Schreibgeschwindigkeit und Laserleistung mit Punkt- und Linienmustern strukturiert. Anschließend wurden Experimente Proteinadsorption durchgeführt. Hierzu wurden unspezifischen zum zur einen fluoreszenzmarkiertes BSA und Streptavidin eingesetzt und die Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert und zum anderen mit Goldclustern markiertes Streptavidin eingesetzt und REM zur Charakterisierung verwendet. Ergänzend wurden jeweils AFM-Aufnahmen von den Strukturen erstellt. Es zeigte sich, dass beide Wege prinzipiell zur selektiven Proteinadsorption geeignet sind, die Proteine adsorbieren lokal in den strukturierten Bereichen. Allerdings wiesen die PEGMeO-SAMs eine deutlich bessere Proteinresistenz auf und das Fluoreszenzsignal der lokal adsorbierten Proteine war auf diesen SAMs größer. Daher sind PEGMeO-SAMs den PEGCI-SAMs bei der Herstellung von Protein-Arrays vorzuziehen. Die Durchmesser der erzeugten Strukturen hingen von den verwendeten Laserparametern ab, sie wurden mit zunehmender Leistung und Pulslänge größer. Die Durchmesser der kleinsten hergestellten Strukturen lagen im Bereich von 300 nm bei Strukturierung mit einem Laserspot mit einem 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser von 2.8 µm. Auch die spezifische Proteinadsorption wurde getestet. Auf einem strukturierten PEGMeO-SAM wurde zunächst biotinyliertes BSA selektiv und unspezifisch adsorbiert. Anschließend wurde hieran spezifisch Streptavidin immobilisiert. Eine derartige, mehrlagige Adsorptionsstrategie kann zum kontrollierten Aufbau biofunktionaler Strukturen verwendet werden. Das immobilisierte Streptavidin stellt zwei weitere Bindungstaschen für Biotin an der Oberfläche zur Verfügung, die zur Anbindung eines weiteren biotinylierten Biomoleküls unter Erhalt dessen natürlicher Funktion genutzt werden können.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit strukturierte SAMs zur lokalen, kovalenten Anbindung von ssDNA verwendet. Hierzu wurde zunächst die auf Au/Si-Substraten etablierte photothermische Strukturierung von HDT-SAMs auf Au/Glas-Substrate übertragen. Die Strukturierung von HDT-SAMs auf Au/Glas-Substraten mit unterschiedlicher Goldschichtdicke zeigte, dass die Strukturgrößen und zur Strukturierung nötigen Laserleistungen stark von der Dicke der Goldschicht abhängen. Eine Strukturierung kann mit sehr geringen Laserleistungen (etwa 10 mW bei einer Goldschichtdicke von 10 nm) durchgeführt werden. Die Strukturgrößen in Abhängigkeit von den Laserparametern wurde nach der Übertragung der Strukturen in den Goldfilm durch nasschemisches Ätzen bestimmt. Die kleinsten erreichten Durchmesser lagen hier im Bereich von 600 nm, wobei der 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser des zur Strukturierung verwendeten Laserspots 2.8 µm betrug.

Strukturierte HDT-SAMs auf Gold wurden zum Aufbau bifunktionaler SAMs verwendet. Die strukturierten Bereiche, in denen die Thiolschicht abgetragen ist, können mittels Backfilling mit einem zweiten Thiol funktionalisiert werden. Diese Strategie wurde zur lokalen Funktionalisierung mit DNA verfolgt. Zunächst wurden bifunktionale SAMs hergestellt, die lokal COOH-Gruppen in einer Matrix von Alkylgruppen enthalten. Es wurde versucht diese Template mittels EDC/NHS-Kopplungschemie mit aminomodifizierter ssDNA zu funktionalisieren. Zwar konnte die Aktivierung der COOH-Gruppen mit NHS mittels IRRAS-Spektroskopie nachgewiesen werden und DNA-funktionalisierte Linienmuster nach der Hybridisierung mit einem komplementären, fluoreszenzmarkierten DNA-Strang im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden, die auf diesem Weg erzielten Ergebnisse waren jedoch wenig zufriedenstellend, da das detektierte Fluoreszenzsignal und folglich wahrscheinlich die erreichte Funktionalisierungsdichte nur sehr gering waren. Als eine geeignete Alternative zur Immobilisierung von ssDNA, hat sich die direkte Funktionalisierung der strukturierten Bereiche mit thiolmodifizierter ssDNA erwiesen. Nach einem Auffüllen des SAMs mit MUD waren die funktionalisierten Bereiche sehr deutlich in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erkennbar.

Neben Thiol-SAMs auf Gold konnten auch Alkylsiloxan-SAMs auf Siliciumsubstraten lokal mit DNA funktionalisiert werden. Hierzu wurde eine ODS-Schicht auf SiO<sub>2</sub>/Si mit dem von Klingebiel et al. entwickelten Verfahren [28, 193] lokal bromiert und durch nasschemische Verfahren aminiert. Ein lokal aminoterminierter SAM konnte zur Anbindung von amino-modifizierter ssDNA mittels Glutaraldehyd als Cross-Linker genutzt werden. Auf diesem Weg konnten DNA-funktionalisierte Strukturen mit Durchmessern im Mikrometerbereich auf einem Siliciumsubstrat realisiert werden.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein laserbasiertes Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, ein beliebiges Polymer an ein Siliciumsubstrat anzubinden. Hierzu wurde zunächst ein Siliciumsubstrat mit OTS beschichtet und nasschemisch azidiert. Dann wurde ein Polymerfilm mittels Spin-Coating auf das Substrat aufgebracht. Die Laserstrukturierung ermöglicht eine Adressierung des SAMs durch den Polymerfilm hindurch. So wird der vom Polymerfilm verdeckte azidterminierte SAM lokal mit dem Laser thermisch aktiviert, was zu einer kovalenten Anbindung der Polymerketten an die Monoschicht führt. Abschließend kann nicht kovalent angebundenes Polymer mit einem geeigneten Lösungsmittel entfernt und die lokal gepfropften Filme freigelegt werden. Die Polymeranbindung wurde ausführlich am Beispiel von Polystyrol untersucht. Der Einfluss der Laserparameter auf die entstehenden Strukturen wurde getestet. Je nach Laserleistung entstanden kreis- oder donutförmige Strukturen mit einer Filmdicke von etwa 4 nm. Die minimalen Strukturgrößen lagen im Bereich von 700 nm bei Verwendung eines Laserspots mit einem 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser von 2 µm. XPS-Messungen des immobilisierten PS-Films zeigen ein für Polystyrol charakteristisches Spektrum. Anhand einer simplen thermokinetischen Analyse wurde die effektive

#### ZUSAMMENFASSUNG

Aktivierungsenergie des Prozesses bestimmt. Sie liegt bei etwa 80 kJ/mol. Verschiedene funktionale Polymere wurden auf diese Weise lokal auf der Oberfläche immobilisiert. So wurde das thermoresponsive PNIPAAm angebunden und das Schaltverhalten einer Struktur mittels AFM unter Wasser beobachtet. Das fluoreszierende Copolymer P(MMA-co-FCA) wurde angebunden und die Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Schließlich wurde das proteinresistente PEG lokal angebunden und die strukturierten Substrate zur selektiven unspezifischen Adsorption von fluoreszenzmarkiertem BSA verwendet. Die Experimente zur Anbindung der verschiedenen Polymere haben gezeigt, dass das Polymer während der Laserstrukturierung nicht beschädigt und die chemische Struktur und damit die Funktion des Polymers erhalten bleibt.

Schließlich wurden Goldnanopartikelstrukturen mit dem Laser hergestellt. Durch eine Laserstrukturierung eines APS-SAMs auf SiO<sub>2</sub>/Si in einer Lösung von Tetrachlorgoldsäure und Natriumcitrat wurden Nanopartikel in einem Schritt gebildet und lokal auf der Oberfläche immobilisiert. So wurden kreis- oder ringförmige Goldnanopartikelstrukturen mit Durchmessern im Mikrometerbereich erhalten. Die mit Goldnanopartikeln dekorierten Bereiche können durch anschließende Funktionalisierung der Goldpartikel als Plattform für den Aufbau biofunktionalisierter Oberflächen eingesetzt werden. Die Möglichkeit der Biofunktionalisierung fluoreszenzmarkierter DNA demonstriert.

Weiterführende Experimente könnten sich mit dem Aufbau multifunktionaler Oberflächen beschäftigen. Durch eine mehrstufige Strukturierung und Funktionalisierung ist ein sukzessiver Aufbau multifunktionaler Strukturen mit verschiedenen biologisch relevanten Molekülen denkbar. So könnten Bio-Arrays hergestellt werden, die zur parallelen Detektion verschiedener Biomoleküle einsetzbar sind.

Eine weitere Verkleinerung der Strukturen ist zum einen durch die Verwendung höher fokussierender Optiken zu realisieren. Außerdem wäre die Übertragung der entwickelten Methoden auf eine fs-Laserstrukturierung sehr interessant, da hierdurch eine Strukturierung im Sub-100 nm-Bereich in Angriff genommen werden kann.

Schließlich kann auch über eine Parallelisierung der Laserstrukturierung durch die Verwendung von Mikrolinsen-Arrays, Masken oder Interferenzmustern nachgedacht werden. Hierdurch könnte die Bearbeitungszeit noch stärker reduziert werden. Vor allem die Strukturierung von HDT-SAMs auf goldbeschichteten Glassubstraten erscheint für diese Weiterentwicklung sehr geeignet, da hierfür nur sehr geringe Laserleistungen (etwa 10 mW) benötigt werden.

## **6 A**NHANG

#### 6.1 Abbildungen



**Abbildung 6.1:** AFM-Aufnahmen (Topographie) von durch laserinduzierte Polymerpfropfung entstandenen Strukturen. PS wurde lokal auf einem ADT-SAM auf Au/Si angebunden. Laserparameter: **a**)  $P = 97 \text{ mW}, \tau = 100 \text{ ms}, \mathbf{b}) P = 107 \text{ mW}, \tau = 50 \text{ ms}, d_{2e} = 2.8 \mu\text{m}.$ Bei den angewandten Laserparametern findet keine Desorption des Thiol-SAMs statt.



**Abbildung 6.2:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Punktmusters von lokal an einen azidterminierten SAM auf 100 nm-SiO<sub>2</sub>/Si gepfropftem P(MMA-co-FCA),  $\lambda_{AF} = 330-385$  nm,  $\lambda_{EF} = > 420$  nm,  $t_L = 5$  s. Laserparameter: **a**) P = 102 mW, **b**) P = 52 mW,  $\tau = 100$  ms, 400 ms, 700 ms, 1000 ms,  $d_{2e} = 2.8 \mu$ m. Zur Präparation des azidterminierten SAMs wurde BrUTS anstatt eines photobromierten ODS-SAMs verwendet.



**Abbildung 6.3:** Auftragung der Strukturdurchmesser in Abhängigkeit von den Laserparametern für die laserinduzierte Anbindung von PNIPAAm an einen azidterminierten SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si,  $d_{2e} = 2.8 \,\mu$ m. Die Linien dienen nur zur Orientierung.



**Abbildung 6.4:** Arrhenius-Auftragung der in Abbildung 6.3 gezeigten Daten zur Bestimmung der effektiven Aktivierungsenergie der laserinduzierten Pfropfung von PNIPAAm an einen azidterminierten SAM. Parameter für die Berechnung der radialen Temperaturprofile: R = 0.38,  $\kappa = 1.5$  W/cm K,  $T_0 = 300$  K und  $T_k = 99$  K.



Abbildung 6.5: Abhängigkeit der Durchmesser der entstandenen Strukturen von den Laserparametern bei der photothermischen Laserstrukturierung eines HDT-SAMs auf verschiedenen Goldsubstraten,  $d_{2e} = 2.8 \,\mu$ m. **a**) 30 nm-Au/Si, **b**) 50 nm-Au/Glas, **c**) 30 nm-Au/Glas, **d**) 10 nm-Au/Glas. Zur Bestimmung der Durchmesser der Strukturen wurden diese durch nasschemisches Ätzen in den Goldfilm übertragen. Die Linien dienen nur zur Orientierung.



**Abbildung 6.6:** AFM-Aufnahmen (Topographie **a**, **c** und **e**) von mittels Laserstrukturierung hergestellten Goldnanopartikelstrukturen auf einem APS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si bei verschiedenen Stoffmengenverhältnissen von Goldsäure und Natriumcitrat in der Strukturierungslösung und die zugehörigen Höhenprofile (**b**, **d** und **f**). Tendenziell nimmt die Größe der entstehenden Partikel zu, je geringer der Anteil an Citrat in der Lösung ist.



**Abbildung 6.7:** AFM-Aufnahmen (Topographie und Phasenkontrast) von mittels Laserstrukturierung hergestellten Goldnanopartikelstrukturen auf einem APS-SAM auf SiO<sub>2</sub>/Si. Laserparameter: P = 200 mW und 150 mW,  $\tau = 100 \text{ ms}$ ,  $d_{2e} = 2.8 \mu m$ ,  $n_{Au}$ : $n_{Ci} = 0.17$ .

#### 6.2 Bestimmung der Beugungsmaßzahl des Laserstrahls nach ISO 11146

Die Beugungsmaßzahl  $M^2$  charakterisiert die Fokussierbarkeit eines Laserstrahls. Sie gibt den Divergenzwinkel eines Laserstrahls im Vergleich zur Divergenz eines idealen Gaußstrahls mit gleichem minimalen Durchmesser an der Strahltaille an. Bei einem Strahl mit Gaußprofil beträgt  $M^2$  idealerweise 1, bei realen Laserstrahlen nimmt die Beugungsmaßzahl einen etwas größeren Wert an. Zur Bestimmung von  $M^2$  wird die Strahltaille des fokussierten Laserstrahls betrachtet. Wie in [212] beschrieben, werden anhand einer Kurvenanpassung an den Strahlverlauf der Durchmesser des Strahls in der Fokusebene, die Strahldivergenz und  $M^2$ ermittelt.

Zunächst wurde die Strahltaille des fokussierten Laserstrahls mit dem Messgerät Beam Master BM 3 (Fa. Coherent) vermessen. Hierzu wurde das Messgerät unter dem Mikroskopobjektiv, das zur Fokussierung verwendet wird, positioniert. Um das Strahlprofil in der Umgebung der Fokusebene abzubilden, wurde das Objektiv mit einer Geschwindigkeit von 1 µm/s auf das Messgerät zu bewegt und der 1/e<sup>2</sup>-Durchmesser des Laserspots mit einer



**Abbildung 6.8:** Strahlprofil des fokussierten Laserstrahls in der Umgebung der Strahltaille. Das Profil wurde mit einer Schrittweite von 1 µm aufgenommen.

Messfrequenz von 1 Hz in zwei Achsen aufgenommen. In Abbildung 6.8 ist das Strahlprofil als Mittelwert der in beiden Achsen aufgenommenen Werten gezeigt.

Zur Ermittlung von  $M^2$  werden die quadrierten Werte des Strahldurchmessers in Abhängigkeit von der Distanz zur Fokusebene herangezogen. Hierbei sollte die Hälfte der Messwerte innerhalb der Rayleighlänge  $z_R$  liegen, die zweite Hälfte in größerer Entfernung als der doppelten Rayleighlänge. Die Rayleighlänge gibt an, in welchem Abstand von der Fokusebene sich der Strahldurchmesser um  $\sqrt{2}$  aufweitet. Es gilt nach [212]:

$$z_R = \frac{\pi d_0^2}{4 \lambda} \quad , \tag{6.1}$$

mit dem minimalen Durchmesser der Strahltaille  $d_0$ . Bei einer Wellenlänge von 532 nm und einem Spotdurchmesser von 2.8 µm beträgt die Rayleighlänge also 11.6 µm. Der für die Bestimmung von  $M^2$  betrachtete Wertebereich wurde entsprechend ausgewählt. Es gilt folgende Gleichung [212]:

$$d^{2}(z) = d_{0} + (z - z_{0})^{2} \Theta^{2} , \qquad 6.2$$

wobei  $\Theta$  der Divergenzwinkel und  $z_0$  die Position der Fokusebene ist.

Die Messwerte des quadrierten Strahldurchmessers in Abhängigkeit vom Abstand zur Fokusebene werden mit einem Polynom 2. Grades angepasst:

$$d^{2}(z) = A + Bz + Cz^{2} . {6.3}$$

Aus den Fitkoeffizienten A, B und C lassen sich der minimale Durchmesser der Strahltaille  $d_o$ und der Divergenzwinkel  $\Theta$  bestimmen [212]:

$$d_0 = \sqrt{A - \frac{B^2}{4C}}, \quad \Theta = \sqrt{C} \quad . \tag{6.4}$$

Schließlich kann die Beugungsmaßzahl  $M^2$  mit folgender Gleichung berechnet werden [212]:

$$M^2 = \frac{d_0 \Theta \pi}{4 \lambda} \quad . \tag{6.5}$$

In Abbildung 6.9 sind die quadrierten Messwerte des Durchmessers in Abhängigkeit vom axialen Abstand und die Kurvenanpassung zur Berechnung der Beugungsmaßzahl dargestellt. Die Beugungsmaßzahl des verwendeten DPSS-Lasers liegt bei 1.17.



**Abbildung 6.9:** Auftragung von  $d^2$  gegen z zur Bestimmung der Beugungsmaßzahl  $M^2$ .

# 6.3 Verwendete Abkürzungen

А	Adenin
a.u.	arbitrary unit
ADT	11-Azido-1-undecanthiol
AES	Augerelektronenspektroskopie
AF	Anregungsfilter
AFM	Atomic Force Microscopy
AOTF	Acousto Optical Tunable Filter
APS	3-Aminopropyltrimethoxysilan
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerisation
BrUTS	11-Bromundecyltrichlorsilan
BSA	Bovine Serum Albumin
С	Cytosin
CCD	Charge-coupled Device
CW	Continuous Wave
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPN	Dip-Pen-Nanolithography
DPSS	Diode Pumped Solid State
DS	Dichroitischer Spiegel
EBL	E-Beam Lithography
edc	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EF	Emissionsfilter
EG	Ethylenglycol
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
F	funktionelle Gruppe
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCA	7-(4-Trifluormethyl)cumarinacrylamid
FR	Fermi-Resonanz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
HDT	1-Hexadecanthiol
In	Initiator
ір	in-plane

IR	Infrarot
IRRAS	Internal Reflection Absorption Spectroscopy
LCST	Lower Critical Solution Temperature
М	Monomer
MHDS	16-Mercaptohexadecansäure
MUD	11-Mercapto-1-undecanol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
ODS	Octadecylsiloxan
OEGMA	Oligoethylenglycolmethacrylat
OTS	n-Octadecyltrichlorsilan
p.a.	per analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEGCI	2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trichlorsilan
PEGMeO	$2\-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]\-trimethoxysilan$
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PNIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamid)
PS	Polystyrol
PVD	Physical Vapor Deposition
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	Rotationen pro Minute
SAES	Scanning Auger Electron Spectroscopy
SAM	Self-Assembled Monolayer
SIMS	Sekundärionenmassenspektroskopie
SSC	Saline Sodium Citrate
ssDNA	single-stranded Deoxyribonucleic Acid
STM	Scanning Tunneling Microscopy
Т	Thymin
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie
μCP	Micro Contact Printing

# 6.4 Verwendete Symbole

Α	präexponentieller Faktor
А, В, С	Fitkoeffizienten
b	effektive Segmentlänge eines Polymers
С	Konzentration
Cp	spezifische Wärmekapazität
d	Durchmesser
D	Abstand der Ankerpunkte eines gepfropften Polymerfilms
$d_o$	minimaler Durchmesser der Laserstrahltaille
$d_{2e}$	1/e <sup>2</sup> -Laserspotdurchmesser
$E_A$	Aktivierungsenergie
f	Brennweite
h	Planck'sches Wirkungsquantum
$h_P$	Polymerfilmdicke
1	Laserintensität
Io	modifizierte Besselfunktion 0. Ordnung
k	Geschwindigkeitskonstante
L	theoretische Polymerkettenlänge
Μ	molare Masse
$M_0$	molare Masse eines Monomers
$M^2$	Beugungsmaßzahl
$M_n$	molare Masse (Zahlenmittel)
$M_{\scriptscriptstyle W}$	molare Masse (Massenmittel)
Ν	Anzahl der Segmente pro Kette in einem Polymer
n	Stoffmenge
n	Brechungsindex
NA	Numerische Apertur
$N_A$	Avogadro-Zahl
р	Druck
Р	Laserleistung
r	radialer Abstand bzw. Radius
R	Reflektivität
$R_F$	Flory-Radius
$R_{Gas}$	allgemeine Gaskonstante

T Temperatur

Zeit

t

- *T*<sub>0</sub> Grundtemperatur (300 K)
- *T<sub>k</sub>* Fit-Parameter für Kirchhoff-Transformation
- *t*<sub>L</sub> Belichtungszeit
- *T<sub>max</sub>* maximaler Temperaturanstieg
- v Schreibgeschwindigkeit
- x, y, z Raumrichtungen im kartesischen Koordinatensystem
- z axialer Abstand
- *z<sub>R</sub>* Rayleighlänge
- α Absorptionskoeffinzient
- Θ Divergenzwinkel
- κ thermische Leitfähigkeit
- $\lambda$  Wellenlänge
- ν Frequenzfaktor
- v Wellenzahl
- ρ Dichte
- σ Polymerpfropfdichte
- τ Pulslänge
- $\tau_{1/2}$  Halbwertszeit
- $\omega_{2e}$  1/e<sup>2</sup>-Laserspotradius

#### 6.5 Veröffentlichungen

A. Schröter, S. Franzka, J. Koch, B. N. Chichkov und N. Hartmann, *Femtosecond-Laser Processing of Nitrobiphenylthiol Self-Assembled Monolayers*, Appl. Surf. Sci. 278 (**2013**) 43.

A. Schröter, M. Mathieu, S. Franzka, J. Feydt, S. Irsen und N. Hartmann, *Fabrication of Chemical Templates via Selective Laser-Induced Desorption of Hexadecanethiol Self-Assembled Monolayers*, Appl. Surf. Sci. 278 (**2013**) 57.

A. Schröter, M. Kalus und N. Hartmann, *Substrate-mediated effects in photothermal patterning of alkanethiol self-assembled monolayers with microfocused continuous-wave lasers*, Beilstein J. Nanotechnol. 3 (**2012**) 65.

B. Klingebiel, A. Schröter, S. Franzka und N. Hartmann, *Photothermally induced bromination and decomposition of alkylsiloxane monolayers on surface-oxidized silicon substrates*, J. Vac. Sci. Technol. A 28 (**2010**) 834.

B. Klingebiel, A. Schröter, S. Franzka und N. Hartmann, *Photothermally induced microchemical functionalization of organic monolayers*, ChemPhysChem 10 (**2009**) 2000.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Lorkowski, G. Lorkowski und P. Cullen, *Biochips-Das Labor in der Streichholzschachtel*, Chem. in unserer Zeit 34 (**2000**) 356.
- [2] L. Shi, W. Hu, Z. Su, X. Lu und W. Ton, *Microarrays: Technologies and Applications*, Applied Mycology and Biotechnology 3 (**2003**) 271.
- [3] N. A. Brunner und C. Freiberg, Expression Profiling mit DNA-Chips: Neue Perspektiven in der antibakteriellen Forschung, BIOspektrum, Sonderausgabe (2002) 502.
- [4] D. D Shoemaker und P. S Linsley, *Recent developments in DNA microarrays*, Curr. Opin. Microbiol. 5 (2002) 334.
- [5] A. E. Frolov, A. K. Godwin und O. O. Favorova, Differential Gene Expression Analysis by DNA Microarray Technology and Its Application in Molecular Oncology, Mol. Biol. 37 (2003) 486.
- [6] L. Berrade, A. E. Garcia und J. A. Camarero, *Protein Microarrays: Novel Developments and Applications*, Pharm. Res. 28 (**2011**) 1480.
- [7] D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer und H. Waldmann, *Proteinbiochips in der Biomedizin und Biotechnologie*, Angew. Chem. 121 (**2009**) 7880.
- [8] V. Seibert, G. Lischetti, J. Meuer, T. Buschmann und A. Wiesner, Detektion von Tumormarkern mit der ProteinChip®-Technologie, BIOspektrum, Sonderausgabe (2002) 512.
- [9] G. Reddy und E. A. Dalmasso, SELDI ProteinChip Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications, J. Biomed. Biotechnol. 4 (2003) 237.
- [10] M. C. Pirrung, *Die Herstellung von DNA-Chips*, Angew. Chem. 114 (**2002**) 1326.
- [11] G. MacBeath und S. L. Schreiber, Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination, Science 289 (2000) 1760.

- P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer und H. Waldmann, *Chemical Strategies for Generating Protein Biochips*, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 9618.
- [13] D. Bäuerle, *Laser Processing and Chemistry*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin **2000**.
- T. Balgar, S. Franzka und N. Hartmann, *Laser-assisted decomposition of alkylsiloxane monolayers at ambient conditions: rapid patterning below the diffraction limit*, Appl. Phys. A 82 (2006) 689.
- [15] M. Mathieu und N. Hartmann, *Sub-wavelength patterning of organic monolayers via nonlinear processing with continuous-wave lasers*, New J. Phys. 12 (**2010**) 125017.
- [16] N. Hartmann T. Balgar, R. Bautista und S. Franzka, Direct laser patterning of octadecylsiloxane monolayers on surface-oxidized silicon substrates: Indications for a photothermal excitation mechanism, Surf. Sci. 600 (2006) 4034.
- [17] B. Klingebiel, L. Scheres, S. Franzka, H. Zuilhof und N. Hartmann, *Photothermal Micro- and Nanopatterning of Organic/Silicon Interfaces*, Langmuir 26 (**2010**) 6826.
- [18] S. Onclin, B. J. Ravoo und D. N. Reinhoudt, *Engineering silicon oxide surfaces using self-assembled monolayers*, Angew. Chem. Int. Ed. 44 (**2005**) 6282.
- [19] F. Schreiber, Self-assembled monolayers: from 'simple' model systems to biofunctionalized interfaces, J. Phys. Condens. Matter 16 (2004) R881.
- [20] J. J. Gooding und S. Ciampi, The molecular level modification of surfaces: from selfassembled monolayers to complex molecular assemblies, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 2704.
- [21] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo und G. M. Whitesides, Selfassembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, Chem. Rev. 105 (2005) 1103.
- [22] C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carrob und R. C. Salvarezza, Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 1805.
- [23] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, Chem. Rev. 96 (1996) 1533.
- [24] N. Herzer S. Hoeppener, U. S. Schubert, Fabrication of patterned silane based selfassembled monolayers by photolithography and surface reactions on silicon-oxide substrates, Chem. Commun. 46 (2010) 5634.

- [25] K. L. Prime und G. M. Whitesides, Adsorption of Proteins onto Surfaces containing end-attached Oligo(ethylene odide) - A Model System using Self-Assembled Monolayers, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 10714.
- [26] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt und M. Grunze, Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers - internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 9359.
- [27] J. D. Andrade und V. Hlady, *Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses*, Adv. Polym. Sci. 79 (**1986**) 1.
- [28] B. Klingebiel A. Schröter, S. Franzka und N. Hartmann, *Photothermally Induced Microchemical Functionalization of Organic Monolayers*, ChemPhysChem 10 (2009) 2000.
- [29] P. Kalimuthu und S. A. John, Studies on ligand exchange reaction of functionalized mercaptothiadiazole compounds onto citrate capped gold nanoparticles, Mater. Chem. Phys. 122 (2010) 380.
- [30] F. Schreiber, Structure and growth of self-assembling monolayers, Prog. Surf. Sci. 65 (2000) 151.
- [31] Y. Yang, A. M. Bittner, S. Baldelli und K. Kern, *Study of self-assembled triethoxysilane thin films made by casting neat reagents in ambient atmosphere*, Thin Solid Films 516 (2008) 3948.
- [32] L. Scheres A. Arafat und H. Zuilhof, *Self-Assembly of High-Quality Covalently Bound Organic Monolayers onto* Silicon, Langmuir 23 (**2007**) 8343.
- [33] C. S. Weisbecker, M. V. Merritt und G. M. Whitesides, *Molecular Self-Assembly of Aliphatic Thiols on Gold Colloids*, Langmuir 12 (**1996**) 3763.
- [34] H. Hoffmann, U. Mayer und A. Krischanitz, Structure of Alkylsiloxane Monolayers on Silicon Surfaces Investigated by External Reflection Infrared Spectroscopy, Langmuir 11 (1996) 1304.
- [35] O. Azzaroni, M. Cipollone, M. E. Vela und R. C. Salvarezza, Protective Properties of Dodecanethiol Layers on Copper Surfaces: The Effect of Chloride Anions in Aqueous Environments, Langmuir 17 (2001) 1483.
- U. Srinivasan, M. R. Houston, R. T. Howe und R. Maboudian, *Alkyltrichlorosilane-based SAM films for stiction reduction in Si micromachines*, J. Microelectromech. Syst. 7 (1998) 252.

- [37] M. Takenaga, S. Jo, M. Graupe, T. R. Lee, Effective van der Waals surface energy of self-assembled monolayer films having systematically varying degrees of molecular fluorination, J. Colloid Interface Sci. 320 (2008) 264.
- [38] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan und G. M. Whitesides, Surveying for Surfaces that Resist the Adsorption of Proteins, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 8303.
- [39] F. Luderer und U. Walschus, Immobilization of Oligonucleotides for Biochemical Sensing by Self-Assembled Monolayers: Thiol-Organic Bonding on Gold and Silanization on Silica Surfaces, Top. Curr. Chem. 260 (2005) 37.
- [40] R. K. Smith P. A. Lewis und P. S. Weiss, *Patterning self-assembled monolayers*, Prog. Surf. Sci. 75 (2004) 1.
- [41] A. Kumar, H. A. Biebuyck und G. M. Whitesides, *Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science*, Langmuir 10 (**1994**) 1496.
- [42] H. Sugimura, T. Hanji a, O. Takai, T. Masuda und H. Misawa, *Photolithography* based on organosilane self-assembled monolayer resist, Electrochim. Acta 47 (2001) 103.
- [43] S. Prakash, T. M. Long, J. C. Selby, J. S. Moore und M. A. Shannon, "Click" Modification of Silica Surfaces and Glass Microfluidic Channels, Anal. Chem. 79 (2007) 1661.
- [44] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmiedl, T. Carell, B. J. Ravoo und D. N. Reinhoudt, *Transfer printing of DNA by "Click" chemistry*, ChemBioChem 8 (2007) 1997.
- [45] F. Zhang, R. J. Gates, V. S. Smentkowski, S. Natarajan, B. K. Gale, R. K. Watt, M. C. Asplund und M. R. Linford, *Direct adsorption and detection of proteins, including ferritin, onto microlens array patterned bioarrays*, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 9252.
- [46] C. Vericat, M. E Vela, G. A. Benitez, J. A. Martin Gago, X. Torrelles und R. C. Salvarezza, Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au (111), J. Phys. Condens. Matter 18 (2006) R867.
- [47] H. Bubert, *Surface and thin film analysis: principles, instrumentation, applications*, 1.Reprint, Wiley VCH, Weinheim **2003**.
- [48] R. G. Nuzzo und D. A. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*, J. Am. Chem. Soc. 105 (**1983**) 4481.
- [49] S. M. Wetterer, D. J. Lavrich, T. Cummings, S. L. Bernasek und G. Scoles, *Energetics and Kinetics of the Physisorption of Hydrocarbons on Au(111)*, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 9266.
- [50] L. H. Dubois und R. G. Nuzzo, *Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces,* Annu. Rev. Phys. Chem. 43 (**1992**) 437.
- [51] H. Kondoh, C. Kodama, H. Sumida und H. Nozoye, *Molecular processes of adsorption and desorption of alkanethiol monolayers on Au(111)*, J. Chem. Phys. 111 (1999) 1175.
- [52] J. Sagiv, Organized Monolayers by Adsorption, I. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 92.
- [53] L. T. Zhuravlev, Concentration of Hydroxyl Groups on the Surface of Amorphous Silicas, Langmuir 3 (**1987**) 316.
- [54] S. Pillai und R. K. Pai, *Controlled growth and formation of SAMs investigated by atomic force microscopy*, Ultramicroscopy 109 (**2009**) 161.
- [55] J. D. Le Grange und J. L. Markham, *Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica*, Langmuir 9 (**1993**) 1753.
- [56] C. D Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides und R. G. Nuzzo, Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 321.
- [57] N. Balachander und C. N. Sukenik, Monolayer transformation by nucleophilic substitution: Applications to the creation of new monolayer assemblies, Langmuir 6 (1990) 1621.
- [58] S. R. Wasserman, Y.-T. Tao und G. M. Whitesides, *Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates*, Langmuir 5 (**1989**) 1074.
- [59] L. Liu M. H. Engelhard und M. Yan, *Surface and interface control on photochemically initiated immobilization*, J. Am. Chem. Soc. 128 (**2006**) 14067.
- [60] N. K. Devaraj und J. P. Collman, *Copper catalyzed azide-alkyne cycloadditions on solid surfaces: Applications and future directions*, QSAR Comb. Sci. 26 (**2007**) 1253.

- [61] C. M. Yam, J. M. Lopez-Romero, J. Gu und C. Cai, *Protein-resistant monolayers* prepared by hydrosilylation of alpha-oligo(ethylene glycol)-omega-alkenes on hydrogen-terminated silicon (111) surfaces, Chem. Commun. 21 (**2004**) 2510.
- [62] P. Harder M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides und P. E. Laibinis, *Molecular* conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 426.
- [63] C. E. D. Chidsey und D. N. Loiacono, *Chemical Functionality in Self-Assembled Monolayers: Structural and Electrochemical Properties*, Langmuir 6 (**1990**) 682.
- [64] K. Bierbaum, M. Kinzler, C. Wöll und M. Grunze, *A NEXAFS and XPS study of the film properties of SAMs of organosilanes on oxidized Si(100)*, Langmuir 11 (**1995**) 512.
- [65] M. K. Chaudhury und G. M. Whitesides, *Correlation Between Surface Free Energy and Surface Constitution*, Science 255 (**1992**) 1230.
- [66] E. Pavlovic, A. P. Quist, U. Gelius und S. Oscarsson, *Surface functionalization of silicon oxide at room temperature and atmospheric pressure*, J. Colloid Interface Sci. 254 (2002) 200.
- [67] M. Seifert, M. T. Rinke und H.-J. Galla, Characterization of Streptavidin Binding to Biotinylated, Binary Self-Assembled Thiol Monolayers; Influence of Component Ratio and Solvent, Langmuir 26 (2010) 6386.
- [68] V. Chechik, R. M. Crooks und C. J. M. Stirling, *Reactions and reactivity in self-assembled monolayers*, Adv. Mater. 12 (**2000**) 1161.
- [69] C. Haensch, S. Hoeppener und U. S. Schubert, *Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions*, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 2323.
- [70] T. P. Sullivan und W. T. S. Huck, *Reactions on monolayers: Organic synthesis in two dimensions*, Eur. J. Org. Chem. 2003 (2003) 17.
- [71] M. R. Linford und C. E. D. Chidsey, Surface functionalization of alkyl monolayers by free- radical activation: Gas-phase photochlorination with Cl<sub>2</sub>, Langmuir 18 (2002) 6217.

- [72] M. V. Baker und J. D. Watling., Using free-radical bromination to functionalise the surfaces of self-assembled alkylsiloxane monolayers, Tetrahedron Lett. 36 (1995) 4623.
- [73] N. Hartmann, D. Dahlhaus, S. Franzka, Self-assembled organic templates for the selective adsorption of gold nanoparticles into confined domains, Surf. Sci. 601 (2007) 3916.
- [74] M. V. Baker und J. D. Watling, *Functionalization of alkylsiloxane monolayers via freeradical bromination*, Langmuir 13 (**1997**) 2027.
- [75] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson und G. M. Whitesides, New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques, Chem.
   Rev. 105 (2005) 1171.
- [76] M. Geissler und Y. Xia, *Patterning: Principles and some new developments*, Adv. Mater. 16 (**2004**) 1249.
- [77] N. J. Brewer, R. E. Rawsterne, S. Kothari und G. J. Leggett, Oxidation of Self-Assembled Monolayers by UV Light with a Wavelength of 254 nm, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 4089.
- [78] F. A. Nae, N. Saito, A. Hozumi und O. Takai, *High-Resolution Submicron Patterning* of Self-Assembled Monolayers Using a Molecular Fluorine Laser at 157 nm, Langmuir 21 (2005) 1398.
- [79] S. A. Ruiz und C. S. Chen, *Microcontact printing: A tool to pattern*, Soft Matter 3 (**2007**) 168.
- [80] J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim und G. M. Whitesides, *Microfabrication by Microcontact Printing of Self-Assembled Monolayers*, Adv. Mater. 6 (**1994**) 600.
- [81] A. Kumar und G. M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching, Appl. Phys. Lett. 63 (1993) 2002.
- [82] M. J. Lercel, G. F. Redinbo, M. Rooks, R. C. Tiberio, H. G. Craighead, C. W. Sheen und D. L. Allara, *Electron Beam Nanofabrication with Self-Assembled Monolayers of Alkylthiols and Alkylsiloxanes*, Microelectron. Eng. 27 (**1995**) 43.

- [83] M. Zharnikov und M. Grunze, Modification of thiol-derived self-assembling monolayers by electron and x-ray irradiation: Scientific and lithographic aspects, J. Vac. Sci. Technol. B 20 (2002) 1793.
- [84] C. K. Harnett, K. M. Satyalakshmi und H. G. Craighead, *Bioactive Templates* Fabricated by Low-Energy Electron Beam Lithography of Self-Assembled Monolayers, Langmuir 17 (2001) 178.
- [85] A. Gölzhäuser, W. Geyer, V. Stadler, W. Eck, M. Grunze, K. Edinger, T. Weimann und
   P. Hinze, Nanoscale patterning of self-assembled monolayers with electrons, J. Vac.
   Sci. Technol. B 18 (2000) 3414.
- [86] D. Wouters und U. S. Schubert, Nanolithographie und Nanochemie: Sondentechniken zur Strukturierung und chemischen Modifizierung von Nanobauelementen, Angew. Chem. 116 (2004) 2534.
- [87] D. S. Ginger H. Zhang und C. A. Mirkin, *The Evolution of Dip-Pen Nanolithography*, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (**2004**) 30.
- [88] R. Szoszkiewicz, T. Okada, S. C. Jones, T.-D. Li, W. P. King, S. R. Marder und E. Riedoet, *High-speed, sub-15 nm feature size thermochemical nanolithography*, Nano Lett. 7 (2007) 1064.
- [89] S.V. Lemeshko und S.A. Saunin, *Lithography with SPM*, NT-MDT Application Notes (**2001**).
- [90] J. Huang, D. A. Dahlgren und J. C. Hemminger, Photopatterning of Self-Assembled Alkanethiolate Monolayers on Gold: A Simple Monolayer Photoresist Utilizing Aqueous Chemistry, Langmuir 10 (1994) 626.
- [91] H. Sugimura, K. Ushiyama, A. Hozumi und O. Takai, Micropatterning of Alkyl- and Fluoroalkylsilane Self-Assembled Monolayers Using Vacuum Ultraviolet Light, Langmuir 16 (2000) 885.
- [92] S. Friebel, J. Aizenberg, S. Abad und P. Wiltzius, Ultraviolet lithography of selfassembled monolayers for submicron patterned deposition, Appl. Phys. Lett. 77 (2000) 2406.
- [93] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pépin, Y. Chen, M. Mejias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L. Couraud und H. Launois, *Electron beam lithography: resolution limits and applications*, Appl. Surf. Sci. 164 (**2000**) 111.

- [94] M. J. Lercel, H. G. Craighead, A. N. Parikh, K. Seshadri und D. L. Allara, *Sub-10 nm lithography with self-assembled monolayers*, Appl. Phys. Lett. 68 (**1996**) 1504.
- [95] C. Haensch S. Hoeppener und U. S. Schubert, '*Clicking' on the nanoscale: 1,3dipolar cycloaddition of terminal acetylenes on azide functionalized, nanometric surface templates with nanometer resolution*, Nanotechnology 20 (**2009**) 135302.
- [96] R. M. Nyffenegger und R. M. Penner, *Nanometer-scale surface modification using the scanning probe microscope: Progress since 1991*, Chem. Rev. 97 (**1997**) 1195.
- [97] Unveröffentlichte Daten, Benjamin Klingebiel.
- [98] T. Balgar, S. Franzka, E. Hasselbrink und N. Hartman, Laser-assisted fabrication of submicron-structured hydrophilic/hydrophobic templates for the directed selfassembly of alkylsiloxane monolayers into confined domains, Appl. Phys. A 82 (2006) 15.
- [99] J. M. Poate und J. W. Mayer, *Laser Annealing of Semiconductors*, Academic Press, New York **1982**.
- [100] M.J. Pilling und P.W. Seakins, *Reaction Kinetics*, Oxford University Press, Oxford 1999.
- [101] H. A. Biebuyck und G. M. Whitesides, Self-Organization of Organic Liquids on Patterned Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold, Langmuir 10 (1994) 2790.
- [102] G. P. Lopez, H. A. Biebuyck, R. Harter, A. Kumar und G. M. Whitesides, Fabrication and imaging of 2-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron-microscopy, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 10774.
- [103] N. Hartmann, S. Franzka, J. Koch, A. Ostendorf und B. N. Chichkov, Subwavelength patterning of alkylsiloxane monolayers via nonlinear processing with single femtosecond laser pulses, Appl. Phys. Lett. 92 (2008) 223111.
- [104] L. Scheres, B. Klingebiel, J. ter Maat, M. Giesbers, H. de Jong, N.Hartmann und H. Zuilhof, Micro- and Nanopatterning of Functional Organic Monolayers on Oxide-Free Silicon by Laser-Induced Photothermal Desorption, Small 6 (2010) 1918.
- [105] A. Schröter, M. Mathieu, S. Franzka, J. Feydt, S. Irsen und N. Hartmann, Fabrication of Chemical Templates via Selective Laser-Induced Desorption of Hexadecanethiol Self-Assembled Monolayers, Appl. Surf. Sci. 278 (2013) 57.

- [106] M. R. Shadnam, S. E. Kirkwood, R. Fedosejevs und A. Amirfazli, Direct Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold Using a Laser Beam, Langmuir 20 (2004) 2667.
- [107] B. J. Ravoo, *Microcontact chemistry: surface reactions in nanoscale confinement*, J. Mater. Chem. 19 (2009) 8902.
- [108] A. Gölzhäuser, W. Eck, W. Geyer, V. Stadler, T. Weimann, P. Hinze und M. Grunze, *Chemical nanolithography with electron beams*, Adv. Mater. 13 (**2001**) 806.
- [109] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. Tsai Lu and D. Solas, *Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis*, Science 251 (**1991**) 767.
- [110] S. Sun, M. Montague, K. Critchley, M.-S. Chen, W. J. Dressick, S. D. Evans und G. J. Leggett, Fabrication of biological nanostructures by scanning near-field photolithography of chloromethylphenyisiloxane monolayers, Nano Lett. 6 (2006) 29.
- [111] W. Geyer, V. Stadler, W. Eck, M. Zharnikov, A. Gölzhäuser und M. Grunze, Electroninduced crosslinking of aromatic self-assembled monolayers: Negative resists for nanolithography, Appl. Phys. Lett. 75 (1999) 2401.
- [112] C. Wendeln, A. Heile, H. F. Arlinghaus und B. J. Ravoo, *Carbohydrate Microarrays by Microcontact Printing*, Langmuir 26 (**2010**) 4933.
- [113] T. P. Sullivan, M. L. van Poll, P. Y. W. Dankers und W. T. S. Huck, Forced peptide synthesis in nanoscale confinement under elastomeric stamps, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004) 4190.
- [114] B. Klingebiel, A. Schröter, S. Franzka und N. Hartmann, Photothermally induced bromination and decomposition of alkylsiloxane monolayers on surface-oxidized silicon substrates, J. Vac. Sci. Technol. A 28 (2010) 834.
- [115] P. Uhlmann, H. Merlitz, J.-U. Sommer und M. Stamm, *Polymer brushes for surface tuning*, Macromol. Rapid Commun. 30 (**2009**) 732.
- [116] J. E. Raynor, J. R. Capadona und D. M. Collard, *Polymer brushes and self-assembled monolayers: Versatile platforms to control cell adhesion to biomaterials*, Biointerphases 4 (2009) FA3.
- [117] J. M. Goddard und J. H. Hotchkiss, *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*, Prog. Polym. Sci. 32 (**2007**) 698.
- [118] W. T. S. Huck, *Responsive polymers for nanoscale actuation*, Mater. Today 11 (2008) 24.

- [119] M. A. Cohen Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov und S. Minko, *Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials*, Nat. Mater. 9 (2010) 101.
- [120] A. Olivier, F. Meyer, J.-M. Raquez, P. Damman und P. Dubois, Surface-initiated controlled polymerization as a convenient method for designing functional polymer brushes: From self-assembled monolayers to patterned surfaces, Prog. Polym. Sci. 37 (2012) 157.
- [121] S. Edmondson V. L. Osborne und W. T. S. Huck, *Polymer brushes via surface-initiated polymerizations*, Chem. Soc. Rev. 33 (**2004**) 14.
- [122] M. Mathieu, A. Friebe, S. Franzka, M. Ulbricht und N. Hartmann, Surface-Initiated Polymerization on Laser-Patterned Templates: Morphological Scaling of Nanoconfined Polymer Brushes, Langmuir 25 (2009) 12393.
- [123] B. Zdyrko und I. Luzinov, *Polymer Brushes by the "Grafting to" Method*, Macromol. Rapid Commun. 32 (**2011**) 859.
- [124] J. Y. Kim, Y. H. Park, J. S. Kim, K. T. Lim, M. Yan und Y. T. Jeong, *Photochemical immobilization of polymer films on Si wafer via monolayers of perfluorophenyl azide derivatives*, J. Ind. Eng. Chem. 13 (2007) 781.
- [125] G. K. Raghuraman, K. Schuh, O. Prucker und J. Rühe, Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Thermal Activation of Self-assembled Monolayers Containing Sulphonyl Azide Group, Langmuir 26 (2010) 769.
- [126] S. A. Al-Bataineh, R. Luginbuehl, M. Textor und M. Yan, Covalent Immobilization of Antibacterial Furanones via Photochemical Activation of Perfluorophenylazide, Langmuir 25 (2009) 7432.
- [127] M. Yan und J. Ren., *Covalent immobilization of ultrathin polymer films by thermal activation of perfluorophenyl azide*, Chem. Mater. 16 (**2004**) 1627.
- [128] H. Wang, J. Ren, A. Hlaing, M. Yan, Fabrication and anti-fouling properties of photochemically and thermally immobilized poly(ethylene oxide) and low molecular weight poly(ethylene glycol) thin films, J. Colloid Interface Sci. 354 (2011) 160.
- [129] M. M. Alvarez, J. T. Khoury, T. G. Schaaff, M.N. Shafigullin, I. Vezmar und R. L.
   Whetten, *Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules*, J. Phys. Chem. B 101 (**1997**) 3706.

- [130] R. F. Khairutdinov, *Physical Chemistry of Nanocrystalline Semiconductors*, Colloid J. 59 (**1997**) 535.
- [131] A. N. Shipway, E. Katz und I. Willner, *Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications,* ChemPhysChem 1 (**2000**) 18.
- [132] A. N. Shipway und I. Willner, *Nanoparticles as structural and functional units in surface-confined architectures*, Chem. Commun. 20 (**2001**) 2035.
- [133] O. R Miranda, B. Creran und V. M. Rotello, Array-based sensing with nanoparticles:
   'Chemical noses' for sensing biomolecules and cell surfaces, Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 728.
- [134] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li und V. M. Rotello, Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, Chem. Rev. 112 (2012) 2739.
- [135] A. J. Haes, D. A. Stuart, S. Nie und R. P. Van Duyne, Using Solution-Phase Nanoparticles, Surface-Confined Nanoparticle Arrays and Single Nanoparticles as Biological Sensing Platforms, J. Fluoresc. 14 (2004) 355.
- [136] J. Turkevich, P. C. Stevenson, A. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Discuss. Faraday Soc. 11 (**1951**) 55.
- [137] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, Nature 241 (1973) 20.
- [138] A. Doron, E. Katz und I. Willner, Organization of Au Colloids as Monolayer Films onto ITO Glass Surfaces: Application of the Metal Colloid Films as Base Interfaces To Construct Redox-Active Monolayers, Langmuir 11 (1995) 1313.
- [139] R. G. Freeman, K. C. Grabar, K. J. Allison, R. M. Bright, J. A. Davis, A. P. Guthrie, M. B. Hommer, M. A. Jackson, P. C. Smith, D. G. Walter und M. J. Natan, *Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates,* Science 267 (1995) 1629.
- [140] D. Dahlhaus, S. Franzka, E. Hasselbrink und N. Hartmann, *1D nanofabrication with a micrometer-sized laser spot*, Nano Lett. 6 (**2006**) 2358.
- [141] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier und L. J. Blum, DNA biosensors and microarrays, Chem. Rev. 108 (2008) 109.
- [142] D. Samanta und A. Sarkar, *Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications,* Chem. Soc. Rev. 40 (**2011**) 2567.

- [143] T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult und W. P. van Bennekom, Self-assembled Monolayers for Biosensors, Analyst 122 (1997) 43R.
- [144] T. A. Horbett und J. L. Brash, *Proteins at interfaces II: Fundamentals and Applications*, ACS Symposium Series 602, American Chemical Society, Washington DC **1995**.
- [145] A. Baszkin und W. Norde, *Physical chemistry of biological interfaces*, 1. Auflage, Marcel Dekker, New York **1999**.
- [146] C. Czeslik, Factors ruling protein adsorption, Z. Phys. Chem. 218 (2004) 771.
- [147] K. P. C. Vollhardt, *Organische Chemie*, 1. korr. Nachdruck der 1. Auflage, Wiley VCH, Weinheim **1990**.
- [148] A. Valstar, M. Almgren und W. Brown, *The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering*, Langmuir 16 (**2000**) 922.
- [149] M. Wahlgren und T. Arnebrant, *Protein adsorption to solid surfaces*, Trends Biotechnol. 9 (**1991**) 201.
- [150] W. Norde, Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface, Adv. Colloid Interface Sci. 25 (1986) 267.
- [151] P. F. Predki, *Functional protein microarrays: ripe for discovery*, Curr. Opin. Chem. Biol. 8 (2004) 8.
- [152] P. Roach, D. Farrar und C. Perry, Interpretation of protein adsorption: Surfaceinduced conformational changes, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 8168.
- [153] J. Gibbs, Effective Blocking Procedures, ELISA Technical Bulletin 3 (2012) 1.
- [154] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloskie und F. R. Salemme, *Structural Origin of High Affinity Biotin-binding Streptavidin*, Science 243 (**1989**) 85.
- [155] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano und F. R. Salemme, Crystallographic and Thermodynamic Comparison of Natural and Synthetic Ligands Bound to Streptavidin, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 3197.
- [156] D. Wild, *The immunoassay Handbook*, 3. Auflage, Elsevier Ltd., Oxford **2005**.
- [157] J. M. Harris, Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, 1. Auflage, Plenum Press, New York 1992.
- [158] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *Protein-Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide*, J. Colloid Interface Sci. 142 (**1991**) 149.

- [159] A. Hucknall, S. Rangarajan und A. Chilkoti, *In Pursuit of Zero: Polymer Brushes that Resist the Adsorption of Proteins*, Adv. Mater. 21 (**2009**) 2441.
- [160] H. W. Ma, J. H. Hyun, P. Stiller und A. Chilkoti, "Non-Fouling" Oligo(ethylene glycol)- Functionalized Polymer Brushes Synthesized by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization, Adv. Mater. 16 (2004) 338.
- [161] W. Gao, W. Liu, J. A. Mackay, M. R. Zalutsky, E. J. Toone und A. Chilkotia, *In situ* growth of a stoichiometric *PEG-like* conjugate at a protein's *N*-terminus with significantly improved pharmacokinetics, Langmuir 22 (**2006**) 3751.
- [162] J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler und J. P. Spatz, Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO<sub>2</sub>-based interfaces, Biomaterials 28 (2007) 4739.
- [163] S. J. Sofia, V. Premnath und E. W. Merrill, *Poly(ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: Grafting density and protein adsorption*, Macromolecules 31 (**1998**) 5059.
- [164] F. Cecchet, B. De Meersman, S. Demoustier-Champagne, B. Nysten und A. M. Jonas, One step growth of protein antifouling surfaces: Monolayers of poly(ethylene oxide) (PEO) derivatives on oxidized and hydrogen-passivated silicon surfaces, Langmuir 22 (2006) 1173.
- [165] A. Papra, N. Gadegaard und N. B. Larsen, *Characterization of ultrathin poly(ethylene glycol) monolayers on silicon substrates*, Langmuir 17 (**2001**) 1457.
- [166] M. Mrksich und G. M. Whitesides, Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25 (1996) 55.
- [167] Wikimedia Commons, http://commons.wikimedia.org (2013)
- [168] P. Christen und R. Jaussi, *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lehreinheiten*, Springer Verlag, Berlin 2005.
- [169] V. Singh, M. Zharnikov, A. Gulinoc und T. Gupta, DNA immobilization, delivery and cleavage on solid supports, J. Mater. Chem. 21 (2011) 10602.
- [170] H. Cai, Y. Q. Wang, P. G. He und Y. H. Fang, *Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label*, Anal. Chim. Acta 469 (2002) 165.

- [171] S. V. Lemeshko, T. Powdrill, Y. Y. Belosludtsev und M. Hogan, Oligonucleotides form a duplex with non-helical properties on a positively charged surface, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 3051.
- [172] S. L. Beaucage, Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications, Curr. Med. Chem. 8 (2001) 1213.
- [173] M. M. S. Silva, I. T. Cavalcanti, M. F. Barroso, M. Goreti, F. Sales und R. Fireman Dutra, Gold electrode modified by self-assembled monolayers of thiols to determine DNA sequences hybridization, J. Chem. Sci. 122 (2010) 911.
- [174] L. A. Chrisey, G. U Lee und C. E. O'Ferrall, *Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films*, Nucleic Acids Res. 24 (**1996**) 3031.
- [175] D.-H. Jung, B. H. Kim, Y. K. Ko, M. S. Jung, S. Jung, S. Y. Lee und H.-T. Jung, Covalent attachment and hybridization of DNA oligonucleotides on patterned single-walled carbon nanotube films, Langmuir 20 (2004) 8886.
- [176] D. Y. Petrovykh, V. Perez-Dieste, A. Opdahl, H. Kimura-Suda, J. M. Sullivan, M. J. Tarlov, F. J. Himpsel und L. J. Whitman, *Nucleobase orientation and ordering in films of single-stranded DNA on gold*, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 2.
- [177] F. Yan und O. A. Sadik, *Enzyme-modulated cleavage of dsDNA for studying interfacial biomolecular interactions*, J. Am. Chem. Soc. 123 (**2001**) 11335.
- [178] T. Förster, Energiewanderung und Fluoreszenz, Naturwissenschaften 6 (1946) 166.
- [179] T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, Ann. Phys. 2 (1948) 55.
- [180] R. M. Clegg, *Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids*, Methods Enzymol. 211 (**1992**) 353.
- [181] V. V. Didenko, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications, BioTechniques 31 (2001) 1106.
- [182] L. Stryer, *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*, Annu. Rev. Biochem. 47 (**1978**) 819.
- [183] A. K. Wright und M. R. Thompson, *Hydrodynamic Structure of Bovine Serum Albumin Deternimed by Transient Electric Birefringence*, Biophys. J. 15 (**1975**) 137.

- [184] W. A. Hendrickson, A. Pahler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Meritt und R. P. Phizackerley, Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 2191.
- [185] A. Lambacher und P Fromherz, *Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer*, Appl. Phys. A 63 (**1996**) 207.
- [186] T. M. Willey, A. L. Vance, T. van Buuren, C. Bostedt, A. J. Nelson, L. J. Terminello und C. S. Fadley, *Chemically Transformable Configurations of Mercaptohexadecanoic Acid Self-Assembled Monolayers Adsorbed on Au(111)*, Langmuir 20 (2004) 2746.
- [187] Y. Xia, X.-M. Zhao, E. Kim und G. M. Whitesides, A selective etching solution for use with patterned self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, Chem. Mater. 7 (1995) 2332.
- [188] C.-Y. Lee, P. Gong, G. M. Harbers, D. W. Grainger, D. G. Castner und L. J. Gamble, Surface coverage and structure of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by XPS, NEXAFS, and fluorescence intensity measurements, Anal. Chem. 78 (2006) 3316.
- [189] S.-K. Yoo, M. Yoon, U. J. Park, H. S. Han, J. H. Kim und H. J. Hwang, A radioimmunoassay method for detection of DNA based on chemical immobilization of anti-DNA antibody, Exp. Mol. Med. 31 (1999) 122.
- [190] C. A. Marquette, I. Lawrence, C. Polychronakos und M. F. Lawrence, *Impedance based DNA chip for direct T(m) measurement*, Talanta 56 (**2002**) 763.
- [191] N. Ballav, H. Thomas, T. Winkler, A. Terfort und M. Zharnikov, *Making Protein Patterns by Writing in a Protein-Repelling Matrix*, Angew. Chem. Int. Ed. 48 (2009) 5833.
- [192] D. Cimen und T. Caykara, Biofunctional oligoN-isopropylacrylamide brushes on silicon wafer surface, J. Mater. Chem. 22 (2012) 13231.
- [193] B. Klingebiel, Laserinduzierte Bromierung organischer Monoschichten, Dissertation, Universität Duisburg-Essen 2011.
- [194] Y. Deng und X.-Y. Zhu, *Transport at the air/water interface is the reason for rings in protein microarrays*, J. Am. Chem. Soc. 128 (**2006**) 2768.

- [195] R. G. Nuzzo, L. H. Dubois und D. L. Allara, Fundamental Studies of Microscopic Wetting on Organic-Surfaces: 1. Formation and Structural Characterization of a Self-Consistent Series of Polyfunctional Organic Monolayers, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 558.
- [196] A. Schröter, M. Kalus und N. Hartmann, Substrate-mediated effects in photothermal patterning of alkanethiol self-assembled monolayers with microfocused continuouswave lasers, Beilstein J. Nanotechnol. 3 (2012) 65.
- [197] M. Mathieu, *Photothermische Laserstrukturierung schwach gebundener, ultradünner organischer Schichten*, Disserstation, Universität Duisburg-Essen **2011**.
- [198] M. Yang, R. L. M. Teeuwen, M. Giesbers, J. Baggerman, A. Arafat, F. A. de Wolf, J. C. M. van Hest und H. Zuilhof, *One-Step Photochemical Attachment of NHS-Terminated Monolayers onto Silicon Surfaces and Subsequent Functionalization*, Langmuir 24 (2008) 7931.
- [199] E. Ito, F. Nakamura, K. Kanai, Y. Ouchi, K. Seki und M. Hara, Characterization of COOH-terminated self-assembled monolayers and adsorption efficiency of DNA molecules studied by X-ray photoelectron Spectroscopy and near-edge X-ray absorption fine structure spectroscopy, Jpn. J. Appl. Phys., Part 1, 45 (2006) 409.
- [200] M. R. Lockett, M. F. Phillips, J. L. Jarecki, D. Peelen und L. M. Smith, A tetrafluorophenyl activated ester self-assembled monolayer for the immobilization of amine-modified oligonucleotides, Langmuir 24 (2008) 69.
- [201] A. Kick, M. Bönsch, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov und M. Mertig, Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide-mercaptohexanol monolayers, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. 172 (2009) 36.
- [202] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand und K. C. Waldron, *Glutaraldehyde:* behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, BioTechniques 37 (2004) 790.
- [203] La Surface XPS-Datenbank, http://lasurface.com (2012).
- [204] H. R. Thomas und J. J. O'Malley, Surface Studies on Multicomponent Polymer Systems by X-ray Photoelectron-Spectroscopy - Polystyrene - Poly(ethylene oxide) diblock Copolymers, Macromolecules 12 (1979) 323.
- [205] S. Patai, *The chemistry of the azido group*, Interscience Publishers, London **1971**.

- [206] W. Brittain und S. Minko, A structural definition of polymer brushes, J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 45 (2007) 3505.
- [207] A. K. Lele, M. M. Hirve, M. V. Badiger und R. A. Mashelkar, Predictions of Bound Water Content in Poly(N-isopropylacrylamide) Gel, Macromolecules 30 (1997) 157.
- [208] S. T. Milner, Polymer brushes, Science 251 (1991) 905.
- [209] B. Bhushan, Springer *Handbook of Nanotechnology*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin **2007**.
- [210] F. Montagne, J. Polesel-Maris, R.Pugin und H. Heinzelmann, Poly(Nisopropylacrylamide) Thin Films Densely Grafted onto Gold Surface: Preparation, Characterization, and Dynamic AFM Study of Temperature-Induced Chain Conformational Changes, Langmuir 25 (2009) 983.
- [211] D. Dahlhaus, *Strukturierte organische Monoschichten zur Anbindung von Nanopartikeln*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2007**.
- [212] J. Eichler, L. Dünkel und B. Eppich, *Die Strahlqualität von Lasern: Wie bestimmt man Beugungsmaßzahl und Strahldurchmesser in der Praxis?*, Laser Tech. J. 2 (**2004**) 63.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

"Destruktive und konstruktive laserbasierte Verfahren zur lokalen Biofunktionalisierung organischer Monoschichten"

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im August 2013

Anja Schröter

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die auf die ein oder andere Weise zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- PD Dr. Nils Hartmann danke ich für die sehr interessante Themenstellung, zahlreiche Ideen, Anregungen und Diskussionen und die permanente Unterstützung.
- Prof. Dr. Eckart Hasselbrink danke ich ebenfalls für die stetige Unterstützung und die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Dr. Steffen Franzka danke ich für seine Hilfe bei allem, was mit Mikroskopie zu tun hat und für viele wertvolle Diskussionen über Mikroskopie und auch andere Themen.
- Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hasselbrink danke ich f
  ür die gute Zusammenarbeit und die sehr angenehme Arbeitsatmosph
  äre. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen der Laserstrukturierungs-Gruppe (Crispin Amiri, Dennis Behrenberg, Martin Przyklenk und Lina Schade) und den ehemaligen Gruppenmitgliedern Dr. Mareike Mathieu und Dr. Benjamin Klingebiel.
- Mark Kalus danke ich für eine sehr erfolgreiche Mitarbeit an diesem Projekt im Rahmen einer abgeschlossenen Bachelor-Arbeit.
- Andreas Aumann und Benjamin Schöps aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Ostendorf an der Ruhruniversität Bochum sowie Jürgen Koch vom Laser Zentrum Hannover danke ich für interessante und gelungene Kooperationen.
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1327 "Optisch erzeugte Sub-100 nm Strukturen für biomedizinische und technische Applikationen".