

AFM-Untersuchungen an Proteinstrukturen auf Titanoberflächen

Diplomarbeit

Zur Erlangung des Grades
„Ingenieur (FH) in Life Technologies“

Studiengang Life Technologies
Vertiefungsrichtung Analytische Chemie

Vorgelegt von

Julien Howald

Fachhochschule Westschweiz (Hes-so Valais)

Die Arbeit wurde an der Fachhochschule Gelsenkirchen, Standort Recklinghausen unter der Anleitung von Prof. Dr. Veith durchgeführt.

Recklinghausen, Februar 2009

Erstprüfer:

Prof. Dr. Michael Veith

Fachhochschule Gelsenkirchen

Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften

August-Schmidt-Ring 10

45665 Recklinghausen

Deutschland

Zweitprüfer:

Prof. Dr. Matthias Wüst

Fachhochschule Westschweiz

Fachbereich Ingenieurwissenschaften

Rte. Du Rawyl 47

1950 Sitten

Schweiz

7.8 Auftrag, Diplomarbeitdaten

HES-SO Valais

SI	TV	EE	IG	EST
X	X			

Données du travail de diplôme
Daten der Diplomarbeit

FO 1.2.02.07.DB
mam/30/06/2008

Confidentiel / Vertraulich

 oui / ja non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS ca/2008/71
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte Fachhochschule Gelsenskirchen	Etudiant / Student Julien Howald	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Matthias Wuest	Expert / Experte (données complètes) Prof. Dr. Michael Veith Physikalische Chemie Fachhochschule Gelsenskirchen, Abt. Recklinghausen D—45665 Recklinghausen	

Titre / Titel

AFM-Untersuchungen an Proteinstrukturen auf Titanoberflächen

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Ziel der Diplomarbeit ist die Visualisierung der Proteinstrukturen von immobilisiertem Fibronectin auf TiO₂-Oberflächen. Die Untersuchungen sollen mit einem AFM (Atomic Force Microscopy) durchgeführt werden. Die AFM-Parameter zur Proteinvisualisierung müssen hierbei optimiert werden. Die Diplomarbeit beinhaltet als Teilziel zunächst die Charakterisierung der TiO_x-Oberflächen, also einen Vergleich der Schicht vor und nach dem TiO_x-Sputtern. Danach soll immobilisiertes Fibronectin auf TiO_x untersucht werden. Optimalerweise wird dies in Flüssigkeit geschehen. Tapping in H₂O ist jedoch experimentell äußerst schwierig. Die Untersuchungen können auch gegen Luft erfolgen und die Ergebnisse verglichen werden. Weiterhin könnte versucht werden, die durch Self-assembly immobilisierte Streptavidin-Monolage zu visualisieren.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
Studiengangsleiter:



Etudiant/Student:

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:

24.09.08

Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:

Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:

Défense orale / Mündliche Verfechtung:

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Personen bedanken, die mir bei der Erarbeitung dieser Diplomarbeit geholfen haben.

Meine ersten Dankesworte sind für Prof. Dr. Michael Veith bestimmt, der die Grundlagen und die Leitung dieser Arbeit festgelegt hat. Ihm danke ich insbesondere für sein großes Vertrauen und seine gute Betreuung während meiner Diplomarbeit an der FH-Gelsenkirchen.

Bei Prof. Dr. Matthias Wüst möchte ich mich für das vorgeschlagene Thema der vorliegenden Arbeit und die Verbindung mit der FH-Gelsenkirchen bedanken. Ich danke ihm auch für die theoretische Einleitung in die Oberflächenanalyse im Rahmen seiner Vorlesung an der FH-Westschweiz.

Ein besonderer Dank gilt Herrn M. Sc. Michael Lehnert für seine tägliche Unterstützung bei molekular biologischen Fragestellungen und für die Weitergabe seiner Erfahrung mit dem AFM. Weiterhin möchte ich mich auch bei ihm für das Korrekturlesen meiner Arbeit, das aufgrund meiner Deutschkenntnisse eine Herausforderung war, bedanken.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie und bei Francine Combe für ihre seelische Unterstützung bedanken sowie bei Lise Howald für ihre finanzielle Hilfe während meiner Zeit in Deutschland.

Erklärung

Diese Diplomarbeit wurde nach der Studienordnung des Fachbereiches 12 der Fachhochschule Gelsenkirchen hergestellt. Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Recklinghausen, den 25. Februar 2009

.....

Julien Howald

„Gott schuf das Volumen, der Teufel die Oberfläche“

Wolfgang Pauli

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motivation	1
1.2	Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	2
2	Stand der Technik	3
2.1	Einsatz des AFM um das Fibronectin auf die Titanoberfläche zu visualisieren.....	3
2.2	Das Grundprinzip der Kraftmikroskopie	8
2.2.1	Instrumentellen Aufbau.....	13
2.2.2	Contact-Mode	15
2.2.3	Tapping-Mode	16
2.2.4	Convolution.....	18
2.2.5	Regelung mit dem PID-Regler.....	20
2.3	Charakterisierung der Oberfläche.....	23
2.3.1	Rauhigkeit.....	23
2.4	Physisorptionsprinzip.....	24
2.5	Kontaktwinkelprinzip	27
2.6	Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie	28
2.7	Beugungsgitter	32
3	Experimentelles	33
3.1	Geräte, Proben und Chemikalien	33
3.1.1	AFM-Gerät.....	33
3.1.2	AFM-Software.....	34
3.1.3	Kontaktwinkelgerät	34
3.1.4	Laser	34
3.1.5	Proben	35
3.1.6	Chemikalien.....	36
4	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1	Durchführung.....	37
4.1.1	Einstellung der Resonanzfrequenz.....	37
4.1.2	Kontaktwinkelmessung.....	37
4.1.3	Analyse der Oberfläche	38
4.1.4	Adsorptionsversuch	40
4.2	Kalibrierung	43
4.2.1	Ergebnisse der Kalibrierung mit der Gitter-Probe.....	43
4.2.2	Bestimmung der Kalibrierung mit der Gold-Kolloid-Probe	45
4.2.3	Bestimmung der Kalibrierung mit dem Beugungsgitter.....	49

4.3	Charakterisierung der Goldoberfläche	53
4.4	Charakterisierung der Waferoberfläche	57
4.5	Charakterisierung der Titanoberfläche.....	60
4.6	Visualisierung des Fibronektins auf der Titanoberfläche	64
4.6.1	Adsorptionszeit 30 Minuten	65
4.6.2	Adsorptionszeit 60 Minuten	71
4.6.3	Adsorptionszeit 120 Minuten	75
4.6.4	Adsorptionszeit 180 Minuten	82
4.6.5	Veränderung der Rauigkeit in Abhängigkeit der Inkubationszeit des Fibronektins	87
4.7	Diskussion	89
4.7.1	Schritte des Adsorptionsprozesses	90
4.7.2	Einfluss der Spülung.....	92
4.7.3	Einfluss der Scangeschwindigkeit	93
4.7.4	Einfluss der Einstellung der Regelung.....	95
4.7.5	Einfluss der Einstellung des Setpoints.....	96
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Anhang	110
7.1	Scanparameter und Regelungsparameter.....	110
7.2	Rohdaten der Kalibrierung.....	110
7.3	Rohdaten der Rauigkeitanalyse.....	111
7.4	Rohdaten den Partikeldimensionen.....	116
7.5	Rohdaten den AFM-Messungen des Beugungsgitters	118
7.6	Parameter der Einstellung der Resonanzfrequenz	118
7.7	Vorbereitungsmethoden der Goldprobe und der Titanprobe	119
7.8	Auftrag, Diplomarbeitdaten	121
7.9	Lebenslauf	122

1 Einleitung

1.1 Motivation

Im Rahmen des Forschungsprojekts „Bionanofunktionalisierte Oberflächen“ sollen Zahnimplantatoberflächen biochemisch so modifiziert werden, dass sich die Implantate in Gingiva-Bindegewebe schnell integrieren lassen. Die Fibroblasten des Bindegewebes produzieren Zellenadhäsionsproteine, die sehr wichtig sind, um sowohl das Gewebe mit dem Implantat zu verbinden als auch das Gewebe zu verheilen. Fibronectin ist ein solches Adhäsionsprotein, das im Bindegewebe produziert wird. Es spielt bei Heilungsprozess eine große Rolle, da es die Implantatoberfläche mit dem Bindegewebe verbindet. Um die Heilungsprozesse zu beschleunigen, sollen Implantatoberflächen chemisch modifiziert werden, sodass eine biomimetische Schicht ausgebildet werden kann [Leh07]. Diese Schicht soll die Verbindung des Fibronectins zum Implantat erleichtern. Titan ist für Implantate insofern ein interessantes Material, da es spontan oxidiert, wenn es mit Sauerstoff konfrontiert wird. Durch diese Oxidation bildet sich eine Oxidschicht auf der Titanoberfläche aus, die unter physiologischen Bedingungen der Zelle inert ist.

Das AFM (Rasterkraftmikroskop: auf Englisch „Atomic Force Microscope“ genannt) erlaubt die Visualisierung von Proteinen, da es möglich ist in flüssigen Phasen sowie an der Luft, Substanzen nachzuweisen die schon gegenüber leicht mechanischen Einwirkungen labil sind.

1.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll physisorbiertes Fibronectin auf ein Modellsubstrat aufgetragen und mittels eines AFM analysiert werden. Das Substrat ist ähnlich der Zahnimplantatoberfläche und besteht aus Titandioxid. Ziel dieser Diplomarbeit ist einerseits die Charakterisierung der Titanoberfläche und andererseits die Visualisierung von immobilisiertem Fibronectin auf der Titanoberfläche mittels AFM. Deshalb soll die Titanoberfläche vor und nach der Fibronectinasorption charakterisiert werden. Zusätzlich wird die Goldschicht auf einem Glassubstrat und einem Silizium-Wafer visualisiert. Die Messungen geschehen mit Tapping-Mode an der Luft, die Oberflächen Charakterisierung wird über quantitative Werte wie Rauigkeit und qualitative Analysen wie Topographie- und Strukturvergleichen bestimmt. Die Parameter des AFMs müssen für jede Oberfläche optimiert werden.

2 Stand der Technik

2.1 Einsatz des AFM um das Fibronectin auf die Titanoberfläche zu visualisieren

Fibronectin ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von circa 440 kDa. Es besteht aus zwei Untereinheiten, die durch Disulfidbindungen an einem Ende kovalent miteinander verbunden sind. Diese zwei Untereinheiten besitzen einen ähnlichen, aus drei Modultypen bestehenden Aufbau [Pro87]. Alle drei Module haben charakteristische Bindungseigenschaft. Das wichtigste Zellenbindungsmodul ist die sogenannte Typ III-Wiederholungseinheit, die das Fibronectin mithilfe der RGD-Sequenz an das Integrin einer Zelle bindet [Alb04].

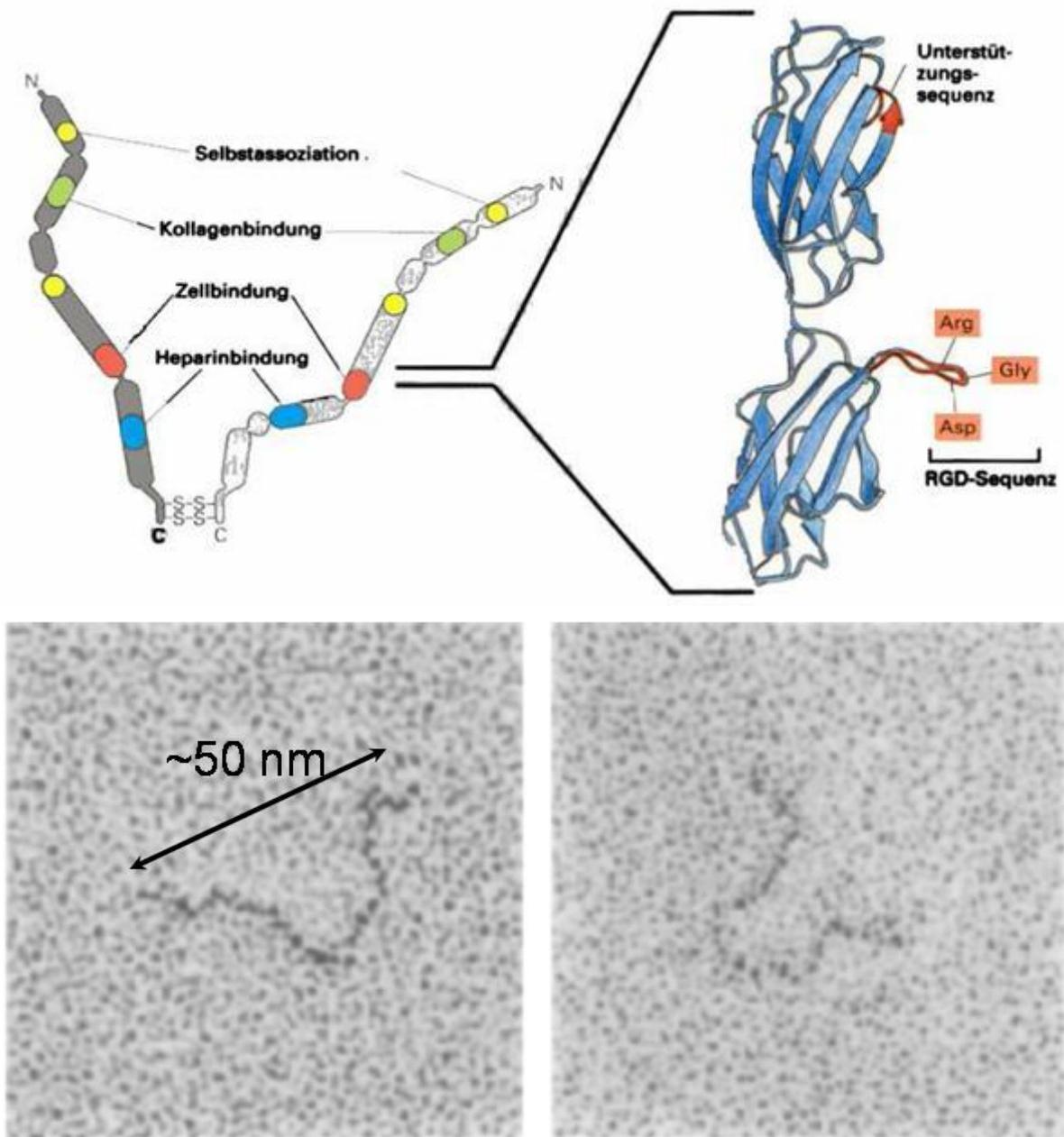


Abbildung 1: Oben: Struktur des Fibronektins und Vergrößerung des Typ III-Moduls [Alb04]; Unten Elektronenmikroskopische Aufnahme eines einzelnen, mit Platin bedampften Fibronektindimer, der Abstand zwischen dem Armenden beträgt circa 50 nm [Eng81].

Die RGD-Sequenz ist eine spezifische Aminosäuresequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), die mithilfe einer benachbarten Unterstützungssequenz bindet das Fibronektin am Intergrin der Zellmembran. Das Fibronektin bindet die Zelle an der extrazellulären Matrix (EZM) durch Kollagenbindungen. Es erlaubt so die Bewegung der Zelle in der EZM.

Das Fibronectin befindet sich löslich im Blut und unlöslich fibrillär in der EZM [Alb04]. Die Fibrille besteht aus einer Verkettung von Fibronectinmolekülen, die durch Selbstassoziation miteinander verbunden sind. Das Fibronectin in seiner fibrillären Form besitzt eine sehr hohe Dehnbarkeit [Eri02]. In Lösung ist die Konformation des Fibronectins am häufigsten kugelförmig und die Dimensionen sind abhängig von den Eigenschaften der Lösung (z.B. von der Ionenkonzentration [Sjö89]). Die Konformation und der Adsorptionsprozess des Fibronectins auf der Oberfläche sind abhängig von einigen Charakteristiken der Oberfläche wie z.B. der Hydrophilität [Ber03], der Ladung [Nga04] und der Rauigkeit [Sou07].

Um ein Protein auf der Oberfläche zu visualisieren, muss zuerst die reine Oberfläche genau untersucht werden, da man die Struktur und die Besonderheiten der Oberfläche erkennt. Die Rauigkeit der Oberfläche bildet die Haupteinschränkung, um ein Protein mittels AFM zu visualisieren. Die Struktur der Oberfläche muss kleiner sein als die Höhe des adsorbierten Proteins, da sonst das Protein und das Relief ineinander übergehen. Die meisten Proteine haben Dimensionen in der Größenordnung von einigen Nanometer. Es wird also in der Regel die Adsorption auf einem sehr glatten Substrat durchgeführt: Silizium-Wafer, der einen sehr dünnen Halbleiter ist; HOPG (highly oriented pyrolytic graphite) und Mica sind wegen ihrer Glätte sehr oft für AFM-Versuche benutzt worden [Jan01].

Titan, das seit Jahren als biokompatibler Stoff benutzt wird [Pro87], ist schon von vielen Wissenschaftlern in mannigfaltigen Testreihen untersucht worden [Cac01, Cac02, Mac98, Sir01]. Reine Titanstücke vom Handel sind meistens nicht glatt genug, um Proteine zu visualisieren. Sie müssen chemisch [Sou07] oder mechanisch [Mac98] vorbereitet werden. Eine häufig benutzte Vorbereitungsmethode, um sehr glatte Titanoberflächen für eine Fibronectinadsorption herzustellen, ist die Sputtertechnik (Kathodenzerstäubung). Das Prinzip der Sputtertechnik ist die Abtragung eines reinen Titan-Targets durch einen Ionenstrahl, der sekundäre Titanionen produziert. Die Titanionen kondensieren auf einem Substrat und bilden eine Schicht [Sir01]. Mit dieser Technik bekommt man Oberflächen, die glatt genug sind, um das Fibronectin zu visualisieren [Sou07].

In diesem Fall besteht die Titanoberfläche aus Titandioxid, das in einer Sauerstoffatmosphäre gesputtert wird. Durch das Sputtern, bildet sich eine TiO_2 Schicht, die gegenüber physiologische Bedingungen inert ist.

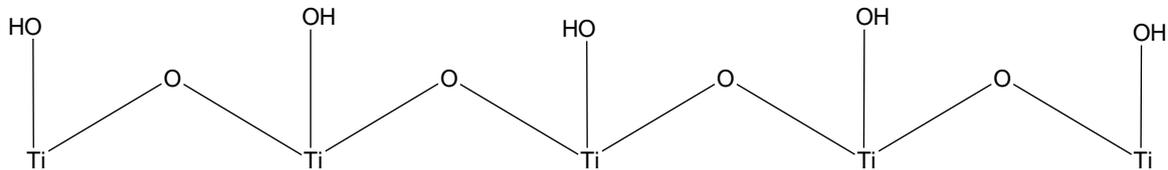


Abbildung 2: Zusammensetzung der TiO_2 -Oberfläche [Hel98]

Cacciafesta et al [Cac00] haben eine Vorbereitungstechnik entwickelt, um glatte Titanoberflächen ($\text{RMS}=0.3 \text{ nm}$) zu erhalten. Diese so genannte „template stripping“ Technik besteht darin, dass eine Titanschicht auf einem sehr glatten Substrat (Mica) durch thermisches Verdampfen aufgetragen wird. Nach dem Verdampfen wird die ausgebildete Oberfläche an ein anderes Substrat geklebt und vom Mica-Substrat abgetrennt. Die Titanoberfläche, die früher an dem Mica haftete, hat sich an das Relief des Micas geschmiegt, deshalb entspricht ihre Rauigkeit weitestgehend der des Micas.

Die Visualisierung des Fibronektins auf der Oberfläche hängt auch von anderen Bedingungen ab. Natürlich muss das Protein zuerst auf die Oberfläche adsorbiert werden. Der Adsorptionsprozess kann durch Physisorption oder Chemisorption erfolgen. Es wird vermutet, dass das Fibronektin hauptsächlich durch Physisorption auf der Titanoberfläche adsorbiert wird. Wie von *Sousa et al* beschrieben [Sou05], beeinflusst die Hydrophilität der Oberfläche den Adsorptionsprozess des Fibronektins. Sie haben den Adsorptionsprozess des Fibronektins auf reinem Titan (oxydiert in einer H_2O_2 -Lösung) und Titan, welches mit der Sputtertechnik vorbereitet worden war, beobachtet und festgelegt, dass die Menge der adsorbierten Fibronektin auf reinen Titan größer als auf dem gesputterten Titan ist.

Weitere AFM-Versuche zeigen, dass das Fibronectin zunächst nicht als Cluster sondern als eine Monolage auf der Titanoberfläche adsorbiert wird [Zen93, Sou07]. Erst nach Erhöhen der Konzentration oder der Inkubationszeit bildet sich eine Monolage aus. Diese Versuche zeigen auch, dass das Fibronectin hier eine kugelförmige Struktur und unterschiedlichen Dimensionen besitzt: Ein Durchmesser von 32 nm bis 55 nm bzw. eine Höhe von 2 nm bis 4 nm. Es wurde (in diesem Zusammenhang) vermutet, dass die Konformation des Fibronectins in Lösung kugelförmig ist, allerdings hängt seine Konformation an der Oberfläche von deren Eigenschaften ab. Beispielweise zeigt der AFM-Versuch der Adsorption des Fibronectins auf verschiedenen Oberflächen von *Bergkvist et al* [Ber03], dass das Fibronectin kompakte Konformation auf hydrophoben Oberflächen (Silizium mit Methylgruppen) hat, während der Konformation auf hydrophilen Oberflächen meistens längförmig ist. Ein Versuch von *Ngankam et al* [Nga04] zeigt, dass die Konformation von der Ladung der Oberfläche abhängt. Die Forscher haben Fibronectin mit anionischen und kationischen Polymerschichten verbunden und festgestellt, dass die Fibronectinschicht auf einem kationischen Polymer dicker ist (19 ± 0.7 nm) als auf einem anionischen (9.9 ± 1 nm). Nach diesen Ergebnissen war ihre These, dass das Fibronectin manchmal horizontalförmig (auf anionischem Polymer) und manchmal vertikalförmig (auf kationischem Polymer) bindet.

Chemisorption des Fibronectins erfolgt meistens durch die Benutzung von Verbindungsmolekülen, die kovalent mit dem Substrat verbunden sind. Ein Beispiel dafür ist der Versuch von *Vallières et al* [Val07]. Sie haben untersucht, wie das Fibronectin mit zwei verschiedenen Crosslinkern auf einer Siliziumoberfläche verbunden ist und wie dies die Konformation beeinflusst. Sie haben festgelegt, dass die Topographie und die Rauigkeit der Oberfläche von dem Schema der Bindung abhängen und dass die Konformation des Fibronectins die biologische Aktivität beeinflusst. Der AFM-Versuch zeigt, dass das Bindungsschema einen Einfluss auf den Dimensionen des Fibronectins hat. In diesem Versuch wurden die Dimensionen des Fibronectins größer (Durchmesser: 32 ± 9 nm; Höhe 3 ± 2 nm), wenn es mit einer Glutarsäureanhydrid-Monolage verbunden ist, als wenn es auf einer Buttersäureäthylester-Monolage verbunden ist (Diameter: 29 ± 11 nm; Höhe 0.9 ± 0.5 nm).

Die Visualisierung eines einzigen adsorbierten Fibronectins mittels AFM auf der Titanoberfläche ist eine Herausforderung. Ein Beispiel für solche Leistung ist die

Untersuchung von *MacDonald et al* [Mac98], die zeigt, dass das Fibronectin auf glatt geschliffenem Titan ($\text{RMS} = 4.45 \pm 0.46 \text{ nm}$) mit einer globularen Konformation und in Dimensionen von $16.5 \pm 1.0 \text{ nm}$ (Länge), $9.6 \pm 1.2 \text{ nm}$ (Breite) und $2.5 \pm 0.5 \text{ nm}$ (Höhe) adsorbiert. Es ist noch wichtig zu bemerken, dass die meisten AFM-Versuche mithilfe anderer Oberflächenanalysen abgesichert werden müssen. Das AFM ist ein relatives Messgerät, das kalibriert werden muss. Die AFM-Messungen geben quantitative Informationen nur über die Topographie einer Oberfläche; die Zusammensetzung der ersten Atomschichten einer Oberfläche müssen also mit Hilfe von Spektroskopiemethoden bestimmt werden.

2.2 Das Grundprinzip der Kraftmikroskopie

Ursprünglich ist das AFM eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (abgekürzt STM von Englisch „Scanning Tunneling Microscope“), das in den achtziger Jahren entwickelt worden war. Das erste AFM wurde im Jahr 1986 [Bon00] erfunden. Das AFM ist ein sehr nützliches Analysegerät, um Informationen über die Oberfläche einer biologischen Probe in seine Urzustand zu erhalten. Der größte Vorteil des AFMs ist seine Fähigkeit zerbrechliche Makromoleküle in Flüssigkeit oder an der Luft zu analysieren, ohne komplizierte Vorbereitung und Analysebedingungen. Vergleichsweise erfolgt die Visualisierung mittels Rastertunnelmikroskop nur für leitende oder leitende beschichtete Proben und mittels Rasterelektronenmikroskop nur im Vakuum. Die Messung ermittelt die Wechselwirkungen zwischen einer dünnen Spitze und der Probenoberfläche, welche von deren Abstand abhängig ist. Diese Spitze folgt der Probenoberfläche über die Bewegung eines Scanners und die Messdaten ergeben sich aus der Vertikalumstellung des Scanners. Mittels AFM kann man die Oberfläche nicht sehen, sondern sie ertasten.

Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe können theoretisch wie zwischen zwei Atomen beschrieben werden. Was man als Wechselwirkung zwischen Atomen bezeichnet ist die Kraft, der elektrostatischen oder elektronischen Wechselwirkung. Wechselwirkungen zwischen Atomen treten nur auf, wenn der Abstand geringer als einige Mikrometer ist. Bei großem Abstand sind die Wirkungen so klein, dass die Kraft zu gering wird, um sie noch zu messen [Bon00]. Die Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Wechselwirkungen, die in einer Größenordnung zwischen einigen Nanometern und Mikrometern wirken. Die Wechselwirkungen, die eine große Rolle in AFM-Messungen spielen, sind die Van-der-Waals Kräfte und die elektronische Wechselwirkung auf Grund des Pauli-Verbot. Diese beiden Wechselwirkungen gewinnen an Bedeutung bei Abständen in der Größenordnung von Nanometern.

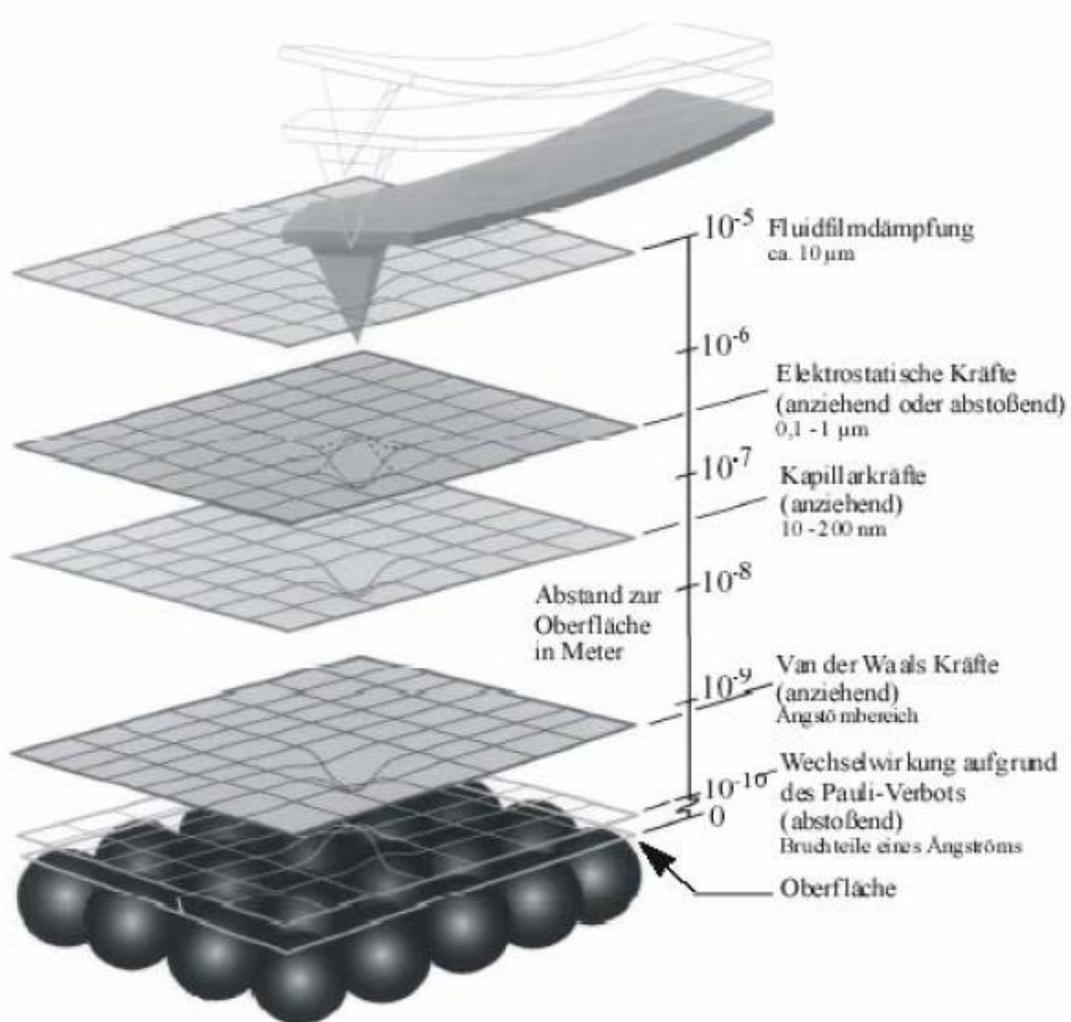


Abbildung 3: Abstand Wechselwirkungen entsprechend [Eli95]

Van-der-Waals Kräfte sind elektronische Kräfte, die von einer asymmetrischen Verteilung der Elektronen im Molekülorbital kommen. Sie können über drei Kräfte definiert werden. Diese drei Kräfte werden London-Dispersionskräfte, Debye-Induktionskräfte und Keesom-Lenkungskräfte genannt. Dispersionskräfte entstehen aus den Wechselwirkungen zwischen zwei augenblicklichen Dipolmomenten, Induktionskräfte dagegen entstehen aus den Wechselwirkungen zwischen einem Dipol und einem induzierten Dipolmoment. Schließlich entstehen Lenkungskräfte aus den Wechselwirkungen zwischen zwei Dipolen.

Der Pauli-Verbot-Satz erklärt die Wechselwirkungen nur beim sehr kleinen Abstand (weniger als 1 Nanometer). Unter diesem Satz versteht man, dass zwei Elektronen mit gleichem Quantenzustand sich nicht gleichzeitig in dem gleichen Orbital befinden dürfen. Wenn sich zwei Elektronen mit gleichem Quantenzustand nähern, wird eine sehr starke abstoßende Kraft erzeugt. Mit Hilfe der anziehenden Van-der-Waals Kräfte und der abstoßenden Wechselwirkung des Pauli-Verbots kann man die Potentialkurve der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Atomen in Abhängigkeit vom Abstand darstellen (Abbildung 4).

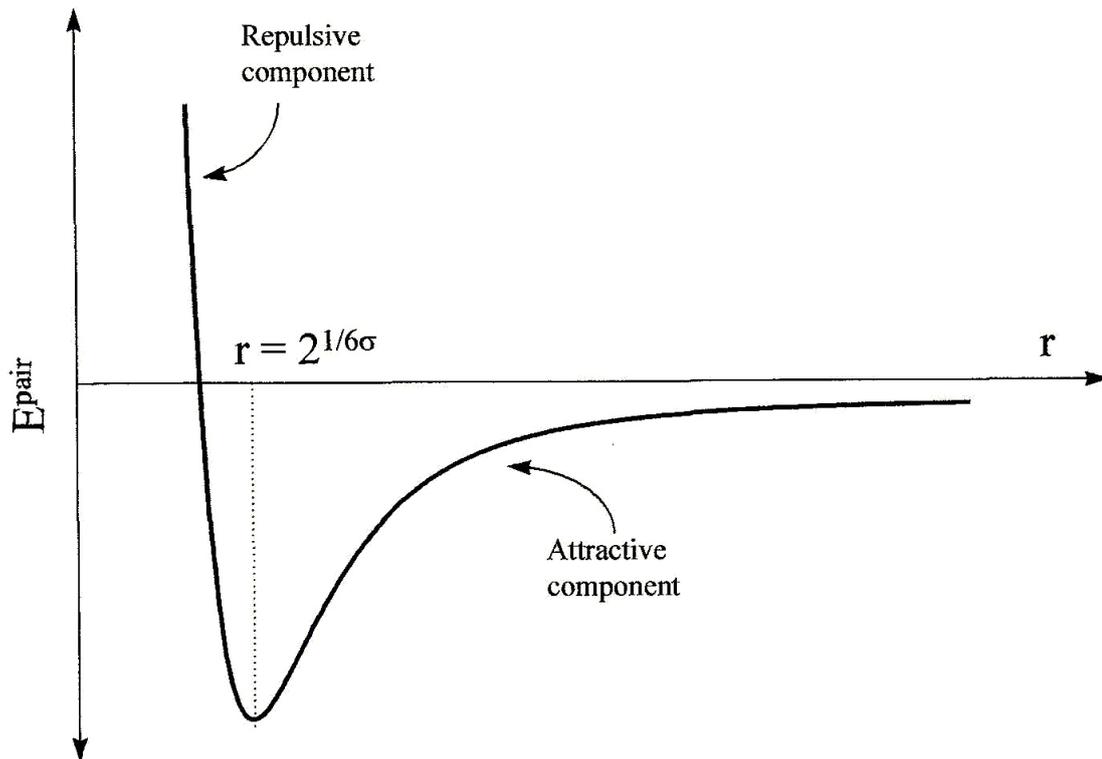


Abbildung 4: Potentialkurve der Wechselwirkungsenergie in Abhängigkeit vom Atom-Atom-Abstand [Mor99].

Diese abstoßende Kraft wirkt sich gegen die Van-der-Waals Wechselwirkungen. Je kleiner der Abstand wird, desto grösser die Kraft wird. Beim Abstand einer Größenordnung von Nanometern wird die abstoßende des Pauli-Verbotskraft des grösser als die anziehende Kraft der Van-der-Waals Wechselwirkungen [Bon00].

Tatsächlich wirken mehrere Atome der Spitze und der Probe auf die Kraft zwischen beiden ein. Diese Potentialkurve lässt sich als eine Kraft-Abstandskurve wie in der Abbildung 5 darstellen:

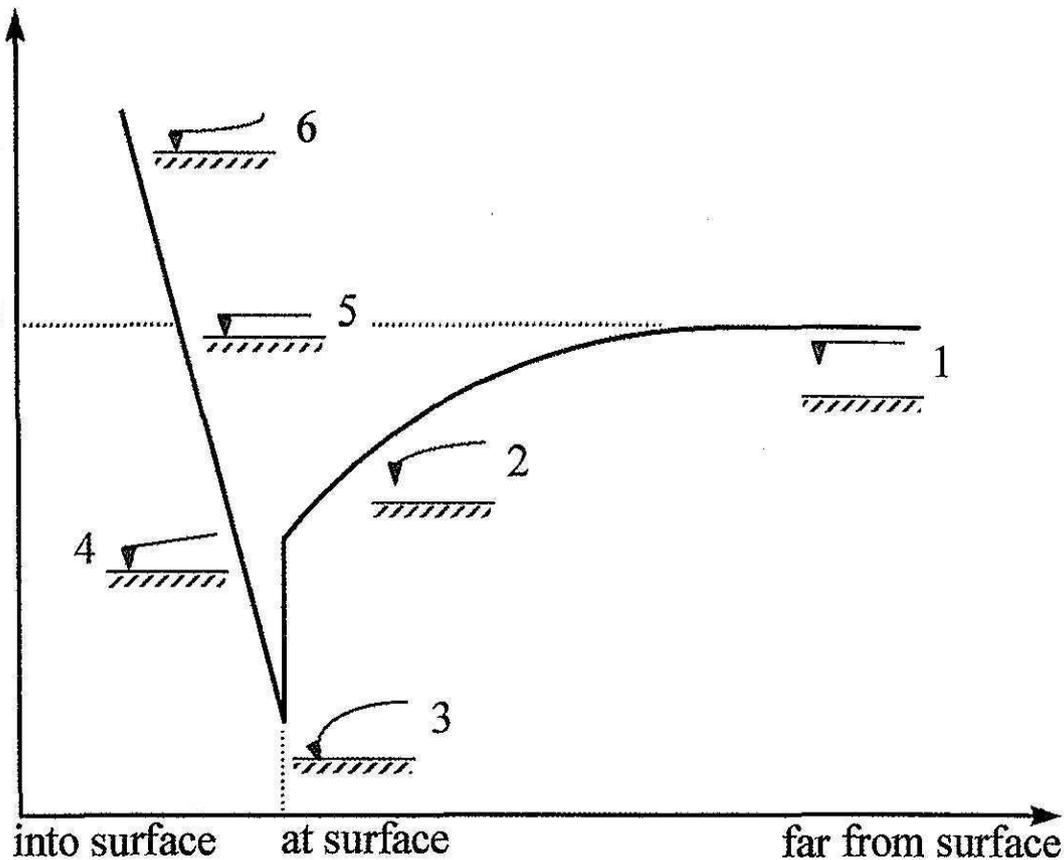


Abbildung 5: Kraft-Abstand-Kurve zwischen Probe und Spitze [Mor99].

Die Oberfläche wird die Spitze abstoßen und die abstoßende Kraft kann durch die Beugung des Cantilevers, an dem die Spitze verankert ist, gemessen werden. Die Beugung des Cantilevers wird Pixel für Pixel gemessen und durch die vertikale Bewegung des Scanners konstant gehalten. Die vertikale Bewegung des Scanners wird gleichzeitig genutzt, um die Topographie der Oberfläche darzustellen.

2.2.1 Instrumentellen Aufbau

Ein AFM besteht aus vier Hauptelementen: Dem Cantilever mit der Spitze; das Steuerungssystem (Scanner); das Sensorsystem und das Elektroniksystem. Der Scanner ist ein Zylinder, der aus piezoelektrischem Material gebaut ist. Die Umstellung des Scanners kommt von einer angelegten Spannung zwischen zwei Bereichen dieses Zylinders. Zum Beispiel entstammt die Vertikalumstellung aus einer Spannung zwischen dem Inneren und der Außenseite dieser Zylinder. Während einer Messung bewegt der Scanner die Probe, das Sensorsystem misst die Beugung des Cantilevers und das Elektroniksystem steuert den Scanner, um die Beugung konstant zu erhalten. Im Tapping-Mode wird die Spitze durch einen piezoelektrischen Motor in Schwingung versetzt. Die Amplitude der Schwingung wird mithilfe des Sensorsystems registriert und durch das Elektroniksystem, das der Scanner bewegt, konstant erhalten. Man sieht in Abbildung 6 den instrumentellen Aufbau eines AFMs mit optischem Sensor.

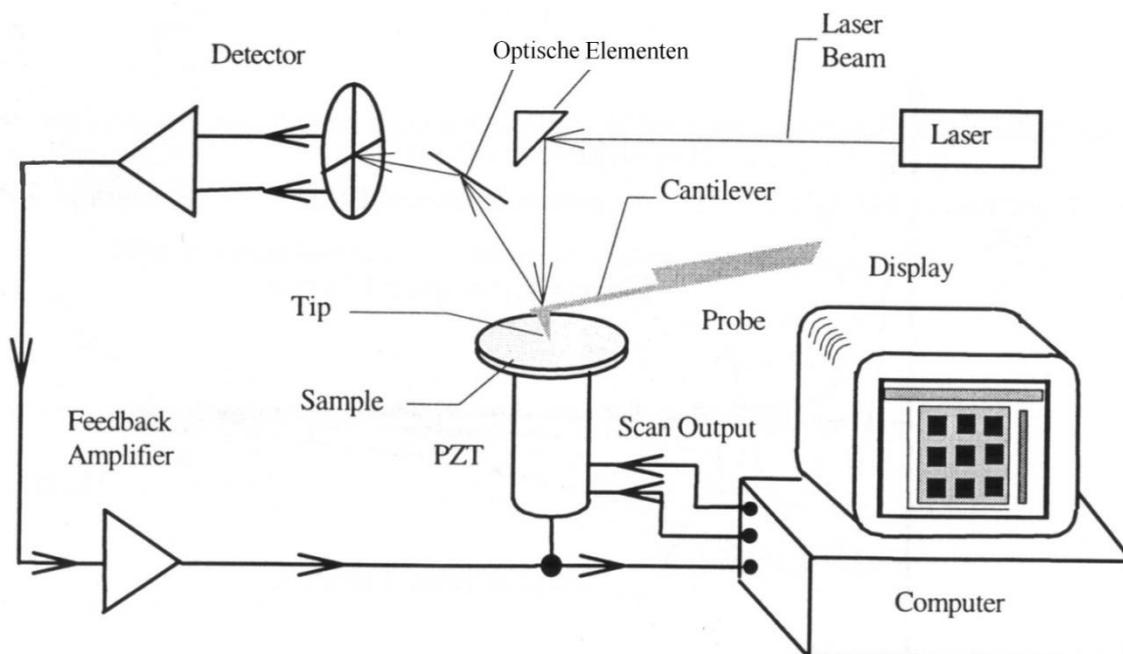


Abbildung 6 : Beispiel eines instrumentellen Aufbaus eines AFMs mit optischem Sensor [Ber03].

Das Sensorsystem besteht hier aus einem Laser, optischen Elementen und einem Diod-Array-Sensor. Der Laserstrahl wird an der Oberseite des Cantilevers reflektiert, sodass die Messung der Beugung des Cantilevers durch die Veränderung der Laserstelle an dem Diod-Array-Sensor erfolgt. Dann wird das Signal der Laserstelle als ein Fehlersignal zu dem Computer gesendet. Der Computer benutzt dieses Fehlersignal, um der Scanner mittels PID-Regler zu steuern und die Topografie der Probe wird durch die Bewegung des Scanners bzw. die zu dessen Bewegung angelegte Spannung abgebildet.

Ein Problem der Messgenauigkeit in dieser Arbeit liegt in dem nicht linearen Lauf der Probe für große Messbereiche in der XY-Ebene [Bon00]. Um die Probe zu bewegen, werden zwei verschiedene Spannungen an beiden Seiten des piezoelektrischen Zylinders angelegt, was bewirkt, dass sich eine Seite ausdehnt und die andere Seite zusammenzieht. Daher folgt die Probe einem gebogenen Verlauf, wie in der Abbildung 7 gezeigt.

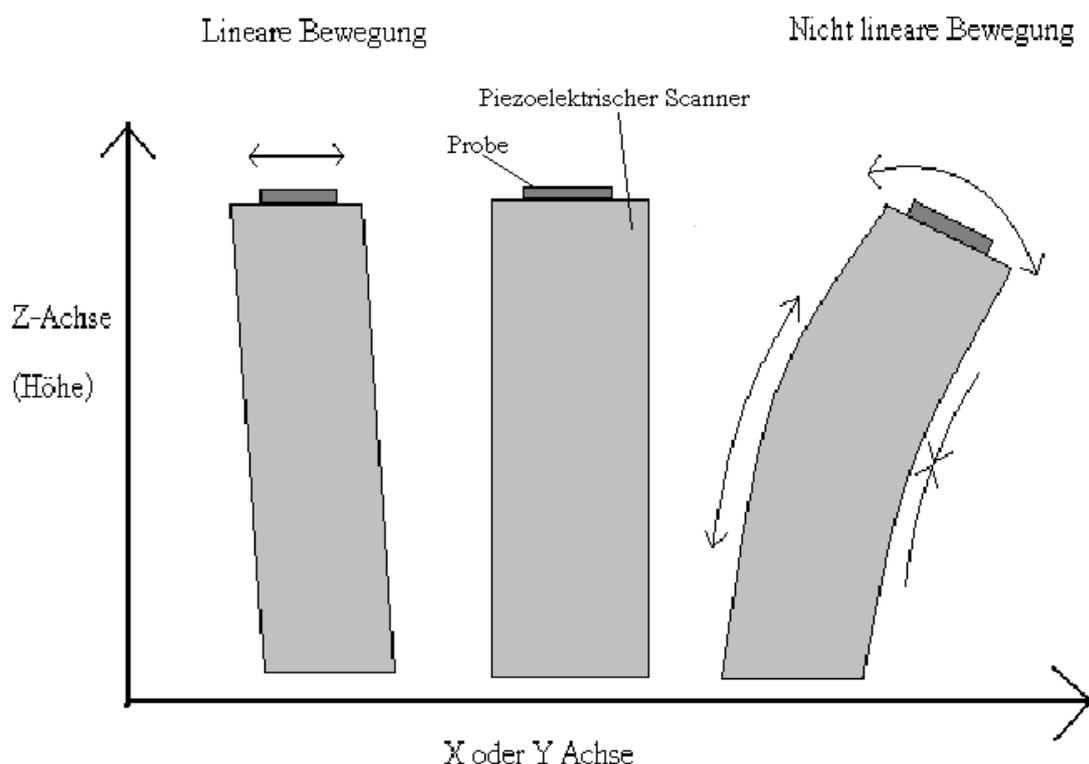


Abbildung 7: Bewegung des Scanners; Für kleine Messbereiche (Links) ist der Lauf der Probe linear, für große Messbereiche (Rechts) ist er nicht linear.

Dies bedeutet, dass bei jeder Bewegung des Scanners in der X-Y-Ebene eine Bewegung der Probe in der Z-Richtung erfolgt. Dieser gebogene Verlauf führt zu einem Messfehler, welcher eine elektronische Korrektur notwendig macht. Die in dieser Arbeit benutzten elektronischen Korrekturen sind als die 1D-Line-Fit-Korrektur und die 1D-Bow-Removal-Korrektur bezeichnet. Die 1D-Line-Fit-Korrektur subtrahiert eine Regressionskurve erster Ordnung, die von der Methode der kleinsten Quadrate ausgerechnet ist, von den Messpunkten. Diese Subtraktion wird für jede Scanlinie der Messung durchgeführt. Die 1D-Bow-Removal-Korrektur subtrahiert eine Regressionskurve zweiter Ordnung. Die 1D-Line-Fit-Korrektur genügt, um das Signal einer schiefen Probe zu korrigieren und die 1D-Bow-Removal-Korrektur wird also benutzt, um der gebogene Verlauf von großen Messbereichen zu korrigieren.

2.2.2 Contact-Mode

Der Kontakt-Modus (auf Englisch „Contact-Mode“ genannt) ist die einfachste Methode, um eine Oberfläche zu visualisieren. Im Contact-Mode ist die Spitze sehr nah an der Oberfläche und wird von abstoßenden Kräften beeinflusst. Die Kraft wird konstant über die Steuerung des Feedback-Systems gehalten. Der Scanner bewegt die Probe in Z-Richtung, damit die Beugung des Cantilevers konstant bleibt. Das vertikale Umstellen der Probe für jede Pixel des Scans erlaubt die Topographie der Oberfläche darzustellen. Das Hauptproblem bei den Messungen im Contact-Mode ist, dass Schäden an der Probe angerichtet werden können, wenn sie zu zerbrechlich ist oder wenn der Abstand zwischen Spitze und Probe zu klein wird. Ein anderes Problem bei Messungen an der Luft im Contact-Mode tritt im Zusammenhang mit Kapillarkräften auf. Wenn eine sehr dünne flüssige Schicht (Luftfeuchtigkeit) auf der Oberfläche ausgebildet wird, kann die Spitze an der Oberfläche kleben bleiben und zu Messfehler führen. Der Contact-Mode erlaubt auch die Seitenkräfte, die an der Spitze wirken, zu messen und daraus ergeben sich Informationen über die mechanischen Charakteristiken der Oberfläche.

2.2.3 Tapping-Mode

Im Tapping-Mode (Abbildung 8, rechts) wird der Cantilever über einen piezoelektrischen Motor zur Schwingung angeregt. Die Schwingung wird auf die Resonanzfrequenz des Cantilevers, damit die Amplitude der Schwingungen maximal wird, eingestellt. Diese Einstellung erlaubt die höchste Auflösung zu erreichen, da die Empfindlichkeit gegen die Veränderung der Amplitude am höchsten ist. Wenn die Spitze auf die Oberfläche trifft, verändern sich die Amplitude und die Kraft zwischen Spitze und Probe kann über diese Amplitudenveränderung gemessen werden. Der Scanner bewegt die Probe in Z-Richtung, damit die Amplitude konstant bleibt. Der Hauptvorteil dieses Modus liegt in der Reduzierung der Kontaktzeit zwischen Spitze und Probe. Mit einer kleinen Kontaktzeit wird möglicher Schaden reduziert und die Visualisierung einer zerbrechlichen Oberfläche ermöglicht.

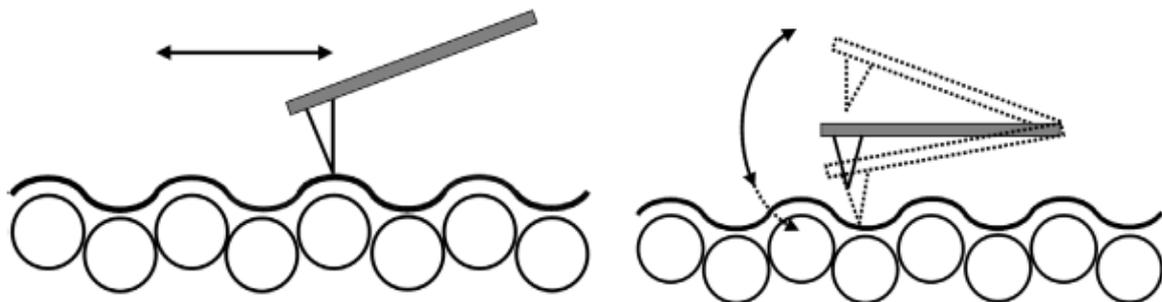


Abbildung 8: Unterschied zwischen Contact- und Tapping-Modes, im Contact-Mode (links) wird die Spitze bei unterbrochenem Kontakt der Oberfläche folgen, im Tapping-Mode (rechts) schwingt die Spitze und folgt bei Unterbrechungen der Oberfläche [Jan01].

Im Tapping-Mode erhält man nicht nur dieselben Informationen wie mit Contact-Mode, sondern auch die Möglichkeit, ein Bild der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche darzustellen. Zu diesem Zweck wird die Verschiebung der Schwingungsphase der Spitze im Verhältnis zur Schwingungsphase des piezoelektrischen Motors gemessen. Diese Phasenverschiebung (Abbildung 9) hängt von dem Energieverlust der Spitze ab, wenn sie auf der Oberfläche trifft [Bon00], und dieser hängt hauptsächlich von der Elastizität der Oberfläche ab. Dies erlaubt die Visualisierung unterschiedlicher mechanischen Eigenschaften der Oberfläche. Kapillarkräfte stören die Phasenverschiebung und sie müssen möglichst reduziert werden, auf diesem Grund wird die Probe vor jeder Messung an der Luft getrocknet.

Im Tapping-Mode werden die Phasenverschiebung und die Topographie einer Oberfläche gleichzeitig gemessen. Die Auflösung der Phasenverschiebung wird nicht durch die großen Unterschiede der verschiedenen Höhen der Oberfläche beeinflusst, weil die Veränderung der Phase eines Schwingungssignals nicht von der Veränderung seiner Amplitude abhängt. Mit dem Tapping-Mode erhält man also Informationen über dem Relief und den Eigenschaften der Oberfläche.

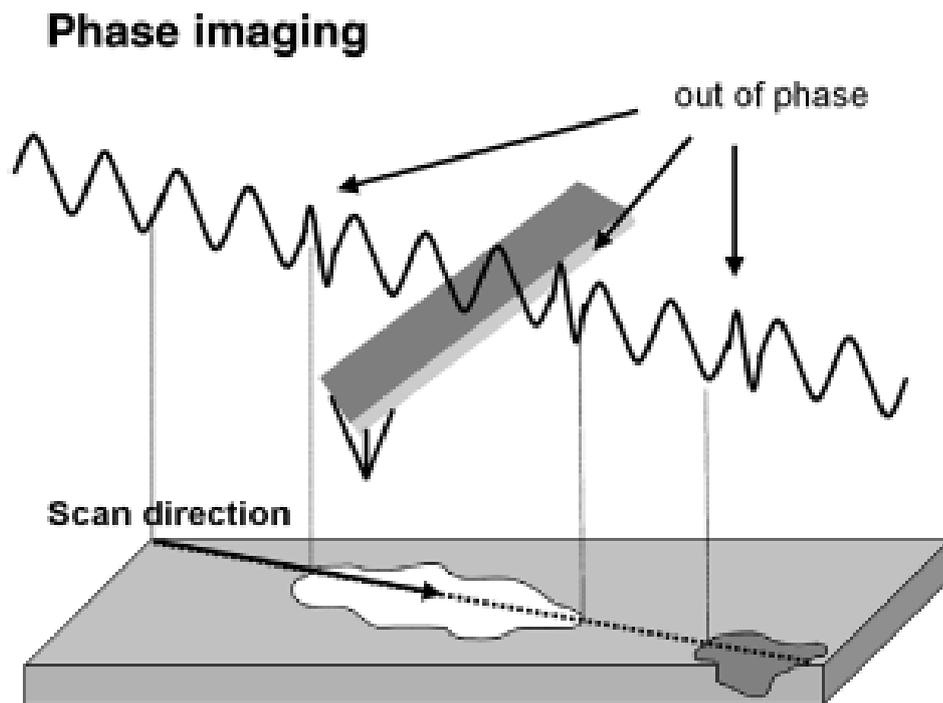


Abbildung 9: Phasenverschiebungen im Tapping-Mode: Bereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften werden mit unterschiedlichen Phasenverschiebungen gemessen [Jan01].

2.2.4 Convolution

Die Convolution ist ein Artefakt, welches von der Form der Spitze abhängt. Die Spitze ist nicht unendlich dünn und ihr Bogenradius meistens größer als der den Konturen der Oberfläche. Der Verlauf der Spitze an der Oberfläche ist also eine Funktion beider Formen.

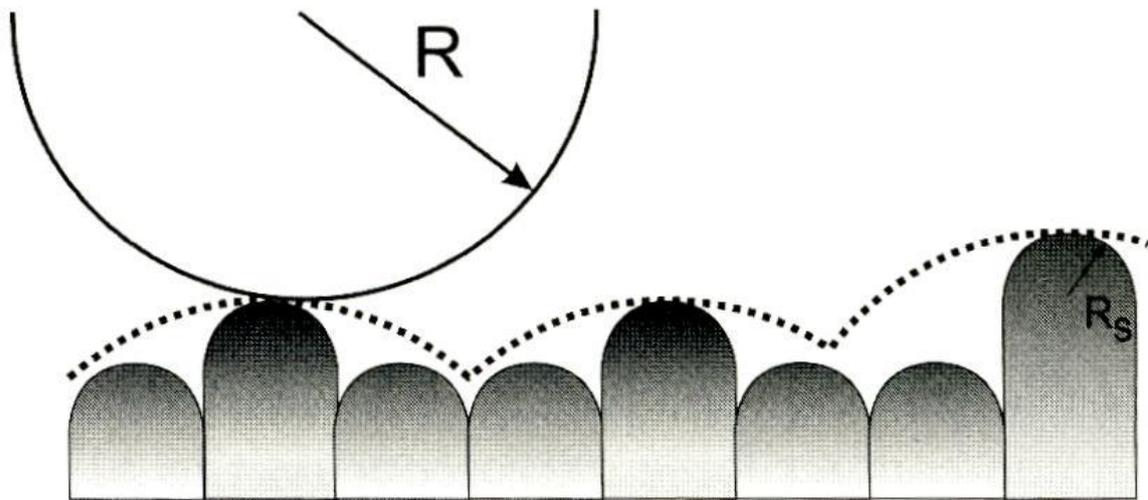


Abbildung 10: Schematische Zeichnung der Convolution der Spitze an der Oberfläche, wenn der Bogenradius der Spitze (R) viel größer als der den Partikel (R_s) der Oberfläche ist [Mey04].

Die Abbildung 10 zeigt ein einfaches Beispiel der Folge einer Convolution, wenn $R \gg R_s$, so dass das Verlauf der Spitze an der Oberfläche hauptsächlich von dem Bogenradius der Spitze abhängt. Wenn R gleich R_s oder kleiner ist, wird diese Wirkung reduziert und der Verlauf der Spitze kommt nahe dem der Oberfläche. Die Convolution reduziert in jedem Fall die Auflösung und verursacht ein Fehler in der Messung der Dimensionen des Musters der Oberfläche. Um diese Wirkung zu reduzieren, wird die Breite auf halber Höhe der Partikel gemessen (Abbildung 11).

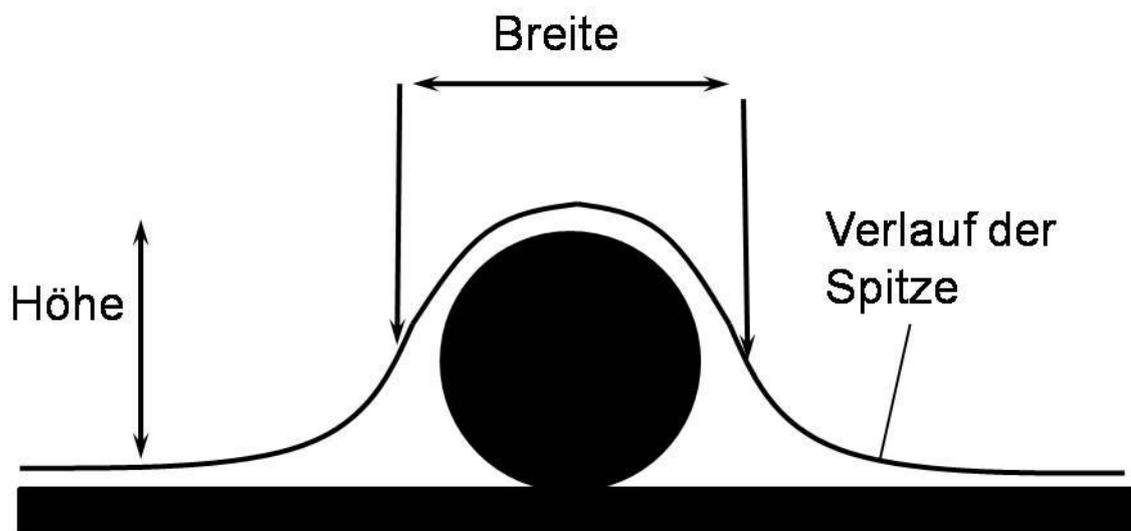


Abbildung 11 : Schematische Zeichnung der Messung den Partikeldimensionen.

Die Spitze kann nach wiederholten Scans einer harten Probe beschädigt werden. Dies führt zu einer Erhöhung des Bogenradius der Spitze und verursacht eine Einschränkung der Auflösung. Das Ende der Spitze kann auch in zwei oder mehr Teilen zerbrochen werden und zu einen so genannte Multiple-Tip-Effekt führen. Ein Multiple-Tip-Effekt ist erkennbar, wenn die Struktur der Oberfläche wie verdoppelt dargestellt wird (Falls die Spitze in zwei Teilen zerbrochen ist). Das Ergebnis ist der Eindruck, das Bild ist unscharf.

2.2.5 Regelung mit dem PID-Regler

Der PID-Regler ist ein Teil des elektronischen Systems, das den Scanner auf der vertikalen Achse steuert. Er ist ein Verstärker des optischen Signals, das zu gering ist, um den Scanner direkt zu steuern. Er ist wichtig, da er die Spitze möglichst nah an die Oberfläche führt und so erlaubt, dass die Spitze dem Topografieverlauf möglichst genau folgt. Der PID-Regler empfängt ein Eingangssignal (siehe Abbildung 12) des Sensorsystems (optischer Detektor), wandelt es um und überträgt ein Ausgangssignal zum Scanner und zum Computer. Der Computer benutzt dieses Ausgangssignal, um die Topografie darzustellen, und der Scanner, um die Probe in Z-Richtung zu bewegen. Das Eingangssignal ist die Differenz (Fehlersignal) zwischen dem Setpoint des Lasers (Zentrum des optischen Detektors) und der Stellung des Lasers am Detektor (Messsignal). Das Ziel der Regelung ist, dass das Fehlersignal schnellstmöglich Null wird.

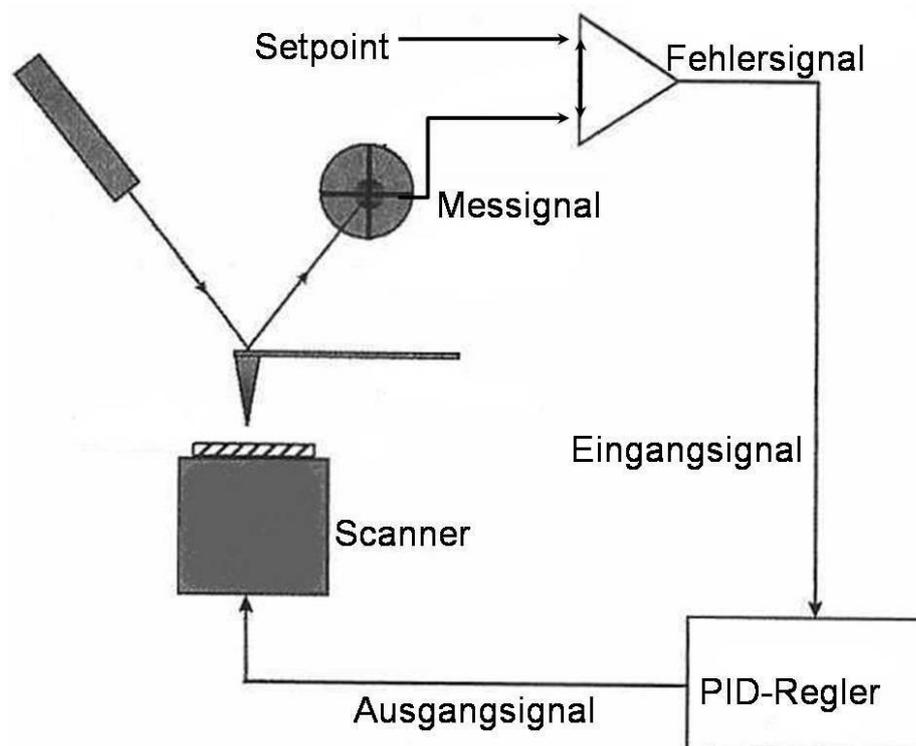


Abbildung 12 : Schematische Zeichnung der Regelung des Signals mittels PID-Regler.

Im Tapping-Mode entspricht das Messsignal dem Effektivwert der Schwingungsamplitude des Cantilevers, wenn die Spitze die Oberfläche trifft. Der Setpoint entspricht dem Effektivwert der Schwingungsamplitude, wenn es kein Kontakt zwischen der Spitze und der Probe gibt. Der Effektivwert ist die ausgerechnete Standardabweichung der Amplitude eines elektronischen Sinussignals. Wenn die Spitze die Oberfläche trifft, verkleinern sich die Amplituden sowie der Effektivwert. Das Ausgangssignal eines PID-Reglers besteht aus drei Anteilen: einen proportionalen, einen integralen und einen differenzialen Teil. Welche wie das Ausgangssignal in Volt angegeben sind.

$$x_{aPID} = x_{aP} + x_{aI} + x_{aD} = K_P \cdot x_e + K_I \cdot x_e \cdot \Delta t + K_D \cdot \frac{\Delta x_e}{\Delta t} \quad \text{Gleichung 1}$$

In der 1 ist x_a das Ausgangssignal und x_e das Eingangssignal. K_P , K_I und K_D beschreiben die proportionale bzw., integrale und differenziale Konstante [Bus91]. Δt ist die Zeit zwischen zwei Messungen des Eingangssignals. Die drei Konstanten werden während der Messung als Parameter der Regelung eingestellt. Der proportionale Anteil der Gleichung 1 multipliziert das Eingangssignal, sodass der Scanner schnell reagieren kann. Wenn die proportionale Konstante zu klein ist, sieht die Topographie sehr glatt aus, da der Scanner nicht schnell genug reagiert, um dem Verlauf der Oberfläche genau zu folgen. Im Gegensatz dazu hat ein PID-Regler, der mit einer zu hohen proportionalitäts Konstanten eingestellt ist, den Nachteil, dass der Scanner zu stark reagiert. Wegen der Trägheit des Scanners wird der Topografieverlauf übertrieben dargestellt und Schwingungen werden im Signal erscheinen. Wenn der PID-Regler nur mit der proportionalitäts Konstanten eingestellt ist, wird das Eingangssignal nie genau den Setpoint treffen (Fehlersignal gleich Null). Tatsächlich hat es immer eine bleibende Regelungsdifferenz zu finden, die von der Konstanten abhängt [Bus91].

Um diese Regelungsdifferenz auf Null zu bringen, wird die integrale Konstante eingestellt. Der integrale Anteil der Gleichung 1 integriert das Eingangssignal auf einem regelmäßigen Zeitintervall. Wenn die integrale Konstante zu hoch eingestellt ist, schwingt das Ausgangssignal, sodass das Rauschen vergrößert wird. Wenn die integrale Konstante zu klein eingestellt ist, wird die Regelungsdifferenz nie Null sein. Daher müssen P und I gut austariert sein. Wenn der Regler aber nur mit der

proportionalen und der integralen Konstante eingestellt ist, beginnt das Ausgangssignal zunehmend zu schwingen. Die Regelung wird also instabil. Um ein stabiles Ausgangssignal zu erreichen, muss eine differentiale Konstante eingestellt werden. Der integrale Anteil des PID-Reglers überträgt ein Ausgangssignal, das von der Geschwindigkeit der Veränderung (Steigung) des Eingangssignals abhängt. Die differentiale Konstante verlangsamt die Regelung, aber sie ist unvermeidlich, um die Schwingungen zu reduzieren. Die proportionale Konstante sowie die integrale Konstante beschleunigen die Regelung, während die differentiale Konstante die Regelung verlangsamt. Die Einstellung eines PID-Reglers ist also ein Kompromiss zwischen der Geschwindigkeit und der Genauigkeit der Regelung.

2.3 Charakterisierung der Oberfläche

2.3.1 Rauigkeit

Die Rauigkeit einer Oberfläche wird in dieser Diplomarbeit durch drei quantitative Werte charakterisiert. Auf der vertikalen Achse wird der sogenannte Z-Range eingetragen. Der Z-Range-Wert ergibt sich aus der Differenz zwischen dem höchsten und dem tiefsten Punkt der Oberfläche (Gleichung 2).

$$Z - range = Z_{\max} - Z_{\min} \quad \text{Gleichung 2}$$

Der zweite Wert ist der quadratische Mittelwert (RMS) der Rauigkeit. Der RMS wird als die Quadratwurzel des Mittelwerts des Quadrats vom Abstand zwischen den Punkten der Oberfläche und der mittleren Höhe definiert (Gleichung 3).

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle Z_i - \bar{Z} \rangle^2} \quad \text{Gleichung 3}$$

In der Gleichung 3 ist N die Zahl der Messwerte (Zahl der Punkte im Bild), Z_i die Höhe jedes Messwertes und \bar{Z} die mittlere Höhe der gemessenen Oberfläche. Die Gleichung 3 beschreibt einen spezifischen Fall des RMS: Wenn der Mittelwert gleich null ist, gleicht der RMS die Standardabweichung.

$$RMS = \sqrt{\bar{Z}^2 + \sigma_Z^2} \quad \text{Gleichung 4}$$

In der Gleichung 4 ist σ die Standardabweichung der gemessenen Punkte der Oberfläche. Der dritte Wert ist das Verhältnis der gemessenen Fläche und der projizierten Fläche (F/PF-Verhältnis [-]). Die gemessene Fläche entspricht dem Relief der Oberfläche, während die projizierte Fläche dem Scanbereich entspricht. Die gemessene Fläche ist also immer grösser als die projizierte Fläche. Deshalb ist das F/PF-Verhältnis immer grösser als eins. Das F/PF-Verhältnis ist ein gutes Maß der Oberflächenrauigkeit, aber auch der Porosität: Je höher die Porosität (oder die Rauigkeit), desto höher das F/PF-Verhältnis.

2.4 Physisorptionsprinzip

Es wird vermutet, dass das in dieser Arbeit untersuchte Fibronectin durch Physisorption auf der Titanoberfläche adsorbiert wird. Die Physisorption ist ein Adsorptionsprozess, der durch Van-der-Waals Wechselwirkungen erfolgt und wo das Molekül nicht kovalent an der Oberfläche gebunden wird. Die Physisorptionsenthalpie ist ungefähr zehn Mal kleiner als die Chemisorptionsenthalpie [Atk06], sodass die Anbindung viel schwächer ist, als die durch Chemiesorption. Der Physisorptionsprozess ist reversibel und hängt von der Adsorptions- sowie Desorptionsgeschwindigkeit ab. Das Gleichgewicht wird erreicht, wenn die Geschwindigkeit der Adsorption gleich der der Desorption ist. Beide Geschwindigkeiten sind abhängig vom Partialdruck (Gas) oder der Konzentration (Flüssigkeit) der adsorbierten Moleküle. Die Menge der adsorbierten Moleküle lässt sich durch den Bedeckungsgrad (Θ) beschreiben:

$$\Theta = \frac{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{besetzten} \cdot \text{Adsorptionsstellen}}{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{vorhandenen} \cdot \text{Adsorptionsstellen}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Der Adsorptionsprozess der ersten adsorbierten Schicht auf einer Oberfläche kann mithilfe der Langmuir-Isotherme beschreiben werden:

$$\Theta = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad \text{Gleichung 6}$$

Wobei p der Druck und K das Verhältnis der Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten ist:

$$K = \frac{k_{\text{adsorption}}}{k_{\text{desorption}}} \quad \text{Gleichung 7}$$

Der Adsorptionsprozess kann durch die Langmuir-Isotherme nur unter folgenden Einschränkungen beschrieben werden:

- Die Langmuir-Isotherme gelten nur für die erste adsorbierte Schicht.
- Alle Stellen der Oberfläche sind identisch und die Oberfläche ist glatt (in der Größenordnung der Moleküle).
- Es gibt keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Molekülen.

Die Adsorptionsprozesse werden genauer durch die BET-Isotherme [Atk06] beschrieben. Die BET-Isotherme gelten auch für die zweite und für weitere Schichten, ohne Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Molekülen:

$$\frac{V}{V_{Mono}} = \frac{cz}{(1-z)\{1-(1-c)z\}} \quad \text{Gleichung 8}$$

mit

$$z = \frac{p}{p^*} \quad \text{Gleichung 9}$$

Wobei V das adsorbierte Gasvolumen ist. V_{Mono} ist das adsorbierte Gasvolumen, um eine komplette Monolage zu bilden. p^* ist der Dampfdruck über der Adsorbatschicht von mehr als einem Molekül Dicke und c eine Konstante, die von der Desorptionenthalpie und der Verdampfungsenthalpie abhängt:

$$c = \exp\left(\frac{\Delta_{De}H^\circ - \Delta_{Ve}H^\circ}{RT}\right) \quad \text{Gleichung 10}$$

Beide Isotherme können mithilfe der Konzentration anstatt des Drucks beschrieben werden.

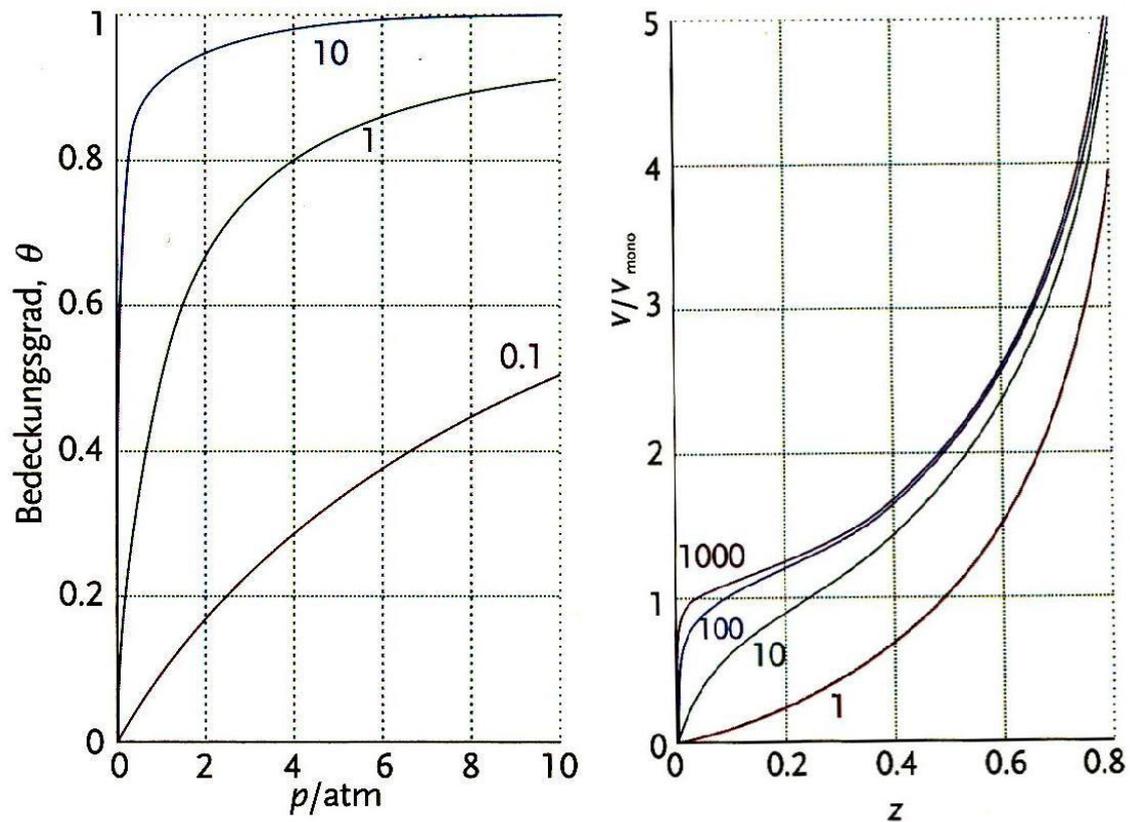


Abbildung 13: Rechts: Die Langmuir-Isotherme für verschiedene K -Werte; Links: Die BET-Isotherme für verschiedene c -Werte [Atk06].

Die Langmuir-Isotherme beschreiben die Adsorption der ersten Monolage, da die Kurve ein Plateau erreicht, wenn die Monolage komplett ist (Abbildung 13). Dem gegenüber steigen die BET-Isotherme unendlich an, da es keine Mengengrenze der adsorbierten Moleküle gibt. Jede neue Schicht könnte als Monolage auch durch die Langmuir-Isotherme beschrieben werden. Beide Isotherme beschreiben dem Adsorptionsprozess mithilfe der Van-der-Waals Wechselwirkungen und sind Näherungsmodelle, die aufgrund von Gasadsorptionsuntersuchungen basieren.

Weitere Probleme werden für die Fibronektinadsorption auf der Titanoberfläche berücksichtigt: Durch seine elektrophilen Seitenketten könnte Fibronektin sehr stark an die Hydroxyl-Gruppen der Titanoberfläche kovalent oder durch Wasserstoff-Brücken binden, sodass die Adsorptionsprozesse nicht mehr durch diese Adsorptionsisotherme beschrieben werden können. Aber durch sterische Hinderung zwischen der Titanoberfläche und dem Fibronektin könnte eine kovalente Bindung verhindert werden, sodass die Bindung zwischen einer kovalenten Bindung und einer Van-der-Waals Wechselwirkung liegen könnte.

2.5 Kontaktwinkelprinzip

Wenn ein Wassertropfen an einer Oberfläche aufgetragen wird, wird es sich in Abhängigkeit der Hydrophilität der Oberfläche mehr oder weniger ausdehnen. Dieses Phänomen ist eine Konsequenz der Oberflächenspannung des Wassertropfens. Der Winkel zwischen der Oberflächenebene und dem Tangens des Tropfens wird als Kontaktwinkel (θ) benannt (siehe Abbildung 14). Je hydrophiler die Oberfläche ist, desto geringer ist der Kontaktwinkel. Der Kontaktwinkel kann im Zusammenhang der Oberflächenspannung beschrieben werden [Atk06] oder auch, wie in dieser Arbeit, als Hilfsmittel benutzt werden, um die Hydrophilität von verschiedenen Oberflächen zu vergleichen.

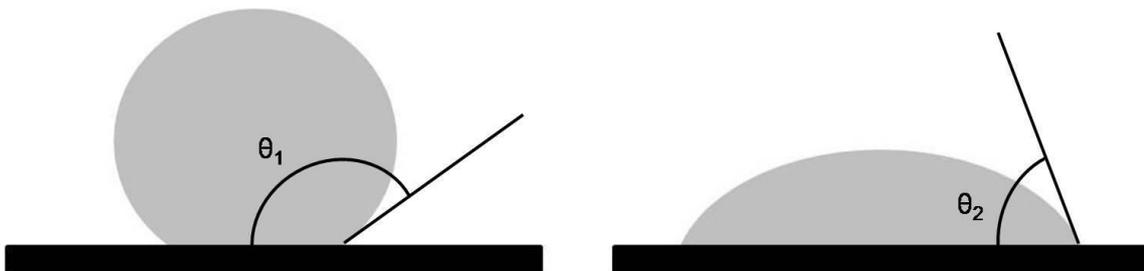


Abbildung 14: Kontaktwinkel einer relativen hydrophoben (θ_1) bzw. hydrophilen (θ_2) Oberfläche.

2.6 Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie

Oberflächenplasmonen-Resonanz-Spektroskopie (Auf Englisch „Surface Plasmon Resonance“ genannt; Abkürzung: SPR) ist eine optische Analyse­methode, die gegen Änderungen der dielektrischen Konstante eines Mediums empfindlich ist. Die Oberflächenplasmonen können als Elektronendichtewellen bezeichnet werden. Diese breiten sich entlang der Oberfläche eines delokalisierte Elektronen enthaltenden Materials aus (hauptsächlich Metalle). Sie können angeregt werden (Resonanz), wenn P-polarisiertes monochromatisches Licht mit einem bestimmten Winkel (Resonanzwinkel) die Grenzfläche eines Metalls und eines Dielektrikums trifft [Sch08]. Diese so genannte Oberflächenplasmonen-Resonanz ist ein Phänomen, das bei Winkeln grösser als der Totalreflexion erscheint. Die Resonanz tritt auf, wenn das P-polarisierte Licht unter bestimmten Bedingungen zu einer Anregung der Elektronendichte des delokalisierten Elektronengases führt. Dies verursacht eine angeregte Plasmonenwelle parallel zu der Grenzfläche und zu einem elektromagnetischen Feld, dessen Intensität in Abhängigkeit vom Abstand der Grenzfläche exponentiell stark abfällt (evaneszentes Feld).

Die SPR-Spektroskopie kann in der so genannte Kretschmann-Konfiguration durchgeführt werden [Sch08]. In dieser Konfiguration tritt der Lichtstrahl durch ein hoch brechendes Prisma, welches an der Unterseite mit einer ultra dünnen Metallschicht bedeckt ist (Abbildung 15). Von dieser Grenzschicht wird der Strahl reflektiert. Die Intensität des reflektierten Strahls wird mit Hilfe eines Detektors gemessen.

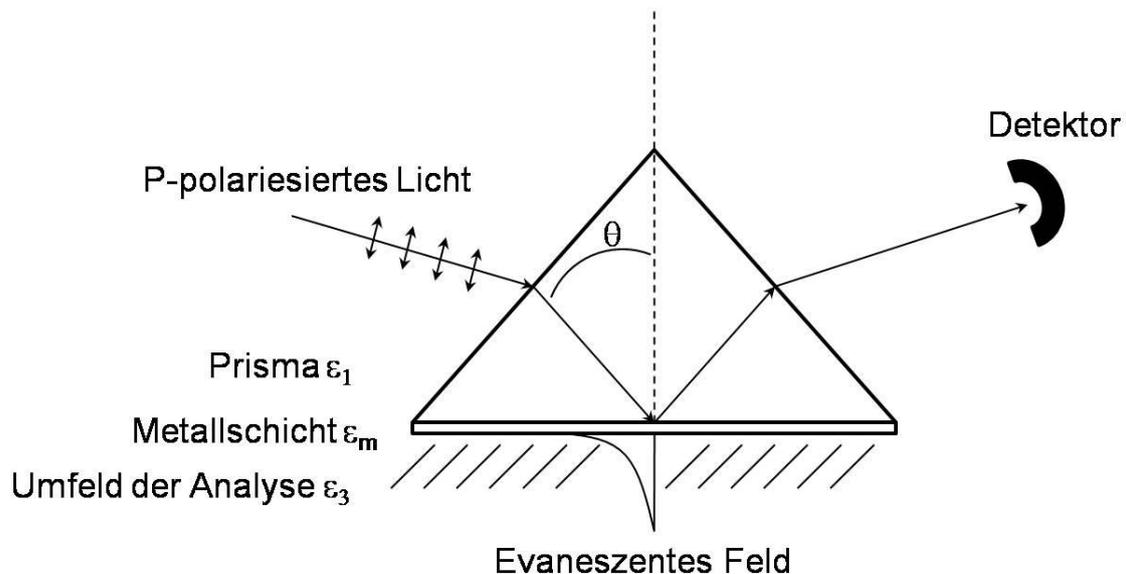


Abbildung 15: Kretschmann-Konfiguration eines SPR-Versuches; ϵ_1 , ϵ_m , und ϵ_2 sind die dielektrischen Konstanten des Prismas, Metallschichts bzw. Umfelds der Analyse.

Die wirksame Ausbreitung des evaneszenten Felds liegt im Bereich von wenigen hundert Nanometern (Abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Strahls). Die Resonanz zwischen dem einfallenden Licht und den Plasmonen ereignet sich, wenn die Energie des Lichts sowie sein Wellenvektor in der Grenzflächenebene die Energie und das Wellenvektor des Plasmons gleichen. Dies kann durch der Dispersionsrelation des einfallenden Lichts und des Plasmons erklärt werden. Die Dispersionsrelation ist der Zusammenhang zwischen der Energie einer Welle und ihrem Wellenvektor. Die Kreisfrequenz (ω) beschreibt die Energie einer Lichtwelle durch seiner Frequenz (ν):

$$\omega = 2\pi\nu$$

Gleichung 11

Die Abbildung 16 zeigt die Dispersionsrelationen des Lichts und der Plasmonen für die Kretschmann-Konfiguration. Die Anregung des Plasmon erfolgt, wenn die Dispersionsrelationskurve des Lichts diejenige des Plasmon schneidet.

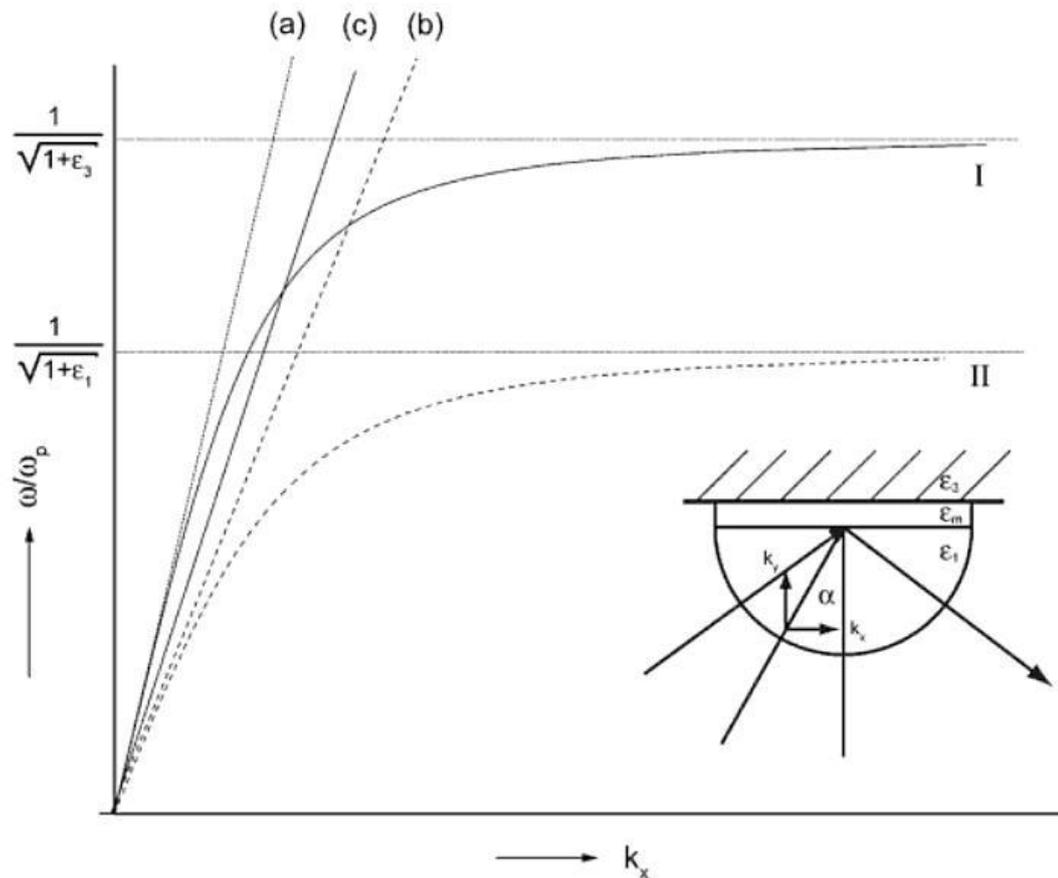


Abbildung 16: Dispersionsrelationen in der Kretschmann-Konfiguration: a für das Licht im Dielektrikum ϵ_1 , b in Dielektrikum ϵ_3 , I für den Plasmonen an der Grenze ϵ_3/ϵ_m , II an der Grenze ϵ_1/ϵ_m ; bei Veränderung des einfallenden Winkels α irgendeine Linie c zwischen den Linien a und b kann dargestellt werden; ω_p ist die Plasmafrequenz der Metallschicht (beschreibt die Energie den Plasmonen, wenn die Resonanz nicht angeregt wird) [Sch08].

Wenn die Plasmonen angeregt werden, wird die Intensität des reflektierten Lichts verkleinert und ein Minimum erzeugt, wenn es zur Resonanz bewirkt. Der Resonanzwinkel wird als der Winkel bezeichnet, welcher die kleinste Intensität des reflektierten Lichts aufweist. Eine Veränderung der dielektrischen Konstante an der Grenzfläche des Metalls verursacht eine Verschiebung der Dispersionsrelation und so des Resonanzwinkels (Abbildung 17).

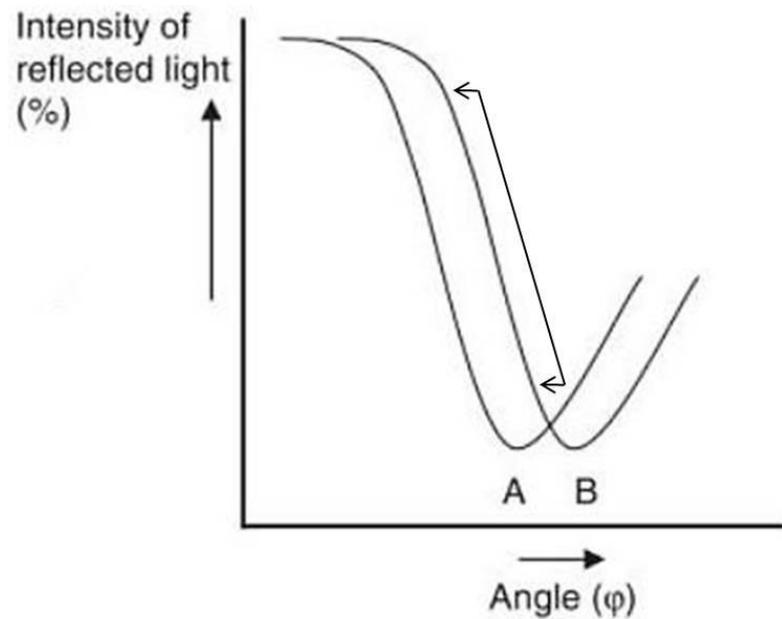


Abbildung 17: Verschiebung des Resonanzwinkels vor und nach einer Veränderung der dielektrischen Konstante an der Grenzfläche einer Metallschicht [Sch08].

In Flüssigkeit kann dies von einer Akkumulation von Material an der Oberfläche des Metalls herrühren. Durch diese Akkumulation ändert sich der Brechungsindex, der von der dielektrischen Konstante abhängt. Deshalb ist SPR-Spektroskopie sehr interessant, um Adsorptionsprozesse zu untersuchen. Der Resonanzwinkel verschiebt sich linear mit der Intensität (Bereich in Abbildung 17 bezeichnet) und mit dem Brechungsindex. Die Verschiebung des Resonanzwinkels ermöglicht es also, die Kinetik eines Adsorptionsprozesses durch direkte Messung der Verschiebung oder durch Veränderung der Lichtintensität bei konstantem einfallenden Winkel zu beobachten.

2.7 Beugungsgitter

Ein Beugungsgitter ist eine glatte Oberfläche, auf der sehr kleine parallele Striche mit einer Tiefe von wenigen Nanometern und einen Abstand zwischen zwei Strichen mit einer Größenordnung von einigen hundert Nanometern aufgebracht worden sind. Beugungsgitter werden oft als Monochromatoren benutzt, da sie die Fähigkeit besitzen polychromatisches Licht zu trennen. Wenn ein monochromatisches Licht das Beugungsgitter trifft, wird es wie von einem Spiegel reflektiert. Wegen der Vertiefungen des Beugungsgitters, legen nicht alle Strahlen des Lichts dieselbe Strecke zurück. Dadurch ergibt sich eine Phasenverschiebung zwischen den Strahlen und somit Interferenzen. Wenn die Interferenz konstruktiv ist, wird ein Beugungsstrahl zusätzlich zu dem reflektierten Strahl in einem anderen Winkel reflektiert. Konstruktive Interferenzen ereignen sich unter folgender Bedingung [Sko03]:

$$n\lambda = d(\sin(r) + \sin(i))$$

Gleichung 12

In der Gleichung 12 ist n die Beugungsordnung, λ die Wellenlänge, d der Abstand zwischen zwei Vertiefungen (Gitterabstand), r der Winkel des Beugungsstrahls und i der des einfallenden Strahls. Die Gleichung 12 erlaubt die Bestimmung des Beugungswinkels eines bekannten Beugungsgitters für einen gegebenen einfallenden Strahl und damit die Bestimmung des Gitterabstandes durch die Messung dieser zwei Winkel.

3 Experimentelles

3.1 Geräte, Proben und Chemikalien

3.1.1 AFM-Gerät

Controller:

- Innova NanoDrive.

Scanner:

- Innova INSC-090 „Large Area Scanner for the Innova Scanning Probe Microscope“, Scanbereich: 90X90 μm , Z-Bereich: 7.5 μm .

Spitze:

- „Tapping-Mode“: RTESPA-M (MPP-11120); Material: Phosphor dotiertes Silizium; Spezifikationen der Spitze: Höhe: 15-20 μm , Bogenradius: < 10 nm; Spezifikationen des Cantilevers: Länge: 125 \pm 10 nm, Federkonstante: (k) 20-80 Nm, Resonanzfrequenz: 300 \pm 100 kHz, Aluminiumüberzug: 40 \pm 10 nm.
- „Force-Modulation“: RFESPA-M (MPP-21100); Material: Phosphor dotiertes Silizium; Spezifikationen der Spitze: Höhe: 15-20 μm , Bogenradius: < 10 nm; Spezifikationen des Cantilevers: Länge: 225 \pm 10 nm, Federkonstante: (k) 3-6 Nm, Resonanzfrequenz: 75 \pm 25 kHz, Aluminiumüberzug: 40 \pm 10 nm (die Force-Modulation-Spitze wird zusätzlich zu der Tapping-Mode-Spitze eingesetzt).

Alle Teile des AFMs kommen von Veeco Instruments Inc.

3.1.2 AFM-Software

- SPMLab v7.0 von Veeco Instruments Inc.:
Scan der Oberfläche und Regelung
- SPMLabAnalysis v7.00 von Veeco Instruments Inc.:
Darstellung der 3D-Bilder, Messungen der Rauigkeit und der Partikel Dimensionen.
- WsXM 4.0 von Nanotec Electronica S.L.:
Darstellung der Höhen- und Phasenbilder

3.1.3 Kontaktwinkelgerät

Gerät:

- „Randwinkelmessgerät“ von Krüss GmbH; Model: DSA10.

Software:

- Drop Shape Analysis 1.51.

3.1.4 Laser

- „Helium-Neon Laser“ von JDS Uniphase; Model:1125P; Wellenlänge: 633nm;
Leistung: 10mW.

3.1.5 Proben

Gitterprobe:

- „AFM calibration grating“ von Veeco Instruments Inc. (Die Produktnummer ist nicht bekannt); X- und Y-Dimensionen des Musters: 10 μ m, Tiefe des Musters: 200nm (Die Genauigkeit ist nicht bekannt).

Goldprobe:

- LASFN9-Glasssubstrat mit ~1.5 nm Chromschichtdicke und ~50 nm Goldschichtdicke (Oberfläche) von dem Max Plank Institut für Polymerforschung in Mainz (MPIP-Mainz); Die Vorbereitungsmethode ist im Anhang 7.7 beschrieben.

Waferprobe:

- „Silizium Wafer“ von MPIP-Mainz (Eigenschaften sind nicht bekannt).

Titanprobe:

- Wafersubstrat mit ~7 nm Titanoxidschichtdicke (Oberfläche) von MPIP-Mainz; die Vorbereitungsmethode ist im Anhang 7.7 beschrieben.

Beugungsgitter:

- Glasssubstrat mit einem erwarteten Abstand von 600 nm zwischen zwei Vertiefungen; das Beugungsgitter ist von Herrn Prof. Dr. Michael Veith der Fachhochschule Gelsenkirchen zur Verfügung gestellt worden.

3.1.6 Chemikalien

Fibronektin:

- Roche 1051407; Rein Fibronektin; Molemasse : 440.000 g/mol .

PBS:

- Sigma-Aldrich P4417-50TAB; „Phosphate Buffered Saline“-Tabletten; eine Tablette in 200ml destilliertem Wasser entspricht 0,01M Phosphatpuffer, 0,0027 M Kaliumchlorid und 0,137 M Natriumchlorid.

Gold-Kolloid-Lösung:

- Sigma-Aldrich G1652; Goldpartikelsuspension, Durchmesser 20 ± 3 nm; Konzentration: ~1 a.u./ml (520 nm); Zusammensetzung: ~0,01 % HauCl_4 , <0,01% Gerbsäure, <0,04 % Natriumzitat.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Durchführung

4.1.1 Einstellung der Resonanzfrequenz

Der Cantilever wird so nah wie möglich der Oberfläche angenähert aber nicht auf die Oberfläche aufgesetzt. Die Einstellung der Resonanzfrequenz ist zweistufig und wie im Abschnitt 11.4.2 des Software-Handbuchs [Vee08] beschrieben durchgeführt worden. Die zwei Schritte können automatisch oder Manual durchgeführt werden. Der Erste besteht darin, dass man ein Scan von der Schwingungsamplitude und der Schwingungsfrequenz des Cantilevers ausführt. Der zweite Schritt besteht darin, den Setpoint einzustellen, welcher in der Software als 60% der maximalen Amplitude der Schwingung festgelegt worden ist. Die benutzten Parameter der automatischen Einstellung der Resonanzfrequenz sind im Anhang 7.6 beschrieben.

4.1.2 Kontaktwinkelmessung

Ein 50 μl Tropfen destilliertes Wasser wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze auf der Oberfläche aufgetragen. Die Software misst den Winkel auf beiden Seiten des Tropfens mit Hilfe einer Kamera und berechnet den Mittelwert.

4.1.3 Analyse der Oberfläche

Die qualitative Analyse der Oberflächen wird durch den Vergleich der verschiedenen Topografiebilder und Phasenbilder durchgeführt. Zu diesem Zweck werden für jede Oberfläche zwei Scanbereiche gewählt: Ein von 20 μm und einen von 1 μm . Der 20 μm Scan wird benutzt, um die Oberfläche grob zu beschreiben. Diese Beschreibung hat die Frage zum Ziel, ob das gemessene Bild repräsentativ zur Bestimmung der ganzen Oberfläche der Probe ist. Mithilfe der 20 μm Bilder werden die Topografie, das Muster und die Homogenität der Oberfläche beschrieben. Aus den 20 μm Bildern werden Bereiche von 1 μm ausgewählt und gemessen. Mit Hilfe der 1 μm Bilder werden die Besonderheiten der Oberfläche beschrieben.

Aus der Oberfläche werden fünf Bereiche von 1 μm und fünf von 20 μm nach der Abbildung 18 ausgewählt und gemessen. Diese Stellen wurden gewählt, da sie im Zentrum des Scanbereiches des Scanners liegen.

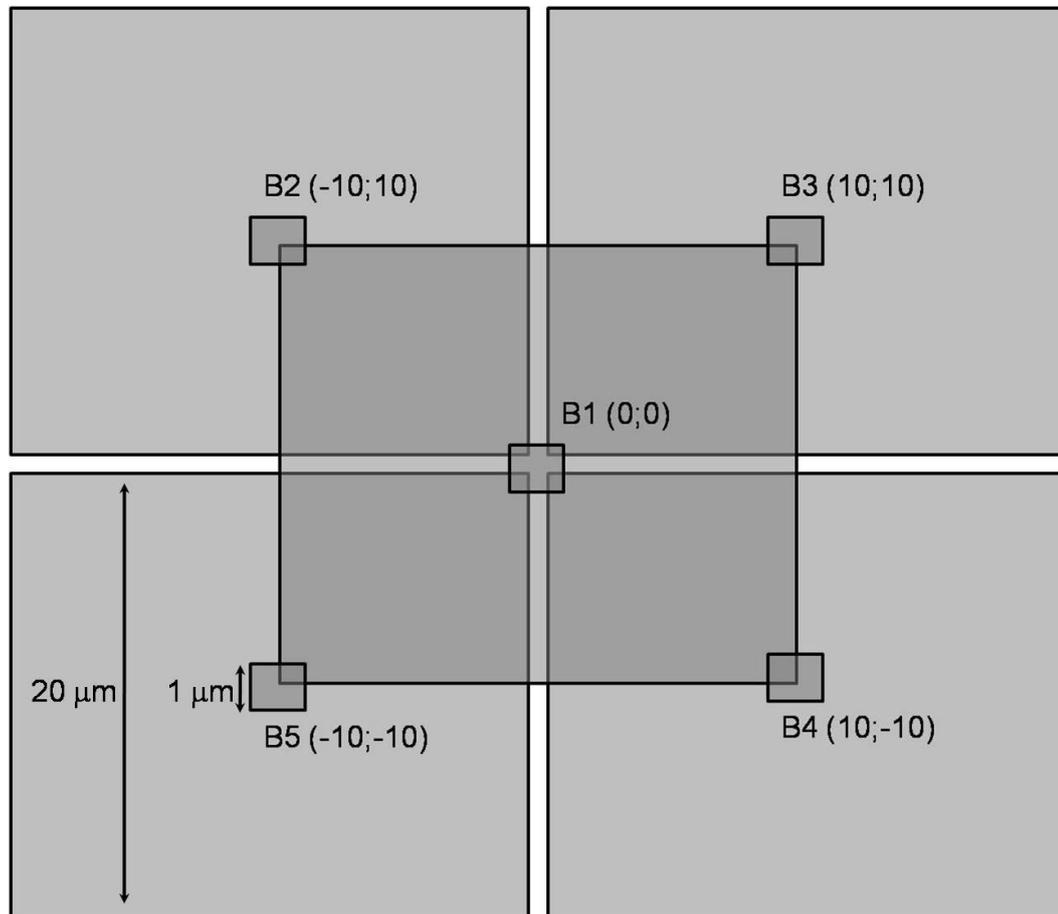


Abbildung 18 : Schematische Zeichnung der gemessenen Bereiche (B1-B5) von 1 und 20 μm ; Im Klammern: (X-Offset; Y-Offset).

Die Gesamtfläche der gemessenen Oberfläche erreicht also $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ und die 1 μm Bereiche liegen im Zentrum des 20 μm Bereiches. Es ist anzumerken, dass für den 20 μm Bereiche jedes Viertel des B1 Bereiches mit einem Viertel der vier anderen Bereiche überlappt, sodass der B1 Bereich doppelt bestimmt wird. Für jeden Bereich werden die Rauigkeiten, der Z-Range und die F/PF-Verhältnisse berechnet.

4.1.4 Adsorptionsversuch

Die Adsorption von Fibronectin wird durch den Vergleich der Titanoberflächen ohne und mit adsorbiertem Fibronectin analysiert. Die Werte der Rauigkeit und die Bilder beider Oberflächen werden verglichen. Die Inkubation von Fibronectin erfolgt über unterschiedliche Zeiträume. Die Fibronectinlösung in PBS wird im destillierten Wasser verdünnt, um die Kristallisation der PBS-Puffersalze während des Trocknens der Probe zu verhindern. Inkubationszeiten von 30, 60, 120 und 180 Minuten waren unter Berücksichtigung der Ergebnisse von *Lehnert et al* [Leh09] gewählt worden (Abbildung 19). Durch diese Zeiten sollten zusätzlich Rückschlüsse über die verschiedenen Adsorptionsphasen erhalten werden.

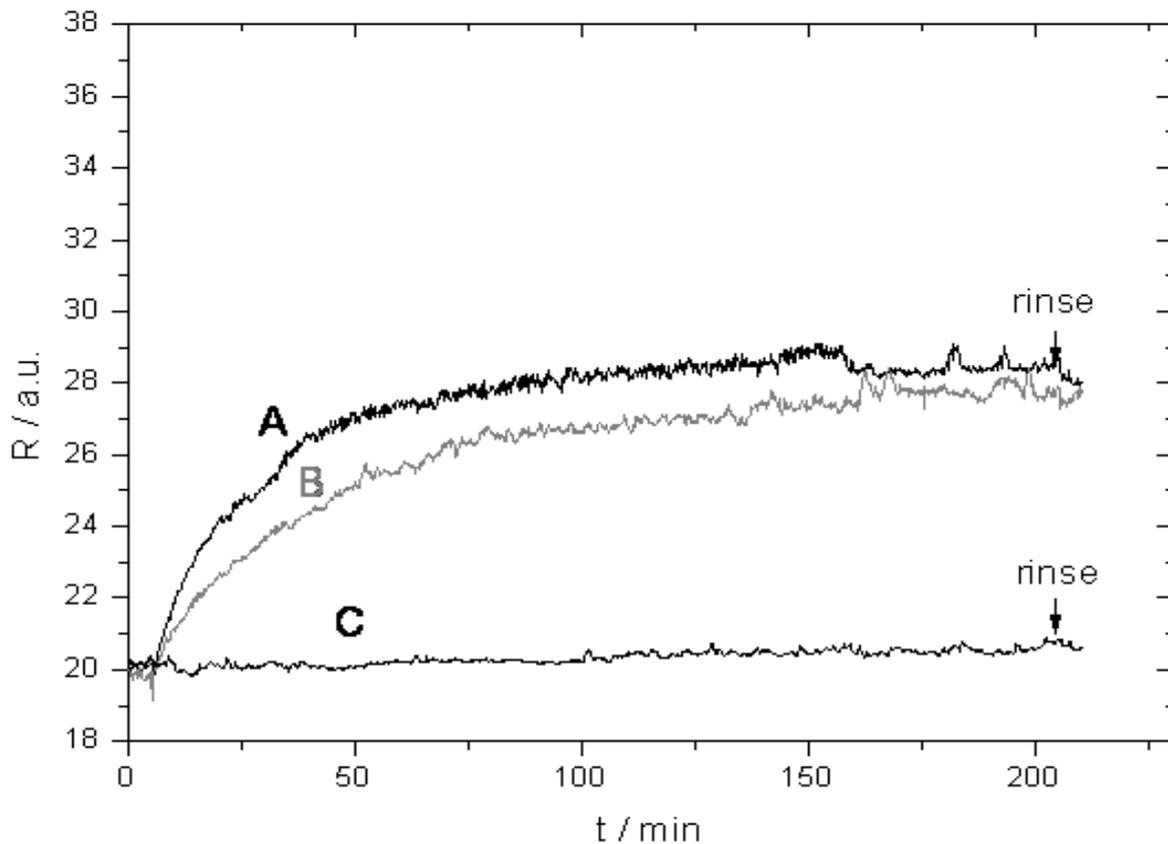


Abbildung 19: Unspezifische Fibronectinadsorption auf unterschiedlichen modifizierten Titanoberflächen; A = Adsorption auf einer Amino-modifizierten TiO_2 -Oberfläche; B = Adsorption auf einer TiO_2 -Oberfläche; C = Adsorption auf einer Streptavidin-Monolage, die an einer Amino-modifizierten biotinilierten TiO_2 -Oberfläche gebunden ist; Y-Achse: Reflektiertes Licht (a.u.=absorbance units in Prozent); X-Achse: Inkubationszeit (Minuten) [Leh09].

Die Abbildung 19 zeigt die SPR-Untersuchung der Adsorptionskinetik vom Fibronektin auf einer reinen Titanoberfläche (Kurve B). Die Intensitätsveränderung des reflektierten Lichts wurde gegen die Inkubationszeit gemessen. Die Intensität verändert sich in Abhängigkeit der Resonanzwinkelverschiebung des Plasmonenspektrums und ist somit linear zum Schichtdickenzuwachs. Die Adsorptionskurve steigt stark bis 60 Minuten an und erreicht ein Plateau nach circa 120 Minuten. Dies bedeutet, dass eine komplette Fibronektinschicht ausgebildet ist. Man sieht auch, dass das Spülen der Messzelle keinen Sprung der Intensität verursacht. Hieraus folgt, dass das Fibronektin fest gebunden ist. Man muss berücksichtigen, dass die Konzentration des Fibronektins in dieser Arbeit ca. 20 nM beträgt (anstatt 30 nM für die SPR-Untersuchung).

Die Fibronektinadsorption wird wie folgt durchgeführt: Eine Titanprobe wird in N₂-Luftstrom von Staub befreit. Die in Wasser vorbereitete Fibronektinlösung besitzt eine Konzentration von ~20 nM. Ein Tropfen von 1 ml dieser Lösung wird auf die Probenoberfläche aufgetragen (Kontaktfläche des Tropfens mit der Oberfläche: ca. 2 cm²) und für verschiedene Zeiträume inkubiert gelassen. Anschließend wird die Probe mit destilliertem Wasser gespült und für 8 Stunden getrocknet und im Exsikkator gelagert.

Die folgenden AFM-Ergebnisse beruhen auf vielen Messungen, die hier nicht vollständig dargelegt werden können. Wenn z.B. fünf Bereiche einer Oberfläche gemessen wurden, wird in dieser Arbeit nur ein repräsentatives Beispiel dieser fünf Messungen vorgestellt. Nur falls die gemessenen Bereiche sehr unterschiedlich waren, wird mehr als ein einziges Bild vorgestellt. Die folgenden quantitativen Werte sind immer auf der Basis aller Messungen berechnet und die Rohdaten der berechneten Werte befinden sich im Anhang. Die folgenden Anmerkungen sind für das Verständnis der Ergebnisse wichtig:

Alle Proben sind vor der AFM-Messung im Vakuumtrockenschrank (Druck <100 mbar) über Nacht und bei Raumtemperatur getrocknet; Bei Betrachtung der 3D-Bilder muss berücksichtigt werden, dass die Wertigkeiten der Skalierung der Z-Achse (nm) und die der X- und Y-Achsen (μm) unterschiedlich sind. Das Verhältnis der Skalierung ist trotzdem immer gleich für jedes 3D-Bild, damit sie direkt miteinander vergleichbar sind; Die Höhenbilder sind mit Schatten dargestellt, damit sie schärfer aussehen; Die AFM-Messungen der Gitterprobe, der Goldprobe und der Gold-Kolloid-Probe werden mithilfe der Tapping-Mode-Spitzen durchgeführt und alle anderen AFM-Messungen sind mithilfe der Force-Modulation-Spitzen durchgeführt worden; Die Scangeschwindigkeiten sind in Mikrometer pro Sekunde angegeben, da sie ohne Berücksichtigung der Scanfrequenz (f in Hz) und des Scanbereiches (B in μm) miteinander verglichen werden können. Die Scangeschwindigkeit (v in $\mu\text{m/s}$) kann wie folgt ausgerechnet werden: $f \cdot 2 \cdot B = v$. Der Faktor 2 wird hinzugefügt, da ein Scan der Rückwärts- und Vorwärtsverlauf der Spitze entspricht; Die quantitativen Ergebnisse sind wie folgt wiedergegeben worden: Zunächst Mittelwert und Einheit. Anschließend (in Klammern) die Standardabweichung, ihre Einheit und die Anzahl der Messungen; Die Analyse, der Gold Oberfläche wurde, am Anfang der Arbeit durchgeführt und benutzt, um den Einfluss der Einstellungen von den verschiedenen Parametern zu untersuchen. Bereiche von vier verschiedenen Größen ohne Berücksichtigung des Schemas der Oberflächenanalyse (siehe Abschnitt 4.1.3) werden gemessen. Deshalb werden die Ergebnisse der Charakterisierung der Goldoberfläche anders dargestellt.

4.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung des AFMs wird in drei Schritten durchgeführt. Als Erstes wird der Scanner in den drei Achsen mit der Gitter-Probe kalibriert. Danach wird die Kalibrierung durch eine Gold-Kolloid-Probe überprüft. Dafür müssen die Dimensionen der adsorbierten Goldpartikel gemessen werden und mit den vorgegebenen Dimensionen des Herstellers verglichen werden. Eine zweite Überprüfung wird mithilfe eines Beugungsgitters durchgeführt. Der Abstand zwischen zwei Strichen des Beugungsgitters wird mittels AFM gemessen und zusätzlich mit einem Laseraufbau bestimmt.

4.2.1 Ergebnisse der Kalibrierung mit der Gitter-Probe

Ein Bereich von circa 20 μm der Gitter-Probe wurde im Tapping-Mode an der Luft gemessen. Nach dem Scan wurde der Scanner in der X-Richtung und Y-Richtung eingestellt, gemäß der beschriebene Vorgehensweise (siehe Abschnitt 14.4 des Software-Handbuchs [Vee08]) unter Beachtung der folgenden Bedingungen: Das Muster der Gitter-Probe muss, soweit das möglich ist, parallel zu der Richtung des Scans befestigt sein; für jede Achse wurde ein Abstand von 10 μm , parallel zur Achse, gemessen und eingestellt; Die Abstände wurden im Phasenbild gemessen. Der Scan wurde mit der 1D-Bow-Removal-Korrektur durchgeführt. Nach der Kalibrierung wurde nochmals ein Scan von 20 μm gemessen (Abbildung 20) und die X-Länge und Y-Länge zwischen zwei Löchern der Oberfläche wurde zehn Mal mit Hilfe des Vorwärts-Signals gemessen. Der Mittelwert jeder Achsenlänge wurde ausgerechnet.

Die Abbildung 20 zeigt das Gitter mit den gemessenen X- (horizontaler Pfeil) und Y-Längen (vertikaler Pfeil) des Musters. Der Mittelwert der X-Längen betrug $10,027 \mu\text{m}$ ($\pm 0,027 \mu\text{m}$, $n=10$) und der der Y-Längen $9,997 \mu\text{m}$ ($\pm 0,016 \mu\text{m}$, $n=10$).

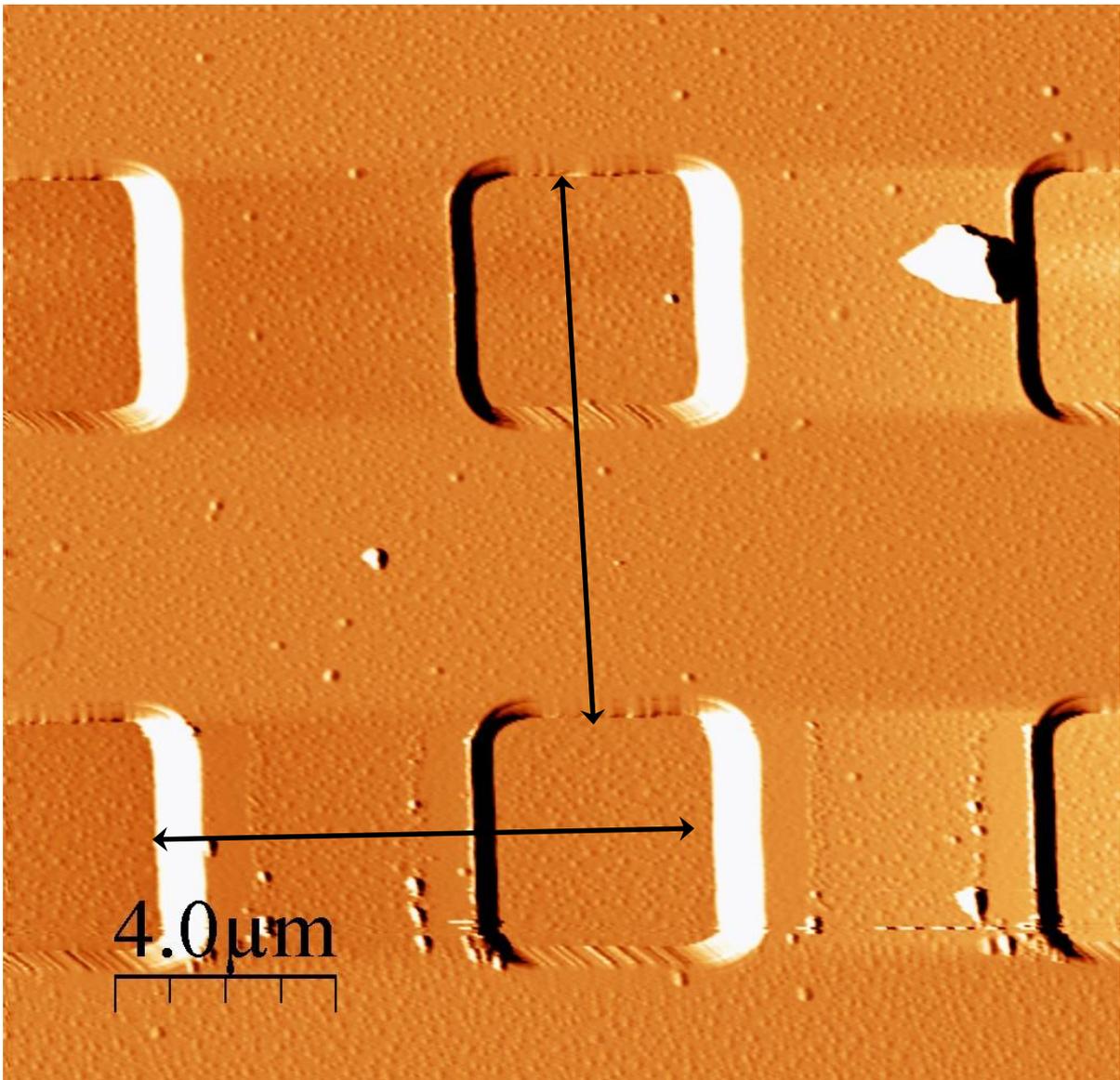


Abbildung 20: Gitterprobenoberfläche nach der Kalibrierung; Scanbereich: $20 \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $10 \mu\text{m/s}$; Auflösung: 512×512 Pixel; Regelung: $P=9$ $I=0,9$ $D=0,1$; die Länge des horizontalen Pfeils beträgt $10,027 \mu\text{m}$ ($\pm 0,027 \mu\text{m}$, $n=10$) und die des vertikalen Pfeils $9,997 \mu\text{m}$ ($\pm 0,016 \mu\text{m}$, $n=10$).

Nach diesem Scan wurde der Scanner in Z-Richtung auf Basis der Referenzhöhe des Gitters (200 nm) kalibriert, gemäß der beschriebenen Vorgehensweise (siehe Abschnitt 14.5 des Software-Handbuchs [Vee08]) unter Beachtung der folgenden Bedingungen: Der Line-Scan wurde mit den Parametern, die im Anhang 7.1 beschrieben sind, durchgeführt. Der Line-Scan muss mindestens durch drei Löcher des Musters gehen, damit man vier Mal die Höhe messen kann.

Nach der Kalibrierung der Z-Achse wurde nochmals ein Line-Scan durchgeführt. Die Höhe des Musters wurde vier Mal mithilfe des Vorwärts-Signals und vier Mal durch das Rückwärts-Signals gemessen. Der Mittelwert dieser acht Messungen wurde ausgerechnet. Die mittlere Höhe zwischen dem Boden und der Kante eines Loches betrug 199 nm (± 4 nm, $n=8$).

4.2.2 Bestimmung der Kalibrierung mit der Gold-Kolloid-Probe

Die Bestimmung der Kalibrierung wird nach der Beschreibung von *Derose et al* [Der99] durchgeführt. Eine Waferprobe wurde mit Ethanol gespült, danach wird ein Tropfen von 0,1 ml der Gold-Kolloid-Lösung ($C \sim 1$ a.u./ml (520 nm)) auf der Oberfläche der Probe aufgetragen. Nach einer Stunde wurde die Probe mit Ethanol und mit destilliertem Wasser gespült. Die Trocknung erfolgte einige Stunden im Vakuumtrockenschrank und kam anschließend zur weiteren Lagerung in einem mit Kieselgel befüllten Exsikkator.

Die Visualisierung der Gold-Kolloid-Probe (Abbildung 21) zeigt, Agglomerate mit unterschiedlichen Größen auf der Waferoberfläche.

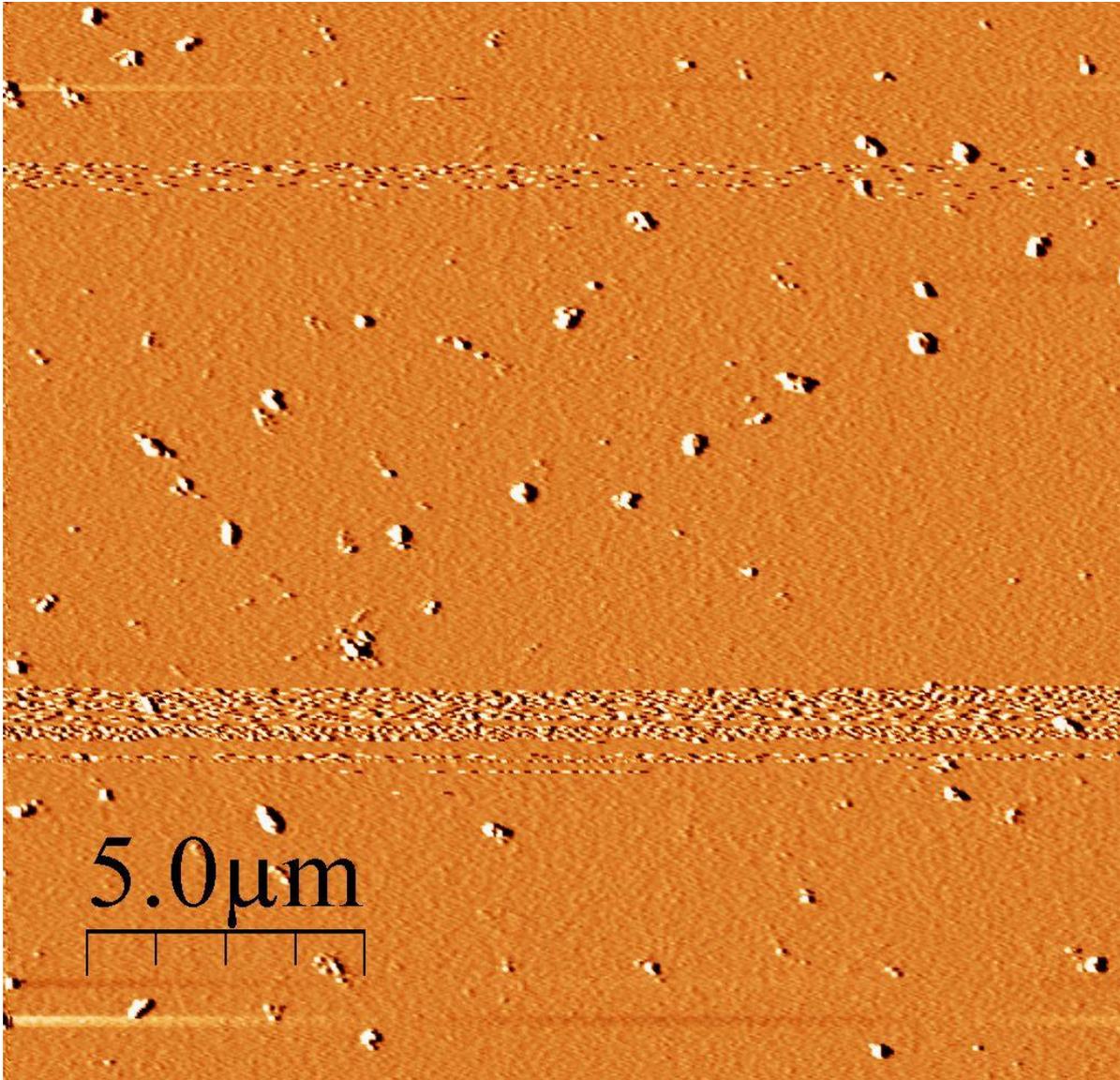


Abbildung 21 : Gold-Kolloid-Probe; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 10 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=9, I=1, D=2; Die horizontale Striche sind Artefakte, die von einer zu starken Regelung kommen; Höhenbild.

Man sieht deutlich in Abbildung 21, dass einige Agglomerate aus kleineren Partikeln bestehen. Die Agglomerate haben ein Durchmesser zwischen 100 und 300 nm und eine Höhe von circa 10 nm.

Ein Scan eines $0,35\ \mu\text{m}$ Bereiches (Abbildung 22) zeigt, dass die Partikel unterschiedlicher Größe auf der Oberfläche zu sehen sind.

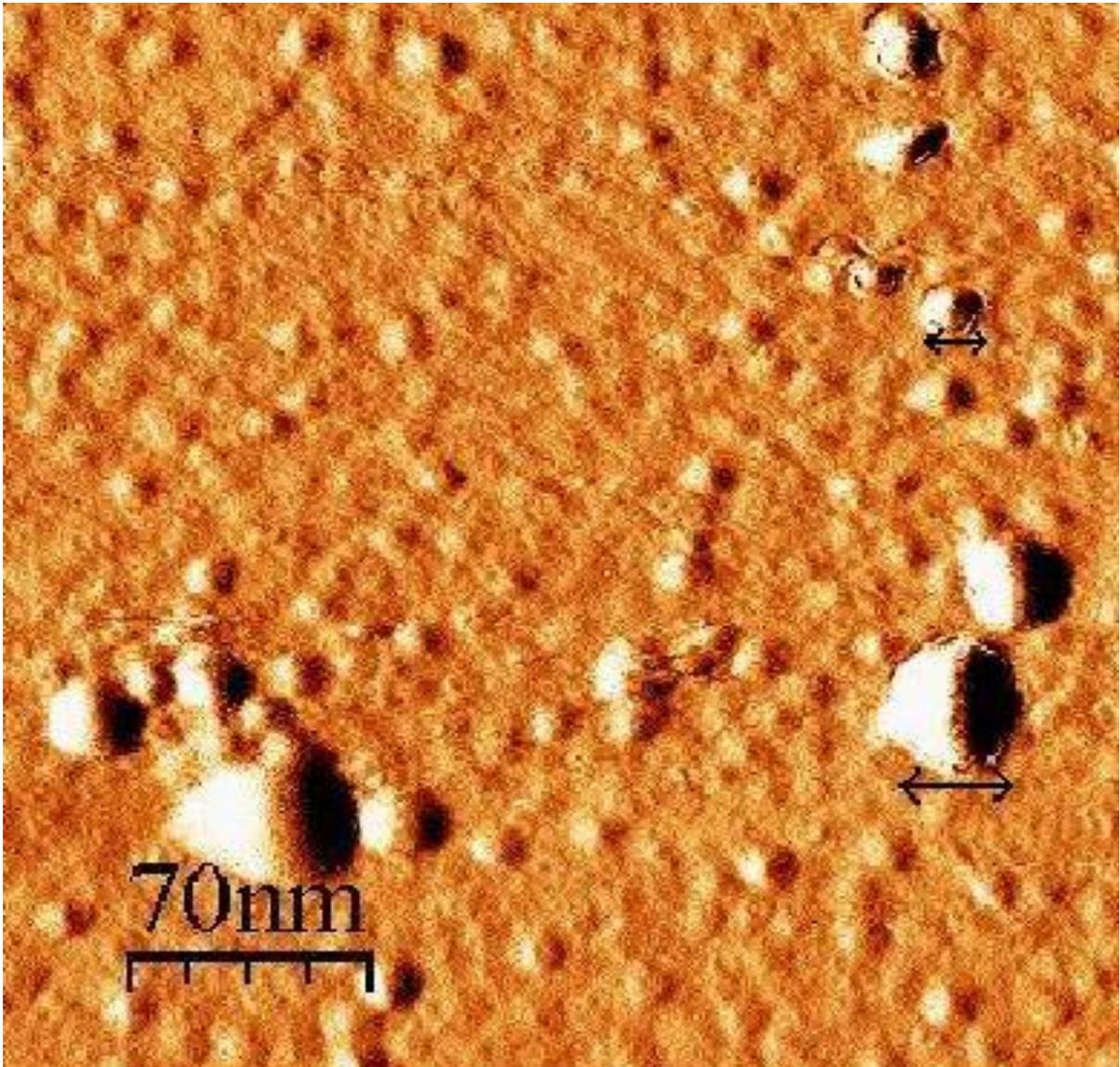


Abbildung 22: Gold-Kolloid-Probe mit adsorbierten Goldpartikeln von verschiedenen Dimensionen; Scanbereich: $0,35\ \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $7\ \mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024×1024 Pixel; Regelung: $P=5$, $I=0,8$, $D=1$; Höhenbild.

Der Durchmesser der Partikel in Abbildung 22 liegt zwischen $15\ \text{nm}$ (Pfeil oben) und $30\ \text{nm}$ (Pfeil unten) und die Höhe zwischen $2\ \text{nm}$ und $5\ \text{nm}$. Weitere Messungen von verschiedenen Stellen auf der Oberfläche entsprechen dem oben dargestellten Beispiel. Viele Partikel, deren Breite in einer Größenordnung von $20\ \text{Nanometern}$ lagen und deren Dimensionen sehr unterschiedlich von einem Partikel zur anderen

waren, konnten dargestellt werden. Es war nicht möglich zu bestimmen, ob die größeren Partikel aus Agglomeraten von kleineren Partikeln bestanden.

Nach Herstellerangaben sollen die Gold-Partikel ein Durchmesser von 20 ± 3 nm besitzen. Die oben genannten Partikeldimensionen entsprechen nicht völlig diesen Charakteristiken. Die Gold-Partikel sollten in etwa kugelförmig sein, d.h. ihre Breiten sollten also ihren Höhen entsprechen. Die gemessenen Gold-Partikel besaßen immer eine grössere Breite als Höhe (4 bis 6 Mal grösser). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Kalibrierung des Scanners entweder in der X-Y-Richtung oder in der Z-Richtung einen Fehler hat. Dies könnte den Fehler in dem Breite-Höhe-Verhältnis der Goldpartikel verursachen. Ein Fehler dieser Art kann auch allerdings durch die Convolution der Spitze und der Goldpartikel kommen.

4.2.3 Bestimmung der Kalibrierung mit dem Beugungsgitter

Der Abstand zwischen zwei Vertiefungen des Beugungsgitters kann man unter zuhilfenahme der Gleichung 13, welche aus Gleichung 12 hervorgeht, berechnet werden. Hierzu wurde ein experimenteller Aufbau, wie in der Abbildung 23 dargestellt, benutzt.

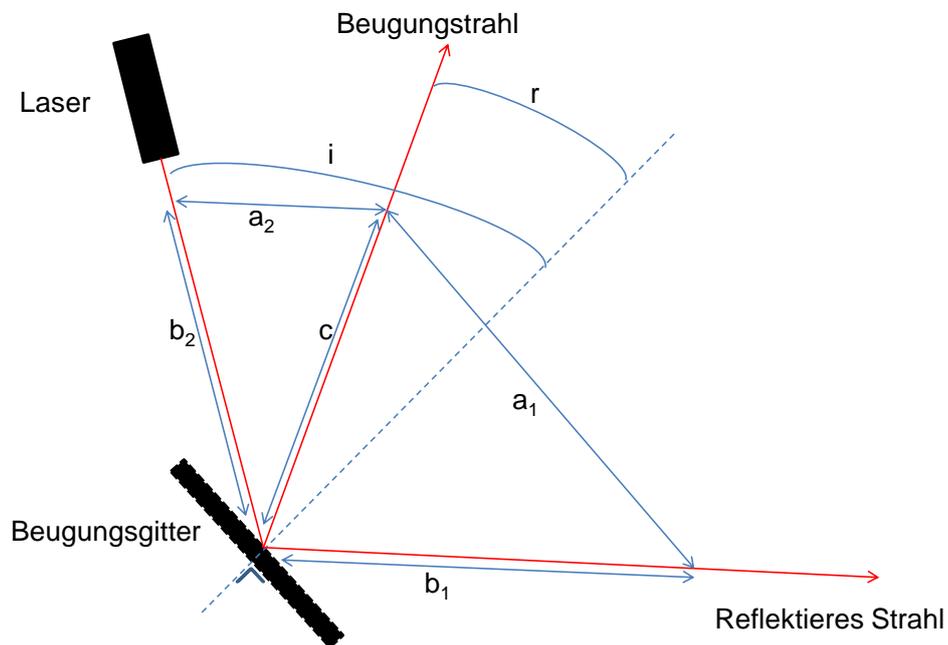


Abbildung 23 : Schematische Zeichnung des Aufbaus zur Bestimmung des Gitterabstands; i ist der einfallende Winkel, r ist der Beugungswinkel, a_1 - c sind die gemessene Längen.

$$d = \frac{n\lambda}{\sin \left(\frac{a \cos \left(\frac{a_1^2 - c^2 - b_1^2}{-2b_1c} \right) - a \cos \left(\frac{a_2^2 - c^2 - b_2^2}{-2b_2c} \right)}{2} \right) + \sin \left(a \cos \left(\frac{a_1^2 - c^2 - b_1^2}{-2b_1c} \right) - \frac{a \cos \left(\frac{a_1^2 - c^2 - b_1^2}{-2b_1c} \right) - a \cos \left(\frac{a_2^2 - c^2 - b_2^2}{-2b_2c} \right)}{2} \right)}$$

Gleichung 13

Der Gitterabstand (d) wird durch die Messung der Längen (a_1 , a_2 , b_1 , b_2 und c) des Aufbaus und die Gleichung 13 berechnet. Die Bestimmung des Gitterabstands mit Hilfe des Lasersaufbaus ergibt folgende Ergebnisse:

Tabelle 1 : Ergebnisse der Bestimmung des Gitterabstands des Beugungsgitter.

Gemessene Längen [cm]		Kalkulierte Abweichung der Längen [cm]
a_1	171	± 0,25
b_1	207,5	
a_2	67,5	
b_2	26,5	
c	93,5	

d [nm]	d_{\max} [nm]	d_{\min} [nm]
696	732	660

Die gemessenen Längen, die der Abbildung 23 entsprechen, sind mit einem Zollstock gemessen worden. Der Fehler einer Längenmessung war also mit 0,5 cm festgelegt worden. Der Gitterabstand (d) ist durch die Gleichung 13 ohne Berücksichtigung des festgelegten Messfehlers berechnet worden. Um den d_{\max} und d_{\min} Wert zu bestimmen, wurde der jeweilige Max-Wert bzw. Min-Wert eingesetzt. Die Differenz zwischen d_{\max} und d_{\min} entspricht also dem maximalen Bereich, in dem der Sollwert enthalten ist.

Die Visualisierung des Beugungsgitters mittels AFM (Abbildung 24) zeigt deutlich die Strichform. Die Vertiefungen scheinen nicht sehr gleichförmig und der Gitterabstand ist nicht konstant.

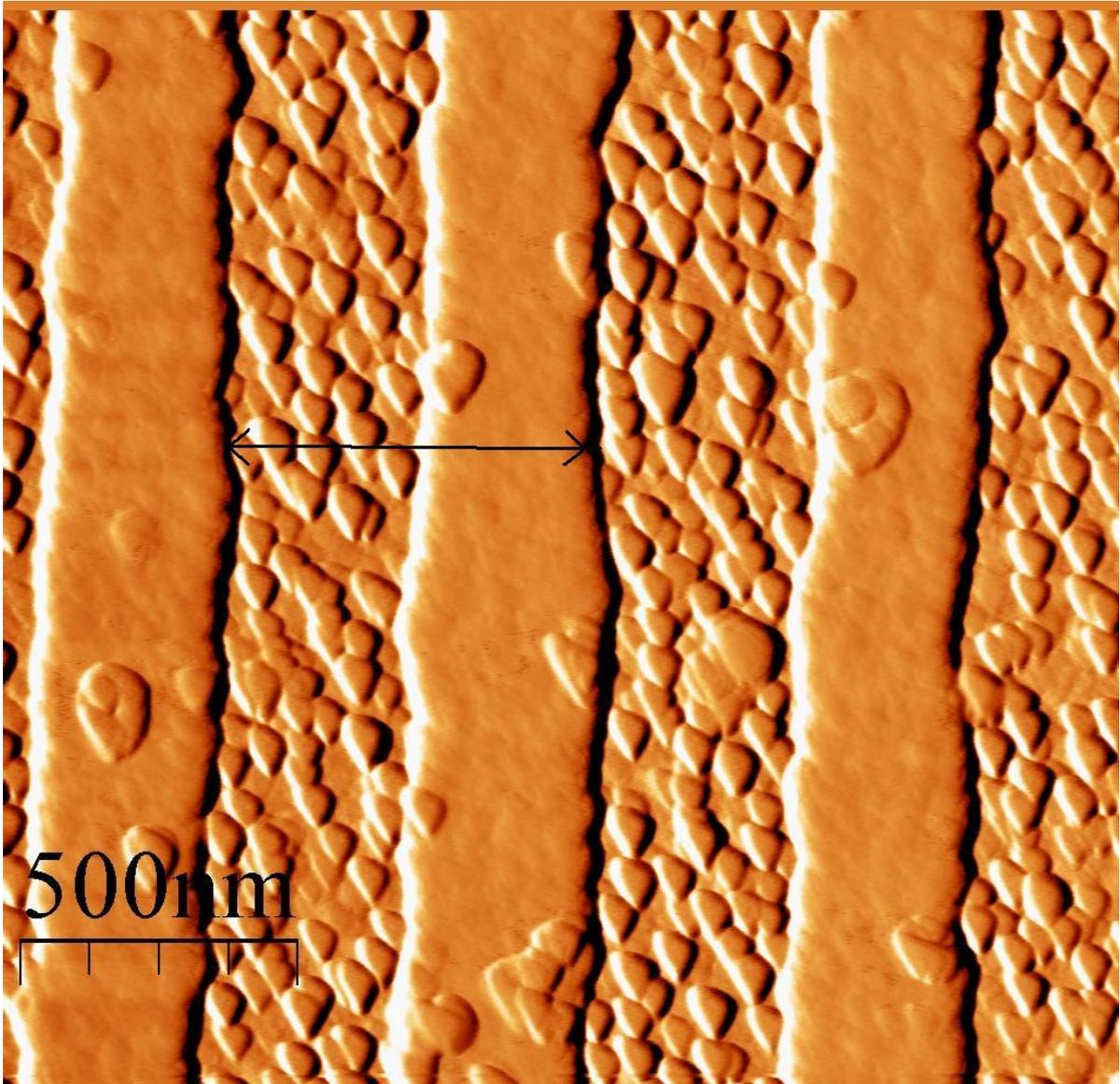


Abbildung 24 : Beugungsgitter mit drei Vertiefungen; Scanbereich: 2 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; der Gitterabstand (Pfeil) ist 687 nm (\pm 16 nm, n=18); Höhenbild.

Der mittels AFM gemessene Mittelwert des Gitterabstandes betrug 687 nm (\pm 16 nm, n=18). Dieses Ergebnis ist auf Basis von drei verschiedenen 2 μm Bereichen berechnet worden. Die Rohdaten sind im Anhang 7.5 beschrieben.

Die Ergebnisse der AFM-Messungen liegen im Bereich der Referenzmessungen, die mit dem Laseraufbau bestimmt wurden. Die Genauigkeit der Aufbaubestimmung ist trotzdem nicht groß genug, um die Genauigkeit des Scanners in X-Y-Richtung zu bestimmen. Der Gold-Kolloid-Versuch erlaubt nicht die Partikeldimensionen mit denen des Herstellers zu vergleichen, sodass die Genauigkeit des Scanners nicht unmittelbar in Z-Richtung bestimmt werden kann. Die Genauigkeit der in dieser Arbeit wiedergegeben Partikeldimensionen kann also nicht beurteilt werden. Durch die Kalibrierung mithilfe der Gitterprobe, Beugungsgitter und der Gold-Kolloid-Probe kann jedoch gesagt werden, dass der Scanner in den Größenordnungen von Mikrometern und Nanometern sich linear in den drei Achsen bewegt.

4.3 Charakterisierung der Goldoberfläche

Es sind vier Bereiche von verschiedenen Größen der Goldoberfläche gemessen worden, die Rauigkeit jedes Scanbereiches und die entsprechende Scangeschwindigkeit sind in der Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Rauigkeit und Z-Range jedes Scanbereiches der Goldoberfläche.

Scanbereich	[μm]	RMS	Z-range	Scangeschwindigkeit	Scanfrequenz
		[nm]	[nm]	[$\mu\text{m/s}$]	[Hz]
1		1,5	19,6	1,0	0,5
2,5		1,5	31,5	2,5	0,5
5		1,4	24,8	5,0	0,5
20		1,6	46,3	10,0	0,25
Mittelwert=		1,5			
Standardabweichung=		0,1			

Der RMS der Goldoberfläche liegt bei 1,5 nm (± 1 nm; $n=4$) und der des Z-Ranges bei ~ 46 nm. Jeder Bereich wurde nur einmal gemessen und der Mittelwert wurde aus den RMS jedes Scanbereiches ausgerechnet. Der bedeutsamste Z-Range der gesamten Oberfläche ist der im 20 μm Bereich. Die Scangeschwindigkeit der Goldoberflächenmessungen ändert sich zwischen 1 $\mu\text{m/s}$ für den 1 μm Scanbereich und 10 $\mu\text{m/s}$ für den von 20 μm . Trotz dieser Differenz sieht man in der Tabelle 2, dass sich der RMS nicht in Abhängigkeit der Scangeschwindigkeit oder Größe des Scanbereiches ändert.

Wie man in Abbildung 25 sieht, ist die Goldoberfläche sehr inhomogen, und besitzt viele Löcher und einige Furchen.

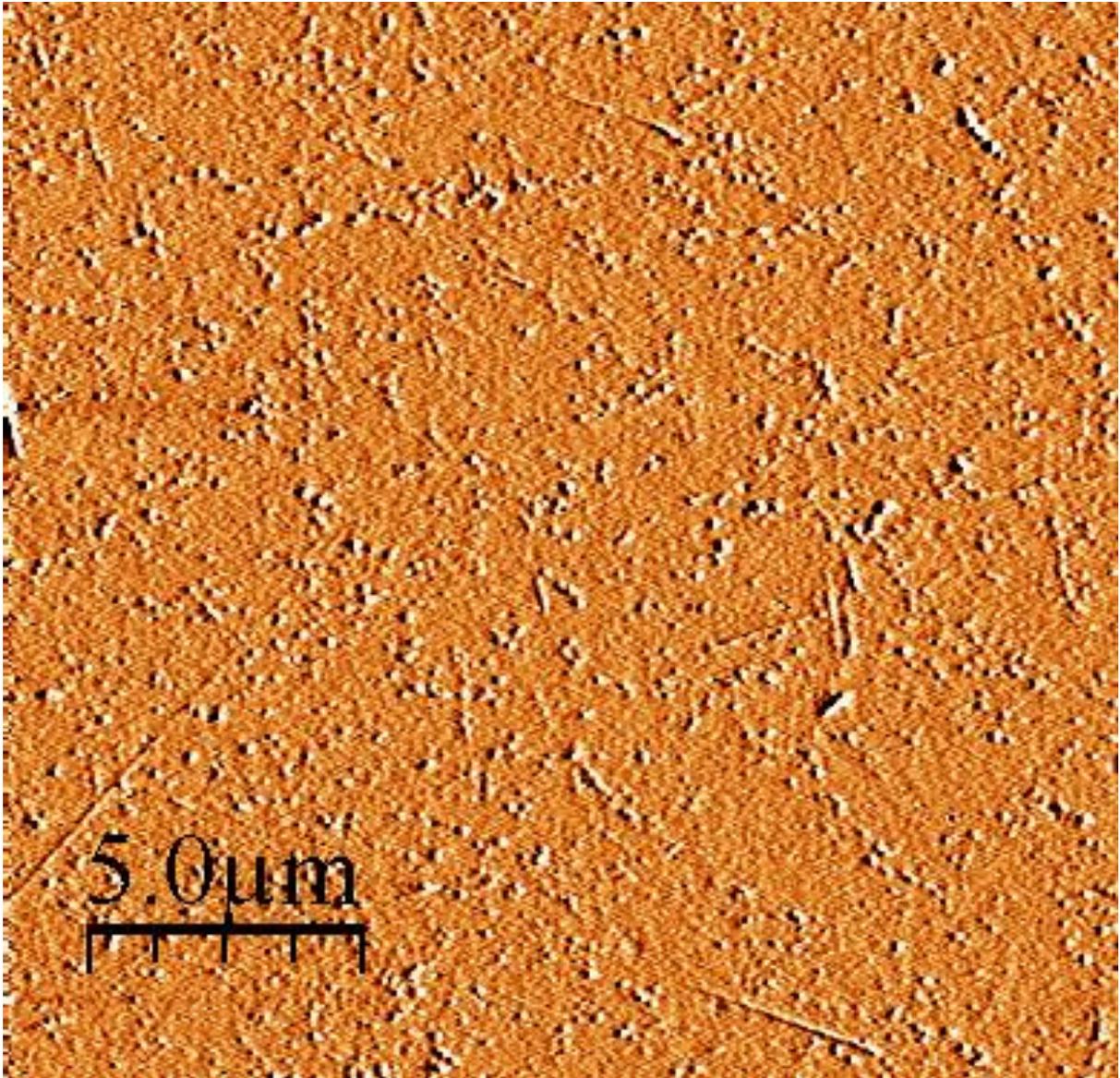


Abbildung 25: Goldoberfläche; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 10 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=9, I=1, D=2; Höhenbild.

Der Scanbereich von 1 μm , welcher eine Vergrößerung des Zentrums des 20 μm Bildes ist, zeigt ein Loch von circa 10 nm Tiefe (Abbildung 27, links, Pfeil) und 120 nm Breite.

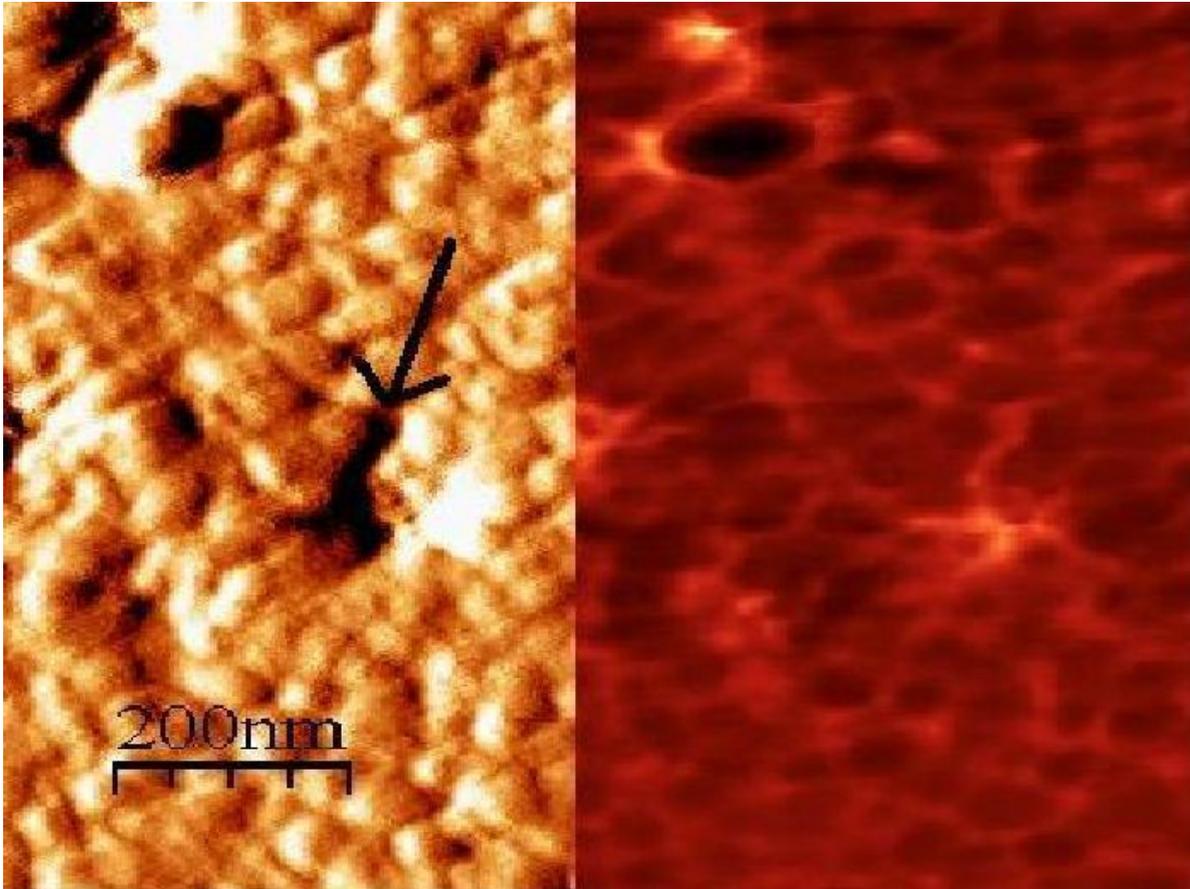


Abbildung 26: Goldoberfläche; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,8, D=2; links: Höhenbild, rechts: Phasenbild.

Dieses Bild zeigt ebenfalls die Goldpartikel aus der die Schicht besteht. Sie besitzen eine mittlere Breite von 43 nm (± 7 nm, $n=10$) und eine mittlere Höhe von 2,4 nm ($\pm 0,6$ nm, $n=10$). Das Phasenbild (Abbildung 27, rechts) erlaubt die Visualisierung der Konturen der GoldPartikel.

Das 3D-Bild des 1 μm Scanbereiches zeigt, wie rau die Goldoberfläche ist.

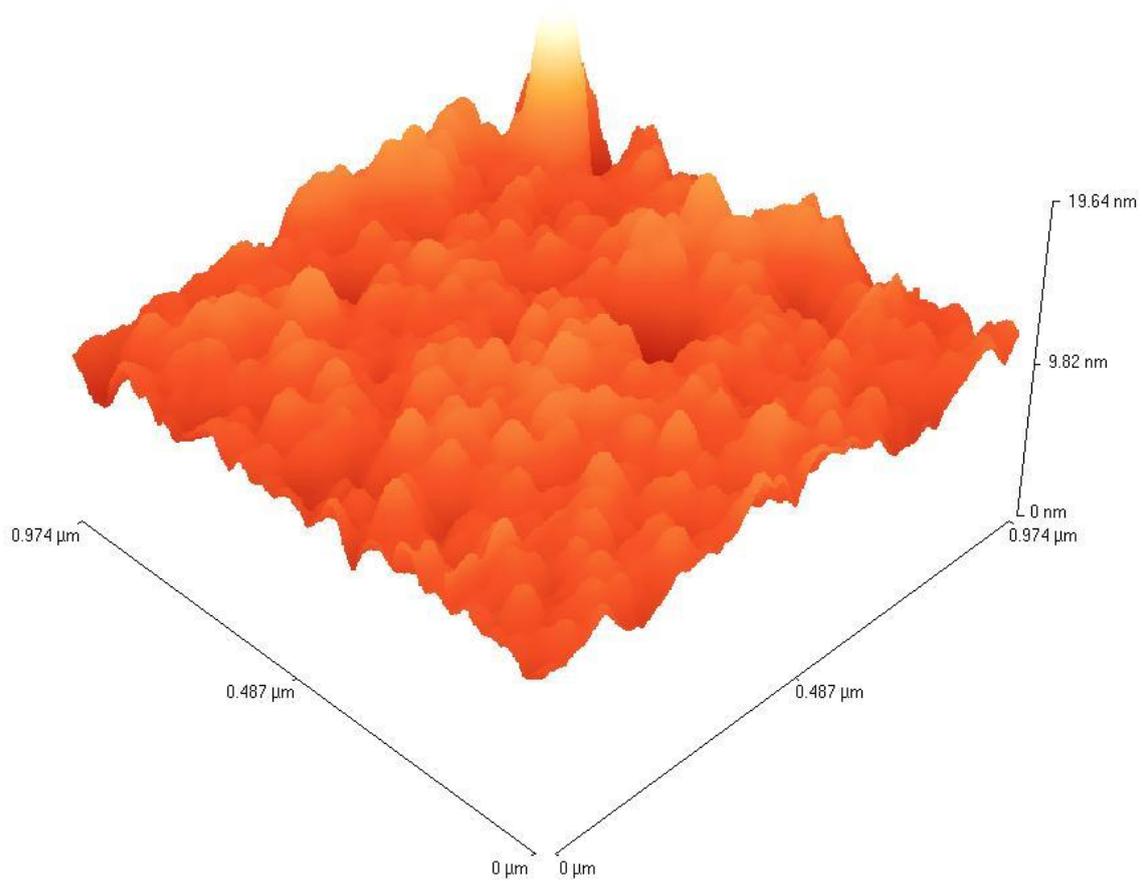


Abbildung 27 : Goldoberfläche; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 0,2 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,8, D=2; 3D-Bild.

4.4 Charakterisierung der Waferoberfläche

Fünf Bereiche von 20 μm der Waferprobe wurden gemessen, der RMS zeigte einen Wert von 0,29 nm ($\pm 0,07$ nm, $n=5$) und der Z-Range 16,6 nm ($\pm 2,8$ nm, $n=5$). Die Abbildung 28, welche ein Beispiel eines 20 μm Scans ist, zeigt, dass die Waferoberfläche sehr homogen und ein paar Erhebungen besitzt.

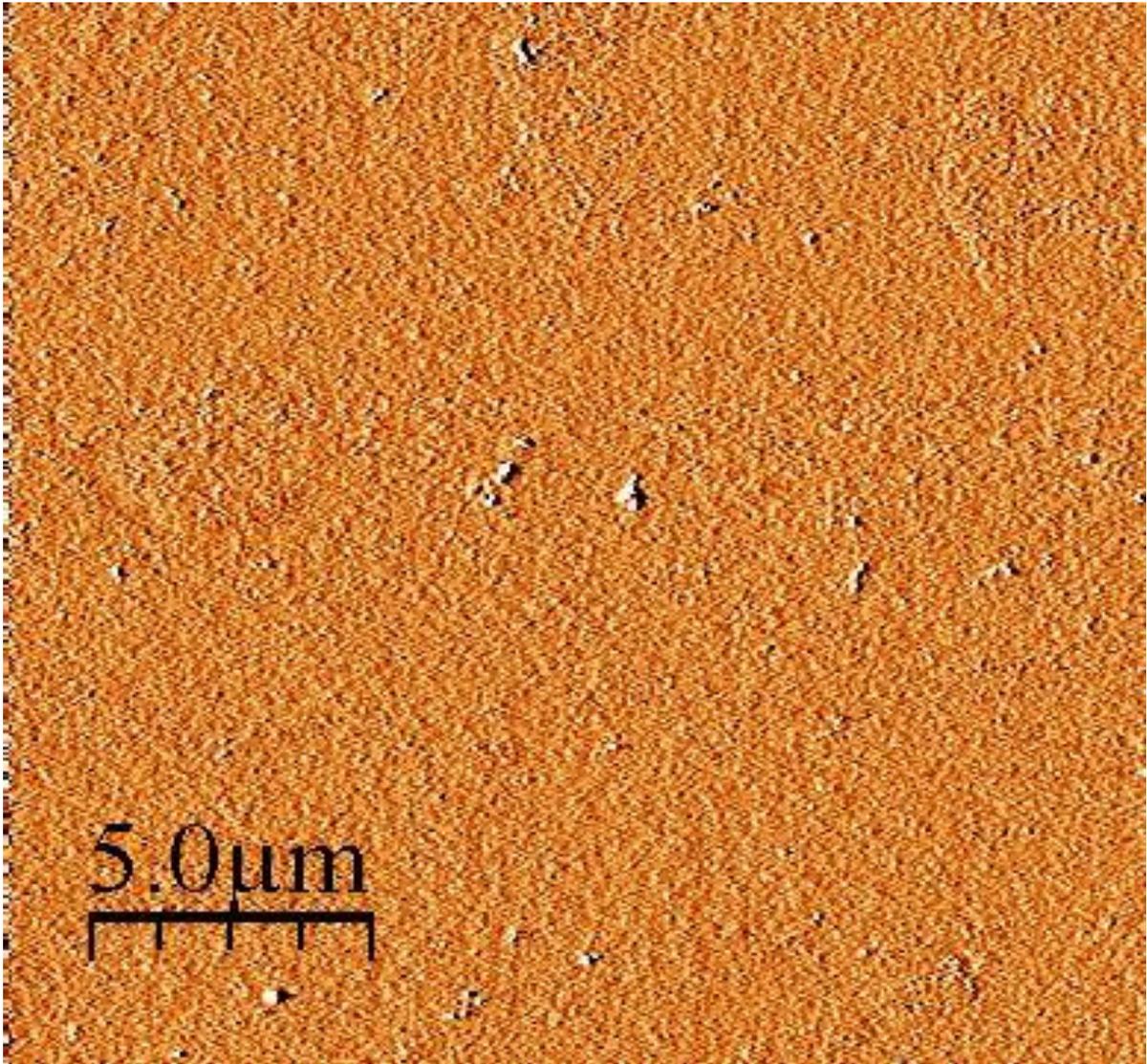


Abbildung 28 : Waferoberfläche; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=9, I=1, D=0,1; Höhenbild.

Die Höhe dieser Erhebungen, die von dem Waferschutzfilm kommen könnten, lag bei circa 15 nm. Das Ergebnis der Kontaktwinkelmessung betrug $48,69^\circ$ ($\pm 0,46^\circ$, $n=6$).

Fünf Bereiche von jeweils $1\ \mu\text{m}$ (Abbildung 29) der Waferoberfläche wurden gemessen. Das Ergebnis des RMS betrug $0,14\ \text{nm}$ ($\pm 0,03\ \text{nm}$, $n=5$), des Z-Range $1,5$ ($\pm 0,7\ \text{nm}$, $n=5$) und das F/PF-Verhältnis $1,0026$ ($\pm 0,0011$, $n=5$).

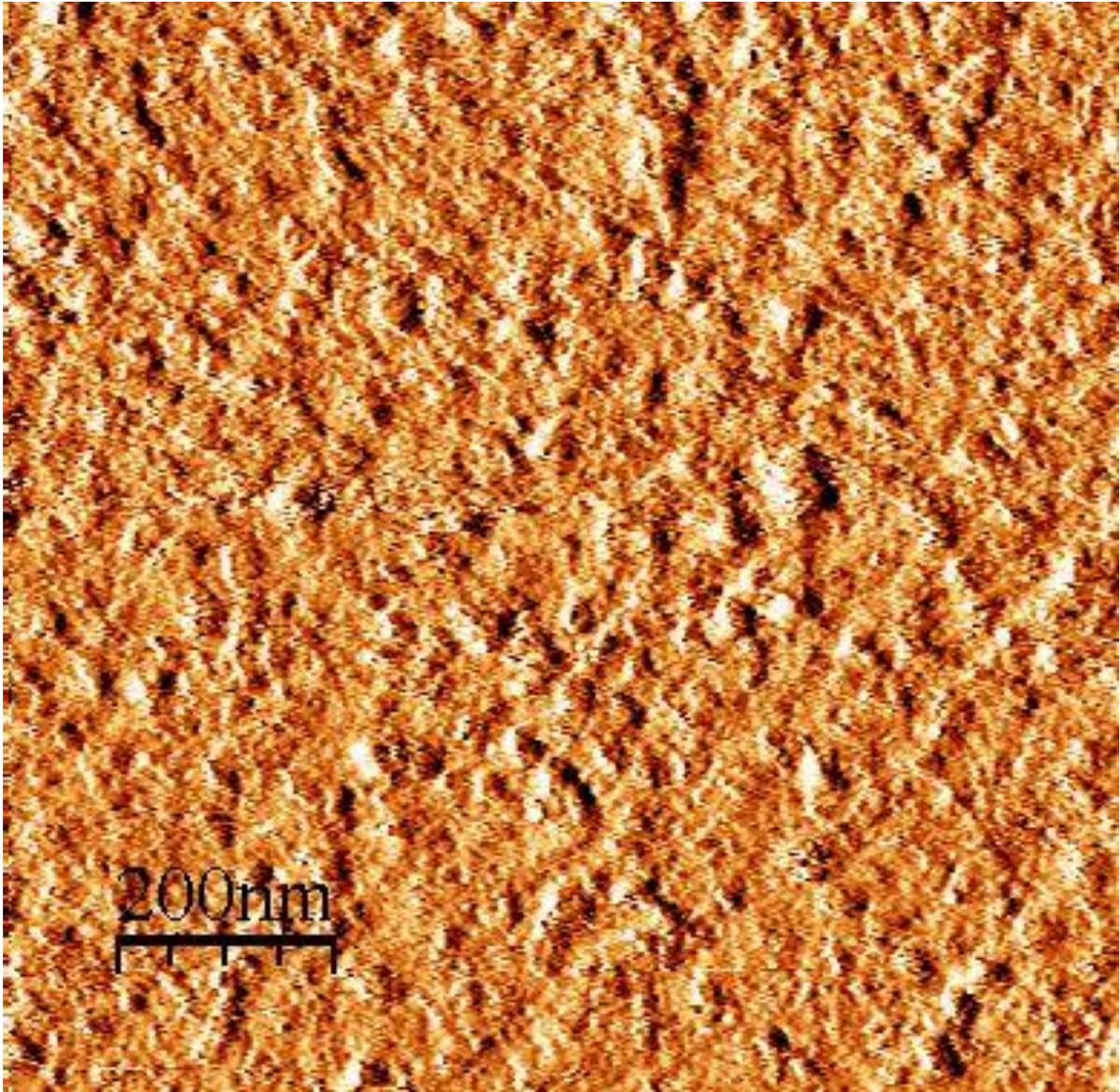


Abbildung 29: Waferoberfläche; Scanbereich: $1\ \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $1\ \mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024×1024 Pixel; Regelung: $P=2$, $I=0,2$, $D=0,1$; Höhenbild.

In Abbildung 29 der Waferoberfläche zeigt sich kein besonderes Muster. Die Waferprobemessungen zeigen ein Rauschen, da die vertikale Bewegung sehr nah von der maximalen Auflösung des Scanners ist.

In dem 3D-Bild (Abbildung 30) sieht man deutlicher die Struktur der Waferoberfläche.

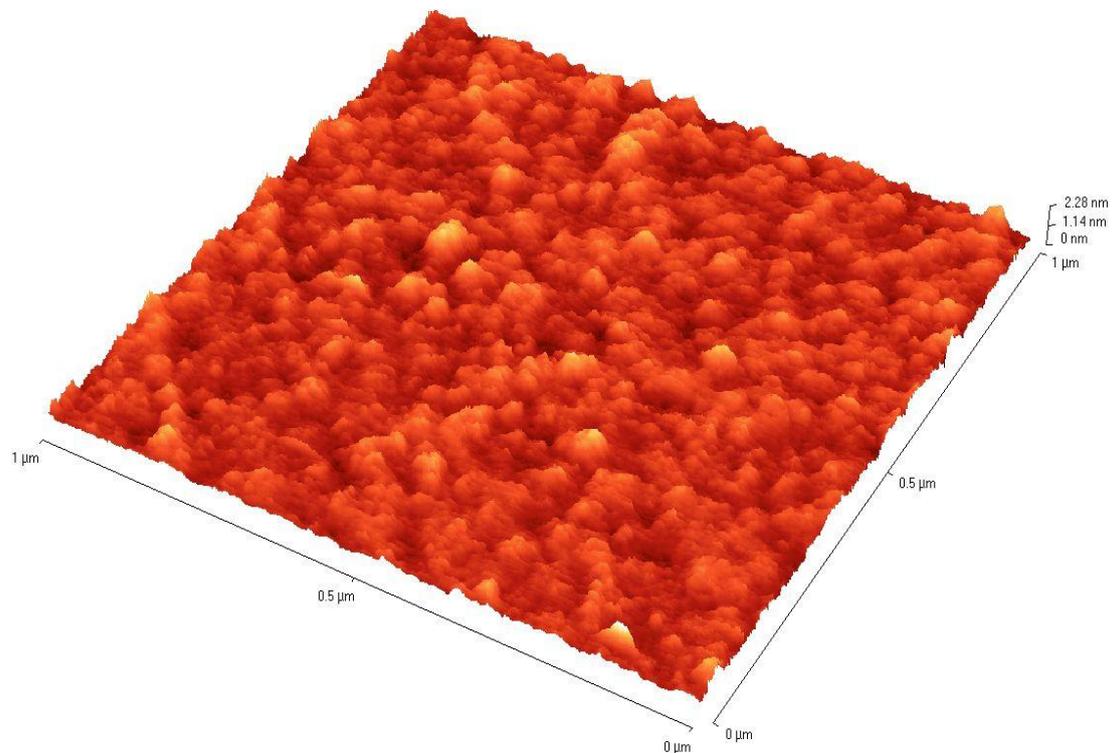


Abbildung 30 : Waferoberfläche; Scanbereich: 1 μm; Scangeschwindigkeit: 1 μm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=2, I=0,2, D=0,1; 3D-Bild.

Es scheint so, dass die Oberfläche aus sehr kleinen Partikel (Durchmesser: <10 nm; Höhe <1 nm) besteht. Diese Partikel setzen sich zusammen und bilden kleine Hügel.

4.5 Charakterisierung der Titanoberfläche

Der Mittelwert des RMS, der mit fünf Bereichen von $20\ \mu\text{m}$ der Titanprobe (Abbildung 31) gemessen wurde, lag bei $0,52\ \text{nm}$ ($\pm 0,05\ \text{nm}$, $n=5$) und der Z-Range bei $6,6\ \text{nm}$ ($\pm 1,5\ \text{nm}$, $n=5$).

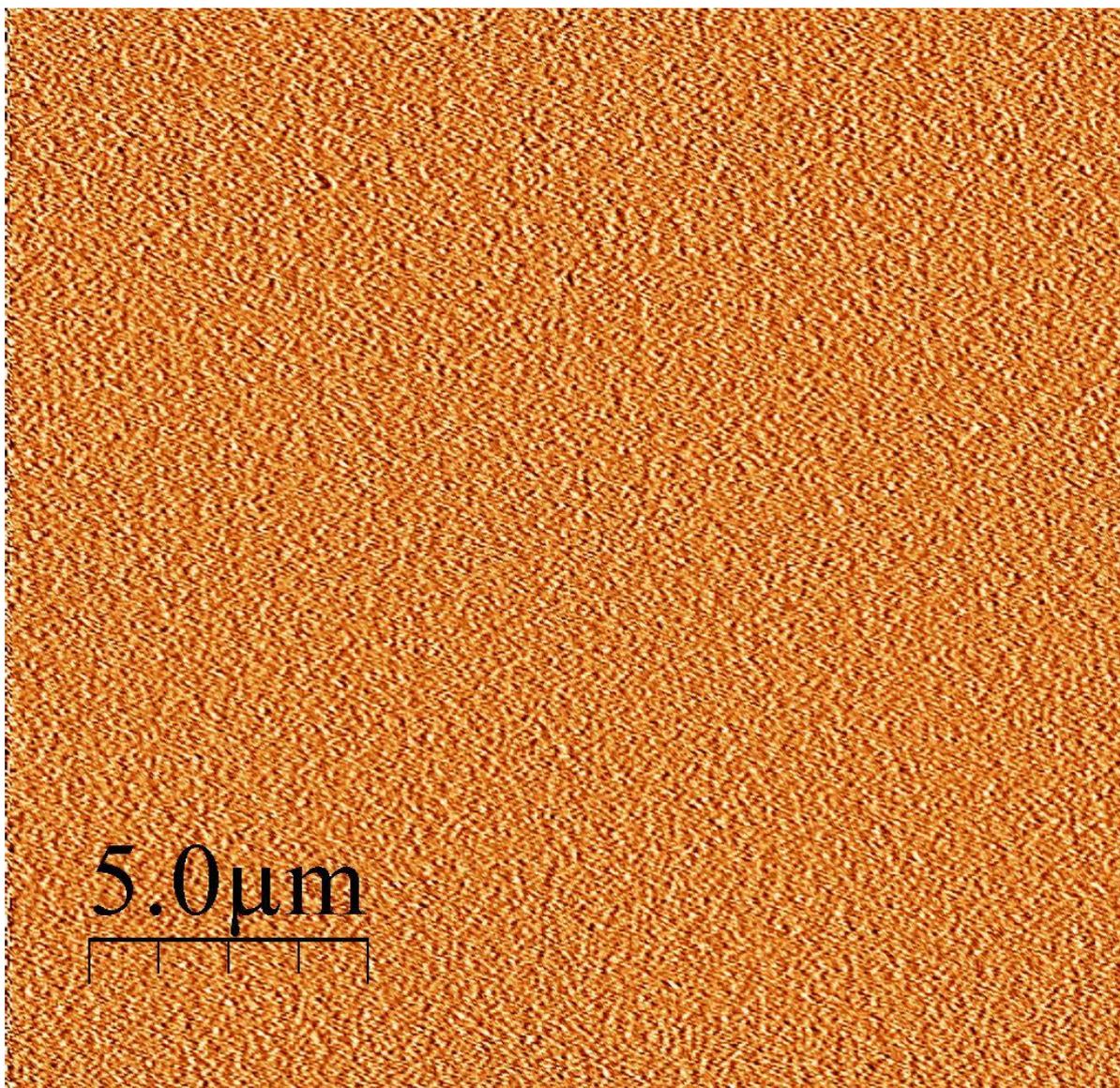


Abbildung 31: Titanoberfläche, Scanbereich: $20\ \mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit: $4\ \mu\text{m/s}$, Auflösung: 512×512 Pixel, Regelung: $P=5\ I=0,5\ D=0,1$; Höhenbild.

Die Abbildung 31 zeigt eine sehr homogene Titanoberfläche ohne Agglomerate. Das Ergebnis der Kontaktwinkelmessung ist $83,33^\circ$ ($\pm 1,21^\circ$, $n=6$).

Es wurden fünf Bereiche von $1\ \mu\text{m}$ (Abbildung 32) der Titanoberfläche gemessen, der RMS beträgt $0,76\ \text{nm}$ ($\pm 0,03\ \text{nm}$, $n=5$), der Z-Range $7,3$ ($\pm 0,5\ \text{nm}$, $n=5$) und das F/PF-Verhältnis $1,0195$ ($\pm 0,0041$, $n=5$).

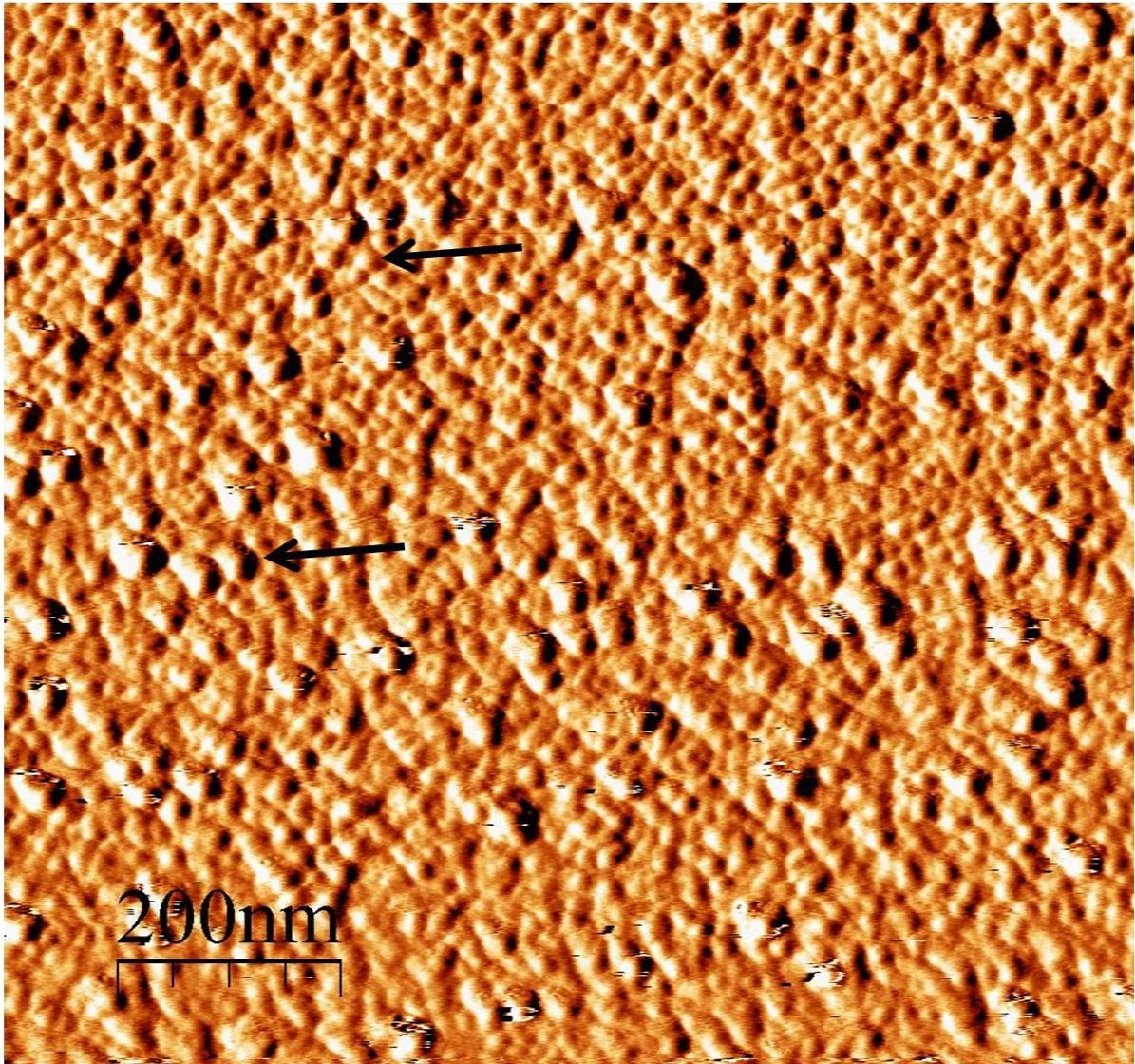


Abbildung 32: Titanoberfläche; Scanbereich: $1\ \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $1\ \mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024×1024 Pixel; Regelung: $P=5$, $I=0,5$, $D=0,1$; Höhenbild.

Man sieht in Abbildung 32, dass die Titanoberfläche hauptsächlich aus zwei verschiedenen Partikelgrößen besteht. Es gibt kleine Partikel (Pfeil oben) mit einem Durchmesser von $12\ \text{nm}$ ($\pm 2\ \text{nm}$ $n=10$) und einer Höhe von $1,4\ \text{nm}$ ($\pm 0,3\ \text{nm}$ $n=10$) und größere Partikel (Pfeil unten) mit einem Durchmesser von $24\ \text{nm}$ ($\pm 4\ \text{nm}$ $n=10$) und einer Höhe von $3,7\ \text{nm}$ ($\pm 0,9\ \text{nm}$ $n=10$). Die Rohdaten sind im Anhang 7.4 beschrieben.

Das 3D-Bild des 1 μm Bereiches zeigt, dass diese Partikel nicht homogen verteilt sind und sich Bereiche mit vielen großen Partikeln und mit vielen kleinen Partikeln bilden.

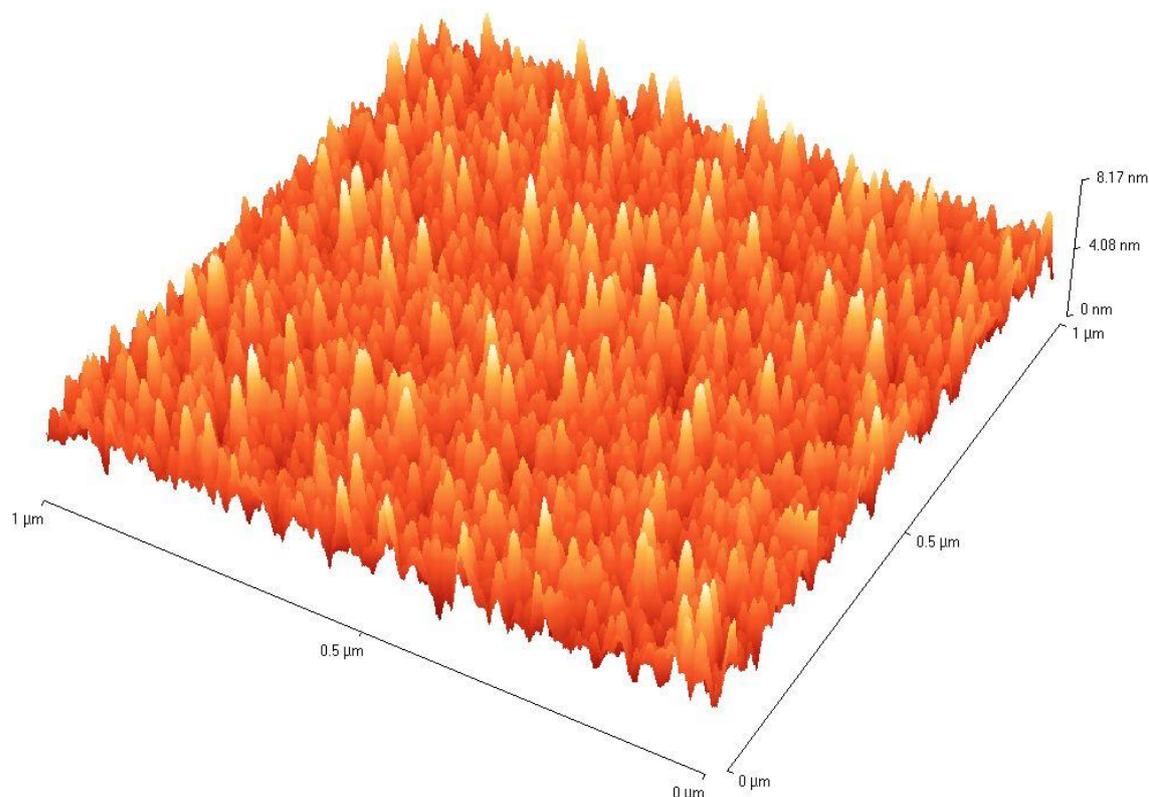


Abbildung 33: Titanoberfläche; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,5, D=0,1; 3D-Bild.

Diese zwei Partikelgrößen könnte man als zwei Niveaus bezeichnen. Die höchsten Partikeln umgeben die Bereiche mit den kleineren Partikeln, es scheint als ob die Oberfläche aus Spitzen und Lücken besteht. Als Lücken wird der freie Raum zwischen den Partikeln bezeichnen.

Der Zusammenfassung der gemessenen Werte für die Wafer- und die Titanoberfläche (siehe Abbildung 34) zeigt, dass der RMS der Waferprobe deutlich geringer als der der Titanprobe ist.

Probe	Scanbereich	RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projektzierte Fläche [-]
Waferoberfläche	20 μm	0,29 \pm 0,07	16,60 \pm 2,80	-
	1 μm	0,14 \pm 0,03	1,50 \pm 0,70	1,0026 \pm 0,0011
Titanoberfläche	20 μm	0,52 \pm 0,05	6,60 \pm 1,50	-
	1 μm	0,76 \pm 0,03	7,30 \pm 0,50	1,0195 \pm 0,0041

Abbildung 34: Zusammenfassung der Rauigkeitanalyse der Wafer- und Titanoberfläche.

4.6 Visualisierung des Fibronektins auf der Titanoberfläche

Von allen Titanproben auf deren Oberfläche das Fibronektin adsorbiert war, wurden fünf Bereiche von 20 μm und fünf von 1 μm analysiert (Wie im Abschnitt 4.1 beschrieben). Die Veränderung der gemessenen Werte der Titanprobe in Abhängigkeit von der Fibronektininkubationszeit wird in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung der gemessenen Werte der Fibronektinadsorption auf der Titanoberfläche für die 1 μm Bereiche.

Probe	RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projektzierte Fläche [-]
Titanoberfläche	0,76 \pm 0,03	7,25 \pm 0,54	1,0195 \pm 0,0041
Titanoberfläche + Fibronektin (Inkubationszeit: 30 min)	0,45 \pm 0,07	4,84 \pm 1,27	1,0046 \pm 0,0011
Titanoberfläche + Fibronektin (Inkubationszeit: 60 min)	0,30 \pm 0,08	4,19 \pm 1,52	1,0037 \pm 0,0014
Titanoberfläche + Fibronektin (Inkubationszeit: 120 min)	0,27 \pm 0,02	4,47 \pm 0,84	1,0032 \pm 0,0009
Titanoberfläche + Fibronektin (Inkubationszeit: 180min)	0,39 \pm 0,01	3,55 \pm 0,33	1,0043 \pm 0,0016

In Tabelle 3 sieht man, dass die Rauigkeit, der Z-Range und das F/PF-Verhältnis sich in Abhängigkeit von der Fibronektininkubationszeit verändert. Die hier zusammengefassten Ergebnisse werden genauer in den folgenden Abschnitten erklärt.

4.6.1 Adsorptionszeit 30 Minuten

Nach einer 30 minütigen Inkubation vom Fibronectin auf der Titanoberfläche betrug der RMS in einem 20 μm Bereich 0,59 nm ($\pm 0,07$ nm, n=5) mit einem Z-Range von 59,3 nm ($\pm 23,6$ nm, n=5).

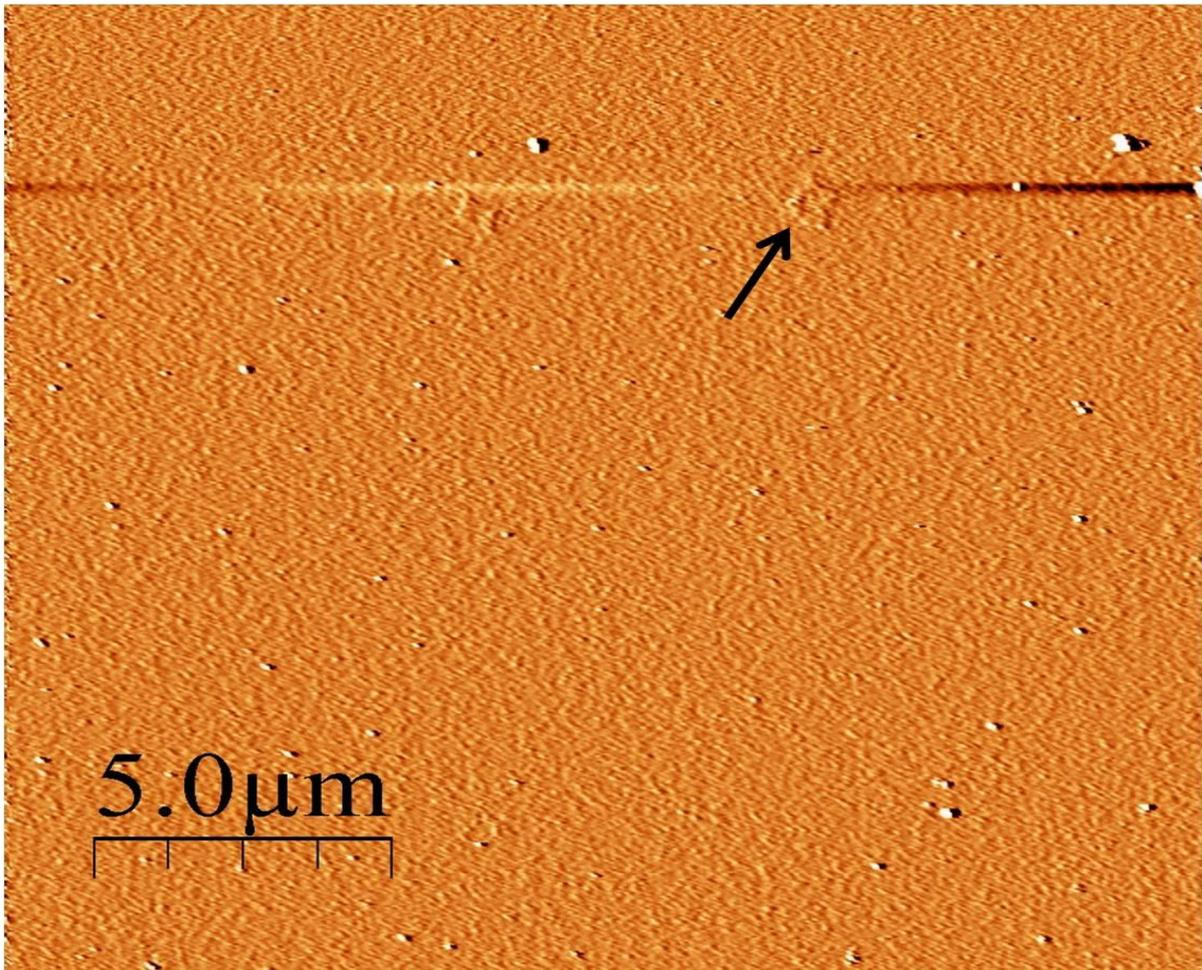


Abbildung 35 : Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 30 Minuten; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=9, I=1, D=0,1; Höhenbild.

Man sieht in Abbildung 35, dass die Oberfläche weniger homogen als die reine Titanoberfläche ist. Es gibt einige Agglomerate oder besondere Bereiche (Pfeil), die höher als der Rest der Oberfläche zu sein scheint. Die weiter unten aufgeführten Ergebnisse zeigen die Unterschiede, die sich auf der Oberfläche finden lassen.

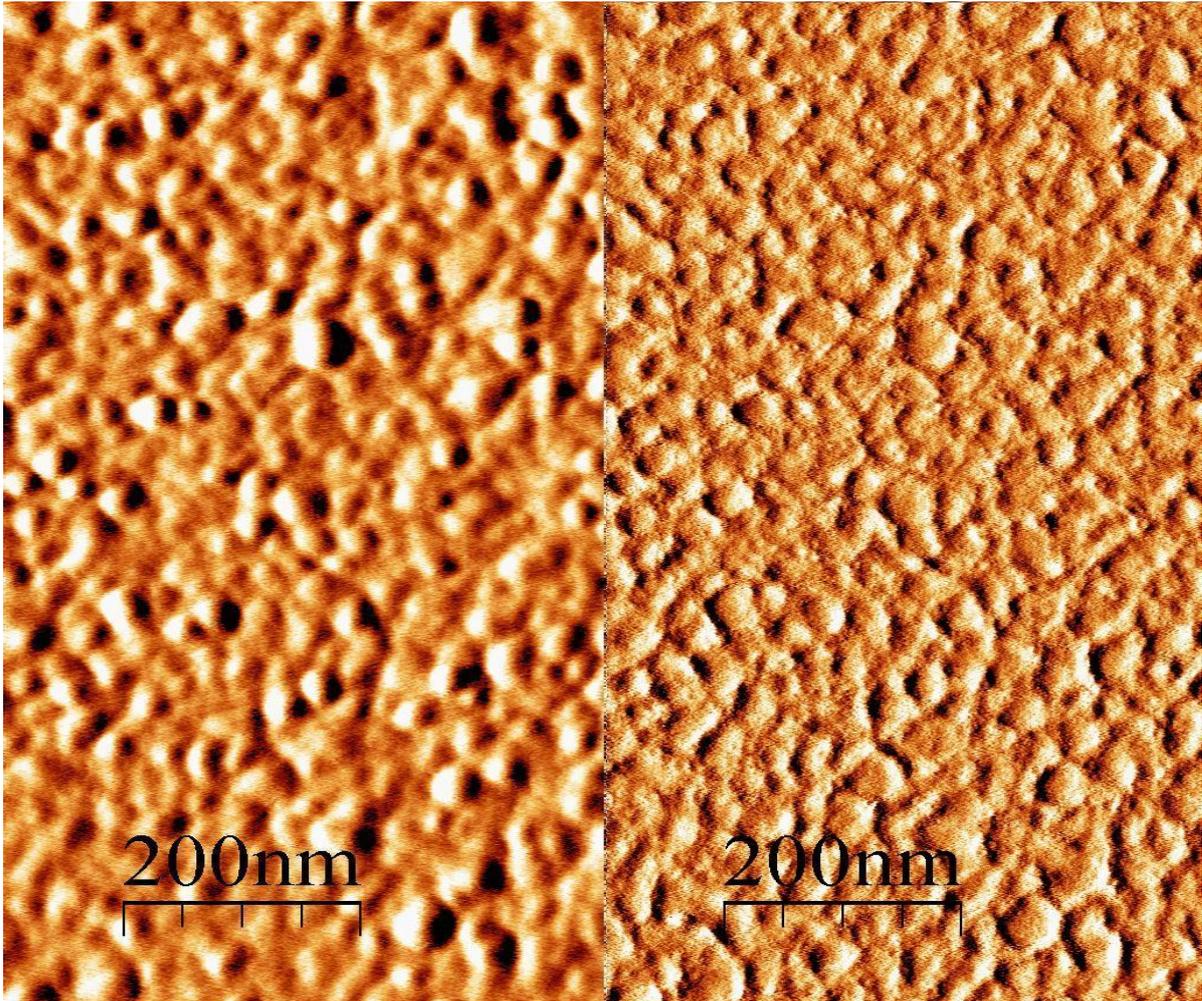


Abbildung 36: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 30 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,5, D=0,1; links: Höhenbild; rechts: Phasenbild.

In Abbildung 36 - 37 und in Abbildung 38 - 39 sind zwei deutlich unterschiedliche Oberflächenstrukturen dargestellt. Trotz dieser unterschiedlichen Bereichstypen war die Rauigkeit der Oberflächen nach 30 Minuten Fibronectinadsorption berechnet worden. Der RMS lag bei 0,30 nm ($\pm 0,08$ nm, n=5), der Z-Range bei 4,2 ($\pm 1,5$ nm, n=5) und das F/PF-Verhältnis bei 1,0037 ($\pm 0,0014$, n=5). Die Struktur, die im Phasenbild (siehe Abbildung 36, rechts) erscheint, entspricht den Konturen der Partikel im Höhenbild. Das 3D-Bild dieses Bereiches zeigt deutlich diese Partikel auf der Oberfläche.

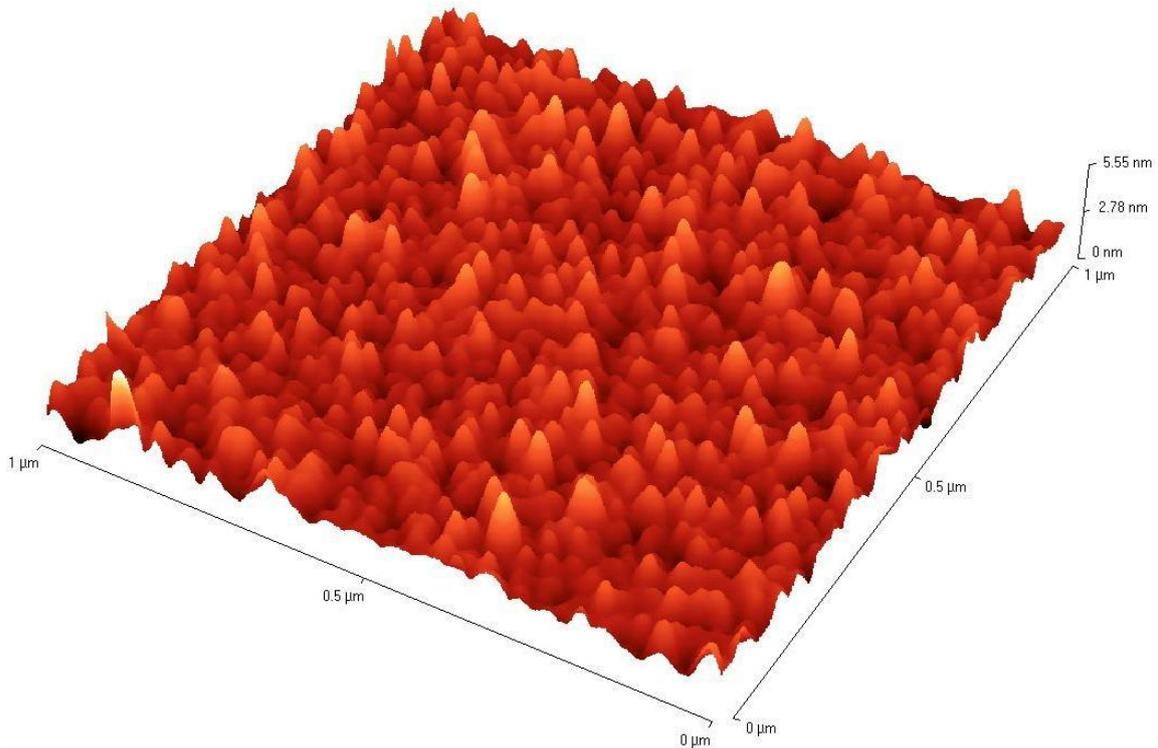


Abbildung 37 : Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 30 Minuten; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,5, D=0,1; 3D-Bild.

Die Oberfläche in Abbildung 37 ist weniger rau als die reine Titanoberfläche. Es scheint, dass die Lücken zwischen den höchsten Partikeln der Titanoberfläche teilweise mit Fibronectinmolekülen ausgefüllt sind und dass nur einige Spitzen dieser Titanpartikel zu sehen sind.

Ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten traten folgenden Bilder (siehe Abbildung 38 - 39) auf. Es ist in diesen Bildern zu erkennen, dass einige Partikel auf der in Abbildung 37- 38 dargestellten Strukturen adsorbiert sind. Die gleichen Partikel sind sehr deutlich in dem Phasenbild (siehe Abbildung 38, rechts) erkennbar.

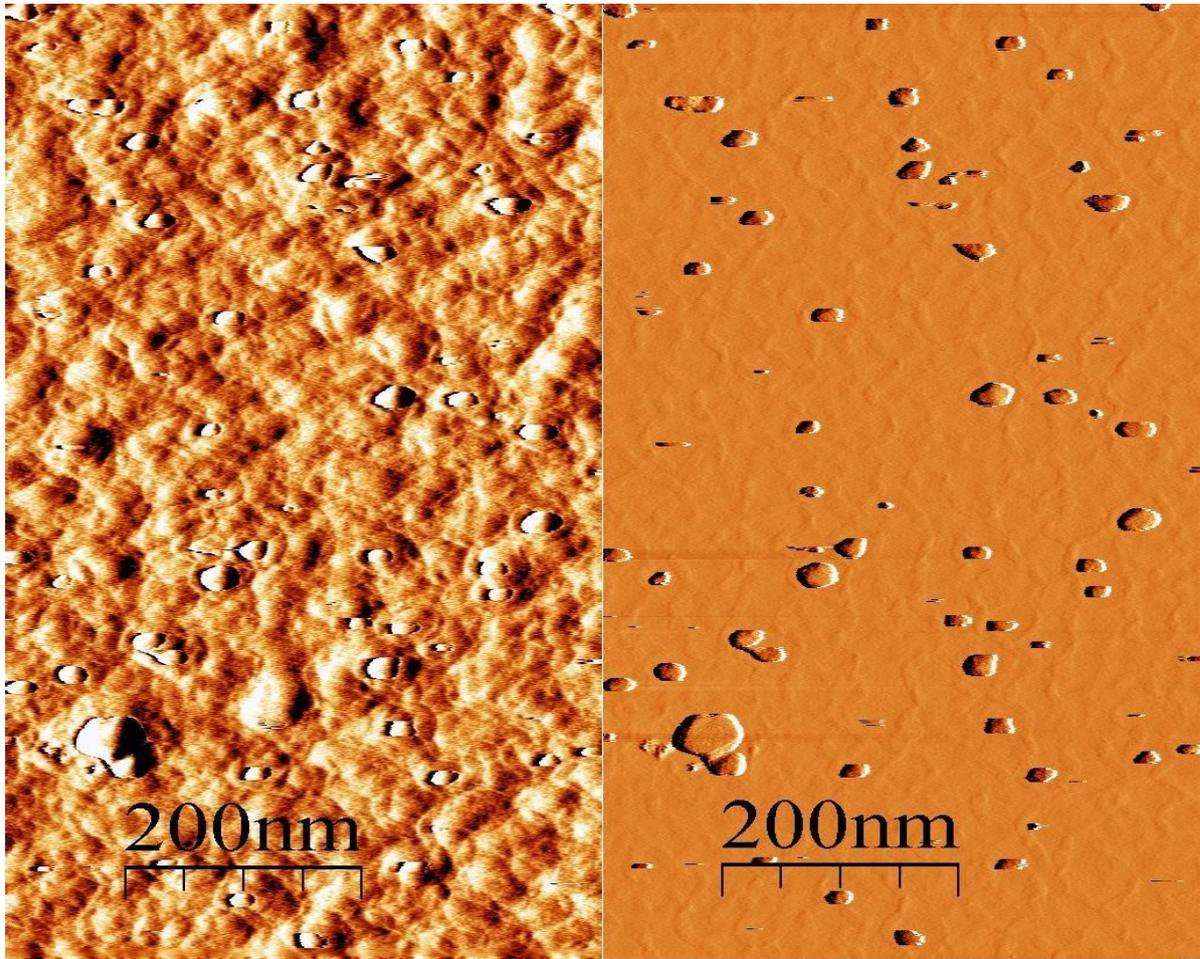


Abbildung 38: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 30 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,5, D=0,1; links: Höhenbild; rechts: Phasenbild.

Die Partikel, die im Phasenbild sehr auffällig erscheinen, haben eine Breite von 29 nm (± 5 nm $n=10$) und eine Höhe von 2,2 nm ($\pm 0,6$ nm $n=10$). Die Rohdaten sind im Anhang 7.4 beschrieben. Die Informationen, die aus dem Phasenbild kommen, zeigen, dass die Phasenverschiebung sehr groß ist, wenn die Spitze ein Partikel oberhalb der Oberfläche trifft. Es scheint auch, dass die untererste Schicht aus einem homogenen Stoff besteht, da nur sehr kleine Phasenverschiebungen zu sehen

sind. Trotzdem sind die Konturen der Partikel der untersten Schicht im Phasenbild noch zu erkennen.

Wegen der großen Phasendifferenz zwischen den isolierten Partikeln, die Fibronectin sein sollten, und dem Rest der Oberfläche konnte man vermuten, dass die untere Schicht aus einer Mischung von Titanspitzen und Fibronectin besteht. Man hat also den Eindruck, dass die Lücken der Titanoberfläche total ausgefüllt sind und dass die Partikel der Titanschicht und die Fibronectinmoleküle gleich hoch sind. Die Schicht unterhalb der isolierten Partikel, die im Phasenbild zu erkennen sind, besteht also aus einer Mischung von Titan- und Fibronectinpartikeln, sodass sie nicht im Phasenbild zu differenzieren sind. Diese Schicht wird in dieser Arbeit weiterhin als Titan-Fibronectin-Misch-Schicht bezeichnen.

Das 3D-Bild dieses Bereiches zeigt zusätzlich, dass die Oberfläche glatter als in Abbildung 37 ist.

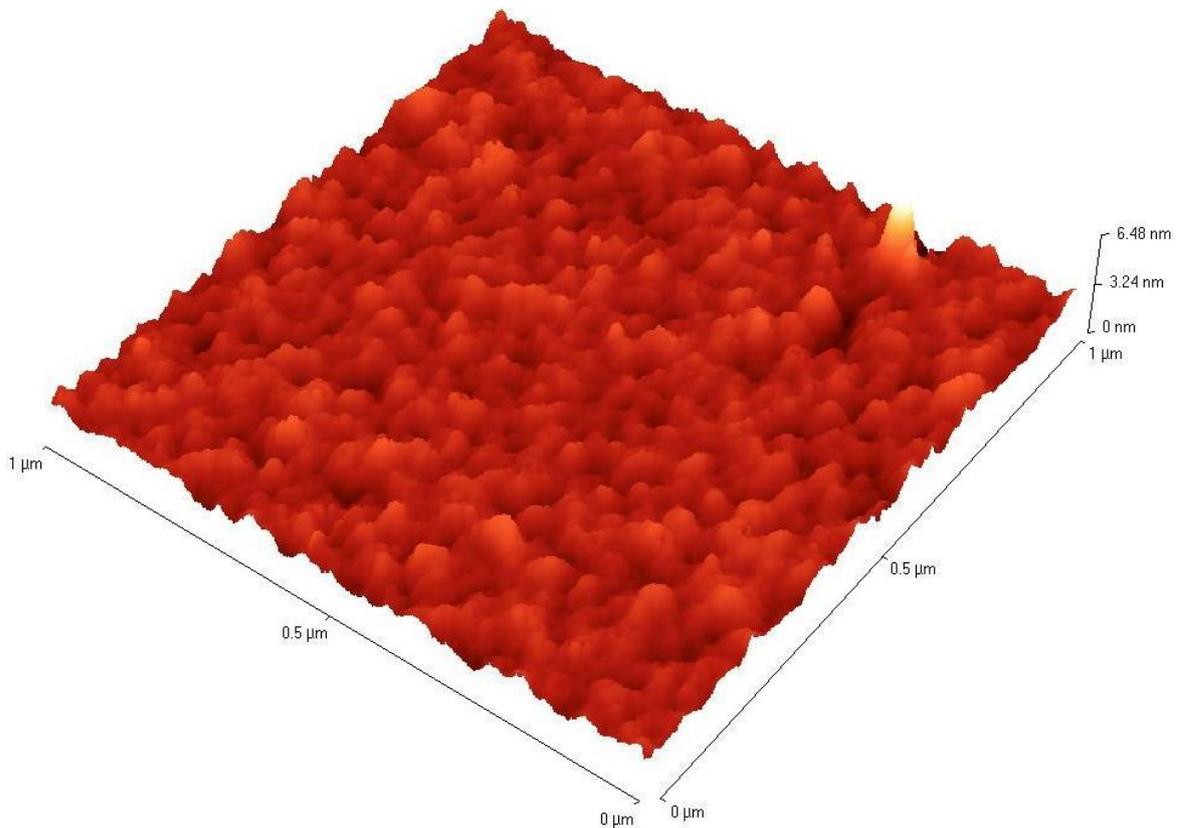


Abbildung 39: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 30 Minuten; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=5, I=0,5, D=0,1; 3D-Bild.

Die Struktur der Titanoberfläche ist in Abbildung 39 nicht mehr zu erkennen, die Oberfläche sieht wie eine homogene Schicht aus.

4.6.2 Adsorptionszeit 60 Minuten

Fünf Bereiche von $20\ \mu\text{m}$ der Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin (Inkubationszeit ist 60 Minuten) wurden gemessen, der RMS lag bei $1,60\ \text{nm}$ ($\pm 1,28\ \text{nm}$, $n=5$) und der Z-Range bei $66,8\ \text{nm}$ ($\pm 27,4\ \text{nm}$, $n=5$).

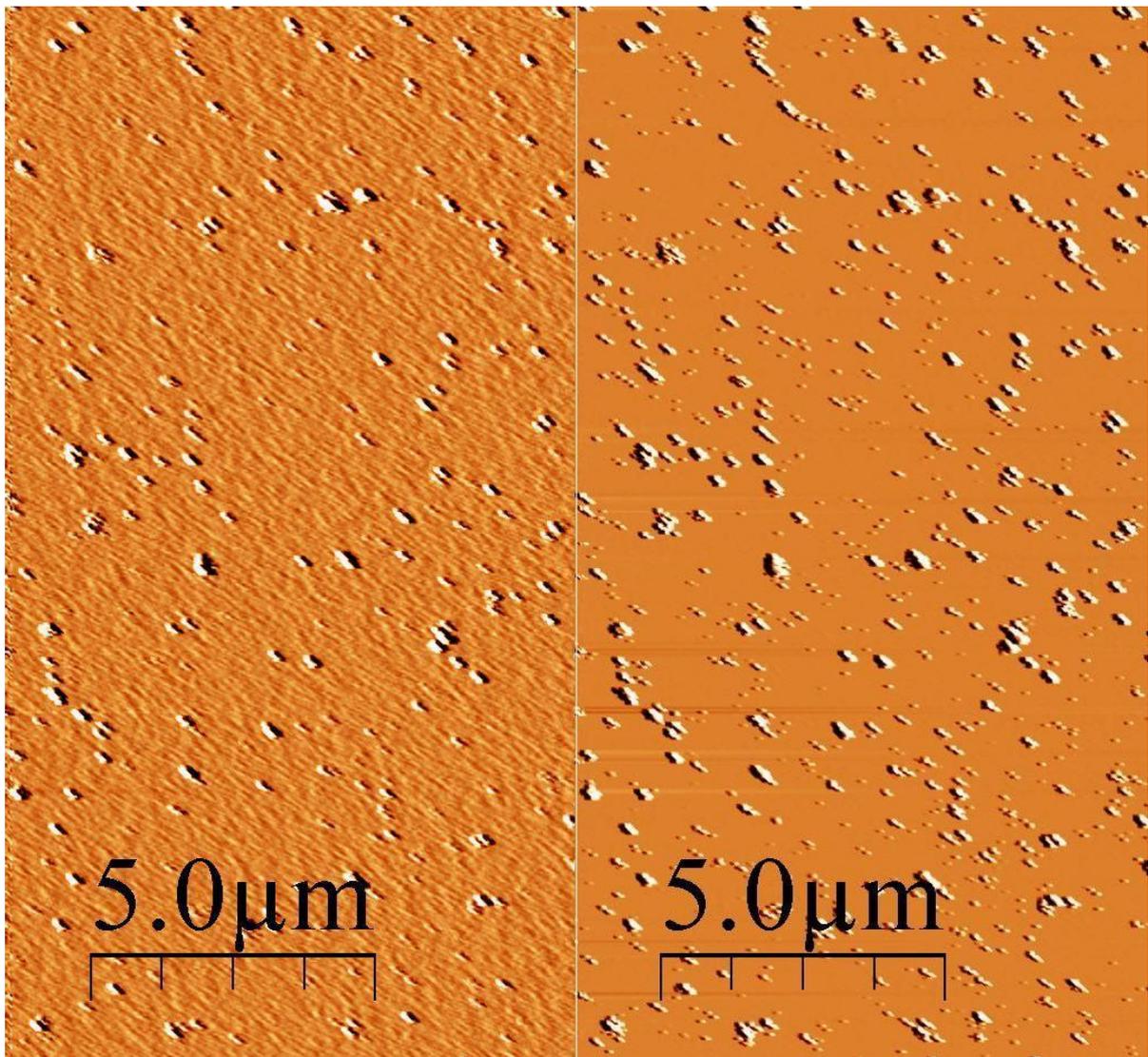


Abbildung 40: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronektinkonzentration: $20\ \text{nM}$; Inkubationszeit: 60 Minuten; Scanbereich: $20\ \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $4\ \mu\text{m/s}$; Auflösung: 512×512 Pixel; Regelung: $P=15$, $I=1$, $D=0,1$; links: Höhenbild; rechts: Phasenbild.

Die Abbildung 40 zeigt regelmäßig verteilte Agglomerate auf der Oberfläche, die sicherlich aus Fibronectin bestehen. Die Agglomerate sind langförmig und parallel ausgerichtet. Diese Richtung ist die Spülrichtung. Es muss angemerkt werden, dass

einzelne Proteinen und Agglomerate einer kleineren Größe im Phasenbild (siehe Abbildung 40, rechts) zu erkennen sind. Eine Vergrößerung davon ist in Abbildung 41 gegeben.

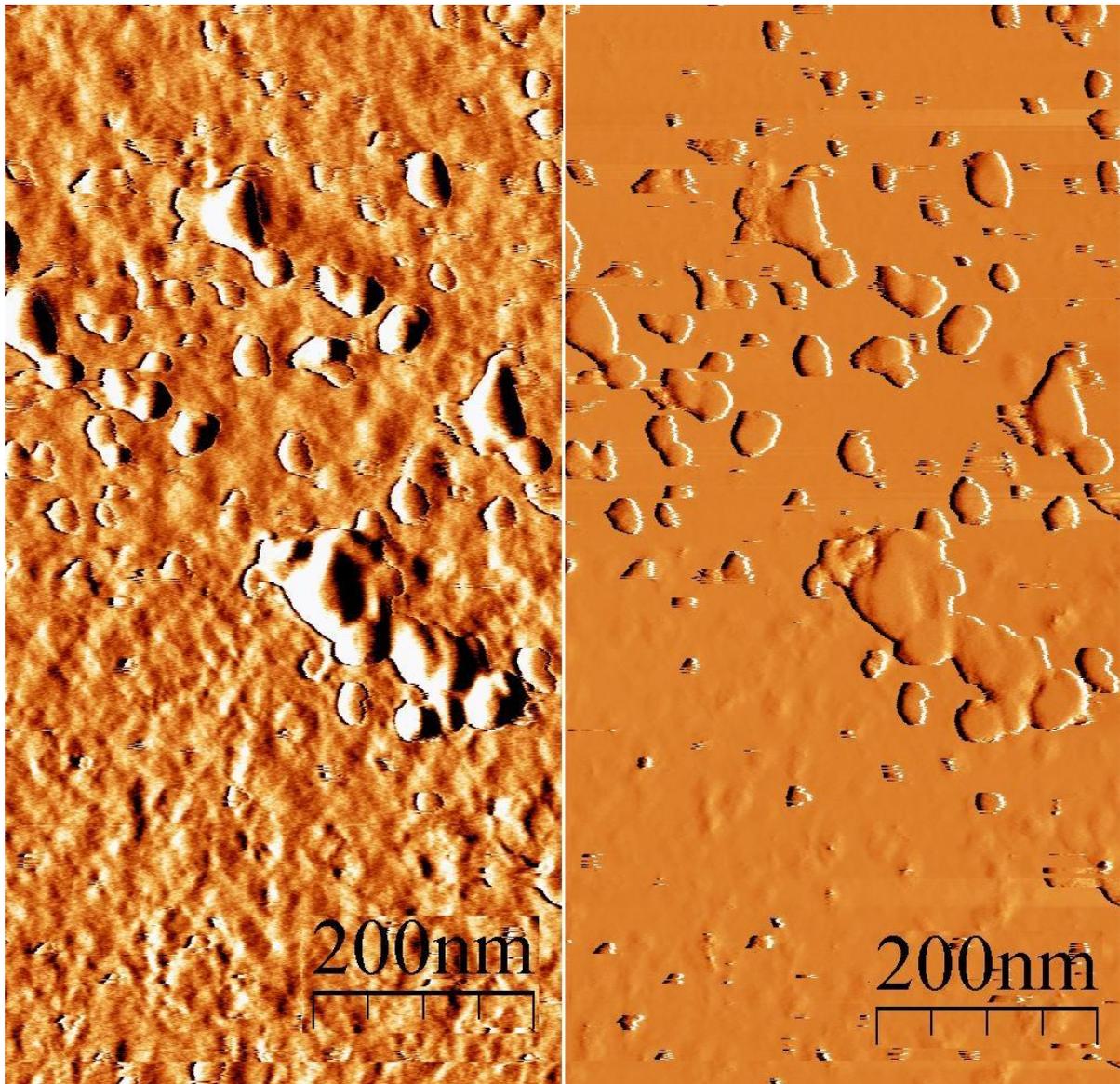


Abbildung 41: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 60 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; Höhenbild.

Die Abbildung 41 zeigt eine sehr glatte Oberfläche mit einigen Partikeln, die wie bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten, oberhalb der anderen lokalisiert sind und manchmal Agglomerate bilden.

Das Phasenbild zeigt, wie für den Versuch nach 30 Minuten, dass die unterste Schicht erneut wie eine Titan-Fibronectin-Misch-Schicht aussieht. Aber diesmal alle gemessenen Stellen ähnlich waren. Die Phasenbilder aller Stellen zeigen einen großen Unterschied zwischen der untersten Schicht und den Partikeln oberhalb dieser. Das 3D-Bild dieses Bereiches zeigt, dass die Agglomerate viel höher als der Rest der Oberfläche sind.

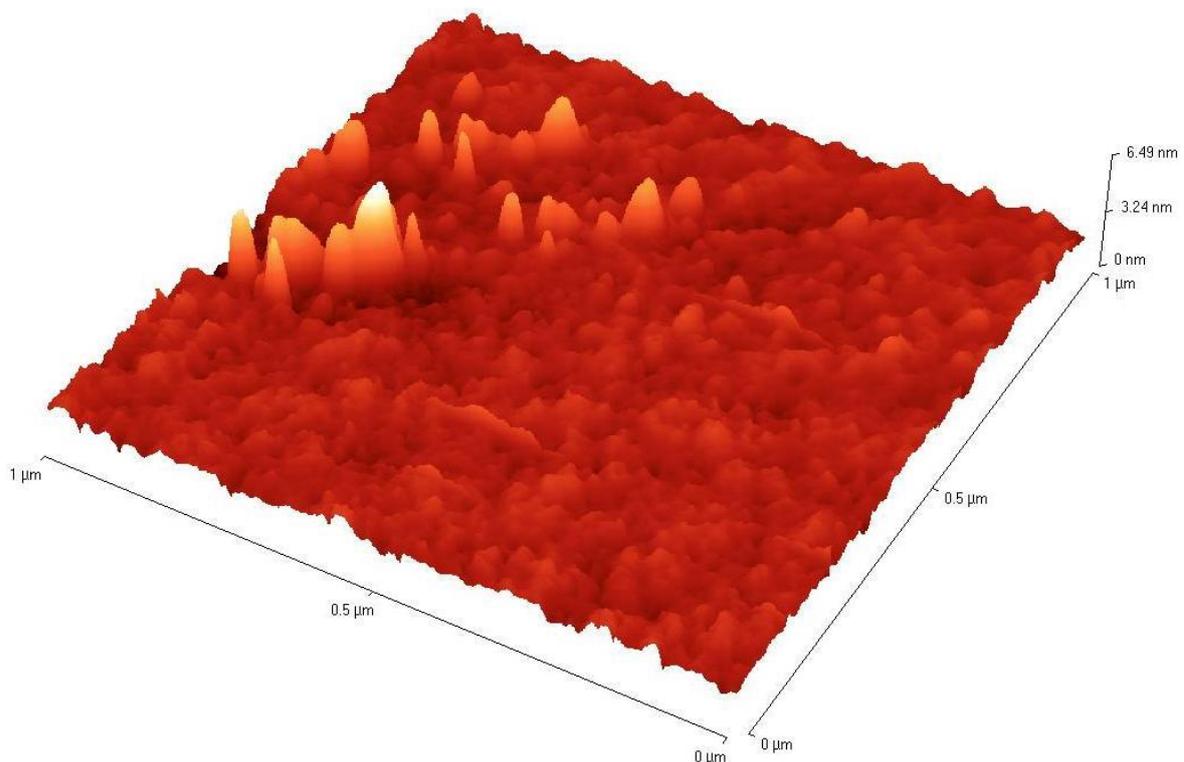


Abbildung 42: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 60 Minuten; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; 3D-Bild.

Die Oberfläche ohne Berücksichtigung der Agglomerate sieht aus, wie die der Fibronectinadsorption nach 30 Minuten. Die Struktur der Oberfläche nach einer 60 minütigen Inkubationszeit besteht also aus einer kompakten homogenen Schicht mit einzelnen Partikeln und Agglomeraten. Fünf Bereiche von 1 µm der Titanoberfläche nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurden gemessen, der RMS betrug 0,45 nm ($\pm 0,07$ nm, n=5), der Z-Range 4,8 ($\pm 1,3$ nm, n=5) und F/PF-Verhältnis 1,0046 ($\pm 0,0011$, n=5).

Ein anderes Beispiel befindet sich in Abbildung 43, das eine Vergrößerung eines Bereiches von $0,6 \mu\text{m}$ eines Agglomerates entspricht. Dieses Bild zeigt die sehr glatte Oberfläche, auf der einige Partikel zu erkennen sind. Im Phasenbild (siehe Abbildung 43, rechts) lassen sich diese Partikel sehr gut von dem Rest der Oberfläche differenzieren.

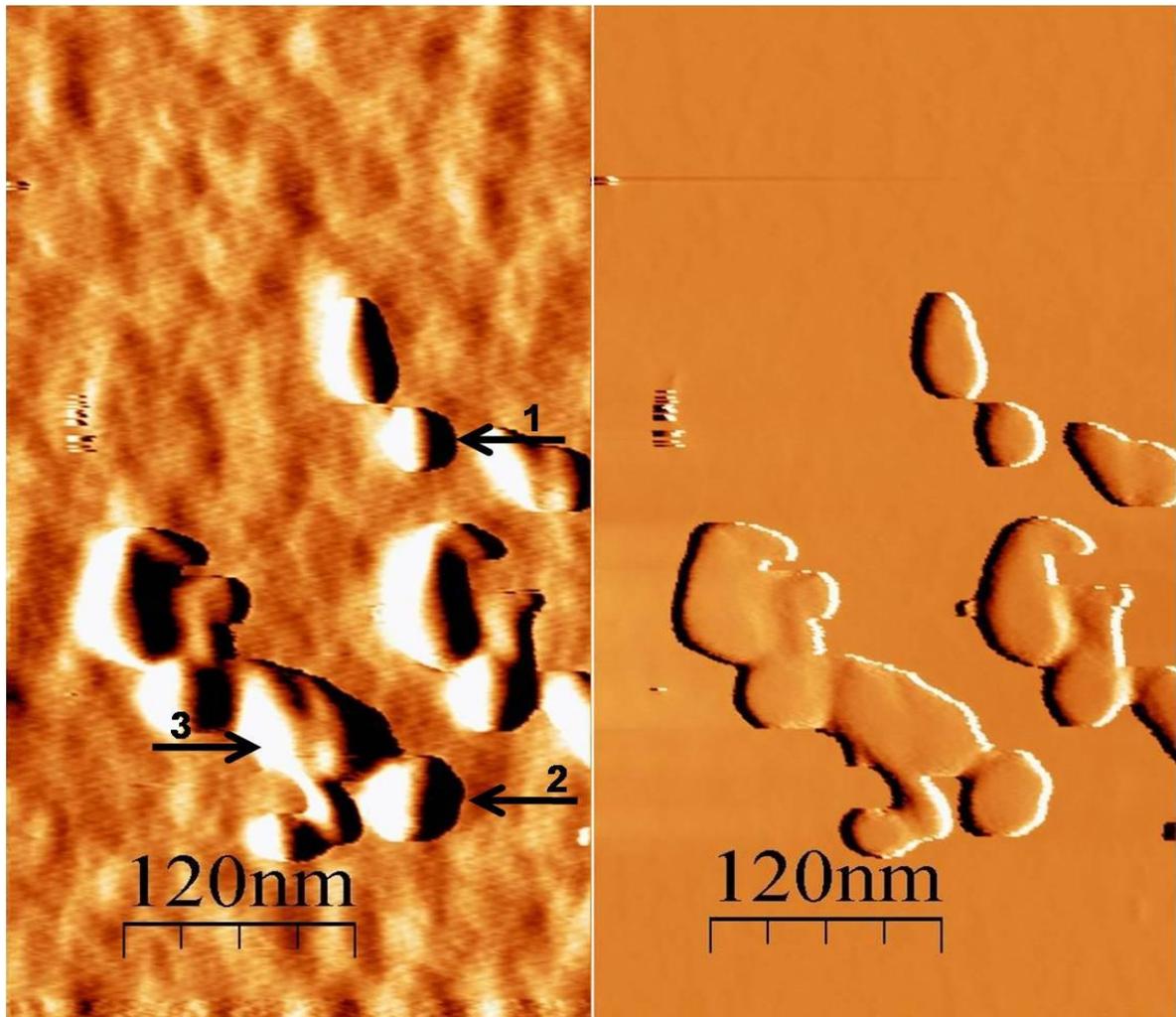


Abbildung 43: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 60 Minuten; Scanbereich: $0,6 \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $0,6 \mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024×1024 Pixel; Regelung: $P=10, I=0,4, D=0,1$; links: Höhenbild; rechts: Phasenbild.

In Abbildung 43 sieht man Partikel unterschiedlicher Größen: z.B. der bei dem Pfeil 1 gezeigte Partikel hat eine Breite von 27 nm und eine Höhe von 2,8 nm. Bei dem Pfeil 2 beträgt die Breite 32 nm und die Höhe 3,2 nm. Der dritte Pfeil zeigt auf ein Agglomerat, das wahrscheinlich aus zwei Partikel besteht mit einer Breite von 57 nm und einer Höhe von 3,4 nm.

4.6.3 Adsorptionszeit 120 Minuten

Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten scheint die Oberfläche äußerst glatt. Die berechnete RMS betrug 0,36 nm ($\pm 0,05$ nm n= 4), und der Z-Range 26,3 nm ($\pm 7,5$ nm n=4).

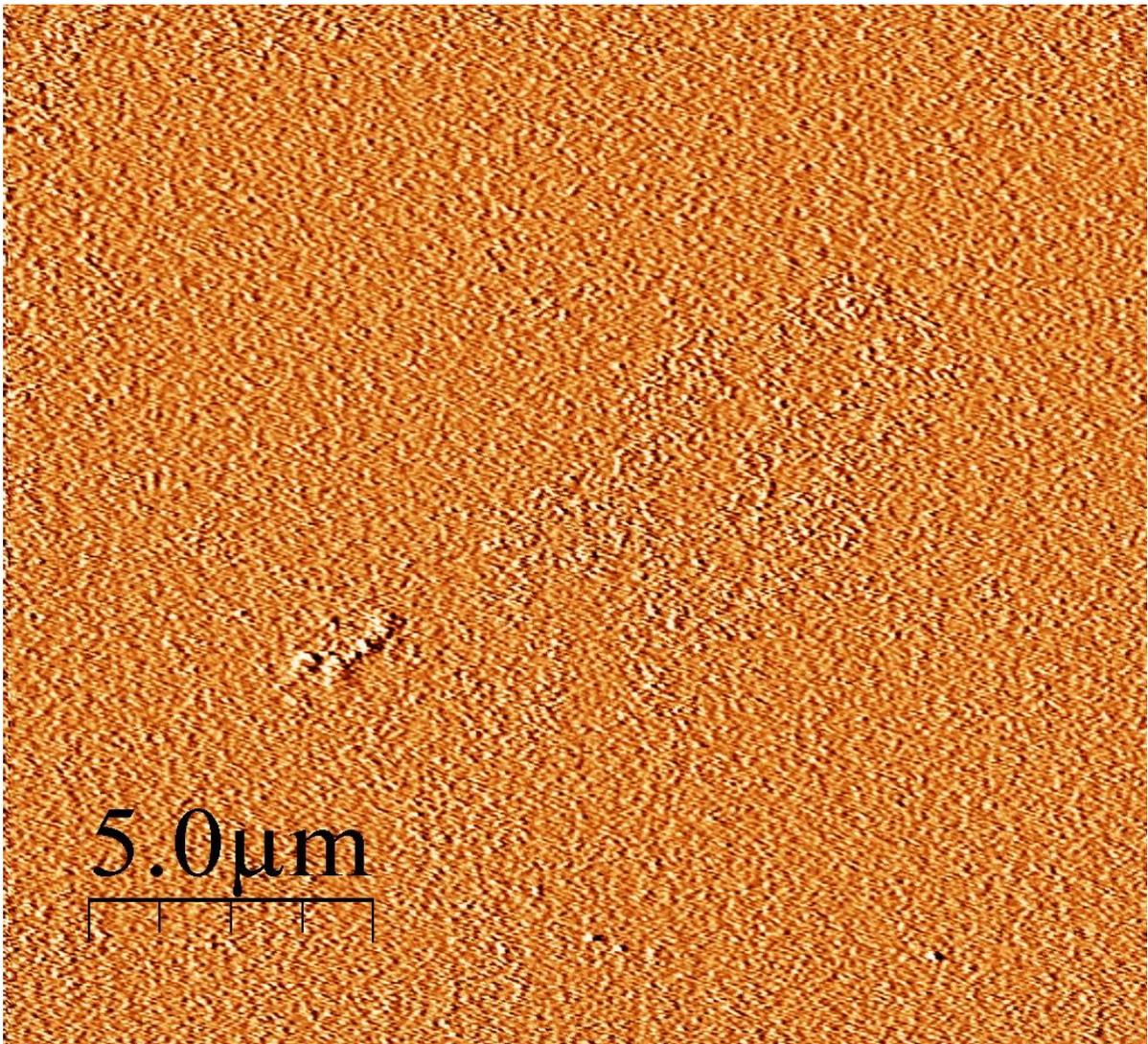


Abbildung 44: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronektinkonzentration: 20 nm; Inkubationszeit: 120 Minuten; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=0,6, D=0,1; Höhenbild.

In Abbildung 44 sieht man eine homogene Oberfläche mit nur einigen Agglomeraten.

Eine Vergrößerung eines Bereiches von 1 μm der Oberfläche nach 120 Minuten Fibronectinadsorption befindet sich in Abbildung 45. Die Rauigkeit des Bereiches

lag bei 0,27 nm ($\pm 0,02$ nm n=5), der Z-Range bei 4,5 nm ($\pm 0,8$ nm n=5) und das F/PF-Verhältnis bei 1,0032 ($\pm 0,0009$ n=5).

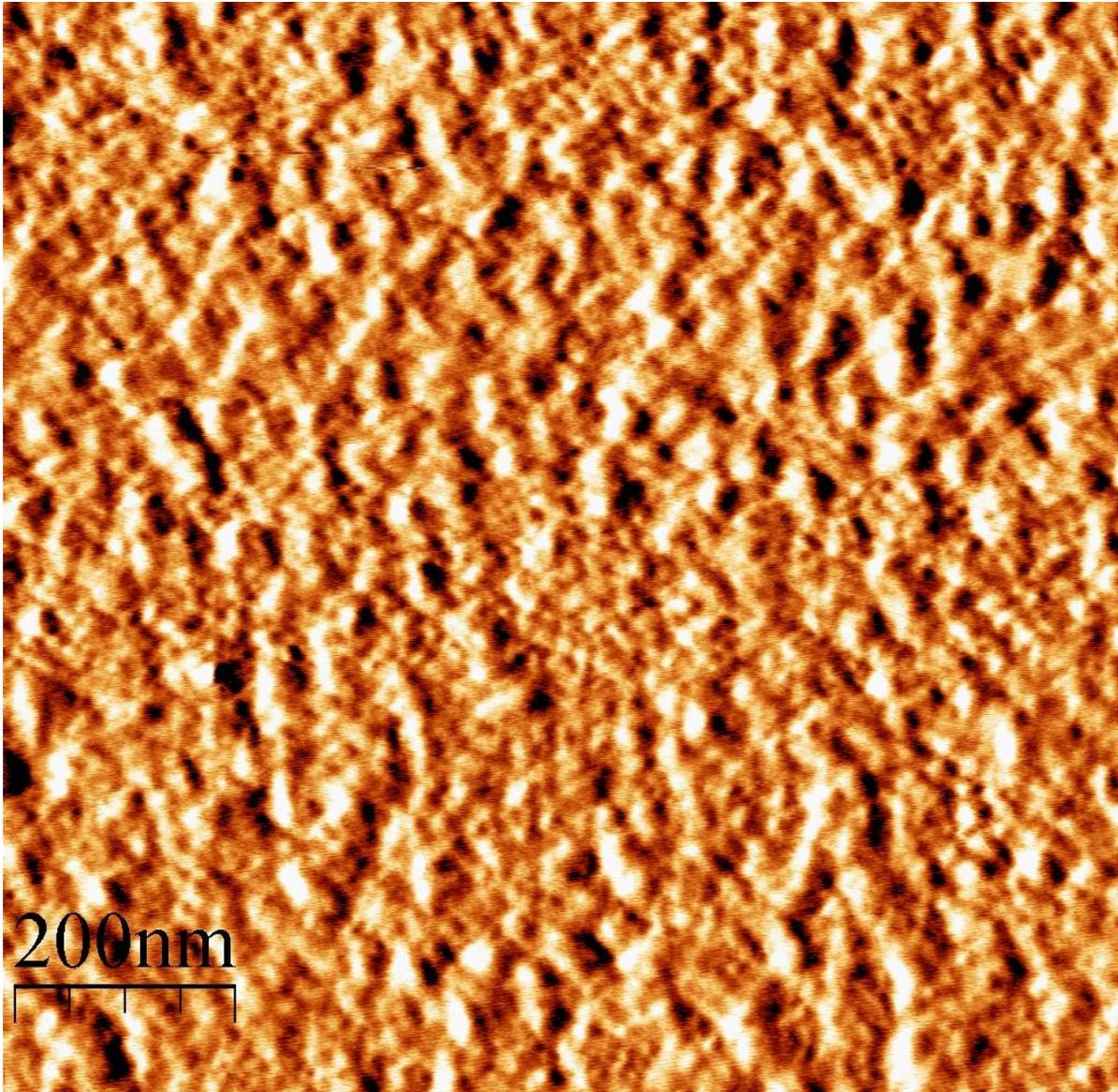


Abbildung 45: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 120 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=0,6, D=0,1; Höhenbild.

Die Abbildung 45 zeigt keine besondere Struktur der Oberfläche, sie besteht aus kleinen Partikeln, die im 3D-Bild (siehe Abbildung 46) deutlich zu sehen sind. Die Titan-Fibronectin-Misch-Schicht war im Phasenbild nicht mehr zu sehen.

Im 3D-Bild sieht man die kompakte Struktur der Oberfläche mit angesammelten Partikeln.

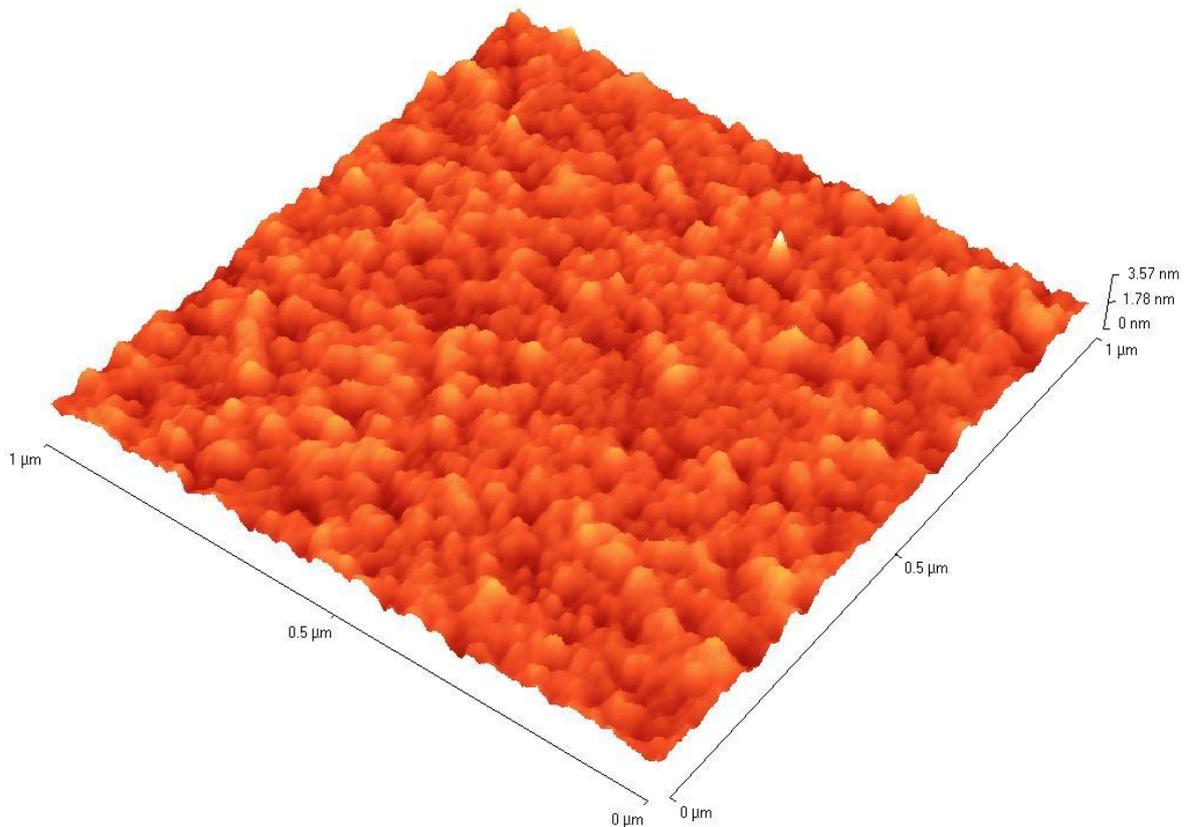


Abbildung 46: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 120 Minuten; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=0,6, D=0,1; 3D-Bild.

Die Abbildung 46 zeigt, dass die Oberfläche hauptsächlich aus Partikeln mit einer Höhe von circa 1 nm und einem Durchmesser von circa 20 nm besteht.

Eine weitere Titanprobe wurde nach dieser Fibronectinadsorptionsdauer (120 Minuten) mit 5 ml Wasser mit größter Vorsicht gespült. Alle anderen Proben waren mit einer Menge von circa 20-50 ml gespült worden. Die Visualisierung dieser Titanprobe zeigt verschlungene Fäden an der Oberfläche.

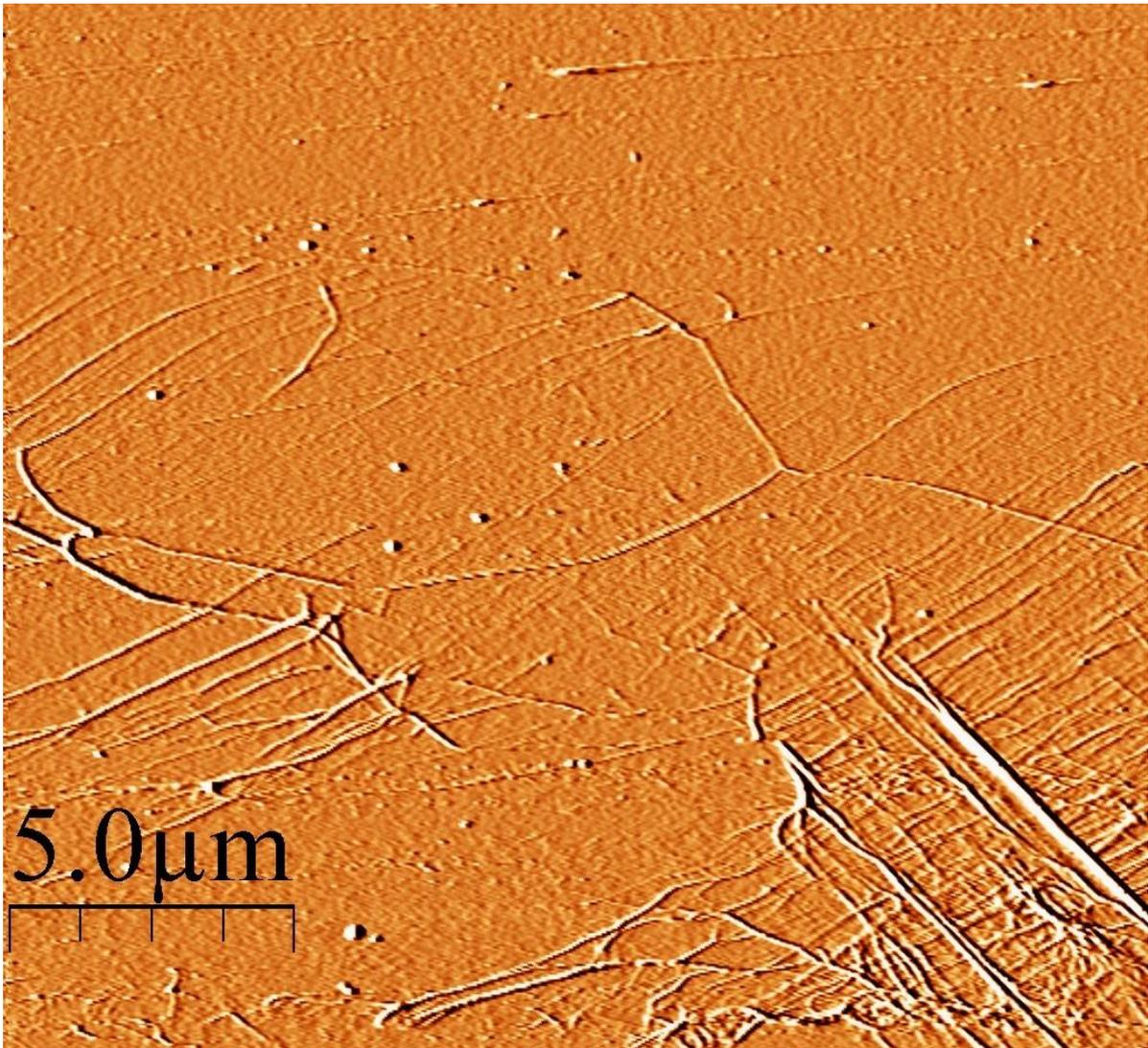


Abbildung 47: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Inkubationszeit: 120 Minuten; Spülung: 5 ml; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m}/\text{s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; Höhenbild.

Die Fäden haben eine Höhe zwischen 5 und 30 Nanometern, eine Breite zwischen 50 und 200 nm und eine Länge von einigen Mikrometern.

Eine Vergrößerung von 1 μm zeigt genauer die Fäden und der Oberfläche unterhalb:

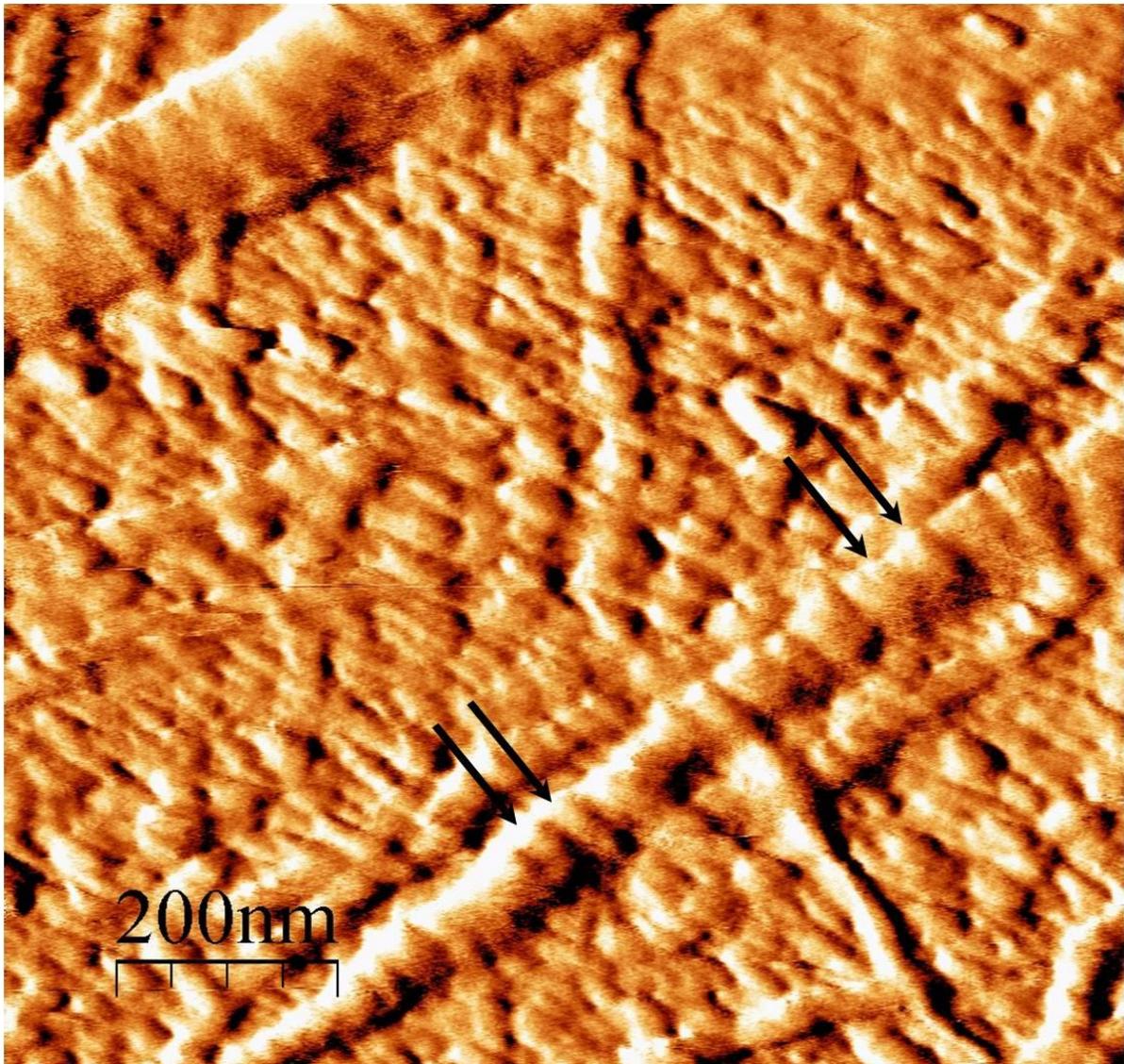


Abbildung 48: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Die Pfeile bezeichnen Untereinheiten der Fäden; Inkubationszeit: 120 Minuten; Spülung: 5ml; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; Höhenbild.

Die Struktur der Fäden zeigt Untereinheiten (Pfeile in Abbildung 48). Der Oberfläche unterhalb der Fäden besteht aus Partikeln eines Durchmessers von circa 20 nm wie in den Bilder nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten und 180 Minuten.

Im 3D-Bild ist deutlich zu sehen, dass die Fäden aus Untereinheiten bestehen. Diese Untereinheiten besitzen eine Höhe von circa 4 nm und eine Breite von circa 50 nm.

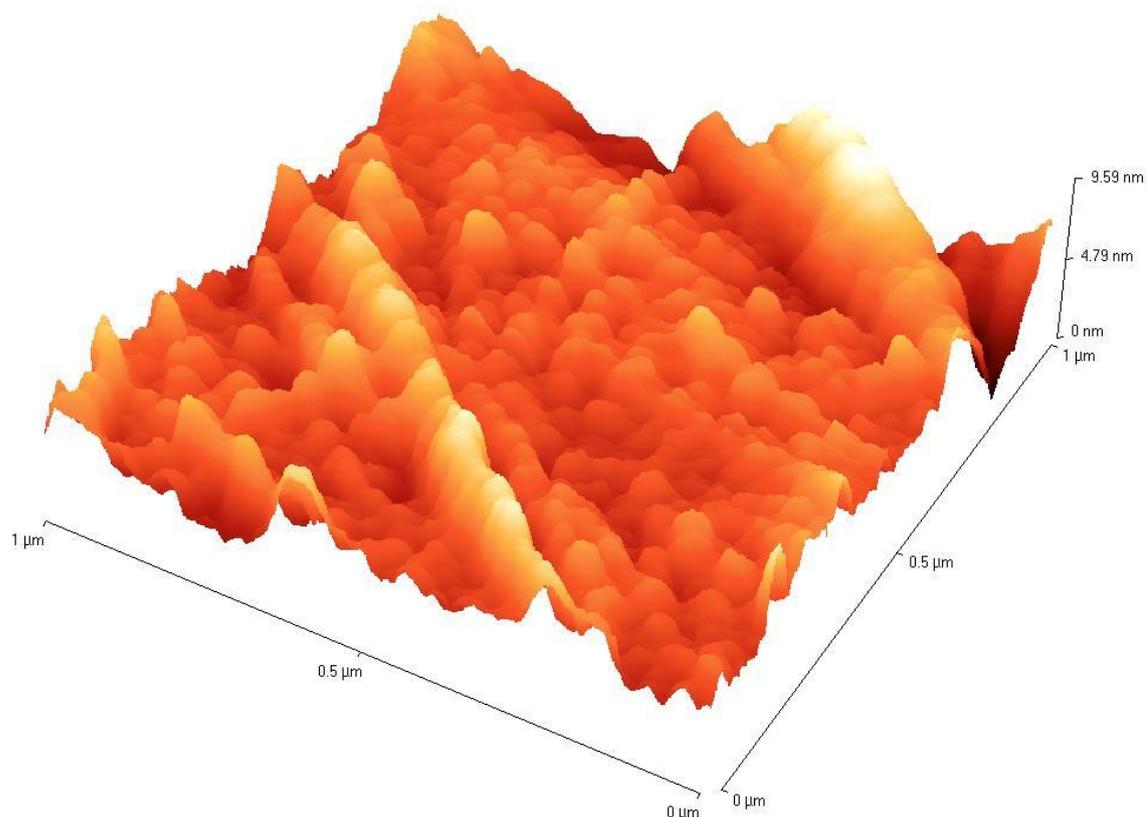


Abbildung 49: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Inkubationszeit: 120 Minuten; Spülung: 5ml; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; 3D-Bild.

Die Dimensionen der Partikel dieser Fäden sind ähnlich der Dimensionen der Partikel, die sich oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht nach 30 und 60 Minuten Inkubation befinden.

Nach den oben beschriebenen Messungen wurden diese Probe nochmals mit Wasser gespült (Diesmal mit 20 ml wie die anderen Probe). Die Spülrichtung war

genau festgelleet worden. Nach dieser Spülung wurde die Probe nochmals vermessen. Die Visualisierung zeigte folgendes Ergebnis:

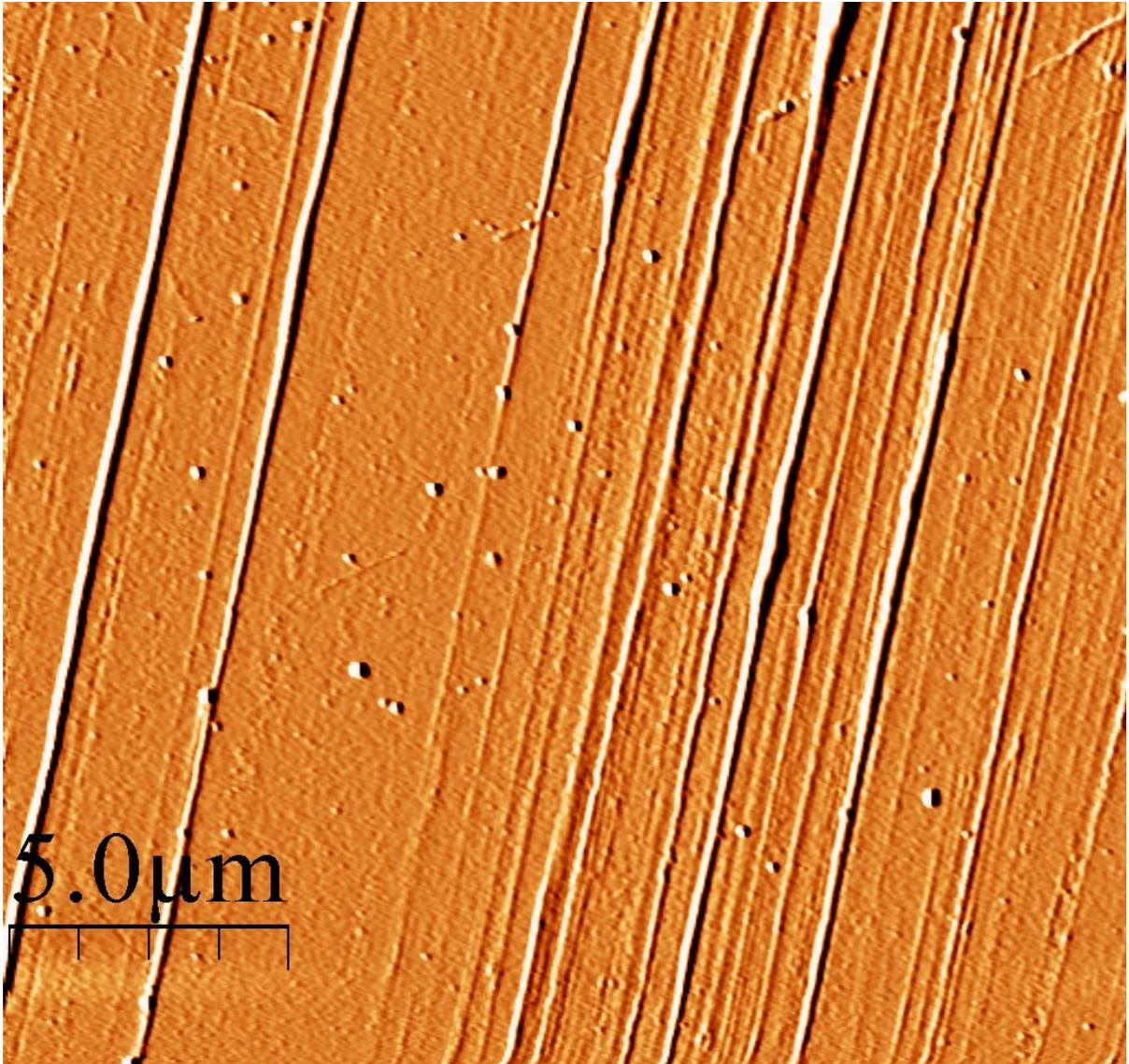


Abbildung 50: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronektin; Inkubationszeit: 120 Minuten; Spülung: ~20 ml; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=15, I=1, D=0,1; Höhenbild.

In Abbildung 50 ist die Spülrichtung von oben nach unten. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fäden nach der zweiten Spülung in der Spülrichtung ausgerichtet sind. Die Fäden sind also nicht fest an der Oberfläche gebunden.

4.6.4 Adsorptionszeit 180 Minuten

Fünf Bereiche von $20\ \mu\text{m}$ der Titanoberfläche nach einer Fibronektinadsorption von 180 Minuten wurden gemessen. Der RMS betrug $0,42\ \text{nm}$ ($\pm 0,08\ \text{nm}$, $n=5$) und der Z-Range $22,4\ \text{nm}$ ($\pm 16,4\ \text{nm}$, $n=5$).

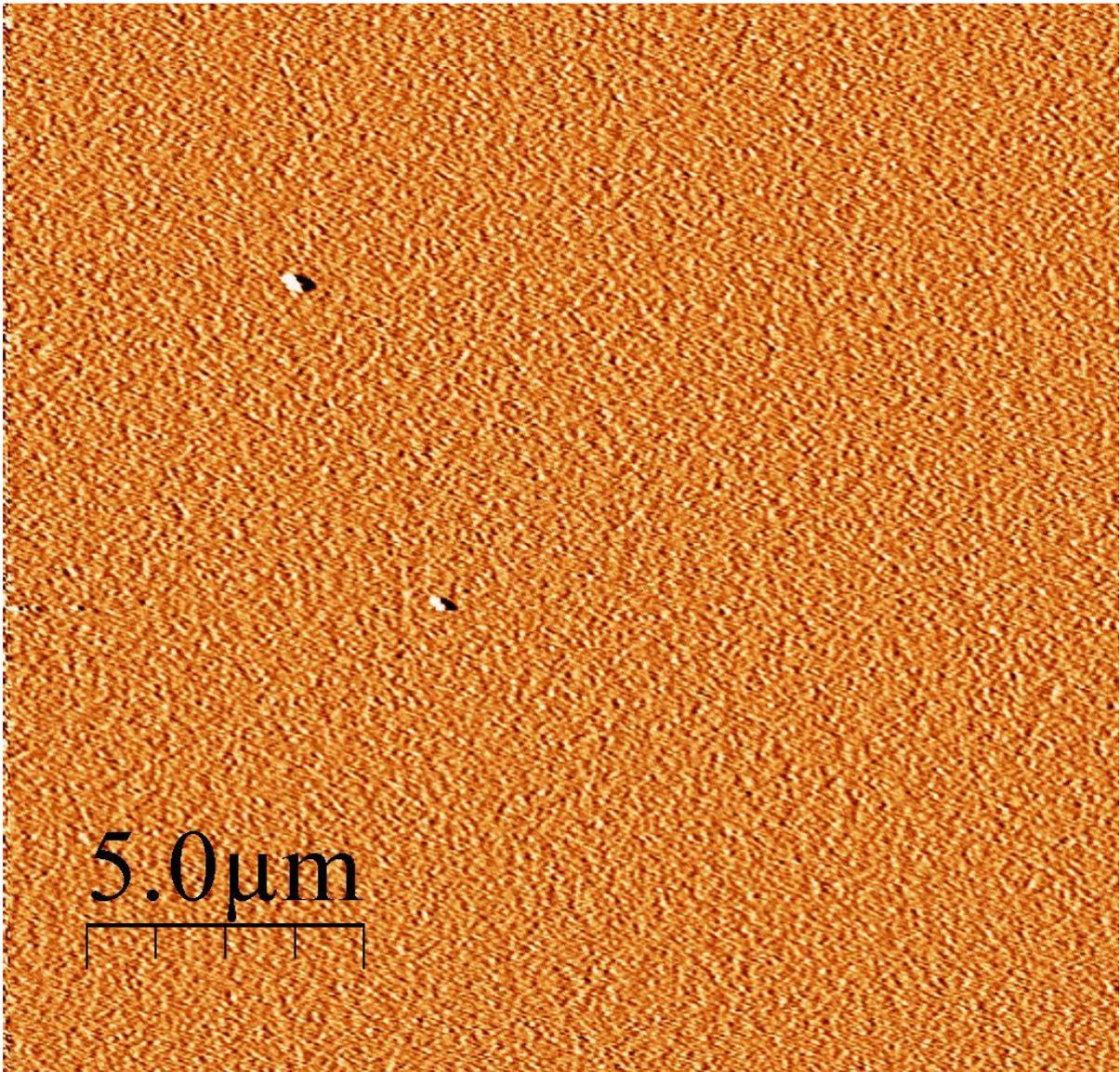


Abbildung 51 : Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronektin; Fibronektinkonzentration: $20\ \text{nM}$; Inkubationszeit: 180 Minuten; Scanbereich: $20\ \mu\text{m}$; Scangeschwindigkeit: $4\ \mu\text{m/s}$; Auflösung: 512×512 Pixel; Regelung: $P=15$, $I=1$, $D=0,1$; Höhenbild.

Nach einer 180 minütigen Fibronektinadsorption erscheint auch diese Oberfläche glatt und homogen. Agglomerate sind selten zu sehen aber die Oberfläche gleicht der nach 120 Minuten. Als Resultat für den 1 μm Scanbereich ergab sich ein RMS von 0,39 nm ($\pm 0,01$ nm, n=5), ein Z-Range 3,6 ($\pm 0,3$ nm, n=5) und ein F/PF-Verhältnis von 1,003 ($\pm 0,0016$, n=5).

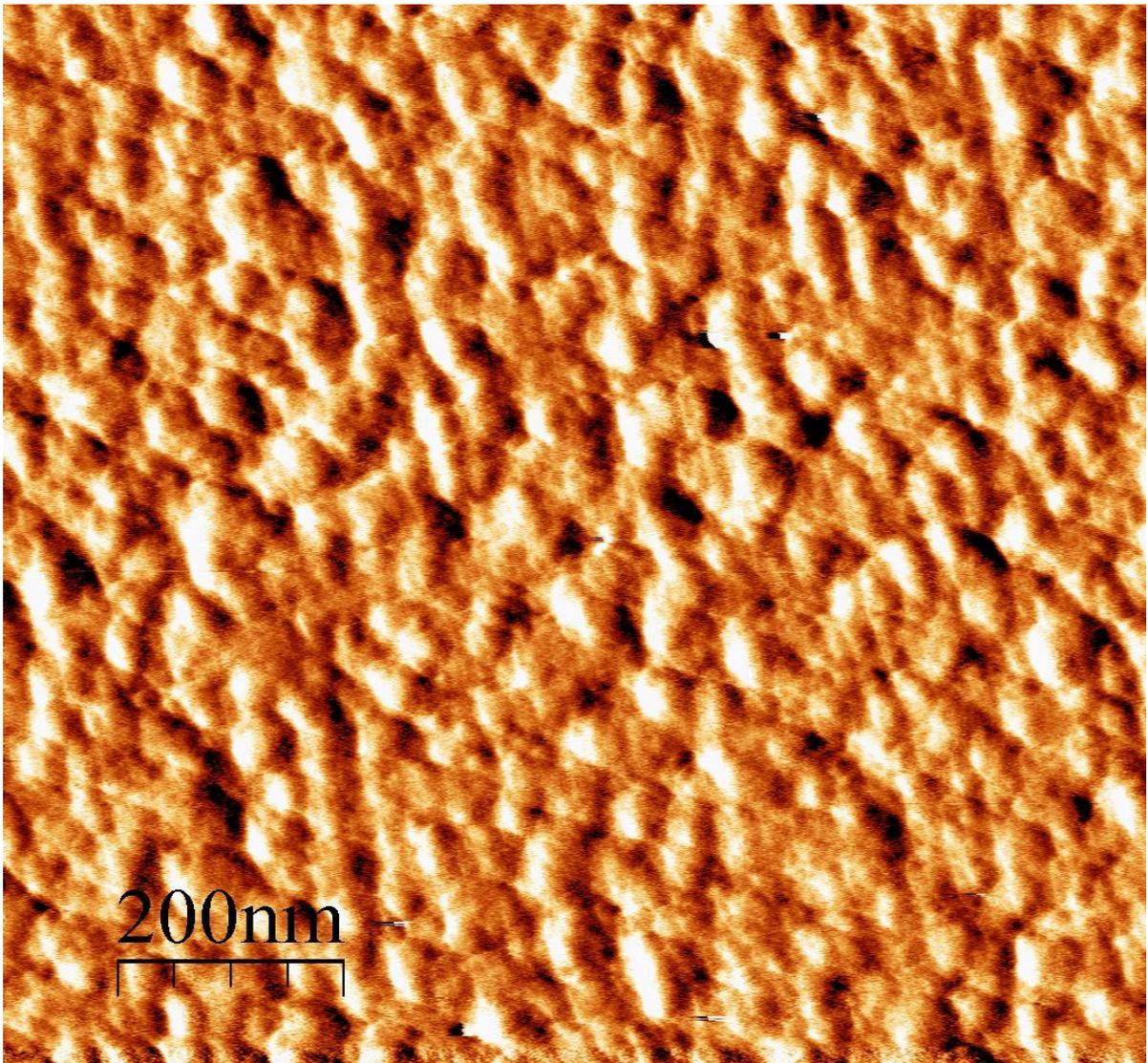


Abbildung 52: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronektin; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 180 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=10, I=1, D=0,5; Höhenbild.

Die Struktur der Oberfläche nach 180 Minuten besteht aus Partikel einer Breite zwischen 30 und 50 nm und einer Höhe zwischen 1 und 1,5 nm. Die Titan-Fibronektin-Misch-Schicht war im Phasenbild nicht mehr zu erkennen.

Das 3D-Bild zeigt die Struktur der Oberfläche, die sehr kompakt ist. Die Oberfläche sieht homogener als die mit einer Inkubationszeit von 120 Minuten aus. Jedoch weist diese eine höhere Rauigkeit auf.

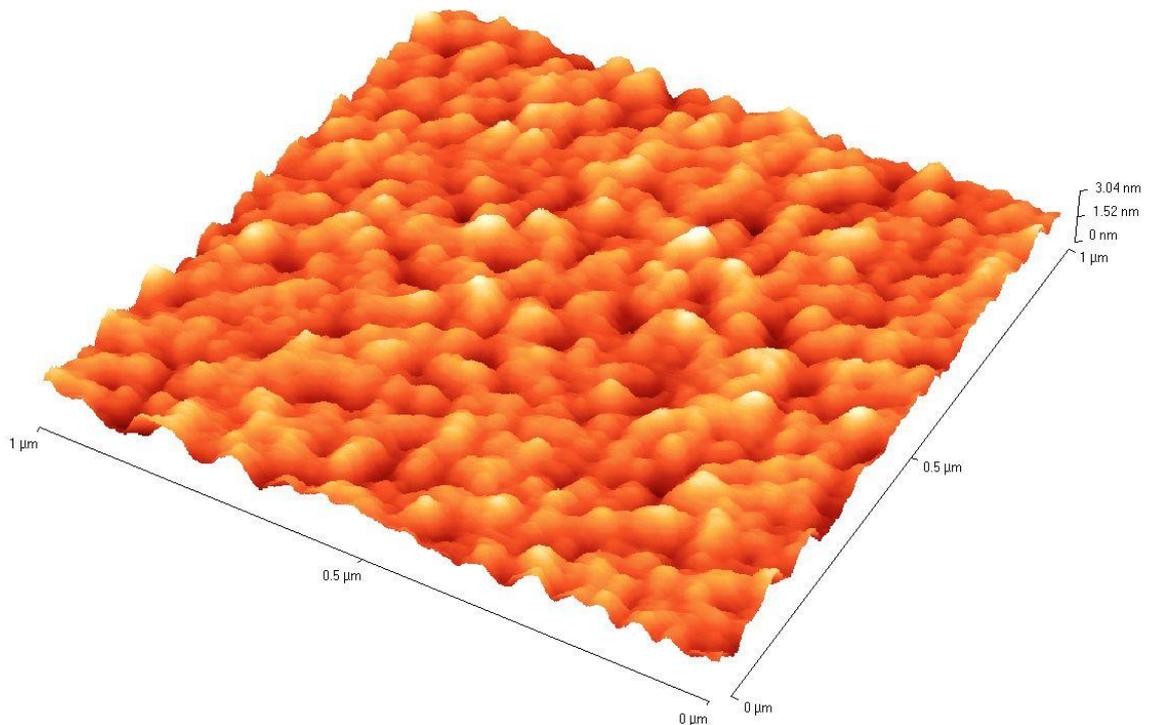


Abbildung 53 : Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronectinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit: 180 Minuten; Scanbereich: 1 µm; Scangeschwindigkeit: 1 µm/s; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=10, I=1, D=0,5; 3D-Bild.

In Abbildung 53 scheinen die Partikel wie eine Monolage angeordnet zu sein. Es sind keine kleineren Partikel, wie auf der Oberfläche bei einer Inkubationszeit von 120 Minuten (siehe Abbildung 46) zu sehen.

Eine weitere Probe wurde mit einer zehnmal höheren Fibronektinkonzentration (~200 nM) vorbereitet. Die Visualisierung dieser Probe zeigt, dass die Oberfläche wie der bei einer Konzentration von 20 nM aussieht. Trotzdem befinden sich mehr Agglomerate auf der Oberfläche als bei einer Konzentration von 20 nM.

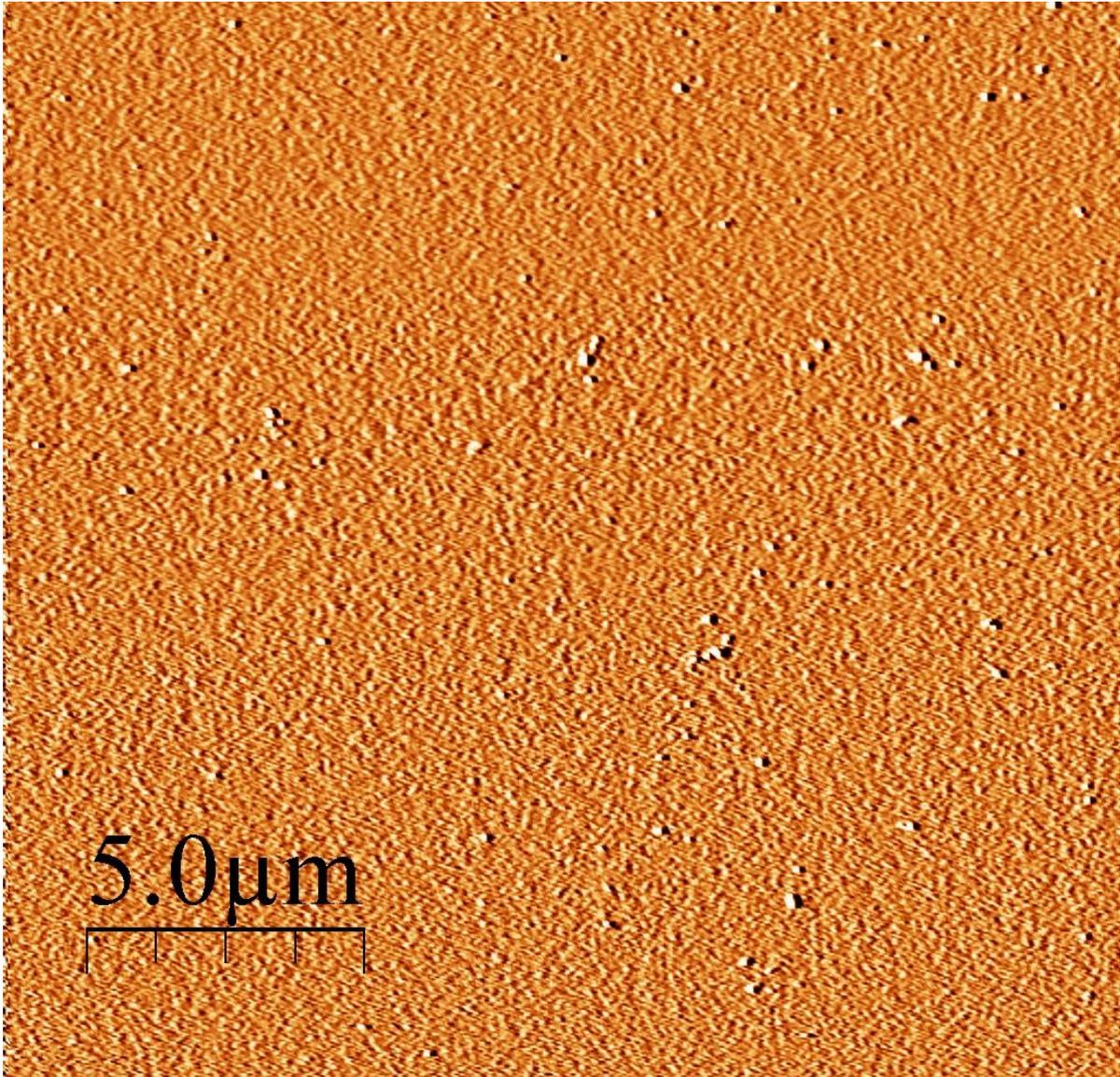


Abbildung 54: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronektin; Fibronektinkonzentration: 200 nM
Inkubationszeit: 180 Minuten; Scanbereich: 20 μm ; Scangeschwindigkeit: 4 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 512x512 Pixel; Regelung: P=15, I=0,8, D=0,1; Höhenbild.

Eine Vergrößerung von 1 μm zeigt, dass die Partikel, aus dem die Oberfläche hauptsächlich besteht, eine Höhe von circa 1 nm und eine Breite von circa 35 nm besitzen.

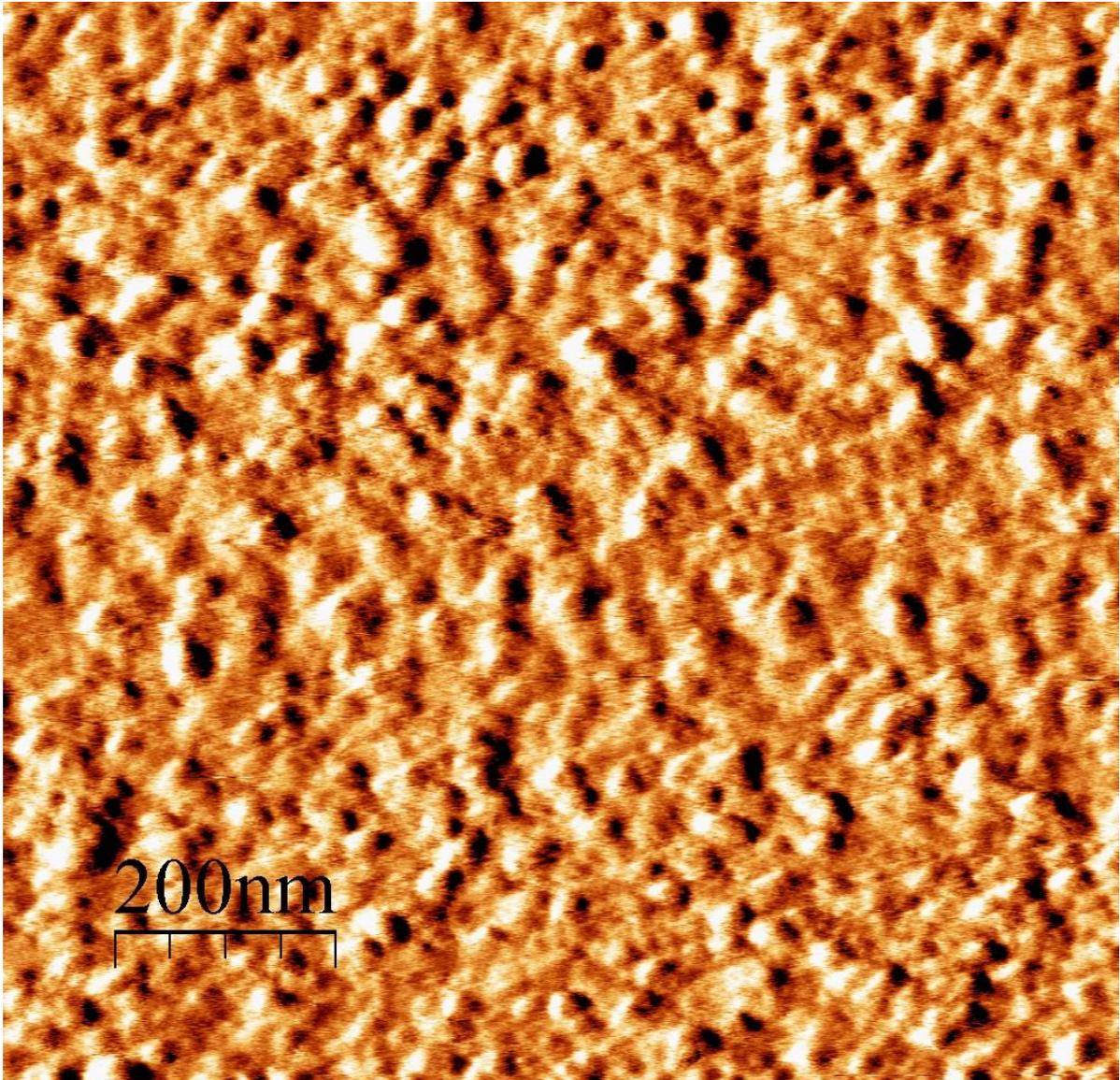


Abbildung 55: Titanoberfläche mit adsorbiertem Fibronectin; Fibronektinkonzentration: 200 nM; Inkubationszeit: 180 Minuten; Scanbereich: 1 μm ; Scangeschwindigkeit: 1 $\mu\text{m/s}$; Auflösung: 1024x1024 Pixel; Regelung: P=10, I=0,8, D=0,5; Höhenbild.

Die Rauigkeit der 1 μm Bereiche betrug 0,42 nm ($\pm 0,04$ nm n=5), der Z-Range 3,63 nm ($\pm 0,39$ nm n=5) und das F/PF-Verhältnis 1,0034 ($\pm 0,0003$). Diese Werte und auch die Dimensionen der Partikel entsprechen denen der Partikel des Adsorptionsversuchs einer Fibronektinkonzentration von 20 nM.

4.6.5 Veränderung der Rauigkeit in Abhängigkeit der Inkubationszeit des Fibronektins

Der Zusammenhang zwischen der Rauigkeit und der Inkubationszeit der Titanproben wird in Abbildung 56 dargestellt. Die Darstellungen des Z-Range und des F/PF-Verhältnis befinden sich im Anhang 7.3.

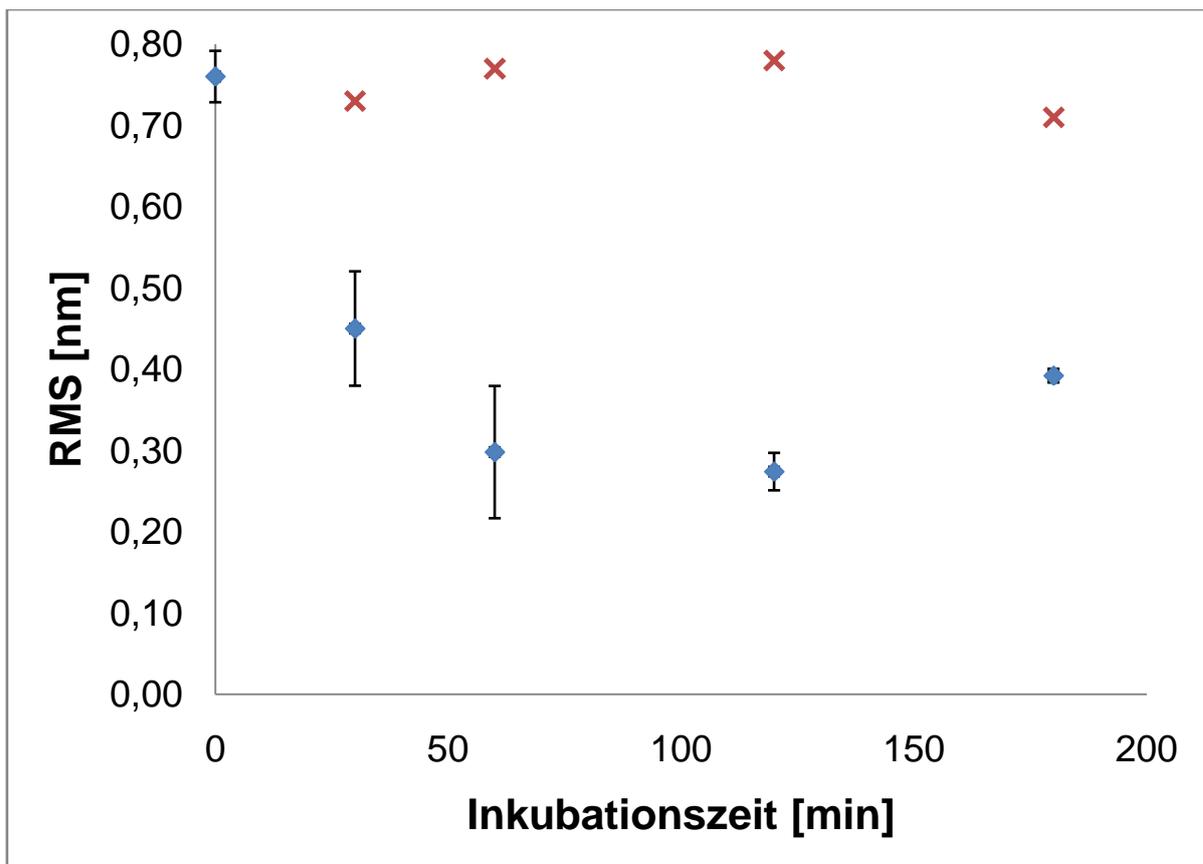


Abbildung 56: Rauigkeit (für die 1 μm Bereiche) den Titanproben in Abhängigkeit der Fibronektininkubationszeit; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen jedes Punktes; die Kreuze bezeichnen die Rauigkeit jeder Titanprobe vor der Fibronektinadsorption.

In Abbildung 56 sieht man, dass der RMS der Titanoberfläche (Inkubationszeit gleich Null) ist viel höher als die der anderen Proben. Sie beträgt ca. 0,8 nm. Man merkt eine starke Verkleinerung der RMS zwischen 0 und 60 Minuten bis zu ca. 0,3 nm. Dieses Minimum wird zwischen 60 und 120 Minuten erreicht und die RMS erhöht sich nochmals bis zu ca. 0,4 nm für die Probe nach 180 Minuten. Die höhere Standardabweichungen der Punkte nach 30 und 60 Minuten entsprechen den Oberflächen, in denen Agglomerate und Partikel oberhalb der Titan-Fibronektin-

Misch-Schicht zu sehen waren. Die Rauigkeit der Titanproben (Kreuze in Abbildung 56) war vor jeden Fibronectinadsorptionsversuch gemessen worden, um zu überprüfen, ob sich die Rauigkeit der Titanoberfläche von Probe zu Probe ändert.

4.7 Diskussion

Der Vergleich der Bilder der Titan- und der Waferoberfläche erlaubt es, das Ergebnis des Sputterns zu erkennen. Tatsächlich wird die Oberfläche viel rauer nach dem Sputtern und die Partikel der Waferoberfläche sind viel kleiner als die Partikel der Titanschicht.

Die Beobachtung der Rauigkeit der Titanoberfläche vor und nach der Fibronectinadsorption zeigt den Erfolg des Adsorptionsprozesses. Die Rauigkeit verkleinert sich sehr stark von 0,8 bis circa 0,3 zwischen dem Anfang des Versuchs und nach 60 Minuten. Dann bleibt sie konstant bis zu einer Inkubationszeit von 180 Minuten. Tatsächlich erhöht sich die Rauigkeit leicht zwischen 120 und 180 Minuten, aber dieser Anstieg kann vernachlässigt werden im Vergleich zu dem enormen Sprung der RMS, welcher direkt nach dem Adsorptionsanfang auftritt.

Nach den Adsorptionsuntersuchungen scheint es, als ob dass Fibronectin auf der untersuchten gesputterten Oberfläche eine kugelförmige Struktur besitzt. Der Durchmesser der Fibronectinmoleküle liegt bei ca. 30 nm und die Höhe bei ca. 2 nm. Diese Dimensionen wurden auf Basis der isolierten Partikel, die oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht zu sehen waren, gemessen (siehe Abschnitt 4.6.1 und 4.6.2). Es ist jedoch zu bedenken, dass die Genauigkeit des Scanners nicht exakt bestimmt werden konnte (siehe Abschnitt 4.2). Die in dieser Arbeit gegebenen Dimensionen müssen also mit Vorsicht betrachtet werden. Die Dimensionen des Fibronectins nach einer Adsorption von 120 und 180 Minuten sind schwieriger zu bestimmen, da die Fibronectinschicht sehr kompakt ist und die Konturen der Partikel nicht deutlich zu erkennen sind.

Diese Form und Dimensionen konnten mit der Untersuchung von *Zenhausen et al* [Zen93] sowie mit der von *MacDonald et al* [Mac98] und der von *Sousa et al* [Sou07] verglichen werden. Diese drei Untersuchungen zeigen, dass das Fibronectin auf unterschiedlichen Titanoberflächen unterschiedliche Dimensionen beträgt. *Zenhausen et al* haben Fibronectin auf dünnenverdampfter Titanschicht untersucht und Dimensionen von 32 nm (Breite) und 2 nm (Höhe) gemessen. Die Untersuchung von *MacDonald* war auf glatt geschliffenem Titan und die Ergebnisse waren eine Breite von 16 nm und eine Höhe von 2,5 nm. Nach der Untersuchung von *Sousa* betragen die Dimensionen des Fibronectins auf gesputtertem Titan schließlich 55 nm (Breite) und 4.6 nm (Höhe).

Der Adsorptionsversuch mit gering benutzter Wasserspülmengemenge (siehe Abschnitt 4.6.3) zeigt Fäden auf der Probenoberfläche, die aus Partikel ähnlichen Dimensionen wie die Fibronectinmoleküle bestehen. Diese Fäden wurden nicht beobachtet, wenn die Wasserspülmengemenge höher war, da sie nicht mit der Oberfläche fest verbunden waren. Es ist also wahrscheinlich, dass diese Fäden in der Lösung ausgebildet wurden und sich auf der Oberfläche gelegt haben, wenn das Lösungsmittel verdampft ist. Diese Fäden könnten Fibronectin in einer Fibrillenform sein. Eine Fibrille besteht aus einer Verkettung mehrerer Fibronectinmoleküle in kompakter Form, die in Lösung selbst-agglomeriert wurden [Eri02]. Weitere Versuche, um dies zu bestimmen, wurden leider nicht durchgeführt.

4.7.1 Schritte des Adsorptionsprozesses

Unter Berücksichtigung der Veränderung der Rauigkeit während des Adsorptionsprozesses und beim Vergleich der Bilder vor und nach dem Adsorptionsversuch auf der Titanoberfläche ist es möglich, dass der Adsorptionsprozess hauptsächlich aus zwei unterschiedlichen Schritten besteht. Der erste Schritt geschieht in den ersten 30 Minuten. Während dieser Zeit scheint Fibronectin die Lücken der Titanschicht, die ungefähr die gleichen Dimensionen wie sie selbst besitzen, auszufüllen und einen starkes Absaken der Rauigkeit zu verursachen. Die Untersuchung der Probe nach 30 Minuten zeigt einige Stellen der Oberfläche, die komplett ausgefüllt sind und isolierte Fibronectinmoleküle oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht adsorbiert sind. Andere Stellen sind nicht komplett ausgefüllt und die Titanstruktur ist noch zu erkennen. Diese Probe kann als eine Grenze vor dem nächsten Schritt angenommen werden. Ab 30 Minuten beginnen die Fibronectinmoleküle oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht zu agglomerieren. Dies führt zu den großen Agglomeraten, die nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten auf der Oberfläche zu erkennen sind.

Als zweiter Schritt kann also vermutet werden, dass die Agglomerierung von Fibronectin zu sehr breiten Agglomeraten führt, die eine weitere Schicht erzeugen. Diese geschlossene Schicht könnte diejenige sein, welche ab 120 Minuten zu sehen ist. Allerdings besteht die Oberfläche nach dieser Inkubationszeit nur aus einer homogenen festen Schicht. Keine Agglomerate, die eine noch weitere Lage formen

könnten, wurden auf dieser Schicht beobachtet und die Visualisierung der Oberfläche nach 180 Minuten zeigt ähnliche Ergebnisse als der Versuch nach 120 Minuten. Deshalb kann man vermuten, dass beide Versuche die gleiche Schicht zeigen. Dagegen spricht der Fakt, dass die Rauigkeit sich zwischen 120 und 180 Minuten leicht erhöht.

Der Adsorptionsversuch nach 180 Minuten und mit einer Fibronektinkonzentration von 200 nM anstatt 20 nM zeigt nichts Besonderes außer, dass sich mehrere Agglomerate auf der Oberfläche bilden. Es scheint so, als ob die ausgebildete Schicht mit 200 nM ähnlich der mit 20 nM ist. Auf Grund dieser einzigen Untersuchung kann nicht vermutet werden, dass die beobachtete Schicht diejenige ist, die ab 120 Minuten auf den Proben mit einer 20 nM Fibronektinkonzentration beobachtet wurde. Tatsächlich ist es möglich, dass während der Adsorptionszeit sich mehr als eine weitere Schicht ausbildet, nachdem die Konzentration erhöht wurde.

Die SPR-Untersuchung, auf deren Basis die Inkubationszeiten gewählt worden waren, zeigt nicht, dass der Adsorptionsprozess aus zwei erkennbaren Schritten besteht (siehe Abschnitt 4.1.4). Man sieht trotzdem, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit nach circa 60 Minuten abnimmt und dass die adsorbierte Menge ab 120 Minuten nur leicht steigt. Dies passt gut mit den oben beschriebenen Schritten des Adsorptionsprozesses zusammen: Die erste Schicht erlaubt eine große Menge an Molekülen zu adsorbieren, da viele Stellen auf der Titanschicht zur Verfügung stehen und so die Adsorptionsgeschwindigkeit hoch ist. Dann verlangsamt die Agglomerierung der Proteine oberhalb der Titan-Fibronectin-Mischschicht die Adsorption bis die Schicht komplett geschlossen ist. Wenn eine geschlossene Schicht erreicht wird, ändert sich die Menge des adsorbierten Fibronectin nicht mehr und die Kinetikmessung geht in ein Plateau über. Schließlich soll man anmerken, dass die Messbedingungen des SPR-Versuchs unterschiedlich waren (Titanschicht auf einem Glassubstrat und Messung in einer PBS-Lösung) die dessen AFM.

4.7.2 Einfluss der Spülung

Der Einfluss der Spülung ist zuerst während des Adsorptionsversuchs mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten bemerkt worden. Die Visualisierung dieser Probe (siehe Abschnitt 4.6.2) zeigt langförmige Agglomerate, die in Spülrichtung angeordnet sind. Das bedeutet nicht nur, dass die Form der Agglomerate von der Spülrichtung abhängt, sondern auch, dass die Menge der adsorbierten Moleküle von der Menge des Spülmittels beeinflusst wird. Eigentlich sollte ein Agglomerat ursprünglich kugelförmig sein. Um langförmig zu werden, sollten sich einige Partikel des Agglomerats durch die Spülung bewegen. Wenn sich diese Partikel an der Oberfläche während der Spülung bewegen, könnte es sein, dass einige von der Oberfläche abgetrennt werden. Dies bedeutet auch, dass das Fibronectin, das sich oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht befindet, nicht fest mit der Schicht gebunden ist.

4.7.3 Einfluss der Scangeschwindigkeit

Es wurde vermutet, dass sich die RMS in Abhängigkeit von der Scangeschwindigkeit verändert sollte. Je höher die Scangeschwindigkeit ist, desto schwieriger ist es für den Scanner, den Verlauf der Oberfläche genau zu folgen. Die Rauigkeit sollte sich verringern, wenn die Scangeschwindigkeit erhöht wird, da die Spitze weniger Zeit hat, um in die Lücken der Oberfläche vorzudringen. Dies wurde durch die Messung der Goldoberfläche mit Scangeschwindigkeiten von 1, 2.5, 5 und 10 $\mu\text{m/s}$ untersucht. Diese Versuche zeigten, dass keine bedeutsame Veränderung der RMS in Abhängigkeit von der Scangeschwindigkeit zu bemerken ist (siehe Abschnitt 4.3). Tatsächlich betrug die Rauigkeit immer circa 1,5 nm. Eine Erklärung dafür ist, dass die Rauigkeit der Goldoberfläche so groß ist, um durch Veränderung der Scangeschwindigkeit eine Änderung in der Rauigkeit festzustellen.

Eine Veränderung der Rauigkeit wurde trotzdem für jede andere Proben bemerkt. Alle Oberflächen außer der Goldoberfläche wurden mit zwei unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten gemessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 4 $\mu\text{m/s}$ für die 20 μm Bereiche und 1 $\mu\text{m/s}$ für die 1 μm Bereiche. Die RMS betrug meistens einen höheren Wert für die höchste benutzte Scangeschwindigkeit. Dies kann dadurch erklärt werden, dass auf den meisten Oberflächen Agglomerate zu sehen waren und unterschiedliche Scanbereiche vermessen wurden. Tatsächlich ist die Wahrscheinlichkeit grösser Agglomerate zu treffen, wenn der Bereich der Messung grösser ist als bei kleineren. Deshalb wurde diese Rauigkeitsveränderung wahrscheinlich wegen der Grössenveränderung des Scanbereiches statt der Scangeschwindigkeit verursacht. Diese Konsequenz ist deutlich zu sehen auf Basis der Messungen der Rauigkeit der Titanprobe und der Probe nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Es waren sehr viele Agglomerate auf der Oberfläche der Adsorptionsversuchsprobe zu sehen und die Rauigkeit war für den 20 μm Bereich viel höher als für den 1 μm . Auf den Titanproben wurden keine Agglomerate beobachtet und die Rauigkeit war für den 20 μm Bereich kleiner als die für den 1 μm Bereich. Die gewählte Rauigkeit, um die verschiedenen Oberflächen genau zu charakterisieren und zu vergleichen ist die von den 1 μm Scanbereichen, da die Agglomerate die Messung der Rauigkeit stören.

Folgende Einflüsse der Scangeschwindigkeit waren zusätzlich bemerkt worden: Es wurde eine Verschiebung zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtssignals des Profils

der Oberfläche beobachtet. Es sieht so aus, als ob diese Verschiebung sich in Abhängigkeit von der Scangeschwindigkeit erhöht. Betrug die Verschiebung diejeniger Geschwindigkeit von $1\ \mu\text{m/s}$ circa 20 nm und erhöhte sich manchmal bis zu 100 nm unter Anwendung einer Geschwindigkeit von $4\ \mu\text{m/s}$. Eine Konsequenz von diesen zu hohen Scangeschwindigkeiten war, dass die Partikel länglich aussahen und aus einem kugelförmigen Vorderteil und einem länglichem Hinterteil parallel zur Scanrichtung bestanden.

4.7.4 Einfluss der Einstellung der Regelung

Der Einfluss der Regelung wurde nicht direkt untersucht, aber ein paar Konsequenzen der Veränderung der Einstellung wurden trotzdem bemerkt. Die meisten Messungen wurden mit folgenden Parametern des PID-Reglers eingestellt:

- Proportionale Parameter: $P= 15$
- Integrale Parameter: $I= 1$
- Differenziale Parameter: $D= 0,1$

Die Messungen der Gold-, Wafer- und Titanoberflächen wurden mit anderen Parametern gemessen, da sie noch am Anfang dieser Arbeit durchgeführt worden waren. Der $D=0,1$ wurde so klein gewählt, da er theoretisch eine Wirkung auf dem Signal haben soll (siehe Abschnitt 2.2.5) und trotz keiner bedeutsamen Wirkungen von einer Veränderung den D bemerkt worden war. Der Parameter P wurde auch optimiert. Es wurde festgestellt, dass je höher der Wert ist, desto schärfer die Konturen des Profils der Oberfläche dargestellt werden. Wurde P jedoch zu groß eingestellt, schwingt sich das Signal auf, was im Bild Rauschen verursachte. P wurde meistens mit einem Wert von 15 oder ein bisschen kleiner eingestellt. Die Einstellung eines hohen P 's beeinflusst auch die Verschiebung zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtssignal negativ. Die Schwingung des Signals wurde ebenfalls unter Anwendung von einem zu hohen I (größer als 1) bemerkt. Die Einstellung dieses Parameters wurde ähnlich durchgeführt wie die des P 's. Zusätzlich hängt I stark von P ab: je kleiner P ist, desto kleiner muss I gewählt werden, um Schwingungen zu vermeiden.

Die oben beschriebenen Einstellungen ändern sich schrittweise und hängen von der gemessenen Oberfläche (Veränderung der Rauigkeit) und der Scangeschwindigkeit ab. Sie sind trotzdem ein guter Ausgangspunkt, um eine unbekannte Oberfläche zu visualisieren.

4.7.5 Einfluss der Einstellung des Setpoints

Die Einstellung der Resonanzfrequenz, insbesondere des Setpoints, spielt eine sehr wichtige Rolle in der Qualität der in dieser Arbeit vorgestellten Messungen. Die Ergebnisse, die in diesem Abschnitt vorgestellt wurden, beruhen auf der Beobachtung von vielen Messungen unter Berücksichtigung der Erfahrung mit der AFM.

Die Resonanzfrequenz wurde nach jedem Wechseln der Spitze und auch jedes Mal, wenn das Gerät wieder eingeschaltet wurde, eingestellt. Die Ergebnisse der Einstellung der Resonanzfrequenz entsprechen den Angaben des Herstellers: zwischen 75 und 85 kHz für die Force-Modulation-Spitzen; zwischen 280 und 330 kHz für die Tapping-Mode-Spitzen. Es wurde nicht bemerkt, dass sich die Resonanzfrequenz einer Spitze verändert, außer bei Beschädigung einer Spitze. Der Setpoint wurde während des Messungstags in einigen Fällen nochmals eingestellt. Es wurden Veränderungen der Einstellung des Setpoints in drei Fällen durchgeführt:

Während des ersten Scans mit einer neuen Spitze; bei Veränderungen der Raumtemperatur und drittens wenn die Oberfläche nicht ausreichend getrocknet wurde. Erstes konnte beobachtet werden, als die Resonanzfrequenz zwischen zwei Scans nochmals eingestellt wurde. Wenn die Messung wiederholt wurde, verringerten sich die maximale Amplitude und auch der Setpoint. Manchmal war die Verringerung so groß, dass die Spitze nicht mehr die Oberfläche traf. Um dieses Problem zu lösen, wurde die Drive-Amplitude der Autotuning-Parameter (siehe Anhang 7.6) erhöht, bis der Setpoint immer im Bereich von 1,3 - 2,0 V lag, welches der Setpoint-Bereich des Autotuning für die Tapping-Mode-Spitze ist. In dieser Arbeit dargelegten Bilder sind zu größten Teil unter diesen Bedingungen gemessen worden.

Der zweite Fall wurde bei starken Veränderungen der Raumtemperatur beobachtet. Die Raumtemperatur schwankte zwischen 26°C am Morgen und 19°C am Ende des Nachmittags eines Messungstags. Unter solchen Bedingungen musste die Einstellung mehrmals pro Tag wiederholt werden, weil die Spitze wegen der Veränderung der Temperatur nicht mehr die Oberfläche traf. Es wurde festgelegt, dass mit Zunahme der Raumtemperatur die maximale Amplitude sowie der Setpoint erhöht wurden. Die Drive-Amplitude wurde bei Temperaturabnahme erhöht, bis der Setpoint in dem oben beschriebenen Bereich lag. Die meisten Messungen

wurden bei stabilen Temperaturen (22-23 °C) durchgeführt, insgesamt wurde festgestellt, dass bei kalten Temperaturen eine höhere Auflösung erreicht wurde, da das Hintergrundrauschen des Signals sehr gering war.

Der dritte Fall wurde bei Messungen von nicht ausreichend getrockneten Titanproben beobachtet. Die Titanprobe wurde direkt nach der Nachttrocknung dem Vakuumtrockenschrank entnommen und sofort gemessen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Spitze manchmal an der Oberfläche haftete, was häufig bei feuchten Oberflächen vorkam. Sind Lücken im Höhenbild sowie im Phasenbild an den gleichen Stellen und zur gleichen Zeit erkennbar, stellt dies ein Merkmal für das Anhaften der Spitze da. Diese Lücken sehen wie ein sehr starker Sprung im Profil beider Signals aus. Nach einem zweiten Nachttrocknen im Vakuumtrockenschrank wurde dieses Phänomen nur noch selten beobachtet. Dieses Problem zeigte sich nicht bei Messungen der Waferprobe, obwohl die Waferoberfläche sehr viel hydrophiler als die Titanoberfläche ist. Die Kontaktwinkelmessung der Waferprobe betrug $48,7^\circ (\pm 0,5^\circ n=6)$ und die der Titanprobe $83,3^\circ (\pm 1,3^\circ n=6)$. Um das Problem zu lösen, wurde der Setpoint so eingestellt, dass die Spitze nur leicht die Oberfläche berührt. Der Setpoint wurde zwischen 80 und 90% anstatt 60% (siehe Abschnitt 4.1.1) der maximalen Amplitude der Schwingung eingestellt. Unter solchen Bedingungen sollte die Spitze nur kurzzeitig in Kontakt mit der Oberfläche treten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Visualisierung von adsorbiertem Fibronectin mittels Rasterkraftmikroskop (AFM) auf einer Modeloberfläche aus Titan für Zahnimplantate im Rahmen des Forschungsprojekts „Bionanofunktionalisierte Oberflächen“. Fibronectin ist ein Glykoprotein, das ein Kernbestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) ist und Zellenadhäsionsfunktion hat. Die Modeloberfläche besteht aus einer Titandioxidschicht, welche auf einem Wafersubstrat gesputtert wurde. Die AFM-Messungen geschahen mit Tapping-Mode an der Luft. Die Rauigkeit (RMS) der Titanoberfläche betrug ca. 0,8 nm und die der Waferoberfläche ca. 0,14 nm. Das im Wasser gelöste Fibronectin anschliessend auf der Titanoberfläche aufgetragen und für unterschiedliche Zeiträume inkubieren gelassen. Das Fibronectin wurde kugelförmig beobachtet. Die gemessenen Dimensionen der Fibronectinmoleküle lagen bei ca. 30 nm (Breite) und ca. 2 nm (Höhe). Direkt nach dem Adsorptionsanfang (nach 30 Minuten) verkleinerte sich sehr stark der RMS von 0,8 bis 0,3 nm und dann blieb er konstant bis 180 Minuten. Dies legt nahe, dass der Adsorptionsprozess aus zwei Schritten besteht. In dem ersten Schritt wird der freie Raum zwischen den Titanpartikel ausgefüllt und es bildet sich eine Titan-Fibronectin-Misch-Schicht aus. Ab 30 Minuten beginnen sich die Fibronectinmoleküle auch oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht zu adsorbieren. Der zweite Schritt ist die Fibronectinagglomeration, die ab 60 Minuten oberhalb der Titan-Fibronectin-Misch-Schicht auftritt. Sie bilden sehr große Agglomerate, die die ganze Oberfläche bedecken und eine weitere Fibronectinschicht schließen. Diese zweite Schicht wurde nach Versuchen mit 120 und 180 Minuten geschlossen. Die Parameter der Regelung wurden bei 15, 1 und 0,1 für den proportionalen, integralen bzw. differenzialen Parameter festgelegt und für jede Oberfläche nur schrittweise geändert. Es wurde festgestellt, dass die Einstellung des Setpoints und der Scangeschwindigkeit die Auflösung bzw. der Messung der Rauigkeit beeinflussen. Die Bestimmung der Kalibrierung mit Hilfe der Gold-Kolloid-Probe und des Beugungsgitters war nicht komplett erfolgreich, da die Goldpartikel verschiedene Größen hatten und da die Bestimmung des Gitterabstands mit Hilfe des Laseraufbaus nicht genau genug war. Der Vergleich der AFM-Messung der Titan- und Waferoberfläche erlaubte die Titandioxidschicht zu erkennen.

Der erste Schritt zur Verbesserung der quantitativen Ergebnisse dieser Arbeit könnte eine Kalibrierung mit Hilfe einer Probe in der Größenordnung unter ein Mikrometer und mit bekannten genauen Spezifikationen der drei Achsen sein. Dann würde die Entwicklung einer Probe (nach das Beispiel der Gold-Kolloid-Probe) in der Größenordnung von einigen Nanometern nützlich sein, um die Kalibrierung zu überprüfen. Die Entwicklung solcher Proben ist eine Herausforderung, da dies viel Zeit in Anspruch nimmt und nur Sinn macht falls eine sehr hohe Messgenauigkeit gewünscht wird. Eine Alternative zur Bestimmung der Kalibrierung wäre den Vergleich der AFM-Ergebnisse mit einer elektronischen Mikroskopietechnik. Eine genauere und quantitative Untersuchung des Einflusses jedes Parameters würde die Genauigkeit und die Auflösung der AFM-Ergebnisse erhöhen. Die Benutzung eines spezifischen Scanners für kleine Scanbereiche würde auch die Genauigkeit der Messungen verbessern. Auf Grund des schlechten Aufbaus der Flüssigkeitmesszelle ist die AFM-Messung in Flüssigkeit extrem schwierig und die Spülung der Probe unmöglich. Die Messung in Flüssigkeit des Fibronektinadsorptionsversuchs würde trotzdem die Benutzung von in PBS-Pufferlösung gelöster Fibronektin erlauben. Unter solche Bedingungen könnten die Dimensionen und die Form des Fibronektin unterschiedlich als die in dieser Arbeit ausfallen. Der wichtigste Punkt bei der Messung in Flüssigkeit wäre die Möglichkeit der Adsorptionsprozess kontinuierlich zu folgen. Schließlich würde die Messung in Flüssigkeit zwei Problemen vermeiden: Die Wasserschicht auf hydrophilen Proben und der Einfluss der Spülung nach jedem Inkubationsversuches, der die Menge des adsorbierten Fibronektin beeinflusst. Als letztes könnte die Visualisierung jeder Phase der Entwicklung des Schicht-Systems auf der Titanoberfläche interessante Informationen über die Veränderung der Oberflächenstruktur nach jedem schritt geben.

6 Literaturverzeichnis

- [Alb04] B. Alberts: *Molekularbiologie der Zelle*, ISBN: 3527304924, 4. Auflage, Wiley-VCH **2004**, Weiheim.
- [Atk06] P. W. Atkins, J. De Paula: *Physikalische Chemie*, ISBN: 3527315462, 4. Auflage, Wiley VCH **2006**, Weiheim.
- [Ber03] M. Bergkvist, J. Carlsson, S. Oscarsson: *Surface-dependent conformations of human plasma Fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy*, Journal of Biomedical Materials Research **2003**, 64 A, pp 349-356.
- [Bon00] D.A.Bonnell (Editor): *Scanning probe microscopy and spectroscopy : theory, techniques, and applications*, ISBN: 9780471248248, Wiley-VCH **2000**, New York.
- [Buh06] B. Buhshan, H. Fuchs: *Applied Scanning Probe Methods: Characterization*. ISBN : 3540269096, Springer **2006**, Berlin.
- [Bus91] P. Busch: *Elementare Regelungstechnik*, ISBN: 3802315677, Vogel **1991**, Würzburg.
- [Cac00] P. Cacciafesta, A. D. L. Humphris, K. D. Jandt, M. J. Miles: *Human Plasma Fibrinogen Adsorption on Ultraflat Titanium Oxide Surfaces Studied with Atomic Force Microscopy*, *Langmuir*, **2000**, 16, pp 8167-8175.
- [Cac01] P.Cacciafesta, K. R. Hallam, A. C. Watkinson, G.C. Allen, M. J. Miles, K. D. Jandt : *Visualisation of human plasma fibrogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness*, *Surface Science* **2001**, 491, pp 405-420.
- [Cac02] P.Cacciafesta, K. R. Hallam, C. A. Oyedepo, A. D. L.Humphris, M. J. Miles, K. D. Jandt : *Characterization of Ultraflat Titanium Oxide Surfaces*, *Chem. Matter.* **2002**, 14, pp 777-789.
- [Der99] J.A. Derose, J.-P. Revel: *A comparative study of colloidal particles as imaging standards for microscopy*, *Journal of Microscopy* **1999**, 195, pp 67-78.
- [Ebe90] R.C. Ebersole, J.A. Miller, J.R. Moran, M.D. Ward: *Spontaneously formed functionally active avidin monolayers on metal surfaces: A strategy for immobilizing biological reagents and design of piezoelectric biosensors*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, p 3239.
- [Eli95] V.Elings: *Digital Instruments Nanoscope Command Reference Manual*, **1995**, Santa Barbara/CA.

- [Ems08] Electron Microscopy Science: Mica Sheets and Disks, 01.12.2008.
www.emsdiasum.com/microscopy/products/preparation/mica.aspx
- [Eng81] J. Engel, E. Odermatt, A. Engel, J. A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, R. Timpl: *Shapes, Domain Organizations and Flexibility of laminin and Fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular Matrix*, Journal of Molecular Biology **1981**, 150, pp 97-120.
- [Eri02] H.P.Erickson: *Stretching Fibronectin*, *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **2002**, 23, pp 575-580.
- [Hel98] J. A. Helson (Editor), H. J. Breme (Editor): *Metals as Biomaterials*, in Wiley series in Biomaterials Sciences and Engineering, ISBN: 0471969354, John Wiley and Son **1998**, Chichester.
- [Hul07] J. R. Hull, J. J. Shannon, G. S. Tamura, D. G. Castner : *Atomic force microscopy and surface plasmon resonance investigation of Fibronectin interactions with group B streptococci*, *Biointerphases* **2007**, 2, pp 64-72.
- [Jan01] K. D. Jandt : *Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces*. *Surface Science* **2001**, 491, pp 303-332.
- [Leh07] M. Lehnert: *Biofunktionalisierung von Metalloberflächen durch spontane Selbstorganisation adhäsionsfördernder Proteine an nanoskaligen, biomimetischen Strukturen*, Master Thesis, Fachhochschule Gelsenkirchen, **2007**.
- [Leh09] M. Lehnert, M. Gorbahn, I. Koeper, W. Knoll, M. Veith: *Specific adsorption of biotinylated Fibronectin on Streptavidin monolayer created on TiO₂ surfaces*, To be submitted in **2009**.
- [Lin00] H. Lin, R. Lal, D. O. Clegg : *Imaging and Mapping Heparin-Binding Sites on Single Fibronectin Molecules with Atomic Force Microscopy*, *Biochemistry* **2000**, 39, pp 3192-3196.
- [Liu02] Z.-J. Liu, N. Jiang, Y. G. Shen, Y.-W. Mai : *Atomic force microscopy study of surface roughening of sputter-deposited TiN thin films*, *Journal of Applied Physics* **2002**, 92, pp 3559-3563.
- [Mac98] D.E. MacDonald, B. Markovic, M. Allen, P. Somasundaran, A.L. Boskey: *Surface analysis of human plasma Fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials*, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, 41, pp 120-130.
- [Mea05] P. Y. Meadows, G. C. Walker : *Force Microscopy Studies of Fibronectin Adsorption and Subsequent Cellular Adhesion to Substrates with Well-Defined Surface Chemistries*, *Langmuir* **2005**, 21, pp 4096-4107.
- [Mey04] E. Meyer, H. J. Hug: *Scanning Probe Microscopy*, ISBN: 3540431802, Springer **2004**, Heidelberg.

- [Mor99] V.J. Morris, A.R. Kirby, A.P. Gunning: *Atomic-force microscopy for biologists*, ISBN : 1860941990, Imperial College Press **1999**, London.
- [Mul01] D. J. Muller, A. Engel : *Conformational changes, flexibilities and intramolecular forces observed on individual proteins using AFM*, Riken Review **2001**, 36.
- [Nga04] A. P. Ngankam, G. Mao, P. R. Van Tassel : *Fibronectin Adsorption onto Polyelectrolyte Multilayer Films*, Langmuir **2004**, 20, pp 3362-3370.
- [Obe02] A. F. Oberhauser, C. Badilla-Fernandez, M. Carrion-Vazquez J. M. Fernandez : *The Mechanical Hierarchies of Fibronectin Observed with Single-molecule AFM*, J. Mol. Biol. **2002**, 319, pp 433–447.
- [Pro87] R. A. Proctor: *Fibronectin: A Brief Overview of its Structure, Function, and Physiology*, Reviews of Infectious Diseases **1987**, 9 supp. 4.
- [Rad94] M. Radmacher, J. P. Cleveland, M. Fritz, H. G. Hansma, P. K. Hansma : *Mapping Interaction Forces with the Atomic Force Microscope*, Biophysical Journal **1994**, 66, pp 2159-2165.
- [Räd95] E. Rädlein, R. Ambos, G. H. Frischat : *Atomic force microscopy of coated glasses*, Fresenius J Anal Chem **1995**, 353, pp 413-418.
- [Sch02] S. Scheuring, D. J. Müller, H. Stahlberg, H.-A. Engel, A. Engel: *Sampling the conformational space of membrane protein surface with the AFM*, European Biophysics Journal **2002**, 31, pp 172-178.
- [Sch08] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, ISBN: 0854042679, Royal Society of Chemistry **2008**, London.
- [Sie98] C. A. Siedlecki, R. E. Marchant : *Atomic force microscopy for the characterization of the biomaterial interface*, Biomaterials **1998**, 19, pp 441-454.
- [Sir01] L. Sirghi, M. Nakamura, Y. Hatanaka, O. Takai : *Atomic Force Microscopy Study of the Hydrophilicity of TiO₂ Thin Films Obtained by Radio Frequency Magnetron Sputtering and Plasma Enhanced Chemical Vapor Depositions*, Langmuir **2001**, 17, pp 8199-8203.
- [Sjö89] B. Sjöberg, M. Eriksson, E. Österlund, S. Pap, K. Österlund: *Solution structure of human plasma Fibronectin as a function of NaCl concentration determined by small-angle X-ray scattering*, European Biophysics Journal **1989**, 17, pp 5-11.
- [Sko03] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, C. Buesse-Herman, F. Dumont: *Principes d'analyse instrumentale*, ISBN: 2744501123, De Boeck Université **2003**, Paris.

- [Sou05] S. R. Sousa, P. Moradas-Ferreira, M. A. Barbosa : *TiO₂ type influences Fibronectin adsorption*, Journal of Materials Science : Materials in Medicine **2005**, 16, pp 1173-1178.
- [Sou07] S.R. Sousa, M. M. Bras, P. Moradas-Ferreira, M. A. Barbosa : *Dynamics of Fibronectin Adsorption on TiO₂ Surfaces*, Langmuir **2007**, 23, (13), pp 7046–7054.
- [Val07] K. Vallieres, P. Chevallier, C. Sarra-Bournet, S.Turgeon, G. Laroche : *AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation*, Langmuir **2007**, 23, pp 9745-9751.
- [Vee08] Ohne Autor: *SPM & Software Manual 004-1005-000*, Revision A, Veeco Instrument Inc. , **2008**.
- [Zen93] F. Zenhausern, M. Adrian, P. Descouts: *Solution Structure and Direct Imaging of Fibronectin Adsorption to Solid Surfaces by Scanning Force Microscopy and Cryo-electron Microscopy*, Electron Microsc. **1993**, 42, pp 378-388.
- [Zum02] S. S. Zumdahl : *Chimie Générale*, ISBN : 2804131238, De Boeck Université **2002**, Paris.

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscope
BET-Isotherme	Isotherme von Brunauer-Emmet-Teller
c	BET-Konstante
d	Gitterabstand des Beugungsgitters
EZM	Extrazelluläre Matrix
F/PF-Verhältnis	Verhältnis der gemessenen und der projizierten Fläche
HOPG	Highly Oriented Pyrolytic Graphite
$\Delta_{De}H^\circ$	Desorptionsenthalpie
$\Delta_{Ve}H^\circ$	Verdampfungsenthalpie
i	Winkel des einfallenden Strahls im Laseraufbau
K	Verhältnis den Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitkonstante
$k_{adsorption}$	Adsorptionsgeschwindigkeitkonstante
$k_{desorption}$	Desorptionsgeschwindigkeitkonstante
K_P	Proportionale Konstante
K_I	Integrale Konstante
K_D	Differenziale Konstante
λ	Wellenlänge
M	Molarkonzentration: mol/l
μm	Mikrometer: 10^{-6} m
μl	Mikroliter: 10^{-6} l
nm	Nanometer: 10^{-9} m
n	Beugungsordnung

p	Druck
p*	Dampfdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PID-Regler	Proportional-Integral-Differential-Regler
r	Beugungswinkel
R	Universelle Gaskonstante $R \sim 8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
RMS	Root Mean Square (Quadratische Mittelwert)
SPR	Surface Plasmon Resonance
STM	Scanning Tunneling Microscope
t	Zeit
T	Temperatur
θ	Winkel in Grad
Θ	Bedeckungsgrad
V	Adsorbiertes Gasvolumen
V_{Mono}	Adsorbiertes Gasvolumen, um eine komplette Monolage zu bilden
x_a	Ausgangssignal eines PID-Reglers
x_e	Eingangssignal eines PID-Reglers
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy (Röntgenfluoreszenzspektroskopie)
z	Verhältnis den Druck und den Dampfdruck
Z-Range	Maximale Höhenbereich einer Oberfläche
Z_{max}	Maximale Höhe einer Oberfläche
Z_{min}	Minimale Höhe einer Oberfläche

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Fibronektins	s.4
Abbildung 2: Zusammensetzung der TiO ₂ -Oberfläche	s.6
Abbildung 3: Abstand Wechselwirkungen entsprechend	s.9
Abbildung 4: Potentialkurve der Wechselwirkungsenergie	s.11
Abbildung 5: Kraft-Abstand-Kurve	s.12
Abbildung 6: Instrumentellen Aufbaus eines AFMs	s.13
Abbildung 7: Bewegung des Scanners	s.14
Abbildung 8: Unterschied zwischen Contact- und Tapping-Modes	s.16
Abbildung 9: Phasenverschiebungen im Tapping-Mode	s.17
Abbildung 10: Convolution der Spitze an der Oberfläche	s.18
Abbildung 11: Messung den Partikeldimensionen	s.19
Abbildung 12: Regelung mittels PID-Regler	s.20
Abbildung 13: Langmuir- und BET-Isotherme	s.26
Abbildung 14: Kontaktwinkel	s.27
Abbildung 15: Kretschmann-Konfiguration	s.29
Abbildung 16: Dispertionsrelationen in der Kretschmann-Konfiguration	s.30
Abbildung 17: Verschiebung des Resonanzwinkels	s.31
Abbildung 23: Laseraufbau	s.49
Abbildung 18: Gemessenen Bereiche	s.39
Abbildung 19: Fibronektinadsorption auf modifizierten Titanoberflächen	s.40
Abbildung 20 : Gitterprobenoberfläche	s.44
Abbildung 21 : Gold-Kolloid-Probe ; 20 μm	s.46
Abbildung 22 : Gold-Kolloid-Probe ; 0,35 μm	s.47

Abbildung 24 : Beugungsgitter ; 2 μm	s.51
Abbildung 25 : Goldoberfläche ; 20 μm	s.54
Abbildung 26 : Goldoberfläche ; 1 μm	s.55
Abbildung 27 : Goldoberfläche ; 1 μm ; 3D-Bild	s.56
Abbildung 28 : Waferoberfläche ; 20 μm	s.57
Abbildung 29 : Waferoberfläche ; 1 μm	s.58
Abbildung 30 : Waferoberfläche ; 1 μm ; 3D-Bild	s.59
Abbildung 31 : Titanoberfläche; 20 μm	s.60
Abbildung 32 : Titanoberfläche; 1 μm	s.61
Abbildung 33 : Titanoberfläche; 1 μm ; 3D-Bild	s.62
Abbildung 34 : Rauigkeit der Wafer- und Titanoberfläche	s.63
Abbildung 35 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 30 Minuten; 20 μm	s.65
Abbildung 36 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 30 Minuten; 1 μm	s.66
Abbildung 37 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 30 Minuten; 1 μm ; 3D	s.67
Abbildung 38 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 30 Minuten; 1 μm	s.68
Abbildung 39 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 30 Minuten; 1 μm ; 3D	s.70
Abbildung 40 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 60 Minuten; 20 μm	s.71
Abbildung 41 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 60 Minuten; 1 μm	s.72
Abbildung 42 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 60 Minuten; 1 μm ; 3D	s.73
Abbildung 43 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 60 Minuten; 0,6 μm	s.74
Abbildung 44 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 120 Minuten; 20 μm	s.75
Abbildung 45 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 120 Minuten; 1 μm	s.76
Abbildung 46 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 120 Minuten; 1 μm ; 3D	s.77
Abbildung 47 : Titanoberfläche mit Fibronektin; 120 Minuten; 20 μm	s.78

Abbildung 48 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 120 Minuten; 1 μm	s.79
Abbildung 49 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 120 Minuten; 1 μm ; 3D	s.80
Abbildung 50 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 120 Minuten; 20 μm	s.81
Abbildung 51 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 180 Minuten; 20 μm	s.82
Abbildung 52 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 180 Minuten; 1 μm	s.83
Abbildung 53 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 180 Minuten; 1 μm ; 3D	s.84
Abbildung 54 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 180 Minuten; 20 μm	s.85
Abbildung 55 : Titanoberfläche mit Fibronectin; 180 Minuten; 1 μm	s.86
Abbildung 56: Rauigkeit den Titanproben während der Adsorption	s.87
Abbildung 57: Z-Ränge den Titanproben während der Adsorption	s.115
Abbildung 58: F/PF-Verhältnis den Titanproben während der Adsorption	s.115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Bestimmung des Gitterabstands	s.50
Tabelle 2: Rauigkeit und Z-Range der Goldoberfläche	s.64
Tabelle 3: Zusammenfassung der gemessenen Werte	s.110
Tabelle 4: Parameter des Scans für die XY-Kalibrierung	s.110
Tabelle 5: Parameter des Scans für den Line-Scan	s.110
Tabelle 6: Messungen der Kalibrierung mit der Gitterprobe	s.110
Tabelle 7: Rauigkeitanalyse der Waferprobe	s.112
Tabelle 8: Rauigkeitanalyse der Titanprobe	s.112
Tabelle 9: Rauigkeitanalyse der Titanprobe; 20 nM; 30 Minuten	s.112
Tabelle 10: Rauigkeitanalyse der Titanprobe; 20 nM; 60 Minuten	s.113
Tabelle 11: Rauigkeitanalyse der Titanprobe; 20 nM; 120 Minuten	s.113
Tabelle 12: Rauigkeitanalyse der Titanprobe; 20 nM; 180 Minuten	s.114
Tabelle 13: Rauigkeitanalyse der Titanprobe; 200 nM; 180 Minuten	s.114
Tabelle 14: Partikeldimensionen der Goldoberfläche	s.116
Tabelle 15 : Partikeldimensionen der Titanoberfläche	s.116
Tabelle 16: Dimensionen der Fibronectinmoleküle	s.117
Tabelle 17: Gitterabstand des Beugungsgitters	s.118
Tabelle 18: Parameter der Autotuning für die Tapping-Mode-Spitze	s.118
Tabelle 19 : Parameter des Autotuning für die Force-Modulation Spitze	s.118

7 Anhang

7.1 Scanparameter und Regelungsparameter

Tabelle 4: Eingestellten Parameter der Regelung und des Scans für die XY-Kalibrierung.

Main window			Scanning window		
Setpoint	3.7387	V	Sample/Line	512	-
P	9	-	Scan rate	0.5	Hz
I	0.5	-	Scan range	20	μm
D	5	-			

Tabelle 5: Eingestellten Parameter der Regelung und des Scans für die Line-Scan-Z-Kalibrierung.

Main window			Scanning window		
Setpoint	3.7387	V	Sample/Line	1024	-
P	3.0	-	Scan rate	0.1	Hz
I	0.3	-	Scan range	20	μm
D	2	-			

7.2 Rohdaten der Kalibrierung

Tabelle 6: Messungen der Kalibrierung mit der Gitterprobe.

Messungsnummer	X-Messung [μm]	Y-Messung [μm]	Z-Messung [nm]
1	10,016	9,984	198
2	10,016	9,984	198
3	10,018	10,016	202
4	10,052	10,016	203
5	9,987	10,016	195
6	10,079	9,985	193
7	10,047	9,984	206
8	10,016	9,984	200
9	10,016	9,985	
10	10,016	10,016	
Mittelwert=	10,027	9,997	199
Standardabweichung=	0,027	0,016	4

7.3 Rohdaten der Rauigkeitanalyse

Tabelle 7: Rauigkeitanalyse der Waferprobe für die 1 μm und 20 μm Scanbereiche.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 μm	B1	0,12	1,10	1,0018
	B2	0,13	1,28	1,0031
	B3	0,12	1,14	1,0019
	B4	0,12	1,13	1,0019
	B5	0,19	2,71	1,0042
Mittelwert=		0,14	1,47	1,0026
Standardabweichung=		0,03	0,70	0,0011

20 μm	B1	0,40	11,67
	B2	0,23	17,21
	B3	0,27	18,30
	B4	0,29	17,15
	B5	0,25	18,46
Mittelwert=		0,29	16,56

Tabelle 8: Rauigkeitanalyse der Titanprobe für die 1 µm und 20 µm Scanbereiche.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,76	7,90	1,0186
	B2	0,72	7,53	1,0243
	B3	0,78	6,64	1,0133
	B4	0,74	7,41	1,0218
	B5	0,80	6,75	1,0196
Mittelwert=		0,76	7,25	1,0195
Standardabweichung=		0,03	0,54	0,0041

20 µm	B1	0,49	7,34
	B2	0,46	4,83
	B3	0,54	6,49
	B4	0,58	8,70
	B5	0,53	5,73
Mittelwert=		0,52	6,62
Standardabweichung=		0,05	1,49

Tabelle 9: Rauigkeitanalyse des adsorbierten Fibronektins auf der Titanprobe für die 1 µm und 20 µm Scanbereiche; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit : 30 Minuten.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,52	6,18	1,0053
	B2	0,39	3,64	1,0046
	B3	0,37	6,09	1,0034
	B4	0,45	3,57	1,0038
	B5	0,52	4,70	1,0061
Mittelwert=		0,45	4,84	1,0046
Standardabweichung=		0,07	1,27	0,0011

20 µm	B1	0,63	81,66	RMS Titanprobe vor der Inkubation [nm] 0,73
	B2	0,63	65,80	
	B3	0,65	65,45	
	B4	0,54	64,45	
	B5	0,49	18,93	
Mittelwert=		0,59	59,26	
Standardabweichung=		0,07	23,64	

Tabelle 10: Rauigkeitanalyse des adsorbierten Fibronektins auf der Titanprobe für die 1 µm und 20 µm Scanbereiche; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit : 60 Minuten.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,44	6,49	1,0055
	B2	0,29	4,49	1,0048
	B3	0,24	2,64	1,0028
	B4	0,26	4,32	1,0027
	B5	0,26	2,99	1,0026
Mittelwert=		0,30	4,19	1,0037
Standardabweichung=		0,08	1,52	0,0014

20 µm	B1	1,04	46,29	RMS Titanprobe vor der Inkubation [nm]
	B2	3,86	101,36	
	B3	1,41	91,72	0,77
	B4	0,76	44,37	
	B5	0,95	50,46	
Mittelwert=		1,60	66,84	
Standardabweichung=		1,28	27,41	

Tabelle 11: Rauigkeitanalyse des adsorbierten Fibronektins auf der Titanprobe für die 1 µm und 20 µm Scanbereiche; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit : 120 Minuten.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,27	3,70	1,0031
	B2	0,24	4,41	1,0020
	B3	0,29	5,37	1,0041
	B4	0,30	3,60	1,0027
	B5	0,27	5,28	1,0041
Mittelwert=		0,27	4,47	1,0032
Standardabweichung=		0,02	0,84	0,0009

20 µm	B1	0,41	36,60	RMS Titanprobe vor der Inkubation [nm]
	B2	0,39	24,20	
	B3	0,29	18,70	0,78
	B4	0,36	25,50	
	B5			
Mittelwert=		0,36	26,25	
Standardabweichung=		0,05	7,50	

Tabelle 12: Rauigkeitanalyse des adsorbierten Fibronektins auf der Titanprobe für die 1 µm und 20 µm Scanbereiche; Fibronektinkonzentration: 20 nM; Inkubationszeit : 180 Minuten.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,40	3,01	1,0023
	B2	0,39	3,51	1,0042
	B3	0,40	3,78	1,0031
	B4	0,38	3,84	1,0063
	B5	0,39	3,60	1,0054
Mittelwert=		0,39	3,55	1,0043
Standardabweichung=		0,01	0,33	0,0016

20 µm	B1	0,44	25,38	RMS Titanprobe vor der Inkubation [nm] 0,71
	B2	0,44	24,38	
	B3	0,30	4,11	
	B4	0,53	47,05	
	B5	0,39	11,18	
Mittelwert=		0,42	22,42	
Standardabweichung=		0,08	16,44	

Tabelle 13: Rauigkeitanalyse des adsorbierten Fibronektins auf der Titanprobe für die 1 µm Scanbereiche; Fibronektinkonzentration: 200 nM; Inkubationszeit : 180 Minuten.

Bereich		RMS [nm]	Z-range [nm]	Fläche/Projizierte Fläche [-]
1 µm	B1	0,36	3,20	1,0029
	B2	0,42	3,32	1,0035
	B3	0,47	3,92	1,0038
	B4	0,43	4,11	1,0034
	B5	0,44	3,62	1,0032
Mittelwert=		0,42	3,63	1,0034
Standardabweichung=		0,04	0,39	0,0003

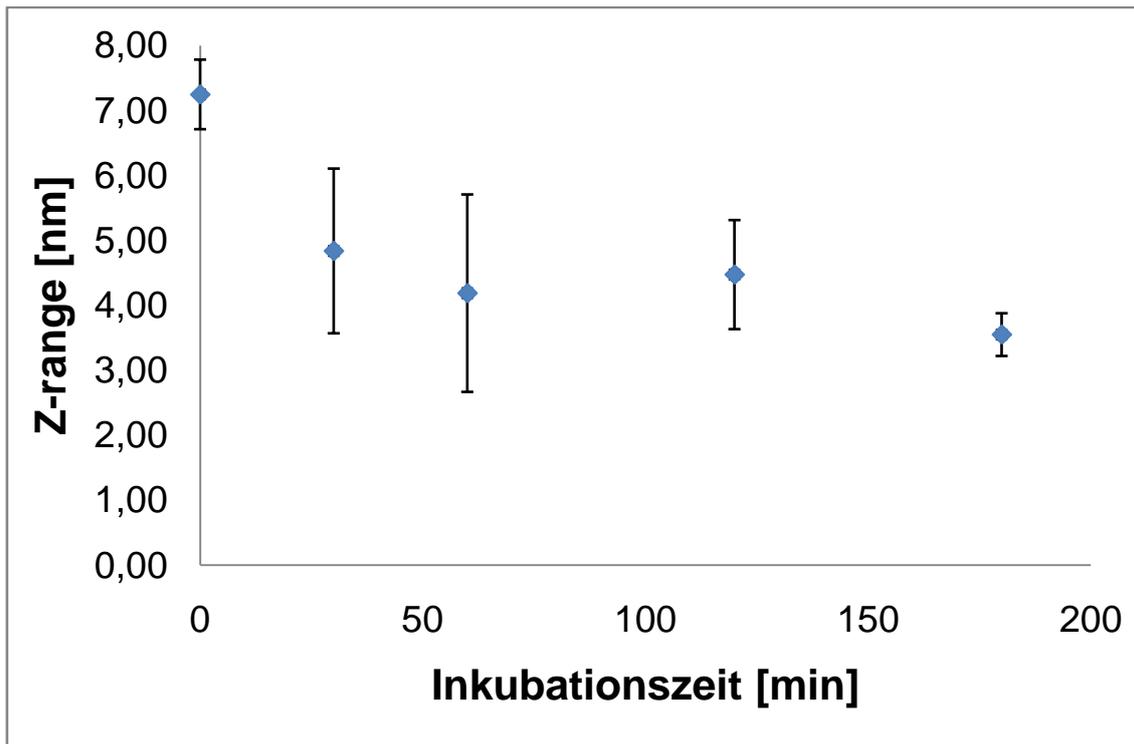


Abbildung 57: Z-Range den Titanproben in Abhängigkeit der Fibronectininkubationszeit für die 1 μm Bereiche.

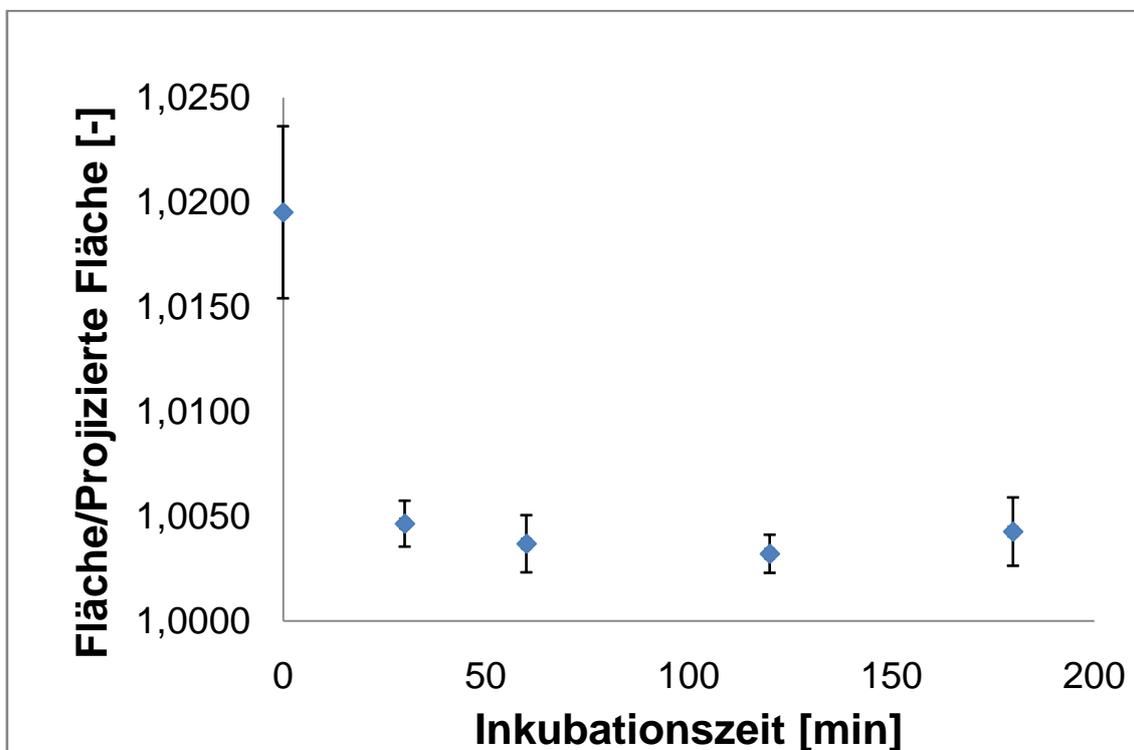


Abbildung 58: F/PF-Verhältnis den Titanproben in Abhängigkeit der Fibronectininkubationszeit für die 1 μm Bereiche.

7.4 Rohdaten den Partikeldimensionen

Tabelle 14: Partikeldimensionen der Goldoberfläche, gemessen mit Hilfe des 1 μm Scanbereich.

Messungsnummer	Breite [nm]	Höhe [nm]
1	53	3,0
2	48	3,0
3	52	2,8
4	43	1,5
5	37	2,7
6	45	3,1
7	30	1,7
8	44	2,0
9	39	2,0
10	36	1,7
Mittelwert=	43	2,4
Standardabweichung=	7	0,6

Tabelle 15 : Partikeldimensionen der Titanoberfläche ; gemessen auf Basis eines 1 μm Bereiches.

Messungsnummer	Kleine Partikeln		Grosse Partikeln	
	Höhe [nm]	Durchmesser [nm]	Höhe [nm]	Durchmesser [nm]
1	1,3	10	2,9	21
2	1,5	13	5,0	28
3	1,9	11	4,2	23
4	1,5	14	3,1	22
5	1,0	10	3,4	24
6	0,7	10	3,7	28
7	1,5	15	2,8	18
8	1,6	11	5,2	30
9	1,3	12	2,9	22
10	1,5	12	3,8	25
Mittelwert=	1,4	12	3,7	24
Standardabweichung=	0,3	2	0,9	4

Tabelle 16: Dimensionen der Fibronektinmoleküle ; gemessen auf Basis des Abbildung 38.

Messungsnummer	Höhe [nm]	Durchmesser [nm]
1	1,3	28
2	1,3	25
3	1,1	18
4	1,3	24
5	1,4	29
6	1,5	32
7	1,4	25
8	1,0	21
9	1,0	24
10	1,0	18
Mittelwert=	1,2	24
Standardabweichung=	0,2	5

7.5 Rohdaten den AFM-Messungen des Beugungsgitters

Tabelle 17: Gitterabstand des Beugungsgitters.

Abstand zwischen zwei Striche [nm]		
685	707	709
676	666	696
641	687	679
684	687	696
701	692	684
684	688	697
Mittelwert [nm]	Standardabweichung [nm]	
687	16	

7.6 Parameter der Einstellung der Resonanzfrequenz

Tabelle 18: Eingestellten Parameter der Autotuning der Resonanzfrequenz für die Tapping-Mode Spitze.

Cantilever Tuning window		
Range	0-600	kHz
Frequency	0	kHz
Drive Amplitude	0.2	V
Gain	x2	-
Bi-directional	-	-
Auto Tune	checked	-
Use Current Frequency Range	checked	-
Adjust Drive Amplitude	-	-
Target Tapping Signal	-	V

Tabelle 19 : Eingestellten Parameter der Autotuning der Resonanzfrequenz für die Force-Modulation Spitze.

Cantilever Tuning window		
Range	0-120	kHz
Frequency	0	kHz
Drive Amplitude	0.2	V
Gain	x1	-
Bi-directional	-	-
Auto Tune	checked	-
Use Current Frequency Range	checked	-
Adjust Drive Amplitude	-	-
Target Tapping Signal	-	V

7.7 Vorbereitungsmethoden der Goldprobe und der Titanprobe

Die Proben kommen von dem Max Planck Institut in Mainz und sind, wie weiter unten beschrieben, vorbereitet werden:

Reinigung: Gläser und Wafer

- 5 mal mit MilliQ-Wasser spülen
- Gläser einzeln mit Spüli reinigen
- 5 mal mit MilliQ-Wasser spülen
- Gläser in 2%ige Hellmanex Lösung geben und 15 Minuten ins Ultraschall Bad
- 5 mal mit MilliQ-Wasser spülen
- Gläser in Etthanol geben und 15 Min stehen lassen
- Gläser mit Stickstoff trocknen
- Gläser nach dem ersten Spülen nicht mehr trocknen lassen
- Lagerung bei unter Argon bei RT oder 50° C im Trockenschrank

Aufdampfen von Chrom und Gold (Evaporator, Edwards FL 400, AUTO 306):

- Gereinigte Gläser in Halterung einspannen
- Vakuum herstellen, Rotationsmotor anstellen
- Dicke für Chrom einstellen (Thickness von 1,5 nm ergibt real 2 nm)
- Spannung anlegen, Rate 0,2 – 0,3 °A/s
- Spannungsregler schnell auf „0“ drehen, wenn gewünschte Dicke erreicht
- Dicke für Gold einstellen (Thickness von 50 nm ergibt real 48 nm)
- Spannung anlegen, Rate 0,5 – 1,0 °A/s
- Spannungsregler schnell auf „0“ drehen, wenn gewünschte Dicke erreicht
- Rotationsmotor ausstellen, Druck ausgleichen
- Lagerung unter Argon bei RT oder 50° C im Trockenschrank

DC-Sputtern von Titanoxid (Edwards, AUTO 500):

- Vakuum herstellen

Freisputtern:

- Argonzufluss öffnen (30 sccm)
- Spannung (300 V) anlegen, violettes Plasma
- Warten bis Plasma blau wird
- 50 nm Titan freisputtern, Zeit kann variieren
- Druck ausgleichen und Proben in Halterung einspannen
- Vakuum herstellen

Sputtern von TiOx:

- Sauerstoffzufluss öffnen (30 sccm)
- Rotationsmotor anschalten
- Leistung (300 W) anlegen, rosa Plasma, Rate ca 0,05 nm/s
- Spannung abschalten, wenn gewünschte Dicke (7 nm) erreicht ist.
- Druck ausgleichen, Rotationsmotor abschalten und Proben entnehmen
- Lagerung unter Argon bei Raumtemperatur

7.9 Lebenslauf

Name: Julien Howald

Geburtsdatum/-ort: 03.10.1982/ Morges (CH)

Nationalität: Schweizer

Familienstand: Ledig

Anschrift: Rte. des Esserts 2 1031 Mex (CH)

Schulbildung:

1998-2002
Diplôme de culture générale
Option paramédicale
Gymnase de Beaulieu
Lausanne

2002-2005
Berufliches technisches Abitur
Ausbildung als Chemielaborant in der analytischen
Chemie
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

Studium:

WS 2005 - Dato
Ingenieur (FH) in Life Technologies
Studiengang Lifes Technologies
Fachhochschule Westschweiz
Sitten