

Biologische Applikationen für die Dip-Pen Nanolithographie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Thomas Laue

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Christof Wöll

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Anwendungsmöglichkeiten für die Dip-Pen Nanolithographie (DPN) entwickelt. Im Fokus hierbei standen mögliche Applikationen, die in biologischen/medizinischen Bereichen Anwendung finden sollten. Bei der DPN handelt es sich um eine konstruktive Nanolithographie-Technik, bei der mit Hilfe der Spitze der Blattfeder (eng. cantilever) eines Rasterkraftmikroskopes ein Molekülübertrag und somit eine Nanostrukturierung erfolgt. Die Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Anwendungen ergaben sich hierbei aus den Grenzen der etablierten Applikationen der DPN selbst.

Die mit der Entwicklung der DPN 1999 vorgestellte und seit dem vorwiegend verwendete „molekulare Tinte“ basiert auf Thiol-Verbindungen, die auf Goldsubstraten appliziert werden. Innerhalb dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sich ebenfalls Azid-Verbindungen, die auf reaktive Polymerschichten appliziert wurden und über eine einfache Click-Reaktion (Huisgen 1,3-Cycloaddition) an diese kovalent banden, als „molekulare Tinte“ für die DPN eignen. Die große Diversität an Substraten, auf der die Polymerschichten aufgetragen werden können, als auch deren Biokompatibilität entsprechen den Anforderungen hinsichtlich zukünftiger Anwendung in der Biologie oder Medizin.

Eine weitere Limitierung der DPN ergibt sich aus der Natur der verwendeten „molekularen Tinten“, genauer gesagt deren Eigenschaft Monolagen auf dem Substrat auszubilden. Durch den Einsatz von Phospholipiden als „molekulare Tinte“ konnten in dieser Arbeit nicht nur dreidimensionale Strukturen generiert, sondern auch deren Funktionalität, die allein auf ihrer dreidimensionalen Form basierte, nachgewiesen werden. Hierfür wurden Beugungsgitter, periodische Strukturen mit definierten Abständen, hergestellt, die eine markierungsfreie, optische Detektion von Biomolekülen in Lösungen erlaubten. Ihre Funktion basiert auf der Veränderung der Höhe des Beugungsgitters nach Analytbindung und daraus resultierend einer Veränderung des vom Gitter gebeugten Lichts. Darüber hinaus konnte ebenfalls die Integration dieser Gitter in ein bestehendes optisches System, wie Wellenleiter demonstriert werden.

Der dritte Teilaspekt dieser Arbeit beschäftigte sich gezielt mit der Integration von DPN generierten Strukturen in bestehende (optische) Systeme bzw. die Beschriftung von vorstrukturierten Substraten. Aufgrund der präzisen Positionierungsmöglichkeit der DPN konnte der Rand von Toroiden, kelchartigen photonischen Strukturen ($\varnothing \sim 40 \mu\text{m}$), die als optische Resonatoren fungieren, mit einer „molekularen Tinten“ beschriftet werden. Es handelte sich hierbei um Phospholipid-Mischungen, die sowohl eine fluoreszente, als auch funktionelle Komponente enthielten. Der Fluoreszenzfarbstoff stellte das Lasermaterial dar, welches unter Anregung und durch die Resonatorstruktur des Toroids zu einer stimulierten Emission führte. Durch Anbindung eines Analyts an die funktionelle Komponente, kommt es zu einer Phasenverschiebung der stimulierten Emission, wodurch eine Detektion des Analyts in einer Lösung realisiert wurde.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Dip-Pen Nanolithographie (DPN) | 1 |
| 1.2 | Derzeitige Grenzen der DPN | 3 |
| 1.2.1 | Eine neue Substrat-Tinten Kombination - Die Click-Chemie DPN | 4 |
| 1.2.1.1 | Generierung reaktiver Oberflächen | 5 |
| 1.2.1.2 | Strukturierung der reaktiven Oberflächen | 6 |
| 1.2.2 | Dreidimensionale Strukturierung - Lipid Dip-Pen Nanolithographie | 7 |
| 1.2.2.1 | Fluidität der Lipidstrukturen | 8 |
| 1.2.2.2 | Applizierung mehrerer Moleküllagen | 9 |
| 1.2.2.3 | Funktionalisierung der Lipidstrukturen | 10 |
| 1.2.2.4 | Funktionalität über Dreidimensionalität - Biosensoren | 12 |
| 1.2.3 | Verwendung vorstrukturierter Oberflächen - Toroide | 12 |
| 1.3 | Zielsetzung der Arbeit | 14 |
| 2 | Material | 15 |
| 2.1 | Chemikalien | 15 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterial | 16 |
| 2.3 | Geräte | 17 |
| 3 | Methoden | 19 |
| 3.1 | Lipid-DPN - Allgemein | 19 |
| 3.1.1 | Herstellung von Lipid-Tinten | 19 |
| 3.1.2 | Beschichtung der Cantilever | 19 |
| 3.2 | Lipid-Beugungsgitter | 21 |
| 3.2.1 | Herstellung der Strukturen | 21 |
| 3.2.2 | Proteindetektion über Beugungsgitter | 21 |
| 3.3 | Funktionalisierung dreidimensionaler Strukturen-Toroide | 22 |
| 3.3.1 | Herstellung der Strukturen | 22 |
| 3.3.2 | Visualisierung der Streptavidinanbindung | 23 |
| 3.3.3 | Bestimmung der Laser-Performance der funktionalisierten Toroide | 23 |
| 3.3.4 | Proteindetektion durch funktionalisierte Toroide | 24 |
| 3.4 | Click-Chemie | 24 |
| 3.4.1 | Beschichtung der Cantilever | 24 |
| 3.4.2 | Herstellung und Visualisierung der Strukturen | 25 |
| 4 | Ergebnisse | 27 |
| 4.1 | Click-Chemie DPN | 27 |
| 4.2 | Dreidimensionale Strukturierung-Lipid Multilayer gratings | 32 |
| 4.2.1 | Charakterisierung der Beugungsgitter | 33 |
| 4.2.2 | Das Lipid-Beugungsgitter als Biosensor | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | Funktionalisierung dreidimensionaler Strukturen - Toroide | 45 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der funktionalisierten Toroide | 46 |
| 4.3.2 | Proteindetektion mittels funktionalisierter Toroide | 48 |
| 4.3.3 | Unterschiedliche molekulare Tinten zur Funktionalisierung der Toroide . | 50 |
| 5 | Diskussion | 53 |
| 5.1 | Click-Chemie DPN | 53 |
| 5.2 | Lipid-Multilayer gratings | 55 |
| 5.3 | Funktionalisierte Toroide | 57 |
| | Literaturverzeichnis | 60 |
| | Abbildungsverzeichnis | 68 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 69 |
| | Publikationen/Patente/Konferenzen | 71 |
| | Danksagung | 73 |
| | Lebenslauf | 74 |
| | Erklärung des Verfassers | 75 |

1 Einleitung

"There's plenty of room at the bottom" ist der Titel und stark zusammengefasst die Kernaussage der Rede von Richard P. Feynmann, die er 1959 auf der jährlichen Versammlung der American Physical Society in Kalifornien hielt.^[1] Diese Vision, die er entwarf, wird im Allgemeinen als die erste dokumentierte Beschreibung der Nanotechnologie angesehen. Seine Idee, dass sich die derzeitige Mikrostrukturierung, nebst gängiger Abbildungsverfahren, noch weiter auf kleinere Maßstäbe reduzieren lässt, dementsprechend eine Nanostrukturierung, wurde von vielen Wissenschaftlern als nicht realisierbar betrachtet, seine Ideen wie z.B. die Informationen der *Encyclopedia Britannica* auf die Größe eines Stecknadelkopfes zu komprimieren, belächelt.

Heute, ungefähr 60 Jahre später, sind jedoch viele dieser Ideen verwirklicht, zum Teil gar als Standardverfahren etabliert worden und trotzdem immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.1 Dip-Pen Nanolithographie (DPN)

Als einer der Meilensteine auf dem Weg zur Nanostrukturierung und Entwicklung von höher auflösenden Abbildungsverfahren kann sicherlich die Erfindung des Rasterkraftmikroskopes (Atomic Force Microscope - AFM) 1986 von Binnig *et al.*^[2] angesehen werden. Bei dieser Abbildungstechnik wird die zu untersuchende Probe mittels einer sehr feinen Nadel, welche an einer Blattfeder (eng.: cantilever) montiert ist, zeilenweise abgetastet. Der Durchmesser des Kopfes dieser Nadel kann zwischen wenigen Nanometern bis hin zu einzelnen Atomen variieren. Die Verbiegung bzw. Auslenkung dieser Blattfeder aufgrund von Höhen- oder Materialunterschieden der Probe wird registriert und über entsprechende Software in dreidimensionale Bilder bzw. Profilogramme umgerechnet.

1999 wurde von Piner *et al.* die „Dip-Pen Nanolithography“(DPN) vorgestellt.^[3] Makroskopisch und vereinfacht dargestellt, handelt es sich hierbei um eine Strukturierungstechnik, die schon seit dem 3. Jahrtausend vor Christus angewandt wird: der Beschriftung eines Substrates (Papyrus) mit einer Tinte mittels eines angespitzten Schreibgerätes (Schreibrohr), kurz gesagt die Schrift.

Piner *et al.* benutzte hierbei als Schreibgerät ein AFM, genauer gesagt die Nadel des Cantilevers, welche mit ihrem geringen Spitzendurchmesser Strukturen von bis zu 30nm Durchmesser erlaubte. In späteren Arbeiten sogar bis zu 14nm.^[4] Bei der verwendeten „Tinte“ handelte es sich um 1-Octadecanethiol (ODT), das auf den Goldsubstraten dicht gepackte Monolagen ausbildet.^[5,6]

Der Transportmechanismus, dem diese Strukturierungstechnik unterliegt, differiert von dem vereinfachten Konzept der Schrift dahingehend, dass die zu applizierenden Moleküle an der Spitze der Cantilever Nadel nicht zwingend in einem Lösungsmittel gelöst vorliegen, sondern entlang eines Wassermeniskus, welcher sich zwischen Probe und Nadel ausbildet, transportiert werden (siehe Abb. 1.1). Durch Variation der umgebenden Luftfeuchtigkeit kann der Wassermeniskus vergrößert bzw. verkleinert werden,^[7] was in einer Vergrößerung bzw. Verkleinerung der geschriebenen Struktur resultiert. Darüber hinaus kann ebenfalls über die Schreibgeschwindigkeit, mit der sich die Nadel über das Substrat bewegt, die Strukturgröße und/oder die Belegungsdichte der Moleküle auf dem Substrat variiert werden.

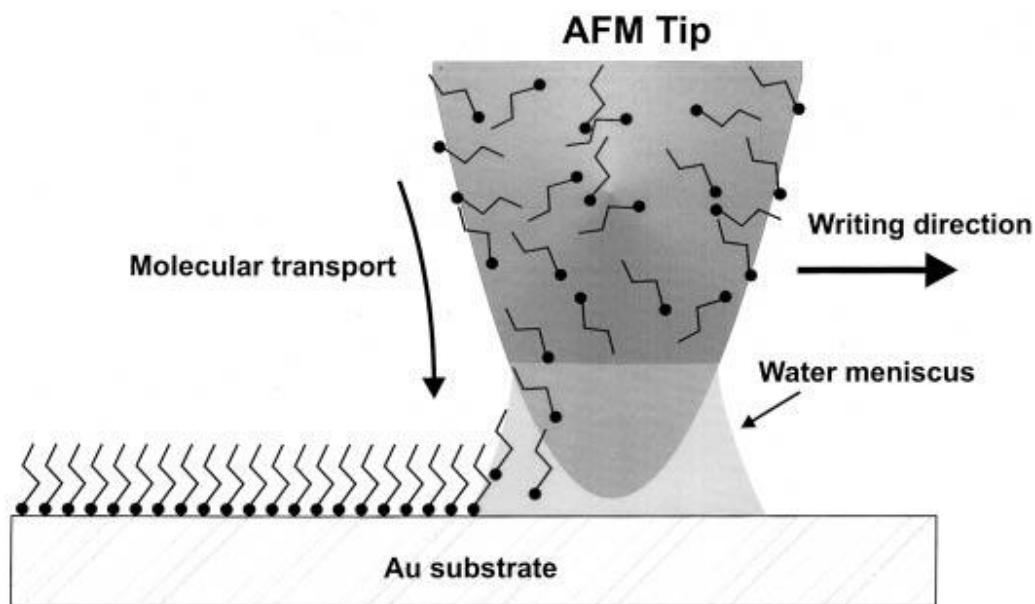


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des DPN-Schreibprozesses. Transport der molekularen „Tinte“ entlang des Wassermeniskus.^[3]

Seit seiner Entwicklung vor rund 10 Jahren wurde eine Vielzahl von Strukturierungsmethoden für die DPN entwickelt.^[8,9] Ebenso erweiterte sich kontinuierlich die Bandbreite der applizierten Moleküle und Materialien, wie zum Beispiel DNA,^[10] Peptide,^[11] Proteine,^[12,13] Polymere^[14] und Nanopartikel.^[15]

Grundlegend kristallisierten sich zwei Funktionalisierungsmethoden heraus, bei der entweder das zu applizierende Moleküle direkt während des Schreibvorganges an das Substrat oder, wie in den meisten Fällen, in einem separaten Folgeschritt an die DPN generierten Strukturen gebunden wird.

1.2 Derzeitige Grenzen der DPN

Zu einem Großteil basieren diese Techniken immer noch auf der ursprünglich verwendeten Chemisorption von Thiolverbindungen (ODT oder MHA) auf Goldoberflächen. Dies stellt gleichzeitig einen wichtigen Faktor dar, der die DPN in ihren Anwendungsmöglichkeiten limitiert; die relativ geringe Variationsbreite von Substrat-Tinten Kombinationen. Goldoberflächen stellen zwar gute Modellsubstrate dar, sind jedoch im biomedizinischen Kontext nur bedingt anwendbar. Diese sind beispielsweise ab einer gewissen Schichtdicke nicht mehr transparent und dementsprechend je nach Anwendung oder optischem Aufbau nicht einsetzbar. Ebenfalls kann es bei der Fluoreszenzmikroskopie zu einer Verfälschung von Fluoreszenzsignalen durch Fluoreszenzlöschung (Quenching)^[16] kommen.

Um diese Probleme zu umgehen, müssen entweder andere Substanzen, die mit der DPN Technologie kompatibel sind, zur Beschichtung eingesetzt oder neue molekulare Tinten, die kein spezielles Substrat bzw. Beschichtung benötigen, gefunden werden. Die Verfahren sollten natürlich ebenfalls einfach zu handhaben sein und eine große Bandbreite von Oberflächen abdecken können.

Aufgrund der Natur der meisten verwendeten molekularen Tinten, handelt es sich bei den applizierten Strukturen vorwiegend um Monolagen, woraus eine weitere Limitierung der DPN bezüglich ihrem Arbeitsgebiet der Nanostrukturierung resultiert: Die Erstellung von dreidimensionalen Strukturen. Dreidimensionale Strukturierungen, die über die Höhe einiger Molekülmonolagen hinausgehen, wurden bis dato zum Beispiel indirekt über Ätztechniken erzielt, wobei mit Hilfe der DPN lediglich der Ätz-Resist appliziert wurde,^[17] die eigentliche Strukturierung erfolgte dementsprechend über eine andere Methodik der Nanostrukturierung.

Die Überwindung dieser Einschränkung könnte der DPN jedoch ein neues Feld von Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Die Wahl der molekularen Tinte und die Form der Strukturierung sind hierbei maßgebend. Eine denkbare Strukturierung wären beispielsweise einfache periodische Strukturen, die, aufgrund ihrer dreidimensionalen Form, als Beugungsgitter fungieren könnten. Hinsichtlich einer möglichen Applikation in der Biologie oder Medizin sollten diese darüber hinaus eine Funktionalisierung tragen und beispielsweise als Biosensoren fungieren können.

Auch wurde bis jetzt das Potential der DPN zur präzise Positionierung der Strukturen auf dem Substrat in Ergänzung zu bereits auf dem Substrat vorhandenen Strukturen nur zum Teil ausgeschöpft. Eine exakte Positionierung der, innerhalb einer Anwendung der DPN geschriebenen, Strukturen untereinander ist durch die inhärente Genauigkeit der AFM Technik automatisch gegeben. Allerdings verzichtet man für die meisten Anwendungen auf eine mehr als ungefähre Ausrichtung an vorher auf dem Substrat aufgetragenen Markern (zur besseren Wiederauffindbarkeit der Strukturen).

Die DPN ermöglicht jedoch mit entsprechendem Aufwand auch die Funktionalisierung bereits auf dem Substrat vorhandener Strukturen wie z.B. Elektroden oder Sensorstrukturen. Hierbei können 2 Arbeiten angeführt werden, die dies veranschaulichen: In der Arbeit von Bellido *et al.* wurden Ferritin Moleküle zwischen die Gitterstrukturen eines TEM-Gitters appliziert^[18] oder in der Arbeit von Chung *et al.*, bei der DNA Moleküle zwischen zwei Elektroden aufgebracht wurden.^[19] Hierbei erforderte jedoch im Vergleich letztere Arbeit eine wesentliche genauere Positionierung der applizierten Strukturen, um zu einer lokalen DNA-Hybridisierung und Überbrückung der Elektroden zu führen. Die Lage der Ferritin Moleküle innerhalb eines Gitters blieb jedoch variabel und konnte über mehrere Mikrometer differieren. Bei beiden Beispielen handelte es sich um planare Oberflächen.

Weitere erfolgreiche Nanostrukturierungen von Substraten, die ihrerseits selber schon Strukturierungen aufweisen, könnten die Kombinationsfähigkeit der DPN mit andere Methodiken der Nanostrukturierung und daraus resultierend neue Applikationen in Bereichen wie beispielsweise der (Bio)Sensorik vorantreiben. Eine mögliche Anwendung hierbei wäre beispielsweise die Integration der vorher erwähnten DPN generierten Beugungsgitter in oder auf Wellenleiter.

Vor allem wenn es sich bei den zu beschreibenden Vorstrukturierungen der Substrate um dreidimensionale Formen handelt, könnte ein neues Feld der Integration von DPN generierten Strukturen in bestehende Strukturierungen erschlossen werden. Toroide, dreidimensionale, photonische Strukturen, die mithilfe des „whispering-gallery effects“^[20] die Anbindung von Molekülen an ihrer Oberfläche detektieren können, könnten eine solche Demonstration erbringen.

1.2.1 Eine neue Substrat-Tinten Kombination - Die Click-Chemie DPN

Reaktive Polymerschichten könnten eine für die Click-Chemie DPN und für biologische Anwendungen geeignete Substratbeschichtung darstellen: Polymerschichten weisen im Vergleich zu Goldsubstraten keine Fluoreszenzlöschung auf und sind, unabhängig von ihrer Schichtdicke, transparent. Die Click-Chemie stellt darüber hinaus ein sehr einfachen und effizienten Reaktionstyp dar.

Unter dem Begriff „Click-Chemie“ wurde 2001 von Kolb *et al.* eine Synthesevorschrift definiert, die sehr speziellen Richtlinien unterliegt.^[21] Grundidee der allgemeinen Click-Chemie-Strategie ist es, die Synthesebedingungen so einfach wie möglich zu halten und ein gewisses „Repertoire“ von Reaktionspartnern zusammenzustellen, die eine Art „Baukasten-System“ darstellen. Ähnlich wie bei der Synthese der Primärmetabolite in der Natur kann man daraufhin aus kleineren Molekülen sukzessiv größere Makromoleküle herstellen.

Die Reaktion muss dementsprechend stereospezifisch, mit einer hohen Ausbeute und unter einfachsten Bedingungen (zum Beispiel: bei Raumtemperatur, unter normalen Luftdruck) ablaufen. Als Lösungsmittel wird auch folglich eine gut handhabbare, einfach abzutrennende Substanz (wie beispielsweise Wasser) vorgeschrieben.

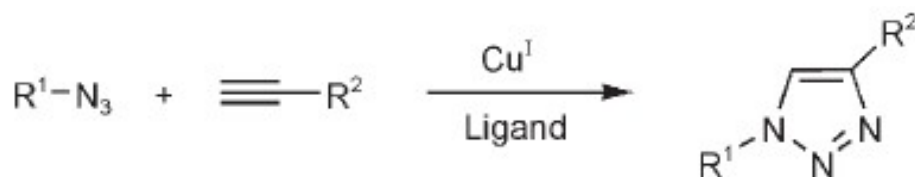


Abbildung 1.2: Kupfer(I)-katalysierte 1,3-Cycloaddition eines Azids und eines Alkyls.^[22]

Ihr prominentester Vertreter stellt die kupferkatalysierte Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition dar.^[22,23] Bei dieser wird über eine 1,3-Cycloaddition aus einem Azid und einem Alkin mit Hilfe eines Übergangskatalysators ein 1,2,3-Triazol synthetisiert (siehe Abb. 1.2).

1.2.1.1 Generierung reaktiver Oberflächen

Lahann *et al.* stellte, basierend auf der Arbeit von Gorham,^[24] 1998 eine Methodik vor, bei der mittels Gasphasenabscheidung (eng.: chemical vapor deposition; CVD) aus funktionalisierten [2.2]Paracyclophan Monomeren, Polymerbeschichtungen auf Substrate generiert werden konnten.^[25] Die Bedingungen des Abscheidungsprozesses des Polymers auf ein Substrat lagen hierbei bei 0,5 mbar, 10°C – 15°C und sind frei von Lösungsmitteln, dementsprechend für nahezu jedes Substrat anwendbar. Im Laufe der Zeit wurden neben den ursprünglich verwendeten Monomeren noch aus einer Vielzahl weiterer Monomere mit anderen funktionellen Gruppen erfolgreich Polymerschichten generiert und so die Bandbreite der Anwendungsmöglichkeit dieser Methodik erweitert.^[26]

Basierend auf diesen Arbeiten wurde 2006 von Nandivada *et al.* eine Polymerschicht mit funktionellen Alkinen hergestellt (siehe Abb. 1.3). Als Monomer wurde das einfach alkin substituierte 4-Ethynyl-[2.2]paracyclophan (siehe Abb. 1.3A) verwendet, um eine reaktive Polymerschicht aus Poly(4-ethynyl-p-xylylen-co-p-xylylen)(siehe Abb. 1.3B) zu synthetisieren. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den gängigen Gasphasenabscheidungen: bei einem Druck von 0,5 mbar erfolgte die Sublimation bei 90°C – 110°C, die Pyrolyse bei 650°C und die Abscheidung bei 15°C.^[27]

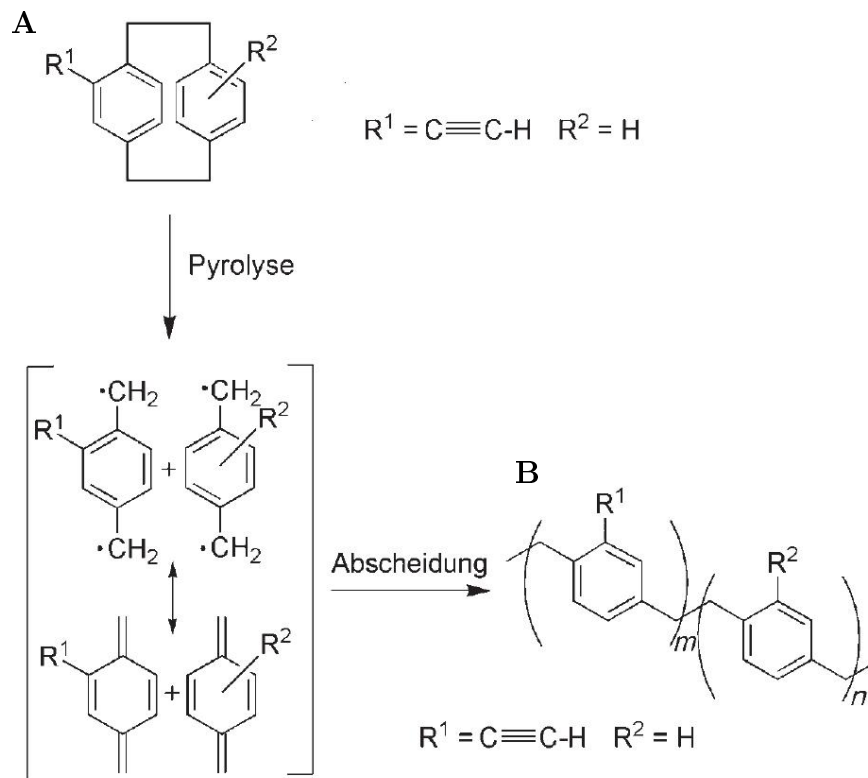


Abbildung 1.3: Synthese des alkinfunktionalisierten Polymeres Poly(4-ethinyl-p-xylylen-co-p-xylylen) durch CVD von 4-Ethinyl[2.2]paracyclophan. **A:** Ausgangsmonomer 4-Ethinyl-[2.2]paracyclophan. **B:** Polymer aus Poly(4-ethinyl-p-xylylen-co-p-xylylen) (2).^[27]

1.2.1.2 Strukturierung der reaktiven Oberflächen

Um die Funktionalität der Polymerschicht zu demonstrieren, wurde an diese Biotin, in Form eines Biotinazids, gebunden. Die Kupfer(I)-Ionen, welche diese Reaktion katalysierten, wurden in situ über Kupfersulfat und Natriumascorbat generiert, wobei Letzteres hierbei als Reduktionsmittel fungierte (siehe Abb. 1.4).

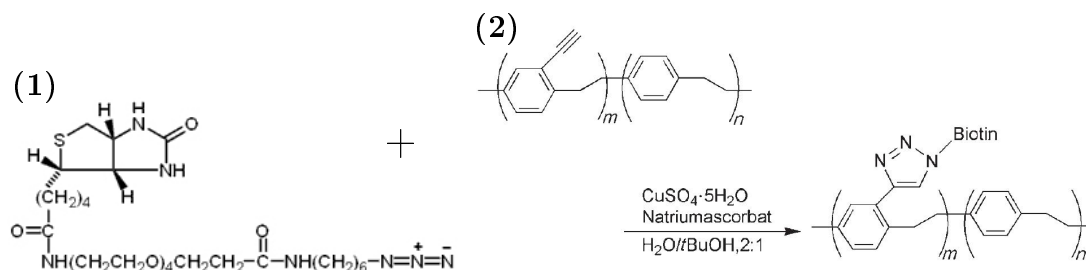


Abbildung 1.4: Bindung von Biotinazid(1) an eine reaktive Polymerschicht(2).^[27]

Der Ablauf dieser Arbeit ist in der Abbildung 1.5 schematische dargestellt. Die Strukturierung erfolgte hierbei über Mikrokontakt-Drucken, wobei zu beachten ist, dass nicht das Biotinazid gedruckt wurde, sondern das Kupfersulfat (siehe Abb. 1.5B). Das Biotinazid und Natriumascorbat

wurden in einem vorhergehenden Schritt auf die reaktive Polymerschicht adsorbiert (siehe Abb. 1.5A). Der Druckprozess führte zu einer lokalen Bildung des Katalysators in den gedruckten Bereichen und nur dort zu einer Bindung des Azids an die reaktive Polymerschicht. Anschließend wurden an diese Biotin-Strukturen TRITC-markiertes Streptavidin gebunden (siehe Abb. 1.5C), um diese fluoreszent sichtbar zu machen (siehe Abb. 1.5D und E).

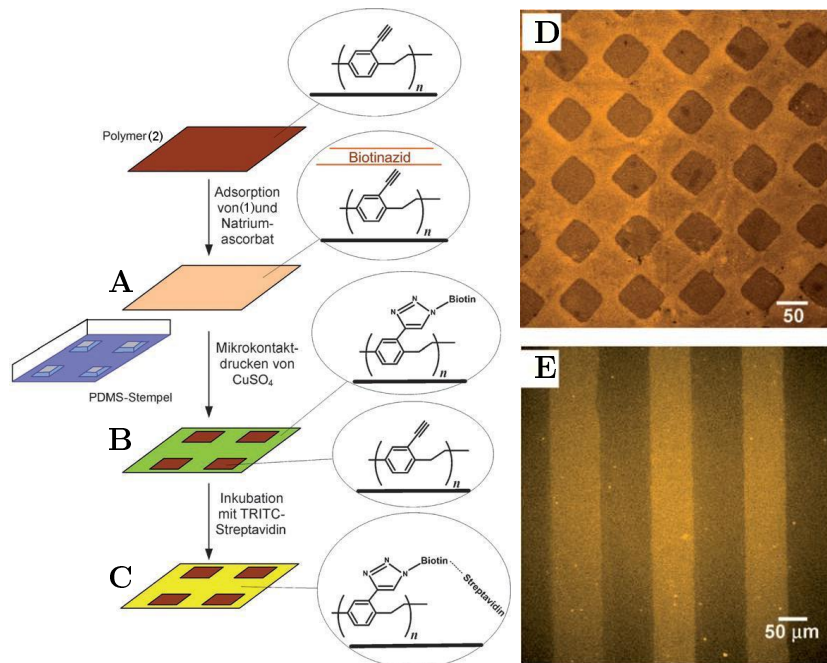


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin Kopplung auf einer reaktiven Polymerschicht (A – C) und Fluoreszenzaufnahmen nach erfolgter Streptavidin-TRITC Kopplung an den biotinylierten Strukturen des Polymers (D und E).^[27]

1.2.2 Dreidimensionale Strukturierung - Lipid Dip-Pen Nanolithographie

Hinsichtlich der Überlegung dreidimensionale Strukturen zu erzeugen, würde sich die vorgestellte neue „molekulare Tinte“ von Azidverbindungen nicht eignen, da diese ebenfalls Monolagen auf dem Substrat ausbilden würde. Lenhert *et al.* stellte 2007 die Lipid Dip-Pen Nanolithographie (L-DPN) vor, bei welcher es sich bei der verwendeten „molekularen Tinte“ um Phospholipidmischungen von DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, $T_m = -20^\circ\text{C}$) mit funktionellen Kopfgruppen tragenden Phospholipiden handelt.^[28] DOPC fungiert hierbei als Trägermaterial, die Menge des zugegebenen funktionellen Phospholipids liegt üblicherweise zwischen 1 mol% – 10 mol%. Das Phasen- und Hydratationsverhalten dieses ungesättigten(18:1) Phospholipids wurde in früheren Arbeiten detailliert dokumentiert^[29] und es liegt bei den gegebenen Arbeitsbedingungen (40% – 80% relative Luftfeuchtigkeit, 18°C – 25°C Umgebungstemperatur und mittleren Luftdruck) in seiner lamellaren flüssig-kristallinen Phase vor.^[30]

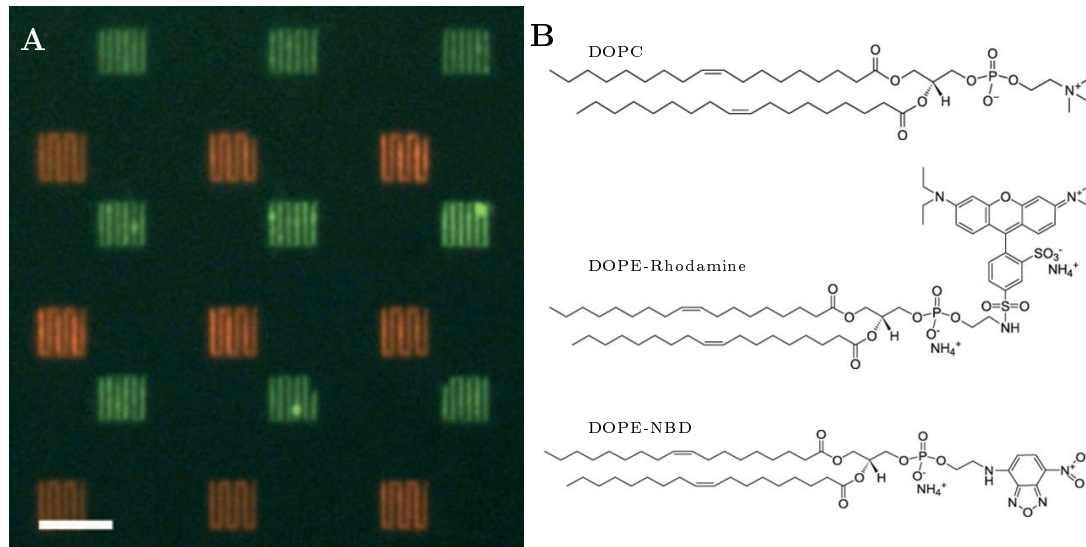


Abbildung 1.6: Exemplarische Nanostrukturen aus Phospholipiden. **A:** Fluoreszenzaufnahme von fluoreszent markierte Lipidstrukturen, geschrieben auf einem Polystyrol Substrat. Der Größenstandard entspricht 5 µm. **B:** Strukturformeln der verwendeten Lipide DOPC, DOPE-Rhodamine und DOPE-NBD. [28]

Bei den anfangs verwendeten funktionellen Gruppen handelt es sich, wie im Fall von DOPE-Rhodamin (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)) und DOPE-NBD (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)) um fluoreszente Moleküle (Rhodamin bzw. NBD), welche zur Visualisierung der geschriebenen Strukturen dienen (siehe Abb.1.6).

1.2.2.1 Fluidität der Lipidstrukturen

Dadurch, dass die Bindung der Lipidstrukturen am Substrat nicht kovalent ist, sondern es sich hierbei um Physisorption handelt, behalten diese weiterhin ihre Fluidität. Lenhert *et al.* demonstrierte diese Eigenschaft, indem er 4 Lipidstrukturen auf ein Substrat applizierte (siehe Abb. 1.7), wovon zwei jeweils mit einem fluorophortragenden Lipid (DOPE-Rhodamin) vermischt waren (Abb. 1.7: A2 und A4), die anderen beiden nur DOPC enthielten (Abb. 1.7: A1 und A3).

Daraufhin wurde eine fluoreszierende und eine nicht fluoreszent anregbare Struktur über eine weitere Lipidstruktur miteinander verbunden (Abb. 1.7: A3 und A4). Als Kontrolle wurde bei den beiden anderen Strukturen diese Verbindung nicht vollständig gezogen (Abb. 1.7: A1 und A2). Wie in Abbildung 1.7 C ersichtlich, konnten die fluoreszenten Lipide über die direkte Verbindung der unteren beiden Strukturen miteinander in die nicht fluoreszente Struktur diffundieren und zu einer Fluoreszenz in dieser führen. Ebenfalls erkennbar ist die im direkten Vergleich lokal geringere Fluoreszenz der unteren Struktur, basierend auf der weiträumigeren Verteilung der fluoreszenten Moleküle innerhalb der Struktur.

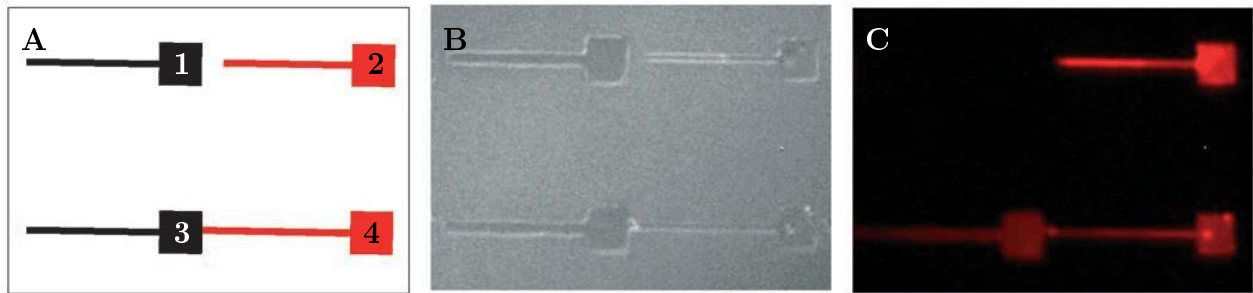


Abbildung 1.7: Nachweis der Fluidität der applizierten Lipidstrukturen. **A:** Schematische Darstellung der geschriebenen Strukturen von **B** und **C** (nach^[28]). Schwarz dargestellt die Strukturen, die nur DOPC enthalten (A1 und A3), rot die Strukturen, denen noch das fluoreszent markierte DOPE-Rhodamin beigemischt wurde (A2 und A4). **B:** Hellfeldmikroskopische Aufnahme der geschriebenen Strukturen. **C:** Fluoreszenzbild der geschriebenen Strukturen. Die Fluoreszenz in der linken, unteren Struktur (A3) basiert auf der Diffusion von fluoreszenten Phospholipiden aus der benachbarten Struktur über die gemeinsame Lipid-Verbindung.^[28]

1.2.2.2 Applizierung mehrerer Moleküllagen

Neben ihrer Fluidität besitzen die Lipidmischungen eine weitere Eigenschaft, mit der sie sich von den gängigen „molekularen Tinten“ abheben. Während des Schreibvorganges können nicht nur einzelne Moleküllagen, sondern Stapel dieser appliziert werden. Durch Variation der umgebenden relativen Luftfeuchtigkeit und/oder der Schreibgeschwindigkeit kann die Höhe der Stapel von einer einzelnen Monolagen bis hin zu mehreren Multilagen beeinflusst werden (siehe Abbildung 1.8). Durch die Erhöhung der relativen Luftfeuchtigkeit wird der Wassermeniskus, als auch der Hydratationsgrad des Phospholipids verändert.

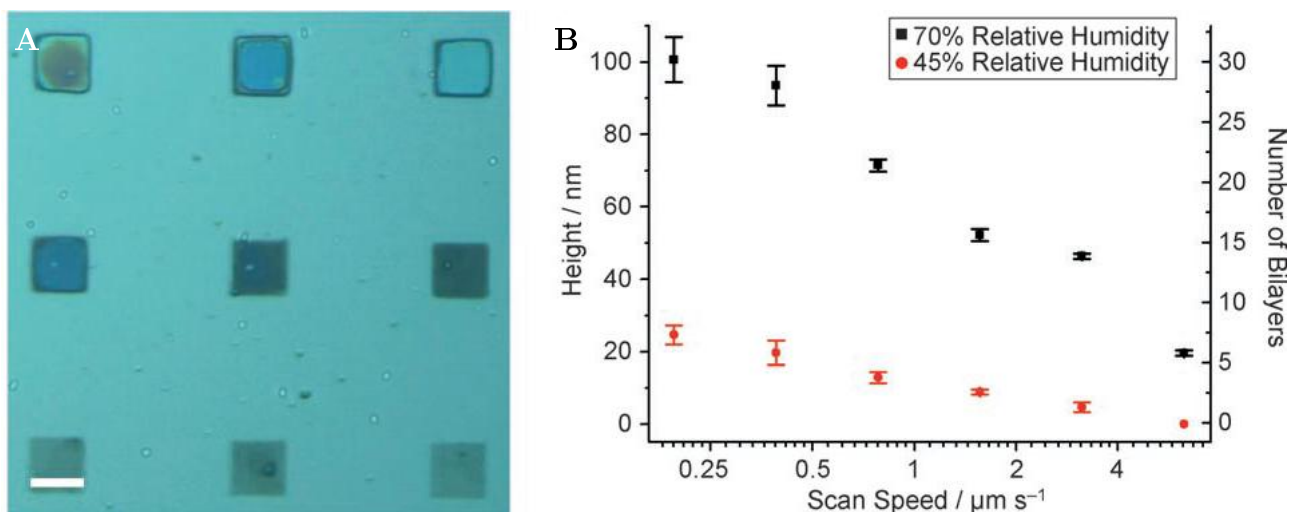


Abbildung 1.8: Regulierung der Multilagenhöhen via Luftfeuchtigkeit und Schreibgeschwindigkeit. **A:** Auflichtmikroskopische Aufnahme von mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten geschriebenen Lipidstrukturen. Der Größenstandard entspricht 5 μm . **B:** Korrelation der Höhe der applizierten Strukturen mit ihrer Schreibgeschwindigkeit bei zwei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von jeweils 8 Querschnittsprofilen einer Struktur.^[28]

1.2.2.3 Funktionalisierung der Lipidstrukturen

Die Verwendung von fluoreszent markierten Lipiden erlaubt eine Visualisierung, als auch Größenabschätzung^[31] der applizierten Strukturen. Durch Beimischung von weiteren funktionelle Kopfgruppen tragende Phospholipiden, können die Strukturen direkt als Bindungspartner für entsprechende Moleküle dienen. Sekula *et al.* demonstrierte 2008 die Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen an solchen Phospholipidstrukturen.^[32]

In Abbildung 1.9 sind diese Funktionalisierungen und die Strukturformeln der beiden verwendeten funktionalisierten Phospholipide schematisch dargestellt. Bei diesen handelte es sich um DGS-NTA(Ni) (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid) succinyl]) einem Nickelchelate, welcher mit Histidin-markierten Proteinen eine Komplexbildung eingeht und so die markierten Proteine an sich bindet und DOPE-Biotin(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap Biotinyl)), welches Streptavidin bindet.

Die Bindung des Moleküls erfolgt dementsprechend direkt, wie im Fall von DGS-NTA(Ni) und Histidin-markierten Proteinen (siehe Abb. 1.9A) oder indirekt über die vorhergehende Bindung von Streptavidin an die Zielstruktur und sukzessive Bindung eines biotinylierten Proteins (siehe Abb. 1.9B).

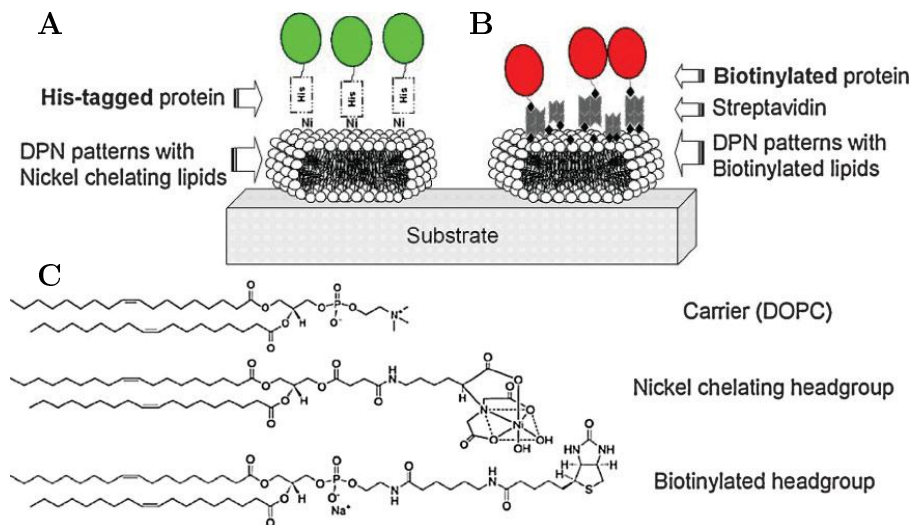


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Lipid-Strukturen über DGS-NTA(Ni)(A) oder DOPE-Biotin(B). C: Strukturformeln der verwendeten Lipide.^[32]

Um den geeigneten molare Masseanteil der beiden funktionellen Lipide in einer Lipidmischung zu bestimmen, wurden an verschiedene Strukturen das fluoreszent markierte Protein Streptavidin (STV-Cy3) und das fluoreszente, Histidin-markierte Protein GFP (His-GFP) gebunden. Die Strukturen selber beinhalteten unterschiedliche molare Massenanteile der funktionellen Lipide und dieser Anteil wurde mit der gemessenen Fluoreszenz des jeweiligen Proteins korreliert (siehe Abbildung 1.10).

Im Fall der biotinylierten Lipide wurde ein molarer Massenanteil von 5 mol% bestimmt, da ab diesem eine Sättigung in der Anbindung an die Strukturen eintrat (siehe Abbildung

1.10B). Obwohl die Strukturen noch nicht ihre mögliche Bindungskapazität erreicht hatten (siehe Abbildung 1.10C), wurde bei den Nickel-Chelat Lipiden der zu verwendende molare Masseanteil auf maximal 35 mol% begrenzt, da die Lipidmischung aufgrund ihrer veränderter Viskosität nicht mehr appliziert werden konnten.^[32]

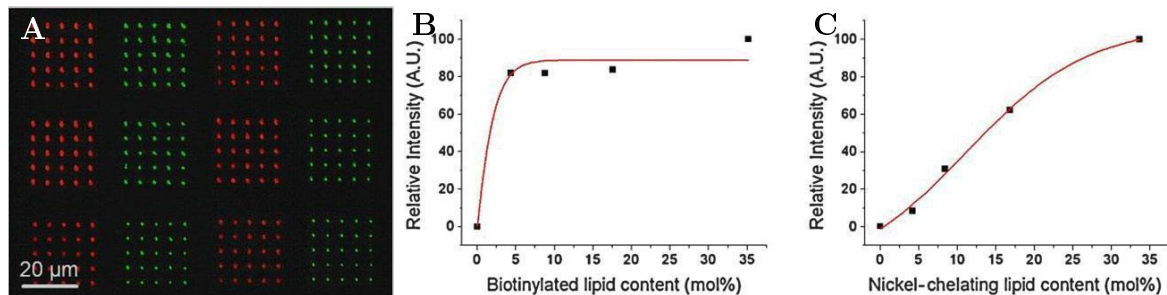


Abbildung 1.10: Bestimmung des optimalen molaren Massenanteils von DGS-NTA(Ni) und DOPE-Biotin über die Fluoreszenzintensität der gebundenen Proteine (rot: STV-Cy3 und grün: His-GFP). **A:** Fluoreszenzaufnahme der gebundenen Proteine an parallel applizierten Lipidstrukturen. **B** und **C** Korrelation der Fluoreszenzintensität der gebundenen Proteine (**B:** STV-Cy3 und **C:** His-GFP) mit dem molaren Massenanteil ihres jeweiligen Lipidbindungspartners.^[32]

Sekula *et al.* demonstrierte die Biokompatibilität der Lipidstrukturen, indem an den biotinylierten Strukturen über Streptavidin der biotinylierte Antikörper α -CD3 ϵ und Rezeptor α -CD28 gebunden wurde. Diese beiden Moleküle führten zu einer Aktivierung der gebundenen Jurkat T-Zellen (siehe Abbildung 1.11A), welche über die Visualisierung der Genexpression von CD69 in den Zellen nachgewiesen wurde. Hierfür wurde CD69 mittels dem Antikörper α -CD69-PE markiert und über den fluoreszent markierten Antikörper α -PETRITC visualisiert (siehe Abbildung 1.11B). Als Kontrolle wurde anstatt α -CD3 ϵ und dem Rezeptor α -CD28 lediglich der Antikörper IgG an die Strukturen gebunden. Dies führte zwar zu einer Adhäsion der T-Zellen, jedoch nicht zu deren Aktivierung (siehe Abbildung 1.11C).

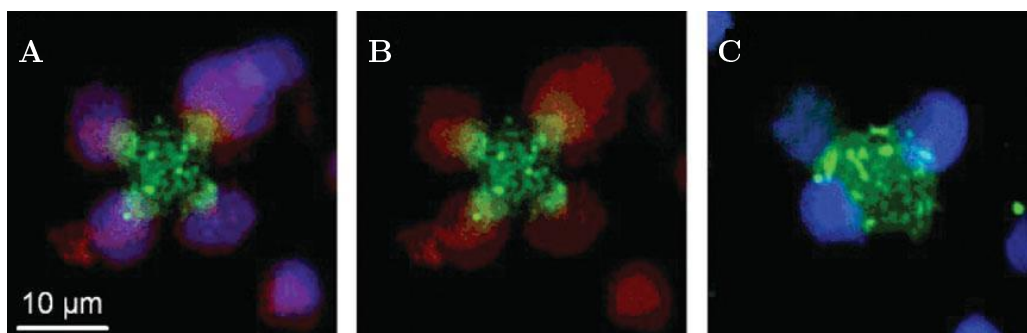


Abbildung 1.11: Aktivierung von T-Zellen über funktionalisierte Lipidstrukturen. Grün: biotinylierte Lipidstrukturen. Blau: DAPI. Rot: α -PETRITC. **A:** Adhärierte Jurkat T-Zellen an den Ecken der Lipidstrukturen, welche eine CD69 Genexpression aufweisen. **B:** CD69 Genexpression in den aktivierten T-Zellen. **C:** Kontrollversuch, bei dem die T-Zellen sich an den Strukturen anlagerten, aber keine Aktivierung aufwiesen.^[32]

1.2.2.4 Funktionalität über Dreidimensionalität - Biosensoren

Die Lipid-DPN stellt zusammengefasst einen möglichen Kandidaten dar, der eine direkte dreidimensionale Strukturierung mit Hilfe der DPN erlauben könnte. Die in den vorgestellten Arbeiten^[28,32] generierten Strukturen wiesen zum Teil schon Strukturhöhen, die über viele Monolagen hinausgehen auf, aber eine Anwendung, die direkt auf der Dreidimensionalität basiert, wurde noch nicht erbracht.

Eine denkbare Applikation wäre hierbei die Herstellung von Beugungsgittern, parallele Gitterstrukturen mit definierten Abständen und Höhen. Seit der ersten wissenschaftlichen Dokumentation von Beugungsgittern bzw. deren Effekt auf Licht (Teilchenwellen) von Rittenhouse im Jahre 1786^[33] wurden diese im Laufe der Zeit kontinuierlich weiter entwickelt^[34-36] und neben ihrem Einsatz in Spektrometern bzw. Monochromatoren noch in einer Vielzahl von weiteren Geräten/Anwendungen^[37-39] verwendet.

Ihre Eigenschaft, Teilchenwellen zu beugen und im Falle von Licht verschiedener Wellenlängen dieses in ihr Spektrum aufzuteilen, könnte zur Anwendung als Biosensor verwendet werden. Voraussetzung hierfür ist eine detektierbare Veränderung des gebeugten Lichtes durch Analytbindung an die generierten Strukturen. Darüberhinaus ist eine Integration solcher funktionellen Beugungsgitter in schon bestehende optische Systeme, wie beispielsweise Wellenleitern, denkbar. Die Lichteinkopplung kann hierbei über reguläre Laser, die ein enges Frequenzspektrum oder Weißlichtlaser, die das gesamte Spektrum des sichtbaren Bereichs aufweisen können, erfolgen. In letzterem Fall wird aus Laserlicht unter Ausnutzung nichtlinearer optischer Effekte (Raman- und Vier-Wellen-Effekt, Selbstphasenmodulation, sowie Solitonen-„Zerfall“), die in den lichtleitenden Elementen auftreten, generiert. Es stellt bezüglich ihrer Eigenschaften eine Vereinigung von Weißlicht und Laserlicht dar und weist dementsprechend eine große Kohärenzlänge und hohe Parallelität jedoch gleichzeitig ein breites Emissionsspektrum auf.^[40,41] Je nach Beschaffenheit des Wellenleiters können diese jedoch weiterhin als planares Substrat angesehen werden.

1.2.3 Verwendung vorstrukturierter Oberflächen - Toroide

Ein gänzlich neues Feld der Integration von DPN-Strukturen in bestehende Strukturierungen ist die Applizierung von DPN-Strukturen auf dreidimensionale Substrate. Ein mögliches „Substrat“ sind hierbei Toroide, dreidimensionale Kelchstrukturen, die über den Flüstergalerie-Effekt als photonische Resonatoren fungieren. Das Detektionsprinzip basiert auf der Phasenverschiebung des resonierenden Lichtes im Toroid durch Anbindung des Analyts an den äusseren Rand, die aktiv resonierende Struktur des Toroids.^[42] Das Licht wird hierbei entweder extern z.B. über eine Glasfaser in den Toroid gekoppelt oder direkt intern in diesem über beigemischte Fluoreszenzfarbstoffe und Anregung dieser generiert.^[43]

Grossmann *et al.* stellte 2010 Toroide^[44] vor, die über Elektronenstrahl-Lithographie aus PMMA generiert wurden. Im Vergleich zu vorhergehenden Arbeiten,^[45] wiesen diese einen

höheren Q -Faktor (2×10^6) und eine konische Form auf. Beides ein Ergebnis des kurzen Erhitzungsprozesses knapp über die Glasübergangstemperatur (30 s, 125°C) am Ende der Fertigung, wodurch die Oberflächenrauheit verringert, der Torus aber gleichzeitig aufgewölbt wird (siehe Abb. 1.12A und B). Mithilfe der DPN würden man hierbei versuchen den äusseren Rand der Toroid mit einer entsprechenden molekularen Tinte zu beschreiben. Durch spezifische Anbindung des Analyts an diesen Strukturen sollte eine detektierbare Phasenverschiebung des resonierenden Lichtes eintreten.

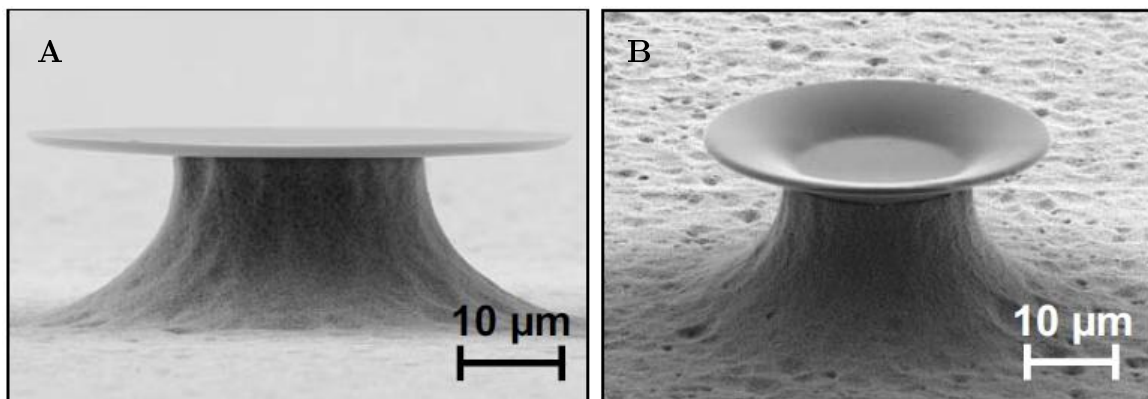


Abbildung 1.12: Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines Toroiden aus PMMA vor (A) und nach (B) des Erhitzungsprozesses.^[44]

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Weiterentwicklung von neuen Nanostrukturierungsverfahren für die Dip-Pen Nanolithographie. Ich fokussierte mich hierbei auf mögliche Applikationen, die für biologische bzw. medizinische Arbeitsgebiete von Interesse sind und die eingangs beschriebenen Grenzen der DPN erweitern.

Dies kann kurz folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Einsatz und Evaluierung einer neuen molekularen Tinte, die nicht auf der Thiol-Gold Chemisorption basiert
- Generierung von dreidimensionalen Strukturen und Nachweis derer Funktionalität
- Funktionalisierung von dreidimensional vorstrukturierten Substraten mit Hilfe der DPN

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller/Bezugsquelle |
|--|--------------------------------|
| Alexa Fluor [®] 555 Azid (ammonium salt) | Invitrogen |
| Alexa Fluor [®] 488, 10 nm colloidal gold conjugate | Invitrogen |
| BSA | Sigma Aldrich |
| BSA-Alexa Fluor [®] 488 Konjugat | Invitrogen |
| Chloroform | Merck |
| DGS-NTA(Ni) | Avanti Polar Lipids |
| DOPC | Avanti Polar Lipids |
| DOPE-Biotin | Avanti Polar Lipids |
| DOPE-Rhodamin | Avanti Polar Lipids |
| DOPE- NBD | Avanti Polar Lipids |
| Ethanol | Merck |
| Kupfersulfat | Sigma Aldrich |
| PEG4 carboxamide-6-azidohexanyl biotin | Invitrogen |
| Natriumascorbat | Sigma Aldrich |
| Streptavidin-Cy3 | Sigma Aldrich |
| Toluol | Sigma Aldrich |
| 2-Propanol | Merck |

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Materialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--------------------------------|
| AFM Tip, Typ-A (Einzel-Spitze; $k=0,041\text{ N/m}$) | NanoInk |
| AFM Tip, Typ-F (26 Spitzen; $k=0,054\text{ N/m}$) | NanoInk |
| Bechergläser | VWR |
| Deckgläser | Menzel-Gläser |
| Einwegspritzen (1 ml – 10 ml) | Becton Dickinson |
| Gewindeflaschen (2 ml & 4 ml) | Supelco |
| Glasflaschen | Duran group |
| Handschuhe | Kimberly-Clark |
| Ink wells (M-12MW/M-6MW/custom-made) | NanoInk |
| Laborflaschen | Duran Group |
| Objektträger | VWR |
| Paraflim | Pechiney Plastic Packaging |
| Petrischalen (Polystyrol) | Greiner |
| Petrischalen (Glas) | Greiner |
| Pinzetten | Dumont |
| Pipetten | Eppendorf |
| Pipettenspitzen | VWR |
| PMMA-Hesaglas | Notz Plastic AG |
| PMMA-107 kDa | PSS Mainz |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml – 1,5 ml) | VWR |
| Spritzflaschen | VWR |
| Spritzenfilter (Porengröße: $0,45\ \mu\text{m}$) | Corning Incorporated |
| Wischtücher | Kimberly-Clark |
| Zentrifugenröhrchen (25 ml & 50 ml) | Greiner/VWR |

2.3 Geräte

Tabelle 2.3: Geräteliste

| Gerät | Hersteller/Bezugsquelle |
|--|--------------------------------|
| Coolsnap HQ ² CCD-Kamera | Photometrics |
| DS-2MV Farb-CCD-Kamera | Nikon |
| DPN 5000 | NanoInk |
| Eclipse 80i Aufrechtmikroskop | Nikon |
| Eclipse TE-2000 E invertiertes Mikroskop | Nikon |
| Exsikator | Duran Group |
| Idus DU420A-BU CCD-Kamera | Andor |
| Glasschneider | VWR |
| Handschuhkasten Unilab | MBraun |
| Kaltlichtquelle | Schott KL 1500 LCD |
| Monochromator Acton SpectraPro 500 | Princeton Instruments |
| Membranpumpe | KNF Neuberger |
| Nd:YVO ₄ Laser | InnoLas GmbH |
| NLP 2000 | NanoInk |
| Orca ER CCD-Kamera | Hamamatsu |
| Plasmalab 80 Plus | Oxford Instruments |
| Präzisionswaage | Sartorius |
| Tischzentrifuge Galaxy 7D | VWR |
| T-PFS Perfect Focus System | Nikon |
| Ultraschallbad Sonorex | Bandelin electronic |
| Vortexer | VWR |
| Weißlichtlaser SuperK Versa | Koheras |
| W-TIRF Illuminator | Nikon |

3 Methoden

3.1 Lipid-DPN - Allgemein

3.1.1 Herstellung von Lipid-Tinten

Die verwendeten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids gelöst in Chloroform gekauft. Das Lipid DOPC (18:1) diente als Trägermaterial. Nach Zugabe der entsprechenden Menge an funktionellen Lipiden (siehe Tabelle 3.1) wurden diese für 30 s – 60 s mittels Vortexer geschüttelt und für 15 min in ein Ultraschallbad gegeben. In die Reservoirs der Inkwells wurden 1 μ l – 1,5 μ l in 0,5 μ l-Schritten der entsprechenden Lipid-Tinte gegeben und um das Chloroform zu verdampfen, wurden die Inkwells für 1h im Vakuum (0,2 bar) gelagert. Die Langzeit-Lagerung der Lipide und deren Lipid-Mischungen erfolgte bei -20°C.

Tabelle 3.1: Prozentuale Stoffmenge der beigesetzten Lipide bezogen auf die Stoffmenge von DOPC

| Lipid | Zugabe |
|---------------|---------|
| DGS-NTA(Ni) | 20 mol% |
| DOPE-Biotin | 4 mol% |
| DOPE-Rhodamin | 1 mol% |
| DOPE- NBD | 1 mol% |

3.1.2 Beschichtung der Cantilever

Für die Herstellung der Beugungsgitters wurde der Multi-Tip Cantilever des F-Typs der Firma NanoInk verwendet (siehe Abb. 3.1A), für die Funktionalisierung der Toroide der Einzel-Tip Cantilever des A-Typs der Firma NanoInk (siehe Abb. 3.1B). Der Spitzendurchmesser beider Cantilever beträgt \sim 15 nm.

Die Beschichtung der Cantilever erfolgte über die im Inkwell befindlichen Mikrokanäle (siehe Abb. 3.2B bzw. C3). Hierbei wurden die Cantilever am DPN 5000 System montiert und bei 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% für rund 30 min (Beugungsgitter) in der jeweiligen Lipid-Mischung belassen bzw. für 15 min bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% (Toroide). Für die spätere parallele Applizierung von Kontrolle und analytbindender Lipid-Tinte, wurde im Falle der Beugungsgitter die Tinten-Aufnahmepunkte des Seitenkanals (siehe Abb. 3.2C3)

verwendet. Hierdurch verblieb zwischen den einzelnen beschichteten Spitzen des Cantilevers jeweils eine unbeschichtet, verminderte dadurch das Risiko einer Kreuzkontamination und sorgte für einen ausreichenden Abstand der Strukturen zueinander. Die erste und letzte Spitze des Cantilevers wurden nicht verwendet. Die Beschichtung des Einzel-Spitzen Cantilevers erfolgte im jeweiligen Kanal des zentralen Aufnahmepunktes (siehe Abb. 3.2B). Für die Kontrolle und analytbindende Tinte wurden separate Cantilever verwendet.

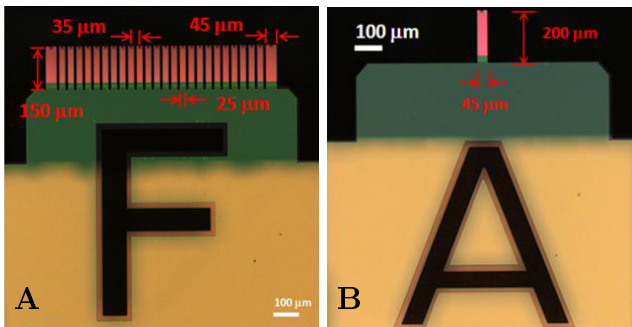


Abbildung 3.1: Cantilever des verwendeten A- und F-Typs von NanoInk¹. **A:** 26-Spitzen Cantilever des F-Typs. Der Abstand der einzelnen Spitzen zueinander beträgt 35 µm. Die beiden äusseren Spitzen dienen primär der AFM-Messung einer geschriebenen Struktur. **B:** Einzel-Spitzen Cantilever des A-Typs.

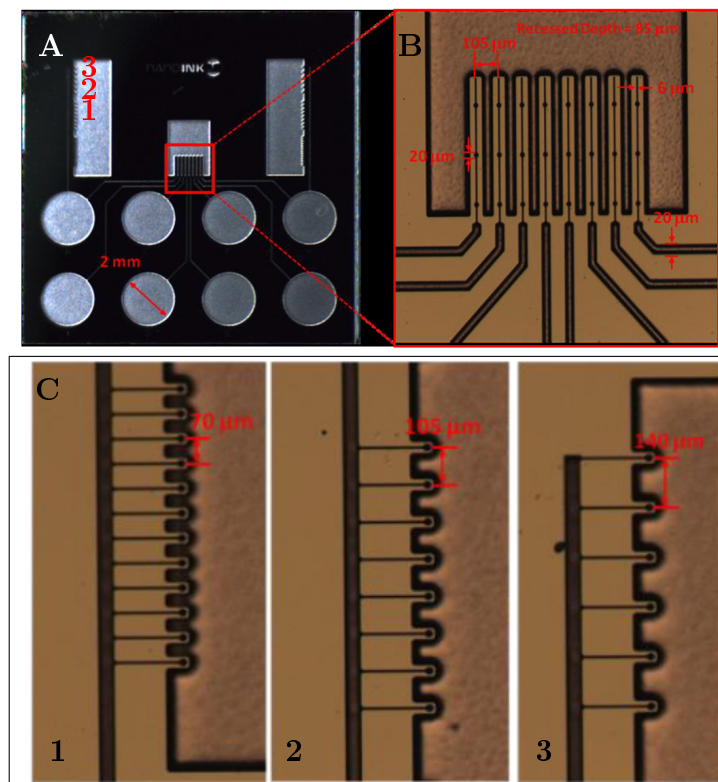


Abbildung 3.2: Inkwell C-8MW2 der Firma NanoInk, sowie Vergrößerungen der Tinten-Aufnahmepunkte des Inkwells¹. **A:** Inkwell C-8MW2. Der rote Bereich markiert den zentralen Aufnahmeort, an dem die Mikrokanäle aller Reservoirs gebündelt werden. 1–3 zeigt die Lage der Teilabschnitte des Seitenkanals aus C. **B:** Vergrößerung des rot markierten Bereiches aus A, den zentralen Tinten-Aufnahmepunkt. **C:** 1–3 zeigt die Vergrößerung der Tinten-Aufnahmepunkte eines Seitenkanals. 1: Abstand 70 µm, 2: Abstand 105 µm und 3: Abstand 140 µm, dadurch kann jede 2., 3. oder 4. Spitze eines F-Typ Cantilevers beschichtete werden.

¹Quelle: <http://www.nanoink.net>

3.2 Lipid-Beugungsgitter

3.2.1 Herstellung der Strukturen

Bis auf die fluoreszent markierten Lipid-Strukturen, die den höher auflösenden TIRF-Aufnahmen dienen (siehe Abb. 4.13), wurden die Beugungsgitter auf kommerzielle PMMA Stücke (ca. $15\text{ mm} \times 15\text{ mm}$) appliziert. Zur Orientierung auf dem Substrat wurde auf dieses ein Kreuz mittels eines Glasschneiders eingeritzt. Das PMMA wurde vor der Verwendung für jeweils 5 min in Isopropanol und Reinstwasser im Ultraschallbad gereinigt. Bei dem Substrat für die TIRF-Aufnahmen handelt es sich um Glas-Deckgläser, die mit PMMA rotationsbeschichtet wurden.

Die Herstellung des Wellenleiters erfolgte durch Mitarbeiter am Institut für Mikrostrukturtechnik(IMT,KIT) bzw. am Institut für Angewandte Physik(APH,KIT).^[46,47]

Die Erstellung der Schreibmuster erfolgte über das systeminterne Programm InkCAD. Die Umgebungsbedingungen während des Schreibprozesses wurden über die Klimakammer des DPN 5000 reguliert. Der Schreibprozess erfolgte bei 23°C und 45% relativer Luftfeuchtigkeit. Um ein Spreiten der Lipid-Strukturen zu minimieren, wurden diese direkt nach deren Beschriftung in einem Handschuhkasten (eng. glovebox) mit Stickstoff-Atmosphäre gelagert. Für den Transport dorthin wurden die Substrate in der Klimakammer des DPN in einer Petrischale mittels Parafilm eingeschlossen.

Die Geschwindigkeit der Schreibprozesse befand sich zwischen $0,1 - 10\ \mu\text{m/s}$ und wurde entsprechend der Höhe der vorangegangenen, applizierten Struktur angepasst. Hierfür wurden die Strukturen mittels einer LED-Handlampe seitlich angestrahlt und deren Höhe über das Kamerabild des DPN 5000 abgeschätzt.

3.2.2 Proteindetektion über Beugungsgitter

Es wurde eine PDMS-Barriere (Kapazität: $\sim 250\ \mu\text{l}$) auf das Substrat gedrückt, in dessen Mitte sich die applizierte Struktur befand. Daraufhin wurden diese für 10 min mit $200\ \mu\text{l}$ einer 0,5%igen BSA Lösung (in $1\times\text{PBS}$) passiviert. Um den Effekt des Spreitens der Lipid-Strukturen zu minimieren, erfolgte diese erste Flüssigkeits-Zugabe in der Stickstoff-Atmosphäre des Handschuhkastens. Darüberhinaus wurden die Proben mindestens 2 h in dieser vorher gelagert. Zur Reduktion der Verdunstung der Pufferlösung wurde nach der Fixierung der Probe auf dem Mikroskopisch über diese eine Petrischale mit einem angefeuchteten Papiertuch gelegt. Vor der jeweiligen Analytzugabe erfolgten 3 Waschschrte durch mehrfaches Triturieren von jeweils $400\ \mu\text{l}$ $1\times\text{PBS}$. Die Zugabe des Analyts erfolgte in $100\ \mu\text{l}$ $1\times\text{PBS}$, wobei hierfür vorher $100\ \mu\text{l}$, der auf der Probe befindlichen Pufferlösung abgenommen wurden.

Die Beugungsbilder wurden über ein invertiertes Mikroskop (Eclipse TE-2000 E, Nikon) mit einer Farb-CCD-Kamera (DS-2MV, Nikon) in 5 s – 10 s Schritten, mit einer 6fachen Vergröße-

rung aufgenommen. Die Beleuchtung der Probe erfolgte über eine Kaltlichtlampe, die in einem Winkel von 70° die Probe bestrahlte. Für die Fluoreszenzaufnahmen dieser Strukturen wurde auf die Fluoreszenzlampe (Intensilight, Nikon) und die Schwarz-Weiss-CCD-Kamera (Orca-ER, Hamamatsu) gewechselt. Die hoch auflösenden TIRF-Aufnahmen erfolgten ebenfalls über das invertierte Mikroskop mit einem 100fachen Ölimmersionsobjektiv, die Beleuchtung über die Fluoreszenzlampe mit einem W-TIRF Illuminator (Nikon) und die Bildaufzeichnung über eine Schwarz-Weiss-CCD Kamera (Orca-ER, Hamamatsu) mit angeschlossenem Perfect Focus System (T-PFS, Nikon).

Die aufgezeichneten Beugungsbilder wurden über ImageJ (v1.38)^[48] analysiert und die ermittelten Daten mittels Origin (6.1) grafisch dargestellt. Neben der Subtraktion der entsprechenden Hintergrundintensität von den gemessenen Beugungsintensitäten, erfolgte ebenfalls eine Division durch die gemessenen Beugungsintensitäten der Kontrollen der Proben, um eine Normierung durchzuführen. Nur im Fall der Streptavidin-Detektion in Serum (siehe Abb.4.18) und der Streptavidin-Detektion an Beugungsgittern unterschiedlicher Höhe (siehe Abb.4.12) wurde die Beugungsintensität der Kontrolle separat aufgeführt.

3.3 Funktionalisierung dreidimensionaler Strukturen-Toroide

3.3.1 Herstellung der Strukturen

Die Herstellung der Toroide erfolgte durch Mitarbeiter am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT,KIT) bzw. am Institut für Angewandte Physik (APH,KIT) nach dem beschriebenen Prozess von Grossmann *et al.*^[44] und ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

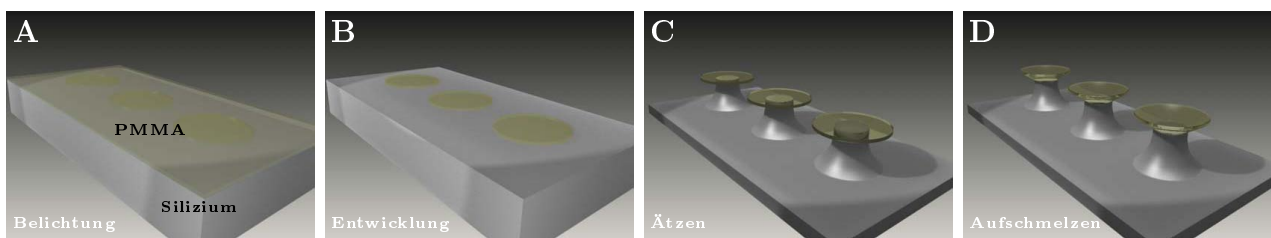


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Herstellung von Toroiden. **A:** Eine 1 µm dicke PMMA Schicht wird auf ein Silizium Substrat über Rotationsbeschichtung aufgetragen und ausgebacken. Über eine entsprechende Photomaske werden mittels tiefen UV- oder Elektronenstrahlolithographie die runden Bereiche, welche nach der Entwicklung (**B**) noch zurückbleiben, hergestellt. **C:** Über einen angeschlossenen Ätzschritt mit XeF₂ entstehen PMMA Scheiben, welche auf Siliziumfüßen ruhen. **D:** Ein angeschlossenes Aufschmelzen (Reflow) führt zu einer Verminderung der Oberflächenrauheit, bei gleichzeitiger Aufwölbung der Toroide.^[44]

Die Schreibmuster der Lipid-Strukturen wurden über das systeminterne Programm InkCAD des DPN 5000 erstellt. Die Umgebungsbedingungen während des Schreibprozesses wurden über die Klimakammer des DPN 5000 reguliert. Der Schreibprozess erfolgte bei 23°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit.

3.3.2 Visualisierung der Streptavidinanbindung

Eine PDMS-Barriere (Kapazität: $\sim 250 \mu\text{l}$) wurde auf das Substrat gedrückt, in dessen Mitte sich die Toroide mit den applizierten Strukturen befanden. Vor der Streptavidin-Zugabe wurde die Probe für 15 min mit 200 μl einer 0,5%igen BSA Lösung (in 1 \times PBS) passiviert und anschließend 3 \times durch mehrfaches Triturieren von jeweils 400 μl 1 \times PBS gewaschen. Die Zugabe des Analyts erfolgte in 100 μl 1 \times PBS, wobei hierfür vorher 100 μl , der auf der Probe befindlichen Pufferlösung abgenommen wurden. Nach 15 min wurde diese 5 \times durch mehrfaches Triturieren von jeweils 400 μl 1 \times PBS gewaschen.

Die Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen erfolgten über eine Schwarz-Weiss-CCD-Kamera (Coolsnap HQ², Photometrics) an einem aufrechten Mikroskop (Eclipse 80i, Nikon). Die Fluoreszenzprofile wurden über ImageJ erstellt.

3.3.3 Bestimmung der Laser-Performance der funktionalisierten Toroide

Der optische Aufbau ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Die funktionalisierten Toroide wurden in einer Flüssigkeitszelle mit Quarzglas Fenster (Kapazität: $\sim 200 \mu\text{l}$) fixiert. Die Flüssigkeits-Zugaben erfolgten manuell über Spritzen. Das optische Pumpen der Toroide erfolgte über eine frequenzverdoppelten Nd:YVO₄ Laser mit Güteschalter (10 ns Pulsen und 20 Hz Wiederholrate). Das vom Toroid emittierte Licht wurde über ein 20 \times Mikroskop-Objektiv gesammelt und an einen Monochromator mit angeschlossener CCD-Kamera (Idus DU420A-BU, Andor) geleitet. Das reflektierte Licht des Pumplasers wurde über Langpass-Filter herausgefiltert. Um eine Relation zwischen angelegter Laser-Pumpleistung und detektierter Emission zu erhalten, wurde die Pumpleistung mittels Pockels-Zelle und einem Polarisationsfilter gesteuert und die entsprechenden Emissionsspektren aufgezeichnet. Hierbei wurde der Laserpeak mit der höchsten optischen Verstärkung verwendet. Das Beugungsgitter im Spektrometer wies 150 Linien/mm auf.

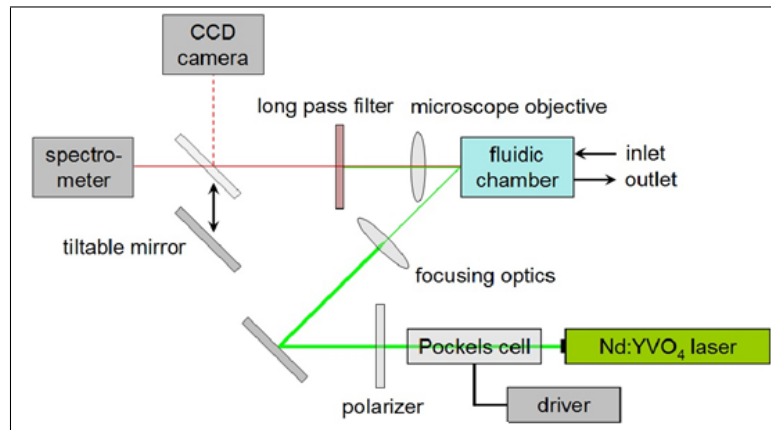


Abbildung 3.4: Schematische Darstellungen des Aufbaus zur Detektion der Emission. Der Strahl eines frequenzverdoppelten Nd:YVO₄ Lasers ($\lambda = 532$ nm) wird durch einen Polarisationsfilter geleitet und auf die Toroide, welche sich in einer Flüssigkeitszelle befinden, fokussiert. Die Pumpleistung des Lasers wird über eine Pockels-Zelle gesteuert. Über ein Spektrometer wird die Emission der fluoreszenten Strukturen gemessen. Hierbei wird diese zuvor über ein Mikroskop-Objektiv gesammelt und durch ein Farbfilter selektiert. Zur Visualisierung kann das Bild hierbei ebenfalls auf eine CCD-Kamera umgeleitet werden.

3.3.4 Proteindetektion durch funktionalisierte Toroide

Um Signalverzerrungen, die durch das Anschwellen des PMMAs auf Flüssigkeits-Zugabe verursacht werden könnten, zu minimieren, wurde die Probe für 30 min in Wasser gelagert, bevor dieses mit einer 0,5%igen BSA-Lösung ausgetauscht wurde. Die BSA-Lösung wurde für 15 min in der Flüssigkeitszelle belassen, um die nicht-funktionalisierten Bereiche des Toroids zu passivieren. Nach der Spülung der Kammer mit Wasser wurde die Streptavidin-Lösung eingespeist und das emittierte Signal der Toroide zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei konstanter Pumpleistung aufgezeichnet. Auf die Datenpunkte eines ausgewählten Laserpeaks wurde mittels Lorentz-Verteilung ein Fit durchgeführt, um die genaue spektrale Position zu bestimmen und so eine stabile Beobachtung der Laser-Mode über die Zeit zu gewährleisten. Das verwendete Beugungsgitter im Spektrometer wies 1200 Linien/mm auf.

3.4 Click-Chemie

3.4.1 Beschichtung der Cantilever

Vor der Beschichtung der Cantilever (F-Typ) mit der entsprechenden Azid-Lösung wurden diese mit Sauerstoff-Plasma behandelt (10 sccm, 100 mTorr, bei 30 W für 5 Minuten). Für die Beschichtung wurden diese dann in die jeweilige Azid-Lösung gebracht, 15 Minuten in dieser belassen und anschließend mittels Stickstoff trocken geblasen. Die Azid-Lösungen beinhalteten neben dem jeweiligen Azid [100 μ l/mg] ebenfalls Kupfersulfat [10 mM] und das Reduktionsmittel Natriumascorbat [20 mM].

3.4.2 Herstellung und Visualisierung der Strukturen

Die Beschichtung der Oberflächen erfolgte von Arbeitskollegen im Department of Chemical Engineering (University of Michigan) bzw. am Institut für funktionellen Grenzflächen (IFG, KIT).^[27]

Der Schreibvorgang der Azid-Strukturen erfolgte bei 23°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit am DPN 5000 System, die Erstellung der Schreibmuster über das systeminterne Programm Ink-CAD. Vor der fluoreszenz-mikroskopischen Betrachtung der geschriebenen Strukturen, wurden diese zuvor mit Reinstwasser gespült, um überschüssige, nicht-gebundene Azide abzuwaschen. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten über eine Schwarz-Weiss-CCD-Kamera (Coolsnap HQ², Photometrics) an einem aufrechten Mikroskop (Eclipse 80i, Nikon).

4 Ergebnisse

4.1 Click-Chemie DPN

Ziel dieser Arbeit war die Integration der Click-Chemie auf reaktive Polymerschichten in das Repertoire der DPN. In Abbildung 4.1A ist der Ablauf dieser Experimente schematisch dargestellt. Auf reaktive Polymerschichten (siehe Abb. 4.1B) wurden mittels DPN (siehe Abb. 4.1C) Strukturen appliziert, die über die Click-Chemie kovalent gebunden werden sollten.

Die Beschichtung der Oberflächen erfolgte hierfür im Vorfeld von unseren Arbeitskollegen im Department of Chemical Engineering (University of Michigan) bzw. am Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG,KIT).^[27] Die Strukturierung der Oberflächen wurden von Michael Hirtz und mir durchgeführt.

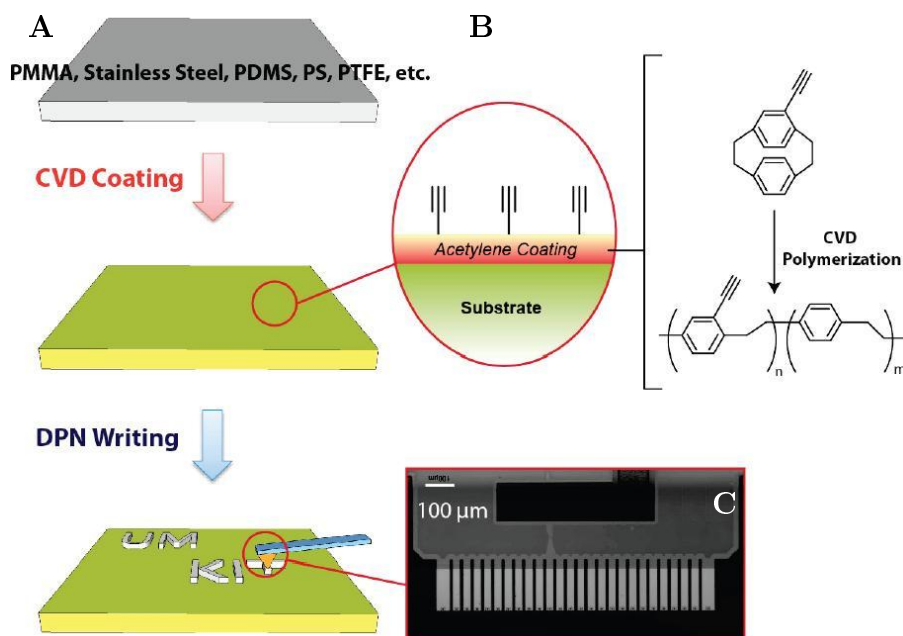


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der DPN auf reaktiven Polymerschichten. **A:** Übersicht der einzelnen Schritte. **B:** Darstellung der reaktiven Polymerschicht. **C:** Mikroskopaufnahme der verwendeten Cantilever.^[49]

Die folgenden Ergebnisse wurden veröffentlicht unter^[49]:

Chen, H.-Y., Hirtz, M., Deng, X., Laue, T., Fuchs, H., und Lahann, J.(2010). Substrate-independent dip-pen nanolithography based on reactive coatings. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 18023–18025.

Es wurde hierfür ein Alexa Fluor[®] 555-markiertes Azid auf die Polymer beschichteten Substrate mittels DPN appliziert und im Anschluss über Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Bei der funktionellen Gruppe der Polymerbeschichtung handelte es sich um Ethin, welches entsprechend mit dem Azid eine kovalente Bindung in Form eines 1,2,3-Triazols ausbildet. Bei der Abbildung 4.2 handelt es sich um eine Fluoreszenzaufnahme dieser applizierten Alexa Fluor[®] 555-Azid-Strukturen, gebunden an einer Polymerschicht auf einem Gold-Substrat. Das Bild zeigt die applizierten Strukturen von 12 Spitzen (eines 26 Spitzen Cantilevers) nach 7 Schreibvorgängen (siehe Abb. 4.2A). Wie anhand dieser Fluoreszenzaufnahme zu erkennen, konnten erfolgreich diese Azide auf das Substrat gebunden werden. Eine geschriebene Struktur bestand hierbei aus jeweils 2 Quadraten ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ & $2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$) und den Abkürzungen KIT, IFG, INT und UM (siehe Abb. 4.2B).

Die Verwendung eines 26-Spitzen Cantilevers (siehe Abb. 4.1C) erlaubte darüber hinaus eine großflächige Parallelisierung des Strukturierungsprozesses. Die Strukturen in horizontaler Richtung wurden jeweils von einer unterschiedlichen Spitze geschrieben, die Strukturen, die in vertikaler Richtung übereinander liegen, sukzessiv von ein und derselben Spitze (siehe Abb. 4.2 Pfeil).

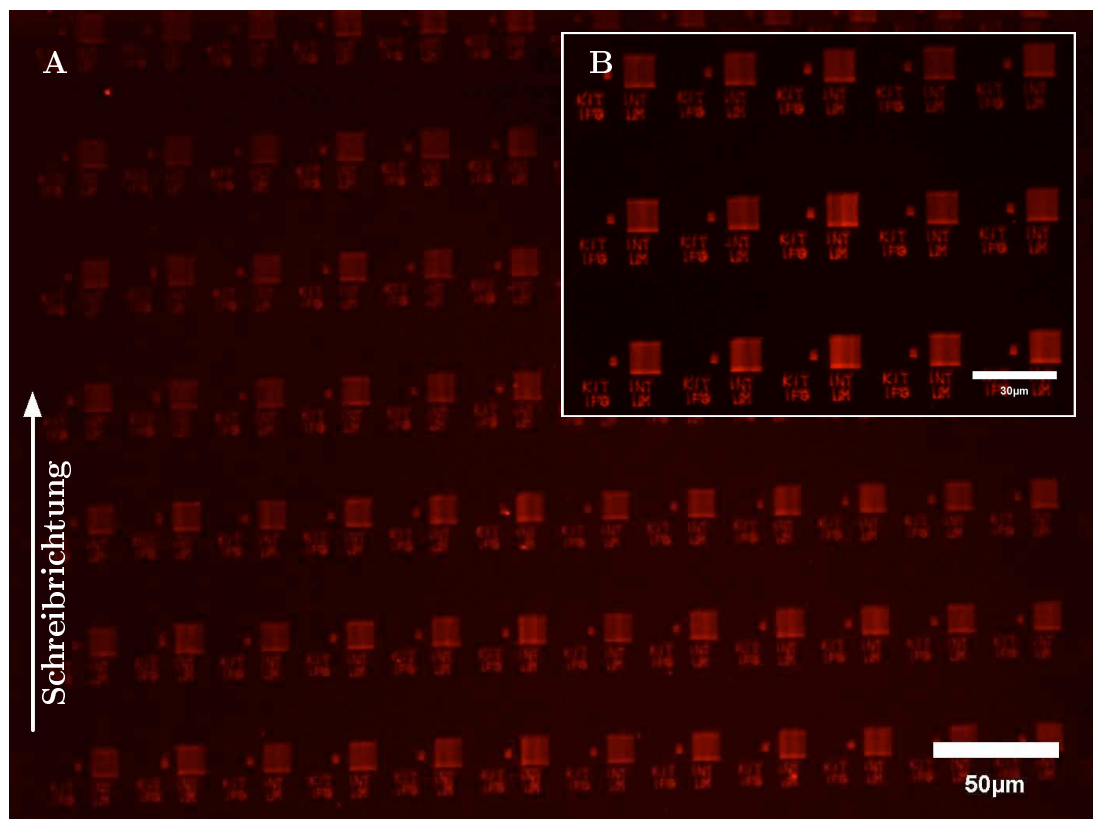


Abbildung 4.2: Applizierte Alexa Fluor[®] 555-Azid Strukturen auf reaktiver Polymerschicht auf einem Gold-Substrat. **A:** Fluoreszenzaufnahme der Strukturen von 12 Spitzen (eines 26 Spitzen Cantilevers) nach 7 Schreibvorgängen. Schreibrichtung in Pfeilrichtung. **B:** Vergrößerung eines Ausschnittes von A. Zu erkennen sind die Strukturen von 5 Spitzen, nach 3 Schreibvorgängen.^[49]

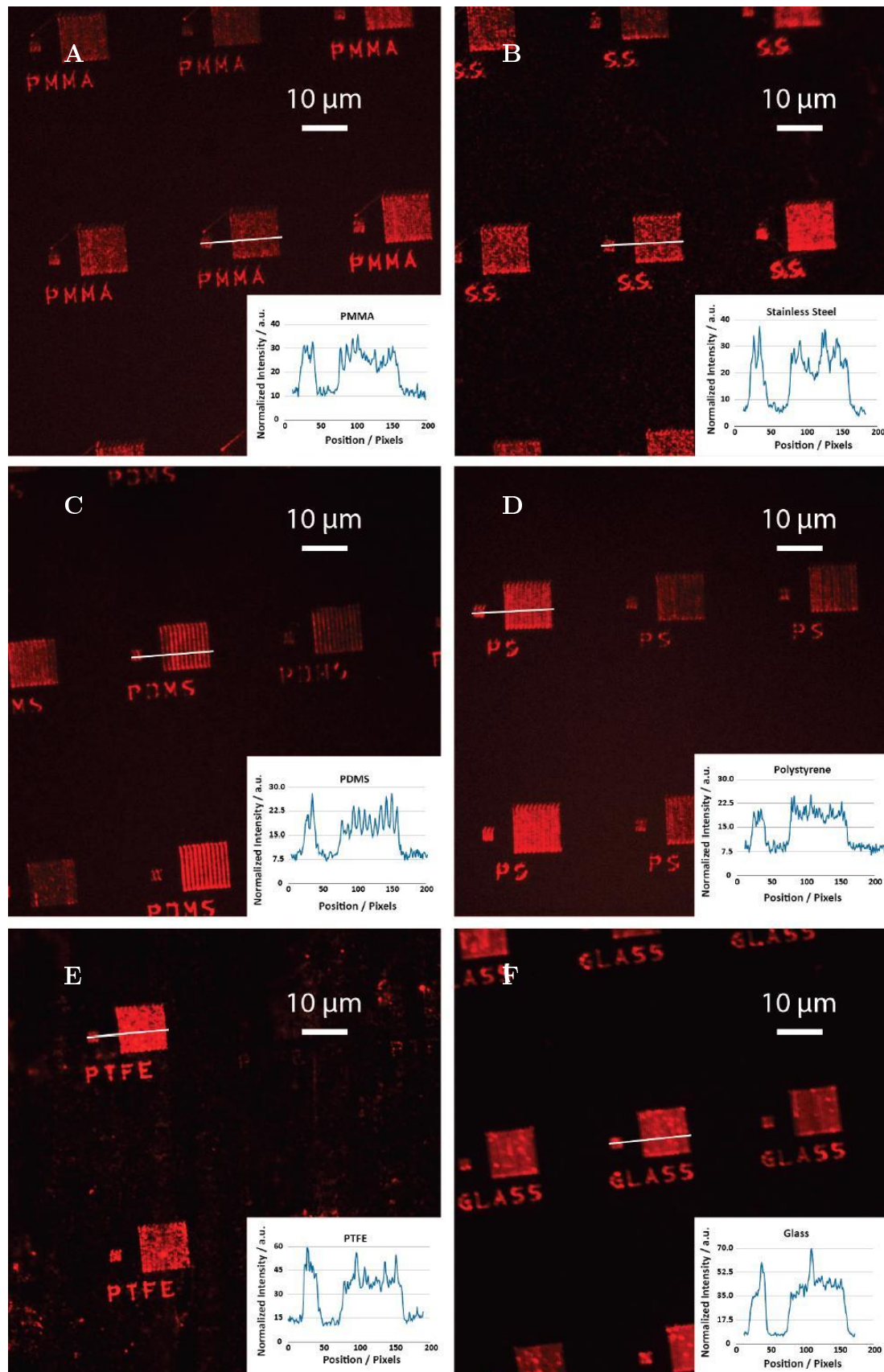


Abbildung 4.3: Fluoreszenzaufnahmen der applizierten Alexa Fluor[®] 555-Aziden auf unterschiedlichen Polymer beschichteten Substraten: PMMA(A), Stahl(B), PDMS(C), Polystyrol(D), Teflon(E) und Glas(F). Fluoreszenzprofil in der jeweiligen Aufnahme entlang der eingezeichneten Linie.^[49]

Um der eigentlichen Forderung nach neuen Substrat/Tinten Kombinationen nachzukommen, wurden unterschiedlichste Substrate mit reaktiven Polymerschichten beschichtet und anschließend mittels DPN mit dem fluoreszenten Azid beschrieben. In Abbildung 4.3 sind die Mikroskopaufnahmen dieser Strukturierungen abgebildet. Eine geschriebene Struktur entsprach hierbei 2 Quadraten ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ & $2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$) und der Abkürzung des jeweiligen Substrates. Die verwendeten Substrate waren: PMMA (Abb. 4.3A), Stahl (Abb. 4.3B), PDMS (Abb. 4.3C), Polystyrol (Abb. 4.3D), Teflon (Abb. 4.3E) und Glas (Abb. 4.3F). Ein Fluoreszenzprofil in jedem der Bilder demonstriert die Uniformität der geschriebenen Strukturen. Auch hierbei konnte die erfolgreiche Strukturierung der einzelnen Substrate gezeigt werden.

Der Nachweis, dass die kovalente Bindung des Azids auf der funktionellen Gruppe der reaktiven Polymerschicht basiert, wurde mit Hilfe einer Polymerschicht, die keine funktionellen Gruppe trägt, erbracht (siehe Abb. 4.3). Sowohl direkt nach erfolgtem Schreibprozess mit dem fluoreszenten Azid (siehe Abb. 4.3A), als auch nach angeschlossenem Waschschriff (siehe Abb. 4.3B) wurden Fluoreszenzaufnahmen der Probe gemacht. Wie im Vergleich der beiden Bilder zueinander erkennbar ist, wurde durch den Waschschriff ein Großteil der Strukturen abgetragen. Dementsprechend ist die funktionelle Gruppe der Polymerschicht essentiell für eine erfolgreiche Bindung des Azids an das Substrat.

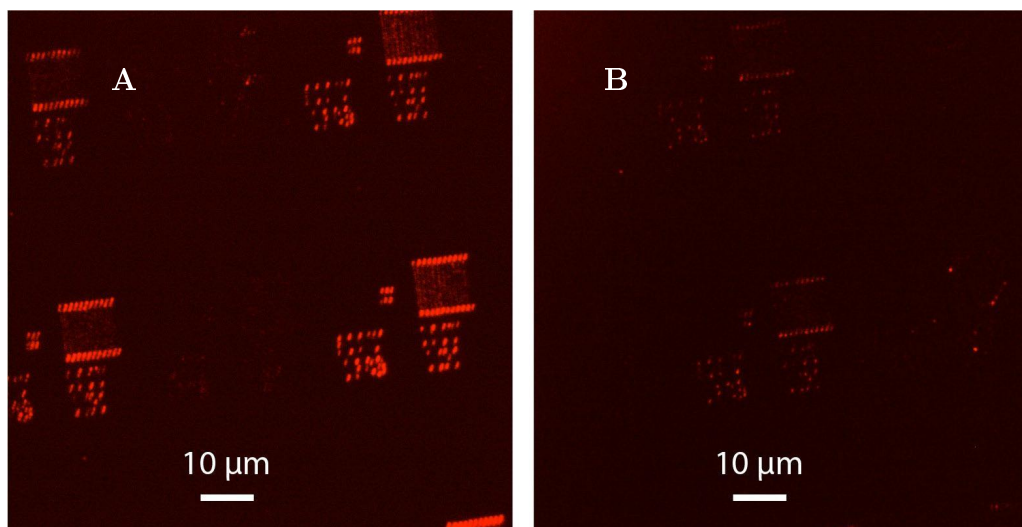


Abbildung 4.4: Nachweis der spezifischen Bindung der Azide basierend auf der reaktiven Ethin Gruppe. Fluoreszenzaufnahme von Alexa Fluor[®] 555-Azid Strukturen auf nicht-funktionalisierter Polymerschicht bevor (**A**) und nachdem (**B**) sie mit Reinstwasser gewaschen wurden.^[49]

Wie in der Einleitung beschrieben^[27] eignet sich diese reaktive Polymerschicht ebenfalls zur Anbindung eines Biotin-Azids und anschließender Kopplung von Streptavidin. Um dies zu verifizieren, wurde auf eine reaktive Polymerschicht auf einem Gold-Substrat mittels DPN ein Biotin-Azid appliziert. Nach dem Schreibprozess wurden Streptavidin markierte Gold-Nanopartikel an diese Strukturen gebunden und mittels AFM visualisiert. Das AFM Bild dieses Versuches ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Im Vergleich des AFM-Bildes mit der Referenz Fluoreszenzauf-

nahme konnten klar die applizierten Strukturen erkannt und dementsprechend eine erfolgreiche Bindung der Streptavidin-Gold-Nanopartikel an den Biotin-Strukturen nachgewiesen werden.

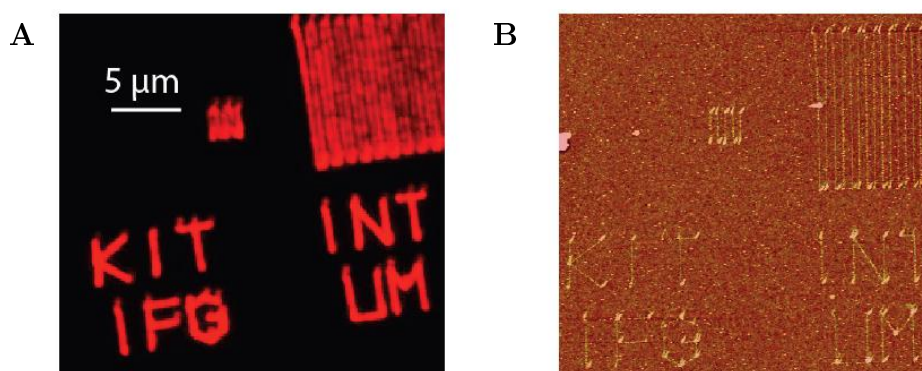


Abbildung 4.5: Bindung von Streptavidin-Gold-Nanopartikel an biotinylierten Strukturen. **A:** Fluoreszenzaufnahme einer Alexa Fluor® 555 Azidstruktur als Referenz. **B:** AFM Bild einer biotinylierten Struktur nach erfolgter Streptavidin-Gold-Nanopartikel Bindung (Michael Hirtz).^[49]

Neben der verwendeten Azid-Alkin Click-Reaktion wurde darüber hinaus ebenfalls die Click-Reaktion von Hydrazid- mit Aldehyd-Gruppen tragenden Molekülen verwendet. Biotin, welches über einen molekularen Linker eine Hydrazid-Gruppe trug (siehe Abb. 4.6A (2)), bildete mit der Aldehyd-Gruppe der Polymerschicht (siehe Abb. 4.6A (1)) unter Kondensation eine Hydrazo-Verbindung aus, wodurch es kovalent an das Substrat gebunden wurde. Die Visualisierung dieser Biotin-Strukturen erfolgte indirekt durch eine angeschlossene Bindung von Streptavidin-Alexa488 an diese (siehe Abb. 4.6B).

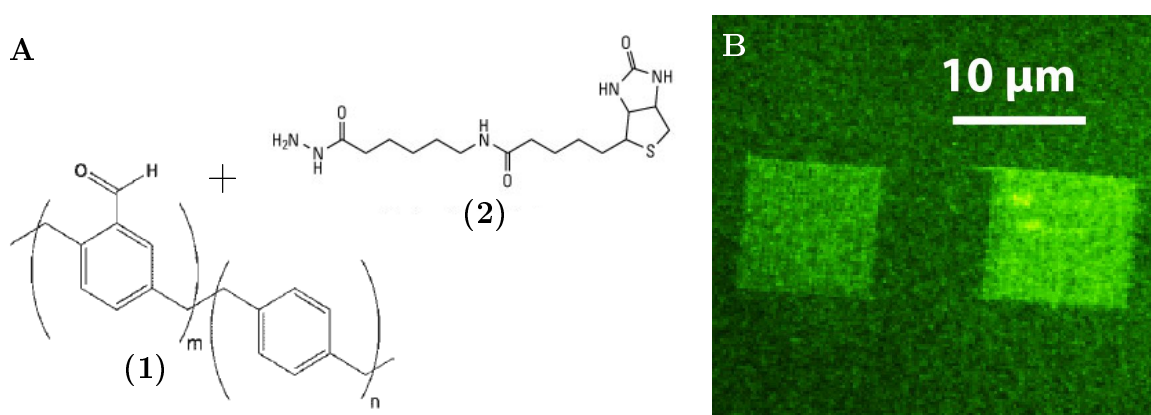


Abbildung 4.6: Verwendung einer Aldehyd-Hydrazid Click-Chemie. **A:** Strukturformel der verwendeten Polymerschicht Poly(4-formyl-p-xylylene-co-p-xylylene),^[50] sowie des an diese gebundenen Hydrazid-LC-Biotins². **B:** Fluoreszenzaufnahme der DPN-generierten Biotin-Strukturen nach Anbindung von Streptavidin-Alexa488 (in Zusammenarbeit mit Hsien-Yeh Chen).^[49]

²Quelle: <http://www.piercenet.com/>

4.2 Dreidimensionale Strukturierung-Lipid Multilayer gratings

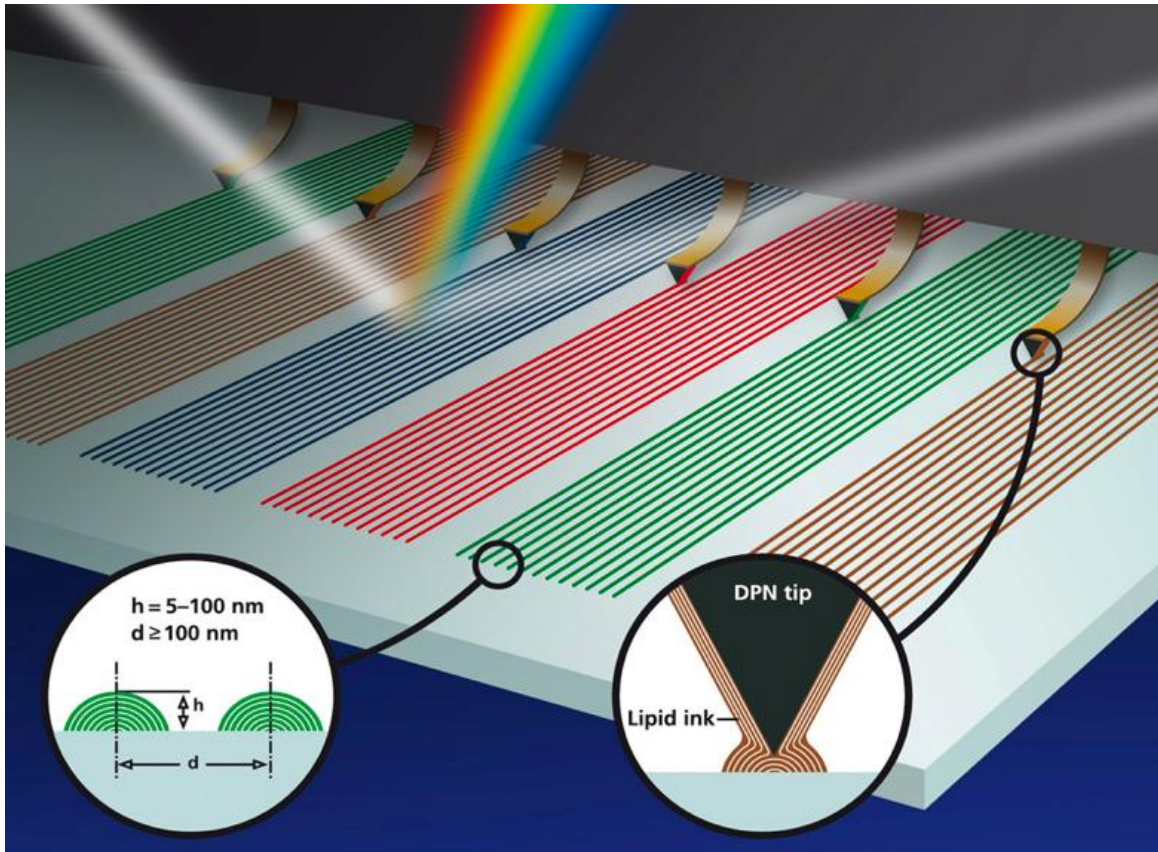


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der Generierung von Beugungsgittern mittels DPN und ihrer Funktionsweise.^[51]

In Abbildung 4.7 ist schematisch die Strukturierung und Wirkungsweise der Beugungsgitter dargestellt. Mittels DPN wurden Lipid-Beugungsgitter verschiedener Periodizität und Höhe generiert. Seitlich einstrahlendes Weißlicht wird an diesen Strukturen gebeugt und seine spektralen Bestandteile können (je nach Gitterperiodizität) unter unterschiedlichen Winkeln beobachtet werden.

Die anfängliche Charakterisierung der Beugungsgitter, sowie das erste Detektionsexperiment wurden von Falko Brinkmann durchgeführt. Meine Arbeit schließt sich an diese Ergebnisse an und deckt die detaillierten Detektionsexperimente dieser Beugungsgitter-Sensoren ab. Die Wellenleiter, sowie die Aufnahmen dieser, wurden von Christoph Vannahme, Soenke Klinkhammer und Timo Mappes durchgeführt.

Die folgenden Ergebnisse wurden veröffentlicht unter^[51]:

Lenhert, S., Brinkmann, F., Laue, T., Walheim, S., Vannahme, C., Klinkhammer, S., Xu, M., Sekula, S., Mappes, T., Schimmel, T., & Fuchs, H. (2010). Lipid multilayer gratings. *Nature nanotechnology*, 5, 275–279.

4.2.1 Charakterisierung der Beugungsgitter

Bei Abbildung 4.8A handelt es sich um eine Farbmikroskopaufnahme von Lipid-Beugungsgittern ($30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$) bestehend aus DOPC mit 5 unterschiedlichen Periodizitäten (500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm und 700 nm), die parallel von 22 Cantilevern geschrieben wurden. Es wurde seitlich in einem Winkel von 70° Weisslicht über einer Kaltlichtquelle auf die Gitter eingestrahlt und mittels einer Farb-CCD-Kamera das Bild aufgenommen. Die verschiedenen Farben basieren auf der Beugung des Lichtes, entsprechend der Periode des jeweiligen Beugungsgitters. Zur Verifizierung wurden die Wellenlänge der jeweiligen Beugungsstrahlen mittels eines Spektrometers gemessen (siehe Abb. 4.8B).

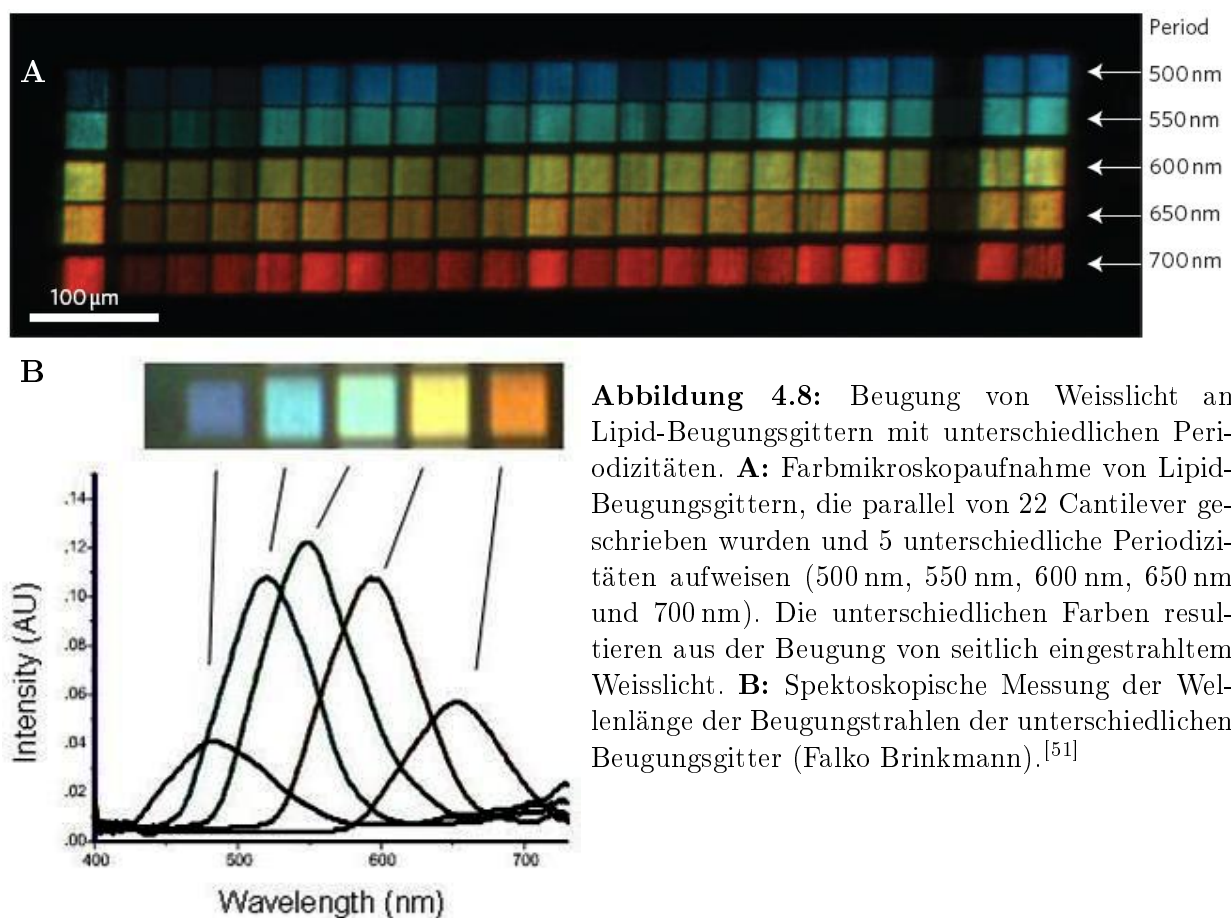


Abbildung 4.8: Beugung von Weisslicht an Lipid-Beugungsgittern mit unterschiedlichen Periodizitäten. **A:** Farbmikroskopaufnahme von Lipid-Beugungsgittern, die parallel von 22 Cantilever geschrieben wurden und 5 unterschiedliche Periodizitäten aufweisen (500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm und 700 nm). Die unterschiedlichen Farben resultieren aus der Beugung von seitlich eingestrahltm Weisslicht. **B:** Spektroskopische Messung der Wellenlänge der Beugungsstrahlen der unterschiedlichen Beugungsgitter (Falko Brinkmann).^[51]

Um eine Korrelation der Beugungsgitterhöhe mit der Intensität des gebeugten Lichts zu erstellen, wurde die Höhe verschiedener Gitter ($25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$, Periodizität von 600 nm) mittels AFM gemessen. Bei den Abbildungen 4.9A und B handelt es sich um zwei dieser Topographie-Aufnahme. Aus dem direkten Vergleich der Bilder ist ersichtlich, dass das Beugungsgitter in 4.9A noch klar als solches zu erkennen ist, mit einer durchschnittlichen Höhe von 29 nm und einem Linienabstand von 600 nm, wohingegen das Beugungsgitter in Abbildung 4.9B durch Fusion der einzelnen Gitterlinien keine Periodizität mehr aufweist. Die Fusion der Gitterlinien ist mit der Höhe des Gitters von rund 100 nm zu erklären, wie auch aus dem Graph 4.9 C ersichtlich. Ab einer Gitterhöhe von rund 70 nm fusionieren die Gitterlinien, wodurch es zum Verlust der

periodischen Struktur und zu einer Verminderung bzw. Auslöschung der Lichtbeugung kommt. In Abbildung 4.9D wurde die über AFM gemessene Höhe der lichtmikroskopischen Aufnahmen des gebeugten Lichtes zugeordnet.^[51]

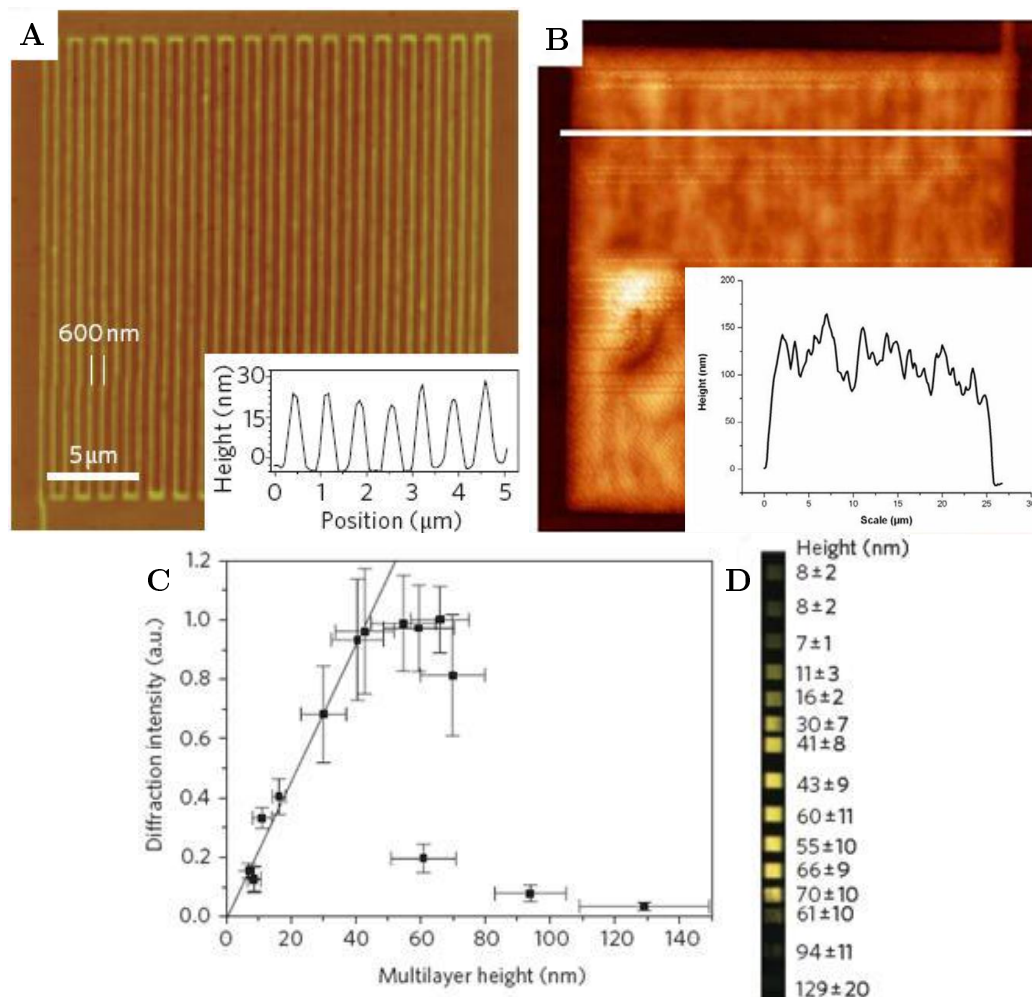


Abbildung 4.9: Korrelation der Beugungsgitterhöhe mit der Intensität des gebeugten Lichtes. Bei **A** und **B** handelt es sich um Topographie Aufnahmen (AFM) von zwei $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ großen Lipid-Beugungsgittern unterschiedlicher Höhe. Das Beugungsgitter **A** weist eine durchschnittliche Höhe von 29 nm und eine Periode von 600 nm auf, wohingegen die Linien des Beugungsgitters von **B** aufgrund ihrer Höhe ($> 100 \text{ nm}$) schon fusioniert sind und keine Gitterstruktur mehr erkennen lassen. Der Graph in **C** zeigt die Korrelation der Gitterhöhe mit der detektierten Intensität des gebeugten Lichtes. Ab einer Höhe von rund 70 nm fusionieren die Gitterlinien, wodurch es zu einer Verminderung bzw. Auslöschung der Lichtbeugung kommt. **D** zeigt die Korrelation der Gitterhöhe mit Mikroskopaufnahmen der Beugungsgitter (Falko Brinkmann).^[51]

4.2.2 Das Lipid-Beugungsgitter als Biosensor

Um die grundlegende Funktionalisierung als Biosensor zu demonstrieren, wurde dem Lipid DOPC 4 mol% DOPE-Biotin beigemischt, um anschließend eine Bindung von Streptavidin an diese Strukturen zu detektieren. Basierend auf früheren Arbeiten^[52] wurde vermutet, dass der Analyt nicht nur die Oberfläche der Strukturen bedecken wird, sondern ebenfalls in diese interkalieren könnte.

Zum Nachweis des Effektes der Interkalation, wurden kompakte Lipid Strukturen ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) generiert, welche kein Beugungsgitter, sondern eine zusammenhängende Oberfläche aufwiesen. Die Höhe dieser Strukturen wurden anschließend mittels AFM bestimmt. Das hierbei verwendete Streptavidin war fluoreszent mit Cy3 markiert. Nach Zugabe des fluoreszent markierten Analyts (50 nM, 1 h) wurde die Fluoreszenz gemessen, über einen gespreiteten Lipid-Layer normalisiert und in Relation zu ihrer Höhe gesetzt.

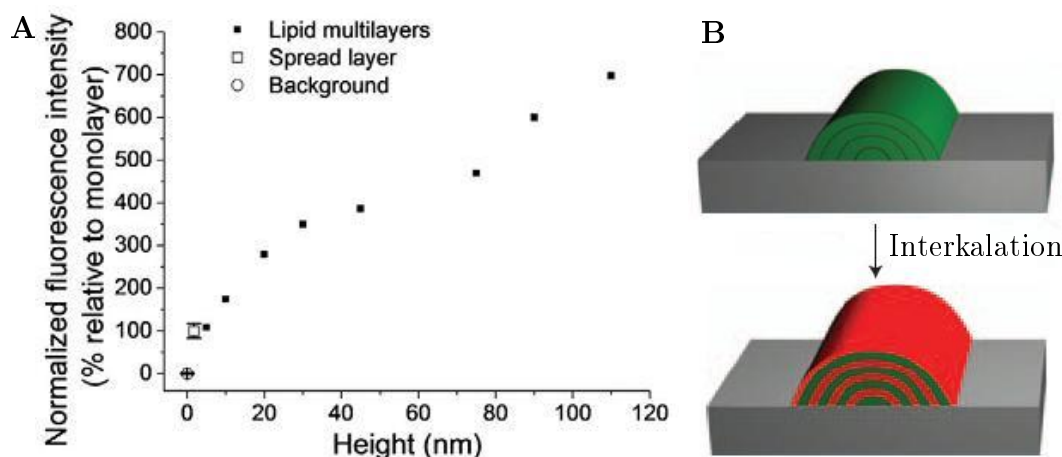


Abbildung 4.10: Interkalation von fluoreszent markierten Streptavidin in Lipid-Strukturen unterschiedlicher Höhe. **A:** An kompakten, quadratischen Lipid Strukturen wurde fluoreszent markiertes Streptavidin gebunden (50 nM, 1 h) und die Fluoreszenzintensität dieser mit ihrer Höhe korreliert. Die Normalisierung erfolgt über die Intensität einer gespreiteten Lipidschicht (in Zusammenarbeit mit Steven Lenhart). **B:** Schematisches Modell der Interkalation des Analyts(rot) an eine mehrlagige Lipid-Gitterlinie(grün) eines Beugungsgitters.^[51]

Wie aus dem Graphen in Abbildung 4.10A ersichtlich, war die Erhöhung des Fluoreszenzsignals so stark, dass sie nicht nur mit der Erhöhung der Struktur und damit der Oberfläche selber korreliert werden konnte, sondern hier der Effekt der Interkalation auftrat. Um dies zu veranschaulichen, kann man von zwei geometrischen Modellen ausgehen, die die Bandbreite der möglichen Formen der Lipid-Strukturen einschließen. Von idealen Quadern mit identischen Grundflächen, in der sich die Strukturen dementsprechend nur in der Höhe unterscheiden oder liegenden Halbzylindern mit elliptrischer Grundfläche, wobei hierbei die Länge der kleinen Halbachse variiert. Beim Vergleich des Bilayers ($3,6\ \text{nm}$)^[53] mit der höchsten Struktur von 110 nm kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung von lediglich $\sim 3,48\%$ (Zylinder) bis $\sim 4,38\%$ (Quader) ($100,07\ \mu\text{m}^2 \rightarrow 103,55\ \mu\text{m}^2$ bzw. $100,01\ \mu\text{m}^2 \rightarrow 104,40\ \mu\text{m}^2$) die Fluoreszenzintensität steigt

jedoch um das 7fache. Im Gegenzug jedoch erhöht sich die theoretische Anzahl von Bilayern von einem auf etwa 30.

Abbildung 4.10B zeigt, basierend auf diesen Beobachtungen, ein simples Model der zu erwartenden Bindungs-Reaktion des Analyts an Gitterlinien der Beugungsgitter. Grün dargestellt ist der Querschnitt einer Gitterlinie, bestehend aus mehreren Lipid-Lagen. Durch Zugabe des Analyts (rot) interkaliert dieser zwischen die verschiedenen Lipid-Bilayer und führt zu einer Erhöhung der Struktur.

Vor der Zugabe des Analyts zu den funktionalisierten Lipid-Strukturen, musste sichergestellt werden, dass sich dieser nicht unspezifisch an die Substrat-Oberfläche anlagert und dadurch das Ergebnis verfälscht. Dies wurde über einer Passivierung mittels einer 0,5%igen BSA Lösung vor Analyt-Zugabe realisiert.^[54,55] Um zu verifizieren, dass sich diese BSA Moleküle nicht unspezifisch an die Lipid-Strukturen anlagern und diese überdecken, wurde im folgenden Versuch fluoreszent markierte Lipid-Strukturen auf ein Substrat appliziert (siehe Abb. 4.11A), für 20 Minuten mit einem fluoreszenten BSA-Alexa Fluor 488 Konjugat passiviert (siehe Abb. 4.11B) und nach erfolgten Waschschritten Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Wellenlängen gemacht. Analog zu früheren Arbeiten^[56] konnte keine unspezifische Protein-Anbindung an die Lipid-Strukturen beobachtet werden. Die grün-fluoreszierende Bereiche beschränken sich nur auf die unbeschriebenen Bereiche des Substrates (siehe Abb. 4.11C).

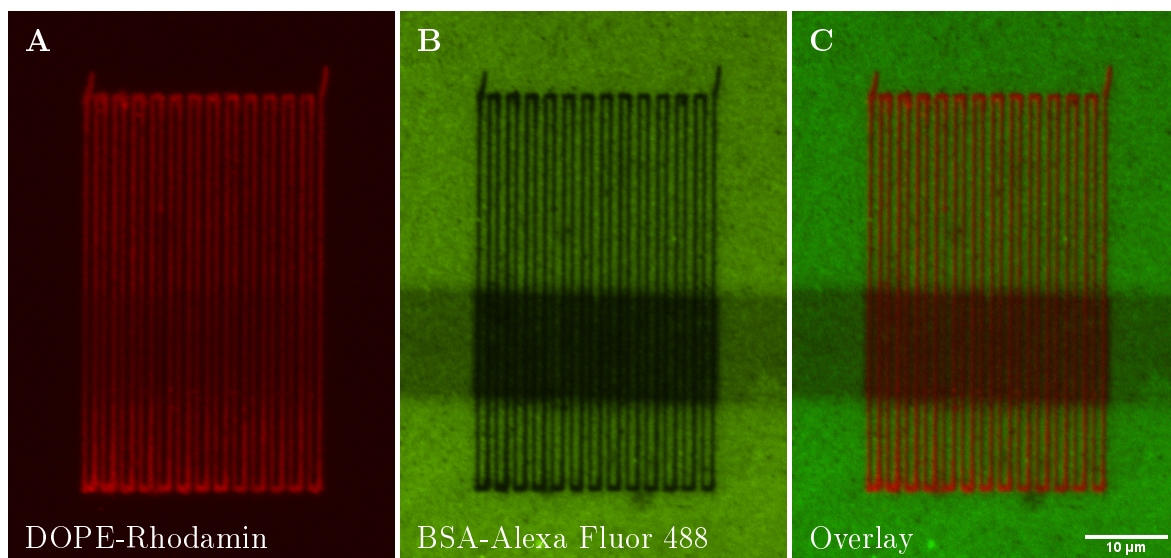


Abbildung 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines fluoreszenten Lipid-Beugungsgitters nach Passivierung mit BSA-Alexa 488. **A:** Fluoreszenzbild der Lipid-Struktur nach Passivierung, visualisiert durch das beigemischte, fluoreszente Lipid DOPE-Rhodamin. **B:** Fluoreszenzaufnahme von BSA-Alexa 488, welches zur Passivierung des Substrates eingesetzt wurde. **C:** Überlagerung der Bilder A und B. Wie zu erkennen ist, beschränkt sich die Fluoreszenz von BSA-Alexa 488 nur auf die unbeschriebenen Bereiche des Substrates. Dementsprechend konnte keine unspezifische Anlagerung von BSA-Alexa 488 an die Lipid-Strukturen detektiert werden. Bei dem horizontalen, dunklen Bereich in der unteren Hälfte des Substrates handelt es sich um einen Wellenleiter (siehe Abb. 4.20).

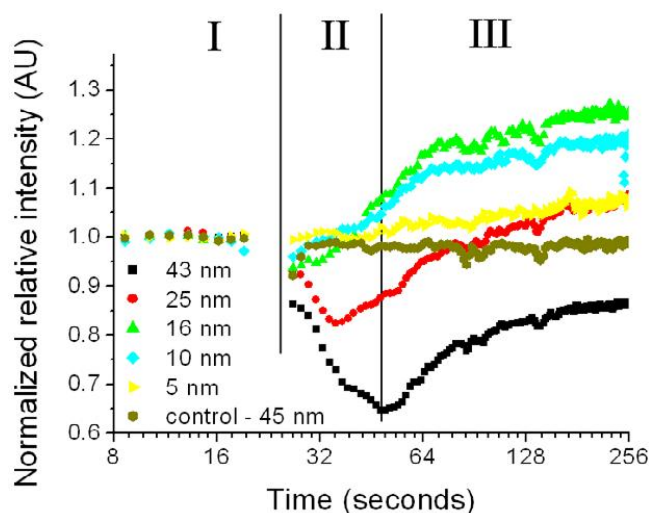


Abbildung 4.12: Intensitätsveränderung des gebeugten Lichtes von Lipid-Beugungsgitter unterschiedlicher Höhe (5 nm, 10 nm, 16 nm, 25 nm und 43 nm) nach Zugabe von 50 nM Streptavidin. Die Höhenbestimmung erfolgte über die in Abb. 4.9 vorgestellte Korrelation. Der Verlauf wurden in drei Phasen aufgeteilt: Phase I stellt die gemessene Intensität vor der Zugabe dar. In Phase II tritt bei den höheren Beugungsgittern (43 nm und 26 nm) der Effekt der Entnetzung ein, was zu einer Reduktion der Intensität des Beugungsgitters führt, die niedrigeren Gitter weisen hier schon Interkalation auf, wodurch die Intensität des gebeugten Lichtes zunimmt. In Phase III kommt es ebenfalls bei den höheren Gittern zur Interkalation des Analyts und einem Intensitätsanstieg des Beugungssignales, wobei nur im Fall des 26 nm hohen Gitters diese, die ursprüngliche Intensität (vor der Analytzugabe) übersteigt (Falko Brinkmann).^[51]

Abbildung 4.12 zeigt die gemessene Intensitätsveränderung von Lipid-Beugungsgitter unterschiedlicher Höhe (5 nm, 10 nm, 16 nm, 25 nm und 43 nm) auf die Zugabe von 50 nM Streptavidin. Die Höhenbestimmung erfolgte über die in Abb. 4.9 vorgestellte Korrelation. Die Analytzugabe erfolgte am Ende der Phase I. Wie zu erkennen ist, weisen die Lipid-Beugungsgitter, die niedriger als 26 nm sind, grundlegend (Phase II & Phase III) eine Erhöhung der Intensität ihres gebeugten Lichtes auf. Die Beugungsgitter mit einer Höhe von 26 nm bzw. 43 nm weisen jedoch im Vergleich innerhalb der ersten 30 Sekunden (Phase II) eine Reduktion der Intensität auf, bevor auch in diesen ein Anstieg des Beugungssignales detektiert wurde, wobei zu beobachten ist, dass nur das 26 nm hohen Gitter die ursprüngliche Intensität (vor der Analytzugabe) übersteigt. Der physikalische Effekt, der zu dieser Reduktion führte, konnte mithilfe von fluoreszent markierten Lipiden und einer höheren Vergrößerung beobachtet werden, wie in Abbildung 4.13 zu erkennen.

In Abbildung 4.13A und B sind Ausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (TIRF) eines biotinylierten, fluoreszent markierten Lipid-Beugungsgitters zu sehen, vor (4.13 A) und 5 Sekunden nach (4.13 B) der Zugabe von 500 nM Streptavidin. Durch die Bindung von Streptavidin an die Gitterlinien kommt es zu einer Veränderung der Oberflächenspannung dieser und dementsprechend einer Veränderung der Grenzflächenspannung. Die Lipid-Beugungsgitter streben daraufhin eine energetisch günstigere, eine kugelförmige Gestalt an. Es tritt der Effekt der Entnetzung ein. Dieser Effekt führte in den ersten 30 Sekunden (Phase II Abb. 4.12) nach

Analytzugabe zur Reduktion des Beugungssignales der höheren Gitter, bis in diesen ebenfalls weitere Streptavidin Moleküle interkalieren konnten und wieder zu einem Anstieg der Intensität des gebeugten Lichtes führten (Phase III Abb. 4.12).

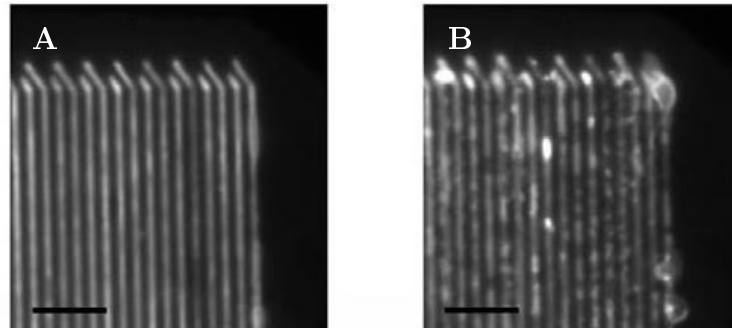


Abbildung 4.13: Entnetzungseffekt von Lipid Beugungsgitterlinien durch Analytbindung. **A** und **B** Ausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (TIRF) eines biotinylierten, fluoreszent markierten Lipid-Beugungsgitters vor (**A**) und 5 Sekunden nach (**B**) der Zugabe von 50 nM Streptavidin. Der Größenstandard entspricht 5 µm (in Zusammenarbeit mit Falko Brinkmann).^[51]

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde das schematische Modell der Reaktion von Lipid-Gitterlinie auf Analytzugabe entsprechend erweitert (siehe Abb. 4.14A). Darüberhinaus konnte auch über die Verwendung von fluoreszent markierten, biotinylierten Lipid-Beugungsgittern, nebst fluoreszent markiertem Streptavidin und der höheren Vergrößerung die Interkalation visualisiert werden (siehe Abb. 4.14B).

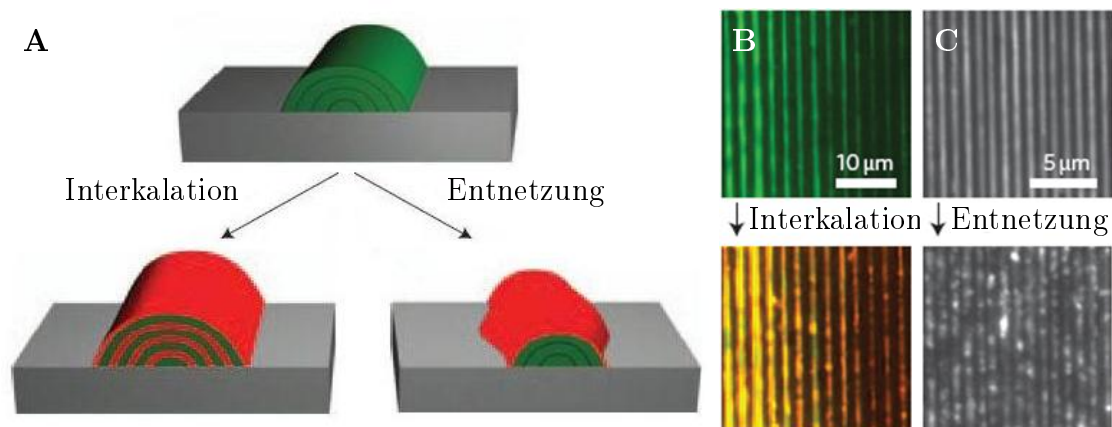


Abbildung 4.14: Erweitertes schematisches Modell der Bindungsreaktion von Lipid-Gitterlinien auf Analytzugabe, sowie Fluoreszenzbilder der beiden Effekte. **A:** Grün dargestellt ist der Querschnitt einer Gitterlinie, bestehend aus mehreren Lipid-Lagen. Durch Zugabe des Analyts (rot) kann dieser zwischen die verschiedenen Lipid-Bilayer interkalieren bzw. führt zu einer Entnetzung der Struktur. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme biotinylierter, fluoreszent markierter Lipid-Beugungsgitter vor (oberes Bild) und 1 h nach der Zugabe (unteres Bild) von 50 nM Streptavidin-Cy3. Beim unteren Bild handelt es sich um eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder der Lipid-Strukturen und des Analyts. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme biotinylierter, fluoreszent markierter Lipid-Beugungsgitter vor (oberes Bild) und 1 min nach der Zugabe (unteres Bild) von 50 nM Streptavidin.^[51]

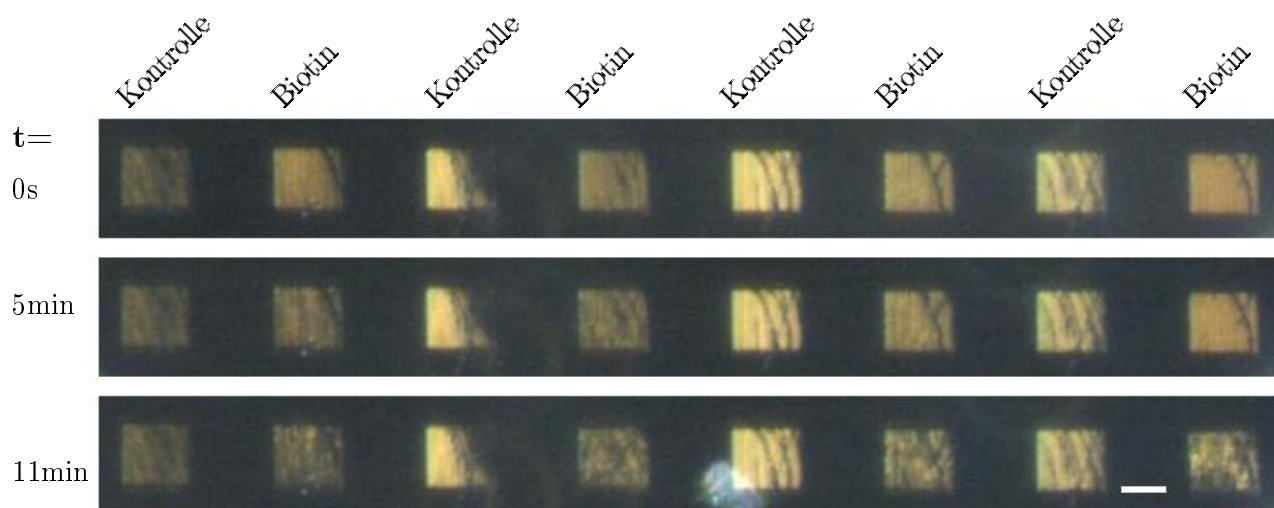


Abbildung 4.15: Veränderung der Beugungsgitter durch Streptavidin-Zugabe (**50 nM**). Mikroskopaufnahmen des gebeugten Lichts von 8 Lipid-Beugungsgittern ($30 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}/700 \text{nm}$ Periode) bestehend aus DOPC (Kontrolle) und DOPC+DOPE-Biotin (Biotin) vor ($t=0 \text{s}$) der Zugabe von 50 nM Streptavidin und 5 min bzw. 11 min danach. Zu erkennen ist der Entnetzungeffekt der Beugungsgitter, die Biotin enthalten (Biotin), im Vergleich zu den unveränderten Kontrollen (Kontrolle). Der Größenstandard entspricht $20 \mu\text{m}$.

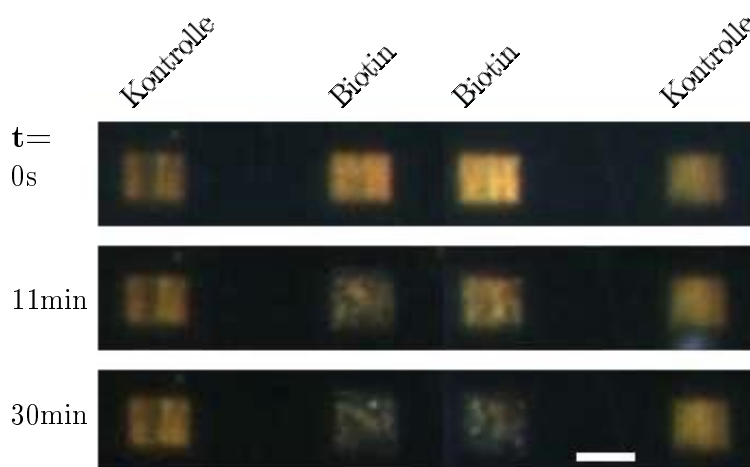


Abbildung 4.16: Veränderung der Beugungsgitter durch Streptavidin-Zugabe (**500 nM**). Mikroskopaufnahmen des gebeugten Lichts von 4 Lipid-Beugungsgittern ($20 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}/700 \text{nm}$ Periode) bestehend aus DOPC (Kontrolle) und DOPC+DOPE-Biotin (Biotin) vor ($t=0 \text{s}$) der Zugabe von 500 nM Streptavidin und 11 min bzw. 30 min danach. Zu erkennen ist der Entnetzungeffekt der Beugungsgitter, die Biotin enthalten (Biotin), im Vergleich zu den unveränderten Kontrollen (Kontrolle). Der Größenstandard entspricht $20 \mu\text{m}$.

Dieser Entnetzungs-Effekt, genauer gesagt die daraus resultierende Veränderung des Beugungsgitters und dementsprechend des gebeugten Lichtes, erlaubte es die Lipid Beugungsgitter als Sensoren einzusetzen. Den Gittern wurden hierfür unterschiedliche Konzentrationen des Analyts Streptavidin zugesetzt und deren Beugungsintensität über die Zeit aufgezeichnet. In

den Abbildungen 4.15 und 4.16 sind die Mikroskopaufnahmen mehrere Beugungsgitter vor ($t = 0$ s) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach ($t = 5$ min & 11 min bzw. 11 min & 30 min) der Zugabe von 50 nM (Abb. 4.15) bzw. 500 nM (Abb. 4.16) Streptavidin abgebildet. Es wurden hierbei parallel Kontroll-Beugungsgitter, die nur das Träger Lipid DOPC enthalten und biotinylierte Beugungsgitter, die das funktionellen Lipid DOPE-Biotin (4 mol%) enthalten, appliziert.

Wie im Graph 4.17 zu sehen, konnte dadurch der zeitliche Verlauf der Intensität des gebeugten Lichtes der Beugungsgitter auf Analytzugabe unterschiedlicher Konzentrationen (0,5 nM–500 nM) dargestellt werden. Aus dem Vergleich der verschiedenen Kurvenverläufe ersichtlich, tritt eine schnellere und stärkere Reduktion der gemessenen Intensität des gebeugten Lichts auf, je höher die hierbei zugesetzte Konzentration an Analyt. Im Vergleich zum Graphen in Abb. 4.12 wurden hierfür, basierend auf der Höhenabschätzung nach Abb.4.9D, nur Gitter mit einer durchschnittlichen Höhe von 35 nm (± 5 nm) verwendet. Darüberhinaus wurde auch ein wesentlich längerer Zeitraum betrachtet (30 min im Vgl. zu 4 min), wodurch der Effekt der Entnetzung dominierte.

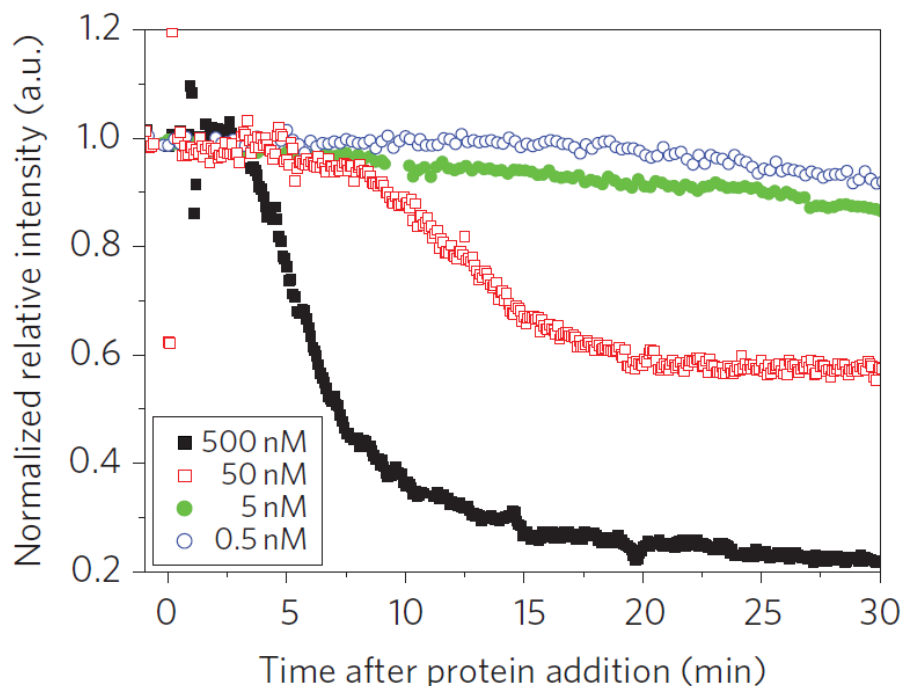


Abbildung 4.17: Verlauf der Intensitätsveränderung des gebeugten Lichts auf Analytzugabe unterschiedlicher Konzentrationen. An biotinylierten Lipid-Beugungsgittern mit einer durchschnittlichen Höhe von 35 nm (± 5 nm) wurde der zeitliche Verlauf der Intensität des gebeugten Lichtes nach Zugabe von verschiedenen Streptavidin Konzentrationen (0,5 nM, 5 nM, 50 nM und 500 nM) beobachtet.^[51]

Einerseits hinsichtlich der zukünftigen Anwendungen der Beugungsgitter in biologischen/medizinischen Bereichen, als auch andererseits zur Verifizierung deren Bindungs-Spezifität, erfolgte vor der Zugabe des nachzuweisende Analyts Streptavidin (50 nM) die Zugabe von 10%igem fötalem Kälberserum (FCS). Dies sollte die Detektion in einem komplexen Protein-Gemisch

simulieren. In Abbildung 4.18 klar erkennbar, dass durch die Zugabe des Serums (erster Pfeil, 5 min) die Intensität nur gering vermindert wurde und erst durch die Zugabe des Analyts Streptavidin (zweiter Pfeil, 10 min) die Intensität, wie zu erwarten, stark reduziert wurde.

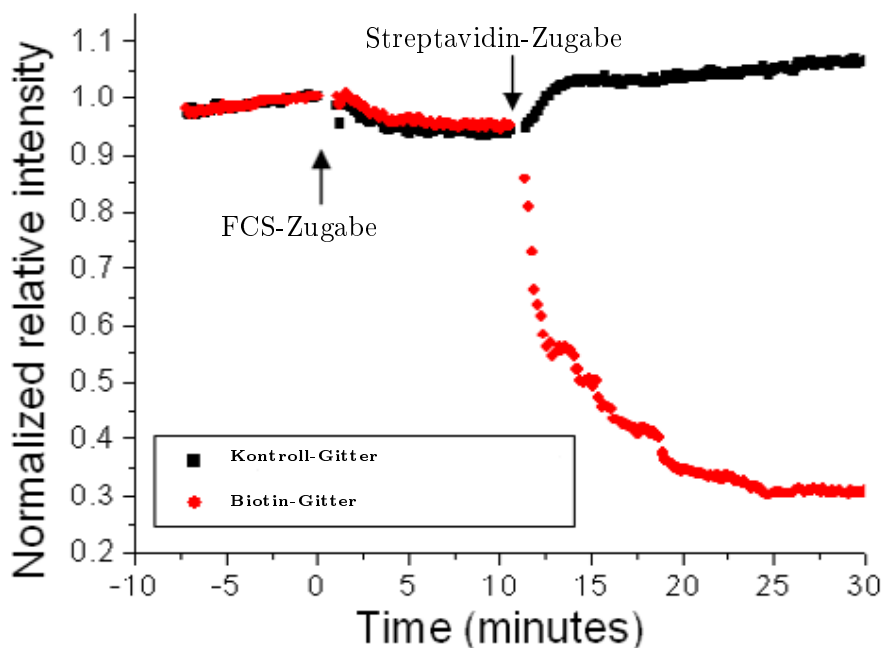


Abbildung 4.18: Verlauf der Intensitätsveränderung des gebeugten Lichts auf Analytzugabe in fötalem Kälberserum. Um die Fähigkeit der Biodetektion in komplexen Protein-Gemischen zu demonstrieren, wurden vor der Zugabe 50 nM Streptavidin, die Beugungsgitter einer 10%igen FCS-Lösung ausgesetzt. Wie zu erkennen ist, löste nur die Zugabe von Streptavidin eine merkliche Reduktion der Beugungsintensität in den biotinylierten Strukturen aus.^[51]

Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Effekt der Entnetzung der Lipid-Beugungsgitter und der daraus resultierenden Verminderung des detektierten gebeugten Lichtes, tritt im folgenden Experiment der Effekt der Interkalation in den Vordergrund. Hierbei wurde zur Funktionalisierung der Beugungsgitter anstatt des biotinylierten Lipids DOPE-Biotin das Lipid DGS-NTA(Ni) verwendet, welches als funktionelle Gruppe einen Nickel-Chelatkomplex trägt (Abb. 1.9). Der nachzuweisende Analyt ist das Protein GFP (green fluorescent protein), welches N-terminal zusätzliche Histidin-Reste aufweist. Diese Histidin Aminosäuren bilden mit dem Nickel Atom des Lipids einen neuen Chelatkomplex, wodurch das Protein an den Lipid-Beugungsgittern gebunden wird. In Abbildung 4.19A kann man deutlich den Anstieg der Intensität des Beugungssignales nach Zugabe des Analyts (Pfeil 1) erkennen. Ebenso sind die entsprechenden Beugungsgitter vor (Abb. 4.19B, Pfeil) und nach (Abb. 4.19C, Pfeil) der Zugabe des Analyts abgebildet. Als Kontrolle diente die jeweils nebenstehende Reihe, in der die Beugungsgitter nur aus dem Träger-Lipid DOPC bestehen.

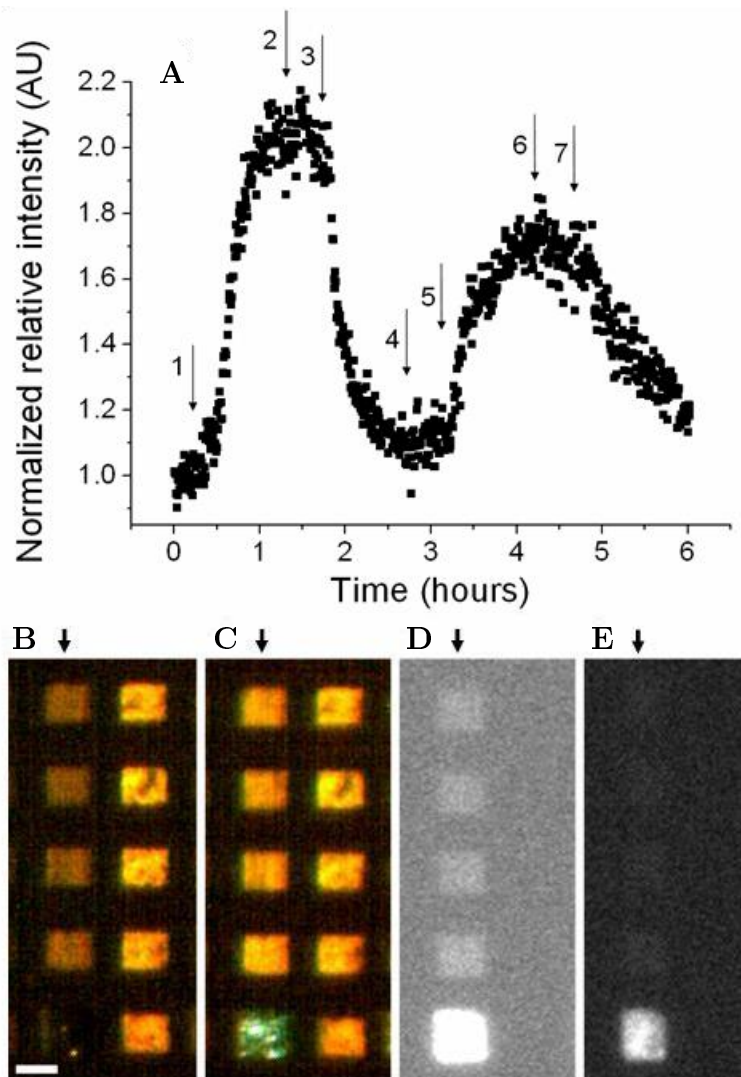


Abbildung 4.19: Reversibilität der Beugungsfähigkeit von Lipid-Beugungsgittern. Als funktionelles Lipid wurde hier DGS-NTA(Ni) verwendet, mit welchem die Bindung von His-GFP nachgewiesen wurde. **A:** Zeitlicher Verlauf der detektierten Intensität von Beugungsgittern. Aufgrund der Verwendung von grünfluoreszentem GFP wurde nur der rote Kanal der aufgezeichneten Bilder einbezogen. Die Erhöhung des Signals basiert auf der Interkalation nach Zugabe von $12,5 \mu\text{M}$ His-GFP (Pfeil 1 und 5), nach dieser wurden jeweils Waschschritte durchgeführt (Pfeil 2 und 4) bevor die Zugabe von 5mM Imidazol erfolgte (Pfeil 3 und 7). Dieses verdrängte jeweils das His-GFP und führte zu einer Reduktion des Signals. **B – E** Farbmikroskopische Aufnahmen von Beugungsgittern vor (**B**) und nach der Zugabe von His-GFP (**C**) bzw. fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vor (**D**) und nach (**E**) der Zugabe von Imidazol. Die Pfeile markieren jeweils die funktionalisierte Beugungsgitter Reihe. Der Größenstandard entspricht $20 \mu\text{m}$.^[51]

Um die Reversibilität der Beugungsgitter zu veranschaulichen, wurden nach Waschschritten (Abb. 4.19A, Pfeil 2, 4 und 6) abwechselnd das Histidin markierte GFP (Abb. 4.19A, Pfeil 1, und 5) und Imidazol (Abb. 4.19A, Pfeil 3, und 7) hinzugegeben. Durch die Zugabe von Imidazol, einer heterocyclischen, aromatischen Verbindung, welche auch Bestandteil der Seitenkette des Histidins selbst ist, kommt es zu einer kompetitiven Verdrängungsreaktion, bei der das gebun-

dene Protein His-GFP durch das Imidazol im Chelatkomplex ausgetauscht wird. Im Gegenzug verdrängt das His-GFP nach erneuter Zugabe z.T. wieder das gebundene Imidazol. Durch die Tatsache, dass das Protein GFP um ein Vielfaches größer als die einfache aromatische Verbindung Imidazol ist, ergibt sich eine Erhöhung des Beugungsgitters bei Anbindung von His-GFP und eine Erniedrigung beim Austausch mit Imidazol, deutlich erkennbar in der Steigerung bzw. Reduktion der Beugungsintensität (Abb. 4.19A). Bei den Abbildungen 4.19D und E handelt es sich um fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beugungsgitter aus B und C vor (Abb. 4.19D) bzw. nach (Abb. 4.19E) der Zugabe von Imidazol.

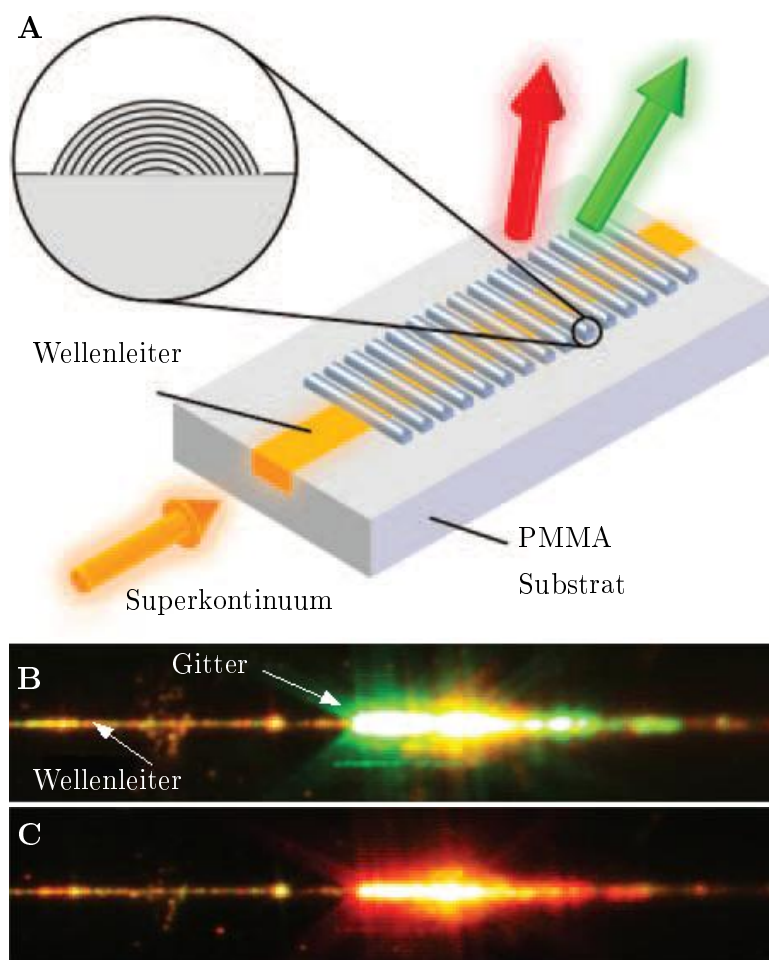


Abbildung 4.20: Integration von Lipid-Beugungsgitter in vorstrukturierte Substrate. **A:** Schematisches Modell des Versuchs. Lipid-Beugungsgitter wurden auf einem Wellenleiter aufgetragen. Das durch den Wellenleiter geleitete weiße Laserlicht wird durch das Beugungsgitter ausgekoppelt und durch Veränderung des Betrachtungswinkel können die unterschiedlichen Spektren beobachtet werden. Der Betrachtungswinkel betrug hierbei 30° (**B**) bzw. 45° (**C**) zur Wellenleiternormalen, das gebeugte, ausgekoppelte Licht befand sich im grünen bzw. roten Spektrum (Christoph Vannahme, Soenke Klinkhammer und Timo Mappes).^[51]

Zur Demonstration der Funktionalität der Beugungsgitter auf vorstrukturierten Oberflächen wurden diese orthogonal mit einer Periodizität von 700 nm auf einen Wellenleiter (8 μm Durchmesser) appliziert (Abb. 4.20A). In den Wellenleiter wurde weißes Laserlicht (500 nm – 800 nm)

eingekoppelt und das, durch das Beugungsgitter ausgekoppelte, gebeugte Licht unter unterschiedlichen Winkeln aufgezeichnet (Abb. 4.20B und C). Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe des Beugungsgitters das im Wellenleiter eingekoppelte Licht ausgekoppelt werden konnte. Durch die Veränderung des Betrachtungswinkel (30° bzw. 45°) wurde das ausgekoppelte Licht unterschiedlicher Wellenlänge (grünes bzw. rotes Spektrum) beobachtet. Dadurch konnte demonstriert werden, dass die Lipid-Beugungsgitter gezielt auf ein vorstrukturiertes Substrat appliziert und in dieses integriert werden können.

Aufgrund der Beschaffenheit/Herstellung der Wellenleiter können diese als planares Substrat angesehen werden. Eine Integration von DPN generierten Strukturen in bzw. auf dreidimensionale Strukturen wird im nachfolgenden Kapitel behandelt.

4.3 Funktionalisierung dreidimensionaler Strukturen - Toroide

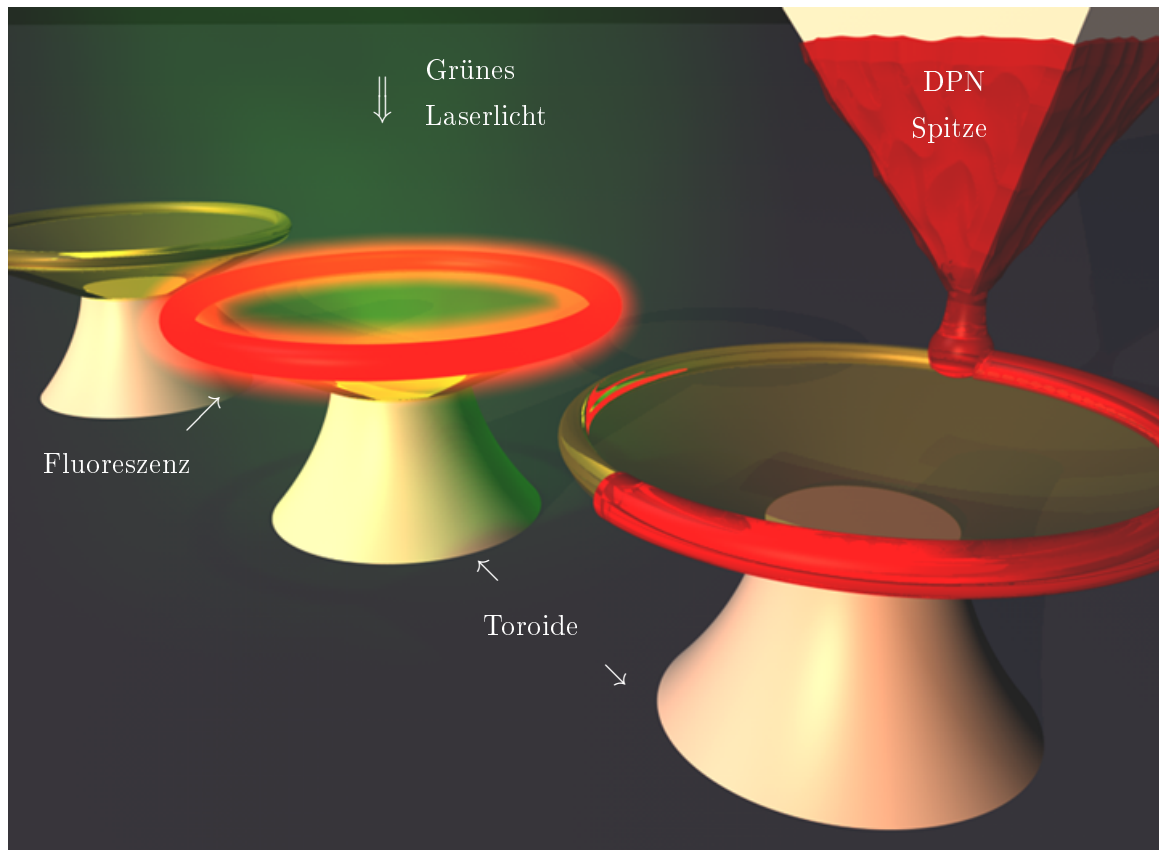


Abbildung 4.21: Schematische Darstellungen des DPN-Strukturierungsprozesses und ihres Wirkungsprinzips. **A:** Mittels DPN wird der äußere Rand des Torus von Toroiden mit einer fluoreszenten „Lipid-Tinte“ funktionalisiert. Durch Bestrahlung von grünem Laserlicht werden die Strukturen zur Fluoreszenz bzw. stimulierten Emission angeregt.

Ziel dieses Teils der Arbeit ist die Funktionalisierung von Toroiden, dreidimensionalen, photonischen Strukturen via DPN. In Abbildung 4.21 ist schematisch der Beschriftungsprozess, sowie die Fluoreszenzanregung bzw. stimulierte Emission der applizierten Struktur mittels grünem Laserlicht abgebildet.

Die Funktionalisierung der Toroide, die anfänglichen Bindungsexperimente, sowie die Herstellung der verschiedenen Lösungen wurden von mir durchgeführt. Die Messungen an den Toroiden erfolgten am Institut für angewandte Physik von Uwe Bog und Tobias Grossmann, welcher ebenfalls die Toroide hergestellt hatte.

Die folgenden Ergebnisse wurden eingereicht unter:

Bog, U., Laue, T., Grossmann, T., Beck, T., Wienhold, T., Hirtz, M., Fuchs, H., Lemmer, U., Kalt, H. und Mappes, T.(2012). Microlasers for biosensing by highly localized multipurpose surface functionalization.

4.3.1 Charakterisierung der funktionalisierten Toroide

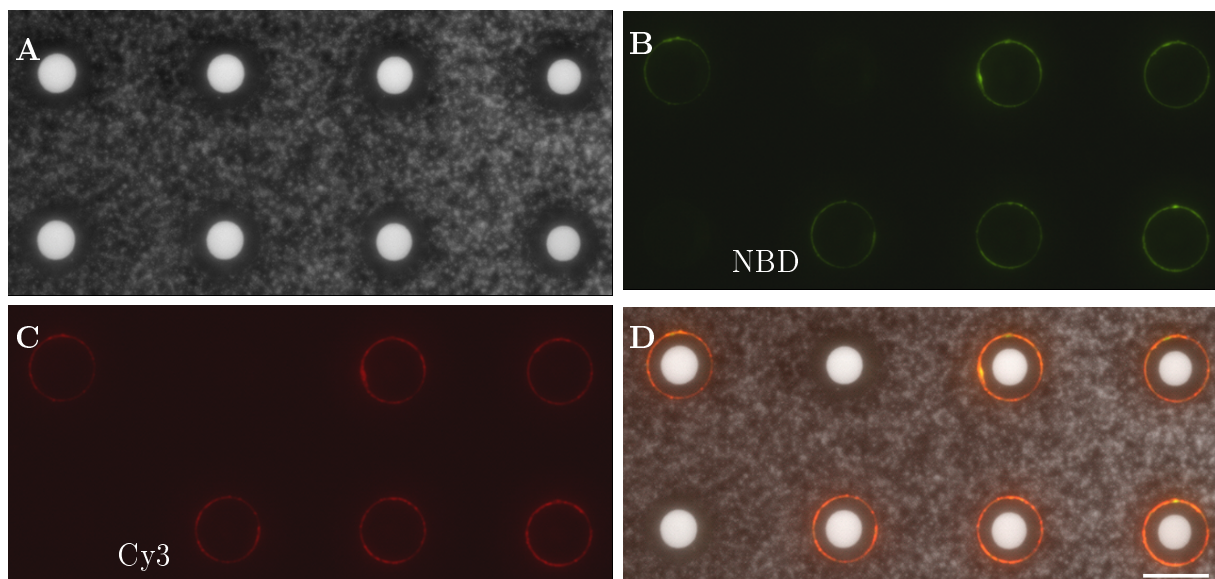


Abbildung 4.22: Mikroskopaufnahmen strukturierter Toroide nach Streptavidin-Cy3 Anbindung. **A:** Hellfeldmikroskopaufnahme von 8 Toroiden mit einem Durchmesser von 40 μm . **B:** Fluoreszenzmikroskopaufnahme der applizierten Lipid-Strukturen auf diesen Toroiden, visualisiert durch das fluoreszent markierte Lipid DOPE-NBD. Zwei der Toroide wurden hierbei zur Kontrolle nicht beschriftet. **C:** Fluoreszenzmikroskopaufnahme des gebundenen Streptavidin-Cy3 an den Lipid-Strukturen. **D:** Überlagerung der Bilder A–C. Wie zu erkennen ist, erfolgte eine Streptavidin Bindung nur an den funktionalisierten Toroiden. Der Größenstandard entspricht 40 μm .

Um grundlegend die Möglichkeit zur Strukturierung von Toroiden mit einer „Lipid-Tinte“ via DPN, sowie eine Anbindung eines Analyts an diese zu demonstrieren, wurden auf den Rand des Kelches verschiedener Toroide eine Lipid-Mischung aus DOPC versetzt mit 1 mol% DOPE-NBD und 4 mol% DOPE-Biotin appliziert. Hierbei wurde für die Lipid-Strukturen der Fluoreszenzfarbstoff NBD gewählt, da das Streptavidin mittels Cy3 markiert ist und so eine spektrale Trennung der beiden Komponenten erreicht werden konnte. In Abbildung 4.22A–D sind die Mikroskopaufnahmen dieser strukturierten Toroide nach Streptavidin-Anbindung (50 nM) zu sehen. Vor der Anbindung wurden die Strukturen mit 0,5% BSA passiviert. Bei Abb. 4.22A handelt es sich um die Hellfeldmikroskopaufnahme dieser verwendeten Toroide. Der Rand des Kelches der Toroide ist aufgrund seiner Transparenz und des dunklen Untergrundes nicht zu erkennen. Der helle Kreis im Mittelpunkt jedes Toroids stellt lediglich dessen „Fuss“ dar (siehe Abb. 1.12).

Auf den Rand von sechs dieser Toroide wurde über DPN die biotinylierte, fluoreszente Lipid-Tinte appliziert (siehe Abb. 4.22B) und an dieser erfolgreich Streptavidin-Cy3 gebunden (siehe Abb. 4.22C). In Abbildung 4.22 D ist die Überlagerung der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopaufnahme dargestellt. Wie im Vergleich zu den beiden unbeschrifteten Toroiden zu erkennen ist, konnte nur an den biotinylierten Strukturen eine Bindung von Streptavidin-Cy3 nachgewiesen werden.

Nachdem dementsprechend gezeigt werden konnte, dass eine Funktionalisierung der Toroide mittels DPN realisierbar ist, wurde auf die eigentliche Funktionsweise dieser als Resonatoren fokussiert. Mit Hilfe der Strukturierung sollte aus den Toroiden ein (Micro)Laser generiert werden. Die applizierten Strukturen stellten hierbei, aufgrund des beigemischten Fluoreszenzfarbstoffes, den Laserfarbstoff dar. Da im Versuchsaufbau (siehe Abb. 3.4) ein grüner Laser verwendet wurde, wurde hierbei die Lipid-Tinte mit dem rot fluoreszierenden Lipid DOPE-Rhodamin (1 mol%) versetzt (siehe Abb. 4.23B, eingebettetes Bild).

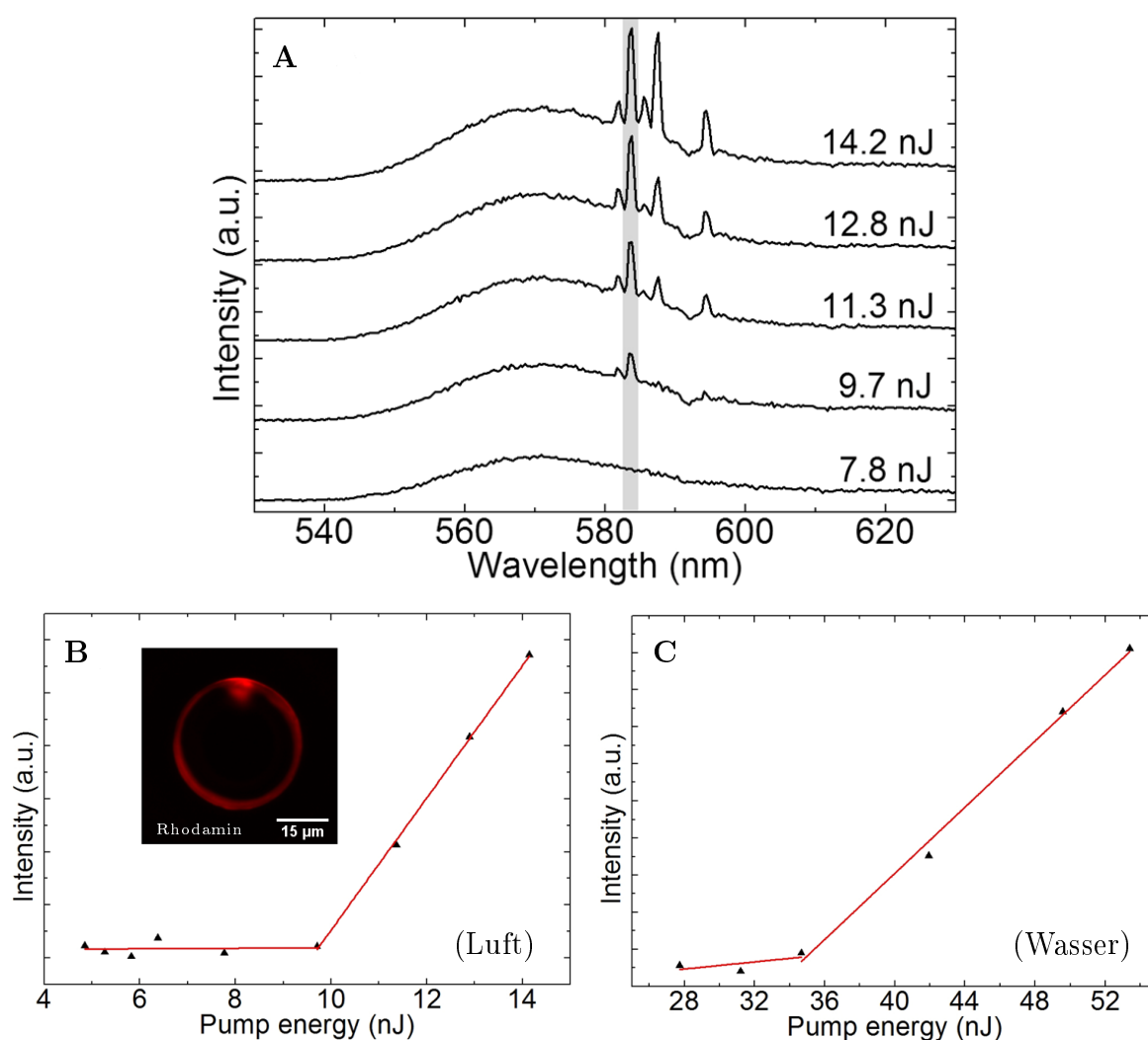


Abbildung 4.23: Funktionsweise des funktionalisierten Toroids als Laser. **A:** Wasserfall-Plots der detektierten Emission eines Toroids auf unterschiedlich starke Pumpenergien des anregenden Lasers (7,8 nJ, 9,7 nJ, 11,3 nJ, 12,8 nJ, und 14,2 nJ) an Luft. Grau hervorgehoben ist der Spektralbereich in dem ab 9,7 nJ eine stimulierte Emission detektiert werden konnte. **B:** Korrelation der Pumpenergie und der gemessenen Intensität der Emission des Toroids im Spektralbereich der stimulierten Emission (in A grau hervorgehoben). Die Laserschwelle liegt bei 9,7 nJ, ab welcher ein linearer Intensitätsanstieg des emittierten Lichts registriert wurde. Das eingebettete Fluoreszenzbild zeigt die applizierte Lipid-Struktur. **C:** Durch Zugabe von Wasser wird die Laserschwelle um das $\sim 3,5$ fache erhöht, verursacht durch Spreiten und Scherung der Lipid-Strukturen (\rightarrow Reduktion des Lasermaterials), sowie erhöhter Streuverlust im wässrigen Medium.

In Abbildung 4.23A sind Wasserfall-Plots der detektierten Emission eines Toroids in Bezug zu verschiedenen Pumpenergien (7,8 nJ, 9,7 nJ, 11,3 nJ, 12,8 nJ, und 14,2 nJ) des anregenden Lasers an Luft dargestellt. Wie zu erkennen ist, kam es ab einer Pumpenergie von 9,7 nJ, neben der Fluoreszenz des Laserfarbstoffes, zu einer detektierbaren stimulierten Emission bei 582 nm (Abb. 4.23A, grauer Bereich). Durch weitere Erhöhung der Pumpenergie stieg diese ebenfalls kontinuierlich an. Abbildung 4.23B zeigt die an diesem Punkt des Spektrums gemessene Intensität in Relation zu der steigenden Pumpenergie. Wie schon in 4.23 A zu erkennen, befand sich bei 9,7 nJ die Laserschwelle, ab der die stimulierte Emission zu einer Erhöhung der Intensität führte. Diese Messung wurde ebenfalls in Wasser durchgeführt und auch hierbei die Pumpenergie mit der gemessenen Intensität korreliert (siehe Abb. 4.23C). Aus dem Graph 4.23 C ist ersichtlich, dass durch die Zugabe von Wasser, die Laserschwelle um das $\sim 3,5$ fache stieg. Dieser Effekt kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits kommt es durch den Austausch des Mediums (Luft \rightarrow Wasser) zu einer Verminderung des Unterschieds der Brechungsindices von Umgebung und Resonator und andererseits könnte es durch Spreiten und/oder Scherung zu einer Reduktion der Lipid-Strukturen und damit zu einer Abnahme des aktiven Lasermaterials kommen. Unabhängig davon kann der funktionalisierte Toroid weiterhin als Laser fungieren.

4.3.2 Proteindetektion mittels funktionalisierter Toroide

In den folgenden Experimenten sollte, als Modellsystem für ein Analyt, die Detektion von Streptavidin über die funktionalisierten Toroide realisiert werden. Der Lipid-Tinte wurde hierfür neben dem fluoreszenzeten Lasermaterial DOPE-Rhodamin (1 mol%) 4 mol% DOPE-Biotin hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Lipid-Strukturen, die nur den Laserfarbstoff beinhalteten.

In Abbildung 4.24A und B sind Wasserfall-Plots der Intensität der detektierten Emission in Bezug zur gemessenen Wellenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten des Detektionsexperimentes dargestellt. Die aufgezeichneten Spektren der Abbildung 4.24A wurden von einem biotinylierten Toroiden genommen, die aus der Abbildung 4.24B von der nicht-biotinylierten Kontrolle, die nur den Fluoreszenzfarbstoff enthielt. Die dargestellten Spektren wurden vor (4.24 A & B, (1)) und nach (4.24 A & B, (2)) der Zugabe einer 0,5%igen BSA-Lösung, sowie 90 s (4.24 A (3)) bzw. 270 s (4.24 A & B (4)) nach der Zugabe von 50 nM Streptavidin aufgenommen. Grau unterlegt wurde der Spektralbereich in dem die folgende Beobachtungen gemacht werden konnten. Die Zugabe der 0,5%igen BSA-Lösung führte sowohl in der Kontrolle, als auch der biotinylierten Struktur zu einer vernachlässigbaren spektralen Verschiebung von ~ 10 bzw. ~ 14 pm. Die Zugabe von 50 nM Streptavidin hingegen führte zu einer spektralen Verschiebung von ~ 126 pm in der Biotintragenden Struktur, die Kontrolle wies hier nur eine Verschiebung von ~ 10 pm auf.

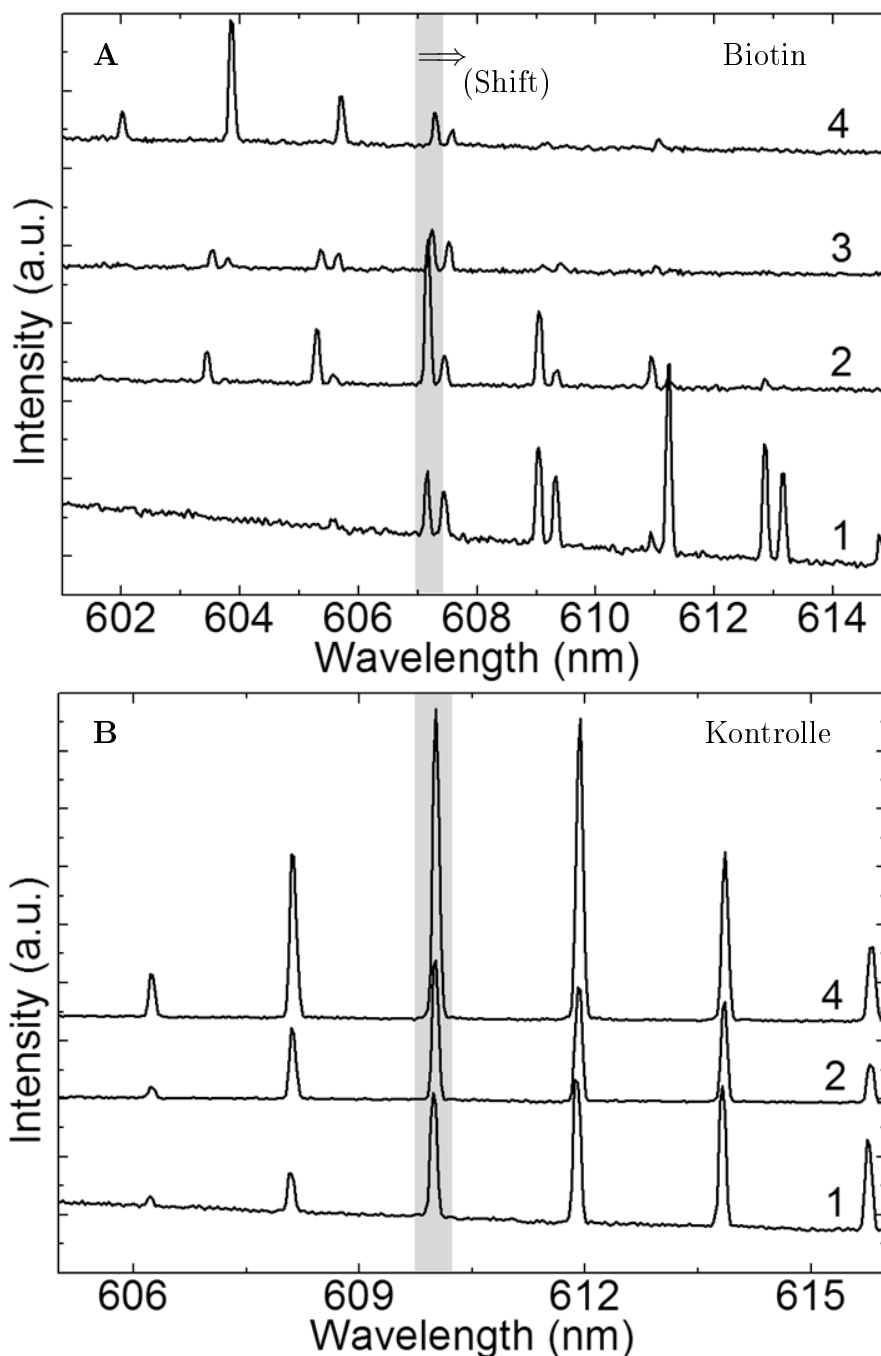


Abbildung 4.24: Detektion von Streptavidin mittels funktionalisierter Toroide. **A** und **B**: Wasserfall-Plots der aufgezeichneten Spektren von biotinylierten (**A**) und nicht-biotinylierten (**B**) Toroiden zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs: Vor(1) und nach (2) der Zugabe einer 0,5%igen BSA-Lösung, sowie 90 s(3) bzw. 270 s(4) nach der Zugabe von 50 nM Streptavidin. Im Gegensatz zu den detektierten spektralen Verschiebungen auf die Zugabe der 0,5%igen BSA-Lösung (~ 10 pm in **A** bzw. ~ 14 pm in **B**), konnte nur in den biotinylierten Toroid eine relevanter Spektralshift von ~ 126 pm 270 s nach der Zugabe von 50 nM Streptavidin gemessen werden. Die Kontrolle wies hierbei nur eine Verschiebung von ~ 10 pm auf.

Diese spektrale Verschiebung erlaubt darüberhinaus ebenfalls eine Diskriminierung der Konzentration des zugegebenen Analyts. In Abbildung 4.25 ist der zeitliche Verlauf des detektierten spektralen Shifts von biotinylierten Toroiden auf die Zugabe von 50 nM und 500 nM Streptavidin

dargestellt. Wie zu erkennen ist, tritt durch die 10fach höhere Konzentration eine Verschiebung von ~ 240 pm innerhalb von 40 s nach Zugabe des Analyts auf, im Vergleich zu einem Shift von ~ 100 pm nach 240 s bei der niedrigeren Konzentration.

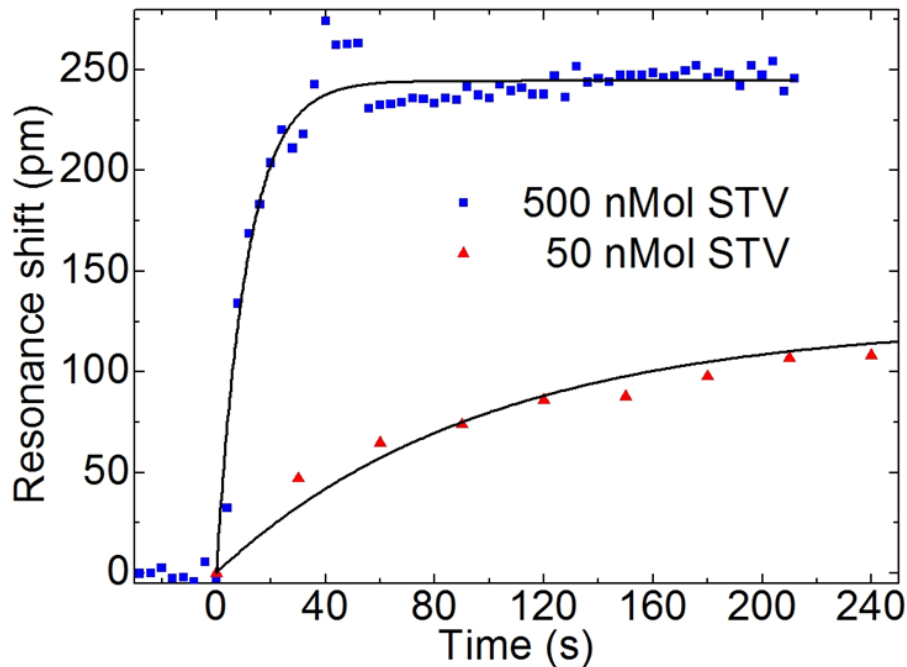


Abbildung 4.25: Zeitlicher Verlauf der spektralen Verschiebung der detektierten Emission biotinylierter Toroide auf Zugabe von 50 nM und 500 nM Streptavidin. Durch die Erhöhung der Konzentration konnte eine schnellere und größerer spektrale Verschiebung erzielt werden.

4.3.3 Unterschiedliche molekulare Tinten zur Funktionalisierung der Toroide

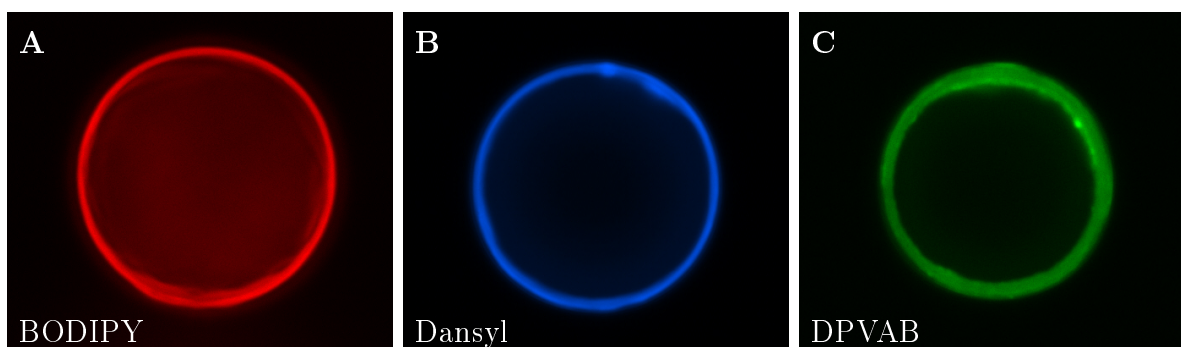


Abbildung 4.26: Verwendung verschiedener fluoreszenter Lipid-Tinten zur Funktionalisierung von Toroiden. Fluoreszenzaufnahmen von funktionalisierten Toroiden, unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe. **A:** Bor-Dipyrromethan (BODIPY), **B:** Dansylchlorid (Dansyl) und **C:** 1,4-Bis[2-[4-[N,N-di(p-tolyl)amino]phenyl]vinyl]benzene (DPVAB).

Aufgrund der Verwendung des DPN-Systems zur Funktionalisierung der Toroide, besteht, gegeben durch die gezielte lokale Applizierung, auch die Möglichkeit verschiedene molekulare

Tinten auf demselben Substrat aufzubringen und eine Parallelisierung zu realisieren. Um dies zu demonstrieren, wurden im folgenden Versuch unterschiedliche fluoreszente Moleküle der biotinylierten Lipid-Tinte beigemischt. In den Abbildungen 4.26 sind die Fluoreszenzaufnahmen der verschiedenen funktionalisierten Toroide abgebildet. Es handelte sich bei diesen um Bor-Dipyrromethan (BODIPY, siehe Abb. 4.26A), Dansylchlorid (Dansyl, siehe Abb. 4.26B) und dem Dotierstoff DPVAB (siehe Abb. 4.26C) .

5 Diskussion

5.1 Click-Chemie DPN

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sich ein prominenter Vertreter der Click-Chemie, die kupferkatalysierte Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition, als „molekulare Tinte“ für die DPN eignet. Auf unterschiedliche Substrate wurden über die reaktive Polymerschicht Strukturen appliziert und kovalent gebunden. Die Bandbreite dieser Substrate reicht hierbei von sehr elastischen Polymeren (PDMS) über „Standard“ Polymeren (PMMA, Polystyrol) und Glas bis hin zu Stahl und deckt somit einen großen Bereich in zukünftigen Anwendungsgebieten, wie der Zellkultur und Medizin (z.B. Implantation) ab.

Die Moleküle werden, vorausgesetzt sie besitzen eine entsprechende Alkin-Gruppe und sind beständig gegenüber den Bedingungen der Beschichtungs-Prozedur des Cantilevers, entweder direkt an das Substrat gebunden oder unabhängig davon indirekt in einem zweiten Schritt über die Bindung via Streptavidin. Letzterer Fall setzt natürlich eine Biotinylierung des Moleküls voraus. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass, im Vergleich zu der vorangegangenen Arbeit von Nandivada *et al.*,^[27] die Bindung des Azids keine vorhergehende Adsorption von Komponenten der Click-Chemie Reaktion erforderte. Der Cantilever wurde in einem Schritt mit dem Katalysator, nebst Reduktionsmittel und dem jeweiligen Azid direkt beschichtet. Darüberhinaus konnten die Strukturierungsbedingungen auch hinsichtlich ihres zeitlichen Aufwandes optimiert werden. Anstatt 12–18 stündigen Druckprozessen wurden die einzelnen Strukturen in wenigen Minuten appliziert.

Diese Arbeit stellt nicht den ersten dokumentierte Versuch, die Click-Chemie mit der DPN zu realisieren, dar. Long *et al.* stellte 2007 eine Methodik vor, bei der Silizium-Wafer über mehrere Zwischenschritten mit einer reaktiven Molekülschicht beschichtet wurden und eine angeschlossene Bindung des Azids über DPN erfolgte.^[57] Im Vergleich hierzu wiesen jedoch die applizierten Azide keine detaillierte Strukturierung auf, es handelte sich lediglich um Punkte und einzelne Linien. Vor allem sind die Reaktionsbedingungen, die die Funktionalisierung des Substrates erfordern, bei weitem aggressiver als die des hierbei verwendeten CVD-Prozesses. Dementsprechend nur für eine begrenzte Auswahl von Substraten anwendbar.

2009 wurde von Paxton *et al.* eine weitere Methodik vorgestellt.^[58] Bei dieser fungiert der Cantilever nicht als Schreibgerät *per se*, über das Moleküle übertragen werden, sondern als Katalysator der Reaktion. Hierfür wurde der Cantilever mit Kupfer beschichtet und in einer Flüssigkeitszelle in welchem sich das Medium, welches alle weiteren Reaktionspartner enthielt, in die Nähe des reaktiven Substrates gebracht. Dadurch wurde ortsspezifisch die Click-Reaktion katalysiert und führte zu einer lokalen Bindung der Azide an das Substrat. Die Verwendung einer Flüssigkeitszelle schränkt natürlich den Versuchsaufbau bedeutend ein und ist im Vergleich zu der hier vorgestellten Arbeit wesentlich aufwendiger.

Die Verwendung dieser CVD Beschichtungstechnik erlaubt darüberhinaus nicht nur den Einsatz verschiedenster Substrate, sondern besitzt ebenfalls, hinsichtlich der generierten Polymeroberfläche, eine große Bandbreite an unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Seit der ersten wissenschaftlichen Dokumentation dieses CVD Prozesses von Gorham 1966,^[24] hat sich die Anzahl der verwendbaren [2.2]Paracyclophanen, aus denen die Polymerschichten hergestellt werden und damit die Bandbreite der von der Polymerschicht exponierten funktionellen Gruppen, kontinuierlich erweitert.^[59,60] Häufig gebräuchliche [2.2]Paracyclophane, genauer gesagt deren gebildete Polymerschicht, sind sogar schon mit handelsüblichen Namen versehen (Parylen-C,-N und -D) und z.T. markenrechtlich (wie z.B. Parylen HT[®]) geschützt.

Die Kompatibilität dieser Polymerschichten bezüglich der experimentiellen Anforderungen der jeweiligen biologischen Anwendung wie z.B. erhöhte bzw. verminderte Zelladhäsion, Zytotoxizität oder Proteinfunktionalität, muss natürlich je nach gewähltem Polymer im Vorfeld eruiert werden, konnte jedoch schon in einigen Anwendungen erfolgreich gezeigt werden: Anbindung von Disacchariden^[50], Adhäsion von bovinen aortalen Endothelzellen^[61], Beschichtung von Gefäßstützen und deren Einsatz *in vitro* und *in vivo*.^[62]

Auch besteht die Möglichkeit einer graduellen Verteilung der funktionellen Gruppe innerhalb der Polymerschicht, sowie die Applizierung verschiedener funktioneller Gruppen innerhalb eines Substrates,^[60] wodurch neben der ortsspezifischen Strukturierung mittels DPN auch die parallele Applizierung verschiedener Moleküle realisiert werden könnte.

Die Plattform, die diese CVD Beschichtung darstellt, ist dementsprechend weit gefächert. Der erfolgreiche Einsatz der DPN zur Strukturierung erfordert natürlich darüber hinaus eine, der funktionellen Gruppe der Polymerschicht entsprechende, Molekülverbindung. Die Click-Chemie bietet hierbei, neben der schon verwendeten Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition, ebenfalls ein breites Spektrum an möglichen Reaktionen und somit Reaktionspartnern.^[63] Die Strukturierung einer Aldehyd-funktionalisierten Polymerschicht mit Hilfe einer Hydrazid- Molekülverbindung konnte in dieser Arbeit schon demonstriert werden. Dies stellt nicht nur eine Erweiterung des Repertoires von einsetzbaren „molekulare Tinte“ dar, sondern ebenfalls eine Möglichkeit zur Molekülanbindung ohne auf eine Kupferverbindung als Katalysator zurück greifen zu müssen.

Hinsichtlich biologischer Anwendungen könnte dieser je nach Konzentration/Versuchsaufbau denaturierend oder zytotoxisch wirken.

Zusammengefasst stellt die Kombination zwischen der CVD Beschichtung von Substraten mit reaktiven Polymerschichten und der angeschlossenen DPN Strukturierung, nach der hier beschriebenen Methodik, ein einfaches, schnelles und vorallem substratunabhängiges Verfahren zur Nanostrukturierung dar. Aufgrund der Natur der DPN sind hierbei den Formen der Strukturen innerhalb deren Arbeitsbereich nahezu keine Grenzen gesetzt. Optimierung hinsichtlich der Beschichtung der Cantilever (wie beispielsweise die Verwendung von Inkwells) könnten ebenfalls zu einer Beschichtung von unterschiedlichen Tinten auf verschiedenen Spitzen eines Cantilevers und somit zu einer parallelen Strukturierung einer variablen Anzahl von Tinten in einem einzigen Schreibvorgang führen.

5.2 Lipid-Multilayer gratings

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich war mit der DPN unter Verwendung von Lipid-Tinten dreidimensionale Strukturen zu generieren, deren Funktionalität allein auf ihrer dreidimensionalen Form beruhte. Durch die Lagerung und erste Flüssigkeitszugabe (nebst gleichzeitiger Passivierung durch BSA) in der nahezu wasserfreien Stickstoffatmosphäre (siehe Abschnitt 3.2.2, Seite 21) konnte das Spreiten der Strukturen minimiert werden und diese behielten nach der Imersion weiterhin die Fähigkeit zur Lichtbeugung.

Dies ermöglichte die Verwendung der Beugungsgitter zur Detektion eines Analyts in Lösung. Es handelte sich hierbei um eine markierungsfreie Technik, wodurch auf den zusätzlichen Einsatz von z.B. markierten Sonden (fluoreszent, radioaktiv, etc.) oder anderen Methoden zur Visualisierung verzichtet werden konnte und der Zeit- und Kostenaufwand reduziert wurde. Darüber hinaus erfordert die Verwendung der Lipid-Tinten generell keine Oberflächenmodifikation und kann auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten verwendet werden.^[28]

Es konnten ebenfalls die verschiedenen Effekte, die zur Veränderung des Beugungsgitters nach Analytzugabe führten, gezeigt werden; die Interkalation und Entnetzung. Im Gegensatz zur Interkalation, die schon in früheren Arbeiten dokumentiert wurde,^[52] ist der Effekt der Entnetzung schwerer zu deuten, da hierbei unbekannte Faktoren, wie beispielsweise die genaue Form und Schichtung der Multi-Lagen Lipid-Linien, sowie auch deren Inhomogenität bezüglich ihrer Höhe und Molekülverteilung,^[64] auftreten. Der Effekt der Entnetzung basiert wahrscheinlich auf der Tatsache, dass sich durch Anbindung von Streptavidin die Oberflächenspannung erhöht (ein Streptavidin-Molekül kann theoretisch vier Biotin-Moleküle an sich binden) und die Lipid-Linien daraufhin eine energetisch günstigere, eine kugelförmige Gestalt anstreben, vergleichbar mit dem Effekt der Plateau-Rayleigh-Instabilität,^[65] welche auch in festen Nano-

strukturen beobachtet wurde.^[66] Aufgrund dieser lokalen Oberflächenerweiterung in Teilen der Gitter-Linien, werden gleichzeitig, innerhalb der jeweiligen Linie, Lipide der Umgebung in diese eingelagert und es kommt zu einer allgemeinen Reduktion der Linienhöhe bei gleichzeitiger Ausbildung von erhöhten, punktuellen Lipid-“Tropfen“ (siehe Abb. 4.13). Dies resultiert in einer Erniedrigung der Beugungsfähigkeit und -intensität des Gitters. Darüberhinaus können auch, je nach Ausprägung bzw. Größe der lokalen Entnetzungs-Strukturen, benachbarte Lipid-Linien fusionieren,^[67] wobei wahrscheinlich hierbei, ausgehend von der Basis der Struktur, eine komplette oder nur partielle Fusion stattfand. Letzterer Effekt könnte somit auch erklären, warum niedrige Strukturen nur den Effekt der Interkalation aufwiesen, da in diesen die Ausdehnung durch Entnetzung nicht zu einer Fusion führte.

Der Nachweis der 5 nanomolaren Protein-Konzentration nach 15 min entspricht bisherigen Detektionsgrenzen von vergleichbaren Biosensoren, die auf Wellenleitern basieren^[68] und liegt sogar je nach Aufbau oder Messmethode darunter.^[69,70] Ein theoretisches Anwendungsgebiet dieser Beugungsgitter wären beispielsweise (Einweg-)Biosensoren, die zur Detektion von Hormonen in Blutproben eingesetzt werden, zumal eine spezifische Detektion in einem Proteingemisch schon gezeigt werden konnte (siehe Abb. 4.18). Obwohl eine signifikante Veränderung des Beugungssignales auf Zugabe der 0,5 nanomolaren Protein-Konzentration erst nach 90 min festgestellt werden konnte und dies eine zu lange Detektionszeit darstellt, konnte damit dennoch gezeigt werden, dass diese Detektionsgrenze prinzipiell erreicht werden kann und durch Optimierung des Sensors wahrscheinlich auch realistisch nutzbar wäre.

Mögliche Optimierungen wären hierbei die Reduktion der Anzahl an verwendeten Beugungsgittern und des Reaktionsraumes, wodurch eine höhere relative Proteinkonzentration pro Gitter und Anbindungsrate erreicht werden könnte. Vor allem die Belichtungs- und Detektionstechnik kann stark verbessert werden. Durch die Verwendung einer seitlich einstrahlenden Kaltlichtquelle konnten in diesem experimentellen Aufbau nur das 4×Mikroskopobjektiv verwendet werden, was das Detektionspotential einschränkte. Theoretisch würde sich hierbei auch die Detektion mittels Spektrometer anbieten (vgl. den Detektionsaufbau in Abb. 3.4). Hinsichtlich einer Optimierung der Belichtungsquelle konnte schon gezeigt werden, dass die Strukturen auf Wellenleiter appliziert werden können und diese auch erfolgreich zu einer Lichtauskopplung führten.

Neben der Verwendung des biotinylierten bzw. chelatbildenden Lipids als proteinbindender Bestandteil des Sensors, könnten auch andere funktionelle Lipide eingesetzt werden und so die Bandbreite an möglichen Interaktionspartnern erhöht werden. Denkbar hierbei wären Modifikationen der Lipid-Kopfgruppen mit Carboxylgruppen,^[71] Glutarylgruppen^[72] oder Thioether^[73,74] zur Protein oder Antikörperbindung. Aufgrund der Verwendung einer Lipid-Tinte und somit einer künstlichen Biomembran, wäre auch eine direkte Integration von Proteinen möglich.^[75,76]

Zusammengefasst konnte der Machbarkeitsnachweis der direkten Generierung von funktionellen, dreidimensionalen Strukturen mittels DPN erbracht werden. Darüber hinaus wiesen die Beugungsgitter, trotz des einfachen experimentellen Aufbaues, eine Detektionsgrenze vergleichbarer Sensoren auf, welche durch Optimierung des Systems weiterhin verringert werden könnte. Auch eine Integration dieser Strukturen in bestehende optische Systeme wie Wellenleiter konnte erzielt werden.

5.3 Funktionalisierte Toroide

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich war den Rand des Kelches von Toroiden, dreidimensionalen Strukturierungen, über die DPN zu funktionalisieren. Innerhalb eines einzigen Produktionsschrittes wurden sowohl das Lasermaterial, als auch die analytbindende funktionelle Komponente appliziert. Aufgrund der verwendeten Lipid-Tinte war hierbei auch keine Vorbehandlung des Substrates nötig. Beides Faktoren, die eine Einsparung von Prozessschritten und dementsprechend eine erhebliche Zeitersparnis darstellen. Ebenso wurde das Risiko einer Schädigung der Substratoberfläche durch den Einsatz dieser lösungsmittelfreien Technik minimiert.

Die Vorversuche zeigten, dass eine spezifische Anbindung des Analyts nur an den funktionalisierten Strukturen möglich war (siehe Abb. 4.22) und dann eine niedrige Laserschwelle an Luft vorlag (siehe Abb. 4.23B). Selbst nach der Immersion der beschriebenen Substrate in eine Flüssigkeit, wodurch durch Spreiten und eventuell auch Abscherung ein Materialverlust in der aktiven Region des Resonators auftrat, konnte noch ein ausreichend starkes Lasersignal generiert werden (siehe Abb. 4.23C). Dieses erlaubte es, die funktionalisierten Toroide zur Detektion einer 500 nM und 50 nM Analytlösung zu verwenden.

Es ist schwer einen direkten Vergleich der hierbei verwendeten Molekülkonzentration mit vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten zu ziehen und dementsprechend eine vergleichbare Aussage über ein theoretisches Detektionslimit zu geben, da es eine Vielzahl von unterschiedlichen Anregungs- und Detektionsmöglichkeiten, sowie Resonatorformen und Materialien gibt, die alle die Detektionskapazität beeinflussen.^[77]

Das optimale Detektionslimit solcher Resonatoren wurde von Armani *et al.*^[45] und He *et al.*^[78] demonstriert, die einen markierungsfreien Einzelmolekülnachweis erbringen konnten. Das Detektions- und Anregungsprinzip in diesen Arbeiten unterscheidet sich jedoch stark von dem in dieser Arbeit verwendeten Aufbau (siehe Abb. 3.4). Neben der Verwendung von Glastoroiden, die einen höheren Gütefaktor aufweisen (Q -Faktor= 10^8), wurde hierbei auch die Ein- und Auskopplung über Glasfasern durchgeführt (siehe Abb. 5.1), was die Kopplungseffizienz stark verbessert.^[79] Allein durch die Verwendung einer Glasfaser zum Einkoppeln des anregenden

Lichts, im Vergleich zu einer direkten Bestrahlung, wird die zu erbringende Pumpleistung des Lasers um das 2600fache reduziert.^[80] Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als aktives Lasermaterial, bleiben diese bei geringeren Anregungsintensitäten über einen längeren Zeitraum stabil, bis eine dauerhafte Schädigung des Moleküls in Form von Bleichung auftreten kann und erlaubt somit eine größere Zeitspanne zur Detektion.

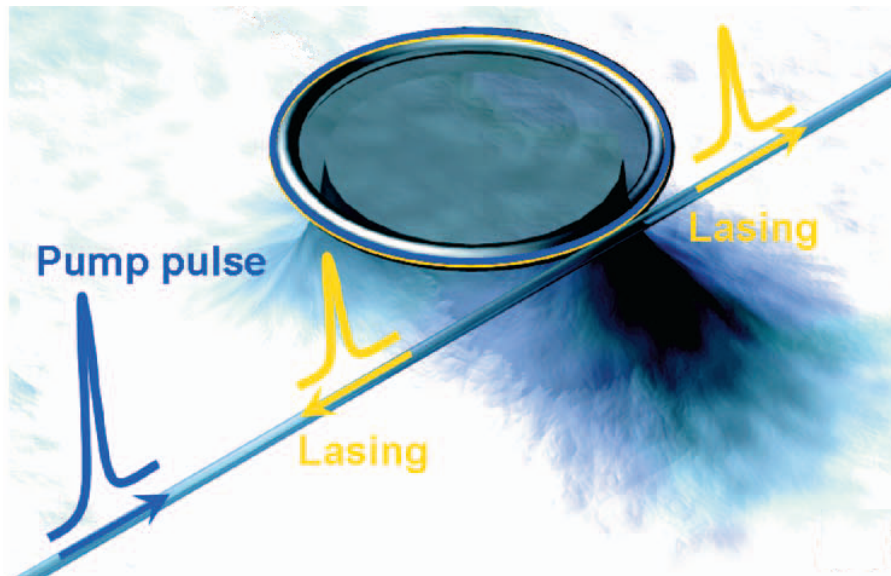


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Ein- und Auskopplung an einem Toroid mittels Glasfaser. Sowohl das anregende Licht (Pump Impulse), als auch die stimulierte Emission (Lasing) wird über die Glasfaser geleitet.^[80]

Der Einsatz solcher Glasfasern benötigt jedoch im Gegenzug eine exakte Positionierung der Faser und dadurch einen weit höheren Aufwand beim Versuchsaufbau, vorallem wenn die Detektion in einer Flüssigkeitszelle durchgeführt wird. Zumal auch für jede Messung an verschiedenen Toroiden diese neu justiert werden muss und somit eine parallele Detektion an unterschiedlichen Toroiden erschwert wird. Hinsichtlich eines zukünftigen Anwendungsgebietes dieser funktionalisierten Toroide in einfach handhabbaren Lab-on-a-Chip Systemen, wurde dementsprechend von der Verwendung einer Glasfaser als lichtleitendes Element zur Ein- und Auskopplung abgesehen.

Grundlegend unterscheidet sich auch das Detektionsprinzip. Obwohl es sich in beiden Fällen, den zitierten Arbeiten, als auch der hier vorgestellten Arbeit, um passive Resonatoren handelte, wurden diese in letzterem Fall durch die Applizierung des Lasermaterials erst in eine aktive Form überführt. Durch die Einstrahlung von Laserlicht kommt es zu einer stimulierten Emission in den Toroiden, dementsprechend der Generierung des Laserlichts, welches zur Molekül-Detektion eingesetzt wird. Im Gegensatz hierzu steht die direkte Verwendung des eingekoppelten Laserlichts zur Detektion von Bindungsreaktionen an der Toroid-Oberfläche. Je nach Qualität des verwendeten Lasers können hierbei die beobachteten Lasermoden, die in den Resonator eingekoppelt werden und sich durch Molekülanbindung verschieben, Resonanzbreiten von nur wenige Femtometern aufweisen. Unter Verwendung hochauflösender Spektrometer

können somit Phasenverschiebungen von wenigen Femtometer detektiert und eine Einzelmoleküldetektion realisiert werden.

Aufgrund des Einsatzes einer Lipid-Tinte als aktives Lasermaterial wiesen die in dieser Arbeit verwendeten Toroid-Laser eine im Vergleich größere Resonanzbreite von 80–110 pm auf. Wahrscheinlich aufgrund der Inhomogenität der Lipidstrukturen, als auch durch die Ausbildung von einzelnen Lipid-Tropfen durch den Entzuchtungseffekt bei Analytbindung und somit der Entstehung von lokalen Streuzentren. Dennoch sollten bei einer Resonanzbreite von rund 100 pm noch eine Phasenverschiebungen von 50 pm klar zu erkennen sein, wodurch die hierbei detektierte Konzentration von 50 nM mit einer Phasenverschiebung von 127 pm noch nicht das Detektionslimit des Sensors darstellt. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass durch den Einsatz der Lipid-Tinte über den Effekt der Interkalation eine Steigerung des Detektionssignales auftrat. Basierend auf einem theoretischen Modell^[81] kann man unter Zugabe einer hohen Konzentration des Analyts bei einer kompletten Bedeckung der Oberfläche des Toroids eine Phasenverschiebung von rund 180 pm erwarten. Die hierbei verwendete relativ geringe Konzentration von 500 nM wies eine Verschiebung von rund 240 pm auf, was einer um 60 pm größeren Verschiebung und Signalsteigerung von rund 33% entspricht.

Im Vergleich zu einer großflächigen Funktionalisierung, wie beispielsweise der Rotationsbeschichtung, erlaubt der Einsatz der DPN und die damit verbundene gezielte Funktionalisierung der photonisch aktiven Bereiche der Sensorelemente ebenfalls den Einsatz einer geringeren Konzentration des Analyts, da dieser nur an die aktiven Bereiche binden kann und nicht über das gesamte Substrat verteilt anbindet. Darüber hinaus ergibt sich auch, wie in dieser Arbeit demonstriert (siehe Abb. 4.26), die Möglichkeit zu einer parallelen Funktionalisierung. Neben den hierbei verwendeten unterschiedlichen Lasermaterialien können auch verschiedene funktionelle Lipide eingesetzt werden, wodurch kombinatorisch aus einer Reihe von Toroiden eine parallele Detektion verschiedener Analyte erzielt werden könnte.

Zusammengefasst konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist mit Hilfe der DPN eine gezielte, lokale Funktionalisierung von Toroiden durchzuführen. Der Einsatz dieser Technik erlaubt darüberhinaus eine erhebliche Einsparung von Produktionsschritten und die Möglichkeit zu einer parallelen Applizierung von verschiedenen funktionellen Komponenten auf verschiedenen Toroiden eines Substrates, welches zusätzlich zu einer parallelen Detektion und zu weiteren Einsparung von Produktionsschritten führen kann. Obwohl das Detektionslimit dieser funktionalisierten Toroide noch nicht erreicht wurde, konnte aufgrund der Multilag-Struktur und der Interkalation des Analyts im Vergleich zu einer funktionellen Monolage eine Signalverstärkung ermittelt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] **Feynmann, R. P.(1960)**. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, **23**, 22–36.
- [2] **Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C.(1986)**. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, **56**, 930–934.
- [3] **Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S., & Mirkin, C. A.(1999)**. "Dip-Pen" Nanolithography. *Science*, **283**, 661–663.
- [4] **Haaheim, J., Eby, R., Nelson, M., Fragala, J., Rosner, B., Zhang, H., & Athas, G.(2005)**. Dip Pen Nanolithography (DPN): process and instrument performance with NanoInk's NSCRIPTOR system. *Ultramicroscopy*, **103**, 117–132.
- [5] **Nuzzo, R. G. & Allara, D. L.(1983)**. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, **105**, 4481–4483.
- [6] **Bain, C. D. & Whitesides, G. M.(1989)**. Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Advanced Materials*, **1**, 110–116.
- [7] **Weeks, B. L., Vaughn, M. W., & Deyoreo, J. J.(2005)**. Direct imaging of meniscus formation in atomic force microscopy using environmental scanning electron microscopy. *Langmuir*, **21**, 8096–8098.
- [8] **Ginger, D. S., Zhang, H., & Mirkin, C. A.(2004)**. The evolution of dip-pen nanolithography. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **43**, 30–45.
- [9] **Wu, C.-C., Reinhoudt, D. N., Otto, C., Subramaniam, V., & Velders, A. H.(2011)**. Strategies for patterning biomolecules with dip-pen nanolithography. *Small*, **7**, 989–1002.
- [10] **Demers, L. M., Ginger, D. S., Park, S.-J., Li, Z., Chung, S.-W., & Mirkin, C. a.(2002)**. Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography. *Science*, **296**, 1836–1838.
- [11] **Cho, Y. & Ivanisevic, A.(2004)**. SiO_x Surfaces with lithographic features composed of a TAT peptide. *Journal of Physical Chemistry B*, **108**, 15223–15228.

-
- [12] Lee, K.-B., Park, S.-J., Mirkin, C. A., Smith, J. C., & Mirksich, M.(2002). Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science*, **295**, 1702–5.
- [13] Lim, J.-H., Ginger, D. S., Lee, K.-B., Heo, J., Nam, J.-M., & Mirkin, C. A.(2003). Direct-write dip-pen nanolithography of proteins on modified silicon oxide surfaces. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **42**, 2309–12.
- [14] Li, B., Lu, G., Zhou, X., Cao, X., Boey, F., & Zhang, H.(2009). Controlled assembly of gold nanoparticles and graphene oxide sheets on dip pen nanolithography-generated templates. *Langmuir*, **25**, 10455–10458.
- [15] Li, B., Goh, C. F., Zhou, X., Lu, G., Tantang, H., Chen, Y., Xue, C., Boey, F. Y. C., & Zhang, H.(2008). Patterning colloidal metal nanoparticles for controlled growth of carbon nanotubes. *Advanced Materials*, **20**, 4873–4878.
- [16] Du, H., Disney, M. D., Miller, B. L., & Krauss, T. D.(2003). Hybridization-based unquenching of DNA hairpins on au surfaces: prototypical "molecular beacon" biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 4012–4013.
- [17] Weinberger, D. A., Hong, S., Mirkin, C. A., Wessels, B. W., & Higgins, T. B.(2000). Combinatorial Generation and Analysis of Nanometer- and Micrometer-Scale Silicon Features via "Dip-Pen" Nanolithography and Wet Chemical Etching. *Advanced Materials*, **12**, 1600–1603.
- [18] Bellido, E., de Miguel, R., Ruiz-Molina, D., Lostao, A., & Maspoch, D.(2010). Controlling the number of proteins with dip-pen nanolithography. *Advanced materials*, **22**, 352–355.
- [19] Chung, S.-W., Ginger, D. S., Morales, M. W., Zhang, Z., Chandrasekhar, V., Ratner, M. A., & Mirkin, C. A.(2005). Top-down meets bottom-up: dip-pen nanolithography and DNA-directed assembly of nanoscale electrical circuits. *Small*, **1**, 64–69.
- [20] Lord Rayleigh, O. M. F. R. S.(1910). The problem of the whispering gallery. *Philosophical Magazine Series 6*, **20**, 1001–1004.
- [21] Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B.(2001). Click-Chemie : diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie*, **113**, 2056–2075.
- [22] Lutz, J.-F.(2008). Kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen: Erkenntnisse und Perspektiven. *Angewandte Chemie*, **120**, 2212–2214.
- [23] Huisgen, R.(1963). 1.3-Dipolare Cycloadditionen. *Angewandte Chemie*, **75**, 604–637.

- [24] **Gorham, W. F.(1966)**. A new, general synthetic method for the preparation of linear poly-p-xylylenes. *Journal of Polymer Science: Part A-1*, **4**, 3027–3039.
- [25] **Lahann, J., Klee, D., & Hiicker, H.(1998)**. Chemical vapour deposition polymerization of substituted [2.2]paracyclophanes. *Macromolecular Rapid Communications*, **19**, 441–444.
- [26] **Lahann, J.(2006)**. Vapor-based polymer coatings for potential biomedical applications. *Polymer International*, **55**, 1361–1370.
- [27] **Nandivada, H., Chen, H.-Y., Bondarenko, L., & Lahann, J.(2006)**. Reaktive Polymere, die „klicken“. *Angewandte Chemie*, **118**, 3438–3441.
- [28] **Lenhert, S., Sun, P., Wang, Y., Fuchs, H., & Mirkin, C. A.(2007)**. Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small*, **3**, 71–75.
- [29] **Ulrich, A. S., Sami, M., & Watts, A.(1994)**. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. *Biochimica et biophysica acta*, **1191**, 225–230.
- [30] **Binder, H.(2003)**. The molecular architecture of lipid membranes–New insights from Hydration-Tuning Infrared Linear Dichroism Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, **38**, 15–69.
- [31] **Nafday, O. A. & Lenhert, S.(2011)**. High-throughput optical quality control of lipid multilayers fabricated by dip-pen nanolithography. *Nanotechnology*, **22**, 225301.
- [32] **Sekula, S., Fuchs, J., Weg-Remers, S., Nagel, P., Schuppler, S., Fragala, J., Theilacker, N., Franzreb, M., Wingren, C., Ellmark, P., Borrebaeck, C. A. K., Mirkin, C. A., Fuchs, H., & Lenhert, S.(2008)**. Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on subcellular scales for the templating of functional proteins and cell culture. *Small*, **4**, 1785–1793.
- [33] **Rittenhouse, D. & Hopkinson, F.(1786)**. An optical problem, proposed by Mr. Hopkinson, and solved by Mr. Rittenhouse. *Transactions of the American Philosophical Society*, **2**, 201–206.
- [34] **Ebert, H.(1889)**. Zwei Formen von Spectographen. *Annalen der Physik*, **274**, 489–493.
- [35] **Czerny, M. & Turner, A. F.(1930)**. Über den Astigmatismus bei Spiegelspektrometern. *Zeitschrift für Physik*, **61**, 792–797.
- [36] **Fastie, W. G.(1952)**. A small plane grating monochromator. *Journal of the Optical Society of America*, **42**, 641–647.

-
- [37] **Kneubühl, F.(1969)**. Diffraction grating spectroscopy. *Applied optics*, **8**, 505–519.
- [38] **Gaylord, T. & Moharam, M.(1985)**. Analysis and applications of optical diffraction by gratings. *Proceedings of the IEEE*, **73**, 894–937.
- [39] **Homola, J., Koudela, I., & Yee, S. S.(1999)**. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **54**, 16–24.
- [40] **Ranka, J. K., Windeler, R. S., & Stentz, a. J.(2000)**. Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm. *Optics letters*, **25**, 25–27.
- [41] **Birks, T. A., Wadsworth, W. J., & Russell, P. S.(2000)**. Supercontinuum generation in tapered fibers. *Optics letters*, **25**, 1415–1417.
- [42] **Armani, A. M., Kulkarni, R. P., Fraser, S. E., Flagan, R. C., & Vahala, K. J.(2007)**. Label-free, single-molecule detection with optical microcavities. *Science*, **317**, 783–787.
- [43] **Grossmann, T., Schleede, S., Hauser, M., Christiansen, M. B. k., Vannahme, C., Eschenbaum, C., Klinkhammer, S., Beck, T., Fuchs, J., Nienhaus, G. U., Lemmer, U., Kristensen, A., Mappes, T., & Kalt, H.(2010)**. Low-threshold conical microcavity dye lasers. *Applied Physics Letters*, **97**, 063304.
- [44] **Grossmann, T., Hauser, M., Beck, T., Gohn-Kreuz, C., Karl, M., Kalt, H., Vannahme, C., & Mappes, T.(2010)**. High-Q conical polymeric microcavities. *Applied Physics Letters*, **96**, 013303.
- [45] **Armani, A. M., Srinivasan, A., & Vahala, K. J.(2007)**. Soft lithographic fabrication of high Q polymer microcavity arrays. *Nano Letters*, **7**, 1823–1826.
- [46] **Henzi, P., Rabus, D. G., Wallrabe, U., & Mohr, J.(2004)**. Fabrication of photonic integrated circuits by DUV-induced modification of polymers. *Proceedings of SPIE*, **5451**, 24–31.
- [47] **Henzi, P., Rabus, D. G., Wallrabe, U., & Mohr, J.(2004)**. Low-cost single-mode waveguide fabrication allowing passive fiber coupling using LIGA and UV flood exposure. *Proceedings of SPIE*, **5454**, 64–74.
- [48] **Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Sunanda, R. J.(2004)**. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–42.

- [49] **Chen, H.-Y., Hirtz, M., Deng, X., Laue, T., Fuchs, H., & Lahann, J.(2010).** Substrate-independent dip-pen nanolithography based on reactive coatings. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 18023–18025.
- [50] **Nandivada, H., Chen, H.-Y., & Lahann, J.(2005).** Vapor-Based synthesis of poly[(4-formyl-p-xylylene)-co-(p-xylylene)] and its use for biomimetic surface modifications. *Macromolecular Rapid Communications*, **26**, 1794–1799.
- [51] **Lenhert, S., Brinkmann, F., Laue, T., Walheim, S., Vannahme, C., Klinkhammer, S., Xu, M., Sekula, S., Mappes, T., Schimmel, T., & Fuchs, H.(2010).** Lipid multilayer gratings. *Nature nanotechnology*, **5**, 275–279.
- [52] **Rädler, J. O., Koltover, I., Salditt, T., & R., S. C.(1997).** Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, **275**, 810–814.
- [53] **Tristram-Nagle, S., Petrache, H. I., & Nagle, J. F.(1998).** Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, **75**, 917–925.
- [54] **Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J.(1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*, **76**, 4350–4354.
- [55] **Ying, P., Yu, Y., Jin, G., & Tao, Z.(2003).** Competitive protein adsorption studied with atomic force microscopy and imaging ellipsometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **32**, 1–10.
- [56] **Ross, E. E., Spratt, T., Liu, S., Rozanski, L. J., Brien, D. F. O., & Saavedra, S. S.(2003).** Planar supported lipid bilayer polymers formed by vesicle fusion. 2 . Adsorption of bovine serum albumin. *Langmuir*, **19**, 1766–1774.
- [57] **Long, D., Unal, K., Pratt, R., Malkoch, M., & Frommer, J.(2007).** Localized „Click“ chemistry through Dip-Pen Nanolithography. *Advanced Materials*, **19**, 4471–4473.
- [58] **Paxton, W. F., Spruell, J. M., & Stoddart, J. F.(2009).** Heterogeneous catalysis of a copper-coated atomic force microscopy tip for direct-write click chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 6692–6694.
- [59] **Hopf, H.(2008).** [2.2]Paracyclophanes in polymer chemistry and materials science. *Angewandte Chemie*, **47**, 9808–9812.
- [60] **Chen, H.-Y. & Lahann, J.(2011).** Designable biointerfaces using vapor-based reactive polymers. *Langmuir*, **27**, 34–48.

-
- [61] Lahann, J., Balcells, M., Rodon, T., Lee, J., Choi, I. S., Jensen, K. F., & Langer, R.(2002). Reactive polymer coatings : A platform for patterning proteins and mammalian cells onto a broad range of materials. *Langmuir*, **18**, 3632–3638.
- [62] Schürmann, K., Lahann, J., Niggemann, P., Klosterhalfen, B., Meyer, J., Kulislich, A., Klee, D., Günther, R. W., & Vorwerk, D.(2004). Radiology biologic response to polymer-coated stents : In vitro analysis and results in an iliac artery sheep model 1. *Radiology*, **230**, 151–162.
- [63] Best, M. D.(2009). Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*, **48**, 6571–6584.
- [64] Hirtz, M., Corso, R., Sekula-Neuner, S., & Fuchs, H.(2011). Comparative height measurements of dip-pen nanolithography-produced lipid membrane stacks with atomic force, fluorescence, and surface-enhanced ellipsometric contrast microscopy. *Langmuir*, **27**, 11605–11608.
- [65] Eggers, J.(1997). Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows. *Reviews of Modern Physics*, **69**, 865–929.
- [66] Molaes, T. M. E., Balogh, A. G., Cornelius, T. W., Neumann, R., & Trautmann, C.(2004). Fragmentation of nanowires driven by Rayleigh instability. *Applied Physics Letters*, **85**, 5337.
- [67] Gau, H., Herminghaus, S., Lenz, P., & Lipowsky, R.(1999). Liquid morphologies on structured surfaces: from microchannels to microchips. *Science*, **283**, 46–49.
- [68] Tazawa, H., Kanie, T., & Katayama, M.(2007). Fiber-optic coupler based refractive index sensor and its application to biosensing. *Applied Physics Letters*, **91**, 113901.
- [69] Lai, Z., Wang, Y., Allbritton, N., Li, G.-P., & Bachman, M.(2008). Label-free biosensor by protein grating coupler on planar optical waveguides. *Optics letters*, **33**, 1735–7.
- [70] Goh, J. B., Loo, R. W., & Goh, M. C.(2005). Label-free monitoring of multiple biomolecular binding interactions in real-time with diffraction-based sensing. *Sensors and Actuators B*, **106**, 243–248.
- [71] Kung, V. T. & Redemann, C. T.(1986). Synthesis of carboxyacyl derivatives of phosphatidylethanolamine and use as an efficient method for conjugation of protein to liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, **862**, 435–439.
- [72] Ng, K., Zhao, L., Meyer, J. D., Rittmann-Grauer, L., & Manning, M. C.(1997). Use of circular dichroism spectroscopy in determining the conformation of a monoclonal

- antibody prior to its incorporation in an immunoliposome. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **16**, 507–513.
- [73] **Derksen, J. T. & Scherphof, G. L.(1985)**. An improved method for the covalent coupling of proteins to liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, **814**, 151–155.
- [74] **Heeremans, J., Kraaijenga, J., Los, P., Kluft, C., & Crommelin, D.(1992)**. Development of a procedure for coupling the homing device glu-plasminogen to liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, **1117**, 258–264.
- [75] **Salafsky, J., Groves, J. T., & Boxer, S. G.(1996)**. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: a study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, **35**, 14773–14781.
- [76] **Groves, J. T. & Dustin, M. L.(2003)**. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods*, **278**, 19–32.
- [77] **Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y.(2008)**. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Analytica chimica acta*, **620**, 8–26.
- [78] **He, L., Ozdemir, S. K., Zhu, J., Kim, W., & Yang, L.(2011)**. Detecting single viruses and nanoparticles using whispering gallery microlasers. *Nature nanotechnology*, **6**, 428–432.
- [79] **Spillane, S., Kippenberg, T., Painter, O., & Vahala, K.(2003)**. Ideality in a fiber-taper-coupled microresonator system for application to cavity quantum electrodynamics. *Physical Review Letters*, **91**, 2–5.
- [80] **Min, B., Kim, S., Okamoto, K., Yang, L., Scherer, A., Atwater, H., & Vahala, K.(2006)**. Ultralow threshold on-chip microcavity nanocrystal quantum dot lasers. *Applied Physics Letters*, **89**, 191124.
- [81] **Zhu, H., White, I. M., Suter, J. D., Dale, P. S., & Fan, X.(2007)**. Analysis of biomolecule detection with optofluidic ring resonator sensors. *Optics express*, **15**, 9139–9146.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Schematische Darstellung des DPN-Schreibprozesses | 2 |
| 1.2 | Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition | 5 |
| 1.3 | Synthese eines alkinfunktionalisierten Polymeres durch CVD | 6 |
| 1.4 | Bindung von Biotinazid an eine reaktive Polymerschicht | 6 |
| 1.5 | Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin Kopplung auf einer reaktiven Polymerschicht und angeschlossener Visualisierung | 7 |
| 1.6 | Applizierte Lipidstrukturen und ihre Strukturformel | 8 |
| 1.7 | Nachweis der Fluidität von Lipidstrukturen | 9 |
| 1.8 | Regulierung der Multilagenhöhen via Luftfeuchtigkeit und Schreibgeschwindigkeit. | 9 |
| 1.9 | Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Lipidstrukturen | 10 |
| 1.10 | Bestimmung des optimalen molaren Massenanteils von DGS-NTA(Ni) und DOPE-Biotin | 11 |
| 1.11 | Aktivierung von T-Zellen über funktionalisierte Lipidstrukturen | 11 |
| 1.12 | Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines Toroiden aus PMMA. | 13 |
| 3.1 | Cantilever des verwendeten A- und F-Typs | 20 |
| 3.2 | Inkwell C-8MW2 der Firma NanoInk | 20 |
| 3.3 | Schematische Darstellung der Toroid-Herstellung | 22 |
| 3.4 | Schematische Darstellungen des Aufbaues zur Detektion der Emission | 24 |
| 4.1 | Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der DPN auf reaktiven Polymerschichten | 27 |
| 4.2 | Applizierte Alexa Fluor [®] 555-Azid Strukturen auf reaktiver Polymerschicht | 28 |
| 4.3 | Fluoreszenzaufnahmen der applizierten Alexa Fluor [®] 555-Aziden auf unterschiedlichen mit Polymer beschichteten Substraten. | 29 |
| 4.4 | Nachweis der spezifischen Bindung der Azide | 30 |
| 4.5 | Bindung von Streptavidin-Gold-Nanopartikel an biotinylierten Strukturen | 31 |
| 4.6 | Fluoreszenzaufnahme von Streptavidin-Alexa 488 biotinylierten Strukturen | 31 |
| 4.7 | Schematische Darstellung der Generierung von Beugungsgitter mittels DPN und ihrer Funktionsweise | 32 |
| 4.8 | Beugung an Lipid-Beugungsgittern mit unterschiedlichen Periodizitäten | 33 |
| 4.9 | Korrelation der Beugungsgitterhöhe mit der Intensität des gebeugten Lichtes | 34 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.10 | Interkalation von fluoreszent markierten Streptavidin in Lipid-Strukturen unterschiedlicher Höhe | 35 |
| 4.11 | Fluoreszenzaufnahmen eines fluoreszenten Lipid-Beugungsgitters nach Passivierung mit BSA-Alexa 488 | 36 |
| 4.12 | Intensitätsveränderung von Lipid-Beugungsgitter unterschiedlicher Höhe auf die Zugabe von 50 nM Streptavidin | 37 |
| 4.13 | Entnetzungseffekt von Lipid-Beugungsgitterlinien durch Analytbindung | 38 |
| 4.14 | Erweitertes schematisches Modell der Bindungsreaktion von Lipid-Gitterlinien auf Analytzugabe | 38 |
| 4.15 | Veränderung der Beugungsgitter durch Streptavidin-Zugabe (50 nM) | 39 |
| 4.16 | Veränderung der Beugungsgitter durch Streptavidin-Zugabe (500 nM) | 39 |
| 4.17 | Verlauf der Intensitätsveränderung des gebeugten Lichts auf Analytzugabe unterschiedlicher Konzentrationen | 40 |
| 4.18 | Verlauf der Intensitätsveränderung des gebeugten Lichts auf Analytzugabe in fötalem Kälberserum | 41 |
| 4.19 | Reversibilität der Beugungsfähigkeit von Lipid-Beugungsgittern | 42 |
| 4.20 | Integration von Lipid-Beugungsgitter in vorstrukturierte Substrate | 43 |
| 4.21 | Schematische Darstellungen des DPN-Strukturierungsprozesses und ihres Wirkungsprinzips | 45 |
| 4.22 | Mikroskopaufnahmen funktionalisierter Toroide nach Streptavidin Anbindung | 46 |
| 4.23 | Funktionsweise des funktionalisierten Toroids als Laser | 47 |
| 4.24 | Detektion von Streptavidin mittels funktionalisierter Toroide | 49 |
| 4.25 | Zeitlicher Verlauf der spektralen Verschiebung der detektierten Emission biotinylierter Toroide auf Zugabe von 50 nM und 500 nM Streptavidin | 50 |
| 4.26 | Verwendung verschiedener fluoreszenter Lipid-Tinten zur Funktionalisierung von Toroiden | 50 |
| 5.1 | Schematische Darstellung der Ein-und Auskopplung an einem Toroid mittels Glasfaser | 58 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|------------------------|--|----|
| <i>AFM</i> | Atomic force microscope | 1 |
| <i>Biotin – Azid</i> | PEG4 carboxamide-6-azidohexanyl biotin | 30 |
| <i>BSA</i> | Bovines Serumalbumin | 46 |
| <i>CVD</i> | Gasphasenausscheidung: eng.=chemical vapor deposition | 5 |
| <i>Dansyl</i> | 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid | 51 |
| <i>DGS – NTA(Ni)</i> | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid) succinyl] | 10 |
| <i>DOPC</i> | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | 7 |
| <i>DOPE – Biotin</i> | 1,2- dipalmitoyl- sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap Biotinyl) | 10 |
| <i>DOPE – NBD</i> | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) | 8 |
| <i>DOPE – Rhodamin</i> | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) | 8 |
| <i>DPN</i> | Dip-Pen Nanolithography | 1 |
| <i>DPVAB</i> | 1,4-Bis[2-[4-[N,N-di(p-tolyl)amino]phenyl]vinyl]benzene | 51 |
| <i>FCS</i> | Fötale Kälberserum | 40 |
| <i>His – GFP</i> | Green fluorescent protein, N-terminal mit Histidin Kette markiert | 10 |
| <i>L – DPN</i> | Lipid Dip-Pen Nanolithography | 7 |
| <i>ODT</i> | 1-Octadecanethiol | 2 |
| <i>PBS</i> | Phosphatgepufferte Salzlösung | 21 |
| <i>PDMS</i> | Poly(dimethylsiloxan) | 29 |
| <i>PMMA</i> | Poly(methyl methacrylat) | 29 |
| <i>PTFE</i> | Poly(tetrafluoroethylen) | 29 |
| <i>MHA</i> | Mercapto-hexadecanoic-acid | 3 |
| <i>NBD</i> | Nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl | 8 |
| <i>Rhodamin</i> | 9-(2-Carboxyphenyl)-3,6-bis(diethylamino)xanthyliumchlorid | 8 |
| <i>STV – Cy3</i> | Streptavidin mit Cy3 markiert | 10 |
| <i>TIRF</i> | Totale interne Reflektion | 38 |
| <i>TRITC</i> | Tetramethylrhodaminisothiocyanat | 7 |

Publikationen/Patente/Konferenzen

Publikationen:

Chen, H.-Y., Hirtz, M., Deng, X., Laue, T., Fuchs, H., und Lahann, J.(2010). Substrate-independent dip-pen nanolithography based on reactive coatings. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 18023–18025.

Lenhert, S., Brinkmann, F., Laue, T., Walheim, S., Vannahme, C., Klinkhammer, S., Xu, M., Sekula, S., Mappes, T., Schimmel, T., & Fuchs, H.(2010). Lipid multilayer gratings. *Nature nanotechnology*, **5**, 275–279.

Eingereicht:

Bog, U., Laue, T., Grossmann, T., Beck, T., Wienhold, T., Hirtz, M., Fuchs, H., Lemmer, U., Kalt, H. und Mappes, T.(2012). Microlasers for biosensing by highly localized multipurpose surface functionalization.

Patente:

Verfahren und Verwendung eines optischen Gitters zum Nachweis des Vorhandenseins von Molekülen

Offenlegung: 11.11.2010

DE 102009019717A1

WO 2010/127780 A1

Konferenzen:

NanoBio-Europe 2010 (Münster) 15-17.06.2010

Poster: Lipid Multilayer gratings. Laue, T., Lenhert, S., Brinkmann, F., Walheim, S., Fuchs, H..

Advanced atomic force Microscopy techniques (Eggenstein-Leopoldshafen) 01-02.03.2010

CFN Summer School on Nano-Biology 2009 (Bad-Herrenalb) 07-11.09.2009

Poster: pH dependant formation of spread supported lipid bilayer arrays formed by multiplexed lipid dip-pen nanolithography. Laue, T., Nguen, K., Sanii, B., Xu, M., Franz, C., Fuchs, H., Parikh, A., Lenhert, S..

Linz Winter Workshop (Linz) 06-09.02.2009

Poster: pH dependant formation of spread supported lipid bilayer arrays formed by multiplexed lipid dip-pen nanolithography. Laue, T., Nguen, K., Sanii, B., Xu, M., Franz, C., Fuchs, H., Parikh, A., Lenhert, S..

Nanobiology Workshop (Eggenstein-Leopoldshafen) 01.12.2008

Organisation& Arbeitspräsentation

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Fuchs für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, sowie die Möglichkeit auf diesem Gebiet der Nanotechnologie zu arbeiten bedanken und ebenso bei Prof. Dr. Bastmeyer für seine Bereitschaft für mich als Doktorvater zu fungieren.

Ebenso gilt Dr. Steven Lenhert mein Dank, da ich ohne ihn wahrscheinlich gar nicht in dieses Arbeitsfeld gekommen wäre, als auch für die Betreuung während der ersten Jahre meiner Promotion.

Besonderer Dank gilt meiner Arbeitskollegin und Büromitbewohnerin Dr. Sylwia Sekula-Neuner, die mir während meiner Promotion immer mit Rat und Tat, sowie kritischen Diskussionen zur Seite stand.

Falko Brinkmann und Uwe Bog für die zahlreichen Kaffee-Diskussionsrunden, sowie die hervorragende Zusammenarbeit an den verschiedenen Projekten.

Dr. Dr. Michael Hirtz für die Fortführung meiner Betreuung, der Zusammenarbeit an gemeinsamen Projekten, sowie seinem unermüdlichen Einsatz bei der Korrektur meiner Arbeit.

Allgemeiner formuliert möchte ich meinen Arbeitskollegen für das professionelle und doch familiäre Umfeld danken, durch welches sich meine Arbeit mit Freude und Erfolg gestaltete.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des INTs für die Zusammenarbeit bedanken, sowie auch bei einigen ganz besonders: Markus Moosmann für seine Unterstützung/Diskussionen bei Fragen rund ums AFM, Dr. Stefan Walheim für seine Zusammenarbeit und konstruktiven Ideen bei unserer gemeinsamen Veröffentlichung, Steffen Haag, Markus Merklinger und Uwe Grosskinsky für die exzellente IT-Betreuung, Lothar Sinn und Albert Schmitt für ihren Einsatz Rund ums Labor und vor allem bei Erika Schütze für ihre Unterstützung bei diversen bürokratischen „Hindernissen“, als auch für manch Mittagspausen-Gespräch, das einem vom Alltag ablenkte.

Dr. Martin Peschel (Nikon) und Dr. Andreas Bergner (LOT) für die Unterstützung und schnelle Hilfe bei Problemen mit unseren Mikroskopen oder DPN-Geräten.

Dem KNMF, für die finanzielle Unterstützung bei verschiedenen Projekten und vorallem durch die Schaffung dieser Plattform, wodurch der Kontakt und die Kooperation mit anderen Wissenschaftlern wesentlich gefördert wurde.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und vor allem meiner Mutter, für ihre bedingungslose Unterstützung und Aufmunterungen, ohne die ich das Studium und diese Promotion niemals bewältigt hätte. Ebenfalls meiner Freundin Ramona Hahn für ihre Geduld und ihr Rückhalt während der letzten Jahre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------------|-------------------|
| Name, Vorname: | Laue, Thomas |
| Geburtsdatum: | 20.08.1978 |
| Geburtsort: | Karlsruhe |
| Familienstand: | ledig |
| Nationalität: | deutsch |
| Akademischer Grad: | Diplom-Biologe |
| Kontakt: | thomaslaue@gmx.de |

Bildungsweg

| | |
|-------------------------|--|
| Seit 01.06.2008 | Doktorand am INT(KIT) |
| SS2003 – SS2007 | Diplomstudiengang Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg HF:Molekularbiologie NF: Zellbiologie & Zoologie Abschlussnote:1,6 |
| WS00/01 – WS02/03 | Vordiplom des Diplomstudiengangs Biologie an der Universität Karlsruhe(TH) Abschlussnote:1,9 |
| WS99/00 – SS00 | Diplomstudiengang Informatik an der Universität Karlsruhe(TH) nicht abgeschlossen |
| 03.08.1998 – 31.08.1999 | Ableistung des Zivildienstes beim mobilen sozialen Dienst der Arbeiterwohlfahrt |
| 05.07.1989 – 26.06.1998 | Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Neureut (Baden-Württemberg) Abschlussnote: 2,0 |

Nebentätigkeit

| | |
|-------------------------|---|
| 01.10.2002 – 30.09.2003 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut der Botanik II der Universität Karlsruhe(TH) |
|-------------------------|---|

Erklärung des Verfassers

Ich versichere, dass ich die Doktorarbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich an die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung gehalten habe. Alle Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Das Gleiche gilt auch für die beigegebenen Zeichnungen, Skizzen und Darstellungen.

Karlsruhe, den 14. Januar 2013

Thomas Laue