

Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist an der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt (<http://www.ub.tuwien.ac.at>).

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology (<http://www.ub.tuwien.ac.at/englweb/>).



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN  
Vienna University of Technology

## DIPLOMARBEIT

# OPTISCHE WELLENLEITERSPEKTROSKOPIE AN EINEM BIOMIMETISCHEN MEMBRANSYSTEM

ausgeführt am

INSTITUT FÜR FESTKÖRPERPHYSIK  
**der Technischen Universität Wien**

in Kooperation mit

AIT AUSTRIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY GMBH

unter der Anleitung von

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Christoph Eisenmenger-Sittner

und

Dr. Asmorom Kibrom

durch

Stefan Tatra

Hietzinger Hauptstraße 38E/2

1130 Wien

WIEN, AM 16. JULI 2012

---



## Zusammenfassung

Gegenstand dieser Diplomarbeit war der Aufbau eines Setups, mit dessen Hilfe optische Wellenleiterspektroskopie am Membranprotein Cytochrom c Oxidase (CcO) simultan mit elektrochemischen Untersuchungen durchgeführt werden können. Durch Optische Wellenleiterspektroskopie wurde die Anbindung des Proteins an ein Substrat sowie die Bildung der Doppellipidmembran gezeigt. Die elektrochemischen Untersuchungen dienen einerseits dazu, direkten Elektronentransfer vom Protein zur Probe nachzuweisen und andererseits zum Nachweis der Bildung einer Doppellipidmembran mit einer von optischer Wellenleiterspektroskopie unabhängigen Methode. Dazu benötigt man eine Oberfläche, die sowohl transparent, als auch leitfähig ist. Eine Möglichkeit das zu bewerkstelligen ist, Tantalpentoxid als Wellenleitermaterial zu verwenden, und darauf eine leitfähige Schicht aufzubringen. Hierfür kommen nur transparente Halbleiter oder ultradünne Goldschichten in Frage. Es werden elektrochemische Untersuchungen von Indium Zinn Oxid (ITO), Aluminium dotiertem Zink Oxid (AZO) und Gold durchgeführt, um die Eignung der Materialien in Bezug auf die Untersuchung direkten Elektronentransfers zu testen. Weiters werden die Dicke und der Brechungsindex von Tantalpentoxid Schichtwellenleitern mittels optischer Wellenleiterspektroskopie bestimmt. Dieser Schichtwellenleiter wird funktionalisiert, CcO wird an die Oberfläche angebunden und eine Protein verankerte Doppellipidmembran bildet sich. Dieses Schichtsystem wird wiederum mittels optischer Wellenleiterspektroskopie charakterisiert. In einem letzten Schritt werden die CcO Anbindung und die Bildung der Doppellipidmembran auch auf elektrochemischen Weg gezeigt.

# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eisenmenger-Sittner, für die Übernahme der Betreuung dieser Diplomarbeit seitens der TU-Wien.

Weiters danke ich Herrn Dr. Asmorom Kibrom für die Betreuung am AIT. Er hat mich bei meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt.

Besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Nowak am AIT für das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke der Fachschaft Physik dafür, dass sie mir lange Jahre meines Studiums ein zweites Zuhause war. Ich habe dort nicht nur Physik sondern auch mehr als irgendwo sonst über das Leben gelernt.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht und finanziert haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Optik evaneszenter Wellen . . . . .	1
1.2	Biologische und künstliche Membrane . . . . .	2
1.3	ptBlm und Cytochrom c Oxidase . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>7</b>
2.1	Elektromagnetische Wellen in Materie . . . . .	7
2.2	Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen . . . . .	8
2.3	Wellenleiter . . . . .	11
2.4	Gitterkopplung . . . . .	14
2.5	Elektrochemie . . . . .	17
2.5.1	Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) . . . . .	17
2.5.2	Cyklovoltametrie (CV) . . . . .	21
2.5.3	Halbleiter, Flachbandpotential und Mott-Schottky Plot . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Messergebnisse und Diskussion</b>	<b>26</b>
3.1	Elektrochemie von transparenten leitfähigen Schichten . . . . .	26
3.1.1	Indium Zinn Oxid . . . . .	27
3.1.2	Aluminium dotiertes Zinkoxid . . . . .	29
3.1.3	Goldbeschichtetes Aluminium dotiertes Zinkoxid . . . . .	35
3.1.4	Gold . . . . .	37
3.1.5	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	38
3.2	Nachweis der Protein verankerten Doppellipidmembran auf Tantalpentoxid mittels Elektrochemischer Impedanz Spektroskopie . . . . .	39
3.3	Optische Wellenleiterspektroskopie . . . . .	40
3.3.1	Charakterisierung der Tantalpentoxidschicht . . . . .	40
3.3.2	Anbindung von Cytochrom c Oxidase und Bildung der Protein verankerten Doppellipidschicht auf Tantalpentoxid . . . . .	46
3.3.3	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	49

3.4	Messungen auf einem Tantalpentoxid-Gold Schichtsystem . . . . .	50
3.4.1	Optische Messungen . . . . .	50
3.4.2	Elektrochemie Messungen . . . . .	52
3.4.3	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>54</b>
	<b>Anhang</b>	<b>57</b>
A.1	Begriffserklärung . . . . .	57
A.2	Messzelle . . . . .	59

# 1 Einleitung

## 1.1 Optik evaneszenter Wellen

Die Detektion evaneszenter Wellen ist eine etablierte Technik zur Untersuchung der Anhaftung dünner Schichten an Oberflächen. Sie funktioniert nach dem Prinzip, dass eine an einem optisch dünneren Medium total reflektierte Welle an der Grenzfläche nicht abrupt abbricht, sondern ein exponentiell abfallender Anteil in das optisch dünnere Medium eindringt. Diese exponentiell abfallenden Wellen werden evaneszente Wellen genannt. Sie reagieren sehr sensitiv auf Brechungsindexänderungen oder Schichtdickenänderungen an der Grenzfläche auf Seiten des dünneren Mediums. Deshalb basieren viele markerfreie Biosensoren (Label free Biosensors) auf dem Prinzip evaneszenter Wellen. Eine der am häufigsten eingesetzten evaneszent-optischen Methoden ist der SPR (Surface Plasmon Resonance)-Sensor (siehe z.B. [1]). Hierbei ist eine dünne Goldschicht auf ein Glassubstrat aufgebracht. Bei Einstrahlung eines Lichtstrahls in einem definierten Einfallswinkel (Plasmonen Resonanzwinkel) werden an der Grenzschicht zwischen Gold und Dielektrikum im Gold Oberflächenplasmonen angeregt. Eine andere Methode zur Detektion evaneszenter Wellen ist Optische Wellenleiterspektroskopie (OWS) mittels eines planaren Schichtwellenleiters. Dieser besteht aus drei Schichten (Substrat, Kern und Deckschicht). Damit sich Lichtstrahlen im Wellenleiter ausbreiten können (elektromagnetische Wellenleitermoden) muss der Brechungsindex des Kerns größer sein als die Brechungsindizes des Substrates und der Deckschicht. Die Anzahl der geführten Moden hängt von der Dicke des Kerns sowie von den Brechungsindizes aller drei Schichten ab [2, 3].

Der Vorteil des SPR-Sensors gegenüber OWS ist, dass durch die Leitfähigkeit der Probenoberfläche elektrochemische Messungen simultan zu optischen Messungen durchgeführt werden können. Man ist jedoch in der Wahl der optischen Wellenlängen eingeschränkt, da der Extinktionskoeffizient  $\kappa$  (Imaginärteil des Brechungsindex) von Gold wellenlängenabhängig und nicht vernachlässigbar klein ist. So gilt beispielsweise für 632,8 nm Wellenlänge  $\kappa = 3,4$ , während für 800 nm Wellenlänge bereits  $\kappa = 4,9$  gilt [4]. Aus dem selben Grund sind Fluoreszenzmessungen mit fluoreszierenden Farbstoffen nahe an der Probenoberfläche komplexer. Ein weiterer

Nachteil bei SPR Spektroskopie ist, dass die Anregung der Oberflächenplasmonen nur mit parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht (transversal magnetische Polarisation, TM) möglich ist. Dadurch kann die Probendicke beziehungsweise die Dicke der anhaftenden Schicht nicht gleichzeitig mit dem Brechungsindex der Probe exakt bestimmt werden. Hierfür ist die Messung von mindestens zwei optischen Moden nötig. OWS hat den Vorteil, dass Wellenleitermoden sowohl mit parallel (TM) als auch senkrecht zur Einfallsebene polarisiertem Licht (transversal elektrische Polarisation, TE) angeregt werden können, weshalb gleichzeitig die Dicke und der Brechungsindex der untersuchten Proben bestimmt werden können. Da der Wellenleiter transparent sein muss, ist es möglich, Absorptionsspektroskopie Messungen durchzuführen [5]. Ein großer Nachteil der OWS ist jedoch, dass transparente Materialien meist nicht elektrisch leitfähig sind, weshalb simultan zu OWS Messungen in der Regel keine elektrochemischen Untersuchungen durchgeführt werden können. Ein Ausweg sind Wellenleiter aus transparenten oxidischen Halbleitern. Diese haben jedoch einen vergleichsweise großen Extinktionskoeffizienten, was eine geringere Sensitivität des Wellenleiters zur Folge hat.

Deshalb wurden in dieser Arbeit Wellenleiter mit geringem Extinktionskoeffizienten untersucht, welche mit einem transparenten, leitfähigen Material beschichtet wurden. Dieses Material musste so dünn wie möglich sein, um eine möglichst hohe Sensitivität des Wellenleiters gegen Brechzahländerungen an der Probenoberfläche zu gewährleisten.

## 1.2 Biologische und künstliche Membrane

Zellmembranen bestehen im Wesentlichen aus einer Lipid-Doppelschicht, die alle lebenden Zellen umhüllt. Sie enthält eine Vielzahl an biologischen Molekülen, hauptsächlich Lipide und Proteine. Die Lipide der Zellmembranen sind amphiphil, das bedeutet, sie bestehen aus hydrophoben und hydrophilen Anteilen. Membranproteine sind in die Zellmembran eingebettet. Es gibt verschiedene Arten von Membranproteinen. Proteine, die in die Membran integriert sind, nennt man Integrale Membranproteine. Falls sie dabei die gesamte Membran überspannen, wie beispielsweise CcO, werden sie Transmembranproteine genannt [6]. Untersuchungen von Membranproteinen erweisen sich aufgrund deren amphiphilen Charakters als kompliziert. Werden sie in Lösung aufbewahrt, müssen sie mit einem Detergens stabilisiert werden, damit sie nicht denaturieren. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene künstliche Membransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen entwickelt.

Ein häufig verwendetes System sind Proteoliposomen [7, 8], das bedeutet, gelöste

Membranproteine werden in eine künstliche sphärische Doppellipidschicht eingebaut, welche die natürliche Umgebung des Proteins imitiert. Das Membranpotential sowie die Lösungsmittelkonzentration im inneren Kompartiment können mit diesem System nicht kontrolliert werden.

Mit Hilfe von Black Lipid Membranes (BLM), welche als frei schwebende Membrane Zugriff auf beide Seiten der Membran erlauben, können diese Nachteile umgangen werden [9]. BLMs haben jedoch eine geringere mechanische Stabilität.

Festkörpergestützte Membrane (solid supported Bilayer Lipid Membrane, sBLM) sind auf einem meist planarem Substrat aufgebracht. Daher sind simultan oberflächenanalytische und elektrochemische Messmethoden möglich [10]. Sie zeichnen sich im Vergleich zu den bisher genannten Systemen durch eine hohe mechanische Stabilität aus. Ein klarer Nachteil im Vergleich zur natürlichen Zelle ist jedoch der kleine Submembranraum, weshalb nur ein sehr kleines Ionenreservoir zur Verfügung steht. Außerdem können Membranproteine mit großen Einheiten außerhalb des Membranraums nicht in die Membran eingebaut werden beziehungsweise verlieren ihre Funktionalität. Eine Weiterentwicklung davon sind verankerte Lipid-Membrane (thethered Bilayer Lipid Membranes, tBLM). Hier steht ein hinreichend großer Submembranraum zur Verfügung, welcher als Ionenreservoir dient, und vielen Membranproteinen die Inkorporation in die Membran erlaubt [11–14]. Große und unflexible Membranproteine können dennoch in ihrer Funktionalität eingeschränkt werden, da die Membran unflexibel an die Oberfläche angebunden wird.

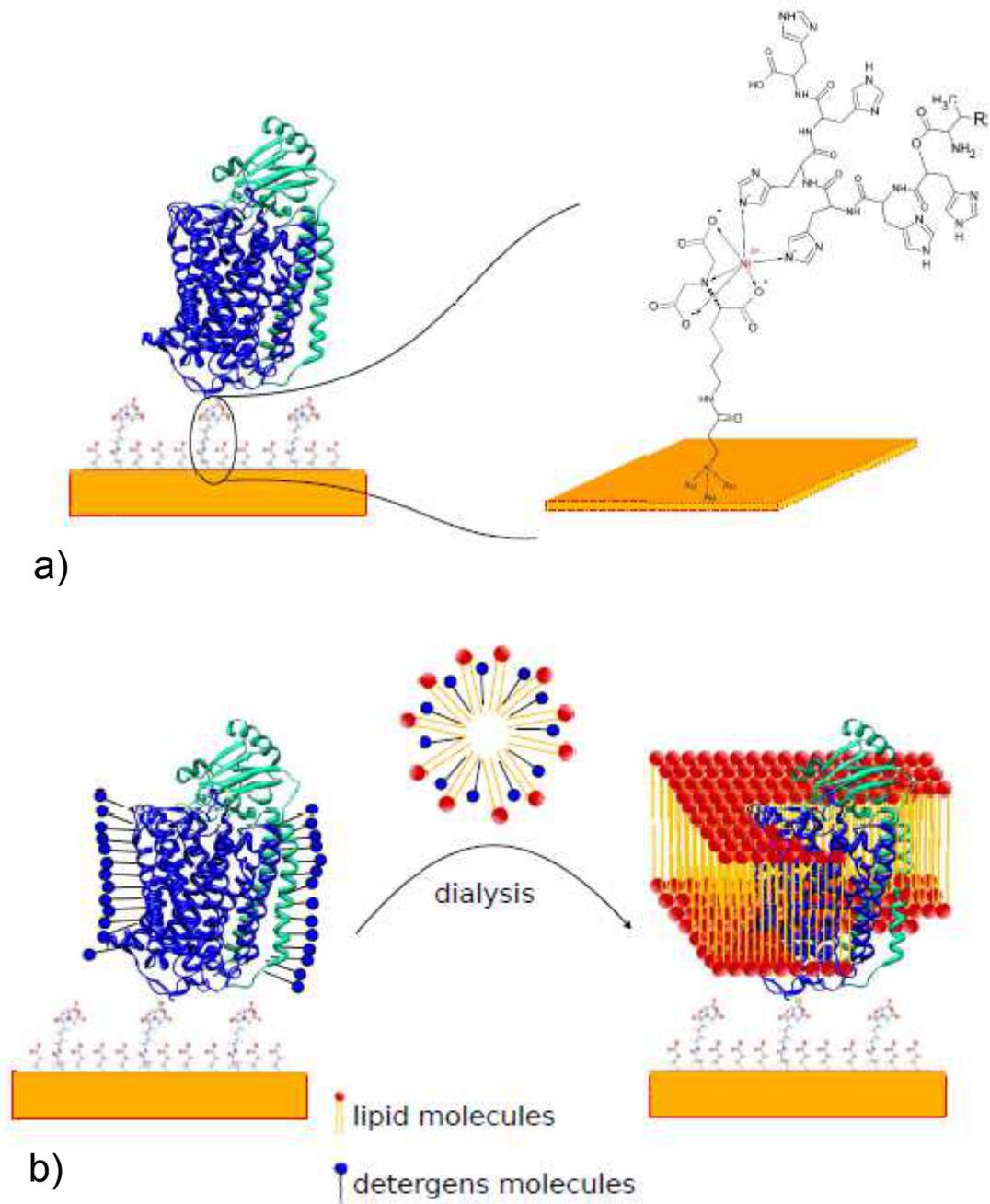
Bei Protein verankerten Doppellipidmembranen (protein-thethered Bilayer Lipid Membranes, ptBLM) definiert das Membranprotein selbst die Größe des Submembranraums, da der Anker am Protein angebunden ist [1]. Dieses System kommt in dieser Arbeit zum Einsatz.

### 1.3 ptBlm<sup>1</sup> und Cytochrom c Oxidase

Bei der Protein verankerten Doppellipidmembran ist ein Ankermolekül direkt an das Protein angebunden. Der Anker ist ein sogenannter His-Tag, der an rekombinante Proteine angefügt wird. Zwei Histidin-Reste bilden hierbei einen Komplex mit einem Ni<sup>2+</sup>-Ion. Die anderen Bindungsstellen dieses Komplexes werden durch die Endgruppe eines Nitrolotriessigsäure (NTA) Restes besetzt. Dieser NTA Rest wird durch ein Thiol auf einer Goldoberfläche immobilisiert (siehe Abb. 1.1a). Die angebundene Proteinschicht wird durch *in-situ* Dialyse in eine Membran rekonstituiert (siehe Abb. 1.1b).

---

<sup>1</sup>protein thethered Bilayer lipid Membrane, Proteinverankerte Doppellipidschicht



**Abbildung 1.1:** a) Oberflächenfunktionalisierung auf Gold für die Immobilisierung von CcO.  
 b) Schematische Darstellung der Rekonstitution von CcO in eine ptBlm durch *in-situ* Dialyse. Quelle: [15]

In dieser Arbeit wurde CcO jedoch nicht nur an Gold, sondern auch an Tantalpentoxid angebunden. Der Unterschied in der Anbindungschemie besteht darin, dass auf oxidischen Oberflächen statt mit einem Thiol mit einem Silan angebunden wird. Vorteil der ptBLM gegenüber allen anderen bisher beschriebenen künstlichen Membransystemen ist, dass Proteine in definierter Orientierung auf einer Oberfläche immobilisiert werden können. Die Orientierung wird durch die Lage des His-Tags bestimmt, welcher an zwei unterschiedlichen Stellen im Protein angebracht werden kann [6]. Ist der His-Tag am C-Terminus in Untereinheit II angebracht, ist direkter Elektronentransfer zwischen Arbeitselektrode und Protein möglich. Ist der His-Tag jedoch im N-Terminus in Untereinheit I angebracht, so ist Elektronentransfer zwischen CcO und einer in Puffer gelösten Redoxspezies möglich. Das Ortsspezifische Anbringen eines His-Tags an CcO ist in [16] beschrieben.

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen. Die Komplexe I-IV bilden dabei die Elektronentransferkette. CcO ist der letzte Komplex der Elektronentransferkette (Komplex IV). Er ist verantwortlich für die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Die Reaktion läuft folgendermaßen ab: Auf jedes an der Reaktion beteiligte Sauerstoffmolekül werden vier Elektronen von Cytochrom c und vier Protonen aus der wässrigen Umgebung übertragen (siehe Abb. 1.2). Vier

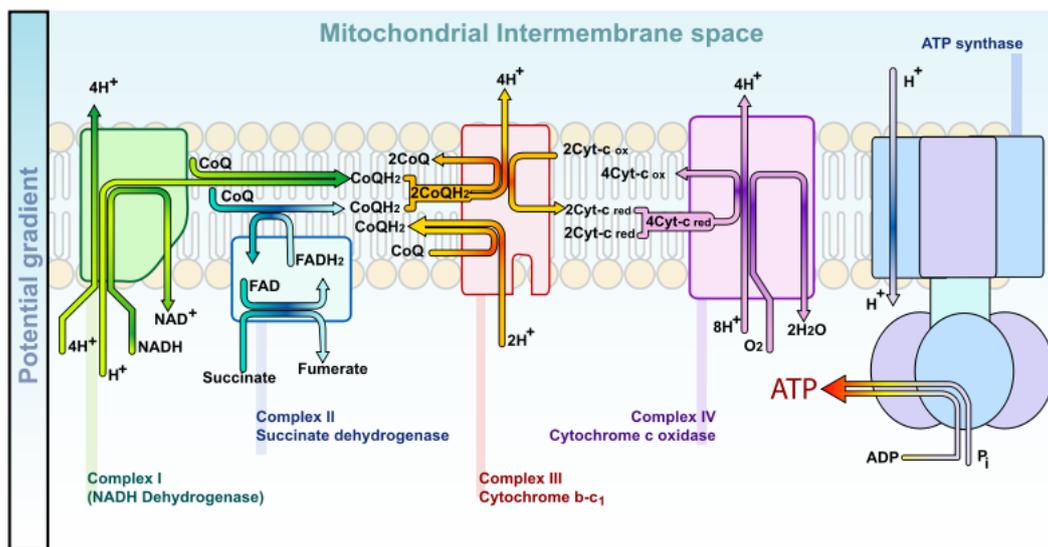


Abbildung 1.2: Die Mitochondriale Atmungskette Quelle: [17]

weitere Protonen werden zusätzlich durch die Membran gepumpt, um den elektrochemischen Potentialgradienten aufzubauen: [17, 18]



$H_i^+$  sind hier die Protonen, die innerhalb der Mitochondrien beziehungsweise Bakterien aufgenommen werden,  $H_o^+$  sind die Protonen, die außerhalb abgegeben werden. In CcO befinden sich vier Redoxzentren, nämlich  $Cu_A$ , Häm<sub>a</sub>, Häm<sub>a3</sub> und  $Cu_B$ , wobei letztere beide gemeinsam auch als Katalytisches Zentrum bezeichnet werden, da hier die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert wird [19, 20]. Der Elektronentransfer läuft sequenziell ab: Cytochrom c, welches sich außerhalb der Membran befindet, gibt Elektronen an  $Cu_A$ , welches das erste der vier Redoxzentren ist. Anschließend werden die Elektronen an das nächste Redoxzentrum, Häm<sub>a</sub>, übertragen. Zuletzt erreichen die Elektronen das katalytische Zentrum Häm<sub>a3</sub>- $Cu_B$ .

Da die Struktur der Untereinheiten bakterieller Atmungskettenenzyme einfacher ist, als die mitochondrialer Proteine, und zudem bakterielle Systeme einfacher genetisch verändert werden können [21], wurde in dieser Arbeit CcO aus *Paracoccus denitrificans* verwendet, welche aus vier Untereinheiten besteht. Im Gegensatz dazu besteht die CcO aus Rinderherzmitochondrien aus 13 Untereinheiten. Da bakterielle CcO starke Homologien zu eukariotischem (Eukarioten = Lebewesen, deren Zellen einen Zellkern besitzen) CcO aufweist, und die prokariotische (Prokarioten = Lebewesen, deren Zellen keinen Zellkern besitzen) Atmungskette gleich funktioniert wie die eukariotische mitochondriale Atmungskette, können die Ergebnisse der Untersuchungen an bakteriell gewonnener CcO auf eukariotische Organismen übertragen werden [21–23].

## 2 Theoretische Grundlagen

Im diesem Kapitel werden kurz die theoretischen Grundlagen zu den verwendeten experimentellen Messmethoden erläutert. Eine ausführliche Betrachtung der Thematik kann man in [24] und [25] nachlesen.

### 2.1 Elektromagnetische Wellen in Materie

Zunächst betrachten wir elektromagnetische Wellen in Materie. Für den Fall, dass keine freien Ladungsträger und Ströme vorhanden sind, gelten folgende Gleichungen (Maxwellgleichungen):

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E}(\vec{r}, t) = 0 \quad (2.1)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\mu_r \mu_0 \frac{\partial \vec{H}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (2.2)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H}(\vec{r}, t) = 0 \quad (2.3)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (2.4)$$

$\mu_0$  ist hierbei die Permeabilität des Vakuums,  $\epsilon_0$  die Dielektrizität des Vakuums und es gilt  $\mu_0 \epsilon_0 = \frac{1}{c_0^2}$ , wobei  $c_0$  die Vakuumlichtgeschwindigkeit ist.  $\mu_r$  und  $\epsilon_r$  beschreiben die materialabhängige Permeabilität und Dielektrizität.  $\vec{E}$  und  $\vec{H}$  beschreiben hier die elektrische beziehungsweise magnetische Feldstärke. Setzt man nun im folgenden  $\mu_r = 1$ , was eine gute Näherung ist, da nicht mit ferromagnetischen Materialien gearbeitet wurde, so erhält man die dispersionsfreien Wellengleichungen

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E} - \frac{1}{c_0^2} \epsilon_r \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (2.5)$$

und

$$\vec{\nabla}^2 \vec{H} - \frac{1}{c_0^2} \epsilon_r \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \quad (2.6)$$

mit den ebenen Wellen

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} \quad (2.7)$$

und

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}_0 e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} \quad (2.8)$$

als spezielle Lösungen der partiellen Differentialgleichung, wobei  $\vec{k}$  der Wellenvektor (zeigt in Ausbreitungsrichtung der Welle mit  $|\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda}$  und Wellenlänge  $\lambda$ ) und  $\omega$  die Kreisfrequenz ist [26].

## 2.2 Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen

Während sich elektromagnetische Wellen im Vakuum immer mit  $c_0$  ausbreiten, propagieren sie in dispersionsfreien Medien mit der Geschwindigkeit  $c = \frac{c_0}{n}$ . Hierbei bezeichnet  $n$  den reellen Anteil des Brechungsindex  $\tilde{n} + i\kappa$  und wird durch  $n = \sqrt{\epsilon_r}$  berechnet. Wir betrachten zunächst elektromagnetische Wellen an Grenzflächen zwischen zwei Materialien mit unterschiedlichem Brechungsindex. Trifft ein Strahl auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex, so teilt er sich in einen transmittierten und einen reflektierten Anteil. Das Medium, in dem der einfallende und der reflektierte Strahl verlaufen, habe den Brechungsindex  $n_1$ , das Medium, in dem der transmittierte Strahl verläuft, habe den Brechungsindex  $n_2$ . Beschränken wir unsere Betrachtung auf homogene isotrope Medien, das bedeutet  $n_1$  und  $n_2$  sind konstant, gilt: Einfallswinkel des einfallenden Strahls = Austrittswinkel des reflektierten Strahls. Für den einfallenden und den transmittierten Strahl gilt das Snelliussche Gesetz:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \quad (2.9)$$

Wie man in Abb.2.1 und 2.2 sieht werden die Winkel gegen die Flächennormale der Grenzfläche gemessen.

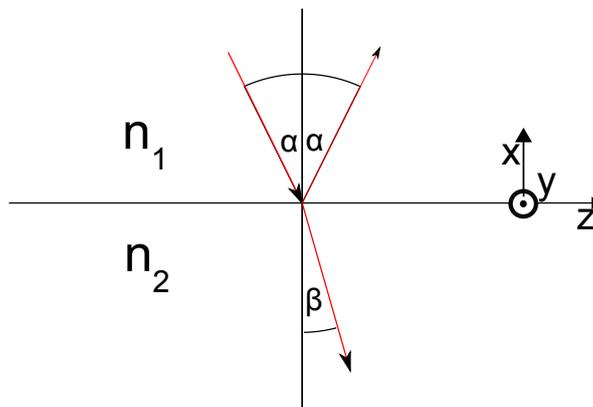
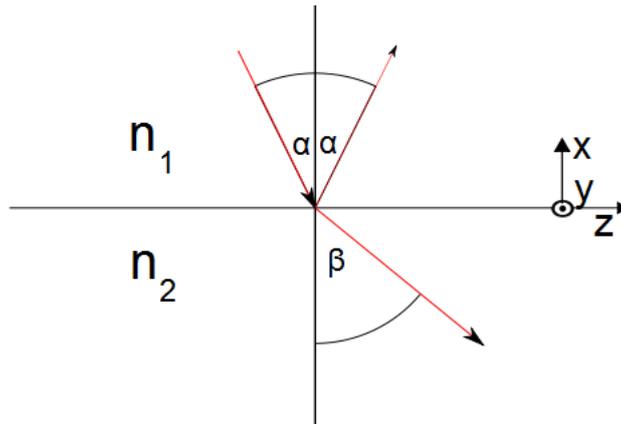


Abbildung 2.1: Snelliussches Brechungsgesetz für  $n_1 < n_2$

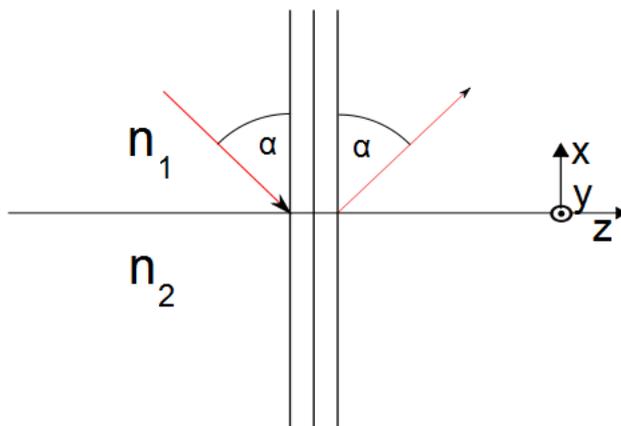


**Abbildung 2.2:** Snelliussches Brechungsgesetz für  $n_1 > n_2$

Der transmittierte Anteil des Strahls wird also für  $n_1 < n_2$ , bei Eintritt aus einem optisch dünneren Medium in ein optisch dichteres Medium zum Lot hin gebrochen und für  $n_1 > n_2$ , bei Eintritt aus einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium, vom Lot weg gebrochen. [27] Beim Eintritt aus einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium kann es zum Spezialfall der Totalreflexion kommen. Diese tritt ab einem bestimmten Einfallswinkel  $\phi_g$  (= Grenzwinkel der Totalreflexion) auf. Dieser berechnet sich aus Gleichung 2.9, für den Fall  $\beta = 90^\circ$ :

$$\alpha = \phi_g = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (2.10)$$

Betrachtet man den Fall der Totalreflexion genauer, so fällt auf, dass der Endpunkt des einfallenden Strahls nicht mit dem Startpunkt des reflektierten Strahls übereinstimmt, sondern seitlich versetzt ist. Dieser Versatz wird auch Goos-Hänchen Effekt genannt (siehe Abb. 2.3). Dieser Effekt ist eine Folge der Stetigkeitsbedingung für



**Abbildung 2.3:** Goos-Hänchen Effekt

die Lösung der Maxwellgleichungen an der Grenzfläche. Das Resultat ist eine eva-

neszente Welle, die in Richtung des Mediums mit dem geringeren Brechungsindex exponentiell abfällt [26].

Aus den Maxwellgleichungen und  $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$  ergibt sich:

$$\vec{B}_0 \cdot \vec{k} = \vec{E}_0 \cdot \vec{k} = 0 \quad (2.11)$$

sowie

$$\vec{k} \times \vec{E}_0 = \omega \vec{B}_0 \quad (2.12)$$

und

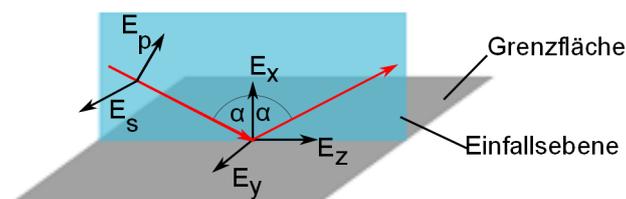
$$\vec{k} \times \vec{B}_0 = -\frac{\omega}{c^2} \vec{E}_0 \quad (2.13)$$

Weiters gilt:

$$E = cB = \frac{c_0}{n} B \quad (2.14)$$

wobei  $\vec{c}_0 \parallel \vec{k}$ .

Die Vektoren  $\vec{E}_0$ ,  $\vec{B}_0$  und  $\vec{k}$  bilden in genau dieser Reihenfolge ein orthogonales Rechtssystem. Wellen dieser Art nennt man auch transversale Wellen. Diese können polarisiert werden. Wir beschränken uns im Weiteren auf lineare Polarisation. Da die meisten beobachteten Effekte elektrischer Natur sind, wird zumeist nur das elektrische Feld betrachtet. Eine in beliebiger Richtung linear polarisierte Welle kann man als Superposition zweier normal aufeinander stehender linear polarisierter Wellen betrachten. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Polarisationsrichtungen senkrecht und parallel zur Einfallsebene (Ebene, die von  $\vec{k}$  der einfallenden Welle und dem Lot auf die Grenzfläche aufgespannt wird, siehe Abb. 2.4) zu betrachten. Wellen, die parallel zur Einfallsebene polarisiert sind (p-Polarisation), nennt man



**Abbildung 2.4:** Koordinatensystem für einfallende Wellen.  $E_s$  ist hier die Komponente des elektrischen Feldes senkrecht zur Einfallsebene (s-Polarisation),  $E_p$  ist die Komponente parallel zur Einfallsebene (p-Polarisation).

Transversal-Magnetische (TM-) Wellen, Wellen, die senkrecht zur Einfallsebene polarisiert sind (s-Polarisation) werden Transversal-Elektrische (TE-) Wellen genannt. Legt man das Koordinatensystem wie in Abb.2.1–2.3, so hat bei TM-Wellen nur das H-Feld eine y-Komponente, während bei TE-Wellen nur das E-Feld eine y-Komponente hat.

## 2.3 Wellenleiter

Als nächstes betrachten wir einen planaren Schichtwellenleiter, das bedeutet ein System aus drei Schichten mit  $n_1 < n_2$  und  $n_3 < n_2$  (Siehe Abb. 2.5 und Abb. 2.6). Propagiert eine Welle in der mittleren Schicht (Brechungsindex  $n_2$ ), so gibt es an beiden Grenzflächen einen Grenzwinkel für die Totalreflexion  $\Phi_g$  (Siehe Gleichung 2.10). Damit sich eine Wellenleitermode ausbreiten kann, muss der Einfallswinkel auf beiden Grenzflächen größer sein als  $\Phi_g$ , das bedeutet es muss gelten

$$\Phi > \arcsin \frac{n_1}{n_2} \quad (2.15)$$

und

$$\Phi > \arcsin \frac{n_3}{n_2} . \quad (2.16)$$

Zusätzlich müssen die Maxwellgleichungen, sowie die Stetigkeitsbedingungen an den

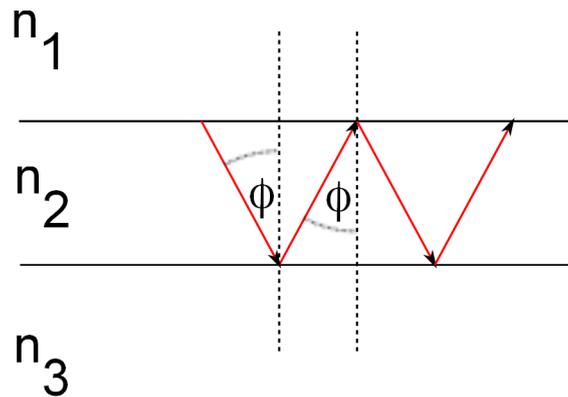


Abbildung 2.5: Strahlengang in einem Wellenleiter

Grenzflächen erfüllt sein. Aufgrund des evaneszenten Anteils des Feldes in Substrat und Deckschicht "spürt" die in  $n_2$  propagierende Welle einen effektiven Brechungsindex  $N_{eff}$ , wobei gilt [28]:

$$N_{eff} = \frac{\beta_a}{k_0} \text{ mit } n_1, n_3 < N_{eff} < n_2 \quad (2.17)$$

mit  $\beta_a = k_z = k_0 n_1 \sin \alpha$ . Hierbei ist  $\alpha$  der Winkel des einfallenden Strahls (siehe Abb. 2.4) und  $\beta_a$  die Propagationskonstante der Mode. Da jede Mode ihre eigene Propagationskonstante besitzt, ist auch der effektive Brechungsindex verschiedener Moden unterschiedlich, auch wenn diese im selben Schichtsystem propagieren. Betrachten wir nun Wellen der Form

$$\vec{E} = \vec{E}_0(x, y) e^{i(\omega t - \beta_a z)}, \quad (2.18a)$$

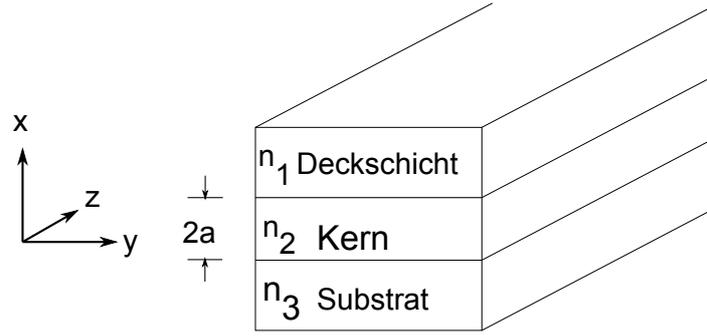


Abbildung 2.6: Modell eines Schichtwellenleiters

$$\vec{H} = \vec{H}_0(x, y)e^{i(\omega t - \beta_a z)}. \quad (2.18b)$$

Setzt man die Gleichungen 2.18a und 2.18b in die Gleichungen 2.2 und 2.4 ein, so erhält man folgendes Gleichungssystem [29, 30]:

$$\frac{\partial E_z}{\partial y} + i\beta_a E_y = -i\omega\mu_0 H_x \quad (2.19)$$

$$-i\beta_a E_x - \frac{\partial E_z}{\partial x} = -i\omega\mu_0 H_y \quad (2.20)$$

$$\frac{\partial E_y}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial y} = -i\omega\mu_0 H_z \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial H_z}{\partial y} + i\beta_a H_y = i\omega\epsilon_0 n^2 E_x \quad (2.22)$$

$$-i\beta_a H_x - \frac{\partial H_z}{\partial x} = i\omega\epsilon_0 n^2 E_y \quad (2.23)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} = i\omega\epsilon_0 n^2 E_z \quad (2.24)$$

Im Wellenleiter, der in Abb. 2.6 dargestellt ist, hängen die Felder nicht von  $y$  ab, das bedeutet  $\frac{\partial \vec{H}}{\partial y} = \frac{\partial \vec{E}}{\partial y} = 0$ . Setzt man diese Beziehung in Gleichung 2.21 und 2.24 ein, so erhält man die Gleichungen für die TM- und die TE-Mode. Die TE-Mode erfüllt folgende Gleichungen:

$$\frac{d^2 E_y}{dx^2} + (k^2 n^2 - \beta_a^2) E_y = 0 \quad (2.25)$$

mit

$$H_x = \frac{-\beta_a}{\omega\mu_0} E_y, \quad (2.26)$$

$$H_z = \frac{i}{\omega\mu_0} \frac{dE_y}{dx} \quad (2.27)$$

und

$$E_x = E_z = H_y = 0 \quad (2.28)$$

Die TM-Mode erfüllt folgende Gleichungen:

$$\frac{d^2 H_y}{dx^2} + (k^2 n^2 - \beta_a^2) H_y = 0 \quad (2.29)$$

mit

$$E_x = \frac{-\beta_a}{\omega \epsilon_0 n^2} H_y, \quad (2.30)$$

$$E_z = \frac{i}{\omega \epsilon_0 n^2} \frac{d H_y}{dx} \quad (2.31)$$

und

$$E_y = H_x = H_z = 0 \quad (2.32)$$

Die Tangentialkomponenten des E- und H-Feldes, das bedeutet in dem Fall die y- und z-Komponenten, müssen an den Übergängen stetig sein. Wählt man für TE-Wellen den Ansatz

$$E_y = \begin{cases} A \cos(\kappa a - \Phi) e^{-\sigma(x-a)} & x \geq a \\ A \cos(\kappa x - \Phi) & -a \leq x \leq a \\ A \cos(\kappa a + \Phi) e^{\xi(x+a)} & x \leq -a \end{cases} \quad (2.33)$$

mit

$$\kappa = \sqrt{k^2 n_2^2 - \beta_a^2} \quad (2.34)$$

$$\sigma = \sqrt{\beta_a^2 - k^2 n_1^2} \quad (2.35)$$

$$\xi = \sqrt{\beta_a^2 - k^2 n_3^2} \quad (2.36)$$

und substituiert

$$u = \kappa a \quad (2.37)$$

$$w = \xi a \quad (2.38)$$

$$w' = \sigma a, \quad (2.39)$$

so erhält man die Eigenwertgleichungen

$$u = \frac{m\pi}{2} + \frac{1}{2} \arctan \frac{w}{u} + \frac{1}{2} \arctan \frac{w'}{u} \quad (2.40)$$

$$\Phi = \frac{m\pi}{2} + \frac{1}{2} \arctan \frac{w}{u} - \frac{1}{2} \arctan \frac{w'}{u}, \quad (2.41)$$

aus denen die Propagationskonstante numerisch berechnet werden kann, wobei gilt:

$$m = 0, 1, 2, \dots, n.$$

Durch analoge Rechnung erhält man für TM-Wellen

$$u = \frac{m\pi}{2} + \frac{1}{2} \arctan \frac{n_2^2 w}{n_3^2 u} + \frac{1}{2} \arctan \frac{n_2^2 w'}{n_1^2 u} \quad (2.42)$$

$$\Phi = \frac{m\pi}{2} + \frac{1}{2} \arctan \frac{n_2^2 w}{n_3^2 u} - \frac{1}{2} \arctan \frac{n_2^2 w'}{n_1^2 u}. \quad (2.43)$$

Die Nummer der Mode wird durch ein tiefergestelltes  $m$  angegeben ( $\text{TE}_m$  und  $\text{TM}_m$ ), welches dem  $m$  in den Gleichungen 2.40 – 2.43 entspricht.

## 2.4 Gitterkopplung

Damit eine Wellenleitermode angeregt werden kann, muss gelten:

$$k_z = \beta_a, \quad (2.44)$$

wobei  $k_z$  der zur Propagationskonstante der angeregten Mode parallele Anteil des Wellenvektors des eingestrahltten Lichtes ist. Da immer  $\beta_a > n_1 k_0$  und  $\beta_a > n_3 k_0$  gilt, ist es nicht möglich, durch bloße Einstrahlung aus Substrat oder Deckschicht eine Mode in den Wellenleiter einzukoppeln. Dies ist eine Folge der Impulserhaltung (siehe Abb. 2.7). Jedes Gitter wird durch den Gittervektor  $\vec{K}$  charakterisiert, wobei  $|K| = \frac{2\pi}{\Lambda}$  gilt und  $\Lambda$  die Gitterperiode (siehe Abb. 2.8) ist.

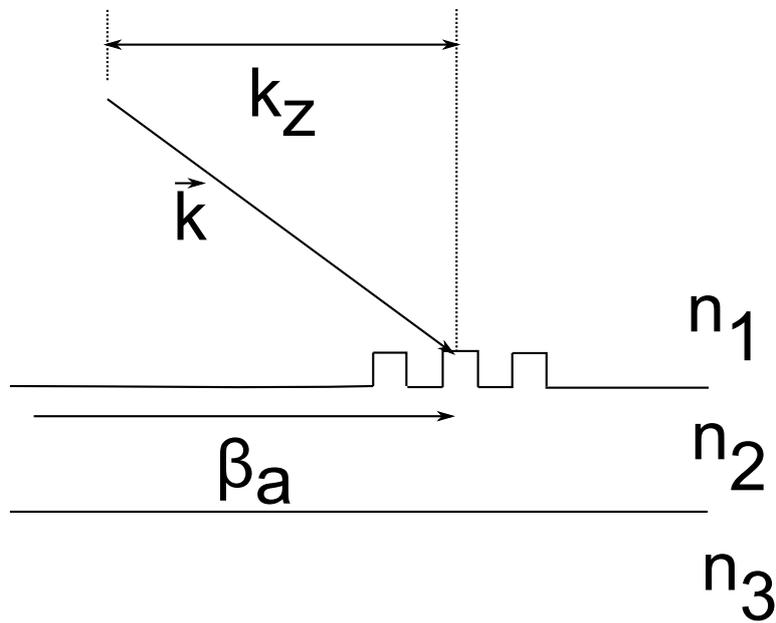


Abbildung 2.7: Impulserhaltung bei Einkopplung einer Wellenleitermode

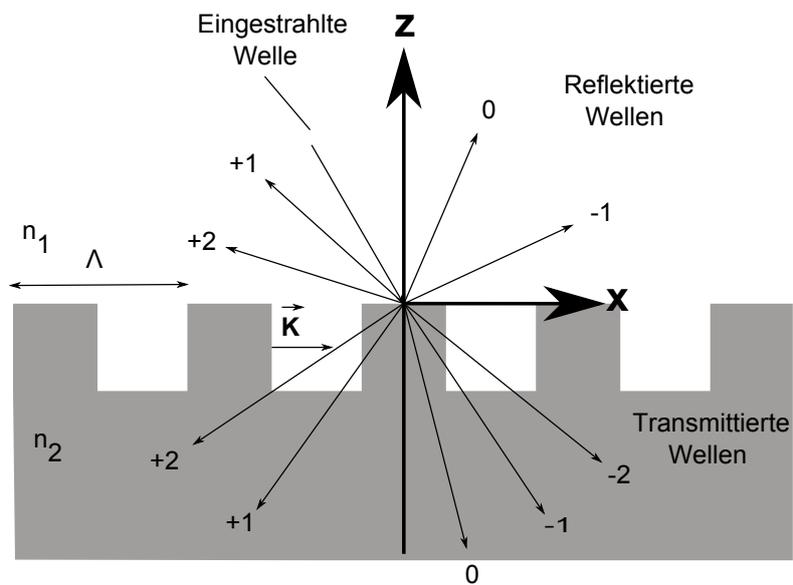


Abbildung 2.8: Geometrie und schematischer Strahlengang in einem Rechtecksgitter

Um Gleichung 2.44 zu erfüllen, benötigt man Hilfsmittel, die den Wellenvektor des eingestrahnten Lichtes "modifizieren." Eine Möglichkeit, eine Wellenleitermode anzuregen, ist mittels eines Koppelgitters. Andere denkbare Möglichkeiten, welche aber in dieser Arbeit nicht verwendet werden, sind Kopplung mittels Prisma oder Stirnflächenkopplung.

Trifft ein Strahl auf ein Gitter, so wird er in mehrere Teilstrahlen (Ordnungen) aufgespalten. Die Winkel, unter denen diese Ordnungen auftreten, ergeben sich aus dem Gangunterschied zwischen zwei benachbarten Wellenfronten. Dieser muss ein Vielfaches der Wellenlänge betragen, und man erhält die Formel

$$q\lambda = \Lambda(\sin \beta_q - \sin \alpha), \quad (2.45)$$

wobei  $\alpha$  der Winkel des einfallenden Strahls und  $\beta_q$  der Winkel des gebeugten Strahls in  $q$ -ter Beugungsordnung ist. Mit wenigen Umformungen erhält man daraus die Gleichung für die Wellenzahlen

$$\vec{k}_q = \vec{k}_u - q\vec{K}, \quad (2.46)$$

wobei für Einkopplung einer Wellenleitermode für die  $x$ -Komponente  $k_{q,x}$  gelten muss:

$$\beta_a = k_{q,x}. \quad (2.47)$$

Hierbei ist  $\vec{k}_u$  der Wellenvektor des vom Gitter ungebrochenen Strahls, für den lediglich das Snelliussche Gesetz gilt,  $q = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$  die Nummer der Beugungsordnung und  $\vec{k}_q$  der Wellenvektor der  $q$ -ten Beugungsordnung. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es bei jedem Gitter auch Reflexionsordnungen gibt, welche für diese Arbeit aber lediglich einen parasitären Effekt darstellen, weshalb nicht weiter auf sie eingegangen wird. Betrachtet man nur Gleichung 2.46, so wären unendlich viele Beugungsordnungen möglich. Nicht alle dieser Beugungsordnungen sind allerdings physikalisch erlaubt. Spaltet man Gleichung 2.46 koordinatenweise auf, betrachtet nur die  $x$ -Achse und setzt in Gleichung 2.9 ein, so erhält man die Beugungsgleichung

$$n_2 \sin \beta_q = n_1 \sin \alpha - q \frac{\lambda}{\Lambda}, \quad (2.48)$$

wobei  $\alpha$  der Winkel des einfallenden Strahls und  $\beta_q$  der Winkel des Strahls in  $q$ -ter Beugungsordnung ist. Betrachtet man Gleichung 2.48, so stellt man fest, dass die rechte Seite betragsmäßig nicht größer werden darf als  $n_2$ , da sonst der Winkel  $\beta_q$  imaginär würde ( $|\sin \beta_q| > 1$ ), was keine physikalisch sinnvolle Lösung darstellt.

Somit erhält man als Einschränkung für die Anzahl der Beugungsordnungen:

$$\lceil \frac{\Lambda}{\lambda}(n_1 \sin \alpha - n_2) \rceil \leq q \leq \lfloor \frac{\Lambda}{\lambda}(n_1 \sin \alpha + n_2) \rfloor \quad (2.49)$$

Die Notation  $\lceil \ ]$  bedeutet hier "aufgerundet auf die nächste Ganze Zahl" und die Notation  $\lfloor \ ]$  bedeutet "abgerundet auf die nächste Ganze Zahl" [31].

## 2.5 Elektrochemie

Die elektrochemischen Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind Elektrochemische Impedanzspektroskopie und Cyklovoltametrie. Bei den Cyklovoltametriemessungen sowie bei den EIS-Messungen auf leitfähigen Oberflächen wurde das "Dreielektrodensystem" mit der Probe als Arbeitselektrode, einer Gegenelektrode aus Platin und einer Ag/AgCl Referenzelektrode verwendet. Bei den EIS-Messungen, welche auf Tantalpentoxid durchgeführt wurden, wurden Kammelektroden aus Gold verwendet. Diese waren unter der Tantalpentoxidschicht angebracht.

### 2.5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

EIS ist eine etablierte Methode, um die elektrischen Eigenschaften von Membransystemen auf leitenden Oberflächen zu charakterisieren. Sie gilt als sehr schonend, da nur sehr kleine Spannungen verwendet werden. Die verwendeten Spannungen haben die Form:

$$E = E_0 \sin \omega t \quad (2.50)$$

$E_0$  ist hierbei die Amplitude und  $\omega$  die Kreisfrequenz, wobei  $\omega = 2\pi\nu$  mit der Frequenz  $\nu$  in Hz gilt. Der daraus resultierende Strom ergibt sich zu

$$I = I_0 \sin(\omega t + \Phi), \quad (2.51)$$

wobei  $\Phi$  der Winkel der Phasenverschiebung ist. Für manche Betrachtungen ist jedoch das Arbeiten mit den komplexen Größen  $E = E_0 e^{i\omega t}$  und  $I = I_0 e^{i\omega t}$  zweckmäßiger.

Die Impedanz  $Z$  wird als  $Z = R + iX = Z' + iZ''$  angegeben, wobei  $R$  der Ohmsche Widerstand und  $X$  die Reaktanz ist. Der Kehrwert der Impedanz ist die Admittanz  $Y$ . Diese wird durch  $Y = Y' + iY'' = \frac{1}{Z} = \frac{Z'}{Z^2} - i\frac{Z''}{Z^2}$  berechnet.

Betrachten wir nun verschiedene elektronische Bauelemente beziehungsweise Schaltkreise, aus denen die gängigen Ersatzschaltbilder für die von uns betrachteten Systeme zusammengesetzt werden können.

- Ohmscher Widerstand R

$$I = \frac{E}{R} = \frac{E_0}{R} \sin \omega t \quad (2.52)$$

$$\Rightarrow \Phi = 0 \quad (2.53)$$

- Kapazität C

$$q = CE \quad (2.54)$$

$$I = \frac{dq}{dt} = C \frac{dE}{dt} = E_0 \omega C \cos \omega t = I_0 \sin(\omega t + \Phi) \quad (2.55)$$

$$\Rightarrow \Phi = \frac{\pi}{2}, \quad I_0 = E_0 \omega C \quad (2.56)$$

mit  $I_0 = \frac{E_0}{X}$  folgt daraus

$$X = \frac{1}{\omega c} \quad (2.57)$$

oder bei Betrachtung mittels komplexer Größen

$$I = \frac{dq}{dt} = C \frac{dE}{dt} = i E_0 \omega C e^{i\omega t} = I_0 e^{i\omega t} \quad (2.58)$$

Das bedeutet für die Impedanz Z und die Phasenverschiebung  $\Phi$

$$Z = \frac{E_0}{I_0} = \frac{1}{i\omega c} = -\frac{i}{\omega c} \quad (2.59)$$

und

$$\Phi = \arctan \frac{Z''}{Z'} = \frac{\pi}{2} \quad (2.60)$$

- Widerstand und Kapazität in Serie

Die Gesamtimpedanz und der Phasenwinkel sind gegeben durch

$$Z = R - \frac{i}{\omega C} \quad (2.61)$$

$$|Z| = \sqrt{R^2 - \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (2.62)$$

$$\Phi = \arctan \left( -\frac{1}{\omega RC} \right) \quad (2.63)$$

- Widerstand und Kapazität parallel

Für Impedanz und Phasenwinkel gilt:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + i\omega C \quad (2.64)$$

$$Z = \frac{R}{1 + i\omega RC} = \frac{R}{1 + (\omega RC)^2} - i \frac{\omega R^2 C}{1 + (\omega RC)^2} \quad (2.65)$$

$$\Phi = \arctan(\omega RC) \quad (2.66)$$

- Induktivität

$$U = L \frac{dI}{dt} \quad (2.67)$$

$$Z = \frac{U}{I} = i\omega L \quad (2.68)$$

Die Induktivität als eines der drei klassischen Wechselstrombauelemente ist hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Sie kommt jedoch in den gängigen Ersatzschaltbildern in EIS-Messungen nicht vor.

Die EIS wird in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten angewandt:

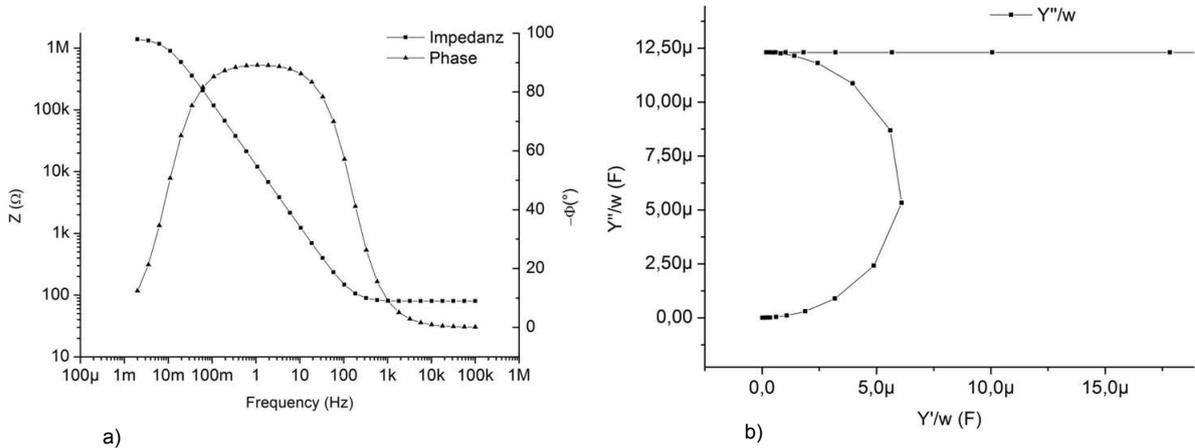
- EIS auf leitfähigen Oberflächen

Hier wird unser System nacheinander Wechselspannungen verschiedener Frequenz ( $\sim 10^{-3} - 10^5$  Hz) ausgesetzt und der resultierende Wechselstrom gemessen. Zur Datenanalyse wird ein Äquivalenzschaltkreis gebildet. Bei den von uns verwendeten Systemen ist dieser meist eine Kombination aus einem Widerstand (Lösungswiderstand) und einem dazu in Serie geschalteten parallelen RC-Glied (Probenoberfläche). Für die aus den EIS Messungen gewonnenen Daten gibt es verschiedene Darstellungsmöglichkeiten. Für die in dieser Arbeit behandelten Effekte sind der Bode-Plot und der frequenzreduzierte Admittanzplot am besten geeignet (siehe Abb. 2.9). Die EIS auf leitfähigen Schichten dient in dieser Arbeit einerseits zur elektrochemischen Charakterisierung der verwendeten transparenten leitfähigen Oberflächen (siehe Abschnitt 2.5.3) und andererseits zum Nachweis der Proteinanbindung und Bildung der ptBlm.

- EIS Messungen auf Tantalpentoxid

Obwohl Tantalpentoxid ein Isolator ist, gibt es dennoch eine Möglichkeit EIS Messungen auf einer Tantalpentoxid Oberfläche durchzuführen. Bei diesen Messungen befinden sich Kammelektroden unterhalb der Tantalpentoxidschicht (siehe Abb. 2.10). Ein Sensor besteht aus zwei Kammelektroden, von denen jede 100 "Finger" enthält. Jeder dieser "Finger" ist  $5 \mu m$  breit, 1 mm lang

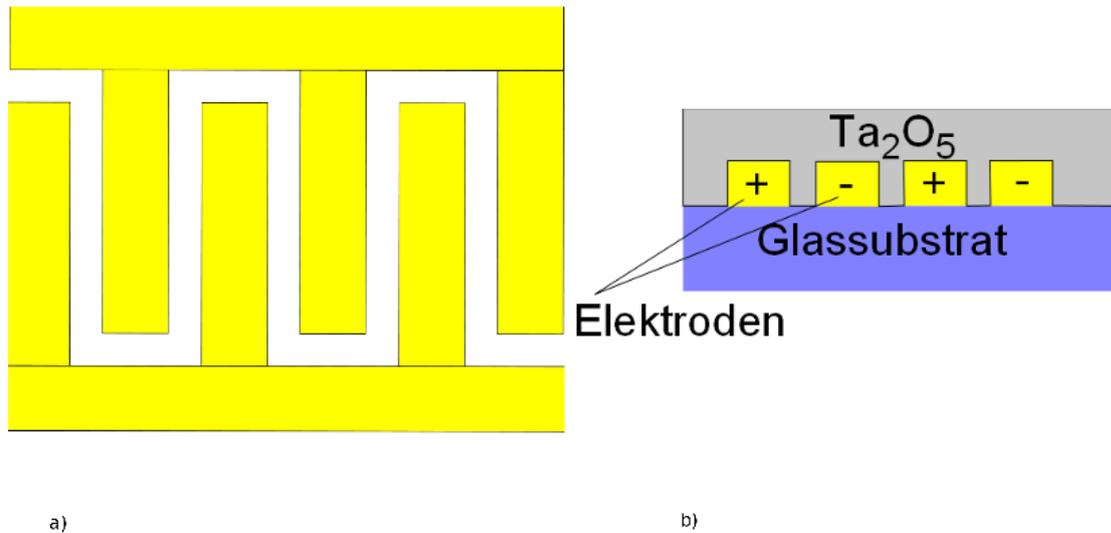
und 100 nm hoch. Der Abstand zwischen zwei "Fingern" beträgt  $5 \mu\text{m}$  [32,33]. Diese Messungen sind möglich, weil das Elektrische Feld bei der verwendeten Geometrie etwa  $10 \mu\text{m}$  aus der Oberfläche "herausragt" [34].



**Abbildung 2.9:** a) Bode Plot und b) frequenzreduzierter Admittanzplot der EIS eines Idealen R(RC)-Gliedes

Beim Bode Plot werden die Impedanz auf einer logarithmischen y-Achse sowie der Phasenwinkel auf einer linearen y-Achse gegen die Frequenz auf einer logarithmischen x-Achse aufgetragen. Im hochfrequenten Bereich kann man den Lösungswiderstand ablesen, im niederfrequenten Bereich die Summe aus Lösungswiderstand und ohmschem Widerstand an der Grenzfläche, wobei bei allen Messungen der Lösungswiderstand im niederfrequenten Bereich vernachlässigbar war.

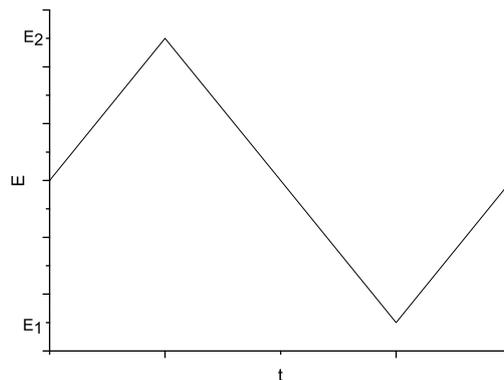
Beim frequenzreduzierten Admittanzplot wird der durch die Kreisfrequenz dividierte Imaginärteil der Admittanz  $Y''/\omega$  auf der y-Achse gegen den durch die Kreisfrequenz dividierten Realteil der Admittanz  $Y'/\omega$  auf der x-Achse aufgetragen. Hier kann man bei  $Y'/\omega = 0$  die Kapazität beziehungsweise Kapazitäten des Systems ablesen [35].



**Abbildung 2.10:** Schematische Darstellung der Kammelektroden a) im Grundriss und b) in der Seitenansicht

## 2.5.2 Cyklovoltametrie (CV)

CV ist eine Methode zum Nachweis direkten Elektronentransfers. Dabei wird an eine Probe periodisch Spannung der Form aus Abb. 2.11 angelegt und der resultierende Strom gemessen. Für unser System brauchbare Scanraten liegen zwischen 10 mV/s und 100 mV/s. Die gemessenen Ströme können unterschieden werden in:



**Abbildung 2.11:** Potentialverlauf einer Cyklovoltametrie

- **Nicht Faradayische Ströme**

Diese resultieren aus der Ionenverschiebung an der Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolytlösung. Sie werden auch kapazitive Ströme genannt. Für

linearen Spannungsverlauf, das bedeutet  $E(t) = E_{Start} + \nu t$  gilt: [36]

$$I_C = \frac{E_{Start}}{R_s} e^{-\frac{t}{R_s C}} + \nu C (1 - e^{-\frac{t}{R_s C}}), \quad (2.69)$$

wobei  $R_s$  der Widerstand der Elektrolytlösung ist. Beim Rücklauf erhält der zweite Term ein negatives Vorzeichen, sodass für die Differenz zwischen Hin- und Rückrichtung des Cyklovoltamogramms gilt:

$$\Delta I_C = 2\nu C \quad (2.70)$$

- **Faradayische Ströme**

Diese stammen von heterogenem Elektronentransfer an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolytlösung und es gilt



wobei O den oxidierten Zustand und R den reduzierten Zustand einer Redoxspezies darstellt. Die Form der Cyklovoltamogramme wird von diffusionsbedingtem Massentransport und heterogenem Ladungstransfer bestimmt. Der Ladungstransfer wird durch eine Grundgleichung der elektrochemischen Kinetik, die Butler-Volmer Gleichung, beschrieben [37]:

$$j_A(0, t) = c_O(0, t) \cdot k^0 \cdot e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E-E_0)} - c_R(0, t) \cdot k^0 \cdot e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E-E_0)} \quad (2.72)$$

mit den Parametern: Standardgeschwindigkeitskonstante des heterogenen Durchtritts  $k^0$ , Durchtrittsfaktor  $\alpha$ , Standardpotential  $E_0$ , Oberflächenkonzentration der Redoxpartner  $c_O$  und  $c_R$ , sowie Faradaykonstante F und allgemeine Gaskonstante R. Die Oberflächenkonzentrationen  $c_O(0, t)$  und  $c_R(0, t)$  sind potentialabhängig und unterscheiden sich von den Konzentrationen  $c_O$  und  $c_R$  im Rest der Lösung. Dies führt zu diffusionsbedingtem Massentransport. Mit den Fick'schen Gesetzen kann man die Konzentrationsverteilung in der Diffusionsschicht beschreiben [21]:

$$\frac{\partial c_O}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 c_O}{\partial x^2} \quad (2.73)$$

$$\frac{\partial c_R}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 c_R}{\partial x^2} \quad (2.74)$$

Der Diffusionsgradient an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Lösung ist

proportional zum Ladungsfluss:

$$j_A(0, t) = -D_O \left( \frac{\partial c_O}{\partial x} \right)_{x=0} = -D_R \left( \frac{\partial c_R}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (2.75)$$

Wirken sich heterogener Ladungstransfer und diffusionsbedingter Massentransport in ähnlicher Größenordnung aus, spricht man vom quasireversiblen Fall. Der an der Arbeitselektrode messbare Strom kann dann durch Gleichung 2.72 und Gleichung 2.75 beschrieben werden.

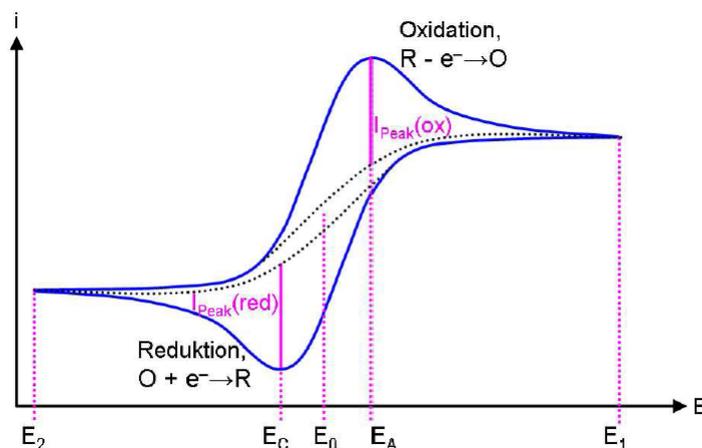
Ist der Elektronentransfer "schnell", das bedeutet  $k^0 > 10^{-1} \frac{cm}{s}$ , spricht man vom reversiblen Fall und die Butler Volmer Gleichung vereinfacht sich zur Nernst Gleichung [36]:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{c_O}{c_R} \quad (2.76)$$

Der gemessene Strom wird beinahe ausschließlich durch den Massentransport als langsamsten Schritt kontrolliert. In diesem Fall hängen die Oberflächenkonzentrationen  $c_O(0, t)$  und  $c_R(0, t)$  ausschließlich vom angelegten Potential ab. Die Lage der Spitzenpotentiale wird dann unabhängig von der Scanrate und der Abstand zwischen den Spitzenpotentialen eines Redoxzentrums beträgt bei Raumtemperatur

$$\Delta E = |E_A - E_C| = \frac{59}{n} mV, \quad (2.77)$$

wobei n die Anzahl der während eines Redoxprozesses umgesetzten Elektronen ist (siehe Abb. 2.12).



**Abbildung 2.12:** Cyklovoltamogramm reversiblen Elektronentransfers: kathodisches und anodisches Spitzenpotential  $E_C$  und  $E_A$ , Umkehrpotentiale  $E_1$  und  $E_2$ , und Redoxpotential  $E_0$ ; Quelle: [21]

Ist der Elektronentransfer "langsam", das bedeutet  $k^0 < 10^{-5} \frac{cm}{s}$ , spricht man vom irreversiblen Fall. Der Strom wird größtenteils durch den Ladungstransfer bestimmt. Es hat nur entweder die kathodische oder die anodische Reaktion eine messbare Geschwindigkeitskonstante. Die Nernst-Gleichung ist hier nicht mehr anwendbar [21].

### 2.5.3 Halbleiter, Flachbandpotential und Mott-Schottky Plot

Die Leitfähigkeit eines Festkörpers hängt von dessen elektronischer Struktur ab. Da Festkörper nahezu unendlich viele Atome enthalten, wird die elektronische Struktur von Festkörpern in Energiebänder, welche von den Atomorbitalen der beteiligten Atome gebildet werden, zusammengefasst. Da die Energiebänder sehr viele Orbitale enthalten, ist die Energiedifferenz zweier Orbitale so gering, dass die Energiebänder als Kontinuum von Energielevels behandelt werden können. Für die Leitfähigkeit eines Festkörpers sind das höchste besetzte (Valenzband) und das niedrigste unbesetzte (Leitungsband) Energieband verantwortlich [38].

Bei Metallen überlappen sich Valenz- und Leitungsband, weshalb Elektronen durch Anlegen eines beliebig kleinen elektrischen Feldes vom Valenz- ins Leitungsband wechseln können. Bei Isolatoren gilt für die Bandlücke  $E_g \gg k_B T$ , wobei  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die Temperatur ist. So können selbst bei hohen Temperaturen keine Elektronen vom Valenzband ins Leitungsband wechseln [39]. Ist die Bandlücke zwar vorhanden, aber so klein, dass Elektronen durch optische oder thermische Anregung vom Valenz- ins Leitungsband wechseln können, so spricht man von Halbleitern.

Eine Möglichkeit, die Leitfähigkeit von Halbleitern zu verbessern, ist Dotierung. Dazu werden gezielt Fremdatome in den Halbleiter eingebracht. Sind es Atome, die ein Elektron mehr haben, als die Atome des Halbleiters, spricht man von Typ n Halbleitern und Elektronenleitung. Werden Atome eingebracht, die ein Elektron weniger haben, spricht man von Typ p Halbleitern und Lochleitung. Da in dieser Arbeit nur Typ n Halbleiter verwendet wurden, werden die folgenden Überlegungen nur für Typ n Halbleiter ausgeführt.

Das Fermi Level des Halbleiters ist die potentielle Energie des Zustandes, dessen Besetzungswahrscheinlichkeit  $\frac{1}{2}$  beträgt. Dieses lässt sich durch angelegte Spannung verändern.

Legt man bei Halbleiter-/Elektrolyt Kontakt eine Spannung an den Halbleiter an, gilt es drei Fälle zu unterscheiden [38]:

- Das Redoxpotential des Elektrolyten ist größer als das Fermi-Level des Halb-

leiters.

Um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen, werden Elektronen vom Halbleiter in den Elektrolyten transferiert. An der Oberfläche des Halbleiters sammeln sich Löcher und es bildet sich ein so genannter depletion layer. Der Halbleiter zeigt Isolatorverhalten.

- Das Redoxpotential des Elektrolyten ist kleiner als das Fermi-Level des Halbleiters.

Um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen werden Elektronen vom Elektrolyten in den Halbleiter transferiert. Es sammeln sich Elektronen an der Halbleiteroberfläche und es bildet sich ein so genannter accumulation layer. Der Halbleiter zeigt metallisches Verhalten.

- Das Redoxpotential des Elektrolyten entspricht dem Fermi-Level des Halbleiters.

Dies ist der Grenzfall zwischen den ersten beiden Fällen. Es erfolgt kein Ladungstransfer zwischen Halbleiter und Elektrolyt. Das Potential, bei dem dies der Fall ist, nennt man Flachbandpotential.

Bei Typ n Halbleitern ist bei angelegten Potentialen, die kleiner als das Flachbandpotential sind, metallisches Verhalten und bei angelegten Potentialen, die größer als das Flachbandpotential sind, Isolatorverhalten zu erwarten. Um direkten Elektronentransfer von einem angebondenen Protein zum Halbleiter messen zu können, ist metallisches Verhalten notwendig.

Eine Möglichkeit, das Flachbandpotential eines Halbleiters zu bestimmen, ist der Mott Schottky Plot. Hierfür werden EIS Messungen bei verschiedenen Biaspotentialen durchgeführt und ein geeignetes Ersatzschaltbild modelliert. Danach wird das reziproke Quadrat der Kapazität gegen das angelegte Biaspotential aufgetragen. Gemäß der Formel

$$\frac{1}{C^2} = \frac{2}{e\epsilon_r\epsilon_0N} \left( E - E_{FB} - \frac{kT}{e} \right) \quad (2.78)$$

mit der Vereinfachung, dass der Term  $\frac{kT}{e}$  bei Raumtemperatur vernachlässigbar ist, ist das Flachbandpotential jenes Potential, an dem die Extrapolation des Fits die x-Achse schneidet [38].

## 3 Messergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau eines Setups, mit dessen Hilfe OWS-Messungen am Membranprotein CcO simultan mit elektrochemischen Untersuchungen durchgeführt werden können. Dieses globale Ziel wurde unterteilt in Elektrochemie auf transparenten, leitfähigen Schichten, OWS Messungen auf Tantalpentoxid sowie die Kombination beider Messmethoden auf einem Mehrschichtsystem.

Die Probengeometrie der elektrochemischen Messungen auf Tantalpentoxid wird in den Abschnitten 2.5.1 und 3.2 beschrieben. In allen anderen Experimenten diente 1 mm dickes Glas ( $n=1,52$ ) mit den Abmessungen 15 x 30 mm als Substrat. Dieses wurde jeweils 15 Minuten mit Aceton, Ethanol und Wasser im Ultraschallbad und danach 15 Minuten bei 50°C mit 2% Hellmanex II (siehe Anhang) gereinigt. Danach wurden die so gereinigten Substrate mit dem jeweiligen Probenmaterial (Tantalpentoxid, ITO, AZO, Gold) in gewünschter Schichtdicke besputtert.

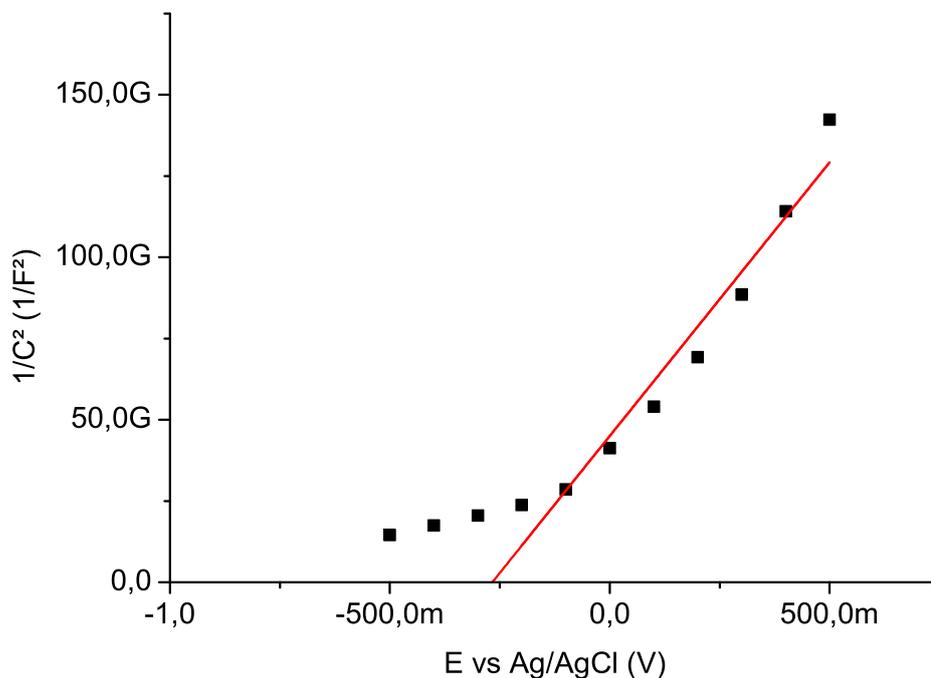
Die Messkammer hatte den Querschnitt einer an den Ecken abgerundeten Raute mit den Winkeln 60 und 120°, eine Fläche von 0,85 cm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0,5 cm.

### 3.1 Elektrochemie von transparenten leitfähigen Schichten

Erstes Ziel dieser Arbeit war das Herstellen einer geeigneten transparenten, leitfähigen Oberfläche, um simultan Elektrochemie-Messungen (EIS und CV) und OWS-Messungen durchführen zu können. Dafür kamen Indium Zinn Oxid (ITO), Aluminium dotiertes Zinkoxid (AZO) oder ein Multischichtsystem bestehend aus einem der vorher genannten Materialien und einer dünnen Goldschicht in Frage. Alle Elektrochemiemessungen wurden mit PBS-Puffer (siehe Anhang) als Elektrolytlösung durchgeführt. Nähere Angaben zu den Messaufbauten sowie zur Durchführung der Messungen befinden sich im Anhang.

### 3.1.1 Indium Zinn Oxid

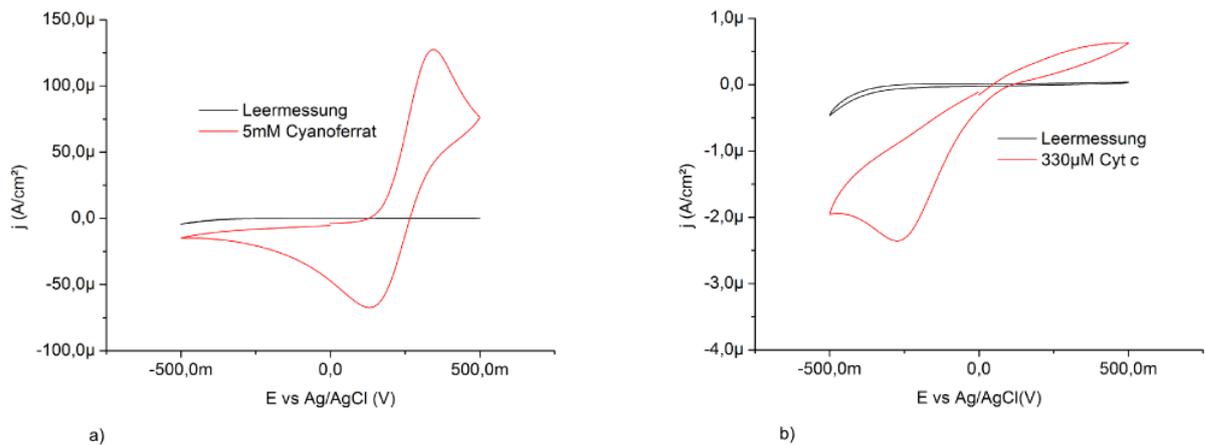
Zunächst musste festgestellt werden, in welchem Potentialbereich reversibler Elektronentransfer möglich ist. Dieser tritt bei Typ n Halbleitern nur im Potentialbereich unterhalb des Flachbandpotentials auf (siehe Kapitel 2.5.3). Deshalb musste das Flachbandpotential der ITO-Proben bestimmt werden. Hierfür wurden EIS-Messungen mit variierendem Biaspotential von -500 mV bis +500 mV durchgeführt, und mit einem geeigneten Ersatzschaltbild modelliert. Im in Abb.3.1 gezeigten Fall war dies ein R(RC)-Glied. Danach wurde eine Mott-Schottky-Auswertung durchgeführt. Im in Abb. 3.1 gezeigten Fall lag das Flachbandpotential bei -273 mV. In [40] ist beschrieben, dass Gleichung 2.78 nur gilt, wenn die Annahme getroffen wird, dass sich in der Verarmungszone des Halbleiters keine Majoritätsladungsträger befinden. Trifft man diese Annahme nicht, gilt diese Gleichung nur in einem linearen Bereich, der bei Typ n Halbleitern oberhalb des Flachbandpotentials liegt. Da das Redoxpotential der verwendeten Redoxspezies (Cytochrom c) oberhalb des Flachbandpotentials von ITO liegt, war kein reversibler Elektronentransfer zu erwarten. Dennoch wurden CV-Messungen auf ITO durchgeführt.



**Abbildung 3.1:** Mott-Schottky Plot zur Bestimmung des Flachbandpotentials eines ITO-Halbleiters, Messpunkte und Fit:  $E_{FB} = -273\text{mV}$

Zunächst mit 5mM Kaliumhexacyanoferrat(II) als Referenz, um herauszufinden,

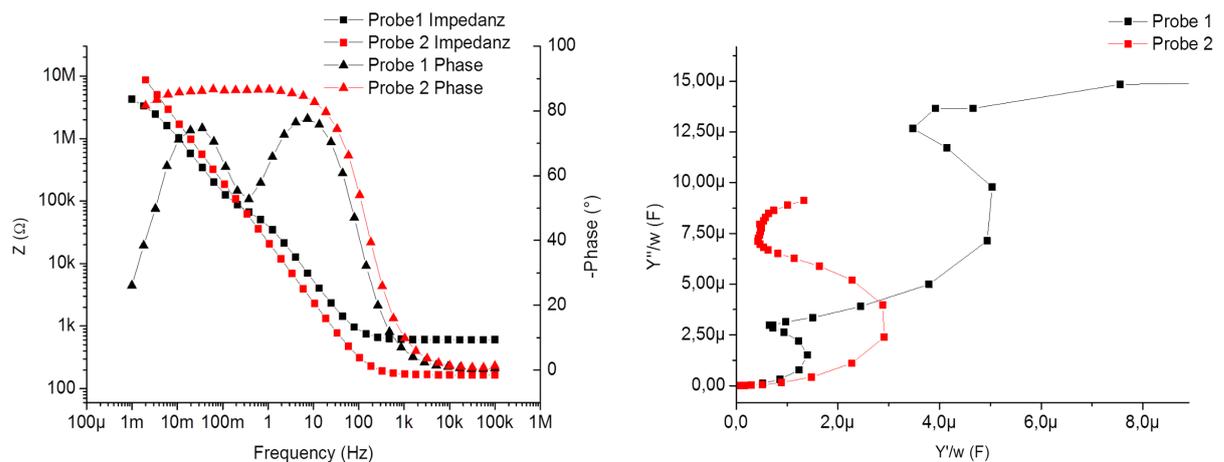
ob auf ITO-Oberflächen generell direkter Elektronentransfer möglich ist, dann mit  $330\mu\text{M}$  Cytochrom c als Beispiel für ein einfaches Hämprotein (siehe Anhang). Kaliumhexacyanoferrat(II) (Konstitutionsformel  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) ist ein Molekül, welches dafür eingesetzt wird, die Möglichkeit des Elektronentransfers nachzuweisen (siehe z.B. [41]). Bei den Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat(II) sieht man reversiblen Elektronentransfer, während man bei den Messungen mit Cytochrom c zwar einen gut ausgeprägten Reduktionspeak, aber keinen Oxidationspeak erkennen kann. Vergleicht man Abb.3.2b mit Abb. 3.1, so sieht man, dass der Reduktionspeak unterhalb des Flachbandpotentials liegt, wo metallisches Verhalten der Oberfläche zu erwarten war, während der Oxidationspeak oberhalb des Flachbandpotentials weniger ausgeprägt war, was auf Isolator-Verhalten der Grenzfläche schließen lässt. Auf den ersten Blick ist es nach dieser Theorie nicht verständlich, warum in Abb. 3.2a reversibler Elektronentransfer zu erkennen ist. Betrachtet man jedoch die Molekulargewichte von Kaliumhexacyanoferrat(II) ( $368,34\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) und Cytochrom c ( $12327\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ), so fällt auf, dass Cytochrom c etwa 30 mal so schwer ist wie Kaliumhexacyanoferrat(II), was auch auf einen entsprechenden Größenunterschied schließen lässt.



**Abbildung 3.2:** CV-Messungen auf ITO-Oberfläche links mit Kaliumhexacyanoferrat(II), rechts mit Cytochrom c

Deshalb ist die mittlere Distanz des Redoxzentrums von Kaliumhexacyanoferrat(II) zur Arbeitselektrode deutlich geringer als die mittlere Distanz des Redoxzentrums von Cytochrom c zur Arbeitselektrode. Da der Elektronentransfer abhängig von der mittleren Distanz von Redoxzentrum zur Arbeitselektrode ist, war bei den Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat(II) im Gegensatz zu den Messungen mit Cytochrom c reversibler Elektronentransfer zu beobachten.

In den Messungen, die in Abb.3.3 zu sehen sind, und welche bei  $0\text{mV}$  Biaspotential durchgeführt wurden, fällt auf, dass Proben, obwohl sie aus der selben Charge stam-



**Abbildung 3.3:** Vergleich der EIS-Messungen zweier ITO-Proben. Das Biaspotential betrug 0mV

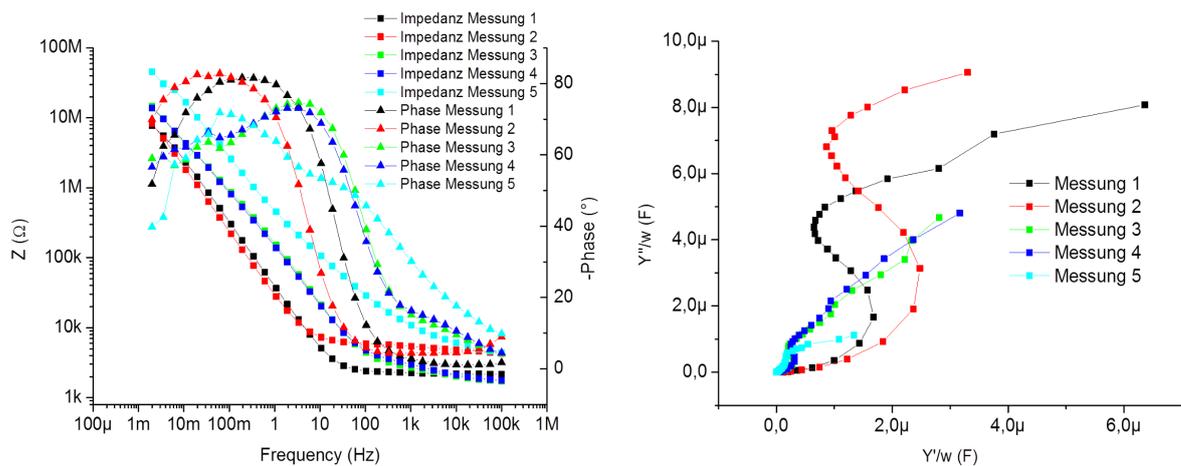
men, unterschiedliche elektrische Eigenschaften aufweisen (siehe Abb.3.3). So ist in den Bode-Plots sowie frequenzreduzierten Admittanzplots eines Teils der Proben nur eine "Zeitkonstante" beziehungsweise kapazitive Komponente zu sehen. Diese können durch einen R(RC)-Ersatzschaltkreis beschrieben werden. Auf den Plots eines anderen Teils der Proben sind zwei kapazitive Komponenten zu sehen, weshalb eine Beschreibung durch einen R(RC)(RC)-Ersatzschaltkreis nahe liegt. Dieses Problem tauchte mit kommerziell erhältlichem ITO bereits in [15] auf. Dort konnte ITO unter anderem auch durch Variation der Sputterparameter mit höherem Flachbandpotential hergestellt werden, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Da erstens das Flachbandpotential der ITO-Proben tiefer liegt als die Redoxpotentiale der in dieser Arbeit verwendeten Proteine und zweitens keine Reproduzierbarkeit hinsichtlich der elektrischen Eigenschaften der ITO-Proben, welche sogar aus der selben Charge stammen, gegeben ist, kann ITO nicht als Arbeitselektrode eingesetzt werden, und ist deshalb als Substrat nicht geeignet.

### 3.1.2 Aluminium dotiertes Zinkoxid

Als weiterer transparenter Halbleiter wurde analog zu den Messungen auf ITO-Oberflächen das Flachbandpotential von AZO bestimmt. Als erstes wurden AZO-Proben mit 50nm Schichtdicke untersucht.

In Abb. 3.4 sieht man, wie sich die Probeneigenschaften mit der Zeit verändern. Der Widerstand im hochfrequenten Bereich steigt an, es ist keine messbare Kapazität mehr vorhanden und die Daten lassen sich nicht mehr mit den gängigen, physikalisch sinnvollen Ersatzschaltbildern fitten. Deshalb wurden nach den EIS-

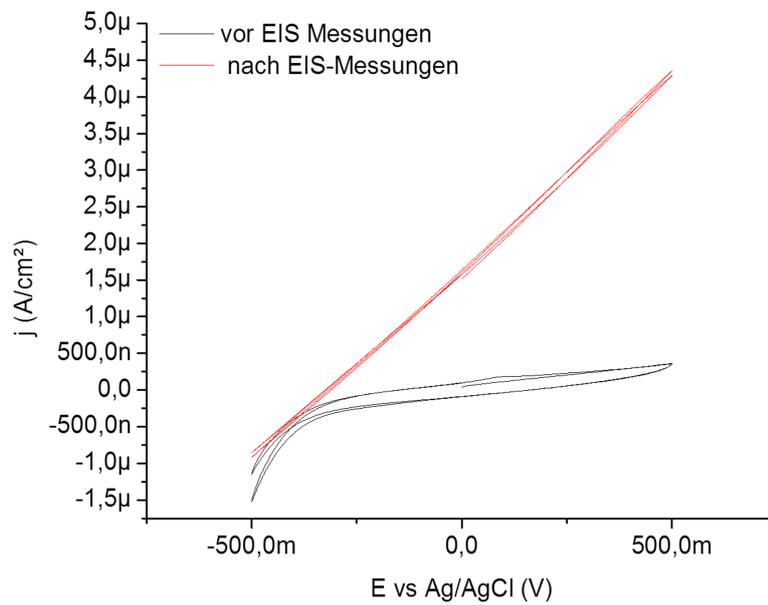


**Abbildung 3.4:** Zeitliche Änderung von Impedanz, Phasenverschiebung und Kapazität einer AZO-Probe; Messung 2 wurde sechs Stunden nach Messung 1, Messung 3 22 Stunden nach Messung 1, Messung 4 24 Stunden nach Messung 1 und Messung 5 96 Stunden nach Messung 1 durchgeführt.

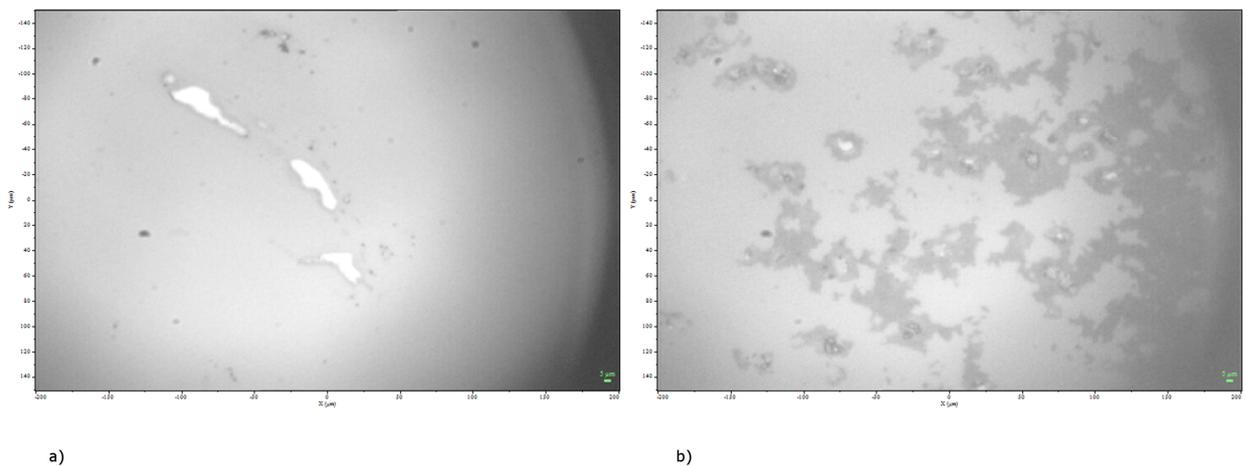
Messungen CV-Messungen durchgeführt und mit CV-Messungen einer frischen Probe verglichen (siehe Abb. 3.5). Nach den EIS-Messungen zeigte die Probe nur mehr ohmschen Widerstand ohne kapazitive Aufladung. Dies lässt auf Beschädigungen der Probenoberfläche schließen. Da sich keine stationären Verhältnisse hinsichtlich der elektrischen Eigenschaften der Proben einstellten, konnte keine Mott-Schottky Auswertung durchgeführt werden.

Da die AZO-Proben mit 50 nm Schichtdicke in Elektrolytlösung eine irreversible, unspezifische Änderung von Impedanz, Phasenverschiebung und Kapazität zeigten, wurden als nächstes AZO-Proben mit 70 nm Schichtdicke untersucht. Deren elektrische Eigenschaften in Elektrolytlösung waren 48 Stunden lang stabil, sodass aussagekräftige EIS-Messungen durchgeführt werden konnten.

Da sich nach 60 Stunden in Elektrolytlösung auch die elektrischen Eigenschaften der AZO Proben mit 70 nm Dicke änderten, wurden vor und nach den EIS-Messungen Lichtmikroskopieaufnahmen durchgeführt (siehe Abb. 3.6). Das Flachbandpotential wurde analog zu den Messungen mit ITO mittels Mott-Schottky-Plot ermittelt und betrug -867mV (siehe Abb. 3.7).



**Abbildung 3.5:** Vergleich der CV Messungen auf AZO vor und nach EIS-Messungen. Nach den EIS-Messungen zeigte die Probe nur mehr ohmschen Widerstand.



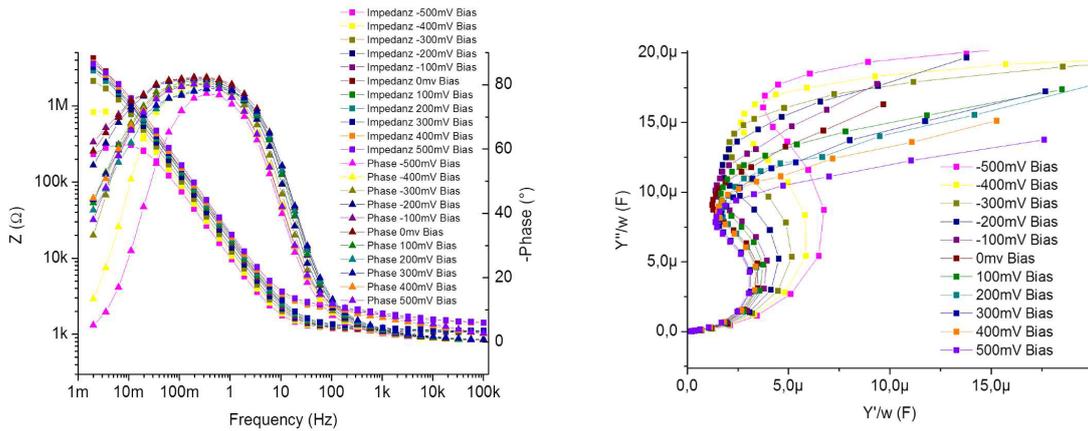
**Abbildung 3.6:** Mikroskopieaufnahmen einer AZO-Probe mit 70 nm Schichtdicke a) vor den EIS-Messungen und b) nach den EIS Messungen. Rechts sind deutliche Ablösungen zu erkennen.

Auf der Aufnahme, die nach den Messungen gemacht wurde sind deutliche Inhomogenitäten auf der Probenoberfläche zu sehen, was auf Materialablagerungen oder Materialablösungen schließen lässt und die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften der Proben (siehe Abb. 3.4 und Abb. 3.5) erklärt. Um zu testen, welche von beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden die Proben nach den Messungen erneut mit den organischen Lösungsmitteln Aceton, Ethanol und Wasser sowie mit 2% Hellmanex II gereinigt. Da sich die Oberfläche auch nach dieser Reinigung nicht mehr veränderte, musste es sich um Ablösungen handeln. Für ITO ist es bereits bekannt, dass die Oberfläche bei elektrischer Polarisierung in basischer Umgebung abgetragen wird [42]. Für AZO existieren hierfür keine Untersuchungen. Da AZO aber ebenso wie ITO ein oxidischer Halbleiter ist, ist anzunehmen, dass die Effekte an der Probenoberfläche in basischer Pufferlösung ähnlich sind.

Da das Flachbandpotential von AZO noch weiter im negativen als das von ITO lag, waren schlechtere Elektronentransfereigenschaften als bei ITO zu erwarten. Dennoch wurden CV-Messungen sowohl mit Kaliumhexacyanoferrat (II) als auch mit Cytochrom c durchgeführt (siehe Abb.3.8), jedoch war nicht einmal in den Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat (II) reversibler Elektronentransfer zu sehen.

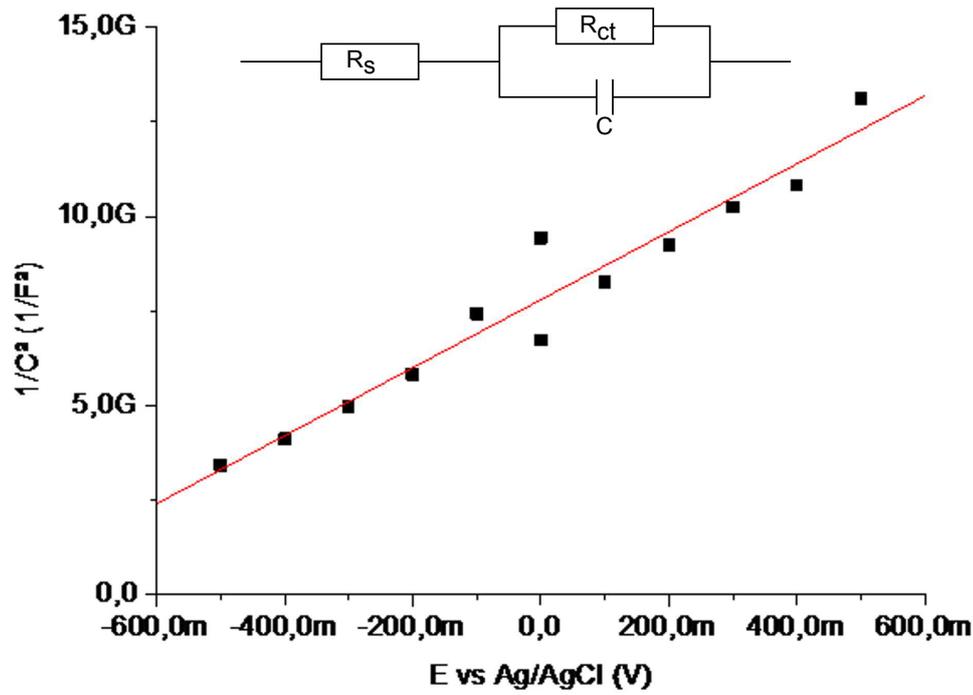
Betrachtet man die Bode Plots der EIS-Messungen genauer (Abb. 3.4 und Abb. 3.7a), so fällt auf, dass der Widerstand im Hochfrequenten Bereich bereits  $> 1k\Omega$  betrug, während er bei den ITO Proben abhängig vom angelegten Biaspotential zwischen 150 und  $400\Omega$  lag. Dies kann nicht alleine durch den Widerstand der Elektrolytlösung, für welche ein Widerstand von unter  $100\Omega$  zu erwarten war, erklärt werden. Deshalb wurden Messungen des Flächenwiderstands der AZO-Proben durchgeführt, welcher bei einer Schichtdicke von 70nm je nach Probe zwischen 350 und  $400\Omega$  betrug. Der Flächenwiderstand wird durch  $R_{\square} = \frac{\rho}{d}$  berechnet (siehe [43]) und ist nicht zu verwechseln mit dem in der EIS gemessenen Widerstand  $\frac{U}{I} = \frac{\rho l}{A}$  obwohl beide die Einheit  $\Omega$  haben. Hierbei ist  $\rho$  der spezifische Widerstand,  $d$  die Schichtdicke einer leitenden Fläche,  $l$  die Länge und  $A$  die Querschnittsfläche eines Leiters. Nur bei einem quadratischen Leiter mit Elektroden über die gesamte Länge zweier gegenüberliegender Kanten stimmt der Widerstand  $R$  mit dem Flächenwiderstand  $R_{\square}$  überein.

Vergleicht man die gemessenen Werte des Flächenwiderstands mit [44], so fällt auf, dass es durch Variation der Sputterparameter möglich ist, AZO-Proben mit einem um einen Faktor 5 niedrigeren Flächenwiderstand herzustellen, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war.



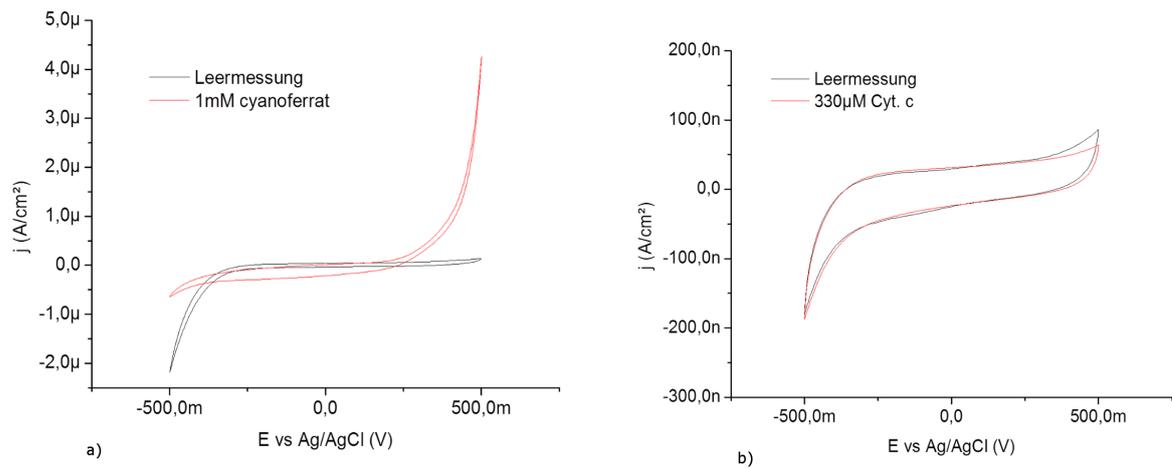
a)

b)



c)

**Abbildung 3.7:** a) Bode Plots, b) Frequenzreduzierte Admittanzplots und c) Mott-Schottky Plot und Ersatzschaltbild von EIS-Messungen einer AZO-Probe mit 70 nm Schichtdicke bei Biaspotentialen von -500 bis 500 mV.  $E_{FB} = -867\text{mV}$   
 Für das Ersatzschaltbild gilt:  $R_s$  = Widerstand der Elektrolytlösung,  $R_{ct}$  = Ladungstransferwiderstand und  $C$  = Kapazität der Grenzschicht zwischen Festkörper und Elektrolyt

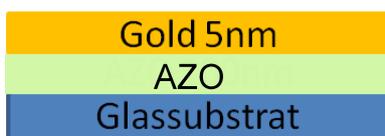


**Abbildung 3.8:** CV Messungen a) mit Kaliumhexacyanoferrat(II) und b) mit Cytochrom c. In a) ist nur irreversibler Elektronentransfer zu erkennen, in b) findet überhaupt kein Elektronentransfer statt.

Im Gegensatz zu den ITO-Proben waren die Eigenschaften der AZO Proben reproduzierbar. Jedoch war das Flachbandpotential von AZO wiederum in einem Bereich, der zu tief lag, um im Bereich des Redoxpotentials der verwendeten Proteine metallisches Verhalten der Probenoberfläche und somit direkten Elektronentransfer zu gewährleisten. Somit können auch AZO-Oberflächen nicht für die Untersuchung von CcO herangezogen werden.

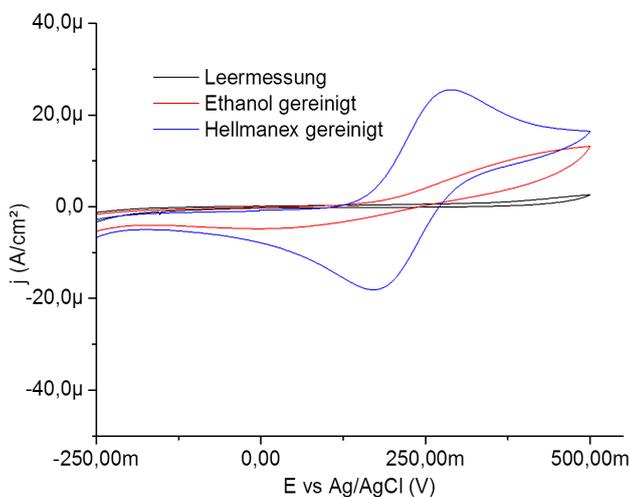
### 3.1.3 Goldbeschichtetes Aluminium dotiertes Zinkoxid

In [45] ist beschrieben, dass ultradünne Goldschichten die Elektronentransfereigenschaften von transparenten Halbleitern wesentlich verbessern können. Deshalb wurden CV-Messungen auf 100nm dicken AZO Proben mit 5nm dicker Goldbeschichtung (siehe Abb. 3.9) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Reinigung beziehungsweise Präparation der Probenoberfläche großen Einfluss auf die Elektronentransfereigenschaften hatte.



**Abbildung 3.9:** Aufbau der Goldbeschichteten AZO-Proben

Zunächst wurden Messungen mit 1mM Kaliumhexazyanoferat (II) durchgeführt, um zu testen ob auf dieser Oberfläche Elektronentransfer möglich ist, wobei ein Teil der Proben mit Ethanol und ein Teil mit Hellmanex II (2%) gereinigt wurde (siehe Abb. 3.10). Die Proben, die mit Ethanol gereinigt wurden, zeigten nur irreversible

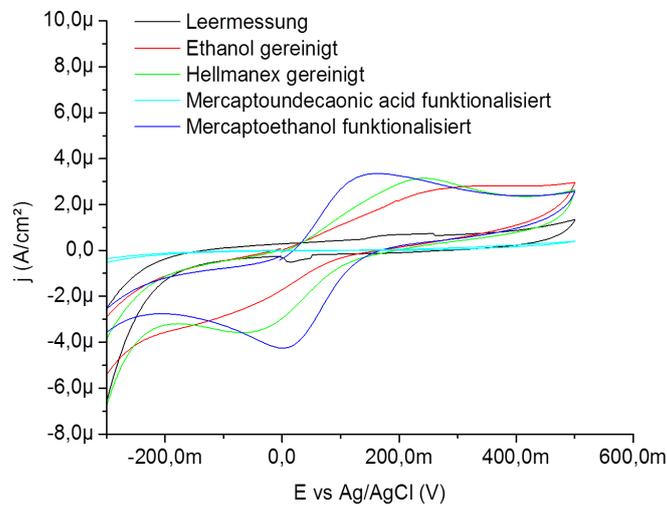


**Abbildung 3.10:** CV-Messungen auf AZO/Gold mit 1mM Kaliumhexacyanoferat (II). Nach Reinigung mit Ethanol ist kein reversibler Elektronentransfer zu erkennen, nach Reinigung mit Hellmanex II wurde reversibler Elektronentransfer gemessen.

Elektronentransfer, während bei den Proben, die mit Hellmanex II gereinigt wurden quasireversibler Elektronentransfer mit  $\Delta E = 117mV$  gemessen wurde, was bereits nahe am theoretischen Wert für reversiblen Elektronentransfer ist.

Bei den CV-Messungen mit  $330 \mu M$  Cytochrom c wurde in den ersten Experimenten

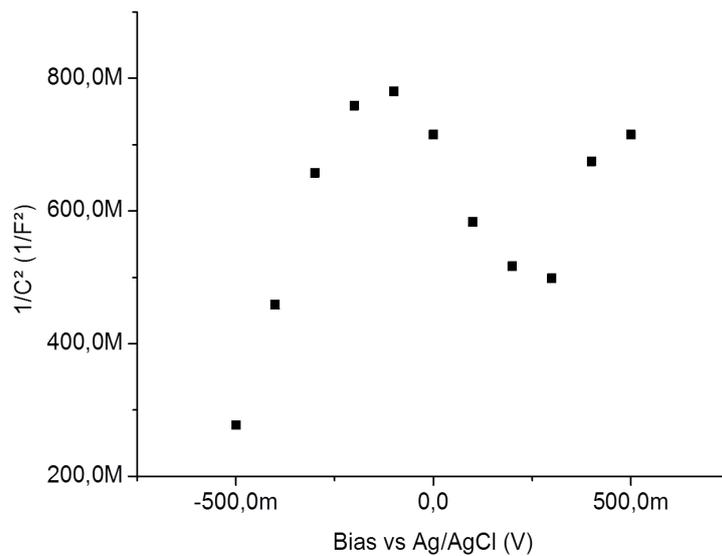
die Oberfläche gleich behandelt wie bei den Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat (II). Jedoch war weder bei den Proben, die mit Ethanol gereinigt wurden, noch bei den mit Hellmanex II gereinigten Proben reversibler Elektronentransfer zu beobachten, wobei die Peaks bei den Hellmanex II gereinigten Proben eine Auswertung der Peakseparation zuließen ( $\Delta E = 311mV$ ), während die Peaks bei den Ethanol gereinigten Proben zu wenig ausgeprägt waren, um die Peakseparation auszuwerten. Im nächsten Schritt wurde ein Teil der Hellmanex II gereinigten Proben mit Mercaptoundecaonic acid und ein anderer Teil mit Mercaptoethanol funktionalisiert (siehe Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11:** CV-Messungen mit  $330 \mu M$  Cytochrom c. Sowohl die Ethanol gereinigten als auch die Hellmanex II gereinigten Proben zeigten keinen reversiblen Elektronentransfer und Mercaptoundecaonic acid passivierte die Oberfläche. Bei den Mercaptoethanol funktionalisierten Proben war quasireversibler Elektronentransfer zu erkennen.

Mercaptoundecaonic acid passivierte die Probenoberfläche, sodass bei den so funktionalisierten Proben kein Elektronentransfer zu erkennen war. Die Messungen der Mercaptoethanol funktionalisierten Proben zeigten quasireversiblen Elektronentransfer mit einer Peakseparation von ( $\Delta E = 160mV$ ).

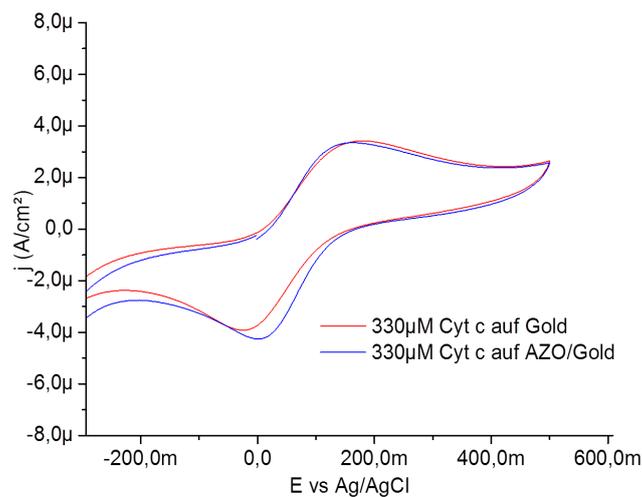
Als letzter Schritt wurden EIS Messungen der Gold beschichteten AZO Proben bei Biaspotentialen von  $-500$  bis  $500$  mV durchgeführt. Die anschließende Mott-Schottky-Auswertung zeigte, dass mit  $5nm$  Gold beschichtete AZO-Proben kein Halbleiterverhalten mehr aufweisen (siehe Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12:** Mott-Schottky Auswertung einer Gold beschichteten AZO Probe. Die Probe zeigt kein Halbleiterverhalten

### 3.1.4 Gold

In den Messungen, die in Abb. 3.12 zusammengefasst sind, wurde gezeigt, dass sich mit 5 nm Gold beschichtetes AZO nicht wie ein Halbleiter verhält. Deshalb wurden CV-Messungen auf einer 5 nm dicken Goldschicht durchgeführt. Diese wurden mit den CV-Messungen auf Gold beschichtetem AZO verglichen (siehe Abb. 3.13). Die Proben wurden mit Mercaptoethanol funktionalisiert. Die Stromdichte war bei



**Abbildung 3.13:** CV-Vergleichsmessung zwischen Gold beschichtetem AZO und einer 5nm dicken Goldschicht.

beiden Proben gleich groß und die Peakseparation war bei den Proben ohne AZO nur um 50 mV größer, als beim AZO/Gold Schichtsystem. Das bedeutet, dass die elektrischen Eigenschaften des Goldes dominieren. Deshalb wurde im Weiteren kein AZO mehr verwendet, sondern mit 5 nm Gold als transparente leitfähige Schicht gearbeitet.

### 3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden Elektrochemiemessungen auf verschiedenen transparenten leitfähigen Oberflächen durchgeführt. Bei den ITO-Proben zeigten bereits Proben aus der selben Charge unterschiedliche elektrische Eigenschaften. CV-Messungen zeigten, dass auf ITO prinzipiell Ladungstransfer möglich ist. Jedoch liegt das Flachbandpotential unterhalb des Redoxpotentials der Redoxzentren der zu untersuchenden Proteine. Da Typ n Halbleiter oberhalb des Flachbandpotentials Isolatorverhalten zeigen, war im relevanten Potentialbereich kein Elektronentransfer von den Redoxspezies zur ITO Oberfläche zu beobachten.

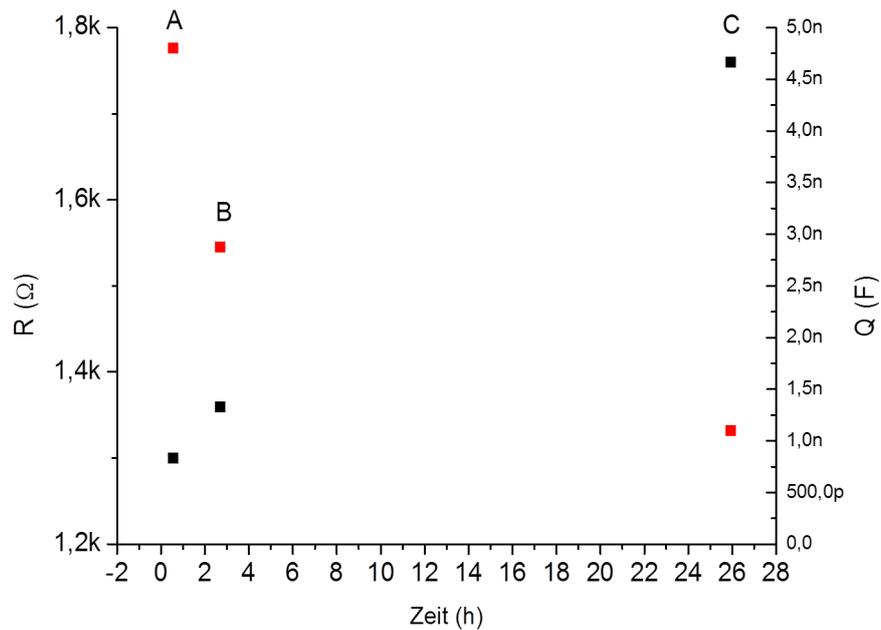
AZO hatte generell einen höheren Widerstand als ITO. Die elektrischen Eigenschaften der AZO-Proben verhielten sich um so stabiler, je höher die Probendicke war. Jedoch war das Flachbandpotential aller AZO-Proben noch unter dem Flachbandpotential von ITO und damit weit unter dem Redoxpotential der verwendeten Redoxspezies, weshalb nicht einmal mit Kaliumhexacyanoferrat (II) reversibler Elektronentransfer beobachtbar war. Eine dünne Goldschicht verbessert die Ladungstransfereigenschaften von transparenten Halbleitern [46], weshalb auf 100 nm AZO, welches mit 5 nm Gold beschichtet ist, reversibler Elektronentransfer mittels CV-Messungen beobachtbar ist. Mott-Schottky Auswertungen dieser Oberfläche ergaben, dass kein Halbleiterverhalten vorliegt. Damit lässt sich auf eine geschlossene Goldschicht schließen. Deshalb wurden diese CV-Messungen auf einer 5nm dicken Goldprobe ohne AZO durchgeführt. Diese wurden mit den vorherigen CV-Messungen verglichen und ergaben Elektronentransfer in ähnlicher Größenordnung wie auf dem AZO-Gold-Schichtsystem, weshalb Elektrochemie-Messungen statt auf AZO mit 5 nm Goldbeschichtung auch auf der Goldoberfläche alleine durchgeführt werden können.

## 3.2 Nachweis der Protein verankerten Doppellipidmembran auf Tantalpentoxid mittels Elektrochemischer Impedanz Spektroskopie

Um die Bildung der ptBlm auf Tantalpentoxid mit einem von optischen Messungen unabhängigen Verfahren nachzuweisen, wurden EIS-Messungen mittels Messung elektrischer Felder durchgeführt. Hierfür sind Goldelektroden in Form von Kammelektroden unterhalb einer Isolatorschicht (in dieser Arbeit Tantalpentoxid) aufgebracht. Der verwendete Chip hatte die Abmessungen 3 x 3 cm. Als Messkammer diente ein Bereich von etwa 6 x 6 mm unter dem sich die Kammelektroden befanden (vier "Sätze" Kammelektroden zu jeweils 1 x 2 mm) und welcher mit PDMS (siehe Anhang) abgedichtet wurde.

Im Gegensatz zu EIS-Messungen auf leitfähigen Schichten, wo in einem Frequenzbereich von 2 mHz bis 100 kHz gemessen wird, hat sich hier ein Frequenzbereich von 10 kHz bis 120 kHz als sinnvoll erwiesen. Als Ersatzschaltbild dient ein R-Q-Glied, wobei Q ein Constant-Phase-Element ist, welches wie folgt definiert ist:

Für die Impedanz gilt:  $Z = \frac{1}{Q(i\omega)^n}$  wobei n eine Zahl zwischen 0 und 1 ist. Für n=0 entspricht das Verhalten einem Widerstand, für n=1 entspricht das Verhalten einem idealen Kondensator. Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen nicht idealen Kondensator, deshalb wird die Einheit des Constant Phase Element im Folgenden als Kapazität bezeichnet. In Abb. 3.14 sind Widerstand und Kapazität des Messsystems aufgetragen, wobei in dem verwendeten einfachen Ersatzschaltbild nicht zwischen Lösungsmittelwiderstand und Widerstand der Probe differenziert wird. Stattdessen werden der Widerstand und die Kapazität des gesamten Systems ausgewertet. Der Widerstand betrug in der Referenzmessung 1,3 k $\Omega$ , stieg mit der Proteinanbindung auf 1,35 k $\Omega$  und mit Bildung der ptBlm auf 1,76 k $\Omega$  an. Die Kapazität betrug vor Proteinanbindung 5 nF. Diese sank nach Proteinanbindung auf 2,9 nF und mit Bildung der ptBlm auf 1,1 nF. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, da die Membran ein zum Rest des Systems in Serie geschaltetes RC-Glied darstellt. Nachteil dieser Methode ist, dass nicht mehr mittels Cyklovoltametrie direkter Elektronentransfer zwischen Protein und Elektrode gezeigt werden konnte, da Tantalpentoxid ein Isolator ist.



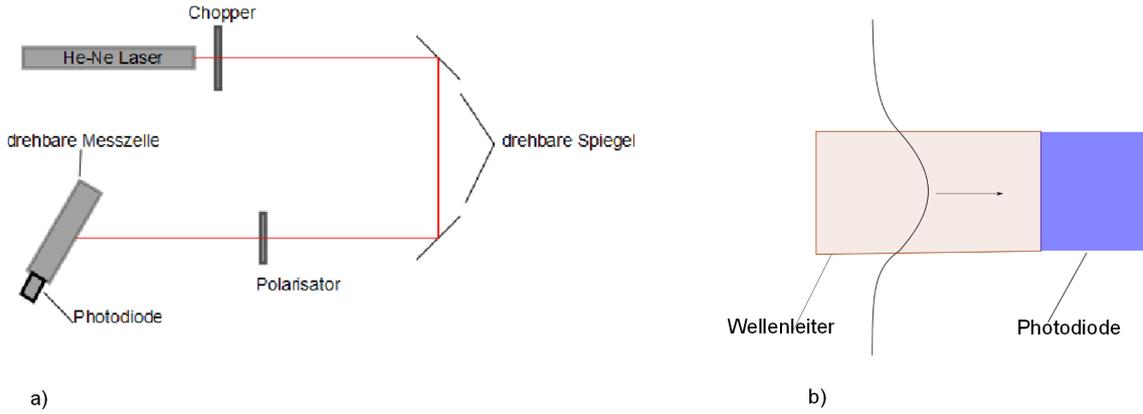
**Abbildung 3.14:** Widerstand (Schwarz) und Kapazität (Rot) des Messsystems. A ist vor Proteinzugabe, B ist nach Proteinanbindung und C ist nach Bildung der ptBlm

### 3.3 Optische Wellenleiterspektroskopie

OWS beruht auf der Tatsache, dass evaneszente Wellen sehr sensitiv auf Brechungsindexänderungen an der Probenoberfläche reagieren. Den Messaufbau, welcher Teil dieser Arbeit war, sieht man in Abb. 3.15. Der Strahl eines Helium-Neon Lasers wird über drehbare Spiegel durch einen Polarisator auf die Messzelle, in die die Probe eingebaut ist, gelenkt. Diese wird mittels eines Goniometers, welches von einem Fünfphasenmotor gesteuert wird, gedreht. Der Fünfphasenmotor ermöglicht Drehungen in  $\frac{1}{1000}^\circ$  Schritten. Der Laserstrahl wird mittels Koppelgitter in den Wellenleiter eingekoppelt, propagiert dann als elektromagnetische Wellenleitermode durch den Wellenleiter und wird an der Stirnfläche mittels Photodiode detektiert. Misst man die resultierende Intensität abhängig vom Winkel der Flächen-normalen der Probe auf den Laserstrahl, so erhält man einen Graphen, wie er in Abb. 3.16 b) gezeigt ist.

#### 3.3.1 Charakterisierung der Tantalpentoxidschicht

Zunächst wurde berechnet, welche Gitterkonstante die verwendeten Koppelgitter haben sollten. Die Kriterien hierfür sind, dass bei Bestrahlung mit einem Helium-Neon Laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) die Wellenleitermoden mit den gebrochenen Strahlen positiver



**Abbildung 3.15:** a) Messaufbau für die OWS-Messungen. Die drehbaren Spiegel dienen zur Justage. Die Drehung der Messzelle erfolgt über ein Goniometer, welches mit einem Fünfphasenmotor gesteuert wird, sodass Drehungen in tausendstel Grad Schritten möglich sind.  
b) Propagation einer Mode im Wellenleiter

erster Ordnung bei möglichst kleinen Winkeln angeregt werden. Die Brechungsindizes der Pufferlösung sowie des Substrats sind bekannt und betragen  $n_p = 1,33$  und  $n_s = 1,52$ . Der Grund, warum Einkopplung bei möglichst kleinen Winkeln angestrebt wird, ist folgender:

Für die Unschärfe einer Mode  $\delta\bar{N}$  gilt [2]:

$$\delta\bar{N} = \frac{\lambda}{L_x}, \quad (3.1)$$

wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und  $L_x$  die Breite des Gitters ist. Mit

$$\bar{N} = N_{eff} - n \sin \alpha - \frac{\lambda}{\Lambda} \quad (3.2)$$

und

$$\delta\bar{N} = \left( N_{eff} - n \sin \alpha_1 - \frac{\lambda}{\Lambda} \right) - \left( N_{eff} - n \sin \alpha_2 - \frac{\lambda}{\Lambda} \right) \quad (3.3)$$

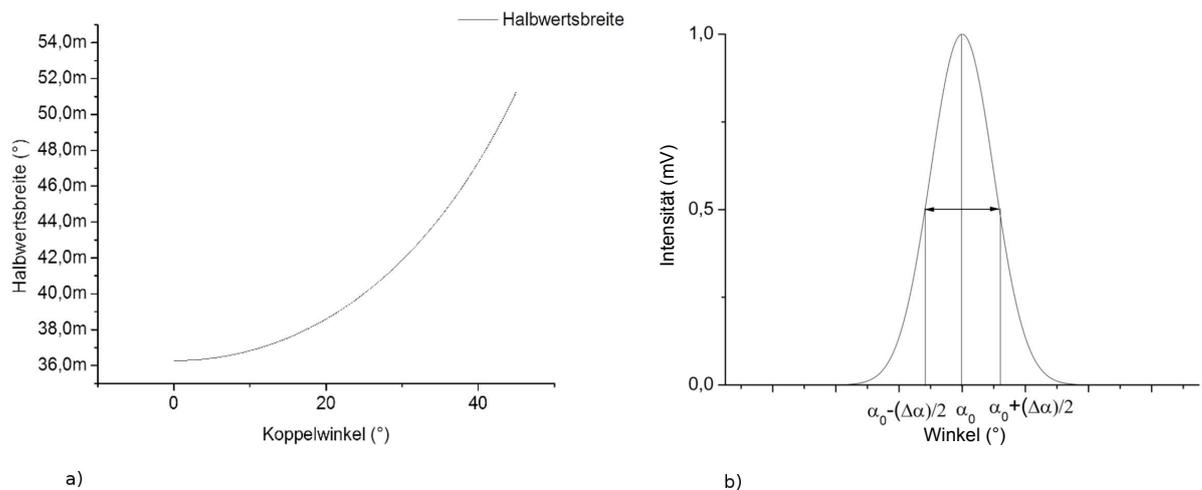
sowie

$$\alpha_1 = \alpha + \frac{\Delta\alpha}{2} \quad \text{und} \quad \alpha_2 = \alpha - \frac{\Delta\alpha}{2} \quad (3.4)$$

folgt daraus

$$\Delta\alpha = 2 \arcsin \frac{\lambda}{2L_x \cos \alpha}, \quad (3.5)$$

wobei  $N_{eff}$  der effektive Brechungsindex,  $\alpha$  der Koppelwinkel und  $\Delta\alpha$  die Winkelhalbwidthsbreite der jeweiligen Mode sowie  $n$  der Brechungsindex von Luft ist. Aus Gleichung 3.5 folgt, dass die Moden umso schärfer sind, je kleiner der Koppelwinkel ist (siehe Abb.3.16).

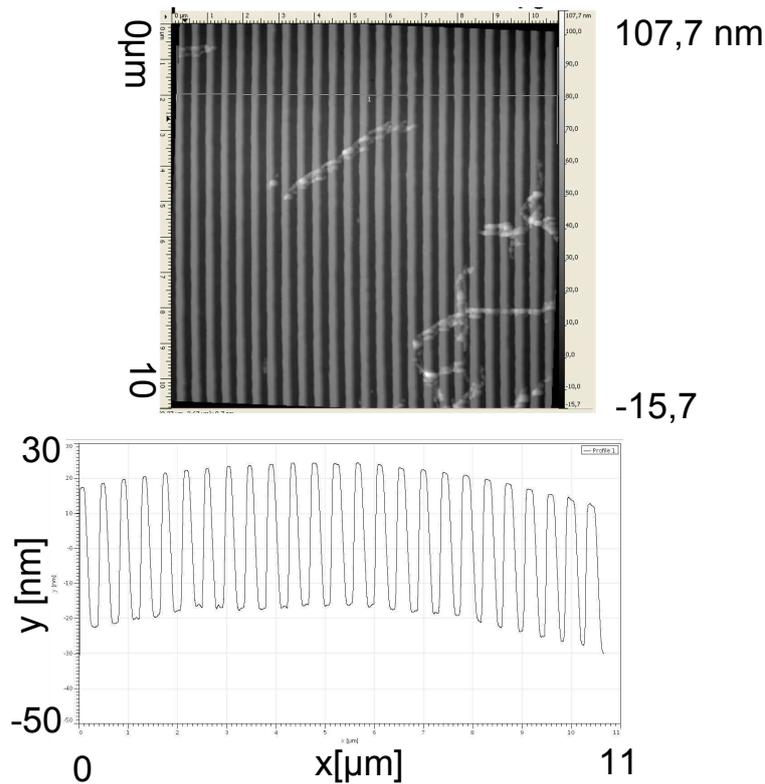


**Abbildung 3.16:** a) Die theoretisch erreichbare Halbwertsbreite einer Wellenleitermode als Funktion des Koppelwinkels bei feststehender Gitterbreite  
 b) Winkelhalbwidthbreite  $\Delta\alpha$  einer Mode um den Koppelwinkel  $\alpha_0$

Für Tantalpentoxid wurde ein Brechungsindex von  $n=1,8$  angenommen [4]. Bei einer Gitterkonstante von  $\Lambda = 420\text{nm}$  ergeben sich Koppelwinkel von  $\approx 6^\circ$  für die  $TM_0$ -Mode und  $\approx 9^\circ$  für die  $TE_0$ -Mode. Da in den verwendeten Wellenleitern nur die  $TM_0$ - und  $TE_0$ -Mode existieren, werden die Moden im Folgenden nur mehr als TM beziehungsweise TE Mode (ohne Index) bezeichnet. Gitter mit einer Gitterperiode von  $\Lambda = 430\text{nm}$  wurden durch Ionenstrahlätzen (Reactive Ion Etching) hergestellt (siehe Abb. 3.17).

Sowohl die Sensitivität als auch die Anzahl der geführten Moden hängen von der Dicke des Wellenleitermaterials ab. Unterschreitet die Dicke einen für jede Mode anderen charakteristischen Wert, so kann die jeweilige Mode nicht mehr im Wellenleiter geführt werden. Dieses Phänomen wird cutoff genannt.

Die mit den Gittern versehenen Substrate wurden durch DC magnetron sputtering mit Tantalpentoxid beschichtet. Eine Simulation ergab als geeignete Dicke, bei der die Sensitivität der TM und TE-Mode noch möglichst groß ist, die aber dennoch vom Cutoff der TM-Mode weit genug entfernt ist, sodass bei  $\approx 10\%$  geringerer Dicke (beispielsweise durch Ungenauigkeit in der Kalibrierung der Sputteranlage) noch beide Moden vorhanden sind, 200nm. In dieser Simulation wurden die effektiven Brechungsindizes für ein Schichtsystem aus Glas als Substrat ( $n=1,52$ ), Tantalpentoxid (angenommenes  $n=1,8$ ) und Pufferlösung ( $n=1,33$ ) in Abhängigkeit von der Schichtdicke des Tantalpentoxid berechnet. Dann wurden die effektiven Brechungsindizes für das "dazugehörige" Vierschichtsystem, bei dem auf dem Tantalpentoxid des eben beschriebenen Systems eine Schicht mit  $n=1,45$  und  $d=5\text{ nm}$  (angenommener Bre-

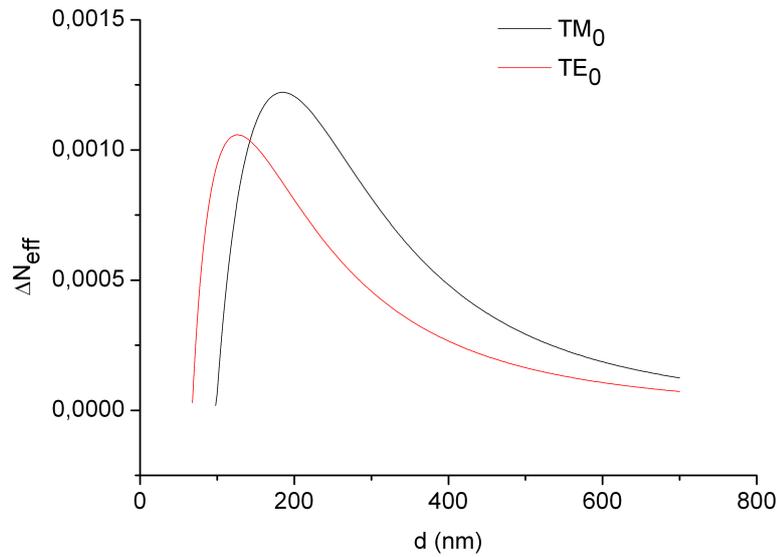


**Abbildung 3.17:** AFM-Aufnahme eines Koppelgitters mit 430nm Gitterperiode Topografie (oben) und Linienprofil an der eingezeichneten Stelle(unten)

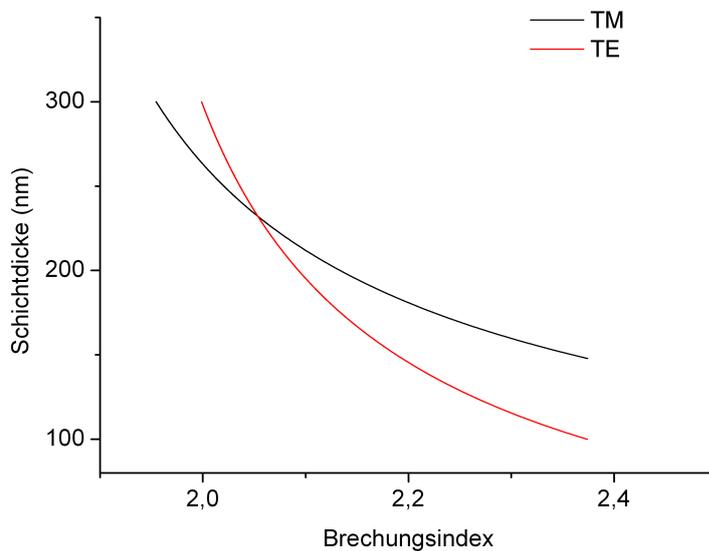
chungsindex und Schichtdicke der CcO) angebracht ist, berechnet. Als letzten Schritt wurde die Differenz der effektiven Brechungsindizes gebildet und gegen die Schichtdicke aufgetragen (siehe Abb. 3.18). OWS-Messungen gegen Luft als Covermedium zur Charakterisierung der Proben ergaben Koppelwinkel von  $17,2^\circ$  für die TM-Mode und  $23,2^\circ$  für die TE-Mode. Mit der Gleichung

$$N_{eff}k = k \sin \alpha + \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (3.6)$$

folgen daraus effektive Brechungsindizes von 1,76781 für die TM-Mode und 1,8663 für die TE-Mode. Setzt man diese Werte in die Gleichungen 2.40 und 2.42 ein und löst das Gleichungssystem numerisch, so ergibt das einen Brechungsindex von  $n=2,0536$  und eine Schichtdicke von  $d=232,2$  nm für die Tantalpentoxidschicht (siehe Abb. 3.19). Der Brechungsindex ist zwar höher als angenommen, jedoch wurde bereits in [3] und [47] ein Brechungsindex gleicher Größe gemessen. Die etwas höhere Schichtdicke kommt daher, dass Tantalpentoxid ein Material ist, das sehr aufwendig zu sputtern ist und deshalb mit den Mitteln, die in dieser Arbeit zur Verfügung standen, nicht mit höherer Schichtdickengenauigkeit herzustellen war, da es keine



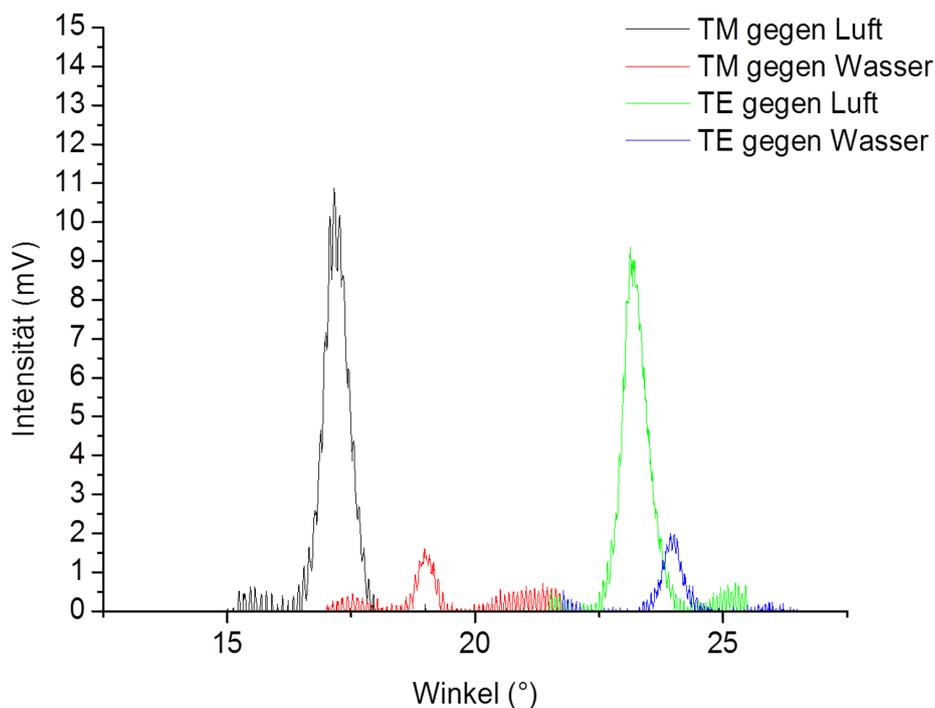
**Abbildung 3.18:** Simulation der Sensitivität der Moden bei Beschichtung des Wellenleiters mit einer 5 nm Dicken Schicht mit  $n=1,45$  (angenommener Brechungsindex der CeO) gegen die Dicke des Wellenleiters aufgetragen. Die Dicke, bei der  $\Delta N_{eff}$  auf Null sinkt, entspricht dem Cutoff der jeweiligen Mode



**Abbildung 3.19:** Auswertung des Dreischichtsystems: Die Schichtdicke der beiden Moden wurde für feststehende effektive Indizes ( $N_{eff,TM} = 1,76781$  und  $N_{eff,TE} = 1,8663$ ) gegen den Brechungsindex aufgetragen. Der Schnittpunkt der beiden Kurven entspricht der Dicke (232,2 nm) und dem Brechungsindex (2,0536) des Wellenleiters

exakten Kalibrierungen für die benötigten Schichtdicken von Tantalpentoxid gab. Eine Kalibrierung der Sputteranlage für Schichtdicken im Bereich von 200 nm wäre zwar möglich, war aber außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

OWS-Messungen gegen Wasser als Covermedium ergaben Koppelwinkel von  $19,01^\circ$  für die TM-Mode und  $23,97^\circ$  für die TE-Mode, was einem Brechungsindex von  $n=2,0587$  und einer Schichtdicke von  $d=230$  nm entspricht (siehe Abb.3.20). Vergleicht man die Halbwertsbreiten der gemessenen Moden aus Abb. 3.20 mit den berechneten Halbwertsbreiten aus Abb. 3.16, so fällt auf, dass die gemessenen Modenbreiten um eine Größenordnung größer sind als die berechneten. Es gibt zwei Möglichkeiten, die Halbwertsbreite zu verringern. Einerseits über optimiertes Gitterdesign und andererseits über homogenere Beschichtung des Substrats mit Tantalpentoxid mittels einer Sputteranlage, mit der es möglich ist, großflächig zu sputtern. Betrachtet man die gegen Luft und Wasser gemessenen Brechungsindizes, so erkennt



**Abbildung 3.20:** Messung der TM und TE Mode gegen Luft und Wasser. Die geringere Intensität bei der Messung gegen Wasser kommt daher, dass gegen Wasser beide Polarisationsrichtungen in einer Messung gemessen wurden (entspricht einer Polarisatoreinstellung von  $45^\circ$ , wobei  $0^\circ$  s-Polarisation und  $90^\circ$  p-Polarisation entspricht). Die Spektren wurden basislinienkorrigiert

man, dass die Brechungsindizes mit einer Genauigkeit von  $10^{-2}$  angegeben werden können. Die Änderung der Schichtdicke zwischen der Messung gegen Luft und ge-

gen Wasser lässt sich dadurch erklären, dass die Proben zwischen den Messungen im Ultraschall und im Plasmacleaner gereinigt wurden. Durch diese Behandlung kann eine dünne Schicht Tantalpentoxid abgetragen werden. Vergleicht man die Koppelwinkel der Moden beider Messungen, so erkennt man, dass die TM-Mode dreimal so sensitiv auf Brechungsindexänderungen reagiert wie die TE-Mode. Vergleicht man diese Messungen mit Sensitivitätsmessungen in [2] und [3], so liegen die Ergebnisse bezüglich der Sensitivität der Moden im Vergleich untereinander bei ähnlicher Größenordnung.

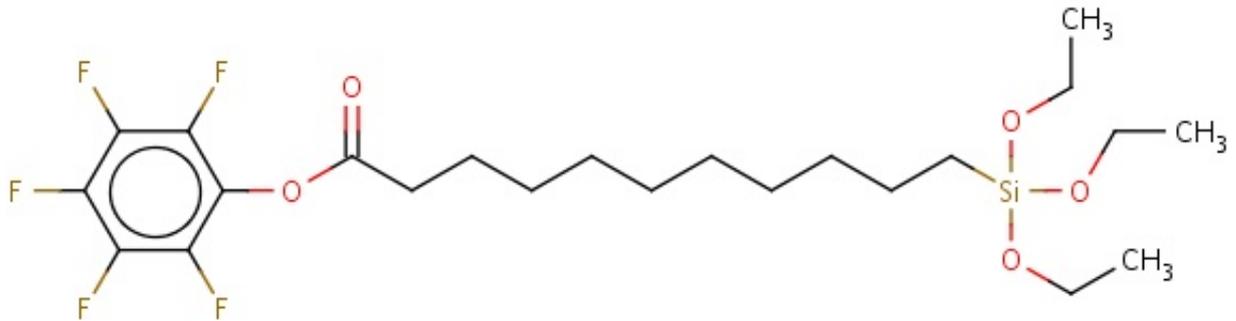
### **3.3.2 Anbindung von Cytochrom c Oxidase und Bildung der Protein verankerten Doppellipidschicht auf Tantalpentoxid**

#### **Reinigung und Funktionalisierung der Proben**

Damit Proteine in spezifischer Orientierung an Tantalpentoxid anbinden konnten, mussten die Proben funktionalisiert werden. Als Vorbereitung dafür wurden sie zunächst mit den organischen Lösungsmitteln Aceton, Ethanol und Wasser jeweils 15 Minuten gereinigt. Durch Behandlung im Ultraschallbad können Mikrorisse in der Probe auftreten. Bei Vorhandensein solcher Mikrorisse kann die Andruckspannung, der die Probe in der Messzelle (siehe Anhang) ausgesetzt ist, zum Bruch der Probe führen. Deshalb wurden die Proben nicht im Ultraschallbad sondern bei  $50^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad gereinigt. Um die Probenoberfläche vollständig zu reinigen wurden die Proben mit Sauerstoffplasma behandelt. Dies hatte außerdem den Vorteil, dass damit eine eventuell noch bestehende Funktionalisierung einer früheren Messung entfernt wurde. Somit konnten die Proben mehrmals verwendet werden.

Im ersten Schritt der eigentlichen Funktionalisierung wurden die Proben silanisiert. Hierfür wurden sie neben einen Tropfen 11-Pentafluorophenylundecanoatetriethoxysilane (siehe Abb. 3.21) gelegt und eine Stunde bei  $150^{\circ}\text{C}$  in den Vakuumofen gelegt, damit sich die Silandämpfe an der Probenoberfläche anlagern konnten.

Im nächsten Schritt wurde die Probe für zwei Stunden in eine ANTA-Lösung (siehe Anhang) gestellt. Danach wurden die Proben mit destilliertem Wasser gespült. Im letzten Schritt der Funktionalisierung wurde die Probe für eine halbe Stunde in Nickel-Lösung (siehe Anhang) gestellt. Nach dieser halben Stunde wurde die Probe mit destilliertem Wasser gespült, da bei Spülung der Nickellösung mit PBS-Puffer  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  ausfallen würde.

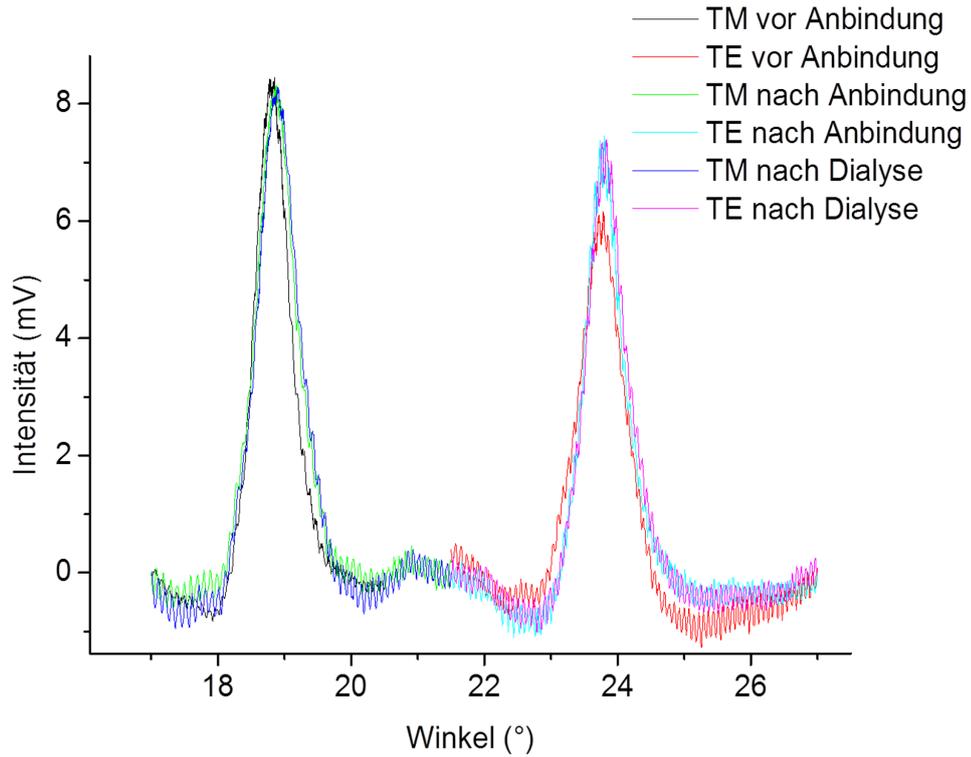


**Abbildung 3.21:** 11-Pentafluorophenylundecanoatetriethoxysilane Molekularstruktur - und Summenformel

### Durchführung der Messungen

Die so funktionalisierten Proben wurden in die Messzelle eingebaut und diese wurde mit PBS-Puffer gefüllt. Hierauf wurde ein Referenzspektrum vor der Proteinanbindung aufgenommen. Danach wurde in DDM Lösung (siehe Anhang) aufgelöstes CcO in die Zelle gefüllt (in der Zelle befindet sich nun 100 nM CcO) und eine Stunde gewartet, um das Protein anbinden zu lassen. Nachdem die Zelle mit DDM-Lösung gespült worden war, wurde wiederum ein Winkelspektrum aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde die Zelle mit Lipid-Lösung (siehe Anhang) gespült und Biobeads wurden zugegeben (Die Zelle wurde zwischen einem Drittel und der Hälfte mit Biobeads gefüllt). Danach wurde die Probe zwei Tage zur Membrandialyse stehengelassen. Danach wurde mit PBS-Puffer gespült und ein letztes Winkelspektrum aufgenommen. Sowohl durch die Anbindung des Proteins als auch durch die Membranbildung vergrößert sich der Brechungsindex an der Probenoberfläche, was zu einer Verschiebung der Wellenleitermoden zu größeren Winkeln hin führt (siehe Abb. 3.22).

In Tabelle 3.1 sieht man die Koppelwinkel und effektiven Brechungsindizes der Wellenleitermoden vor und nach der Proteinanbindung sowie nach Bildung der ptBlm.



**Abbildung 3.22:** Winkelspektren vor und nach der Anbindung von CcO an Tantalpentoxid und nach der Dialyse der ptBlm . Die Spektren wurden basislinienkorrigiert.

	TM vor Anb.	TM nach Anb.	TM nach Dial.	TE vor Anb.	TE nach Anb.	TE nach Dial.
Winkel (°)	18,811	18,876	18,906	23,756	23,784	23,824
$N_{eff}$	1,79454	1,79561	1,7961	1,87493	1,87539	1,87602

**Tabelle 3.1:** Koppelwinkel und effektive Brechungsindizes der Wellenleitermoden vor Proteinanbindung, nach Proteinanbindung und nach Bildung der ptBlm durch Dialyse.

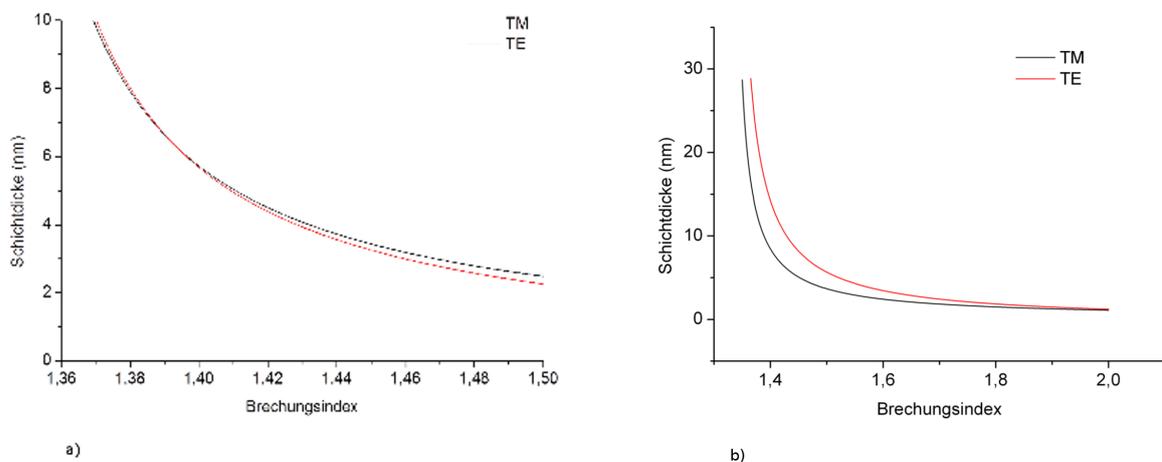
Die Auswertung des Vierschichtsystems erfolgte gemäß der Formel

$$\Phi = k_{z,F}d + \Phi_{FS} + \Phi_{FF'C} = 2\pi m \quad \text{mit} \quad k_{z,F} = k\sqrt{n^2 - N_{eff}^2} \quad (3.7)$$

aus [2], wobei  $\Phi_{FS}$  und  $\Phi_{FF'C}$  die Phasenverschiebungen an den Grenzflächen des Wellenleiters sind,  $d$  und  $n$  die Schichtdicke und der Brechungsindex des Wellenleiters sind und für die verwendeten Moden  $m = 0$  gilt. Die Berechnung wurde mit Octave [48] mit Hilfe der Funktion `fsolve` durchgeführt. Die Referenzmessung vor Anbindung der CcO ergab eine Schichtdicke von 230nm und einen Brechungsindex von 2,05 für den Wellenleiter, was gut mit den Werten aus Abb.3.19 übereinstimmt, weshalb hier auf eine eigene Grafik verzichtet wird. Bei der Messung nach der Proteinanbindung

erhält man einen Brechungsindex von 1,39 und eine Schichtdicke von 6,4 nm für das Protein (siehe Abb. 3.23 a). In [49] ergaben Röntgenspektroskopieaufnahmen eine Dicke von 8,97 nm für CcO, was etwas höher ist als die mit OWS gemessene Dicke. Dies lässt sich durch geringe Besetzung der Probenoberfläche erklären.

Wertet man die Messungen nach Bildung der ptBlm aus, so erhält man kein Ergebnis im physikalisch erlaubten Bereich (siehe Abb. 3.23 b, die Kurven würden sich erst bei einem Brechungsindex von  $n = 2,24$  schneiden, welcher für Proteine unrealistisch ist). Dies deutet auf eine Anisotropie der ptBlm hin. Dies lässt sich dadurch



**Abbildung 3.23:** Schichtdicke als Funktion des Brechungsindex bei festgehaltenen effektiven Indizes a) nach Proteinanbindung ( $N_{eff, TM} = 1,79561$  und  $N_{eff, TE} = 1,87539$ ) b) nach Bildung der ptBlm ( $N_{eff, TM} = 1,7961$  und  $N_{eff, TE} = 1,87602$ )

erklären, dass CcO in definierter Ausrichtung in die ptBlm integriert ist. Auf Grund dieser strukturellen Ordnung unterscheidet sich der Brechungsindex für parallel polarisiertes Licht vom Brechungsindex für senkrecht polarisiertes Licht. Um trotzdem die Schichtdicke und die Brechungsindizes bestimmen zu können, sind Wellenleiter, welche pro Polarisationsrichtung mindestens zwei Moden führen, notwendig.

### 3.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden OWS Messungen mit Tantalpentoxid Wellenleitern auf Glassubstraten gegen Luft und Wasser beziehungsweise PBS-Puffer (gleicher Brechungsindex wie Wasser) ohne Funktionalisierung und Proteinbeschichtung zur Charakterisierung der Wellenleiter durchgeführt. Danach wurden die Proben funktionalisiert, CcO wurde angebunden und eine ptBlm wurde gebildet. Nach jedem dieser Schritte wurde ein

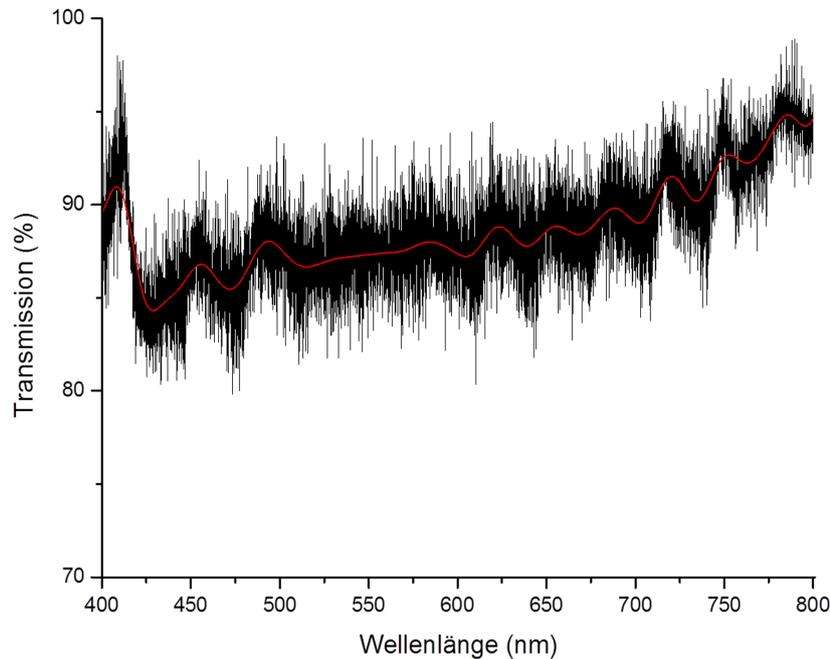
OWS-Winkelscan durchgeführt. Die Charakterisierung der Wellenleiter ergab einen Brechungsindex von 2,05 und eine Dicke von 230 nm. Eine Ellipsometriemessung, welche zum Vergleich durchgeführt wurde, ergab mit 2,079 für den Brechungsindex und 238 nm für die Schichtdicke ähnliche Werte. Messungen nach Proteinanbindung ergaben einen Brechungsindex von 1,39 und eine Schichtdicke von 6,4 nm für CcO. Die Ergebnisse nach Bildung der ptBlm sprechen für eine Anisotropie der Doppellipidmembran. Um auch bei Vorliegen von Anisotropie die Schichtdicke der Doppellipidmembran sowie die Brechungsindizes in beiden Polarisationsrichtungen messen zu können, werden Wellenleiter benötigt, welche in beiden Polarisationsrichtungen mehr als eine Mode führen. Die Halbwertsbreite der gemessenen Wellenleitermoden, welche ein gutes Maß für die Sensitivität und damit das Auflösungsvermögen des Wellenleiters ist, ist um eine Größenordnung größer, als der theoretisch erreichbare errechnete Wert. Diese ließe sich aber noch durch optimierte Gitter sowie homogeneres Sputtering verbessern. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Tantalpentoxid Schichtwellenleiter grundsätzlich geeignet sind, um die Anbindung von Proteinen an der Oberfläche zu detektieren. Mit den vorgeschlagenen Veränderungen kann auch die ptBlm charakterisiert werden.

## 3.4 Messungen auf einem Tantalpentoxid-Gold Schichtsystem

### 3.4.1 Optische Messungen

Als Erstes musste festgestellt werden, wie stark eine 5 nm dicke Goldschicht einfallendes Licht absorbiert. Hierfür wurden Transmissionsmessungen einer Probe mit 5 nm dicker Goldschicht im Vergleich zu einer Probe ohne Goldbeschichtung gemessen. Die Proben wurden mit Weißlicht einer 75 W Xe-Lampe, welches durch eine Glasfaser geleitet wurde, durchstrahlt und die Intensität mittels einer CCD-Kamera und eines Spektrometers gemessen (siehe Abb. 3.24). Die Messung ergab, dass je nach Wellenlänge zwischen 80 und über 95% des Lichtes durch die Probe transmittiert werden. Insbesondere bei einer Wellenlänge von 632,8 nm, der Wellenlänge des verwendeten He-Ne-Lasers, werden  $\approx 90\%$  des eingestrahnten Lichtes transmittiert.

Um auf den Gold beschichteten Tantalpentoxidproben Proteinanbindung messen zu können, wurden die Proben funktionalisiert. Die Funktionalisierung erfolgte ähnlich wie im vorherigen Kapitel beschrieben, jedoch wurden die goldbeschichteten Proben nicht silanisiert und dann in ANTA-Lösung gelegt. Stattdessen wurden sie 16 Stunden lang in eine 15:85 Mischung DTP-Lösung:DTNTA Lösung (siehe Anhang)



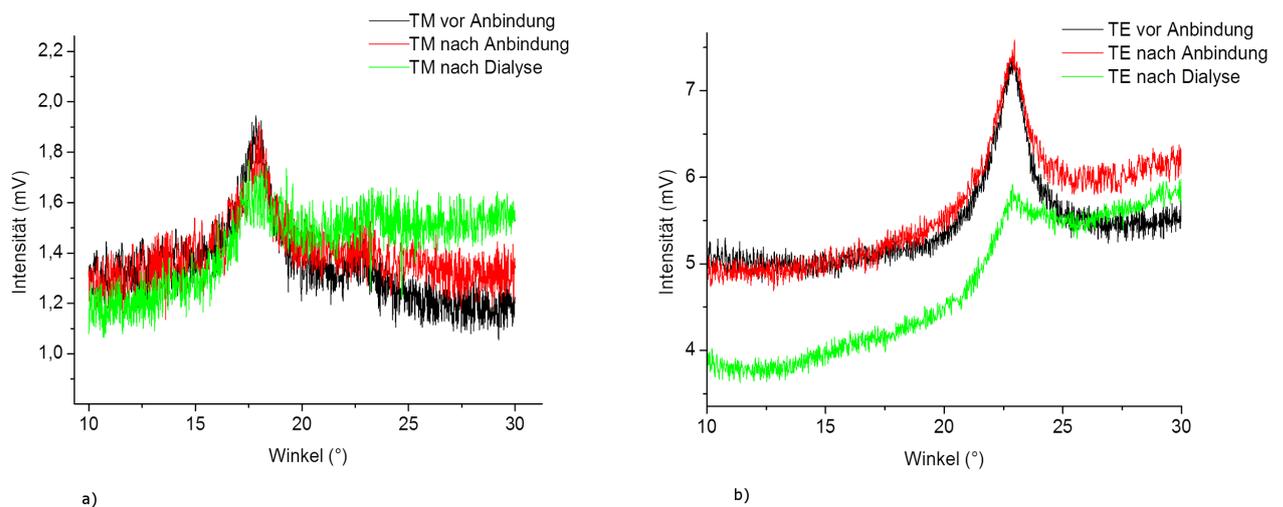
**Abbildung 3.24:** Transmissionsmessung einer goldbeschichteten Probe mit Weißlicht einer 75 W Xe-Lampe. Als Referenz (100%) diente eine Transmissionsmessung einer Probe ohne Goldbeschichtung.

gestellt.

Nach der Funktionalisierung wurden vor und nach der Proteinanbindung, sowie nach der Dialyse OWS-Winkelspektren aufgenommen (siehe Abb. 3.25).

Betrachtet man die Peakpositionen, so erkennt man keine auswertbare Änderung zwischen den Messungen, was gegen eine definierte Proteinanbindung spricht. Man erkennt jedoch eine Änderung der Peakform, was bedeutet, dass sehr wohl Effekte (beispielsweise unspezifische Adsorption) an der Probenoberfläche stattfinden. Betrachtet man die Spektren als Ganzes, so fällt auf, dass die Intensität der Wellenleitermoden geringer als bei den nicht goldbeschichteten Proben ist, was ein geringeres Signal-Rausch-Verhältnis zur Folge hat. Die Winkelhalbwidthen der Wellenleitermoden betragen je nach Mode zwischen  $1,5^\circ$  und  $3^\circ$ . Im Vergleich dazu betragen die Winkelhalbwidthen der Moden der nicht goldbeschichteten Proben nur zwischen  $0,6^\circ$  und  $0,8^\circ$ .

Diese hohe Modenbreite führt zu einer niedrigen Gütezahl des Wellenleiters. Dies macht ein Erkennen der Änderung des effektiven Brechungsindex und somit eine Bestimmung von Schichtdicken und Brechungsindizes mit ausreichender Genauigkeit unmöglich. Der Grund für die beiden Beobachtungen ist der im Fall von Gold



**Abbildung 3.25:** OWS-Winkelspektren auf Gold beschichtetem Tantalpentoxid vor und nach Proteinanbindung sowie nach Dialyse a) TM-Moden und b) TE-Moden

nicht mehr vernachlässigbare Extinktionskoeffizient. Des Weiteren waren nach der Funktionalisierung Beschädigungen der Probenoberfläche bereits mit freiem Auge zu sehen. Dies kommt daher, dass DTNTA, um die Oberfläche funktionalisieren zu können, mit dem Gold reagiert. Hierbei wird ein Teil der Oberfläche abgetragen. Bei SPR-Messungen (siehe zB. [1]) fällt dies nicht weiter auf, da dort die Goldschicht etwa 50 nm dick ist. Bei einer nur 5 nm dicken Goldschicht ist dieser Effekt jedoch zu groß, um vernachlässigt zu werden.

### 3.4.2 Elektrochemie Messungen

Bei einer EIS Messung auf Gold beschichteter Tantalpentoxid Oberfläche war zu erkennen, dass nach der Funktionalisierung mit DTNTA der Widerstand bereits im hochfrequenten Bereich bei etwa  $15\text{ k}\Omega$  lag, was darauf hindeutet, dass die Goldschicht nicht mehr geschlossen war.

### 3.4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden OWS Messungen auf Gold beschichtetem Tantalpentoxid durchgeführt. Obwohl Transmissionsmessungen, die zuvor durchgeführt worden waren, ergaben, dass etwa 90% des eingestrahlenen Lichtes durch die Goldschicht transmittieren, wurden die Moden durch die Goldschicht stark gedämpft. Dies lässt sich so erklären, dass eine Mode strahlenoptisch gesehen mehreren Totalreflexionen, sowohl an der Tantalpentoxid-Glas Grenzfläche als auch an der Tantalpentoxid-Gold Grenzfläche

ausgesetzt ist. Bei jeder dieser Totalreflexionen dringt der evaneszente Anteil der Welle in das Glas beziehungsweise Gold ein. Da der Extinktionskoeffizient von Gold bei der verwendeten Wellenlänge von  $\lambda = 632,8$  nm nicht vernachlässigbar ist und sich somit ein Teil der Welle in einem absorbierenden Medium ausbreitet, wird der Welle Energie entzogen, womit die reflektierte Welle geschwächt wird. Diesen Effekt nennt man abgeschwächte Totalreflexion (ATR) [6]. Dadurch betrug für die TM-Moden das Rauschen (Summe der positiven und negativen Abweichung vom Mittelwert außerhalb der Peaks) 0,2 mV bei einer Peakhöhe von nur 0,5 mV und einer Winkelhalbwidthsbreite zwischen 2,7 und 3°. Für die TE Moden betrug das Rauschen ebenfalls 2 mV. Die Peakhöhe betrug hier allerdings 2,5 mV bei einer Winkelhalbwidthsbreite von 1,5 bis 2°. Beim Versuch der Funktionalisierung wurde die Goldschicht beschädigt, sodass zumindest mit OWS keine definierte Proteinanbindung an der Probenoberfläche festgestellt werden konnte und EIS-Messungen nicht zielführend waren, da die Goldschicht nicht mehr geschlossen war, sodass bereits im hochfrequenten Bereich ein Widerstand von  $\approx 15k\Omega$  gemessen wurde.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war der Aufbau eines Setups, mit dem simultan OWS-Messungen und Elektrochemiemessungen am Membranprotein CcO durchgeführt werden können. Hierfür wurde berechnet, bei welcher Schichtdicke der Tantalpentoxid Wellenleiter eine möglichst große Sensitivität bezüglich der  $TM_0$  und der  $TE_0$  Mode hatte, und bei welcher Gitterkonstante die Einkopplung des Lichtes in den Wellenleiter bei möglichst kleinen Winkeln erfolgt. Entsprechende Wellenleiter wurden hergestellt. Weiters wurden verschiedene transparente, leitfähige Schichten auf ihre Eignung zum Nachweis direkten Elektronentransfers zu Hämproteinen getestet. Schließlich wurden beide Methoden kombiniert, indem ein Wellenleiter mit einer dünnen Goldschicht besputtert wurde.

Es wurden EIS-Messungen auf verschiedenen transparenten leitfähigen Schichten durchgeführt. Bei ITO lag das Flachbandpotential bei -273 mV, bei AZO bei -867 mV. Beides ist unterhalb des Redoxpotentials sowohl von Cytochrom c als auch von CcO. Da Typ n Halbleiter bei Potentialen oberhalb des Flachbandpotentials Isolatorverhalten zeigen, war kein direkter Elektronentransfer zu beobachten. Zusätzlich verhielten sich bereits ITO-Proben aus der selben Charge elektrochemisch unterschiedlich, weshalb die Messungen mit ITO nicht reproduzierbar waren.

Bei AZO hing es von der Schichtdicke ab, ob sich die Proben in Elektrolytlösung elektrochemisch stabil verhielten. Ab einer Schichtdicke von 70 nm stellten sich stationäre Verhältnisse ein, sodass über einen Zeitraum von zwei Tagen, was dem Zeitraum entspricht, der zur Proteinanbindung an die Probenoberfläche und Bildung der ptBlm notwendig ist, aussagekräftige Messungen möglich waren. Beschichtet man jedoch einen Wellenleiter mit einer 70 nm dicken Schicht, so wird die Sensitivität gegenüber Änderung des Brechungsindex an der Probenoberfläche verringert, da sich evaneszente Wellen in Wellenleitern bei Brechungsindexänderungen der Oberfläche um so stärker ändern, je näher die Probenoberfläche am Kern des Wellenleiters ist. Beschichtung mit einer 5 nm dicken Goldschicht konnte die Elektronentransfereigenschaften der AZO Schichten soweit verbessern, dass direkter Elektronentransfer sowohl von Kaliumhexacyanoferrat (II) als auch von Cytochrom c zum AZO/Gold-Schichtsystem zu beobachten war. Bei den Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat

(II) betrug die Peakseparation  $\Delta E = 117mV$ , bei den Messungen mit Cytochrom *c* betrug sie nach Funktionalisierung mit Mercaptoethanol  $\Delta E = 160mV$ . In beiden Fällen handelt es sich um quasireversiblen Elektronentransfer.

Da jedoch eine Mott-Schottky Auswertung von EIS-Messungen auf dem AZO/Gold Schichtsystem zeigte, dass das AZO/Gold-Schichtsystem kein Halbleiterverhalten aufweist, wurden CV-Messungen auf 5 nm dicken Goldschichten durchgeführt. Da in den CV-Messungen kein nennenswerter Unterschied zwischen Goldoberfläche und Gold beschichteter AZO Oberfläche zu erkennen war und die Sensitivität der Wellenleiter um so größer ist, je dünner die Beschichtung ist, wurden in der Folge Proben ohne AZO verwendet.

Tantalpentoxid Wellenleiter wurden mittels OWS bezüglich Schichtdicke und Brechungsindex charakterisiert. Die verwendeten Wellenleiter hatten eine Dicke von 232 nm und einen Brechungsindex von 2,05.

Mittels OWS wurde Anbindung von CcO und Bildung der ptBlm auf Tantalpentoxid Wellenleitern gezeigt. Diese Messungen ergaben für CcO eine Schichtdicke von 6 nm und einen Brechungsindex von 1,39. Die Modenbreite ist jedoch eine Größenordnung größer, als theoretisch möglich wäre. Dies wirkt sich negativ auf die Genauigkeit der Messungen aus. Mit den vorhandenen Wellenleitern konnten Brechungsindizes mit einer Genauigkeit von  $10^{-2}$  bestimmt werden. Die ptBlm ist jedoch anisotrop, was sich mit den vorhandenen Wellenleitern nur insofern feststellen ließ, als die Gleichungen für Schichtdicke und Brechungsindex im erwarteten, physikalisch erlaubten Bereich keine Lösung hatten. Um Anisotropie und die Brechungsindizes in den beiden Polarisationsrichtungen mit Sicherheit feststellen zu können, würde man Wellenleiter benötigen, die mehr als eine Mode pro Polarisationsrichtung führen. Dies kann entweder durch Erhöhung der Schichtdicke oder durch Verringerung der verwendeten Laserwellenlänge bewerkstelligt werden. Mittels EIS Messungen des elektrischen Feldes mit Kammelektroden aus Gold unter der Tantalpentoxidschicht konnte die Bildung der ptBlm auch elektrochemisch nachgewiesen werden. Dies lässt sich aus einem Ansteigen des Widerstandes und einem Absinken der Kapazität des Messsystems sowohl nach Proteinanbindung als auch nach Bildung der ptBlm erklären. Aufgrund der Messanordnung sind jedoch keine CV-Messungen mit diesem Setup möglich, weshalb die Funktionalität des Proteins nicht überprüft werden konnte.

Auf Gold beschichtetem Tantalpentoxid konnte keine Proteinanbindung beobachtet werden, da durch die 16-stündige Funktionalisierung mit DTNTA die Probenoberfläche beschädigt wurde. Der Widerstand der beschädigten Proben, welcher mittels EIS Messung bestimmt wurde, betrug bereits im hochfrequenten Bereich  $\approx 15k\Omega$ . Dadurch konnten auf dieser Oberfläche keine aussagekräftigen Elektrochemies-

sungen durchgeführt werden.

In weiteren Experimenten soll die Sensitivität der Tantalpentoxidwellenleiter erhöht werden. Dies kann einerseits durch spezielles Gitterdesign und andererseits durch die Herstellung homogenerer Tantalpentoxidschichten bewerkstelligt werden. Wie bereits erwähnt, müssen die Schichtdicke des Wellenleiters und die Wellenlänge des verwendeten Lasers aufeinander abgestimmt werden, sodass in beiden Polarisationsrichtungen mehr als eine Mode geführt wird.

Um Experimente mit Gold beschichteten Tantalpentoxid Wellenleitern durchführen zu können, und somit direkten Elektronentransfer nachweisen zu können, besteht die Möglichkeit, die Probe mit einer höheren DTNTA Konzentration (z.B. DTNTA: DTP = 25:75) und dafür nur zwei Stunden zu funktionalisieren. Schließlich besteht noch die Möglichkeit, den Wellenleiter mit anderen dünnen, transparenten, leitfähigen Materialien, welche sich elektrochemisch stabiler verhalten (beispielsweise Graphen [50]), zu beschichten, um Optische und elektrochemische Untersuchungen simultan durchführen zu können.

# Anhang

## A.1 Begriffserklärung

- Anta Lösung: 0,17M  $N\alpha',N\alpha''$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine und 0,48M Kaliumcarbonat werden in deionisiertem Wasser gelöst.
- DDM Lösung: 1,95mM n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside wird in PBS-Puffer gelöst.
- DTNTA-Lösung: 10mM 3,3'-Dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl)-propionamide-N''-diacetic acid] wird in Dimethylsulfoxid gelöst.
- DTP-Lösung 10mM Dithio-bis-Propionat wird in Dimethylsulfoxid gelöst.
- Häm: Ein Häm ist eine Komplexverbindung mit einem Eisenion im Zentrum.
- Häm Protein: Ein Häm Protein ist ein Protein, dessen prosthetische Gruppe (organisches Molekül, das kovalent an ein Enzym gebunden ist) eine Häm-Gruppe ist.
- Komplexverbindung: Eine Komplexverbindung ist eine chemische Verbindung, in deren Zentrum ein Metallatom oder Ion mit einer Lücke in der Elektronenkonfiguration ist, sodass sich Moleküle anlagern können, die mindestens ein freies Elektronenpaar für die Bindung zur Verfügung stellen.
- Hellmanex II: Hellmanex II ist ein alkalisches Reinigungsmittel der Firma Hellma. Der pH Wert der Verdünnung auf 2 % mit deionisiertem Wasser beträgt 12,0.
- Lipid Lösung: Für die Lipid Stammlösung wird 2.4mM 1,2 Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine in PBS-Puffer gelöst. 250 $\mu$ l dieser Stammlösung werden in 50ml DDM-Lösung gelöst.
- Nickel-Lösung 40mM  $NiCl_2$  und 40 $\mu$ M Essigsäure werden in deionisiertem Wasser gelöst und mit KOH auf pH 5,5 titriert.

- PBS Puffer: 0,1M KCl und 0,05M  $K_2HPO_4$  werden in deionisiertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8 titriert.
- PDMS: Polydimethylsiloxan, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit von Dow Corning;

## A.2 Messzelle

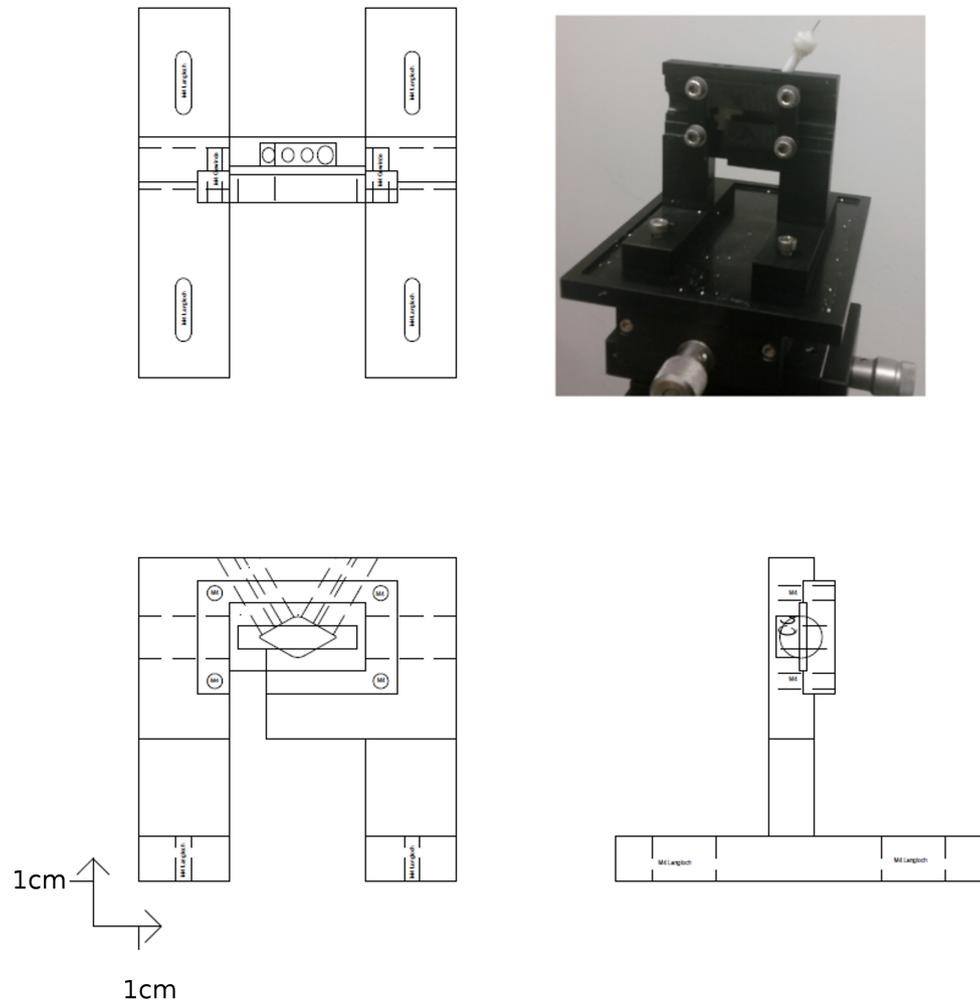


Abbildung A.1: Technische Zeichnung und Foto der Messzelle

# Literaturverzeichnis

- [1] F. Giess, M. G. Friedrich, J. Heberle, R. L. Naumann, and W. Knoll. The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane. *Biophysical Journal*, 87(5):3213–3220, November 2004.
- [2] K. Tiefenthaler and W. Lukosz. Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors. *Journal of the Optical Society of America B*, 6(2):209–220, 1989.
- [3] Katrin Schmitt, Kerstin Oehse, Gerd Sulz, and Christian Hoffmann. Evanescent field sensors based on tantalum pentoxide waveguides - a review. *Sensors*, 8(2):711–738, February 2008.
- [4] [www.refractiveindex.info](http://www.refractiveindex.info) (5.mai2011).
- [5] K. Ogawa, J. Harada, T. Fujiwara, and H. Takahashi. Uv-vis absorption spectra of powdered materials: Direct measurements by optical waveguide spectroscopy. *Chemistry Letters*, 33(11):1446–1447, November 2004.
- [6] Christoph Nowak. *Spektroelektrochemische Untersuchungen mittels oberflächenverstärkter Infrarotabsorptionsspektroskopie (SEIRAS) an Multi-Redox-Center-Proteinen in einer biomimetischen Membranumgebung*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2010.
- [7] H. M. Lee, T. K. Das, D. L. Rousseau, D. Mills, S. Ferguson-Miller, and R. B. Gennis. Mutations in the putative h-channel in the cytochrome c oxidase from rhodobacter sphaeroides show that this channel is not important for proton conduction but reveal modulation of the properties of heme a. *Biochemistry*, 39(11):2989–2996, March 2000.
- [8] M. I. Verkhovskiy, A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan, and M. Wikstrom. Proton translocation by cytochrome c oxidase. *Nature*, 400(6743):480–483, July 1999.
- [9] Mathias Winterhalter. Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5:250–255, 2000.

- [10] E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science*, 271(5245):43–48, January 1996.
- [11] R. Guidelli, G. Aloisi, L. Becucci, A. Dolfi, M. R. Moncelli, and F. T. Buoninsegni. New directions and challenges in electrochemistry - bioelectrochemistry at metal/water interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 504(1):1–28, May 2001.
- [12] W. Knoll, C. W. Frank, C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhäusser, J. Rühle, E. K. Schmidt, W. W. Shen, and A. Sinner. Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(3):137–158, 2000.
- [13] G. Krishna, J. Schulte, B. A. Cornell, R. J. Pace, and P. D. Osman. Tethered bilayer membranes containing ionic reservoirs: Selectivity and conductance. *Langmuir*, 19(6):2294–2305, March 2003.
- [14] R. Naumann, T. Baumgart, P. Graber, A. Jonczyk, A. Offenhäusser, and W. Knoll. Proton transport through a peptide-tethered bilayer lipid membrane by the h<sup>+</sup>-atp synthase from chloroplasts measured by impedance spectroscopy. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(1-2):25–34, January 2002.
- [15] Asmorom Kibrom. *A Biomimetic Model Membran System on Oxidic Surfaces Designed for the Investigation of Cytochrome c Oxidase and other Membrane Proteins by Fluorescence and Waveguide Spectroscopy*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Juli 2010.
- [16] D. M. Mitchel and R. B. Gennis. Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome-c-oxidase from rhodobacter-sphaeroides by ni<sup>2+</sup>-nta affinity-chromatography. *Febs Letters*, 368(1):148–150, July 1995.
- [17] Marc Großerüschkamp. *Time-Resolved Surface Enhanced Resonance Raman Spectro-Electrochemistry of Heme Proteins*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2010.
- [18] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-Vch, 2. edition, 2001.
- [19] G. Antonini, F. Malatesta, P. Sarti, and M. Brunori. Proton-pumping by cytochrome-oxidase as studied by time-resolved stopped-flow spectrophotometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13):5949–5953, July 1993.

- [20] V. Y. Artzatbanov, A. A. Konstantinov, and V. P. Skulachev. Involvement of intra mitochondrial protons in redox reactions of cytochrome a. *Febs Letters*, 87(2):180–185, 1978.
- [21] Vinzenz Ulrich Kirste. *Elektrochemisch gesteuerte zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Redox-Membranproteinen in einer biomimetischen Membran-Architektur*. PhD thesis, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, November 2007.
- [22] Katja Bender. *Entwicklung und Charakterisierung verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2004.
- [23] V. Drosou, B. Reincke, M. Schneider, and B. Ludwig. Specificity of the interaction between the paracoccus denitrificans oxidase and its substrate cytochrome c: Comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome c(552), and its truncated and site-directed mutants. *Biochemistry*, 41(34):10629–10634, August 2002.
- [24] W. Karthe and R. Müller. *Integrierte Optik*. Technisch-physikalische Monographien. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, 1991.
- [25] T. Tamir and S. T. Peng. Analysis and design of grating couplers. *Applied Physics*, 14:235–254, 1977.
- [26] Christoph Hoffmann. Charakterisierung der Glastemperatur von ultradünnen Langmuir Blodgett Seitenketten Polymere mittels optischer Modenspektroskopie. Master's thesis, Fachhochschule Wiesbaden University of Applied Sciences, Januar 2007.
- [27] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, and H. Schmidt. *Optik für Ingenieure*. Springer, 2005.
- [28] Bahaa E. A. Saleh and Malvin Carl Teich, editors. *Fundamentals of Photonics*. Wiley-Interscience, 2007.
- [29] KATSUNARI OKAMOTO. *Fundamentals of Optical Waveguides*. Elsevier, 2006.
- [30] W. Knoll. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annual Review of Physical Chemistry*, 49:569–638, 1998.

- [31] Kevin Randolph Harper. Theory, design, and fabrication of diffractive grating coupler for slab waveguide. Master's thesis, Brigham Young University, December 2003.
- [32] Christian Jungreuthmayer, Gerald M. Birnbaumer, Juergen Zanghellini, and Peter Ertl. 3d numerical simulation of a lab-on-a-chip-increasing measurement sensitivity of interdigitated capacitors by passivation optimization. *Lab Chip*, 11:1318–1325, 2011.
- [33] Johanna Gottschamel, Lukas Richter, Andy Mak, Christian Jungreuthmayer, Gerald Birnbaumer, Marcus Milnera, Hubert Brueckl, and Peter Ertl. Development of a disposable microfluidic biochip for multiparameter cell population measurements. *Analytical Chemistry*, 81(20):8503–8512, October 2009.
- [34] P. Ertl and R. Heer. Interdigitated impedance sensors for analysis of biological cells in microfluidic biochips. *Elektrotechnik & Informationstechnik*, 129(1–2):47–50, 2009.
- [35] Wolfgang Knoll and Rigoberto C. Advincula, editors. *Funktional Polymer Films*, volume 2. Wiley-Vch, 2011.
- [36] Allen J. Bard and Larry R. Faulkner. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. JOHN WILEY & SONS, INC., 2 edition, 2001.
- [37] D. Pletcher, R. Greef, R. Pear, L. M. Peter, and J. Robinson. *Instrumental methods in electrochemistry*. Ellis Horwood series in chemical science. Ellis Horwood, 2001.
- [38] Adrian W. Bott. Electrochemistry of semiconductors. *Current Separations*, 17(3):87–91, December 1998.
- [39] Wolfgang Demtröder. *Experimentalphysik 3*. Springer, 4th edition, 2009.
- [40] W. J. Albery, G. J. OShea, and A. L. Smith. Interpretation and use of mottschottky plots at the semiconductor/electrolyte interface. *Journal of the Chemical Society-faraday Transactions*, 92(20):4083–4085, October 1996.
- [41] I. Streeter, G. G. Wildgoose, L. D. Shao, and R. G. Compton. Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: An analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes. *Sensors and Actuators B-chemical*, 133(2):462–466, August 2008.

- [42] Jason Stotter, Yoshiyuki Show, Shihua Wang, and Greg Swain. Comparison of the electrical, optical, and electrochemical properties of diamond and indium tin oxide thin-film electrodes. *Chemistry of Materials*, 17:4880–4888, 2005.
- [43] Dieter K. Schroder. *Semiconductor Material and Device Characterization*. Wiley-IEEE Press, 2006.
- [44] Z. L. Pei, X. B. Zhang, G. P. Zhang, J. Gong, C. Sun, R. F. Huang, and L. S. Wen. Transparent conductive ZnO : Al thin films deposited on flexible substrates prepared by direct current magnetron sputtering. *Thin Solid Films*, 497(1-2):20–23, February 2006.
- [45] J. C. Bernede, L. Cattin, M. Morsli, and Y. Berredjem. Ultra-thin metal layer passivation of the transparent conductive anode in organic solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 92(11):1508–1515, November 2008.
- [46] T. Dimopoulos, G.Z. Radnoczi, B. Pécz, and H. Brückl. Characterization of zno:al/au/zno:al trilayers for high performance transparent conducting electrodes. *Thin Solid Films*, 519(4):1470 – 1474, 2010.
- [47] Zacarias Malacara-Hernandez and Philip Baumeister. Refractive index of a tantalum pentoxide film. *Applied Optics*, 19(11):1737–1738, 1980.
- [48] <http://www.gnu.org/software/octave/> (16.november 2011).
- [49] M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornroth, P. Brzezinski, and S. Iwata. The x-ray crystal structures of wild-type and eq(i-286) mutant cytochrome c oxidases from rhodobacter sphaeroides. *Journal of Molecular Biology*, 321(2):329–339, August 2002.
- [50] Y. Z. Chang, G. Y. Han, M. Y. Li, and F. Gao. Graphene-modified carbon fiber mats used to improve the activity and stability of pt catalyst for methanol electrochemical oxidation. *Carbon*, 49(15):5158–5165, December 2011.