

In-situ-Untersuchung von adsorbierten
Proteinfilmern an fest-flüssig-
Grenzflächen mittels
Röntgenreflektometrie bei hoher
Energie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät Physik der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Kaveh Shokuie

Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen der Röntgenreflektometrie	4
2.1. Die Streugeometrie.....	5
2.2. Dispersion von Röntgenstrahlen in Materie.....	6
2.3. Die Born'sche Näherung.....	8
2.4. Die Reflektivität einer ideal glatten Grenzfläche.....	10
2.5. Die Reflektivität eines Schichtsystems.....	12
2.6. Raue Grenzflächen.....	15
2.7. Die Reflektivität in kinematischer Näherung.....	17
2.8. Modellierung des Profils.....	19
2.9. Geometrischer Faktor und Auflösung.....	21
2.10. Anpassung von Reflektivitäten.....	23
3. Struktur und Wechselwirkung von Proteinen	25
3.1. Wechselwirkungen in chemischen Systemen.....	25
3.2. Aufbau der Proteine.....	28
3.3. Proteinadsorption.....	34
4. Probensysteme und Präparation	37
4.1. Die Substrate.....	37
4.2. Proteine.....	40
4.3. Präparation der Proben.....	43
5. Die Messplätze	45
5.1. Die Strahllinie BL9 an DELTA.....	45
5.2. Die Strahllinie ID15A.....	48
6. Auswertung der Daten und Diskussion	51
6.1. Auswertung der Messungen an der Strahllinie BL9.....	51
6.1.1 Charakterisierung der Substrate.....	52
6.1.2 Auswertung der pH-abhängigen Messungen von Lysozym auf Silizium.....	57
6.1.3 Auswertung der konzentrationsabhängigen Messungen von Lysozym auf Silizium.....	61
6.1.4 Auswertung der konzentrationsabhängigen Messungen von Hämoglobin auf Silizium.....	62
6.1.5 Auswertung der Messungen von Lysozym auf polyelektrolytischen Schichten.....	66
6.1.6 Auswertung der Messungen von Hämoglobin auf polyelektrolytischen Schichten.....	71

Inhaltsverzeichnis

6.1.7 Auswertung der Messung von Lysozym auf OTS.....	73
6.2. Auswertung der Messungen an der Strahllinie ID15A.....	74
6.2.1 Auswertung der Messungen von Lysozym auf Silizium.....	74
6.2.2 Auswertung der Messungen von Hämoglobin auf Silizium.....	76
6.3. Diskussion der Ergebnisse.....	78
7. Zusammenfassung und Ausblick	81
7.1. Zusammenfassung.....	81
7.2. Ausblick.....	82
8. Anhang	84
8.1. Die Abélès-Matrix-Methode.....	84
9. Literaturverzeichnis	92

1. Einleitung

Proteine sind Grundbausteine lebender Organismen mit vielfältigen Funktionen. Sie dienen unter anderem als Enzyme (Biokatalysatoren), Hormone, molekulare Rezeptoren, Ionenkanäle, Transportproteine und Strukturproteine.

Eine ebenfalls bedeutende Eigenschaft von Proteinen ist ihre Grenzflächenaktivität. Unter Proteinadsorption versteht man die Ansammlung von Proteinmolekülen an einer fest-flüssigen, flüssig-flüssigen und flüssig-gasförmigen Grenzfläche. Sie spielt immer dann eine große Rolle, wenn Proteine mit einer Grenzfläche in Kontakt treten und sich hierdurch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Grenzfläche verändern. Die Untersuchung der Proteinadsorption an einer fest-flüssig-Grenzfläche ist Gegenstand dieser Arbeit. Von Bedeutung ist dieser Vorgang vor allem für die Biologie und in die Medizin. So kann z.B. die Adsorption des im Blut enthaltenen Proteins Fibrinogen zur Bildung von Thrombosen an Implantatmaterialien des Herz- Kreislaufsystems führen [103,104]. Ein weiterer negativer Effekt, der ebenfalls auf die Proteinadsorption zurückgeführt werden kann, ist die Bildung von Plaque an Zähnen und Zahnersatz [77,106]. Auch das sogenannte Faulen von Kontaktlinsen resultiert aus dem Kontakt mit dem in der Tränenflüssigkeit enthaltenen Protein Lysozym [45]. Zusätzlich zu den unerwünschten Effekten der Proteinadsorption gibt es auch Fälle, in denen Proteinadsorption gezielt eingesetzt wird. In der Zellbiologie werden beispielsweise Proteinschichten verwendet, um durch Adhäsion das Wachstum dicht besiedelter in vitro Zellkulturen zu ermöglichen [19]. Ein weiteres Anwendungsgebiet für die gezielte Proteinadsorption ist die Verwendung sogenannter Biochips [65]. Bei diesen sind Bereiche der Oberfläche unterschiedlich beschichtet, sodass jeder Bereich spezifisch Proteine bindet. Daher können Biochips dazu verwendet werden, unterschiedliche Proteine einer Lösung nachzuweisen und zu analysieren. All diese Beispiele zeigen die Notwendigkeit der Untersuchung des Effekts der Proteinadsorption sowohl im Rahmen der Grundlagenforschung als auch im Hinblick auf die Entwicklung biotechnologischer Materialien.

Der Prozess der Proteinadsorption ist ein Prozess, der einhergeht mit dem Erreichen eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen dem adsorbierten Protein und der Proteinlösung. Daher ist es für die Untersuchung der Proteinadsorption notwendig, dass diese in situ, d.h. mit der umgebenden Proteinlösung, stattfindet. Es existieren zahlreiche Methoden, mit denen die Proteinadsorption untersucht wird. Röntgen- und Neutronenreflektometrie, Ellipsometrie, Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR), zirkulärer Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie), Fluoreszenz-Spektroskopie bei interner Totalreflexion (TIRF) und kalorimetrische Methoden sind nur einige

Beispiele. Sowohl die Röntgenreflektometrie als auch die Neutronenreflektometrie bieten die Möglichkeit das vertikale Dichteprofil des adsorbierten Proteins zu untersuchen. Neue Synchrotronstrahlungsquellen erlauben dabei durch ihre hochenergetische Röntgenstrahlung und hohen Photonenfluss den Zugriff auf die Struktur der adsorbierten Proteinschichten mit nie dagewesener Genauigkeit. Aufgrund der hohen Brillanz dieser Quellen muss jedoch auch der Effekt der Schäden an Proteinen durch die Synchrotronstrahlung diskutiert werden.

Somit ist die Methode, die im Rahmen dieser Arbeit für die in situ Untersuchung der Proteinadsorption verwendet wurde die Röntgenreflektometrie bei hoher Photonenenergie ($E_{\text{photon}}=27$ keV und $E_{\text{photon}}=72,5$ keV). Die hohe Energie des Röntgenstrahls ermöglicht bei der in-situ-Messung die Transmission des einfallenden und des reflektierten Strahls innerhalb der Flüssigkeitsphase der Proteinlösung, ohne dass der Strahl größeren Intensitätsverlusten unterworfen wird. Die Methode der Röntgenreflektometrie ermöglicht allgemein die Bestimmung des lateral gemittelten Elektronendichteprofiles der Probe senkrecht zur Probenoberfläche. Im Fall adsorbierter Proteine lassen sich aus dem Elektronendichteprofil wiederum, bei gegebenen Daten über das jeweilige Protein (Molekülgröße, van-der-Waals-Volumen, Elektronenzahl), die adsorbierte Menge pro Fläche und die Anzahl der Moleküllagen ermitteln. Auch kann bei einheitlicher Ausrichtung der Proteine die Struktur des Proteins untersucht werden.

Die Unterteilung der Arbeit ist wie folgt:

- Im Kapitel 2 dieser Arbeit werden die Grundlagen der Röntgenreflektometrie beschrieben. Im Vordergrund stehen hierbei die Reflektivität eines Schichtsystems im Rahmen des Parratt-Verfahrens und die Modellierung des Elektronendichteprofiles.
- Im Kapitel 3 werden im einzelnen die Struktur und die Wechselwirkung von Proteinen erläutert. Sie spielen beide im Hinblick auf die Proteinadsorption eine große Rolle. Anschließend wird auf den Prozess der Proteinadsorption näher eingegangen.
- Im Kapitel 4 werden die Probensysteme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden und deren Präparation vorgestellt. Dies betrifft sowohl die Proteine als auch die Substrate, die verwendet wurden, um unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen zu untersuchen.

- Kapitel 5 enthält eine Beschreibung der Messplätze BL9 und ID15A, an denen die Reflektivitätsmessungen bei hoher Photonenenergie durchgeführt wurden.
- Die Auswertung der Daten und ihre Analyse wird im Kapitel 6 vorgestellt. Hierbei wird anhand der Adsorption von Lysozym der Einfluss des pH-Wertes auf die Proteinadsorption diskutiert. Die konzentrationsabhängigen Messungen von Lysozym und Hämoglobin auf Silizium sollen weiterhin dazu dienen, den Einfluss der Konzentration auf die Adsorption der Proteine zu untersuchen. Messungen mit polyelektrolytisch oder mit hydrophobem OTS beschichteten Silizium-Wafern als Substrat sollen des Weiteren Aufschluss über die Auswirkung unterschiedlicher Wechselwirkungsmechanismen auf die Adsorption geben.
- Kapitel 7 schließlich enthält eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und einen Ausblick auf künftige Untersuchungen.

2. Grundlagen der Röntgenreflektometrie

Die Anwendung der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie stellt eine bewährte Methode dar, um Struktur von Grenz- und Oberflächen zu untersuchen. Hierbei entscheidet die Wellenlänge der Strahlung, auf welchen Längenskalen die zur Untersuchung verwendete Strahlung sensitiv ist. Mit sichtbarem Licht lassen sich so z.B. Strukturen auf Mikrometerskala auflösen, mit Röntgenstrahlen können Längenskalen im atomaren Bereich untersucht werden.

Die Wechselwirkung zwischen Röntgenstrahlen und Materie erfolgt überwiegend über die Elektronen des Materials. Je nach Energie der Röntgenstrahlung und Art des Materials ergeben sich zahlreiche Phänomene wie Thompson-Streuung, Compton-Streuung und resonante Streuung. Bei der elastischen Streuung beschränkt man sich hauptsächlich auf die Thompson-Streuung. Das ermöglicht die Betrachtung des Streuprozesses im Rahmen der klassischen Elektrodynamik.

Bei elastischer Röntgenstreuung unterscheidet man weiterhin zwischen Streumethoden am gesamten Probenvolumen (z.B. Kleinwinkel- und Weitwinkelstreuung) und Oberflächenröntgenstreuung (siehe Abbildung 2.1), zu der auch die Röntgenreflektometrie gehört. Bei der Röntgenreflektometrie wird die Streuintensität in Abhängigkeit vom Einfallswinkel α_i unter der spekulären Bedingung $\alpha_i = \alpha_f$ (α_f =Ausfallswinkel) innerhalb der Einfallsebene untersucht. Diese Untersuchungsmethode ermöglicht die Bestimmung des Dichteprofiles senkrecht zur Probenoberfläche.

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der Oberflächenröntgenstreuung im Hinblick auf die Röntgenreflektometrie, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, erklärt. Ebenso wird der Einfluss des Elektronendichteprofiles auf die Reflektivität diskutiert.

2.1. Die Streugeometrie

Die Streugeometrie für Röntgenstreuung an einer Oberfläche ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

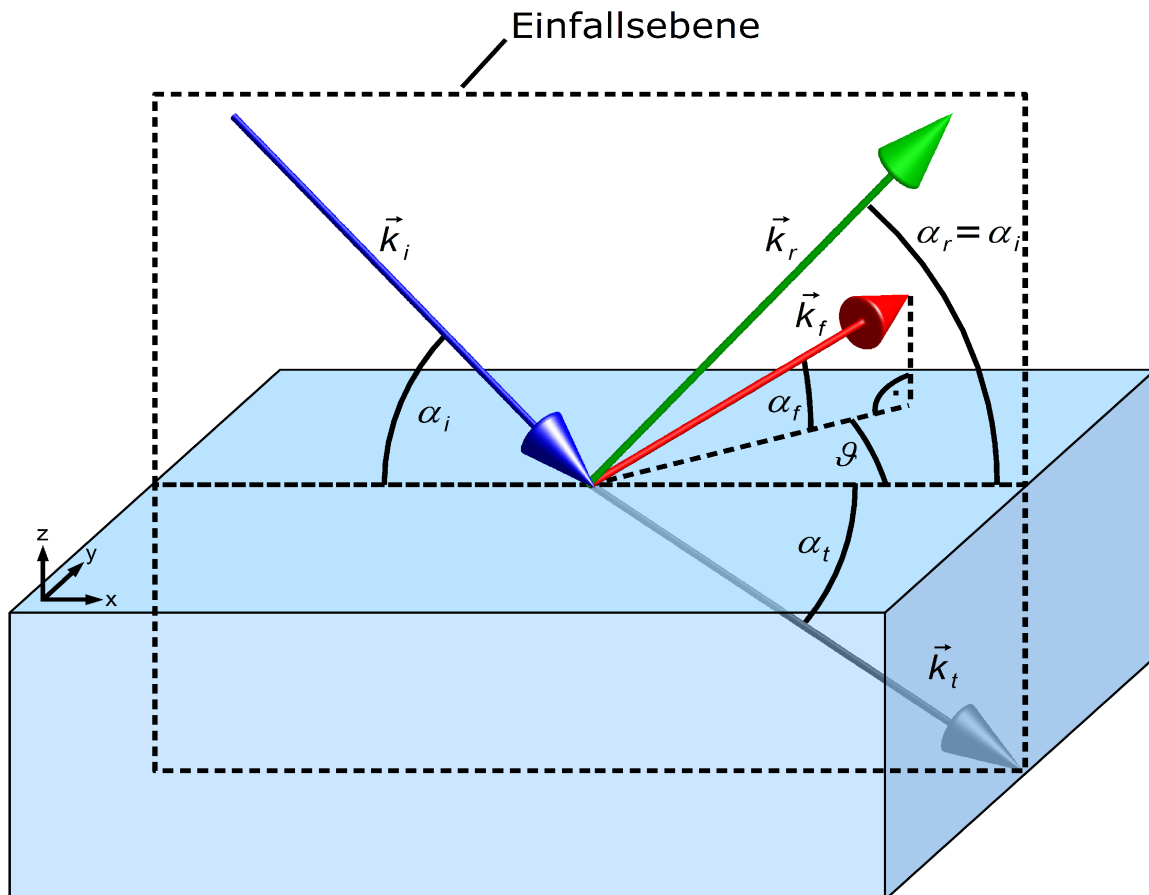


Abbildung 2.1: Streugeometrie für Röntgenstreuung an einer Oberfläche.

Der einfallende Strahl mit dem Wellenvektor \vec{k}_i trifft unter dem Winkel α_i auf die Probenoberfläche und wird teilweise reflektiert (grün), gebrochen (schwarz) und diffus gestreut (rot). Die Wellenvektoren \vec{k}_r und \vec{k}_t des reflektierten und des gebrochenen Strahls liegen in der Einfallsebene. Der Wellenvektor \vec{k}_f des diffus gestreuten Anteils kann auch Komponenten außerhalb der Einfallsebene besitzen. α_f ist der Winkel zwischen \vec{k}_f und seiner senkrechten Projektion auf die Oberfläche. Bei Streuung außerhalb der Einfallsebene ist ϑ der Winkel zwischen der Einfallsebene und der senkrechten Projektion von \vec{k}_f auf die Oberfläche. Für die Wellenvektorüberträge \vec{q}_s , \vec{q}_r und \vec{q}_t im diffus gestreuten, im reflektierten und transmittierten Fall gelten:

$$\vec{q}_s = \vec{k}_f - \vec{k}_i = k \begin{pmatrix} \cos \alpha_f \cos \vartheta - \cos \alpha_i \\ \cos \alpha_f \sin \vartheta \\ \sin \alpha_f + \sin \alpha_i \end{pmatrix}, \quad (2.1)$$

$$\vec{q}_r = \vec{k}_r - \vec{k}_i = k \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 2 \sin \alpha_i \end{pmatrix}, \quad (2.2)$$

$$\vec{q}_t = \vec{k}_t - \vec{k}_i = k \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ -\sqrt{n^2 - \cos \alpha_i} + \sin \alpha_i \end{pmatrix}. \quad (2.3)$$

k bezeichnet die Wellenzahl im Vakuum ($k=2\pi/\lambda$) und n den Brechungsindex des Materials. Berücksichtigt wurde außerdem noch das Snellius'sche Brechungsgesetz $\cos \alpha_i = n \cos \alpha_f$.

2.2. Dispersion von Röntgenstrahlen in Materie

Trifft Röntgenstrahlung auf Materie, so kann die Wechselwirkung in einem einfachen klassischen Modell durch induzierte Dipole im Material beschrieben werden, die durch das äußere Strahlungsfeld erzwungene Schwingungen ausführen. Die induzierten Dipole erzeugen ihrerseits ein Strahlungsfeld, das sich mit dem äußeren überlagert. Bei der mathematischen Betrachtung wird für die Strahlung eine ebene Welle $\vec{E}(\vec{r})$ der Form

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_0 \cdot \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}) \quad (2.4)$$

angesetzt. \vec{k} bezeichnet hierbei den Wellenvektor, \vec{r} den Ortsvektor und \vec{E}_0 die Amplitude. Die Ausbreitung des elektrischen Feldes erfolgt gemäß der Helmholtz'schen Gleichung [6]

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + k^2 n^2(\vec{r}) \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (2.5)$$

$n(\vec{r})$ ist der ortsabhängige Brechungsindex. Die Wechselwirkung der Strahlung mit einem isotropen Medium führt zu einer Polarisation des Mediums gemäß

$$\vec{P} = \chi \vec{E} \quad (2.6)$$

(\vec{P} =Polarisationsvektor, χ =Suszeptibilität).

Im Rahmen des Modells gedämpfter harmonischer Oszillatoren ergibt sich für die Suszeptibilität [31,44]

$$\chi = r_e c^2 N \sum_j \frac{f_j}{\omega_j^2 - \omega^2 - i \gamma_j \omega} \quad (2.7)$$

N ist hierbei die Anzahl der Moleküle pro Volumen, ω_j die Resonanzfrequenz der Oszillatormode j , ω die Frequenz der einfallenden Strahlung, r_e die Thompson'sche Streulänge des Elektrons und c die Vakuumlichtgeschwindigkeit. γ_j stellt eine Dämpfung dar, die den Effekt der Absorption berücksichtigt. f_j ist ein Gewichtungsfaktor für die Oszillatormode j , der auch als Oszillatorstärke bezeichnet wird. Es gilt:

$$\sum_j f_j = Z \quad (2.8)$$

(Z =Ordnungszahl).

Der Zusammenhang zwischen Brechungsindex und Suszeptibilität ist gegeben durch [6]

$$n^2 = 1 + 4 \pi \chi \quad (2.9)$$

Ist die Frequenz der Röntgenstrahlung weit oberhalb der Resonanzfrequenzen (Absorptionskanten) des Systems, folgt für den Realteil des Brechungsindex

$$n = \sqrt{1 - 4 \pi r_e \frac{c^2}{\omega^2} \rho} \approx 1 - 2 \pi r_e \frac{c^2}{\omega^2} \rho = 1 - \delta \quad (2.10)$$

δ bezeichnet hierbei die Dispersion, ρ die Elektronendichte ($\rho = N \cdot Z$). Für Vakuum oder Luft hat δ den Wert Null. Für die meisten Materialien liegt der Betrag von δ bei einer Energie von 8 keV in der Größenordnung 10^{-6} . Da δ stets positiv ist, ist der Brechungsindex eines Materials für Röntgenstrahlung kleiner als eins. Hierdurch kommt es beim Übergang von Vakuum oder Luft in die Probe unterhalb eines kritischen Einfallswinkels α_c zum Effekt der externen Totalreflexion. Der kritische Winkel der Totalreflexion ist gegeben durch $\alpha_c \approx \sqrt{2 \delta}$.

Der allgemeine Ausdruck für n berücksichtigt noch den Effekt der Absorption in Form eines imaginären Terms $i\beta$. Somit ist [38]:

$$n = 1 - \delta + i\beta = 1 - 2\pi r_e \frac{c^2}{\omega^2} \sum_j n_j f_j. \quad (2.11)$$

n_j ist hierbei die Anzahl der Atome der Sorte j pro Volumen, $f_j = f_{1j} + i f_{2j}$ ist der komplexe Formfaktor. Der Realteil f_{1j} des Formfaktors entspricht bei nichtresonanter Streuung der Zahl der Elektronen des Atoms. Der Zusammenhang zwischen dem Imaginärteil f_{2j} und dem Absorptionsquerschnitt μ_j ist gegeben durch [38]

$$f_{2j} = \frac{\omega \mu_j}{4\pi r_e c}. \quad (2.12)$$

2.3. Die Born'sche Näherung

Eine Methode der mathematischen Behandlung des Streuprozesses ist die Lösung der Helmholtz'schen Gleichung mittels Iteration. Zu diesem Zweck wird mit der Definition des Streupotentials

$$V(\vec{r}) = k^2 [1 - n^2(\vec{r})] = 4\pi r_e \rho(\vec{r}) \quad (2.13)$$

die Helmholtz'sche Gleichung auf die Form

$$(\nabla^2 + k^2) E(\vec{r}) = V(\vec{r}) E(\vec{r}) \quad (2.14)$$

gebracht. Die übrigen Schritte verlaufen in Analogie zu der quantenmechanischen Behandlung der Streuung von freien Teilchen [88]. Fasst man die rechte Seite von (2.14) formal als Inhomogenität auf, kann der Lösungsansatz mittels Green'scher Funktion angewendet werden. Die Gleichung der Green'schen Funktion lautet dann

$$(\nabla^2 + k^2) G(\vec{r}) = \delta(\vec{r}). \quad (2.15)$$

Die physikalisch sinnvolle Lösung von (2.15) ist die vom Punkt \vec{r}' auslaufende Kugelwelle

$$G(\vec{r} - \vec{r}') = -\frac{1}{4\pi} \frac{e^{ik|\vec{r} - \vec{r}'|}}{|\vec{r} - \vec{r}'|}. \quad (2.16)$$

\vec{r} ist der Beobachtungspunkt (Position des Detektors). Für $|\vec{r}| \gg |\vec{r}'|$ gilt:

$$k|\vec{r}-\vec{r}'|\approx kr-k\frac{\vec{r}}{r}\cdot\vec{r}'+o(r^{-2}),$$

$$G(\vec{r}-\vec{r}')=-\frac{1}{4\pi}\frac{e^{ikr}}{r}e^{-i\vec{k}'\cdot\vec{r}'}, \quad (2.17)$$

mit auslaufendem Wellenvektor $\vec{k}'=k\frac{\vec{r}}{r}$ und $r=|\vec{r}|$.

Die partikuläre Lösung von (2.14) ergibt sich als Faltung der rechten Seite von (2.14) mit der Green'schen Funktion. Die Gesamtlösung ist die Superposition der Lösung der homogenen Wellengleichung (ebene Welle) mit der partikulären Lösung. Insgesamt erhält man den selbstkonsistenten Ausdruck

$$E(\vec{r})=e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}}-\frac{e^{ikr}}{4\pi r}\int e^{-i\vec{k}'\cdot\vec{r}'}V(\vec{r}')E(\vec{r}')d^3r'. \quad (2.18)$$

Diese Gleichung kann nun durch rekursives Einsetzen in sich selbst in die Born'sche Reihe

$$E(\vec{r})=\sum_{n=0}^{\infty}E_n(\vec{r}) \quad (2.19)$$

entwickelt werden. Der Term 0. Ordnung von (2.19) ist die einfallende ebene Welle selbst. Es gilt die Rekursion

$$E_n(\vec{r})=-\frac{e^{ikr}}{4\pi r}\int e^{-i\vec{k}'\cdot\vec{r}'}V(\vec{r}')E_{n-1}(\vec{r}')d^3r'. \quad (2.20)$$

Der Term erster Ordnung ist die einfache Streuung der einfallenden Welle an der Probe. Er ist gegeben durch

$$E_1(\vec{r})=-\frac{e^{ikr}}{4\pi r}\int V(\vec{r}')e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}'}d^3r', \quad (2.21)$$

mit dem Wellenvektorübertrag $\vec{q}=\vec{k}'-\vec{k}$. Lässt man mehrfache Streuung außer Acht, ergibt sich unter Verwendung der Gleichung (2.13) für den differentiellen Streuquerschnitt in 1. Born'scher Näherung der Ausdruck [2]

$$\begin{aligned} \frac{d\sigma}{d\Omega} &= \frac{r^2 I_{\text{auslaufend}}}{I_{\text{einfallend}}} = r^2 |E_1|^2 = \frac{1}{16\pi^2} \left| \int V(\vec{r}') e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}'} d^3r' \right|^2 \\ &= r_e^2 \left| \int \rho(\vec{r}') e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}'} d^3r' \right|^2. \end{aligned} \quad (2.22)$$

Gleichung (2.22) besagt, dass der differentielle Streuquerschnitt proportional zum Betragsquadrat der Fouriertransformierten der Elektronendichteverteilung $\rho(\vec{r})$ ist.

2.4. Die Reflektivität einer ideal glatten Grenzfläche

Trifft eine ebene elektromagnetische Welle $\vec{E}^{(i)} = \vec{A} \exp(-i(\omega t - \vec{k}_i \cdot \vec{r}))$ auf eine ideal glatte Grenzfläche, so wird die einfallende Welle aufgespalten in eine reflektierte Welle $\vec{E}^{(r)} = \vec{R} \exp(-i(\omega t - \vec{k}_r \cdot \vec{r}))$ und eine transmittierte Welle $\vec{E}^{(t)} = \vec{T} \exp(-i(\omega t - \vec{k}_t \cdot \vec{r}))$. An der Grenzfläche gelten die Stetigkeitsbedingungen für die Komponenten von \vec{E} und \vec{H} innerhalb der Grenzfläche (x-y-Ebene)

$$\begin{aligned} E_x^{(i)} + E_x^{(r)} &= E_x^{(t)}, & E_y^{(i)} + E_y^{(r)} &= E_y^{(t)}, \\ H_x^{(i)} + H_x^{(r)} &= H_x^{(t)}, & H_y^{(i)} + H_y^{(r)} &= H_y^{(t)}. \end{aligned} \quad (2.23)$$

Der Zusammenhang zwischen \vec{E} und \vec{H} ist bei ebenen Wellen gegeben durch die Beziehung [44]

$$\vec{H} = \frac{\vec{k}}{k} \times \vec{E}. \quad (2.24)$$

Bezeichnet man mit A_{\parallel} , A_{\perp} , R_{\parallel} , R_{\perp} , T_{\parallel} und T_{\perp} die Amplituden paralleler und senkrechter Komponenten (bzgl. der Einfallsebene) der einfallenden, reflektierten und transmittierten Welle, erhält man aus den Stetigkeitsbedingungen (2.23)

$$\begin{aligned} \frac{k_{i,z}}{n_1 k} A_{\parallel} + \frac{k_{r,z}}{n_1 k} R_{\parallel} &= \frac{k_{t,z}}{n_2 k} T_{\parallel}, & A_{\perp} + R_{\perp} &= T_{\perp}, \\ \frac{k_{i,z}}{k} A_{\perp} + \frac{k_{r,z}}{k} R_{\perp} &= \frac{k_{t,z}}{k} T_{\perp}, & n_1 A_{\parallel} + n_1 R_{\parallel} &= n_2 T_{\parallel}. \end{aligned} \quad (2.25)$$

n_1 und n_2 bezeichnen die Brechungsindizes der Medien 1 und 2; $k_{i,z}$, $k_{r,z}$ und $k_{t,z}$ sind die z-Komponenten von \vec{k}_i , \vec{k}_r und \vec{k}_t .

Auflösen der Gleichungen (2.25) ergibt die Fresnel'schen Gleichungen für die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten für die Fälle der senkrechten und parallelen Polarisation

$$r_{\perp} = \frac{R_{\perp}}{A_{\perp}} = \frac{k_{i,z} - k_{t,z}}{k_{i,z} + k_{t,z}}, \quad (2.26)$$

$$r_{\parallel} = \frac{R_{\parallel}}{A_{\parallel}} = \frac{n_2^2 k_{i,z} - n_1^2 k_{t,z}}{n_2^2 k_{i,z} + n_1^2 k_{t,z}}, \quad (2.27)$$

$$t_{\perp} = \frac{T_{\perp}}{A_{\perp}} = \frac{2k_{i,z}}{k_{i,z} + k_{t,z}}, \quad (2.28)$$

$$t_{\parallel} = \frac{T_{\parallel}}{A_{\parallel}} = \frac{2n_1 n_2 k_{i,z}}{n_2^2 k_{i,z} + n_1^2 k_{t,z}}. \quad (2.29)$$

Im Falle der Röntgenstrahlung gilt: $n_1, n_2 \approx 1$. Somit entfällt im spekulären Fall in der Regel die Unterscheidung zwischen senkrechter und paralleler Polarisation, sodass man sich auf (2.26) und (2.28) beschränken kann. Der Zusammenhang zwischen $k_{i,z}$ und $k_{t,z}$ lautet

$$k_{t,z} = \sqrt{k_{i,z}^2 - k_c^2}, \quad (2.30)$$

mit $k_c = k \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$. Für Werte $k_{i,z} \gg k_c$ folgt für die Fresnelreflektivität $R_F(q_z) = |r|^2$

$$R_F(q_z) = \left| \frac{k_{i,z} - \sqrt{k_{i,z}^2 - k_c^2}}{k_{i,z} + \sqrt{k_{i,z}^2 - k_c^2}} \right|^2 \approx \left(\frac{q_c}{2q_z} \right)^4, \quad (2.31)$$

mit dem Wellenvektorübertrag $q_z = k_{i,z} - k_{r,z} = 2k_{i,z}$ und dem kritischen Wellenvektorübertrag $q_c = 2k_c$.

Somit verhält sich bei größeren q_z -Werten die Fresnelreflektivität wie $1/q_z^4$. In Abb. 2.2 ist das Beispiel der q_z -Abhängigkeit der Fresnelreflektivität einer Wasser-Luft-Grenzfläche dargestellt. Wie man erkennen kann, ist bei größeren q_z -Werten der Abfall der gemessenen Werte deutlich stärker, als der der berechneten Fresnelreflektivität. Verursacht wird dies durch die Rauigkeit der Grenzfläche (siehe Kapitel 2.6).

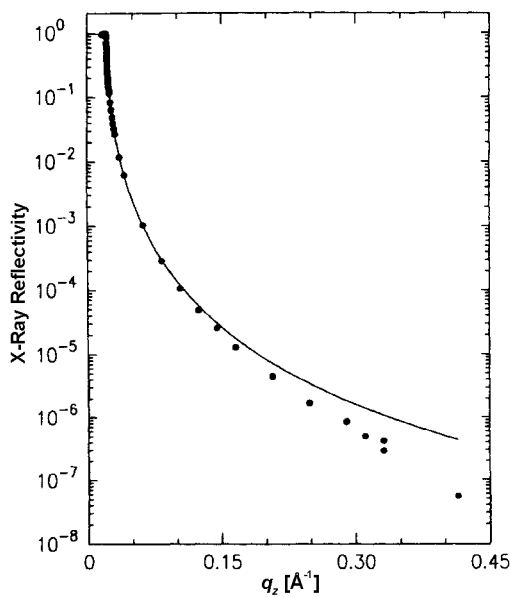


Abbildung 2.2: Röntgenreflektivität in Abhängigkeit vom Wellenvektorübertrag gemessen an einer Wasseroberfläche (Punkte). Die durchgezogene Kurve ist die berechnete Fresnelreflektivität. Für kleine q_z -Werte ist die Übereinstimmung sehr gut, für größere q_z -Werte macht sich der Einfluss der Rauigkeit im stärkeren Abfall bemerkbar. Das Bild wurde entnommen aus [7].

2.5. Die Reflektivität eines Schichtsystems

Die Betrachtung der Fresnelreflektivität wurde beschränkt auf den Fall zweier angrenzender Medien mit einer ideal glatten Grenzfläche. Dieses Modell soll im Folgenden auf ein Schichtsystem erweitert werden. Zunächst wird der Fall einer einzigen Schicht betrachtet. Danach wird durch ein rekursives Verfahren das Ergebnis auf ein mehrschichtiges System erweitert. Dieses Verfahren wird als das Parratt-Verfahren bezeichnet [69].

Im Fall einer Schicht wird diese von zwei halbunendlich ausgedehnten Medien umschlossen, dem Referenzmedium 2 mit dem Brechungsindex n_2 und dem Substrat 0 mit dem Brechungsindex n_0 . An beiden Grenzflächen treten Reflexionen und Transmissionen des Strahls auf. Hierdurch kommt es zu einer mehrfachen Aufspaltung des einfallenden Strahls (Abbildung 2.3). Die mehrfach gestreuten Anteile überlagern sich mit einer Phasenverschiebung zu dem einfach reflektierten Strahl von der oberen Grenzfläche (Grenzfläche 1). Das Schema, nach dem man die mehrfach reflektierten Anteile aufaddiert, ist in Abbildung 2.3 (rechts) wiedergegeben.

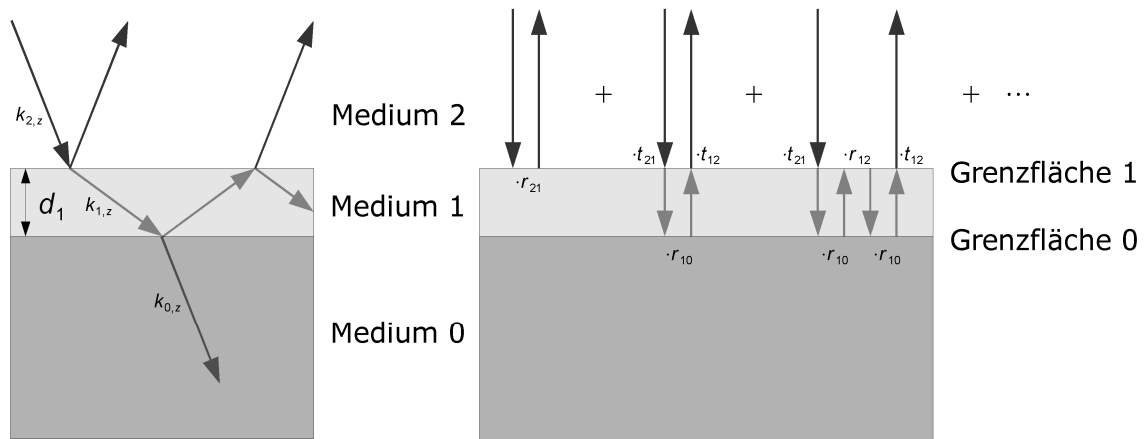


Abbildung 2.3: Berücksichtigung der mehrfachen Streuung bei der Reflexion von einer Schicht.

Berücksichtigt man mehrfache Reflexionen, so ergibt sich für den Reflexionskoeffizienten r_1 der Schicht die unendliche Reihe

$$\begin{aligned}
 r_1 &= \tilde{r}_{21} + t_{21} \tilde{r}_{10} t_{12} e^{2ik_{1,z}d_1} + t_{21} \tilde{r}_{10} \tilde{r}_{12} \tilde{r}_{10} t_{12} e^{2 \cdot 2ik_{1,z}d_1} + \dots \\
 &= \tilde{r}_{21} + t_{21} \tilde{r}_{10} t_{12} e^{2ik_{1,z}d_1} \sum_{m=0}^{\infty} (\tilde{r}_{10} \tilde{r}_{12} e^{2ik_{1,z}d_1})^m,
 \end{aligned} \tag{2.32}$$

mit dem Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten $\tilde{r}_{ij} = \frac{k_{i,z} - k_{j,z}}{k_{i,z} + k_{j,z}}$ und dem Transmissionskoeffizienten $t_{ij} = \frac{2k_{j,z}}{k_{i,z} + k_{j,z}}$. Für $k_{j,z}$, die z -Komponente des Wellenvektors im Medium j , gilt:

$$k_{j,z} = \sqrt{k_z^2 - (1 - n_j^2) k^2}, \tag{2.33}$$

k_z ist die Wellenvektorkomponente im Vakuum.

Der Faktor $e^{2ik_{1,z}d_1}$ berücksichtigt die Phasenverschiebung, die bei zweimaligem Durchlaufen der Schicht entsteht.

Wegen $|\tilde{r}_{10} \tilde{r}_{12} e^{2ik_{1,z}d_1}| < 1$ konvergiert die Reihe (2.32). Unter Verwendung der Beziehungen

$$\tilde{r}_{j+1,j}^2 + t_{j+1,j} t_{j,j+1} = 1, \tag{2.34}$$

$$\tilde{r}_{j+1,j} = -\tilde{r}_{j,j+1} = \tilde{r}_j \tag{2.35}$$

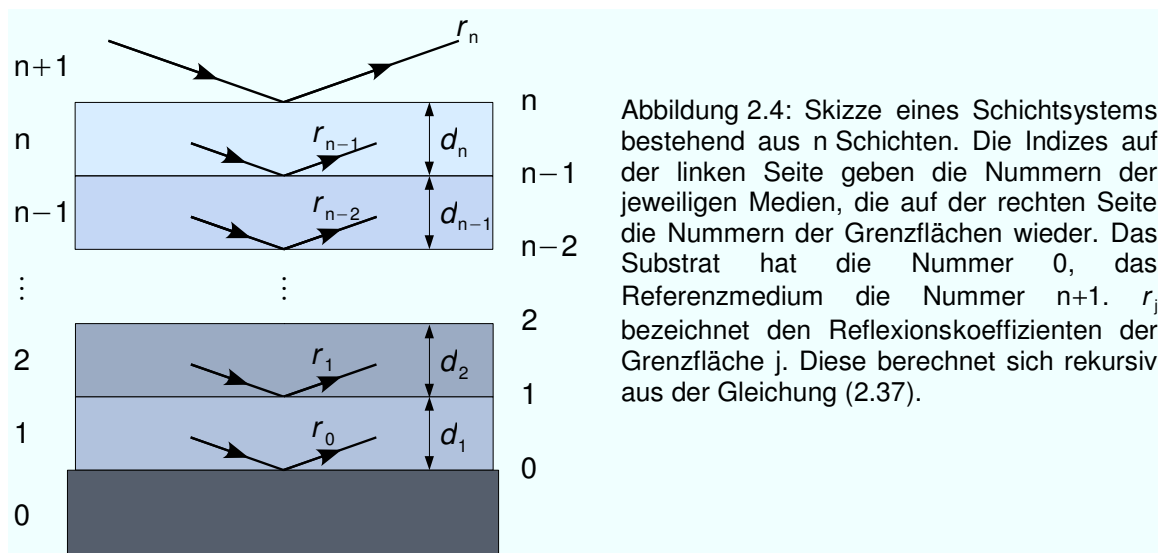
findet man

$$r_1 = \frac{\tilde{r}_1 + \tilde{r}_0 e^{2ik_{1,z}d_1}}{1 + \tilde{r}_1 \tilde{r}_0 e^{2ik_{1,z}d_1}}. \tag{2.36}$$

Die Gleichung (2.36) lässt sich auf den Fall eines Schichtsystems mit n glatten Grenzflächen (siehe Abbildung 2.4) erweitern. Betrachtet man eine beliebige Schicht j , dann ergibt sich der Reflexionskoeffizient r_j der oberen Grenzfläche, indem man in (2.36) den Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten \tilde{r}_0 durch den Reflexionskoeffizienten r_{j-1} des Schichtsystems $0 \dots j-1$ unterhalb der Schicht ersetzt. Hierdurch ergibt sich die Rekursionsformel

$$r_j = \frac{\tilde{r}_j + r_{j-1} e^{(2i k_{j,z} d_j)}}{1 + \tilde{r}_j r_{j-1} e^{(2i k_{j,z} d_j)}}, \text{ mit } (j=1 \dots n). \quad (2.37)$$

Für das Substrat gilt speziell $r_0 = \tilde{r}_0$. Die Reflektivität R des gesamten Schichtsystems ist gegeben durch das Betragsquadrat des Reflexionskoeffizienten r_n der obersten Grenzfläche.



In Abbildung 2.5 ist die berechnete Reflektivität einer Polystyrolschicht auf Silizium in Abhängigkeit vom Einfallswinkel in logarithmischer Darstellung wiedergegeben. Die Dicke der Polystyrolschicht ist 800 \AA . Deutlich zu erkennen sind die Oszillationen in der Reflektivitätskurve. Diese werden auch als Kiessig-Oszillationen bezeichnet [47]. Sie sind eine Folge der abwechselnd konstruktiven und destruktiven Interferenzen der Teilwellen, die von der unteren und der oberen Grenzfläche reflektiert werden. Ebenfalls zu erkennen sind die unterschiedlichen kritischen Winkel von Silizium und Polystyrol. Sie sind auf die unterschiedlichen Dispersionen der Substanzen zurückzuführen ($\delta_{Si} = 7,56 \cdot 10^{-6}$, $\delta_{PS} = 3,5 \cdot 10^{-6}$ für $E=8048 \text{ eV}$).

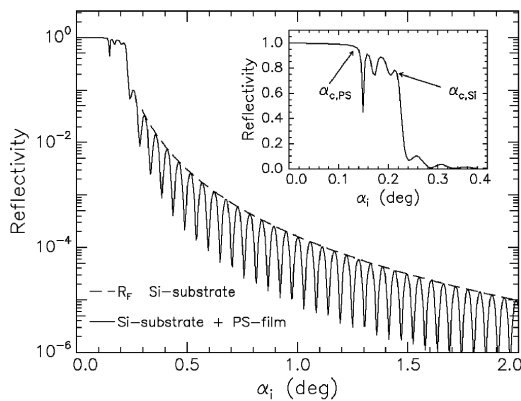


Abbildung 2.5: Berechnete Reflektivität einer 800 Å dicken Polystyrolschicht auf Silizium (durchgezogene Kurve) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel α_i . Die gestrichelte Kurve ist die Fresnelreflektivität der Siliziumoberfläche ohne Polystyrol. Berechnet wurde die Reflektivität für eine Energie von 8048 eV ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$). Für die Oszillationsperiode gilt $\Delta\alpha_i[\text{°}] = \frac{180 \cdot \lambda}{2\pi \cdot d}$. Zusätzlich sind in einer linearen Darstellung die unterschiedlichen kritischen Winkel von Polystyrol ($0,15^\circ$) und Silizium ($0,22^\circ$) zu sehen. (Bild aus [99])

2.6. Raue Grenzflächen

Auf atomarer Längenskala ist jede Grenzfläche rau. Da die Methode der Röntgenstreuung sensitiv auf atomarer Größenordnung ist, kann die Rauigkeit der Grenzfläche nicht vernachlässigt werden. Neben der zufälligen Anordnung der Atome oder Moleküle an der Grenzfläche, die die Ursache für die intrinsische Rauigkeit ist, sind thermische Fluktuationen von Flüssigkeitsoberflächen, sogenannte Kapillarwellen [23], eine andere Ursache für die mikroskopische Rauigkeit.

Mathematisch bedeutet die Berücksichtigung der Rauigkeit, dass die Höhe h der Grenzfläche eine Funktion der lateralen Koordinaten x und y ist. Bei Grenzflächen mit einer zufälligen atomaren Anordnung ist die Funktion $h(x,y)$ zur Beschreibung der Grenzfläche nicht geeignet, da sie nicht einheitlich ist. Sinnvoller ist daher eine statistische Beschreibung. Für eine statistische Beschreibung wird der sprunghafte Übergang der Brechungsindizes ersetzt durch ein kontinuierliches, lateral homogenes Profil. Angenommen wird ein Ensemble aus glatten Grenzflächen mit einer Wahrscheinlichkeitsdichte $P_j(z)$ für die Höhe z der Grenzfläche j (siehe Abbildung 2.6).

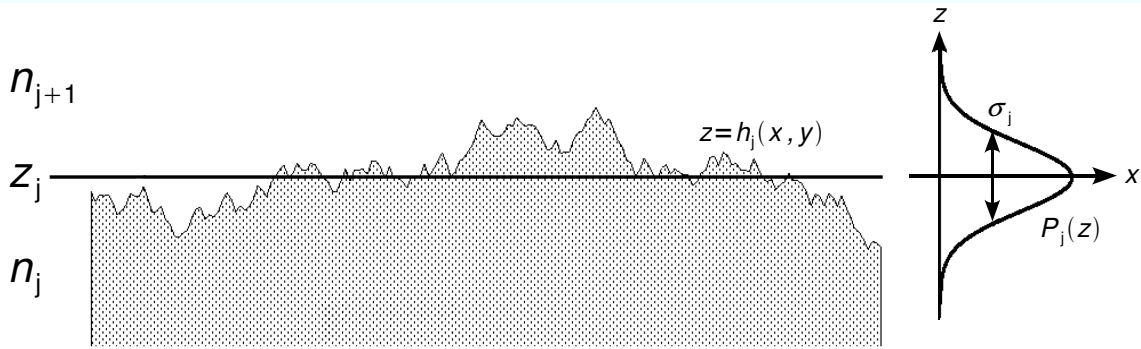


Abbildung 2.6: Die Raue Grenzfläche beschrieben durch die Höhenfunktion $h_j(x, y)$ wird mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsdichte $P_j(z)$ lateral gemittelt. $P_j(z)$ bezeichnet die Wahrscheinlichkeit eine Grenzfläche in der Höhe zwischen z und $z+dz$ zu finden. z_j bezeichnet mittlere Höhe der Grenzfläche j .

Mit der Definition der Wahrscheinlichkeitsdichte $P_j(z)$ lassen sich die mittlere Höhe der Grenzfläche z_j und die „root mean square“-Rauigkeit (rms-Rauigkeit) σ_j definieren:

$$z_j = \int z P_j(z) dz, \quad (2.38)$$

$$\sigma_j^2 = \int (z - z_j)^2 P_j(z) dz. \quad (2.39)$$

Der kontinuierliche Übergang von dem Medium mit dem Brechungsindex n_j zu dem mit dem Brechungsindex n_{j+1} ist gegeben durch das lateral gemittelte Profil

$$\begin{aligned} n(z) &= \int_{-\infty}^{\infty} [n_j + (n_{j+1} - n_j) \Theta(z - z')] P_j(z') dz' \\ &= n_j + (n_{j+1} - n_j) \int_{-\infty}^z P_j(z') dz', \end{aligned} \quad (2.40)$$

$\Theta(z)$ ist die Heaviside-Funktion.

Für die Wahrscheinlichkeitsdichte wird häufig eine Gauß-Funktion angenommen

$$P_j(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_j} e^{-\frac{(z-z_j)^2}{2\sigma_j^2}}. \quad (2.41)$$

Für das Brechungsindexprofil ergibt sich in diesem Fall

$$n(z) = n_j + (n_{j+1} - n_j) \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{z - z_j}{\sqrt{2} \sigma_j} \right) \right], \quad (2.42)$$

mit der erf-Funktion

$$\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt. \quad (2.43)$$

Wie in Abbildung 2.2 im Kapitel 2.4 bereits gezeigt wurde, führt die Rauigkeit einer Grenzfläche zu einem stärkeren Abfall der Reflektivität bei größeren q_z -Werten. Die mathematische Behandlung der Röntgenstreuung einer rauen Grenzfläche in 1. Born'scher Näherung kann in [4,92] nachgeschlagen werden. Als Resultat ergibt sich für die Reflektivität $R(q_z)$ einer rauen Grenzfläche der Ausdruck

$$R(q_z) = R_F(q_z) \cdot e^{-q_z^2 \sigma^2}. \quad (2.44)$$

Wobei $R_F(q_z)$ die Fresnelreflektivität und σ die Rauigkeit der Grenzfläche bezeichnet. Rauigkeit bewirkt also einen exponentiellen Abfall der Reflektivität. Der exponentielle Abfall kann hierbei auch als das Ergebnis des Spezialfalls des erf-Funktionsprofils (2.42) verstanden werden. Im nächsten Kapitel wird ein allgemeiner Zusammenhang zwischen dem Elektronendichteprofil und der Reflektivität, auch bekannt als die kinematische Näherung, präsentiert.

2.7. Die Reflektivität in kinematischer Näherung

Bei der kinematischen Näherung werden mehrfache Reflexionen, wie sie bei der Parratt-Reflektivität berücksichtigt wurden, vernachlässigt. Darüberhinaus werden nur solche Bereiche der Reflektivitätskurve berücksichtigt, die weit oberhalb des kritischen Winkels der Totalreflexion liegen. Auch werden Brechung und Absorptionseffekte innerhalb des Mediums außer Acht gelassen. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich einen direkten Zusammenhang zwischen der Elektronendichte $\rho(z)$ und der Reflektivität zu erhalten.

Die rekursive Form der unendlichen Reihe (2.32) lautet im Fall eines Schichtsystems

$$r_j = \tilde{r}_j + (1 - \tilde{r}_j^2) r_{j-1} e^{i q_{j,z} d_j} \sum_{m=0}^{\infty} (\tilde{r}_j r_{j-1} e^{i q_{j,z} d_j})^m . \quad (2.45)$$

Verwendet wurden hierbei die Beziehungen (2.34), (2.35) und $q_{j,z} = 2k_{j,z}$. Vernachlässigt man Ausdrücke $\sim O(r_j^2)$ erhält man

$$r_j = \tilde{r}_j + r_{j-1} e^{i q_{j,z} d_j} . \quad (2.46)$$

Für ein Schichtsystem bestehend aus n Schichten ergibt die Ausführung der Rekursion (2.46) für den Reflexionskoeffizienten r_n der obersten Grenzfläche

$$r_n = \sum_{j=0}^n \tilde{r}_j e^{i \sum_{l=j+1}^{n+1} q_{l,z} d_l} , \text{ mit } (d_{n+1} = 0) . \quad (2.47)$$

Lässt man Absorptions- und Brechungseffekte innerhalb des Materials außer Acht, kann im Phasenterm $q_l = q_{n+1}$ (für $l = 1, \dots, n+1$) gesetzt werden. Mit $d_l = z_l - z_{l-1}$ ($z_l =$ Position der Grenzfläche l) erhält man

$$r_n = \sum_{j=0}^n \tilde{r}_j e^{i q_{n+1,z} (z_n - z_j)} . \quad (2.48)$$

Schließlich nimmt man noch an, dass sich der Wellenvektor beim Übergang von einem Medium ins andere nicht signifikant ändert. Für den Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten \tilde{r}_j folgt durch Anwendung von (2.33) und (2.10)

$$\tilde{r}_j = \frac{k_{j+1,z} - k_{j,z}}{k_{j+1,z} + k_{j,z}} = \frac{k_{j+1,z}^2 - k_{j,z}^2}{(k_{j+1,z} + k_{j,z})^2} \approx \frac{-4\pi r_e (\rho_{j+1} - \rho_j)}{q_{n+1,z}^2} , \quad (2.49)$$

$$r_n = - \frac{4\pi r_e e^{i q_{n+1,z} z_n}}{q_{n+1,z}^2} \sum_{j=0}^n (\rho_{j+1} - \rho_j) e^{-i q_{n+1,z} z_j} . \quad (2.50)$$

Durch Übergang zu infinitesimal dicken Schichten kann die Summation in (2.50) durch ein Integral ersetzt werden, das den Reflexionskoeffizienten r eines Materials mit einem kontinuierlichen Dichteprofil $\rho(z)$ ausdrückt

$$\begin{aligned}
 r &= -\frac{4\pi r_e e^{iq_{n+1,z}z_n}}{q_{n+1,z}^2} \sum_{j=0}^n \frac{\rho_{j+1} - \rho_j}{z_{j+1} - z_j} e^{-iq_{n+1,z}z_j} (z_{j+1} - z_j) \\
 &\approx -\frac{4\pi r_e e^{iq_{n+1,z}z_n}}{q_{n+1,z}^2} \int \frac{d\rho(z)}{dz} e^{-iq_{n+1,z}z} dz.
 \end{aligned} \tag{2.51}$$

Die Reflektivität $R(q_z)$ lautet entsprechend

$$R = \frac{16\pi^2 r_e^2}{q_{n+1,z}^4} \left| \int \frac{d\rho(z)}{dz} e^{-iq_{n+1,z}z} dz \right|^2. \tag{2.52}$$

Auf Grund der oben verwendeten Näherungen ist (2.51) streng genommen nur für $q \gg q_c$ gültig. Eine Verbesserung erreicht man, indem man in (2.52) $16\pi^2 r_e^2 / q_{n+1,z}^4$ durch $R_F / \Delta\rho^2$ ersetzt [16]

$$R = R_F \left| \frac{1}{\Delta\rho} \int \frac{d\rho(z)}{dz} e^{-iq_{n+1,z}z} dz \right|^2. \tag{2.53}$$

R_F ist hierbei die Fresnelreflektivität beim direkten Übergang vom Referenzmedium $n+1$ in das Substrat 0 und $\Delta\rho$ die Elektronendichtedifferenz der beiden Medien.

2.8. Modellierung des Profils

Das Brechungsindexprofil einer rauen Grenzfläche wurde in Kapitel 2.6 (Gleichung 2.42) bereits vorgestellt. Eine Erweiterung dieser Gleichung für den Fall eines Schichtsystems mit rauen Grenzflächen ist gegeben durch das sogenannte Box-Modell

$$\begin{aligned}
 n(z) &= n_0(1 - Y_0(z)) + \sum_{j=1}^n [n_j(Y_{j-1}(z) - Y_j(z))] + n_{n+1} Y_n(z) \\
 &= n_0 + \sum_{j=0}^n (n_{j+1} - n_j) Y_j(z).
 \end{aligned} \tag{2.54}$$

Y_j ist hierbei die integrierte Wahrscheinlichkeitsdichte aus (2.40)

$$Y_j(z) = \int_{-\infty}^z P_j(z') dz'. \tag{2.55}$$

Für den Fall einer Gauß-Verteilung ergibt sich demnach

$$Y_j(z) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{z - z_j}{\sqrt{2} \sigma_j} \right). \quad (2.56)$$

Gleichung (2.54) hat streng genommen jedoch nur dann Sinn, wenn die Rauigkeiten der Grenzflächen klein gegenüber den Schichtdicken sind ($d_j > 2(\sigma_{j-1} + \sigma_j)$). In Abbildung 2.7 ist der Fall eines Schichtsystems mit extrem hoher Rauigkeit wiedergegeben.

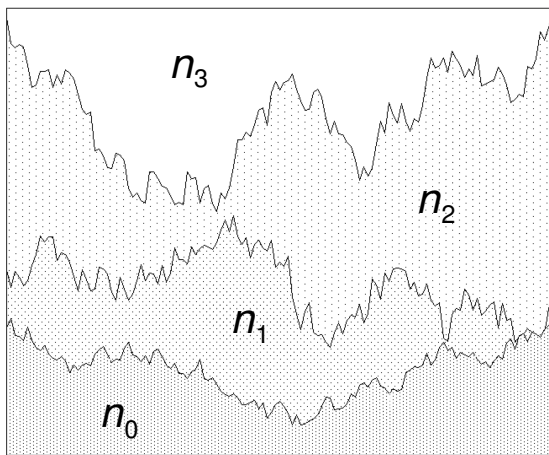


Abbildung 2.7: Beispiel eines extrem rauen Schichtsystems. Bei einer lateralen Mittlung können die realen Werte für die Brechungsindizes nicht mehr erreicht werden.

In diesem Fall können wegen der lateralen Mittlung die realen Werte für die Brechungsindizes der reinen Medien im Gesamtprofil unter Umständen nicht mehr angenommen werden. Um diese Tatsache zu berücksichtigen wird Gleichung (2.54) durch das sogenannte Effektive-Dichte-Profil ersetzt [89,93,99]. Bei diesem Modell wird das Profil der Schicht j konstruiert durch

$$W_j(z) = \begin{cases} Y_{j-1}(z) & \text{für } z \leq \zeta_j \\ 1 - Y_j(z) & \text{für } z \geq \zeta_j. \end{cases} \quad (2.57)$$

ζ_j ist hierbei die Höhe zwischen z_{j-1} und z_j , in der die Profile der Grenzflächen $j-1$ und j stetig ineinander übergehen¹. Sie ist gegeben durch

$$\zeta_j = \frac{\sigma_j z_{j-1} + \sigma_{j-1} z_j}{\sigma_j + \sigma_{j-1}} \quad \text{für } j=1 \dots n. \quad (2.58)$$

¹ Die Funktion Y_j muss von der Form $Y_j = Y\left(\frac{z-z_j}{\sigma_j}\right)$ sein, wobei Y die Bedingung $Y(z) = 1 - Y(-z)$ erfüllen muss.

Im Falle des Substrates ist $\zeta_0 = -\infty$, im Falle des Referenzmediums $\zeta_{n+1} = \infty$. Das Gesamtprofil des Schichtsystems berechnet sich durch

$$n(z) = \frac{\sum_{j=0}^{N+1} n_j W_j(z)}{\sum_{j=0}^{N+1} W_j(z)} . \quad (2.59)$$

Sowohl das Box-Modell (2.54) als auch das Effektive-Dichte-Modell (2.59) liefern stetige Dichteprofile. Die Berechnung der Reflektivität erfolgt bei beiden Modellen durch Zerlegen der Profile in Schichten mit glatten Grenzflächen (Schichtdicke ca. 1 Å). Auf das Schichtsystem kann anschließend das rekursive Verfahren von Parratt (siehe Kapitel 2.5) angewendet werden.

Im Rahmen dieser Modelle ist jedoch eine eindeutige Parametrisierung des Dichteprofiles durch die Parameter Schichtdicke, Rauigkeit und Dispersion in Analogie zur Gleichung (2.42) häufig nicht mehr möglich. Daher kann in diesen Fällen nur noch das Gesamtprofil zur Interpretation der vertikalen Struktur herangezogen werden. Die Gleichungen (2.54) und (2.59) sind hierbei als Methoden zur Profilparametrisierung zu verstehen.

2.9. Geometrischer Faktor und Auflösung

Zusätzlich zu den Einflüssen auf die Reflektivität, die durch mikroskopische Eigenschaften der Probe verursacht werden, spielen auch solche eine Rolle, die auf den Messaufbau zurückzuführen sind. Einer dieser Effekte ist der geometrische Faktor. Dieser kommt zu Stande, wenn bei kleinen Einfallswinkeln die Projektionsfläche des Strahls größer wird als die Oberfläche der Probe (siehe Abbildung 2.8). Auf die Weise wird nur ein Bruchteil des einfallenden Strahl von der Probe gestreut. Gerade bei der Nutzung von hochenergetischer Strahlung, bei der die Streuung unter extrem kleinen Winkeln geschieht, ist dieser Effekt von großer Bedeutung.

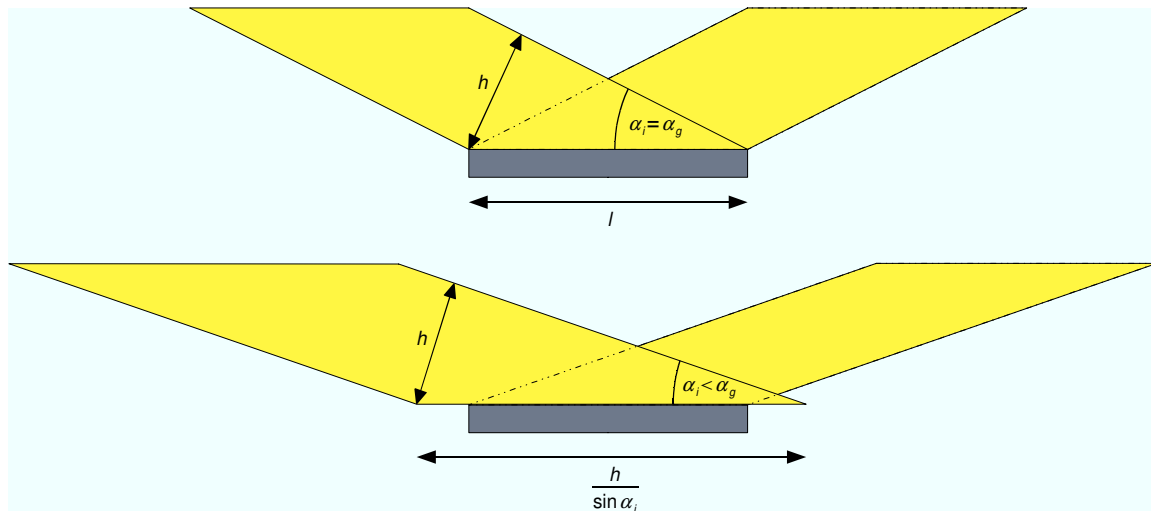


Abbildung 2.8: Skizze zur Veranschaulichung des geometrischen Effekts. α_g ist hierbei der Winkel, bei dem die projizierte Fläche des Strahls die Probenoberfläche vollständig bedeckt.

Zur Berechnung der Reflektivität kann dieser Effekt durch Multiplikation der Reflektivität mit dem Faktor

$$g = \begin{cases} 1 & \text{für } \alpha \geq \alpha_g \\ \frac{\sin \alpha}{\sin \alpha_g} & \text{für } \alpha < \alpha_g \end{cases} \quad (2.60)$$

berücksichtigt werden. α_g ist hierbei der Winkel, bei dem die projizierte Fläche des Strahls die Probenoberfläche vollständig bedeckt (siehe Abbildung 2.8). Für α_g gilt

$$\sin \alpha_g = \frac{h}{l}, \quad (2.61)$$

mit der Strahlhöhe h und der Länge der Probe l .

Neben dem geometrischen Effekt spielt bei Reflektivitätsmessungen auch die Auflösung eine Rolle. Diese ist auf den endlichen Akzeptanzwinkel $\Delta\alpha_f$ des Detektors und die Divergenz $\Delta\alpha_i$ des einfallenden Strahls zurückzuführen. Für die Auflösung der q -Komponenten in der Einfallsebene ergeben sich die Ausdrücke

$$\begin{aligned}\delta q_x &= \frac{\Delta \lambda}{\lambda} q_x + k(\alpha_i \Delta \alpha_i + \alpha_f \Delta \alpha_f) \\ \delta q_z &= \frac{\Delta \lambda}{\lambda} q_z + k(\Delta \alpha_i + \Delta \alpha_f).\end{aligned}\tag{2.62}$$

$\Delta \lambda / \lambda$ ist hier die Wellenlängenverbreiterung, die ebenfalls durch den Messaufbau bestimmt wird. Handelt es sich um einen symmetrischen Aufbau [34] (d.h. $\Delta \alpha_i = \Delta \alpha_f = \Delta \alpha$), vereinfachen sich unter Vernachlässigung von $\Delta \lambda / \lambda$ die Ausdrücke (2.62) zu

$$\begin{aligned}\delta q_x &= q_z \Delta \alpha \\ \delta q_z &= 2 k \Delta \alpha.\end{aligned}\tag{2.63}$$

Der Einfluss der Auflösung auf die Reflektivität wird durch Faltung der Intensität $R(q_z)$ mit der Auflösungsfunktion $g(q_z)$ berücksichtigt,

$$I(q_z) = \int R(\tilde{q}_z) g(q_z - \tilde{q}_z) d\tilde{q}_z.\tag{2.64}$$

Für die Auflösungsfunktion wird häufig eine Gauß-Funktion angenommen,

$$g(q_z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \delta q_z} e^{-\frac{q_z^2}{2\delta q_z^2}}.\tag{2.65}$$

2.10. Anpassung von Reflektivitäten

Allgemein erfolgt die Anpassung von Reflektivitäten durch Minimierung der Fehlerfunktion

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \gamma_k \left(\frac{f(R_{k,obs}(q_{z,k})) - f(R_{k,cal}(q_{z,k}, p))}{\Delta R_{k,obs}} \right)^2.\tag{2.66}$$

$R_{k,cal}$ bezeichnet die berechneten, $R_{k,obs}$ die gemessenen Werte mit den zugehörigen Fehlern $\Delta R_{k,obs}$. γ_k ist ein Gewichtungsfaktor für den Messpunkt k . Da Werte für die Reflektivität in der Regel einen Bereich von mehr als 6 Größenordnungen abdecken, ist es zweckmäßig nicht die Reflektivität selbst, sondern eine Funktion $f(R)$ der Reflektivität zu verwenden. Beispiele hierfür sind die Logarithmus-Funktion oder die auf die Fresnelreflektivität normierten Werte R/R_F . Gewöhnlich werden für die Anpassung die Parameter p , mit denen das

Profil modelliert wird, optimiert. Zusätzlich können aber auch Parameter wie der geometrische Faktor oder die Auflösung angepasst werden. Bei den Optimierungsalgorithmen, die verwendet werden, unterscheidet man zwischen deterministischen und stochastischen Algorithmen. Während deterministische Algorithmen abhängig von Startwerten stets das selbe lokale Minimum finden, sind stochastische Algorithmen beim wiederholten Versuch auch in der Lage globale Minima zu finden. Bekannte deterministische Minimierungsverfahren sind das Levenberg-Marquardt-Verfahren [60] und das Nelder-Mead-Simplex-Verfahren [54,64]. Beispiele für stochastische Methoden sind das Differential-Evolution-Verfahren [94] und das Simulated-annealing-Verfahren [48].

Eine für Reflektivitätsauswertungen geeignete Software ist das Programm LSFIT [90]. Die Berechnung der Reflektivität erfolgt bei LSFIT durch das oben beschriebene Parratt-Verfahren. Für die Modellierung des Profils kann u.a. auch das Effektive-Dichte-Profil verwendet werden. Zur Optimierung der Modellparameter benutzt LSFIT das Levenberg-Marquardt-Verfahren. Eine zusätzliche Fehlerminimierungsoption von LSFIT ist das Programm REFFIT. Hierbei werden dem ursprünglich vorhandenen Profil zufallsgenerierte Gauß-Profile unterschiedlicher Halbwertsbreite, Höhe und Mittelwert superpositioniert. Das resultierende „ausgebeulte“ Profil ist zwar im Detail nicht immer realistisch, kann allerdings häufig gute Hinweise darauf liefern, an welchen Stellen das bestehende Profil verändert werden muss, um eine Verbesserung der Reflektivitätsanpassung zu erzielen.

3. Struktur und Wechselwirkung von Proteinen

3.1. Wechselwirkungen in chemischen Systemen

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Wechselwirkungskräfte in chemischen Systemen vorgestellt. Diese spielen sowohl für den Zusammenhalt von Biomolekülen als auch deren Struktur und Formation eine wichtige Rolle.

• **Kovalente Wechselwirkung**

Die kovalente Wechselwirkung ist verantwortlich für chemische Bindungen und den Zusammenhalt von Molekülen. Auch Aminosäuren innerhalb einer Polypeptidkette sind kovalent miteinander gebunden. Eine umfassende Betrachtung der kovalenten Wechselwirkung kann in [15,35] nachgeschlagen werden. Mit einer Bindungsenergie von 200-800 kJ/mol ist die kovalente Wechselwirkung die stärkste in chemischen Systemen. Solange also keine chemischen Reaktionen in dem System stattfinden, ist auch der Zusammenhalt von Makromolekülen gewährleistet. Die weiter unten aufgeführten Wechselwirkungen können lediglich Konformationsänderungen von Makromolekülen bewirken.

• **Elektrostatische Wechselwirkung**

Entgegengesetzt geladene Moleküle oder Molekülgruppen üben aufeinander eine Anziehung aus. Die Wechselwirkungsenergie E_{Coul} wird wiedergegeben durch das Coulomb'sche Gesetz

$$E_{Coul} = \frac{q^+ \cdot q^-}{\epsilon_0 \epsilon_r r} . \quad (3.1)$$

Hierbei bezeichnen q^+ und q^- die Ladungen der jeweiligen Moleküle bzw. der Molekülgruppen, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante, ϵ_r die Dielektrizitätszahl des Mediums und r den Abstand der Ladungsträger.

Da Lösungen elektrisch neutral sind, befinden sich in einer Lösung Ionen und Gegenionen gleichermaßen. Dies hat zu Folge, dass das elektrische Feld eines Ions durch Gegenionen abgeschirmt wird. Die Abschirmung der Ladung wird für verdünnte Lösungen im Rahmen der Debye-Hückel-Theorie behandelt [15]. Zu Grunde gelegt wird hierbei eine Boltzmann-Verteilung der Gegenionenwolke. Für das abgeschirmte Potential gilt:

$$E_{pot} = \frac{z_i^2 e^2}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon_r r} e^{-r/r_D}. \quad (3.2)$$

z_i bezeichnet die Anzahl der Ladungen des Ions der Sorte i , e die Elementarladung. Die Debye-Länge r_D ist definiert durch

$$r_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 e^2 I}}. \quad (3.3)$$

Hierin ist die Ionenstärke I gegeben durch

$$I = \frac{1}{2} \sum_j n_{j,0} z_j^2, \quad (3.4)$$

mit der mittleren Ionenzahl pro Volumen $n_{j,0}$.

• **van-der-Waals-Wechselwirkung**

Auch bei elektrisch neutralen Atomen oder Molekülen, die kein permanentes Dipolmoment besitzen, entsteht durch Fluktuationen der Elektronendichte ein Dipolmoment. Der Dipol erzeugt ein temporäres elektrisches Feld, das nun selbst in der Lage ist in benachbarten Atomen Dipolmomente zu induzieren. Die resultierende anziehende Wechselwirkung ist im zeitlichen Mittel von Null verschieden, sodass eine anziehende Wechselwirkung existiert. Eine Gesetzmäßigkeit zwischen dem Abstand r zweier Atome und dem van-der-Waals-Potential E_{vdW} wurde 1937 von F. London gefunden [57]. Sie lautet:

$$E_{vdW} = -\frac{1}{(4 \pi \epsilon_0)^2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6} \frac{3}{2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}. \quad (3.5)$$

Hierbei sind I_1 und I_2 die Ionisierungsenergien und α_1 und α_2 die Polarisierbarkeiten der beiden Teilchen.

Betrachtet man die van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen zwei makroskopischen Körpern, dann erfolgt die Berechnung der Wechselwirkungsenergie durch paarweise Summation der Molekülpotentiale¹. Der einfache Fall der Wechselwirkung zwischen zwei Körpern mit Kugelgestalt

¹ Bei dieser Näherung werden quantenmechanische Vielteilcheneffekte außer Acht gelassen. Eine allgemeinere Beschreibung der van-der-Waals-Wechselwirkung makroskopischer Körper im Rahmen der Quantenfeldtheorie ist in der Lifshitz-Theorie [25] enthalten.

bzw. zwischen einer Kugel und einer Ebene wurde von H.C. Hamaker berechnet [36]. Das Ergebnis lautet

$$E_{vdW} = -\frac{A}{6} \left\{ \frac{2R_1R_2}{d^2 + 2d(R_1 + R_2)} + \frac{2R_1R_2}{d^2 + 2d(R_1 + R_2) + 4R_1R_2} + \ln \frac{d^2 + 2d(R_1 + R_2)}{d^2 + 2d(R_1 + R_2) + 4R_1R_2} \right\} \quad (3.6)$$

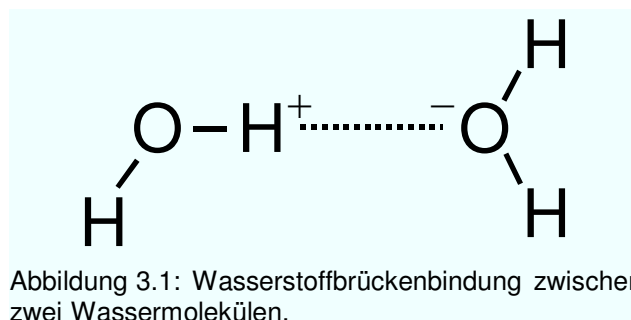
für die Wechselwirkung zweier Kugeln mit den Radien R_1 und R_2 und dem Kontaktabstand d , bzw.

$$E_{vdW} = -\frac{A}{6} \left\{ \frac{R}{d} + \frac{R}{d + 2R} + \ln \frac{d}{d + 2R} \right\} \quad (3.7)$$

für die Wechselwirkung einer Kugel mit einer ebenen Oberfläche ($R_1 = R$, $R_2 \rightarrow \infty$). A ist die sogenannte Hamaker-Konstante [41].

• Die Wasserstoffbrückenbindung

Die Wasserstoffbrückenbindung ist streng genommen der Spezialfall einer besonders starken Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen einem Wasserstoffatom und einem elektronegativeren Atom (N^- , O^- , F^- etc.) eines benachbarten polaren Moleküls. Die Bindungsenergie von Wasserstoffbrückenbindungen liegt zwischen 10 und 40 kJ/mol, größer als die der van-der-Waals-Wechselwirkung, jedoch weitaus kleiner als die der kovalenten Bindung. Eine weitere Besonderheit der Wasserstoffbrückenbindung ist ihre Richtungscharakteristik. Die Stärke der Bindung ist dann am höchsten, wenn sich die Wasserstoffbrückenbindung mit der kovalenten Bindung des Donoratoms auf einer Linie befindet [107] (Abbildung 3.1).



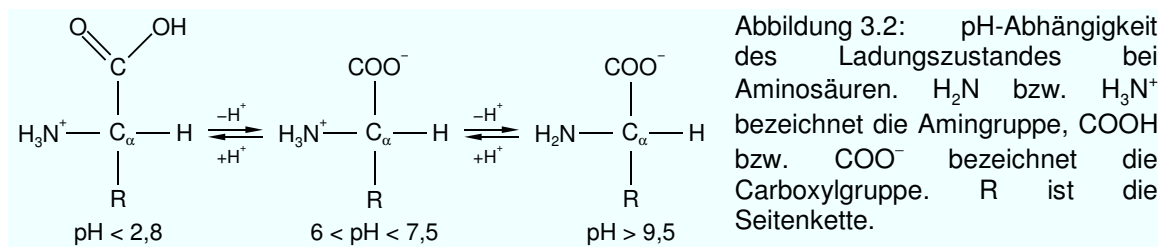
• Der hydrophobe Effekt

Befinden sich Moleküle, die weder geladen noch polar sind im Wasser, dann sorgt die stärkere Wechselwirkung zwischen den Wassermolekülen dafür, dass

sich diese durch Ausbildung von fluktuierenden Käfigstrukturen um die unpolaren Moleküle ordnen. Entropisch ist dieser Prozess ungünstig. Daher strebt ein solches System einen Zustand an, in dem die unpolaren Moleküle sich zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Effektiv führt dies zu einer erhöhten Anziehung zwischen den Molekülen der unpolaren Substanz [41]. Dies wird als der hydrophobe Effekt bezeichnet. Die stärkere Anziehung ist jedoch keine Folge der direkten Wechselwirkung zwischen den unpolaren Molekülen, sie ist vielmehr entropisch bedingt durch die Umordnung der Wasserstoffbrückenbindungen des Wassers.

3.2. Aufbau der Proteine

Bausteine der Proteine sind α -Aminosäuren. Charakteristisch bei Aminosäuren sind die Aminogruppe und die Carboxylgruppe (Abbildung 3.2). Das Kohlenstoffatom, das diese beiden Gruppen miteinander verbindet, wird α -Kohlenstoffatom (C_α) genannt. Die Gesamtheit aus Amino- und Carboxylgruppe wird als Proteinrückgrat bezeichnet. Bis auf wenige Ausnahmen sind alle vorkommenden Aminosäuren linksdrehend. Mit dem C_α -Atom ist auch die Seitenkette der Aminosäure verbunden. Bei den in der Natur vorkommenden Aminosäuren sind 20 unterschiedliche Seitenketten bekannt (Abbildung 3.3). Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Kategorien von Seitenketten: unpolare, ungeladene polare und geladene Seitenketten. Die unterschiedlich polaren Eigenschaften der Seitenketten geben dem Protein seinen amphiphilen Charakter. In wässrigen Lösungen dissoziieren Aminosäuren zu polaren Ionen. Der Ladungszustand hängt vom pH-Wert der Lösung ab. Bei einem pH-Wert zwischen 6 und 7,5 liegen Aminosäuren als Zwitterionen vor.



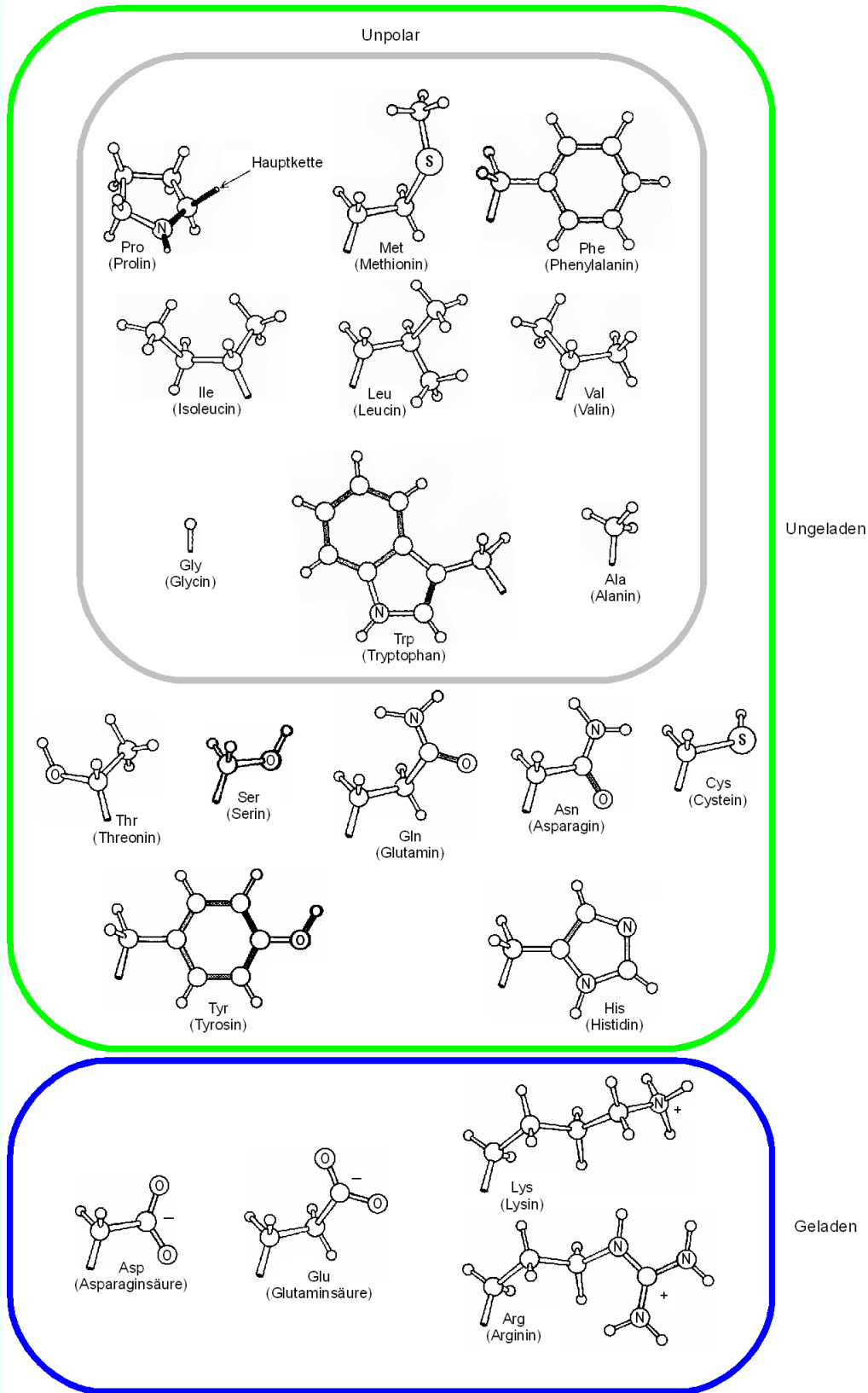


Abbildung 3.3: Die 20 in der Natur vorkommenden Seitenketten von Aminosäuren. Bilder aus [22].

Struktur und Wechselwirkung von Proteinen

Unter Freisetzung eines Wassermoleküls kann ein Aminosäuremolekül über seine Amino- und Carboxylgruppe Peptidbindungen zu anderen Aminosäuremolekülen aufbauen (Abbildung 3.4). Hierdurch entsteht die Peptidkette. Die sich ergebende Abfolge der Seitenketten bildet die Primärstruktur des Proteins. Die Primärstruktur eines Proteins ist entscheidend für Bildung spezifischer Konformationen.

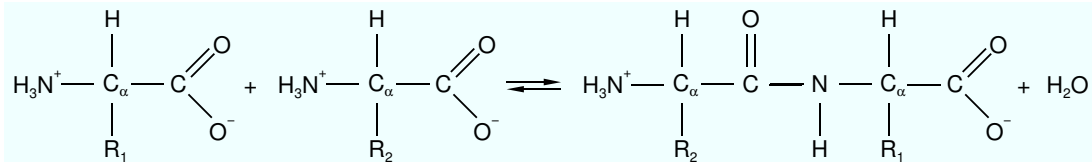


Abbildung 3.4: Entstehung einer Peptidbindung aus zwei Aminosäuren unter Freisetzung von Wasser.

Abbildung 3.5: a) Die mesomere Elektronendichteverteilung der Carbonylgruppe. Die Grenzstrukturen dazu sind b) die Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoff- und dem Sauerstoffatom c) die Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffatom. Im Fall b) gäbe es Rotationsfreiheit um die C-N-Bindungsachse. Im zweiten Fall würden zu hohe Ladungen am Stickstoff- und Sauerstoffatom auftreten.

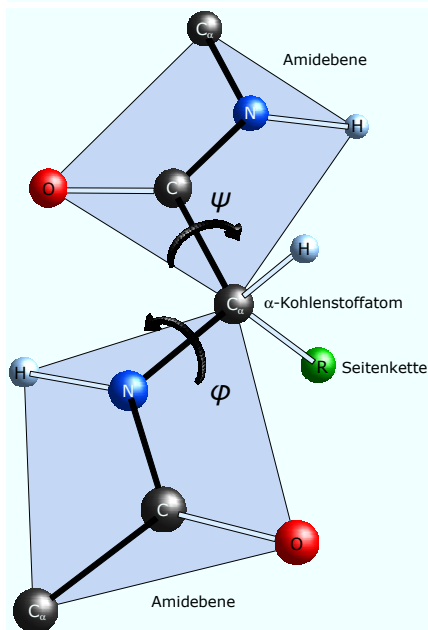
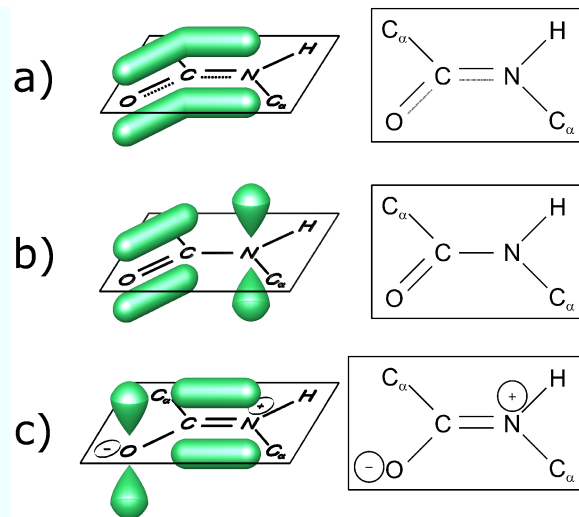
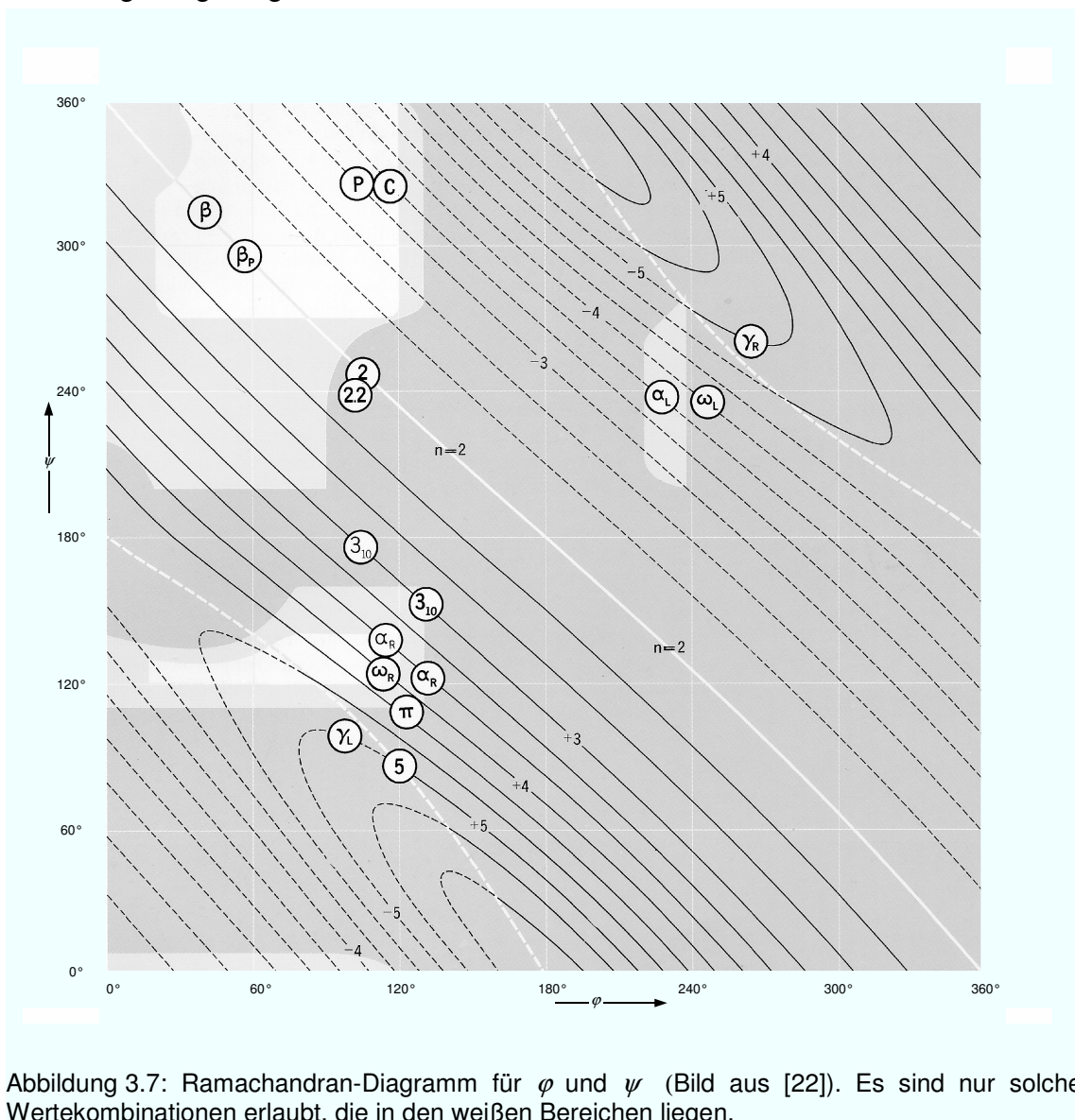


Abbildung 3.6: Rotationsfreiheit der Amidebenen um die Diederwinkel φ und ψ . Rotationen um φ und ψ sind positiv, wenn sie vom α -Kohlenstoffatom aus im Uhrzeigersinn ablaufen. Bei $\varphi = \psi = 0$ sind die beiden Amidebenen koplanar. Bild nach [22].

Die räumliche Struktur der Peptidbindung ist in Abbildung 3.6 wiedergegeben. Wegen des mesomeren Bindungscharakters der C-O-Bindung und der C-N-Bindung (siehe Abbildung 3.5) ist für eine Rotation um die C-N-Bindungsachse gegenüber der planaren Anordnung eine Aktivierungsschwelle von 88 kJ/mol nötig [107]. Daher ist die planare Anordnung der Peptidbindung die stabilste. Diese Anordnung wird auch als Amidebene bezeichnet. Rotationsfreiheit herrscht jedoch um die C_α -N-Bindungsachse (φ -Winkel) und die C_α -C-Bindungsachse (ψ -Winkel) zweier benachbarter Amidebenen. Aber auch die Rotationsfreiheit der φ - und ψ -Winkel (Diederwinkel) ist aus sterischen und energetischen Gründen eingeschränkt. Welche Kombinationen dieser Winkel aus sterischen Gründen erlaubt sind, wurde von G. N. Ramachandran untersucht [78]. Das Diagramm dazu ist in der Abbildung 3.7 gezeigt.



Struktur und Wechselwirkung von Proteinen

Diese Einschränkung gewährleistet, dass der minimale Abstand zwischen den Atomen des Proteinrückgrats nicht unterschritten wird. Zusätzlich können bei besonders günstiger Lage der Atome des Proteinrückgrats Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe und dem Wasserstoffatom nächstgelegener Amidebenen ermöglicht werden (Abbildung 3.8). Die Gesamtheit der Strukturen, die auf die Wechselwirkung zwischen den Atomen des Proteinrückgrats zurückzuführen sind, bilden die Sekundärstruktur des Proteins. Bei der Wasserstoffbrückenbindung innerhalb der selben Peptidkette ergeben sich Helixstrukturen für die Peptidkette (Abbildung 3.8).

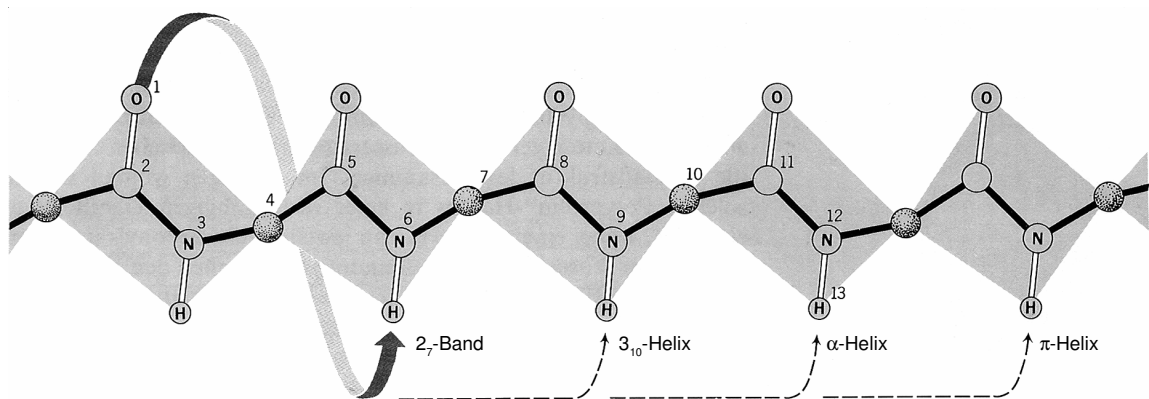


Abbildung 3.8: Durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe und dem Wasserstoffatom nächstgelegener Amidebenen entstehen die vier verwandten Helixtypen. Bild aus [22].

Die stabilste und am häufigsten vorkommende Helixstruktur ist die rechtsgängige α -Helix (Abbildung 3.9 links). Sie entsteht durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom einer Amidebene und dem Wasserstoffatom der dritt-nächstgelegenen Amidebene. Neben der Bildung von Helixstrukturen durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb einer Peptidkette existieren auch Proteinstrukturen, die durch Bindungen zwischen unterschiedlichen Peptidketten stabilisiert werden. Bekanntes Beispiel hierfür ist die 1951 von Corey und Pauling gefundene antiparallele β -Faltblattstruktur [70] (Abbildung 3.9). Neben geordneten Formationen der Sekundärstruktur¹ findet man in einem Proteinmolekül auch ungeordnete Bereiche, die geordnete Bereiche mit einander verbinden.

¹ Alternativ kann man auch die Sekundärstruktur über die Werte für die Diederwinkel definieren. Für die α -Helix lauten diese $\varphi = 113^\circ$ $\psi = 136^\circ$ [95], für die antiparallele β -Faltblattstruktur $\varphi = 40^\circ$, $\psi = 315^\circ$ [78].

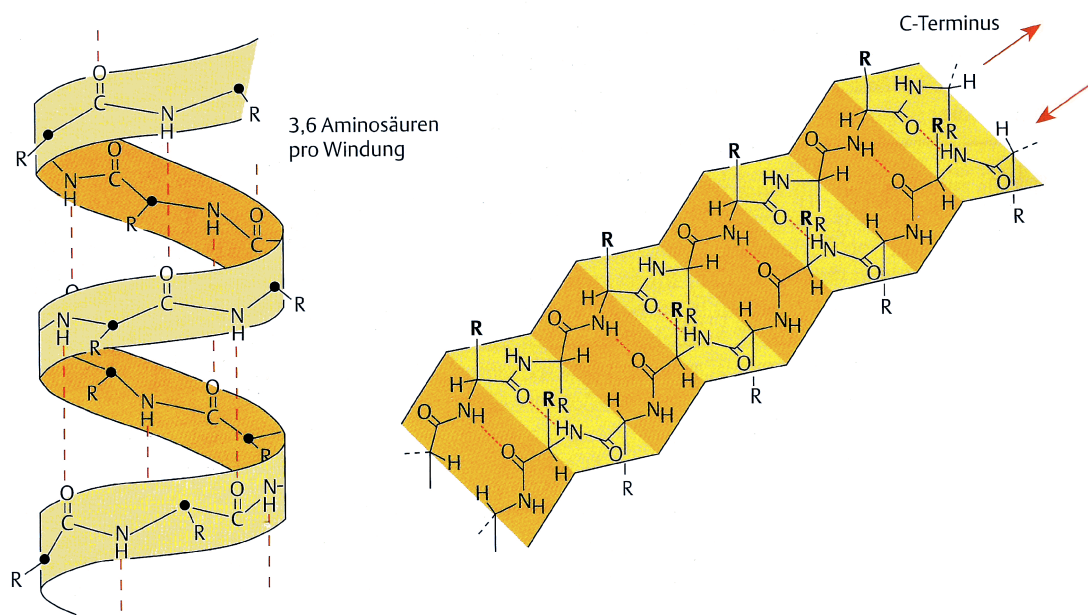


Abbildung 3.9: Räumliche Darstellungen der α -Helixstruktur und der antiparallelen β -Faltblattstruktur. (Bild aus [63]).

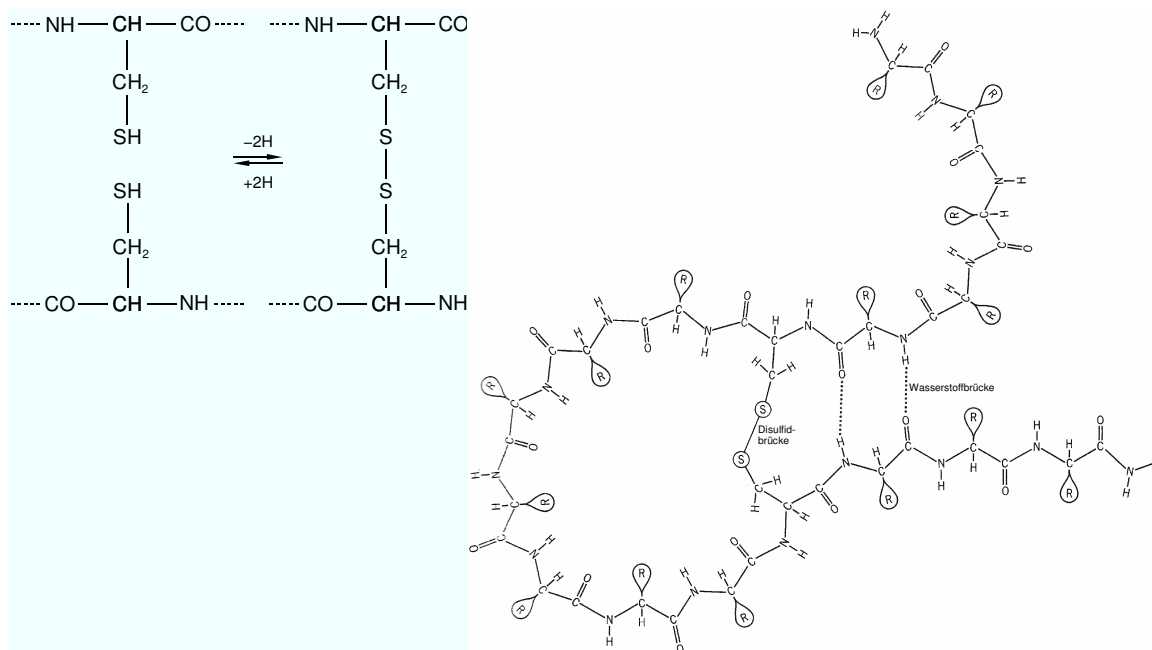


Abbildung 3.10: Faltung einer Peptidkette durch Disulfidbrückenbindung über zwei Cysteinseitenketten.

Durch Wechselwirkung der Proteinseitenketten, die in einer Peptidkette weit voneinander entfernt sind, kommt die Tertiärstruktur zu Stande. Art der Wechselwirkungen können hierbei ionische, van-der-Waals-Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung oder der hydrophobe Effekt sein. Darüberhinaus können kovalente Disulfidbrückenbindungen zur Faltung des Proteins beitragen. Diese ergibt sich durch Oxidation der Sulfhydrylgruppen zweier

Cysteinseitenketten (Abbildung 3.10). Die Quartärstruktur schließlich gibt bei Proteinen, die aus mehreren Polypeptidgruppen bestehen, die räumliche Anordnung der Untereinheiten sowie die Art der Bindung zwischen ihnen wieder. Ein gut untersuchtes Protein mit einer Quartärstruktur ist das Hämoglobin (siehe Kapitel 4.2).

3.3. Proteinadsorption

Die 20 Aminosäuren, aus denen die Proteine bestehen, haben unterschiedliche polare Eigenschaften. Dies führt dazu, dass an nahezu jeder Grenzfläche Adsorption beobachtet werden kann, sobald Proteine mit der Grenzfläche in Berührung kommen [59]. Wechselwirkungen, die für Adsorption verantwortlich sind, sind die van-der-Waals-Wechselwirkung, die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Proteinmolekül und der Grenzfläche und der hydrophobe Effekt. Allgemein gilt, dass Adsorption dann stattfindet, wenn die Gibbs'sche Energie G verkleinert wird: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$. Dies kann entweder durch eine Absenkung der Enthalpie H oder durch eine Erhöhung der Entropie S erfolgen. Die van-der-Waals-Wechselwirkung und die elektrostatische Wechselwirkung sind Beispiele für Wechselwirkungen, die zu einer Absenkung der Enthalpie führen. Im Falle der van-der-Waals-Wechselwirkung kann man mit Hilfe der Hamaker-Gleichung (3.7) zeigen, dass die Enthalpieänderung im Bereich von $\Delta H = -0,6 k_B T$ bis $\Delta H = -4,6 k_B T$ liegt, wenn sich kugelförmige Proteinmoleküle in einem Abstand zwischen 0,5 nm und 0,1 nm zu einer Wasser-Siliziumoxid-Grenzfläche befinden [13,14]. Im Vergleich dazu beträgt das elektrostatische Wechselwirkungspotential bei einem Abstand von 0,8 nm zwischen einem Lysozymmolekül und einer Grenzfläche zwischen $\Delta H = -0,8 k_B T$ und $\Delta H = -1,9 k_B T$, abhängig von der Orientierung des Moleküls [81]. Dass die van-der-Waals-Wechselwirkung teilweise stärker zur Adsorption beiträgt als die elektrostatische Wechselwirkung, liegt an der Abschirmung der Ladung durch Gegenionen. In Verbindung mit der elektrostatischen Wechselwirkung ist auch der pH-Wert der Proteinlösung von Bedeutung. Da Aminosäuren, aus denen die Proteine bestehen, amphoterer Charakter haben, hängt der Ladungszustand des Proteins vom pH-Wert der Lösung ab. Der pH-Wert, bei dem die Summenladung des Proteins Null beträgt, wird als der isoelektrische Punkt (pI) bezeichnet. Bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes ist das Protein positiv, bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes ist es negativ geladen. Im Bereich des isoelektrischen Punktes sorgt die anziehende elektrostatische Wechselwirkung zwischen den gegensätzlich geladenen Seitenketten an der Oberfläche eines Proteins für eine kompakte Konformation des Proteins. Von größerer Bedeutung für die Adsorption ist der hydrophobe

Effekt. Tritt ein hydrophober Teil des Proteins mit einer hydrophoben Oberfläche in Kontakt, werden die Wassermoleküle an der Grenzfläche freigesetzt und die Entropie erhöht (Abbildung 3.11).

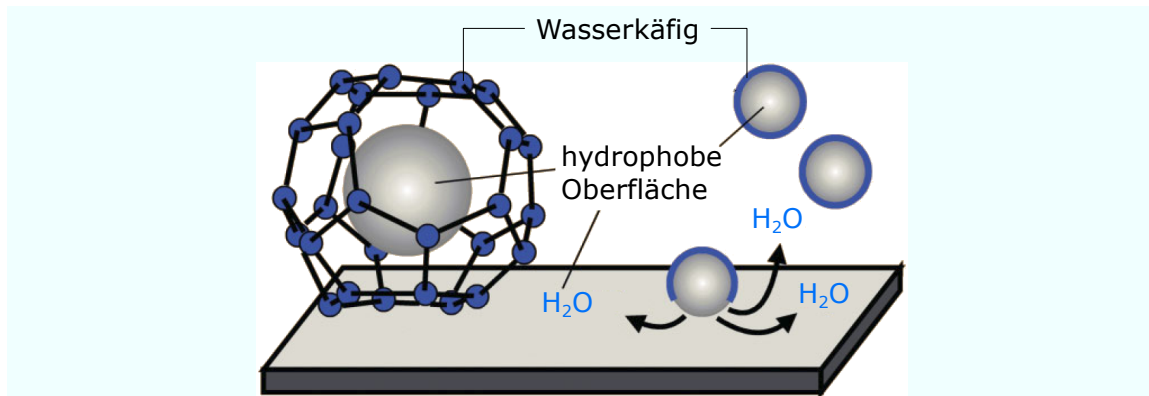
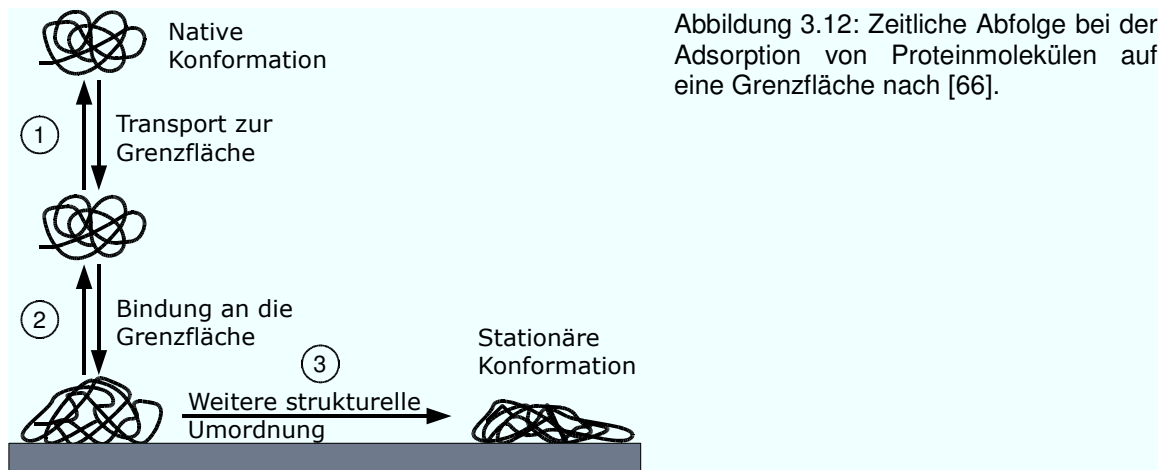


Abbildung 3.11: Hydrophober Effekt. Wassermoleküle bilden durch Wasserstoffbrückenbindungen netzartige Strukturen an hydrophoben Molekülen und Oberflächen. Tritt das Molekül mit einer hydrophoben Grenzfläche in Kontakt, werden die Wassermoleküle freigesetzt und die Entropie erhöht. Die Absenkung der Gibbs'schen Energie führt zu einer effektiven Anziehung zwischen Grenzfläche und Molekül. Bild wurde entnommen aus [14].

Dieser Vorgang führt ebenfalls zu einer Absenkung der Gibbs'schen Energie. Der hydrophobe Effekt ist somit eine entropisch treibende Kraft für die Adsorption. Im nativen Zustand befinden sich die unpolaren Seitenketten eines in wässriger Lösung befindlichen Proteins überwiegend im Inneren des Proteins, während die polaren Seitenketten sich an der Oberfläche des Proteins anordnen. Treten Proteine jedoch mit hydrophoben Grenzflächen in Kontakt, neigen die Proteine dazu über ihre hydrophoben Seitenketten zu adsorbieren. Daher kann die Adsorption auf hydrophoben Grenzflächen auch mit einer Entfaltung des Proteins einhergehen.

Der zeitliche Verlauf der Adsorption eines Proteinmoleküls kann allgemein durch folgende drei Stufen zusammengefasst werden [66] (Abbildung 3.12): In der ersten Stufe wird das Protein zur Grenzflächenregion transportiert. Diese Stufe des Adsorptionsprozesses ist ein stochastischer Vorgang, der mit der Brown'schen Molekularbewegung beschrieben werden kann [67]. In der zweiten Stufe des Adsorptionsprozesses sorgt das Oberflächenpotential in der Grenzflächenregion für die Adsorption des Proteins. Unmittelbar verbunden mit diesem Prozess ist, abhängig von der Art der Wechselwirkung, eine Konformationsänderung des Proteins. In der dritten Stufe des Adsorptionsprozesses erfolgt schließlich die irreversible Relaxation der Proteinkonformation in den stationären Zustand.

Struktur und Wechselwirkung von Proteinen



Als Maß für die Stärke der Adsorption von Proteinen an Grenzflächen wird häufig die Menge des adsorbierten Proteins pro Fläche, die Oberflächenkonzentration Γ , verwendet. In Abbildung 3.13 ist qualitativ die zeitliche Entwicklung einer adsorbierten Proteinschicht dargestellt.

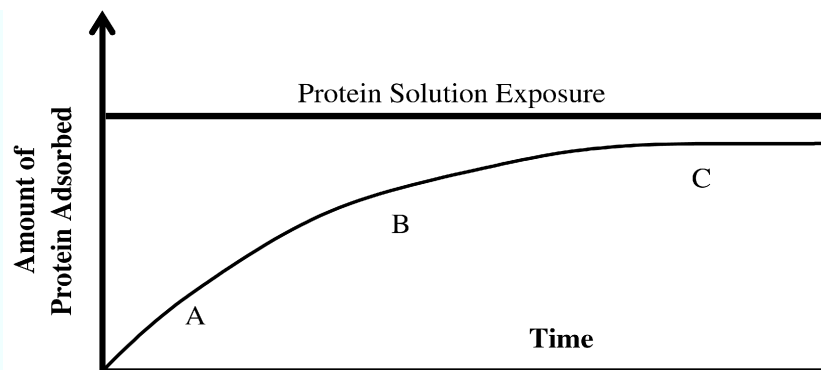


Abbildung 3.13: Darstellung der qualitativen zeitlichen Entwicklung einer Proteinmonolage. In Phase A finden zunächst reversible Adsorptionsprozesse statt. In der Phase B finden neben weiteren reversiblen Adsorptionsprozessen auch Relaxationen der bereits adsorbierten Moleküle in den stationären Zustand statt. In der Phase C schließlich sind die Proteinmoleküle mit einer derart hohen Dichte adsorbiert, dass weitere Adsorptionen aus sterischen Gründen verhindert werden. Bild entnommen aus [55].

Messung der Abhängigkeit zwischen Oberflächenkonzentration des adsorbierten Proteins und der Konzentration des Proteins in der Lösung bei gleich bleibender Temperatur wird als Adsorptionsisotherme bezeichnet. Wegen des vorhin erwähnten irreversiblen Charakters der Adsorption ist der Verlauf der Adsorptionsisotherme abhängig von der Vorgeschichte des Systems. Aus diesem Grund weist eine Adsorptionsisotherme, abhängig davon, ob sie bei zunehmender oder abnehmender Konzentration aufgenommen wurde, ein Hystereseverhalten auf [37].

4. Probensysteme und Präparation

4.1. Die Substrate

Die Benetzungseigenschaft eines Substrates ist ein entscheidender Faktor für die Adsorption von Molekülen auf diesem. Diese Eigenschaft kann durch Anbindung einer oder mehrerer organischer Schichten mit sogenannten funktionellen Gruppen an das Substrat grundlegend verändert werden. Die Strukturvielfalt von funktionalisierenden Schichten reicht von einer Ansammlung von Molekülen mit zufälliger Anordnung bis hin zu Systemen mit dicht gepackten, geordneten Molekülen, sogenannten Self Assembled Monolayers (SAMs). Im Folgenden werden drei Substrate aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

- **Silizium-Wafer**

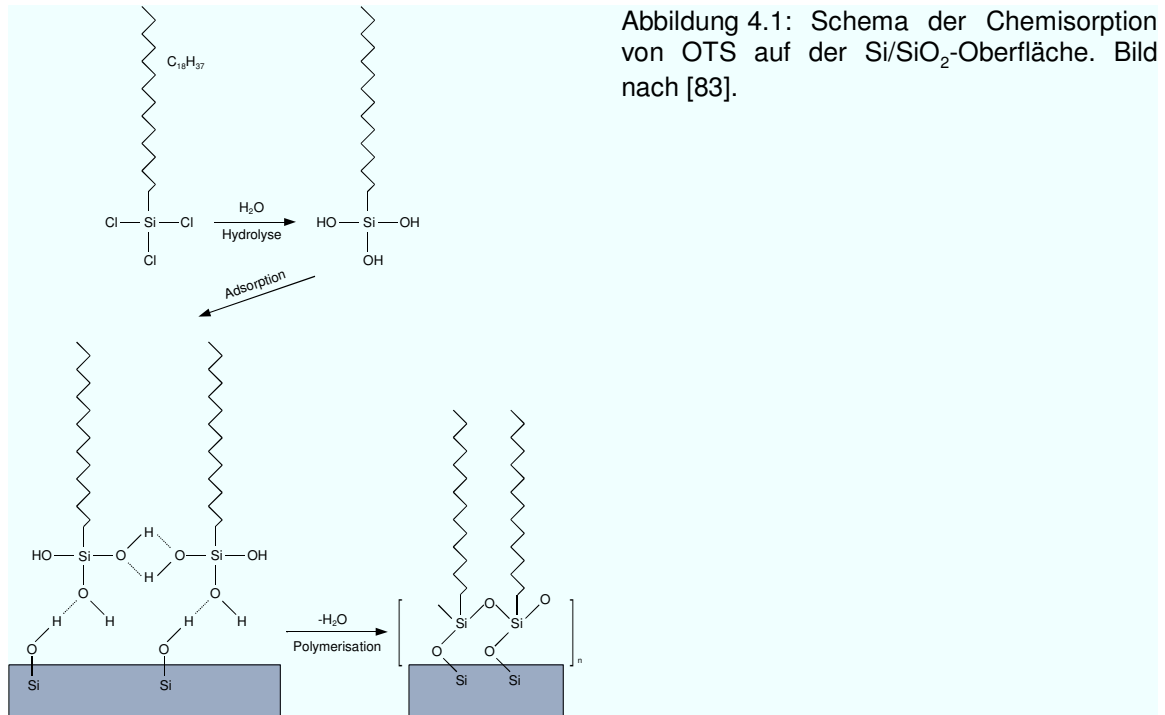
Bei Silizium-Wafern handelt es sich um Siliziumscheiben, die aus einem Silizium-Einkristall herausgeschnitten wurden. Ist Silizium der Umgebungsluft ausgesetzt, bildet sich durch Reaktion mit Sauerstoff amorphes SiO_2 auf der Waferoberfläche. Diese Oxidschicht verleiht der Oberfläche des Wafers chemische Stabilität. Die Dicke dieser Schicht liegt üblicherweise im Bereich $10 \text{ \AA} - 30 \text{ \AA}$ ¹. Eine Besonderheit der SiO_2 -Oberfläche ist, dass die restlichen Valenzen bei Raumtemperatur mit Wasser reagieren, sodass sich auf der Oberfläche Silanolgruppen $(\text{Si-OH})^-$ ausbilden [33]. Hierdurch wird die Oberfläche des Wafers hydrophil. Wegen ihrer chemischen Stabilität finden Silizium-Wafer häufig als Substrate für Adsorptionsmessungen Verwendung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Silizium-Wafer sowohl als Substrate für Proteinadsorption als auch als Basissubstrate für die Beschichtung mit Oktadecyltrichlorsilan (OTS) und Polyelektrolyten verwendet.

- **Oktadecyltrichlorsilan**

Eine weit verbreitete Methode SAMs auf Oberflächen zu erzeugen ist die Chemisorption von Oktadecyltrichlorsilan (OTS) auf Silizium. Wie alle Trichlorsilane besteht OTS aus einer SiCl_3 -Kopfgruppe und einer organischen Restkette. Durch eine chemische Reaktion zwischen der Hydroxylgruppe der Siliziumoxidschicht, dem adsorbierten Wasser und der Siliziumchlorid-Bindung der Kopfgruppe des OTS-Moleküls resultiert eine kovalente Bindung zwischen

¹ Die Schichtdicke kann durch Erhitzen des Wafers an Sauerstoff auf einige 100 nm vergrößert werden.

dem Substrat und dem OTS-Molekül [97]. Zwischen benachbarten OTS-Molekülen werden Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Zusätzlich können durch Polymerisation unter Abgabe von Wasser Netzwerke aus kovalenten Si-O-Si-Bindungen entstehen [83,97,105] (siehe Abb.4.1).



Aufgrund der unpolaren Kohlenwasserstoffkette des OTS-Moleküls ist die Oberfläche des mit OTS beschichteten Wafers hochgradig hydrophob. Eine Besonderheit der OTS beschichteten Oberfläche ist, dass sich in wässrigen Lösungen zwischen der OTS-Schicht und Wasser eine Wasserverarmungszone ausbildet. Dies wurde ursprünglich auf die Ausbildung sogenannter Nanogasbläschen zwischen der OTS-Schicht und Wasser zurückgeführt [24]. Spätere Messungen mittels Röntgenreflektivität [62,76] zeigten jedoch, dass dies auf die hydrophobe Eigenschaft der Oberfläche zurückzuführen ist. OTS-beschichtete Silizium-Wafer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung auf die Adsorption von Proteinen zu untersuchen.

• **Polyelektrolytische Schichten**

Im Gegensatz zu chemisorbierten Molekülen neigen physisorbierte Kleinmoleküle aufgrund thermischer Anregung dazu, von der Oberfläche wieder zu desorbieren. Die Tendenz zur Desorption kann durch die Verwendung von Makromolekülen, wie Polymere, stark unterdrückt werden. Die mehrfache Bindung der Moleküle mit der Oberfläche über verschiedene Kontaktstellen sorgt

für eine erhöhte Stabilität der Moleküle gegenüber der thermischen Desorption [10]. Eine besondere Bedeutung haben hierbei geladene Polymere, sogenannte Polyelektrolyte. Sie bestehen aus positiv oder negativ geladenen Monomeren. Beispiele für solche Polyelektrolyte sind Polyethylenimin (PEI^+), Polyallylaminhydrochlorid (PAH^+) und Polystyrolsulfonat (PSS^-) (Abbildung 4.2). Die Ladung des Monomers entsteht durch Dissoziation der Seitengruppen in Lösung.

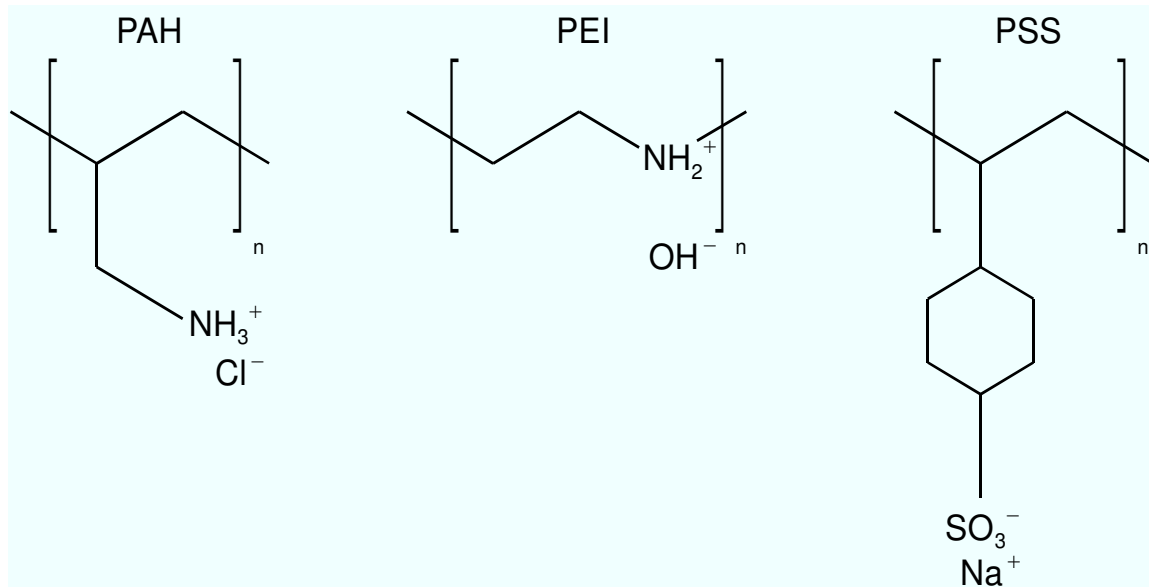


Abbildung 4.2: Struktur der positiv geladenen Monomere PEI und PAH und dem negativ geladenen Monomer PSS. Aus der n-fachen Wiederholung des Monomers ergibt sich die Polyelektrolytkette.

Entscheidend für die räumliche Ausdehnung von Polyelektrolytmolekülen in einer Lösung ist der Salzgehalt der Lösung. Die gegenseitige Abstoßung der Monomereinheiten in der Polyelektrolytkette führt dazu, dass eine Streckung des Polyelektrolyts bevorzugt wird. Wird die Salzkonzentration in der Lösung erhöht, werden dadurch die Ladungen der Monomere abgeschirmt. Auf diese Weise werden kompaktere Formationen der einzelnen Polyelektrolytmoleküle in der Lösung begünstigt.

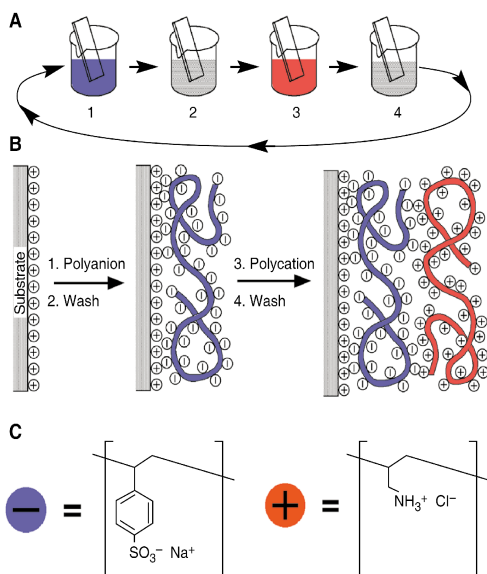


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der schichtweisen Deposition polyelektrischer Schichten [17].

Die Herstellung polyelektrolytischer Schichten erfolgt in der Praxis durch schichtweise Adsorption der Polyelektrolyte [17] (siehe Abbildung 4.3). Die Adsorption wird verursacht durch elektrostatische Anziehung zwischen der geladenen Oberfläche und den entgegengesetzt geladenen Polyelektrolytmolekülen. In der Regel wird nach der Adsorption der Polyelektrolytmoleküle auf die Substratoberfläche gleichzeitig auch eine Invertierung der Oberflächenladung erreicht [46]. Durch wiederholte Anwendung lassen sich Multischichten aus Polyelektrolyten mit abwechselnder Ladung erzeugen. Standardbeispiele hierfür sind Multischichten aus PSS und PAH. Zur Verankerung von Multischichten aus PSS und PAH dient in der Praxis häufig die ebenfalls elektrostatische Bindung von PEI an das Substrat [18]. Polyelektrolytische Schichten wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet um deren Einfluss auf die Proteinadsorption insbesondere im Hinblick auf die Umkehrung der Oberflächenladung zu untersuchen.

4.2. Proteine

• Lysozym

Entdeckt wurde das Lysozym von Alexander Flemming im Jahr 1922 [32]. Es ist ein Enzym, das die Polysaccharidkomponente in bakteriellen Zellwänden hydrolysiert und somit bakterizid wirkt. Eine der am meisten untersuchten Formen von Lysozym ist das Lysozym aus Hühnereiweiß. Es besteht aus nur einer einzigen Polypeptidkette mit 129 Aminosäuren und vier Disulfidbrücken [11]. Der isoelektrische Punkt pI von Lysozym liegt bei pH 11, die Masse des Lysozymmoleküls beträgt 14,3 kDa. Die Struktur des Hühnereiweißlysozyms

wurde zum ersten Mal 1965 von David Phillips mittels Röntgenkristallographie aufgelöst [5]. Lysozym ist ein globuläres Protein mit einer ellipsoidalen Form (Maße: $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$). Es besitzt zwei strukturelle Bereiche, sogenannte Domänen. Eine dieser Domänen besteht im Wesentlichen aus α -Helizes, der andere aus β -Faltblättern. Der enzymatisch aktive Bereich des Lysozyms liegt in der Spalte zwischen diesen beiden Domänen (Abbildung 4.4).

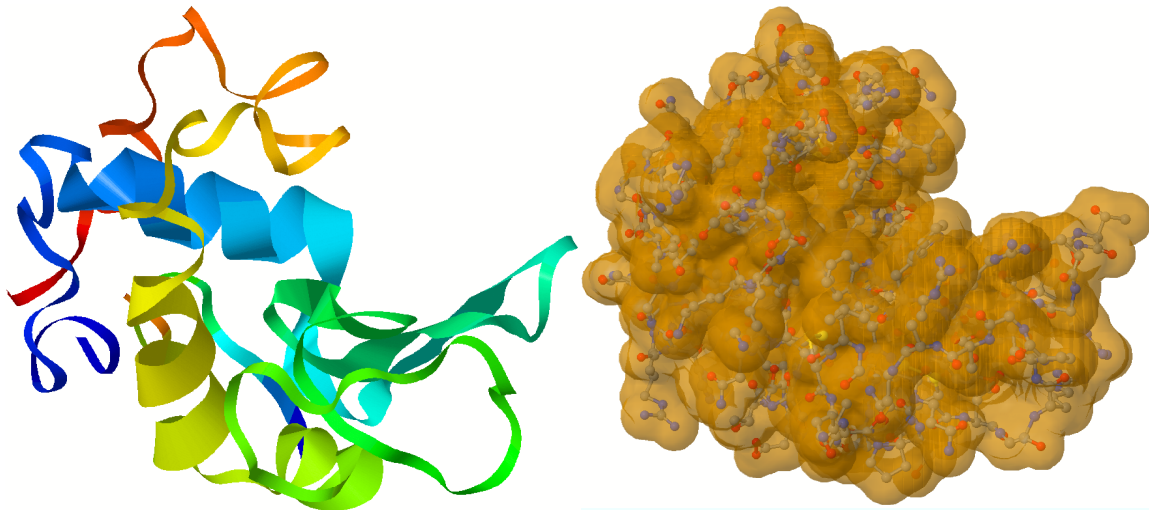


Abbildung 4.4: Links: Struktur des Hühnereiweißlysozyms in Bänderdarstellung. Rechts: räumliche Struktur des Moleküls mit der van-der-Waals-Oberfläche. Im oberen rechten Bereich ist die enzymatisch aktive Spalte zwischen den α - und β -Domänen zu sehen. Das Bild wurde erstellt mit Jmol aus der PDB-Datei 1LYZ.pdb [21].

• **Hämoglobin**

In lebenden Organismen ist Hämoglobin ein intrazelluläres Protein, das für den Sauerstofftransport verantwortlich ist. Die Struktur des Hämoglobins wurde 1968 von Max Perutz mittels Röntgenkristallographie bestimmt [72,73] (Abbildung 4.5). Hämoglobin ist ein tetrameres Protein mit der Quartärstruktur $\alpha_2\beta_2$, die sich als Dimer zweier $\alpha\beta$ -Protomere darstellen lässt. Die α - und β -Einheiten haben ausgeprägten Kontakt zueinander. Am $\alpha_1\text{-}\beta_1$ - und $\alpha_2\text{-}\beta_2$ -Kontakt sind 35 Aminosäuren, am $\alpha_1\text{-}\beta_2$ - und $\alpha_2\text{-}\beta_1$ -Kontakt 19 Aminosäuren beteiligt [102]. Ursache hierfür ist hauptsächlich die hydrophobe Wechselwirkung, aber auch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen tragen zur Stabilisierung bei. Zwischen den $\alpha_1\text{-}\alpha_2$ - bzw. $\beta_1\text{-}\beta_2$ -Verbindungsstellen verläuft ein 20 \AA langer und 50 \AA breiter Kanal. Die Maße des Hämoglobinmoleküls betragen $64 \times 55 \times 50 \text{ \AA}^3$, die Masse des Moleküls beträgt $64,5 \text{ kDa}$.

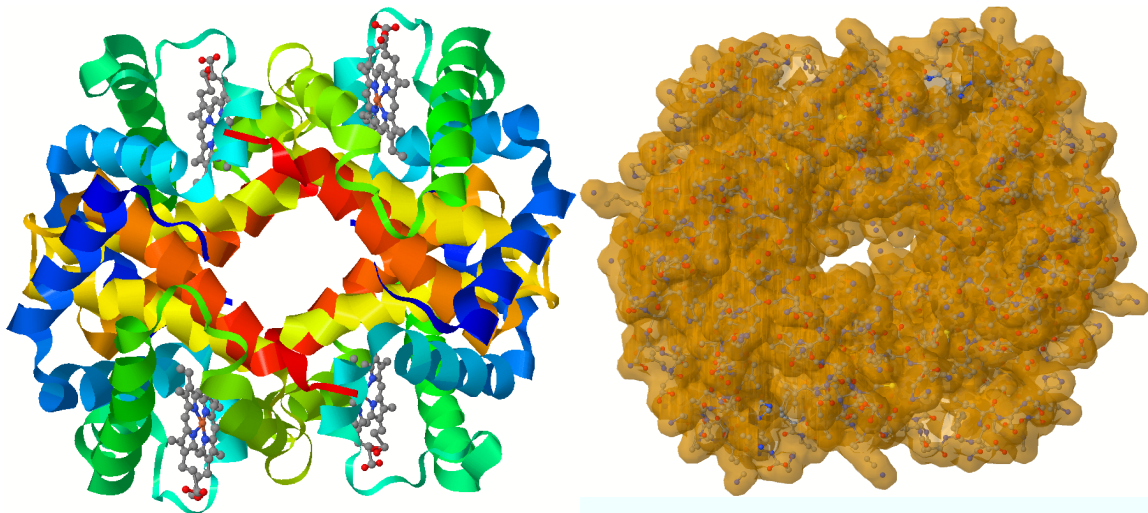


Abbildung 4.5: Links: Bänderdarstellung des menschlichen Hämoglobinmoleküls. Eingezeichnet sind zusätzlich die vier Hämgruppen. Rechts: räumliche Struktur von Hämoglobin mit der van-der-Waals-Oberfläche. Zu sehen ist auch der Hohlraum in der Mitte des Moleküls. Das Bild wurde erstellt mit Jmol aus der PDB-Datei 4hhb.pdb [30].

Hämoglobin enthält, wie alle anderen Vertreter der Globinmoleküle, an jedem Monomer eine Hämgruppe. Diese ist fest in einer hydrophoben Tasche des Proteins eingelagert. Das heterozyklische Ringsystem der Hämgruppe besteht aus einem Porphyrinmolekül und einem Eisenatom. Das Porphyrinmolekül setzt sich zusammen aus vier Pyrrolringen, die über Methylbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 4.6). Das Eisenatom der Hämgruppe befindet sich zwischen den vier Stickstoffatomen im Zentrum des Porphyrinmoleküls. Koordiniert wird das Eisenatom von den vier Stickstoffatomen des Porphyrins und einem Stickstoffatom der His-F8-Kette¹. Zusätzlich kann ein Sauerstoffmolekül die Position des sechsten Liganden am Eisenatom einnehmen.

¹ Sowohl bei Myoglobin als auch bei Hämoglobin wird das Eisenatom von dem Stickstoffatom der achten Seitenkette der Helix mit der Bezeichnung F koordiniert. Daher wird diese Histidinkette in der Nomenklatur auch als His-F8-Kette bezeichnet.

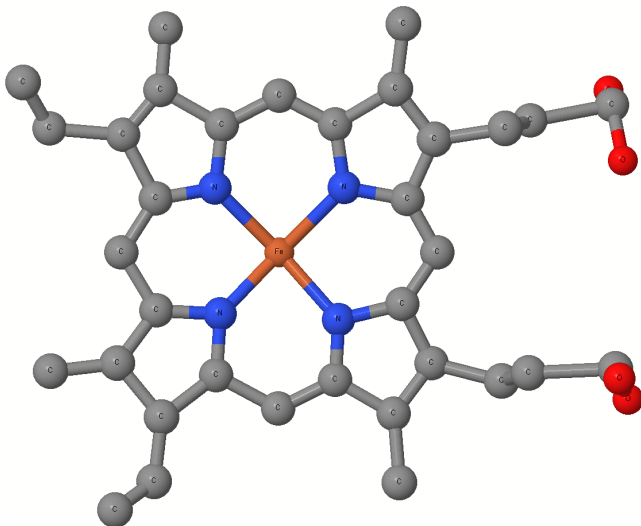


Abbildung 4.6: Struktur der Hämgruppe mit dem Eisenatom in der Mitte. Die Stickstoffatome des Porphyrins (blau) bilden vier Liganden des Eisenatoms (Orange). Im Hämoglobinmolekül bilden das Stickstoffatom der F8-Histidinkette und ein O_2 -Molekül weitere Liganden des Eisenatoms. Das Bild wurde erstellt mit JMol.

4.3. Präparation der Proben

• **Präparation der Proteinlösungen**

Sowohl Lysozym als auch Hämoglobin lagen vor der Präparation der Lösungen in Pulverform vor (Hühnereiweißlysozym: Fluka 62970, Rinderhämoglobin: Sigma H2500). Da Proteine in der Regel basisch bzw. sauer in der Lösung reagieren, ist es zweckmäßig, das Lösungsmittel, in dem die Proteine gelöst werden sollen, zu puffern. Als Pufferlösung wurde NaH_2PO_4 in wässriger Lösung verwendet. Die Konzentration der Pufferlösung war 0,01 molar. Der pH-Wert wurde durch Hinzufügen von Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

• **Reinigung der Silizium-Wafer**

Für die Reflektivitätsmessungen wurden polierte Silizium-Wafer mit einer (100)-Orientierung (Hersteller: Wacker Siltronic AG, Burghausen) verwendet. Diese wurden auf $18 \times 18,8 \text{ mm}^2$ bzw. $20 \times 20 \text{ mm}^2$ große Scheiben zugeschnitten. Vor der eigentlichen Reinigung wurden zunächst makroskopische Verunreinigungen der Waferoberfläche mechanisch entfernt. Anschließend wurden die Silizium-Wafer für ungefähr 15 Minuten einer Mischung aus 30% Wasserstoffperoxidlösung (Konzentration 35%) und 70% konzentrierter Schwefelsäure (Reinheit 98%), auch als Piranhalösung bekannt, ausgesetzt. Die Temperatur wurde in dieser Zeit mit Hilfe einer Heizplatte auf ca. 90°C gehalten. Anschließend wurden die Silizium-Wafer gründlich mit Milli-Q-Wasser (spezifischer Widerstand: $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$) abgespült. Nach der Reinigung wurden die Silizium-Wafer in Milli-Q-Wasser unter Schutzatmosphäre aufbewahrt.

• **Präparation polyelektrolytischer Schichten**

Die Präparation polyelektrolytischer Schichten erfolgte durch Adsorption der Polyelektrolyte aus der Lösung auf die vorher gereinigten Silizium-Wafer. Verwendet wurden die Polyelektrolyte Polyethylenimin (PEI⁺), Polyallylaminhydrochlorid (PAH⁺) und Polystyrolsulfonat (PSS⁻). Charakteristische Daten der verwendeten Polyelektrolyte können der Tabelle 4.1 entnommen werden. Lösungen der Polyelektrolyte wurden mit einer Monomer-Konzentration von 0,01 molar angesetzt. Zusätzlich wurden, um eine Faltung der Polyelektrolytmoleküle zu erreichen, den Lösungen von PSS und PAH 1 molar NaCl zugemischt. Der Lösung von PEI wurde kein Salz beigegeben.

Polyelektrolyt	Herstellernummer	Mittleres Molekulargewicht des Polymers (Da)	Summenformel des Monomers
PEI	Aldrich 243051	60000	C ₂₃ H ₅₇ N ₁₁
PSS	Sigma P3143	70000	[C ₈ H ₇ O ₃ S] ⁻ Na ⁺
PAH	Aldrich 283215	15000	[C ₃ H ₈ N] ⁺ Cl ⁻

Tabelle 4.1: Daten der verwendeten Polyelektrolyte.

Die Deposition der Polyelektrolyte auf Silizium-Wafer erfolgte durch Eintauchen der Wafer in die entsprechenden Lösungen in der Reihenfolge PEI, PSS, PAH für jeweils 15 Minuten. Zwischen den einzelnen Depositionsschritten wurden die Wafer gründlich mit Milli-Q-Wasser gespült.

• **Präparation von OTS-beschichteten Wafern**

Die Präparation der OTS-beschichteten Silizium-Wafer erfolgte mittels Immersionsbeschichtung [68,91]. Hierzu wurde die OTS-Lösung (Aldrich, 90%) durch Beigabe von Chloroform auf eine Konzentration von 0,1 mM gebracht. Durch Eintauchen der vorher gereinigten Silizium-Wafer in die Lösung für die Dauer von einer Stunde wurden diese mit OTS beschichtet. Das überschüssige OTS wurde anschließend durch ein Chloroform-Bad vom OTS-beschichteten Silizium-Wafer gelöst.

5. Die Messplätze

Im Folgenden werden die Messplätze beschrieben, an denen Hochenergie-röntgenreflektometrie durchgeführt wurde. Die Hochenergie-röntgenreflektometrie ist eine Methode, die sich sehr gut dafür eignet, die Struktur sogenannter vergrabener Schichten zu untersuchen. Bei dieser Messmethode wird davon Gebrauch gemacht, dass der Absorptionskoeffizienten μ mit steigender Energie E wie E^{-3} abfällt¹ [2]. Im Falle der Proteinadsorption bietet die Hochenergie-röntgenreflektometrie die Möglichkeit die adsorbierte Proteinschicht in situ zu untersuchen. Hierbei durchdringt der Röntgenstrahl mit nur geringem Absorptionsverlust die umgebende Proteinlösung und wird von der fest-flüssig-Grenzfläche reflektiert.

Neben der hohen Photonenenergie ist ein hoher Strahlungsfluss eine weitere Anforderung, die an den Messplatz gestellt wird. Gemäß der kinematischen Näherung (Gleichung (2.53) im Kapitel 2.7) ist die Reflektivität proportional zum Betragsquadrat der Fouriertransformierten der Elektronendichteänderung vertikal zur Probenoberfläche. Bei einer In-situ-Untersuchung wird durch die Wahl der Proteinlösung als Referenzmedium an Stelle von Luft die Differenz der Elektronendichte zwischen der Proteinschicht und dem Referenzmedium gesenkt. Dies hat vor allem zu Folge, dass die Kiessig-Oszillationen nicht mehr so stark ausgeprägt sind wie bei einer Ex-situ-Messung. Um dennoch quantitativ gut auswertbare Messungen zu erhalten, benötigt man daher für eine gute Statistik der Messpunkte einen hohen Photonenfluss. Besonders geeignet als Strahlungsquellen sind hierbei vor allem Synchrotronstrahlungsquellen der dritten Generation. Die im folgenden beschriebenen Strahllinien erfüllen die erforderlichen Kriterien.

5.1. Die Strahllinie BL9 an DELTA

Die Dortmunder Elektronenspeicherringanlage DELTA der Technischen Universität Dortmund ist eine Synchrotronstrahlungsquelle der dritten Generation. Die Speicherringanlage besteht aus drei Hauptkomponenten. Im Linearbeschleuniger LINAC werden die Elektronen auf eine Energie von bis zu 75 MeV beschleunigt. Die weitere Beschleunigung auf 1,5 GeV erfolgt im Boostersynchrotron BoDo. Der Speicherring wird mit einem maximalen Strahlstrom von 130 mA und einer Lebensdauer von bis zu 10 Stunden betrieben. Die Synchrotronstrahlung wird bei DELTA u.a. mit Hilfe von speziellen Anordnungen von Magneten, sogenannte insertion devices, erzeugt [100]. Eine

¹ Dies gilt allerdings nur, wenn resonante Streuung ausgeschlossen wird.

Die Messplätze

schematische Darstellung des Aufbaus von DELTA ist in Abbildung 5.1 wiedergegeben.

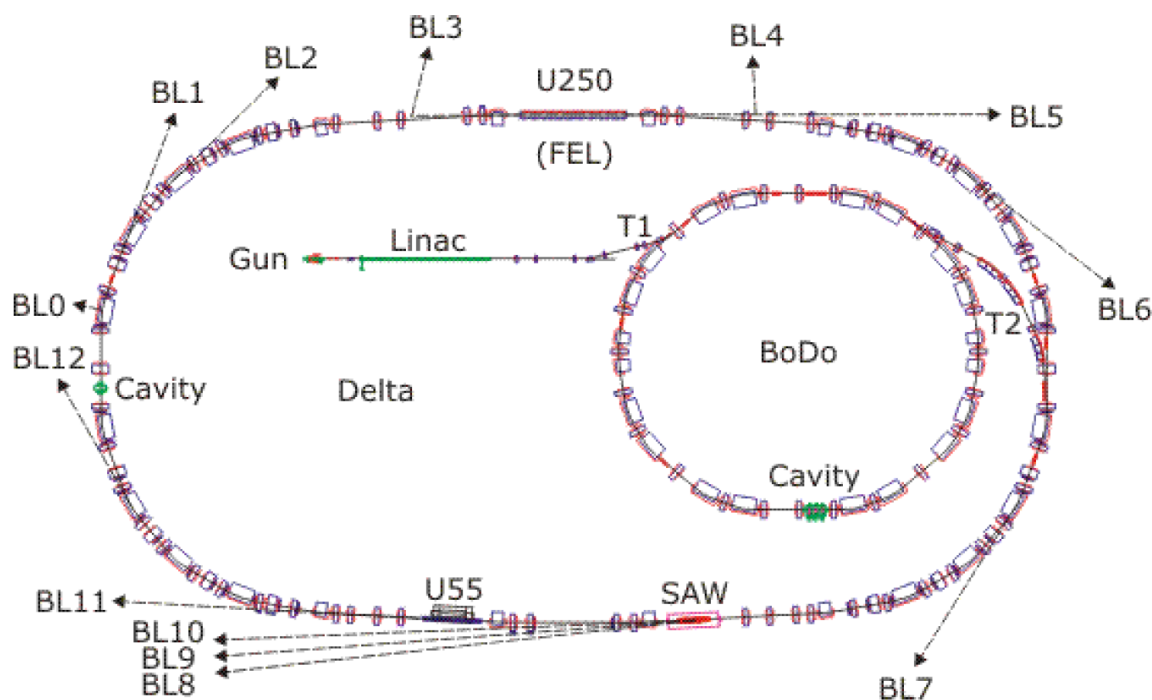


Abbildung 5.1: Schema der Dortmunder Elektronenspeicherringanlage DELTA. Eingezeichnet sind auch die Lagen der Strahllinien (BL) und insertion devices (SAW, U55, U250).

Die Strahlung der Strahllinie BL9 wird mit Hilfe des supraleitenden asymmetrischen Wigglers (SAW) erzeugt. Dieser hat eine kritische Energie von 7,9 keV. Mit Hilfe eines Silizium-(311)-Doppelkristallmonochromators können erwünschte Strahlungsenergien in dem Bereich zwischen 4 keV und 30 keV mit einer Auflösung von $\Delta E/E = 10^{-4}$ selektiert werden [71]. Durch eine sagittale Krümmung des zweiten Monochromatorkristalls wird zusätzlich eine horizontale Fokussierung des Strahls auf 1 mm Breite erzielt. Hochenergiereflektivitätsmessungen an der Strahllinie BL9 werden üblicherweise bei einer Energie von 27 keV durchgeführt. Dieser Wert für die Photonenenergie stellt letztendlich einen Kompromisswert zwischen Photonenenergie und Photonenfluss dar. Ein typischer Wert für den Photonenfluss an der Strahllinie BL9 bei einer Energie von 27 keV und einem Strahlstrom des Speicherrings von 100 mA ist $7 \cdot 10^8$ Photonen/s/mm² [71]. Ebenfalls von Bedeutung ist im Fall biologischer und organischer Proben die Vermeidung von Strahlenschäden an der zu untersuchenden Probe. Wie Messungen von Reich et al. [79] zeigten, können Strahlenschäden bei ähnlich großen Photonflüssen mit einer Energie um 25 keV gering gehalten werden.

Der schematische Aufbau für Reflektivitätsmessungen ist in Abbildung 5.2 wiedergegeben.

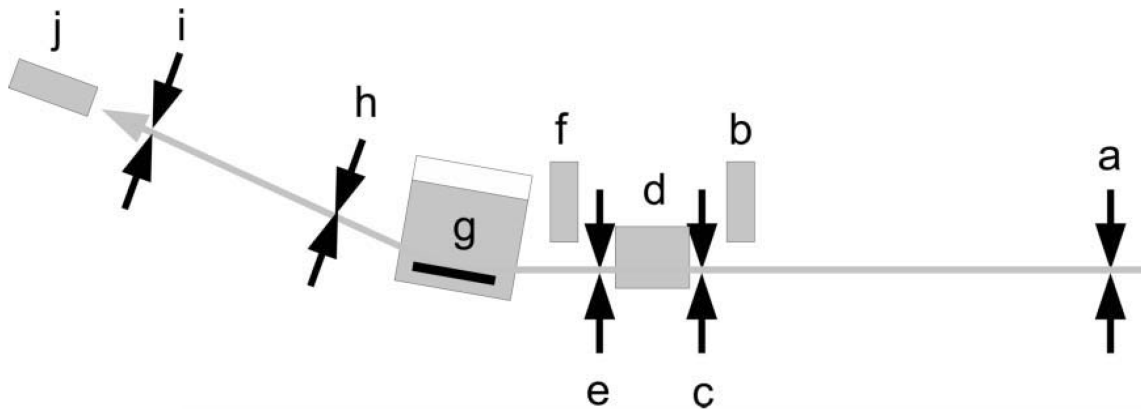


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für Reflektivitätsmessungen an der Strahllinie BL9 (Bild aus [71]). Die Aufbaukomponenten a bis j sind im Text erklärt.

Der einfallende, monochromatische Röntgenstrahl wird mittels zweier Blendensysteme a und c kollimiert. Die Strahlhöhe wird mit Hilfe des Blendensystems e auf 0,2 mm eingestellt. Zwischen den Blenden e und c befindet sich das Autoabsorbersystem d, das dazu dient, den Photonenfluss zu begrenzen und somit eine Sättigung des Detektors zu vermeiden. Vor und hinter dem Autoabsorber befinden sich zwei NaI-Monitordetektoren (b und f). Diese werden verwendet, um ein Referenzmaß für die Intensität des Primärstrahls zu erhalten. Die zu vermessende Probe wird auf einem Sechs-Kreis-Diffraktometer befestigt (Abbildung 5.3). Der Probenstisch g befindet sich in einem Abstand von 200 mm von dem Blendensystem e. Hinter dem Probenstisch befinden sich zwei weitere Blendensysteme. Das Blendensystem h, das in einem Abstand von 300 mm von der Probe positioniert ist, dient hauptsächlich dazu, diffus gestreute Strahlung abzuschirmen und somit die Untergrundstrahlung im Detektor zu vermindern¹. Das Blendensystem i unmittelbar vor dem NaI-Detektor j bestimmt schließlich die Winkelauflösung der Messung. Sie liegt typischerweise bei einem Wert von 0,015°. Die Ausrichtung der Probe im Strahl erfolgt mit Hilfe des erwähnten Sechs-Kreis-Diffraktometers (Abbildung 5.3). Da an der Strahllinie BL9 die Richtung des einfallenden Strahls nicht verändert werden kann, wird die Änderung des Einfallswinkels auf die Probe durch Verkippen der Probe um den Probenmittelpunkt erzielt (θ -Rotation). Die Position des Detektors wird über die θ -Rotation verändert. Als Probenbehälter wurde die in Abbildung 5.4 dargestellte

¹ Gerade bei Hochenergiereflektivitätsmessungen an flüssig-fest-Grenzflächen ist dies besonders wichtig, da durch das Durchdringen der Flüssigkeitsphase auch Streustrahlung vom Flüssigkeitsvolumen entsteht.

Die Messplätze

Probenzelle verwendet. Die Halterungsschiene dient zur Stabilisierung des Substrates gegenüber Verkippungen innerhalb der Zelle.

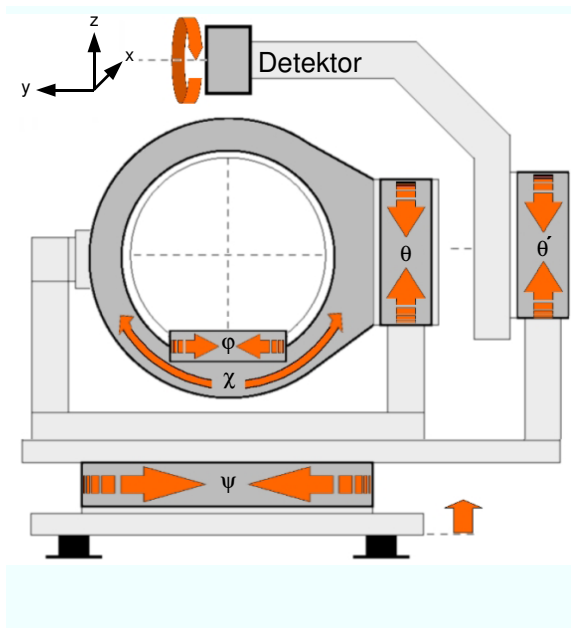


Abbildung 5.3: Rotationsfreiheitsgrade des Sechskreis-Diffraktometers an der Strahllinie BL9 (Bild aus [52]). Die positive x-Richtung entspricht der Strahlrichtung.

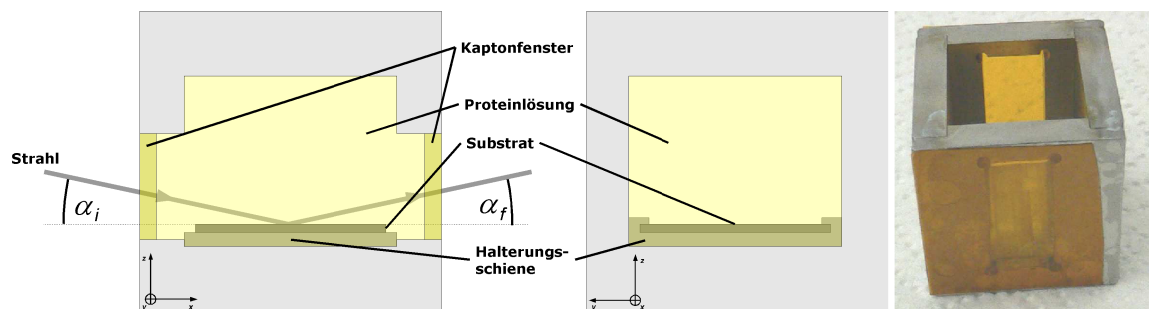


Abbildung 5.4: Links: Skizze der verwendeten Probenzelle. Rechts: Bild der Probenzelle ohne Deckel.

5.2. Die Strahllinie ID15A

Hochenergiereflektivitätsmessungen wurden auch an der Strahllinie ID15A der europäischen Synchrotronstrahlungsanlage (ESRF) in Grenoble durchgeführt. Als Strahlungsquelle dient hier ein siebenpoliger asymmetrischer Wiggler mit einer kritischen Energie von 44,1 keV [39,80]. Photonen mit einer Energie unterhalb von 40 keV werden mit Hilfe eines 4 mm dicken Aluminiumabsorbers herausgefiltert. Die Breite des unfokussierten Strahls ist 200 μm , die Höhe 67 μm . Als Monochromator werden zwei gebogene, asymmetrisch geschnittene Siliziumkristalle in fester Laue-Geometrie [96] verwendet (Abbildung 5.6). Der erste Kristall dient der Erzeugung einer virtuellen Strahlungsquelle für den

zweiten Kristall. Durch den zweiten Kristall wird die intrinsische Divergenz des Strahls ausgeglichen. Der Energiebandpass des Monochromators wird durch einen asymmetrischen Schnitt der Kristalle relativ zu der (111)-Ebene bestimmt. Der Schnittwinkel beträgt für den ersten Kristall $37,74^\circ$, für den zweiten Kristall $37,76^\circ$ [20]. Die Energieauflösung des Monochromators beträgt somit $\Delta E/E=2\cdot 10^{-3}$. Eine zusätzliche Fokussierung des Strahls wird mit Hilfe des sogenannten „compound refractive lenses“ (CLR) erzeugt. Diese Einheit besteht aus einem System von 232 einzelnen Aluminiumlinsen mit je einem Krümmungsradius von $200\ \mu\text{m}$. Durch die CRLs wird der Strahl auf eine Höhe von $5\ \mu\text{m}$ und eine Breite von $15\ \mu\text{m}$ fokussiert. Der fokussierte Strahl hat bei einem Strahlstrom des Speicherrings von $200\ \text{mA}$ einen Fluss von $2\cdot 10^{10}$ Photonen/s [80] (maximale Flussdichte: $2,6\cdot 10^{14}$ Photonen/s/ mm^2). Die Divergenz des Strahls beträgt $30\ \mu\text{rad}$ [20]. Der Probenstisch, auf dem die zu untersuchende Probe montiert wird, besitzt unterschiedliche Translation- und Rotationsmöglichkeiten, die der Justierung der Position und Neigung der Probe dienen.

Für Reflektivitätsmessungen im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Änderung des Einfallswinkels die Neigung der Probe verändert. Die Photonenenergie betrug $72,5\ \text{keV}$. Bei dieser Energie erfordert die Messung ein hohes Maß an mechanischer Stabilität des Aufbaus. Zu diesem Zweck wurde bei Messungen an der Strahllinie ID15A eine Probenzelle verwendet, in der der Silizium-Wafer durch eine Haltevorrichtung an Verschiebungen gehindert wurde (Abbildung 5.5).

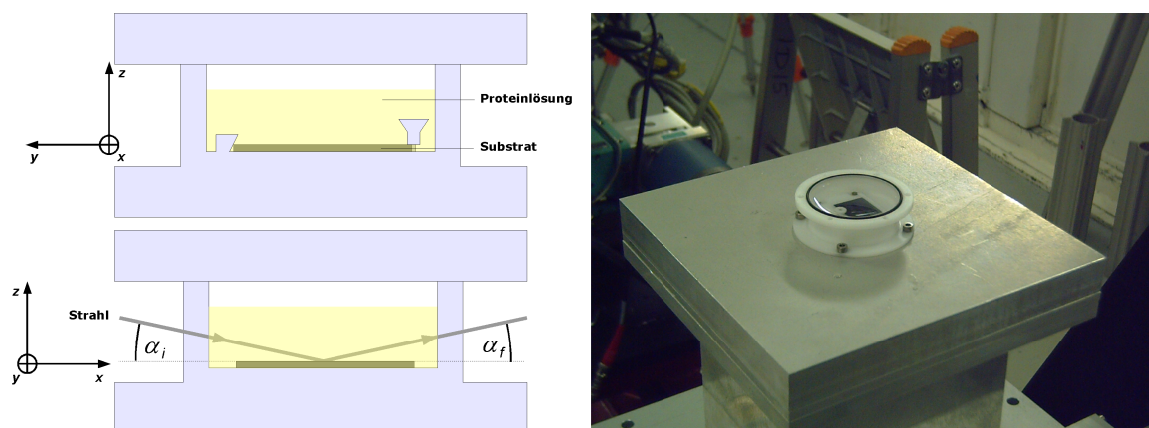
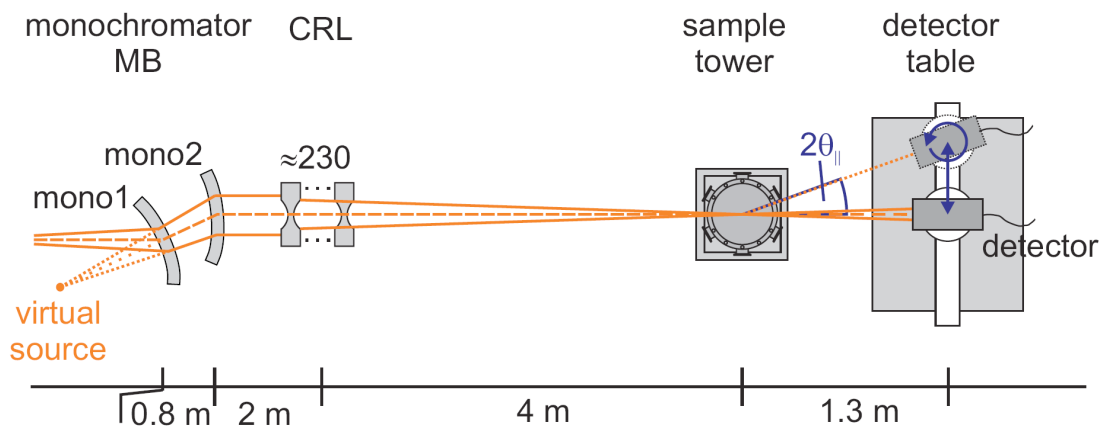


Abbildung 5.5: Links: Skizze der verwendeten Probenzelle mit Haltevorrichtung für das Substrat. Rechts: Bild der Probenzelle ohne Deckel.

Die Messplätze

a top view



b side view

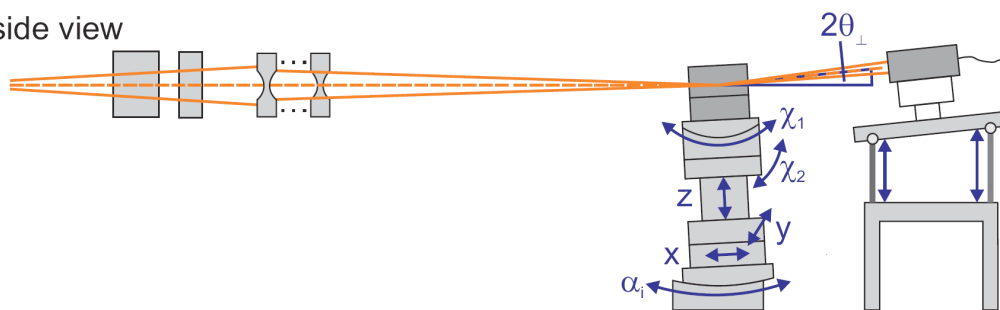


Abbildung 5.6: Skizze von dem experimentellen Aufbau der Strahllinie ID15A. Als Monochromator werden zwei asymmetrisch geschnittene gebogene Siliziumkristalle verwendet (mono1, mono2). Die sogenannten „compound refractive lens“-Systeme (CRL), bestehend aus ca. 230 Aluminiumlinsen, dienen der zusätzlichen Fokussierung des Strahls. Der Probenstisch (sample tower), auf dem die Probe montiert wird, besitzt mehrere Rotation- und Translationsfreiheitsgrade, die der Justierung der Position und Neigung der Probe dienen. Bild aus [26].

6. Auswertung der Daten und Diskussion

Im diesem Kapitel wird die Auswertung der aufgenommenen Reflektivitätsdaten präsentiert. Reflektivitätsmessungen wurden an der Strahllinie BL9 der Dortmunder Elektronenspeicherringanlage DELTA und an der Strahllinie ID15A der europäischen Synchrotronstrahlungsanlage ESRF durchgeführt. Die Probensysteme, die gewählt wurden, waren Lösungen von Lysozym und Hämoglobin auf unterschiedlichen Substraten. Als Substrate wurden reine Silizium-Wafer mit einer hydrophilen Oberfläche, Silizium-Wafer mit physisorbierten polyelektrolytischen Schichten sowie Silizium-Wafer mit OTS-Beschichtung (hydrophob) gewählt. Grund der Wahl der unterschiedlichen Substrate war es, den Einfluss verschiedener Wechselwirkungsmechanismen auf die Adsorption zu untersuchen. Die Reflektivitätsmessungen fanden stets ca. 30 Minuten nach dem Eintauchen des Substrats in die Proteinlösung statt. Nach dieser Zeitspanne wird davon ausgegangen, dass sich zwischen dem adsorbierten Protein und der umgebenden Proteinlösung ein Gleichgewicht einstellt, sodass Effekte der Adsorptionskinetik vernachlässigt werden können. Die Auswertung der Reflektivitäten, die in diesem Kapitel präsentiert werden, erfolgte mit dem rekursiven Verfahren von Parratt bzw. mit dem Matrixverfahren von Abélès (siehe Anhang 8.1). Zur Modellierung des Dichteprofiles wurden das Box-Modell nach Gleichung (2.54) und das Effektive-Dichte-Profil nach Gleichung (2.57) aus Kapitel 2.8 verwendet. Als Verteilungsfunktion Y_j wurde überwiegend die erf-Funktion verwendet. Bei einigen Profilen wurde zwischen den erf-Funktionsverläufen des Profils auch ein linearer Verlauf $\text{lin}(z)$ der Form

$$\text{lin}(z) = \begin{cases} 0 & \text{für} & z < -\frac{\sqrt{2\pi}\sigma}{2} \\ \frac{1}{2} + \frac{z}{\sqrt{2\pi}\sigma} & \text{für} & -\frac{\sqrt{2\pi}\sigma}{2} < z < \frac{\sqrt{2\pi}\sigma}{2} \\ 1 & \text{für} & z > \frac{\sqrt{2\pi}\sigma}{2} \end{cases} \quad (6.1)$$

eingefügt, um die Anpassung zu verbessern.

6.1. Auswertung der Messungen an der Strahllinie BL9

Die Messungen an der Strahllinie BL9 wurden alle bei einer Energie von 27 keV durchgeführt. Nach jeder Reflektivitätsmessung wurde zur Bestimmung der diffus gestreuten Strahlung auch eine longitudinal diffuse Messung

durchgeführt¹. Die Untergrundmessung wurde anschließend von der Reflektivitätsmessung abgezogen. Zur Berechnung der Modellreflektivitäten wurde neben der Dispersion auch die Absorption berücksichtigt. Wie Gleichung (2.11) aus Kapitel 2.2 zeigt, ändern sich Dispersion δ und Absorption β nicht unabhängig voneinander. Sie sind beide über die Teilchendichte mit einander verknüpft. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, wurde nicht die Absorption selbst, sondern der Quotient δ/β für die Anpassung verwendet. Da der Quotient δ/β nur von den Formfaktoren der jeweiligen Atome bzw. Moleküle abhängt, kann er für das gleiche Material als nahezu konstant betrachtet werden. Die Erfahrung bei den hier verwendeten Modellsystemen zeigt außerdem, dass erst eine Veränderung des Quotienten δ/β um eine oder zwei Größenordnungen eine merkliche Veränderung in der berechneten Reflektivität nach sich zieht. Der Quotient δ/β wurde für Silizium auf 10^2 , für die adsorbierte Schicht, der Proteinlösung und Wasser auf 10^3 gesetzt. Berechnet wurden die Werte mittels [108].

6.1.1 Charakterisierung der Substrate

Vor den eigentlichen Messungen mit Proteinen wurden Reflektivitäten von den Substraten ohne Proteinadsorbat aufgenommen. Dies ist sinnvoll, da man nur so bei der späteren Messung feststellen kann, welche Anteile des Dichteprofiles tatsächlich auf das Adsorbat zurückzuführen sind. Auch können auf die Weise bei reinen Silizium-Wafern etwaige Verunreinigungen an der Oberfläche festgestellt werden. Für die Charakterisierungsmessung der Wafer wurde die Probenzelle mit Wasser gefüllt. Hierdurch kann einerseits verhindert werden, dass sich während der Messung Verschmutzungen aus der Luft an der Substratoberfläche ansammeln. Andererseits hat man mit Wasser ein Referenzmedium, dessen Dispersion nahezu dieselbe wie die von der Proteinlösung ist². Somit ist ein qualitativer Vergleich zwischen der Charakterisierungsmessung vom Substrat und der späteren Messung mit Protein möglich.

¹ Bei der longitudinal diffusen Messung ist der Detektorwinkel gegenüber dem Detektorwinkel in der Reflektivitätsmessung um einen konstanten Betrag $\Delta\alpha$ innerhalb der Einfallsebene verschoben ($\alpha_r = \alpha_i + \Delta\alpha$). Für $\Delta\alpha$ wurde hier ein Wert von $0,1^\circ$ gewählt.

² Berechnung der Dispersion bei den gewählten Proteinkonzentrationen ergibt zwischen der Elektronendichte von reinem Wasser und der Proteinlösung eine relative Abweichung von lediglich 0,01%.

- **Charakterisierung von Silizium-Wafern**

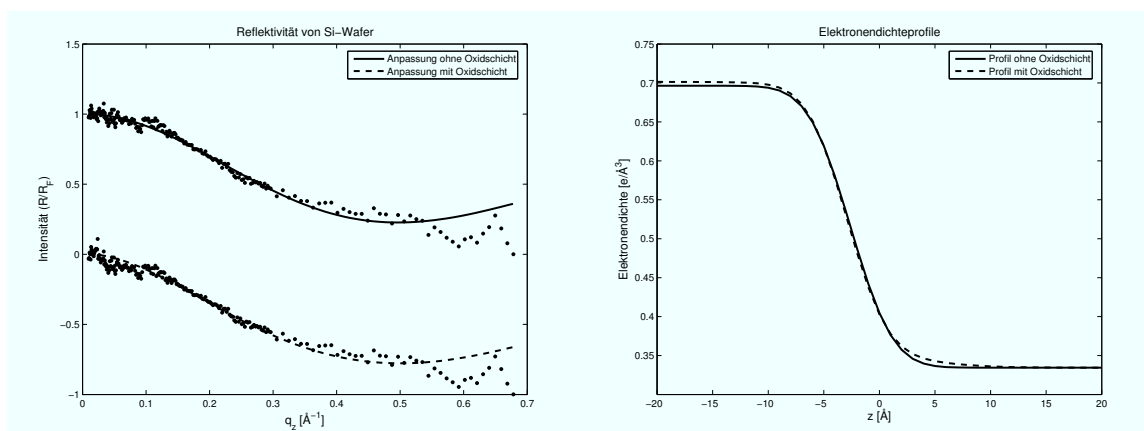


Abbildung 6.1: Gemessene Reflektivität von einem Si-Wafer im Wasser und die dazu berechneten Reflektivitäten (durchgezogene und gestrichelte Kurve). Die durchgezogene Kurve wurde aus einem Modell bestehend aus nur einer Grenzfläche, die gestrichelte aus einem Modell mit einer Oxidschicht berechnet. Aus Gründen der Übersicht sind die berechneten Reflektivitäten vertikal gegenüber einander verschoben.

In Abbildung 6.1 ist die Reflektivität eines Silizium-Wafers stellvertretend für alle Charakterisierungsmessungen von Silizium im Wasser wiedergegeben. Die durchgezogene Kurven sind die berechneten Reflektivitäten. Die Reflektivität ist auf die Fresnelreflektivität normiert. Zur Berechnung der Reflektivität wurden ein Profil bestehend aus nur einer Silizium-Wasser-Grenzfläche und ein weiteres Profil mit einer Schicht zwischen den beiden Medien angesetzt. Hierdurch sollte die Siliziumdioxidschicht berücksichtigt werden. Die Anpassung mit beiden Modellen führt jedoch auf nahezu dasselbe Elektronendichteprofil. Die Abweichung der Modellreflektivitäten von den Messpunkten im Bereich $q_z > 0,5 \text{ \AA}^{-1}$ könnte zwar auf eine Oxidschicht hindeuten, die geringen Abweichungen bei hohen q_z -Werten lassen jedoch vermuten, dass es sich in diesem Fall um eine sehr dünne Schicht handelt, die mit dem zu Verfügung stehenden q_z -Bereich nicht eindeutig aufgelöst werden kann. Für die weitere Auswertung der Messdaten an BL9 wurde die Oxidschicht der Silizium-Wafer nicht mehr berücksichtigt. Die Werte aus der Anpassung mit nur einer Silizium-Wasser-Grenzfläche sind der Tabelle 6.1 zu entnehmen.

	δ_{Si} [10^{-7}]	ρ_{Si} [$e/\text{\AA}^3$]	δ_{Wasser} [10^{-7}]	ρ_{Wasser} [$e/\text{\AA}^3$]
Verwendeter Wert	6,584	0,6964	3,162	0,334
Literaturwert	6,631 [108]	0,7014	3,162 [108]	0,334

Tabelle 6.1: Literaturwerte und angepasste Werte für die Silizium-Wasser-Grenzfläche.

Der Wert für die Dispersion von Silizium bestimmt zwar bei diesen Messungen den kritischen Winkel für die Totalreflexion, leichte Verschiebungen des Wafers in der Probenzelle ($<0.01^\circ$) von Messung zu Messung führten ebenfalls zu leichten Verschiebungen des kritischen Winkels. Um einen Wert für die Dispersion von Silizium zu erhalten, wurde aus mehreren gemessenen Reflektivitäten die Dispersion bestimmt und darüber der Mittelwert gebildet. Dieser Wert ist in Tabelle 6.1 angegeben. Bei der weiteren Auswertung der Reflektivitäten wurden die in Tabelle 6.1 aufgeführten Werte für die Dispersion von Silizium und Wasser verwendet und nicht mehr verändert. Verschiebungen am kritischen Winkel, die sich bei einigen berechneten Reflektivitäten gegenüber den gemessenen durch die Verwendung dieser Werte ergaben, wurden durch die Annahme eines Winkel-Offsets korrigiert.

• **Charakterisierung polyelektrolytisch beschichteter Silizium-Wafer**

Für die Adsorption von Lysozym und Hämoglobin auf polyelektrolytischen Schichten wurden sowohl Silizium-Wafer mit PEI-PSS-Beschichtung als auch Silizium-Wafer mit einer PEI-PSS-PAH-Beschichtung hergestellt. Während der Charakterisierungsmessungen befanden sich die polyelektrolytisch beschichteten Wafer im Wasser (pH 7). Die Charakterisierungsmessungen der PEI-PSS-beschichteten Silizium-Wafer sind in der Abbildung 6.2, die der PEI-PSS-PAH-beschichteten Wafer in der Abbildung 6.3 dargestellt. Um die Proben für die Auswertung der Proteinadsorption zuordnen zu können, wurden sie mit Nummern versehen. In Abbildung 6.2 und 6.3 rechts sind die Elektronendichteprofile wiedergegeben, aus denen die Modellreflektivitäten berechnet wurden. Zur Modellierung der Profile wurde im Fall der PEI-PSS-Wafer ein Schichtsystem bestehend aus zwei Schichten, im Fall der PEI-PSS-PAH-Wafer ein Schichtsystem aus drei Schichten verwendet. Bei beiden Profilen wurde ein stückweise linearer Verlauf des Profils angenommen. Diese Annahme konnte erheblich zur Verbesserung der Anpassung beitragen. Auffällig ist bei nahezu allen Profilen ein Anstieg der Elektronendichte, der im Bereich zwischen $z=7 \text{ \AA}$ und $z=9 \text{ \AA}$ beginnt und bei einem Maximum bei $z=30 \text{ \AA}$ bzw. $z=40 \text{ \AA}$ endet. Eine Erhöhung der Dichte innerhalb der polyelektrolytischen Schicht, wie sie in der Literatur durch eine Verzahnung unterschiedlich geladener Polyelektrolyte begründet wird (sogenannte fuzzy layer) [75,86,87], kann hier als Erklärung für diesen Anstieg ausgeschlossen werden. Wegen des schwachen Elektronendichtekontrastes zwischen

verzahnten und unverzahnten Bereichen ist eine solche Dichteerhöhung mit Röntgenreflektometrie schwer zu beobachten¹.

Die Inhomogenität der adsorbierten Polyelektrolytschicht kann durch eine zu schwache Bindung der Polyelektrolytmoleküle an das Substrat erklärt werden. Zurückzuführen wäre dies auf eine zu geringe Oberflächenladungsdichte des Silizium-Wafers bei der Präparation der PEI-Schicht. Eine zu geringe Oberflächenladungsdichte führt dazu, dass die erste Schicht (PEI) nur über wenige geladenen Gruppen an das Substrat bindet [17]. Bei weiterer Adsorption polyelektrolytischer Schichten wird die anziehende Wechselwirkung zwischen den Schichten stärker, da von hier ab nur noch die Wechselwirkung zwischen den Polyelektrolytmolekülen maßgeblich ist. Auf diese Weise wird die adsorbierte Menge von Schicht zu Schicht erhöht, was sich letztendlich in der höheren Dichte bemerkbar macht [40,56].

Wie man erkennen kann, liefert die Charakterisierung bei allen polyelektrolytisch beschichteten Wafern nahezu übereinstimmende Profile. Dies ist ein Beleg für die gute Reproduzierbarkeit der Präparation.

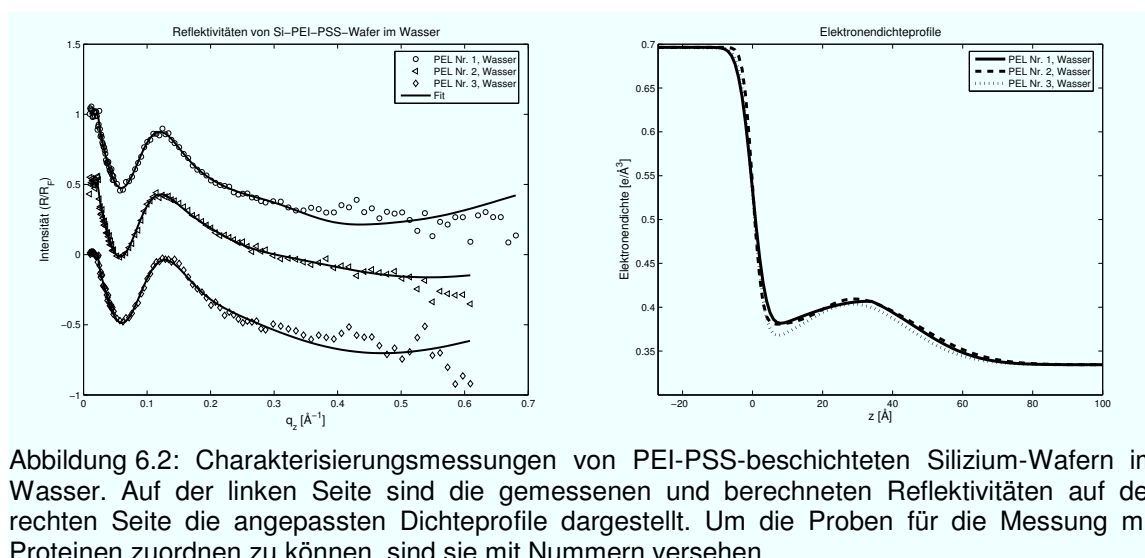


Abbildung 6.2: Charakterisierungsmessungen von PEI-PSS-beschichteten Silizium-Wafern im Wasser. Auf der linken Seite sind die gemessenen und berechneten Reflektivitäten auf der rechten Seite die angepassten Dichteprofile dargestellt. Um die Proben für die Messung mit Proteinen zuordnen zu können, sind sie mit Nummern versehen.

¹ In der Literatur können Röntgenreflektivitätsmessungen von polyelektrolytischen Schichten häufig mit dem einfachen Modell einer Schicht mit einer konstanten Elektronendichte ohne eine interne Struktur erklärt werden [17,18]. Die sogenannte fuzzy layer wurde bisher nur mittels Neutronenreflektometrie bei einer zusätzlichen Kontrasterhöhung mittels Deuterierung festgestellt [75].

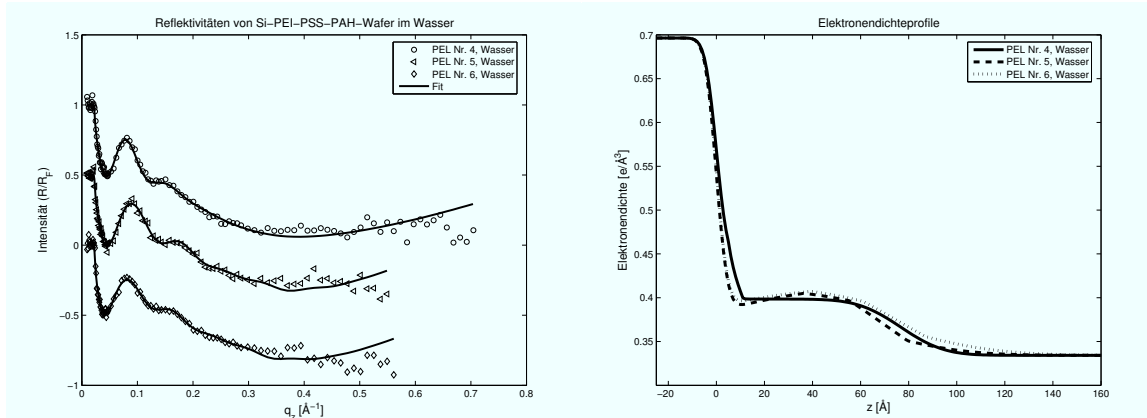


Abbildung 6.3: Charakterisierungsmessungen von PEI-PSS-PAH-beschichteten Silizium-Wafern im Wasser. Auf der linken Seite sind die gemessenen und berechneten Reflektivitäten auf der rechten Seite die angepassten Dichteprofile dargestellt. Um die Proben für die Messung mit Proteinen zuordnen zu können, sind sie mit Nummern versehen.

• Charakterisierung des OTS beschichteten Silizium-Wafers

Die auf die Fresnelreflektivität normierte Reflektivitätsmessung vom OTS-beschichteten Silizium-Wafer und die dazu angepasste Modellreflektivität sind auf der linken Seite der Abbildung 6.4 zu sehen. Rechts in der Abbildung 6.4 ist das Elektronendichteprofil, das für die Berechnung der Modellreflektivität verwendet wurde, dargestellt. Für die Modellierung des Profils wurde das Effektive-Dichte-Modell (Kapitel 2.8) verwendet. Angesetzt wurden hierzu formal zwei Schichten.

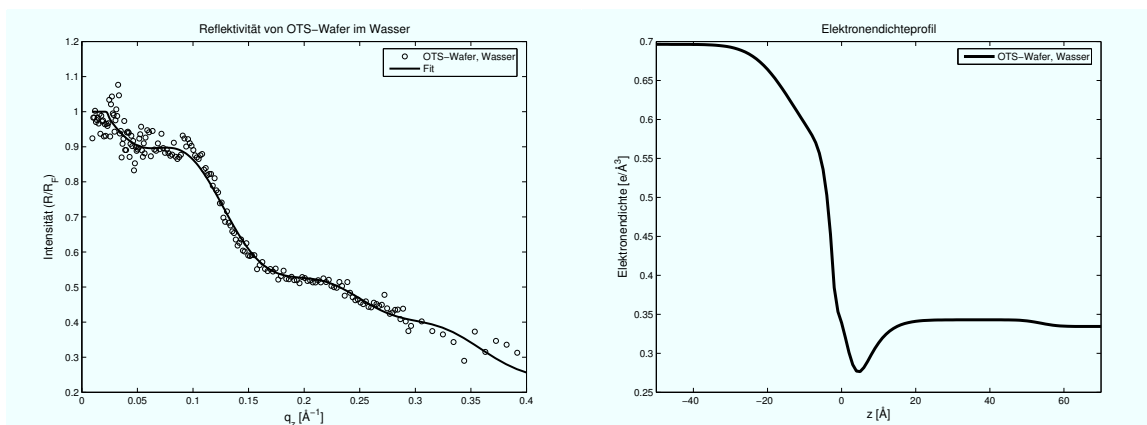


Abbildung 6.4: Charakterisierungsmessung vom Silizium-Wafer mit einer chemisorbierten OTS-Schicht im Wasser.

Zu erkennen ist im Elektronendichteprofil der Bereich ($0 \text{ \AA} - 20 \text{ \AA}$) mit einer geringeren Elektronendichte als das Referenzmedium Wasser. Das Minimum der Elektronendichte in diesem Bereich liegt bei $0,28 e/\text{\AA}^3$. Dies ist eine Übereinstimmung mit der von Mezger et al. [62] beobachteten

Wasserverarmungszone, dessen Minimum bei ca. $0,27 \text{ e}/\text{\AA}^3$ liegt. Die Breite der Wasserverarmungszone kann aus dem Elektronendichteprofil in Abbildung 6.4 zu $7,5 \text{ \AA}$ abgeschätzt werden. Der Bereich zwischen $z = -40 \text{ \AA}$ und $z = 0 \text{ \AA}$ zeigt das Dichteprofil der Siliziumdioxidschicht, der Kopfgruppe des OTS-Moleküls und der Kohlenwasserstoffkette des OTS-Moleküls. Aufgrund einer nicht optimalen Präparation stimmt dieser Bereich des Elektronendichteprofiles nicht exakt mit dem Profil von Mezger et al. überein. Die leicht höhere Elektronendichte gegenüber Wasser (um ca. 3%) im Bereich oberhalb der Wasserverarmungszone (zwischen $z = 15 \text{ \AA}$ und $z = 60 \text{ \AA}$) ist vermutlich auf leichte Verunreinigungen des Wafers nach der Präparation zurückzuführen.

6.1.2 Auswertung der pH-abhängigen Messungen von Lysozym auf Silizium¹

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorption von Lysozym wurde bei pH 4, pH 7 und pH 11 untersucht. Für die Konzentration wurde ein fester Wert von $0,1 \text{ mg/ml}$ gewählt. Die Reflektivitäten und die zugehörigen Elektronendichteprofile sind in der Abbildung 6.5 dargestellt. Zu erkennen sind die Kiessig-Oszillationen, die auf die adsorbierte Proteinschicht hindeuten. Ein quantitatives Ergebnis wurde durch Anpassung einer Modellreflektivität erzielt. Angesetzt wurde für das Profil ein erf-Profil der Form

$$\rho(z) = \rho_{Si} + (\rho_{ads} - \rho_{Si}) \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{z}{\sqrt{2} \sigma_{Si}} \right) \right] + (\rho_{H_2O} - \rho_{ads}) \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{z - d_{ads}}{\sqrt{2} \sigma_{ads}} \right) \right]. \quad (6.2)$$

Wie man anhand der Abbildung 6.5 erkennen kann, lassen sich mit diesem Modell die gemessenen Reflektivitäten bis zu einem q_z -Wert von $0,3 \text{ \AA}^{-1}$ gut anpassen. Optimiert wurden die Dicke der Schicht, die Rauigkeit und die Elektronendichte. Die Werte sind in der Tabelle 6.2 aufgeführt.

pH-Wert	$\rho_{ads} [\text{e}/\text{\AA}^3]$	$d_{ads} [\text{\AA}]$	$\sigma_{ads} [\text{\AA}]$	$\Gamma_{ads} [\text{mg}/\text{m}^2]$
pH 11	$0,39 \pm 0,02$	35 ± 1	9,3	$2,31 \pm 0,5$
pH 7	$0,39 \pm 0,03$	29 ± 1	6,3	$1,75 \pm 0,4$
pH 4	$0,35 \pm 0,02$	31 ± 1	5,0	$0,62 \pm 0,1$

Tabelle 6.2: Ermittelte Werte für die adsorbierte Proteinschicht in Abhängigkeit vom pH-Wert (Konzentration $0,1 \text{ mg/ml}$).

¹ Die in diesem Kapitel präsentierten Messdaten wurden hiervon unabhängig im Rahmen einer Diplomarbeit (F. Evers [29]) diskutiert und in [28] publiziert.

Auswertung der Daten und Diskussion

Die Angabe dieser Werte ist in diesem Fall sinnvoll, da durch die Einfachheit des Modells eine Unterscheidung zwischen ρ_{ads} , d_{ads} und σ_{ads} gegeben ist².

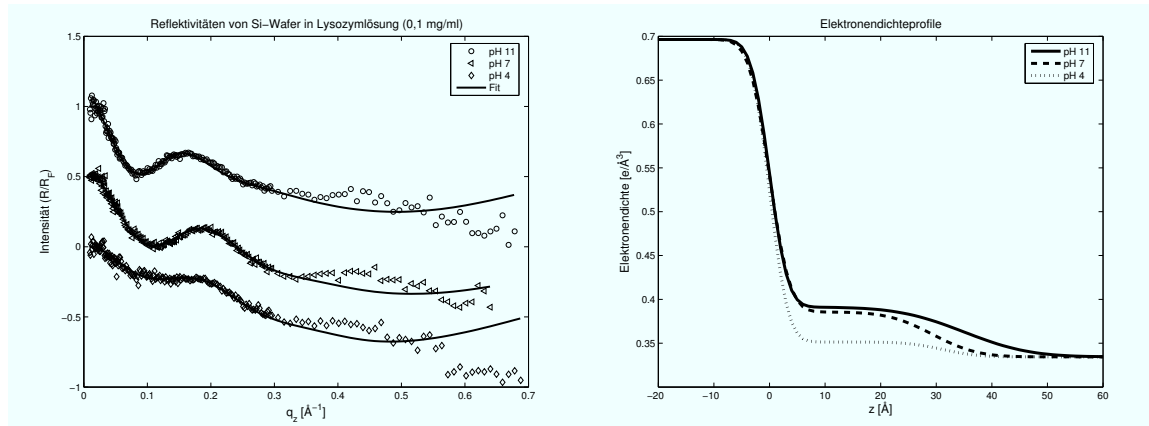


Abbildung 6.5: Darstellung der gemessenen und berechneten Reflektivitäten vom Silizium-Wafer in der Proteinlösung bei verschiedenen pH-Werten (links). Rechts sind die Dichteprofile vom Schichtsystem dargestellt.

Um den Wert für die Oberflächenkonzentration Γ_{ads} des Proteins zu erhalten, wurde das lateral gemittelte Dichteprofil des adsorbierten Proteins \bar{n}_{Lys} betrachtet. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass in der adsorbierten Schicht auch Wassermoleküle eingelagert sind. Die Einlagerung von Wassermolekülen führt dazu, dass der Wert für die Elektronendichte der Schicht zwischen den Werten von Wasser und Lysozym liegt.

Insgesamt kann die Verteilung unterschiedlicher Substanzen in einem Schichtsystem durch die z -abhängigen Volumenanteile $\phi(z)$ berücksichtigt werden. Für die lateral gemittelten Elektronendichteprofile ρ_1 und ρ_2 vor und nach der Adsorption gelten folgende Beziehungen

$$\rho_1(z) = \phi_{Si}^{(1)}(z) n_{Si} Z_{Si} + \phi_{Wasser}^{(1)}(z) n_{Wasser} Z_{Wasser}, \quad (6.3)$$

$$\rho_2(z) = \phi_{Si}^{(2)}(z) n_{Si} Z_{Si} + \phi_{Wasser}^{(2)}(z) n_{Wasser} Z_{Wasser} + \phi_{Lys}(z) \frac{Z_{Lys}}{V_{Lys}}. \quad (6.4)$$

ϕ_{Si} , ϕ_{Wasser} und ϕ_{Lys} sind die z -abhängigen Volumenanteile von Silizium, Wasser und Lysozym. Es gelten

$$\begin{aligned} \phi_{Si}^{(1)}(z) + \phi_{Wasser}^{(1)}(z) &= 1 \quad \text{und} \\ \phi_{Si}^{(2)}(z) + \phi_{Wasser}^{(2)}(z) + \phi_{Lys}(z) &= 1. \end{aligned} \quad (6.5)$$

² Dieser Sachverhalt ist darauf zurückzuführen, dass die Dicke der Schicht groß gegenüber der Rauigkeit beider Grenzflächen ist.

Z_{Si} , Z_{Wasser} und Z_{Lys} sind Elektronenzahlen pro Teilchen ($Z_{Wasser}=10$, $Z_{Lys}=7630$ ¹). n_{Wasser} ist die Anzahl der Wassermoleküle pro Volumen bei einer Dichte von 1 g/ml. v_{Lys} bezeichnet das van-der-Waals-Volumen des Lysozymmoleküls ($v_{Lys}=16700 \text{ \AA}^3$ [12]). Bildet man die Differenz der Gleichungen (6.3) und (6.4) erhält man mit Hilfe der Beziehungen (6.5) für den Volumenanteil von Lysozym

$$\phi_{Lys} = \frac{\rho_2 - \rho_1}{\frac{Z_{Lys}}{v_{Lys}} - n_{Wasser} Z_{Wasser}} \quad (6.6)$$

Hierbei wurde berücksichtigt, dass ϕ_{Si} vor und nach der Adsorption gleich bleibt.

Mit $\bar{n}_{Lys} = \frac{M_{Lys}}{v_{Lys}} \phi_{Lys}$ ergibt sich für die Dichte von Lysozym ($M_{Lys} = 14,3 \text{ kDa}$)

$$\bar{n}_{Lys} = M_{Lys} \frac{\rho_2 - \rho_1}{Z_{Lys} - v_{Lys} n_{Wasser} Z_{Wasser}} \quad (6.7)$$

Die Proteindichteprofile der adsorbierten Lysozymschichten sind in Abbildung 6.6 wiedergegeben.

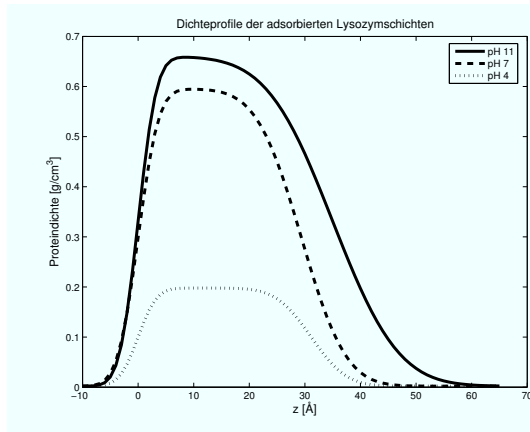


Abbildung 6.6: Proteindichteprofile von Lysozym innerhalb der adsorbierten Schicht in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zur Berechnung des Profils wurde Gleichung (6.7) verwendet. Die Oberflächenkonzentration Γ_{ads} ergibt sich aus Gleichung (6.8).

Aus diesen Profilen lassen sich mittels Integration

$$\Gamma_{ads} = \int \bar{n}_{Lys}(z) dz \quad (6.8)$$

die Oberflächenkonzentrationen Γ_{ads} der adsorbierten Schichten ermitteln (Tabelle 6.2). Vergleicht man die ermittelten Werte für die Dicke der adsorbierten

¹ Die Anzahl der in dem Protein enthaltenen Atome jeder Sorte wurde der PDB-Datei 1LYZ.pdb entnommen [21].

Lysozymschicht mit den molekularen Maßen des Lysozymmoleküls ($30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$), so lässt dies einen Rückschluss auf die Ausbildung einer Monolage zu. Aus den Maßen des Lysozymmoleküls lassen sich auch Vorhersagen über die Oberflächenkonzentration der adsorbierten Lysozymschicht machen¹. Im Falle einer „side-on“-Konfiguration der Moleküle (mit der Längsachse der Moleküle parallel zur Oberfläche) beträgt die Oberflächenkonzentration $\Gamma = 1,76 \text{ mg/m}^2$, bei einer „end-on“-Konfiguration (mit der Längsachse des Moleküls senkrecht zur Oberfläche) $\Gamma = 2,64 \text{ mg/m}^2$. Für beide Werte wurde jeweils die dichteste Packung der Proteinmoleküle angenommen. Ein Vergleich mit den gemessenen Werten für die Oberflächenkonzentration führt zu dem Ergebnis, dass bei pH 4 die Waferoberfläche nicht vollständig mit Lysozymmolekülen bedeckt ist. Bei pH 7 hingegen stimmt der gemessene Wert für die Oberflächenkonzentration mit dem berechneten Wert für die dichteste Packung im Falle einer „side-on“-Konfiguration überein. Der nahezu gleiche Wert für die Schichtdicke bei pH 4 und pH 7 lässt den Rückschluss zu, dass in beiden Fällen überwiegend „side-on“-Konfigurationen der Lysozymmoleküle vorhanden sind. Bei pH 11 hingegen ist auch die Dicke der adsorbierten Proteinschicht höher, allerdings geringer als bei einer Adsorption, an der nur „end-on“-Konfigurationen beteiligt sind (45 \AA). Daher ist es wahrscheinlich, dass hier eine Kombination aus „end-on“- und „side-on“-Konfigurationen vorliegt. Die laterale Mittlung ergibt den Wert zwischen 30 \AA und 45 \AA .

Sowohl pH 4 als auch pH 7 liegen beide unterhalb des isoelektrischen Punktes von Lysozym (pH 11). Bei diesen pH-Werten ist das Lysozymmolekül insgesamt positiv geladen. Als Ursache für die Adsorption kommt bei diesen pH-Werten die anziehende elektrostatische Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Silizium-Wafer-Oberfläche und dem Lysozymmolekül in Frage. Bei pH 11, dem isoelektrischen Punkt von Lysozym, ist die anziehende Wechselwirkung zwischen den Lysozymmolekülen und der Oberfläche stark reduziert. Die dennoch stärkere Adsorption wird in diesem Fall auf Wechselwirkung zwischen den Proteinen innerhalb der adsorbierten Schicht zurückgeführt [43,58].

¹ Voraussetzungen hierfür ist, dass sich während der Adsorption die tertiäre Struktur des Proteins nicht ändert. Laut Haynes et al. [37] ist diese Voraussetzung bei Lysozym auf hydrophilen Grenzflächen erfüllt.

6.1.3 Auswertung der konzentrationsabhängigen Messungen von Lysozym auf Silizium¹

Konzentrationsabhängige Messungen wurden für die Konzentrationen 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,03 mg/ml durchgeführt. Für alle Messungen lag der pH-Wert der Lösung bei pH 11. Die Reflektivitäten und die zugehörigen Elektronendichtepprofile sind in der Abbildung 6.7 wiedergegeben. Zur Berechnung der Modellreflektivitäten wurde das Profil der Gleichung (6.2) zu Grunde gelegt. In der Abbildung 6.8 sind die Dichtepprofile der adsorbierten Proteinschichten dargestellt. Diese wurden mit Hilfe der Gleichung (6.7) aus Kapitel 6.1.2 berechnet.

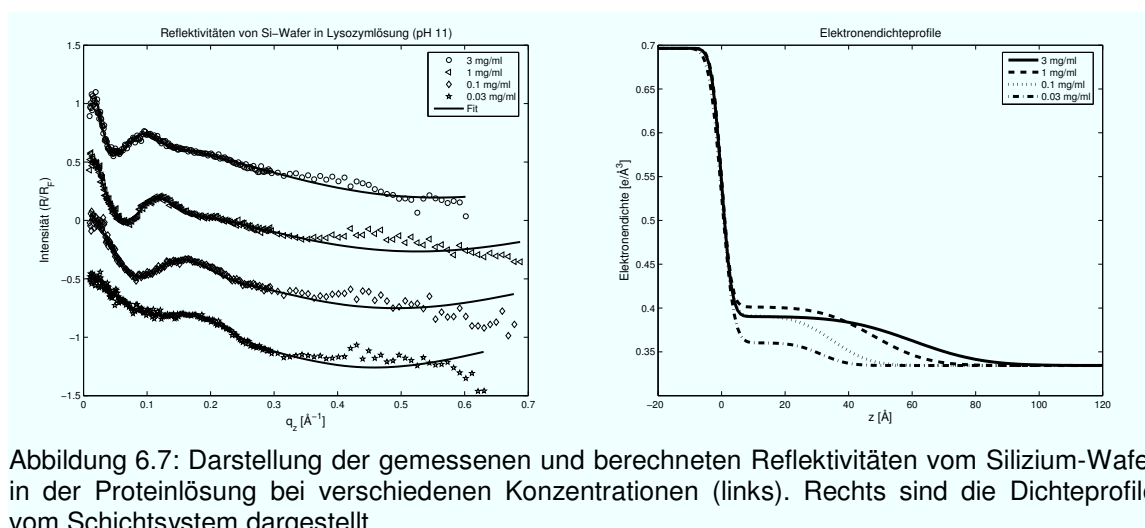


Abbildung 6.7: Darstellung der gemessenen und berechneten Reflektivitäten vom Silizium-Wafer in der Proteinlösung bei verschiedenen Konzentrationen (links). Rechts sind die Dichtepprofile vom Schichtsystem dargestellt.

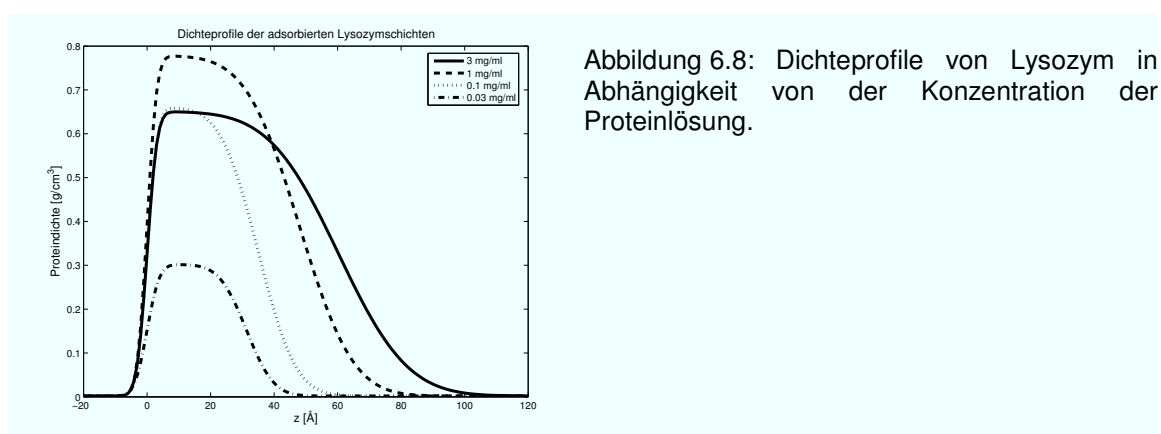


Abbildung 6.8: Dichtepprofile von Lysozym in Abhängigkeit von der Konzentration der Proteinlösung.

Die angepassten Parameter für Gleichung (6.2) und die daraus berechneten Werte für die Oberflächenkonzentration sind der Tabelle 6.3 zu entnehmen.

¹ Die in diesem Kapitel präsentierten Messdaten wurden hier unabhängig im Rahmen einer Diplomarbeit (F. Evers [29]) diskutiert und in [28] publiziert.

Konzentration [mg/ml]	ρ_{ads} [e/Å ³]	d_{ads} [Å]	σ_{ads} [Å]	Γ_{ads} [mg/m ²]
3	0,39±0,03	60±1	17,2±0,5	3,92±0,8
1	0,40±0,03	48±1	13,3±0,5	3,73±0,7
0,1	0,39±0,03	31±1	5,0±0,5	2,31±0,3
0,03	0,36±0,03	31±1	6,7±0,5	0,95±0,2

Tabelle 6.3: Ermittelte Werte für die adsorbierte Proteinschicht in Abhängigkeit von der Konzentration der Proteinlösung (pH 11).

Die Interpretation der Schichtdicken der adsorbierten Proteinschichten lässt den Rückschluss zu, dass bei der Konzentrationen 0,03 mg/ml eine Adsorption der Lysozymmoleküle mit einer „side-on“-Konfiguration stattgefunden hat. Der kleinere Wert für die Oberflächenkonzentration als bei einer dichtmöglichen Packung einer „side-on“-Konfiguration (1,76 mg/m²) lässt darauf schließen, dass bei dieser Konzentration keine vollständige Bedeckung der Waferoberfläche stattgefunden hat. Bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml entspricht die Dicke der adsorbierten Schicht zwar ebenfalls einer „side-on“-Konfiguration, die Oberflächenkonzentration ist jedoch um ca. 30% höher als bei einer dichtmöglichen Packung¹. Es wird angenommen, dass hier bereits aller Wahrscheinlichkeit nach eine partielle „end-on“-Konfiguration vorliegt. Der Wert für die Schichtdicke bei 1 mg/ml übersteigt leicht den maximalen Wert für die Schichtdicke einer Monolage. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die teilweise Entstehung von Doppellagen aus Proteinmolekülen. Bei einer Konzentration von 3 mg/ml schließlich werden verstärkt Doppellagen gebildet, sodass auch die Schichtdicke mit dem Wert einer Doppellage aus „side-on“-Konfigurationen übereinstimmt. An dieser Stelle soll allerdings noch angemerkt werden, dass bei der bisherigen Betrachtung stets vor der nativen Struktur des Proteins ausgegangen wurde. An hydrophilen Grenzflächen sollte dies zwar erfüllt sein. Bei höheren Konzentrationen (wie in diesem Fall bei 1 mg/ml und 3 mg/ml) wurde in der Literatur allerdings auch von Aggregation des Proteins berichtet, die zu einer Erhöhung der Schichtdicke führen kann [3,9].

6.1.4 Auswertung der konzentrationsabhängigen Messungen von Hämoglobin auf Silizium

Die aufgenommenen Reflektivitäten von Silizium-Wafern in Hämoglobinlösung bei verschiedenen Konzentrationen sind in der Abbildung 6.9 dargestellt. Der

¹ Die unabhängige Auswertung von F. Evers hat hierfür sogar einen höheren Wert von 2,78 mg/m² ergeben.

pH-Wert der Lösung betrug bei allen Messungen pH 7 (isoelektrischer Punkt von Hämoglobin).

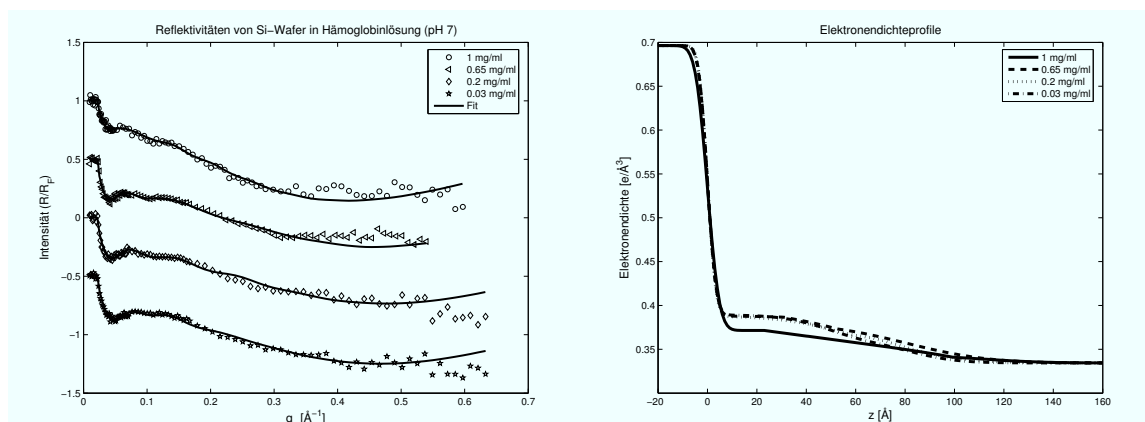


Abbildung 6.9: Links: Darstellung der gemessenen und berechneten Reflektivitäten vom Silizium-Wafer in der Hämoglobinlösung bei unterschiedlichen Konzentrationen. Rechts: Elektronendichteprofile vom Schichtsystem.

Die Profile in Abbildung 6.9 wurden mit der Gleichung (2.54) aus Kapitel 2.8 erzeugt. Formal wurden hierzu zwei Schichten für die adsorbierte Hämoglobinschicht angesetzt. Zudem wurde bei einigen Reflektivitäten (1 mg/ml; 0,65 mg/ml) ein stückweise linearer Verlauf des Profils angesetzt, durch den eine Verbesserung der Anpassung erzielt werden konnte.

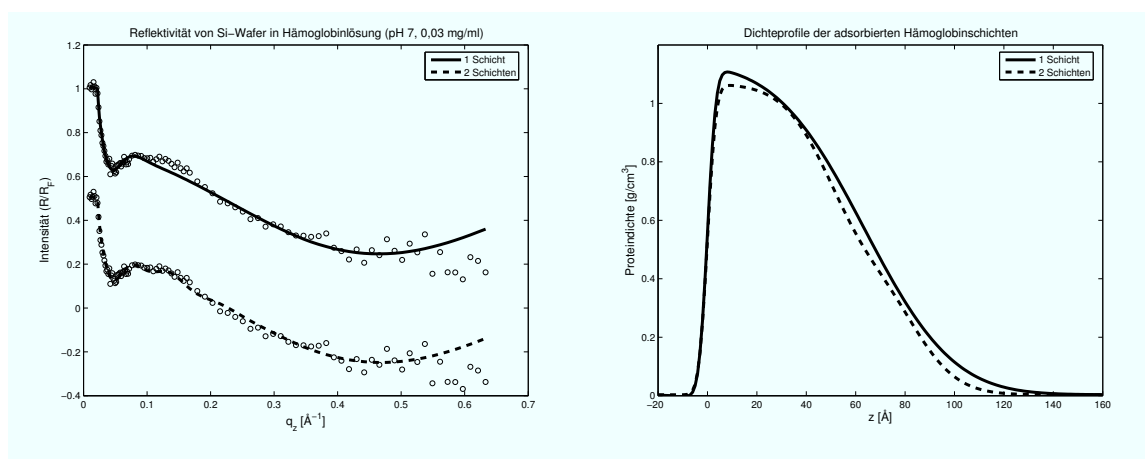


Abbildung 6.10: Vergleich der Anpassung der Reflektivität von Hämoglobin (pH 7, 0,03 mg/ml) mit nur einer Schicht und mit zwei Schichten. Durch Berücksichtigung des größeren q_z -Bereichs ($>0,1 \text{\AA}^{-1}$) erhält man eine größere Auflösung des Proteindichteprofiles.

Im Gegensatz zu Lysozym konnte ein einfaches Schichtmodell keine zufriedenstellende Anpassung der Reflektivitäten liefern. In Abbildung 6.10 ist das Ergebnis einer Anpassung mit einem einfachen Schichtmodell gezeigt. Wie man erkennen kann, weicht die Modellreflektivität bei q_z -Werten größer als

0,1 Å⁻¹ stark von den Messwerten ab. Zum Vergleich dazu ist in die Abbildung auch die Anpassung mit einem Modell bestehen aus zwei Schichten eingefügt. Man erkennt, dass durch die Berücksichtigung des größeren q_z -Bereichs auch eine genauere Auflösung des Elektronendichteprofiles ermöglicht wird. In der Tabelle 6.4 sind die Oberflächenkonzentrationen der adsorbierten Schichten angegeben.

Konzentration [mg/ml]	Γ_{ads} [mg/m ²]
1	5,3±0,1
0,65	7,8±0,1
0,2	7,0±0,1
0,03	6,7±0,1

Tabelle 6.4: Ermittelte Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Hämoglobins auf Silizium bei unterschiedlichen Konzentrationen in der Lösung (pH 7).

Die optimierten Parameter für Schichtdicke, Rauigkeit und Dispersion können nicht direkt interpretiert werden. Berechnet wurden die Werte für die Oberflächenkonzentration analog wie im Kapitel 6.1.2 ($M_{Häm}=64,5$ kDa). Für das Eigenvolumen des Hämoglobinmoleküls wurde der Wert $v_{Häm}=86583$ Å³ verwendet¹. Dieser Wert wurde aus dem Literaturwert für die Elektronendichte des Moleküls ($\rho_{Häm}=0,398$ e/Å³) und der Zahl der Elektronen des Moleküls ($Z_{Häm, Rind}=34460$) bestimmt². Der Literaturwert für die Elektronendichte wurde aus Röntgenstreuungsmessungen ermittelt [101]. Zwar wurde dieser Wert für menschliches und nicht für das hier verwendete Rinderhämoglobin gemessen, ein Vergleich zwischen den Hämoglobinarten zeigt jedoch eine nur geringe Abweichung der Elektronenzahlen der Moleküle ($Z_{Häm, Mensch}=34440$). Daher kann von einer annähernd gleichen Elektronendichte ausgegangen werden. Die lateral gemittelten Profile vom adsorbierten Hämoglobin sind in der Abbildung 6.11 wiedergegeben. Wie man erkennen kann, zeigen die Profile im Gegensatz zu Lysozym einen viel stärker ausgeprägten inhomogenen Verlauf. Dies kann mit Inhomogenitäten in der Elektronendichteverteilung innerhalb des Hämoglobinmoleküls selbst in Zusammenhang stehen. In [101] wird darauf

¹ Eine frühere Messung von Schelten et al. [85] mittels Neutronenkleinwinkelstreuung hatte für das Volumen des Hämoglobinmoleküls einen Wert $v_{Häm}=84000\pm 2000$ Å³ ergeben.

² Die Anzahl der in den vier Globinmolekülen des Tetramers enthaltenen Atomsorten wurde im Fall des menschlichen Hämoglobins der PDB-Datei 4hhb.pdb [30], im Falle des Rinderhämoglobins der Datei 1fsx.pdb [82] entnommen. Berücksichtigt wurden außerdem die vier Hämgruppen bestehend aus Protoporphyrin und dem Eisenatom (Formel: C₃₄H₃₂N₄O₄Fe).

hingewiesen, dass bei Streuvektoren $q > 0,08 \text{ \AA}^{-1}$ sich die Inhomogenitäten in der Elektronendichteverteilung in Röntgenstreuungsmessungen bemerkbar machen.

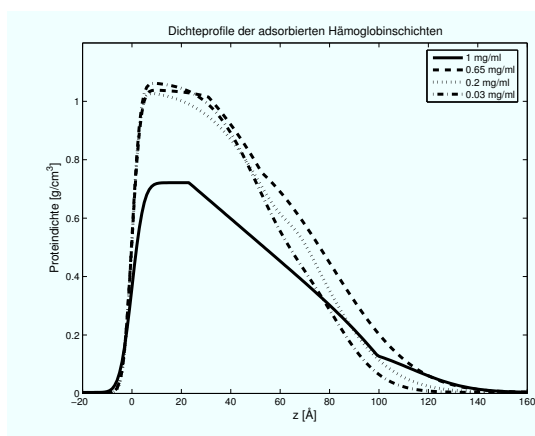


Abbildung 6.11: Dichteprofile von Hämoglobin in Abhängigkeit von der Konzentration der Proteinlösung (pH 7).

Theoretische Werte für die Oberflächenkonzentration von Hämoglobin erhält man aus den Maßen des Moleküls ($64 \times 55 \times 50 \text{ \AA}^3$). Im Falle einer Monolagenadsorption mit dichtester Packung ergeben sich Werte im Bereich von $\Gamma = 3,2 \text{ mg/m}^2$ bis $\Gamma = 3,9 \text{ mg/m}^2$, je nach Orientierung der Hämoglobinmoleküle. Die Werte aus den Röntgenreflektivitätsmessungen liegen deutlich darüber (siehe Tabelle 6.4). Ungewöhnlich ist der Wert für 1 mg/ml, der kleiner ist als bei niedrigeren Konzentrationen. Lässt man diesen Wert außer Acht, zeigt sich mit steigender Konzentration auch eine Tendenz zu einer stärkeren Adsorption. Diese Tendenz wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen mit alternativen Messmethoden bestätigt (Kondo et al. [49,50]: Zirkulärer Dichroismus (CD), Santos et al. [84], Everest et al. [27]: Optische Absorptionsspektroskopiemethoden). Im Falle der Adsorption von Hämoglobin auf Silizium wurde von Everest et al. [27] bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml (pH 7) eine Oberflächenkonzentration von $4,0 \text{ mg/m}^2$ gemessen. Messungen von Kondo et al. haben für das selbe Probensystem für eine Konzentration von 0,03 mg/ml (pH 7) eine Oberflächenkonzentration von ca. $2,3 \text{ mg/m}^2$ ergeben.

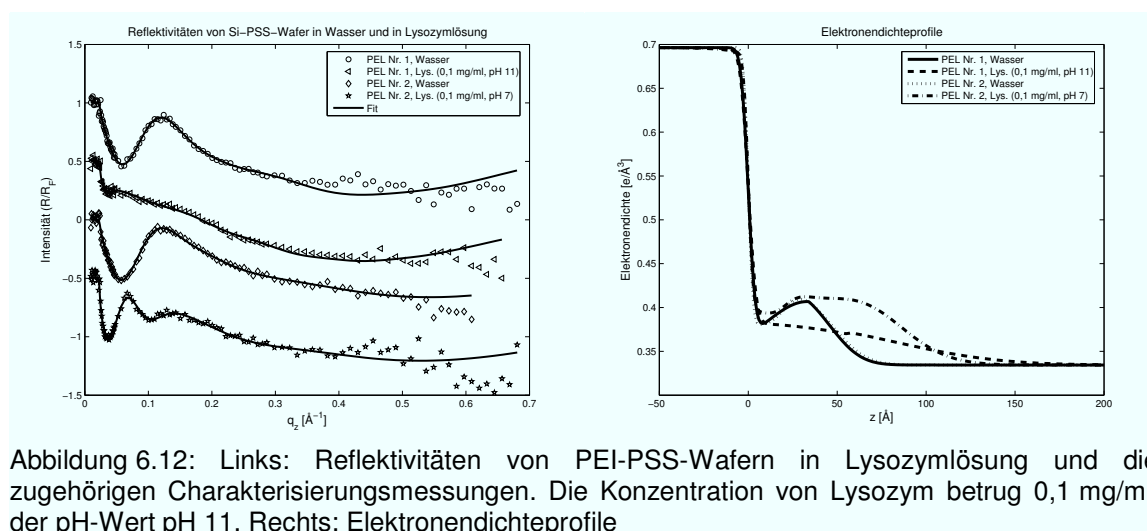
Die aus den Reflektivitätsmessungen an der BL9 bestimmten Werte für die Oberflächenkonzentration Γ können nur durch die Annahme einer Doppellage erklärt werden. Mehrfache Adsorptionsschichten von Hämoglobin auf Silizium wurden von Martin et al. [61] beobachtet. Die Dicke der adsorbierten Hämoglobinschichten kann durch die gleichmäßigen Übergänge zwischen der Proteinschicht und der Proteinlösung schwer abgeschätzt werden (zwischen 80 \AA und 100 \AA). Im Fall von Hämoglobin können auch Konformationsänderungen des Moleküls nicht ausgeschlossen werden. Bei Hämoglobin handelt es sich im Gegensatz zu Lysozym um ein sogenanntes weiches Protein [51]. Ebenfalls können laut Kondo et al. [51] als Folge der

Tetramerstruktur des Proteins Konformationsänderungen eines Monomers auf andere Monomere übertragen werden.

6.1.5 Auswertung der Messungen von Lysozym auf polyelektrolytischen Schichten

Reflektivitätsmessungen von adsorbiertem Lysozym auf polyelektrolytisch beschichteten Silizium-Wafern wurden sowohl auf PEI-PSS- als auch auf PEI-PSS-PAH-Wafern durchgeführt. Bei allen Messungen wurde für Lysozym eine Konzentration von 0,1 mg/ml gewählt. Der pH-Wert lag für die beiden Messungen mit PEI-PSS-Wafern bei pH 7 und pH 11, für die Messung mit dem PEI-PSS-PAH-Wafer bei pH 11.

In der Abbildung 6.12 sind die Messungen von PEI-PSS-Wafern in Lysozymbilösung, die zugehörigen angepassten Reflektivitäten und die Elektronendichteprofile wiedergegeben. Zum Vergleich sind auch die Reflektivitäten und die Elektronendichteprofile aus den Charakterisierungsmessungen in die Abbildung eingefügt. Sowohl die Charakterisierungsmessungen als auch die Messung in Lysozymbilösung wurden formal mit dem Profilmodell der Gleichung (2.54) aus Kapitel 2.8 unter Annahme von zwei Schichten angepasst.



Durch den qualitativen Vergleich der gemessenen Reflektivität bei pH 11 mit der Charakterisierungsmessung des PEI-PSS-Wafers kann man erkennen, dass bei der Messung bei pH 11 die Stärke der Kiessig-Oszillationen stark reduziert wird. Qualitativ zu deuten ist dieser Sachverhalt mit der Abnahme des Elektronendichtekontrastes zwischen den Schichten und der Proteinlösung. Wie man erkennen kann, ergibt die Auswertung der Reflektivität für die Adsorptionsmessung bei pH 11 eine gleichmäßig abnehmende Elektronendichte.

Bei der Messung bei pH 7 hingegen sind die Kiessig-Oszillationen noch deutlich ausgeprägt, allerdings mit einer kleineren Oszillationslänge als bei der Charakterisierungsmessung. Passend dazu zeigt auch das Elektronendichteprofil eine höhere Dicke des Gesamtschichtsystems. Sowohl bei pH 11 als auch bei pH 7 konnten Modellprofile, in denen nur eine weitere Schicht für Lysozym oberhalb des bestehenden polyelektrolytischen Schichtsystems angenommen wurde, keine Anpassung der Modellreflektivität an die Messdaten erzielen¹. Hieraus kann man schließen, dass in beiden Fällen eine Änderung der Formation der Polyelektrolytmoleküle im gesamten Schichtsystem stattfindet. Besonders stark ist dieser Effekt bei pH 11 zu beobachten. Die starke Strukturveränderung bei pH 11 wäre allerdings auch damit zu erklären, dass bei diesem pH-Wert durch die höhere Konzentration von OH⁻-Ionen eine Streckung der PSS-moleküle an der Oberfläche hervorgerufen wird. Eine stärkere Streckung der Polyelektrolytmoleküle hätte ebenfalls einen gleichmäßigeren Übergang im Elektronendichteprofil zu Folge. Ein Einfluss des Proteins kann allerdings auch nicht ganz ausgeschlossen werden. Bei pH 7 hingegen ist nur eine schwache Umstrukturierung des bestehenden polyelektrolytischen Schichtsystems zu beobachten. Deutlich zu erkennen ist bei der Messung mit pH 7 die Adsorption eines Lysozymfilms auf der Oberfläche. Allerdings ist auch hier keine klare Trennung zwischen der polyelektrolytischen Schicht und der adsorbierten Proteinschicht erkennbar. Eine reine Darstellung der adsorbierten Proteinschicht ist hier daher nicht möglich.

Zum Vergleich sind in Abbildung 6.13 links die Messung vom PEI-PSS-PAH-Wafer in Lysozymlösung und die zugehörige Charakterisierungsmessung wiedergegeben. Rechts in der Abbildung sind die jeweiligen Elektronendichteprofile dargestellt.

¹ Hierzu wurde mit dem REFFIT-Modus des Reflektivitätsanpassungsprogramms LSFIT mittels stochastischer Superposition von Gauss-Funktionen nur der obere Bereich des Profils aus der Charakterisierungsmessung verändert. Trotz mehrmaliger Versuche konnte keine gute Anpassung erreicht werden.

Auswertung der Daten und Diskussion

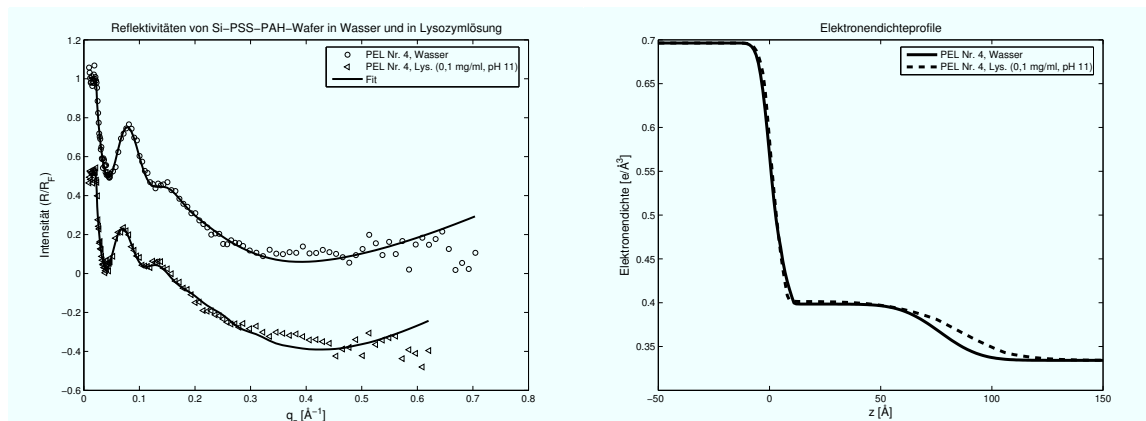


Abbildung 6.13: Links: Die Reflektivitätsmessung vom PEI-PSS-PAH-Wafer im Wasser und in der Lysozymlösung. Die Konzentration von Lysozym betrug 0,1 mg/ml, der pH-Wert pH 11. Rechts: Elektronendichteprofile

Im Gegensatz zur der Reflektivität vom PEI-PSS-Wafer konnte die Reflektivität vom PEI-PSS-PAH-Wafer in Lysozymlösung ohne größere Veränderungen der inneren z-Bereiche des Charakterisierungsprofils angepasst werden. Angesetzt wurde für das Charakterisierungsprofil das Modellprofil der Gleichung (2.54) mit zwei Schichten, für das Adsorptionsprofil das selbe Modellprofil mit drei Schichten. Der Vergleich der Elektronendichteprofile zeigt, dass das PEI-PSS-PAH-Schichtsystem offenbar stabiler ist. Die Differenz der Profile aus der Messung in Proteinlösung und der Charakterisierungsmessung ist in Abbildung 6.14 wiedergegeben. In dem Differenzprofil ist der Bereich unterhalb von $z=54$ \AA gleich Null gesetzt.

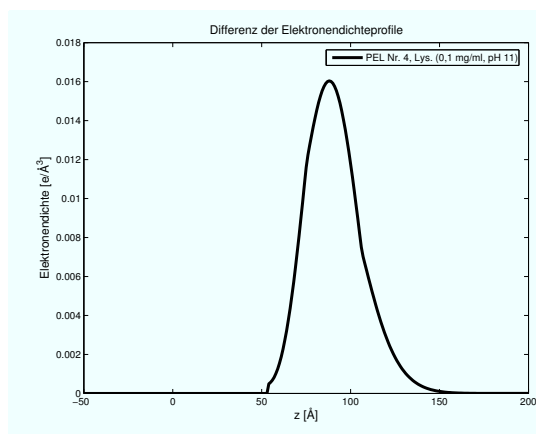


Abbildung 6.14: Differenzprofil aus der Adsorptionsmessung und der Charakterisierungsmessung. Unterschiede der Profile im Bereich unterhalb von $z=54$ \AA wurden nicht berücksichtigt.

Das Differenzprofil in Abbildung 6.14 beschreibt den charakteristischen Verlauf einer adsorbierten Lysozymschicht. Die Dicke dieser Schicht kann aus den ungefähren Positionen der Wendepunkte zu $d = 34 \text{\AA} \pm 2 \text{\AA}$ abgeschätzt werden. Sie entspricht der Dicke einer Lysozymschicht mit einer „side-on“-Konfiguration. Das Maximum der Elektronendichte liegt mit $0,016 e/\text{\AA}^3$ weit unterhalb der

Elektronendichte des Lysozymmoleküls ($Z_{Lys}/v_{Lys}=0,46 \text{ e/\AA}^3$). Es liegt daher im Falle einer Adsorption von Lysozym auf dem bestehenden polyelektrolytischen Schichtsystem nur eine unvollständige Bedeckung mit Lysozym vor.

Wie im Fall der Adsorption von Proteinen auf reinen Silizium-Wafern ist es auch im Fall der Adsorption von Proteinen auf polyelektrolytischen Schichten möglich Werte für die Oberflächenkonzentration der adsorbierten Proteinschichten zu bestimmen.

Für die Elektronendichte des polyelektrolytisch beschichteten Wafers gilt vor und nach der Adsorption in Analogie zu (6.3) und (6.4)

$$\rho_1(z) = \phi_{Si}^{(1)}(z) n_{Si} Z_{Si} + \phi_{PEL}^{(1)}(z) \rho_{PEL} + \phi_{Wasser}^{(1)}(z) n_{Wasser} Z_{Wasser}, \quad (6.9)$$

$$\rho_2(z) = \phi_{Si}^{(2)}(z) n_{Si} Z_{Si} + \phi_{PEL}^{(2)}(z) \rho_{PEL} + \phi_{Wasser}^{(2)}(z) n_{Wasser} Z_{Wasser} + \phi_{Lys}(z) \frac{Z_{Lys}}{v_{Lys}}, \quad (6.10)$$

mit

$$\begin{aligned} \phi_{Si}^{(1)}(z) + \phi_{PEL}^{(1)}(z) + \phi_{Wasser}^{(1)}(z) &= 1, \\ \phi_{Si}^{(2)}(z) + \phi_{PEL}^{(2)}(z) + \phi_{Wasser}^{(2)}(z) + \phi_{Lys}(z) &= 1. \end{aligned} \quad (6.11)$$

ρ_{PEL} bezeichnet hierbei die mittlere Elektronendichte der Polyelektrolytmoleküle. Durch die Wahl unterschiedlicher Volumenanteile $\phi_{PEL}^{(1)}$ und $\phi_{PEL}^{(2)}$ für die Polyelektrolytmoleküle wurde berücksichtigt, dass sich nach der Adsorption von Lysozym auch das Profil der polyelektrolytischen Schicht ändert. Schließt man Desorption der Polyelektrolytmoleküle aus, gilt

$$\int (\phi_{PEL}^{(2)}(z) - \phi_{PEL}^{(1)}(z)) dz = 0. \quad (6.12)$$

Verwendet man anstelle der Elektronendichtedifferenz den integrierten Ausdruck $\int (\rho_2(z) - \rho_1(z)) dz$, ergibt sich aus den integrierten Ausdrücken von (6.9), (6.10) und (6.11) die Beziehung

$$\int \phi_{Lys}(z) dz = \frac{1}{\frac{Z_{Lys}}{v_{Lys}} - n_w Z_w} \int (\rho_2(z) - \rho_1(z)) dz, \quad (6.13)$$

bzw. mit $\Gamma_{Lys} = \frac{M_{Lys}}{v_{Lys}} \int \phi_{Lys}(z) dz$

$$\Gamma_{Lys} = \frac{M_{Lys}}{Z_{Lys} - v_{Lys} n_w Z_w} \int (\rho_2(z) - \rho_1(z)) dz. \quad (6.14)$$

Die mit Hilfe der Gleichung (6.14) erhaltenen Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Lysozyms auf polyelektrolytischen Schichtsystemen sind der Tabelle 6.5 zu entnehmen.

Polyelektrolytisches Schichtsystem	Γ_{ads} [mg/m ²]	Konzentration [mg/ml]	pH
PEI-PSS	1,3±0,1	0,1	11
PEI-PSS	3,8±0,1	0,1	7
PEI-PSS-PAH	0,7±0,05	0,1	11

Tabelle 6.5: Oberflächenkonzentrationen des adsorbierten Lysozyms in Abhängigkeit vom gewählten polyelektrolytischen Schichtsystem.

Insgesamt kann man erkennen, dass die Tendenz von Lysozym auf einem polyelektrolytischen Schichtsystem mit PSS als oberste Schicht zu adsorbieren größer ist als auf einem mit PAH als oberste Schicht. Auch trägt die positive Ladung der Lysozymmoleküle bei pH 7 zu einer noch stärkeren Adsorption bei. Eine stärkere Tendenz von Lysozym auf einem mit PSS abgeschlossenen, polyelektrolytischen Schichtsystem zu adsorbieren wurde auch von Ladam et al. [53] bei pH 7,35 beobachtet¹. Dass Proteine auch dazu neigen in ein polyelektrolytisches Schichtsystem einzudringen, wurde von Jackler et al. [42] anhand der Adsorption von Staphylokokken-Nuklease (SNase) mit Neutronenreflektometrie beobachtet. Ebenfalls wurde von Picart et al. [74] beobachtet, dass geladene Kolloidperlen im Falle einer entgegengesetzten Ladung zu der Oberfläche eines polyelektrolytischen Schichtsystems in das Schichtsystem eindringen, im Fall einer gleichen Ladung jedoch nur über der Oberfläche schweben. Obwohl die Übertragung des Adsorptionsmodells der Kolloidperlen auf das Adsorptionsmodell von Lysozym eine gute Erklärungsmöglichkeit für die Messergebnisse bieten wurde, muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass zwei der Messungen von Lysozym bei pH 11, dem isoelektrischen Punkt des Proteins, durchgeführt wurden. Bei diesem pH-Wert sollte die Gesamtladung des Proteins Null sein. Daher kann nicht allein die Gesamtladung des Proteins als Erklärungsmöglichkeit herangezogen werden. Die Messung bei pH 7 zeigt allerdings auch, dass die positive Ladung von Lysozym wesentlich zu einer stärkeren Adsorption beiträgt.

¹ Für die adsorbierte Menge von Lysozym auf einem polyelektrolytischen Schichtsystem mit PSS als oberste Schicht wurde von Ladam et al. ein Wert von 4,6 mg/m² gemessen, auf einem polyelektrolytischen Schichtsystem mit PAH als oberste Schicht ein Wert von 2,6 mg/m².

6.1.6 Auswertung der Messungen von Hämoglobin auf polyelektrolytischen Schichten

Untersucht wurde auch die Adsorption von Hämoglobin auf polyelektrolytisch beschichteten Silizium-Wafern. Der pH-Wert lag bei allen Messungen bei pH 7, dem isoelektrischen Punkt von Hämoglobin. Die Messung mit dem PEI-PSS-Wafer erfolgte bei einer Konzentration der Hämoglobinlösung von 1 mg/ml, die Messungen mit den PEI-PSS-PAH-Wafern erfolgten bei den Konzentrationen 1 mg/ml und 0,1 mg/ml.

Links in der Abbildung 6.15 ist die Reflektivitätsmessung des PEI-PSS-Wafers in der Hämoglobinlösung zusammen mit der zugehörigen Charakterisierungsmessung wiedergegeben. Rechts in der Abbildung sind die jeweiligen Elektronendichteprofile dargestellt. Die Modellierung der Profile erfolgte in beiden Fällen mit der Gleichung (2.54) (Kapitel 2.8). Dabei wurden für beide Profile zwei Schichten angenommen.

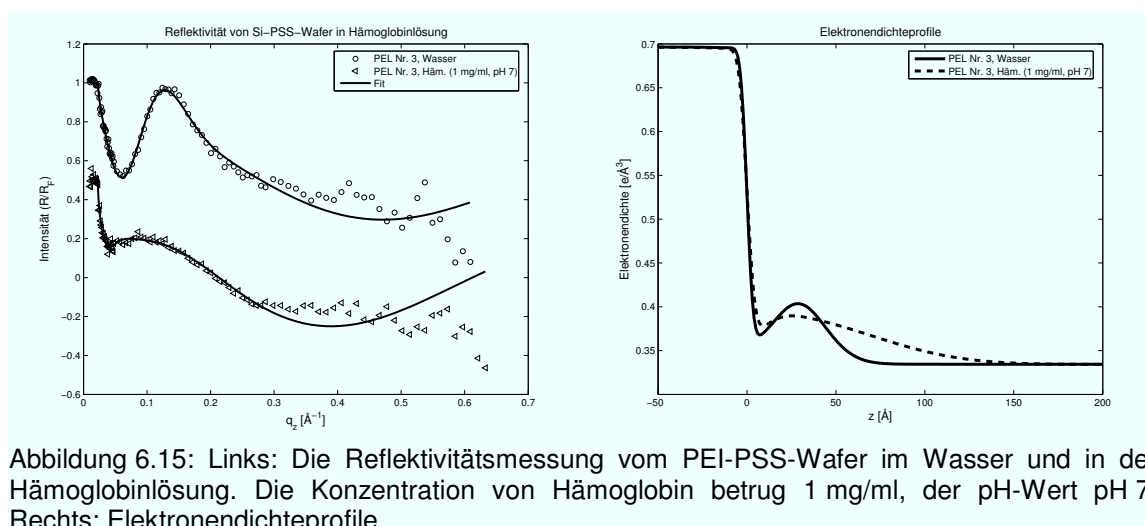


Abbildung 6.15: Links: Die Reflektivitätsmessung vom PEI-PSS-Wafer im Wasser und in der Hämoglobinlösung. Die Konzentration von Hämoglobin betrug 1 mg/ml, der pH-Wert pH 7. Rechts: Elektronendichteprofile.

Der Vergleich zwischen der Charakterisierungsmessung und der Messung in Hämoglobinlösung zeigt eine Veränderung des Elektronendichteprofiles, die sich nicht nur auf die höheren z -Bereiche oberhalb der polyelektrolytischen Schicht beschränkt. Es ist daher davon auszugehen, dass wie im Fall von Lysozym sich auch bei der Hämoglobinadsorption das Dichteprofil des vorhandenen polyelektrolytischen Schichtsystems bestehend aus PEI und PSS mit verändert. Die Messungen und die angepassten Modellreflektivitäten vom PEI-PSS-PAH-Wafer in Hämoglobinlösung sind in Abbildung 6.16 wiedergegeben. Die Modellierung der Elektronendichteprofile auf der rechten Seite der Abbildung erfolgte ebenfalls formal mit Hilfe der Gleichung (2.54) mit drei Schichten. Zusätzlich zu den erf-Funktionsverläufen der Grenzfläche wurden

auch lineare Profilverläufe der Form (6.1) aus Kapitel 6 angesetzt. Hierdurch konnte die Qualität der Anpassung verbessert werden.

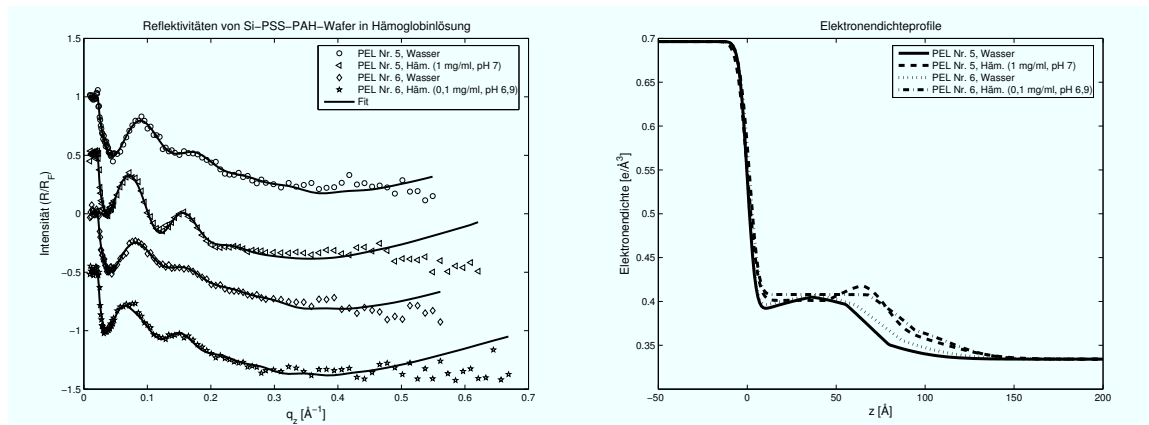


Abbildung 6.16: Links: Die Reflektivitätsmessung von PEI-PSS-PAH-Wafern im Wasser und in der Hämoglobinlösung bei Konzentrationen 1 mg/ml und 0,1 mg/ml. Der pH-Wert lag für beide Messungen bei pH 7. Rechts: Elektronendichteprofile.

Wie im Fall der Adsorption von Hämoglobin auf das polyelektrolytische Schichtsystem PEI-PSS könnte auch im Fall eines PEI-PSS-PAH-Schichtsystems die Änderung des Profils nicht auf den höheren z -Bereich oberhalb des bestehenden Schichtsystems beschränkt werden.

In Analogie zu Kapitel 6.1.5 wurden auch im Fall der Adsorption von Hämoglobin auf polyelektrolytischen Schichten mit Hilfe der Gleichung (6.14) die Werte für die Oberflächenkonzentrationen des adsorbierten Proteins berechnet. Für das Volumen und die Elektronenzahl von Hämoglobin wurden die Werte aus Kapitel 6.1.4 verwendet. Die berechneten Werte sind der Tabelle 6.6 zu entnehmen.

Polyelektrolytisches Schichtsystem	Γ_{ads} [mg/m ²]	Konzentration [mg/ml]	pH
PEI-PSS	3,02±0,5	1	7
PEI-PSS-PAH	4,2±0,4	1	7
PEI-PSS-PAH	3,6±0,5	0,1	6,9

Tabelle 6.6: Werte für die Oberflächenkonzentration Γ_{ads} von Hämoglobin in Abhängigkeit vom polyelektrolytischen Schichtsystem sowie Konzentration und pH-Wert der Hämoglobinlösung.

Wie man sieht, zeigen die Werte in in Tabelle 6.6, dass bei gleicher Konzentration der Hämoglobinlösung die Proteinmoleküle stärker dazu neigen, auf ein polyelektrolytisches Schichtsystem mit PAH als oberste Schicht zu adsorbieren. Bei einer höheren Konzentration ist auch eine höhere Tendenz zur

Adsorption auf das polyelektrolytische Schichtsystem PEI-PSS-PAH festzustellen.

6.1.7 Auswertung der Messung von Lysozym auf OTS

Reflektivitätsmessung vom OTS-beschichteten Silizium-Wafers in Lysozymlösung wurde bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml und einem pH-Wert von pH 11 durchgeführt. Die Messung und die zugehörige angepasste Modellreflektivität ist auf der linken Seite der Abbildung 6.17 zu sehen. Das Elektronendichteprofil, mit dem die Modellreflektivität berechnet wurde, ist auf der rechten Seite der Abbildung wiedergegeben. Zur Modellierung des Profils wurde die Gleichung (2.54) aus Kapitel 2.8 mit formal drei Schichten angesetzt. Für die Profilverläufe wurden erf-Funktionen gewählt. Zum Vergleich sind auch die Charakterisierungsmessung des OTS-beschichteten Silizium-Wafers in Wasser und das zugehörige Elektronendichteprofil in die Abbildung 6.17 eingefügt.

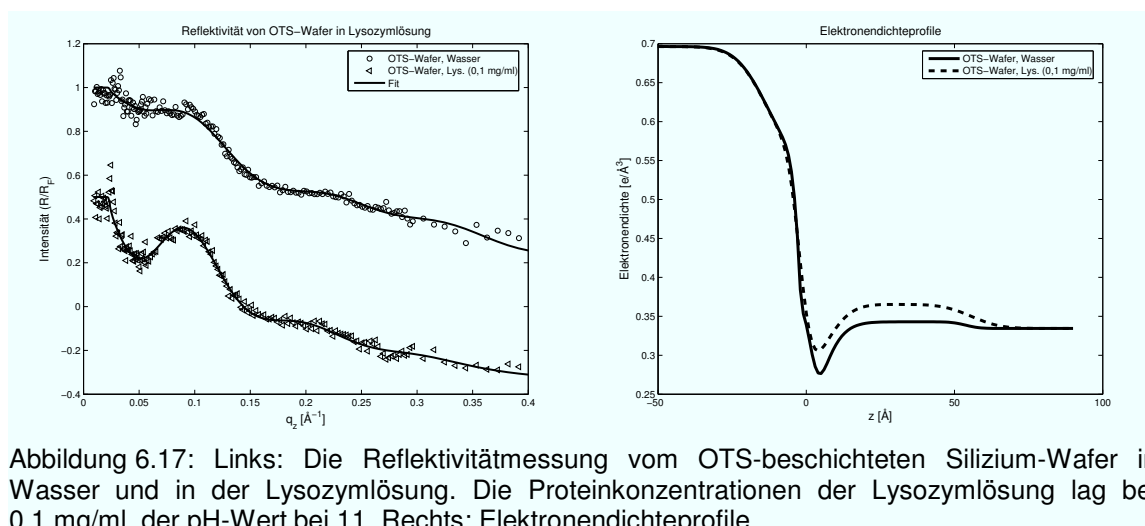


Abbildung 6.17: Links: Die Reflektivitätsmessung vom OTS-beschichteten Silizium-Wafer in Wasser und in der Lysozymlösung. Die Proteinkonzentrationen der Lysozymlösung lag bei 0,1 mg/ml, der pH-Wert bei 11. Rechts: Elektronendichteprofile.

Der Vergleich zwischen der Charakterisierungsmessung und der Messung in Lysozymlösung zeigt eine Erhöhung der Elektronendichte im Bereich zwischen $z=0 \text{ \AA}$ und $z=70 \text{ \AA}$. Dies deutet auf die Adsorption von Lysozym hin. Ebenfalls beeinflusst wird hierbei die Elektronendichte der Wasserverarmungszone. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 6.18 die Differenz aus dem Profil der Messung in Lysozymlösung und dem Profil der Charakterisierungsmessung dargestellt.

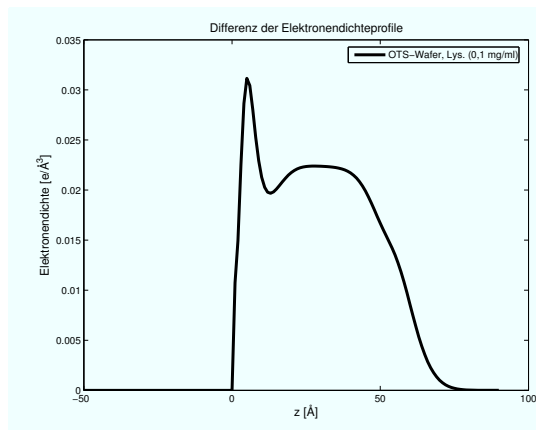


Abbildung 6.18: Differenz aus dem Profil der Messung in Lysozymlösung und dem Profil der Charakterisierungsmessung.

Die Erhöhung der Elektronendichte im Bereich der Wasserverarmungszone kann durch eine Adsorption von Lysozym über die hydrophoben Bereiche des Lysozymmoleküls erklärt werden. Dies setzt eine Konformationsänderung des Lysozymmoleküls gegenüber seinem nativen Zustand voraus.

6.2. Auswertung der Messungen an der Strahllinie ID15A

Die Messungen an der Strahllinie ID15A wurden alle bei einer Photonenenergie von 72,5 keV durchgeführt. Nach jeder Reflektivitätsmessung wurde durch eine separate Messung die diffuse Streuung ermittelt. Hierbei war der Detektorwinkel gegenüber dem Detektorwinkel bei der Reflektivitätsmessung um einen konstanten Betrag $\vartheta = 0,1^\circ$ außerhalb der Einfallsebene verschoben. Aufgrund der hohen Energie ist die Absorption der meisten Materialien vernachlässigbar. Aus diesem Grund wurde bei den berechneten Reflektivitäten die Absorption β Null gesetzt. Bedingt durch die starke Fokussierung ist die Flussdichte der Strahllinie ID15A extrem hoch (maximale Flussdichte: $2,6 \cdot 10^{14}$ Photonen/s/mm²). Daher ist auf eventuelle Strahlschäden zu achten

6.2.1 Auswertung der Messungen von Lysozym auf Silizium

Reflektivitätsmessungen von Silizium-Wafern in Lysozymlösung wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml und einem pH-Wert von pH 11 durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der ersten Messung sicherzustellen, wurde die Messung bei der selben Konzentration und dem selben pH-Wert jedoch mit einem anderen Silizium-Wafer wiederholt. Die Messungen und die dazu angepassten Modellreflektivitäten sind auf der linken Seite der Abbildung 6.19 wiedergegeben. Rechts in der Abbildung sind die Elektronendichteprofile dargestellt, mit denen die Modellreflektivitäten berechnet wurden. Für die Modellierung der Profile wurde das in Kapitel 2.8 angegebene Effektive-Dichte-Profil formal mit drei Schichten verwendet. Im Gegensatz zu den Messungen an der Strahllinie BL9 konnten bei den Messungen an der ID15A

durch den größeren q_z -Bereich auch die Oxidschichten der Silizium-Wafer aufgelöst werden. Der Einfluss der Oxidschicht auf die jeweiligen gemessenen Reflektivitäten ist an den langwelligeren Oszillationen erkennbar. Für die Oxidschicht wurden Schichtdicken zwischen $d_{Oxid}=11 \text{ \AA}$ und $d_{Oxid}=12 \text{ \AA}$ ermittelt. Die kurzwelligeren Oszillationen, die im Bereich zwischen $q_z=0,05 \text{ \AA}^{-1}$ und $q_z=0,15 \text{ \AA}^{-1}$ auftreten, sind auf die adsorbierten Proteinschichten zurückzuführen. Für die Modellierung der jeweiligen Proteinschichten wurden zwei Schichten angenommen.

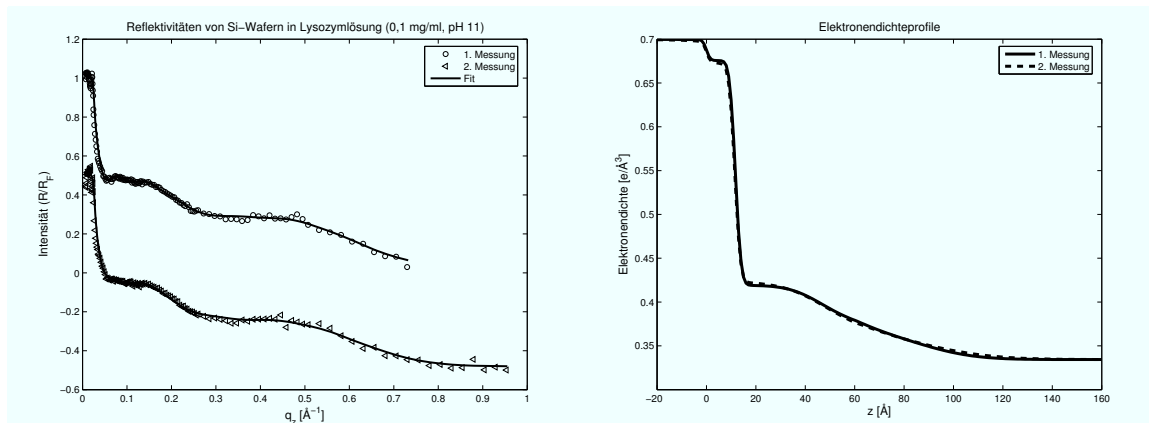


Abbildung 6.19: Darstellung der gemessenen und berechneten Reflektivitäten vom Silizium-Wafern in Lysozymlösung (links). Rechts sind die Dichteprofile vom Schichtsystem dargestellt.

In Analogie zu Kapitel 6.1.2 wurden mit Hilfe der Gleichung (6.7) die Proteindichteprofile der adsorbierten Lysozymschichten berechnet. Diese sind in Abbildung 6.20 dargestellt. Zum Vergleich ist zusätzlich die Messung an der BL9 (0,1 mg/ml, pH 11) in die Abbildung eingefügt.

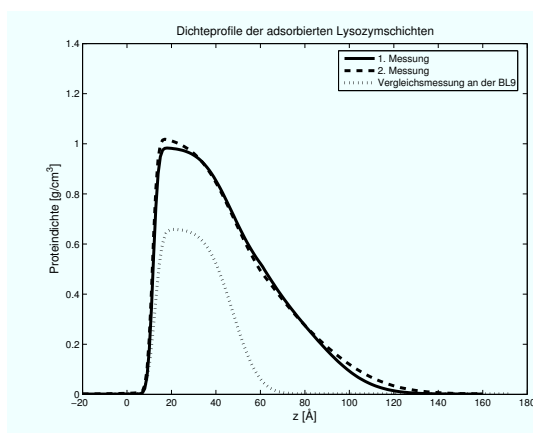


Abbildung 6.20: Proteindichteprofile der adsorbierten Lysozymschichten. Zum Vergleich ist die Messung an der BL9 (0,1 mg/ml, pH 11) eingefügt. Obwohl die Messungen mit der selben Konzentration und dem selben pH-Wert durchgeführt wurden, ist ein deutlicher Unterschied der Dichteprofile aus den Messungen an der BL9 und der ID15A zu erkennen.

Wie man erkennen kann, sind die beiden Proteindichteprofile aus den Messungen, die an der ID15A aufgenommen wurden, nahezu identisch. Dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen. Der Vergleich mit dem Profil aus der Messung an der BL9 zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied sowohl in der Breite des gesamten Dichteprofiles als auch in der maximalen Dichte. Mittels Integration der Proteindichteprofile wurden die Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Lysozyms bestimmt (Tabelle 6.7).

	Γ_{ads} [mg/m ²]
1. Messung	5,31
2. Messung	5,44

Tabelle 6.7: Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Lysozyms der beiden Messungen.

Die geringe Abweichung der Werte in Tabelle 6.7 voneinander (ca. 2%) ist ein weiterer Beleg für die Reproduzierbarkeit der Messungen der Lysozymadsorption an der ID15A. Die Werte für die Oberflächenkonzentration zeigen allerdings auch eine große Abweichung zu den Werten aus den Messungen an der Strahllinie BL9 (siehe Kapitel 6.1.3).

Insgesamt können wegen der guten Reproduzierbarkeit der Messungen an der ID15A Messartefakte durch falsche Justierung der Probe ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursache für die zu hohen Abweichungen sowohl im Dichteprofil als auch in der Oberflächenkonzentration kämen in diesem Fall Strahlschäden an der Probe in Betracht. Vorstellbar wäre die Bildung von dicht gepackten Fragmenten auf der Oberfläche, deren Dichte beim Übergang zum Flüssigkeitsvolumen nahezu exponentiell abnimmt. Hierfür spricht auch, dass im Gegensatz zu den Messungen an der Strahllinie BL9 für die Anpassung der Reflektivitäten in Abbildung 6.19 insgesamt zwei Schichten für die Modellierung der Lysozymschicht angenommen werden mussten.

6.2.2 Auswertung der Messungen von Hämoglobin auf Silizium

Ebenfalls durchgeführt wurden an der Strahllinie ID15A Reflektivitätsmessungen von Silizium-Wafern in Hämoglobinlösung. Auch hier wurden zwei Messungen mit unterschiedlichen Wafern durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Messung zu überprüfen. Für beide Messungen wurde für den pH-Wert pH 7, für die Proteinkonzentration 0,1 mg/ml gewählt. Die Reflektivitätsmessungen und die dazu angepassten Modellreflektivitäten sind auf der linken Seite der Abbildung 6.21 zu sehen. Rechts in der Abbildung sind die Elektronendichteprofile dargestellt, mit denen die Modellreflektivitäten berechnet

wurden. Für die Modellierung des Schichtsystems wurde wie im Kapitel 6.2.1 das Effektive-Dichte-Profil mit drei Schichten angesetzt.

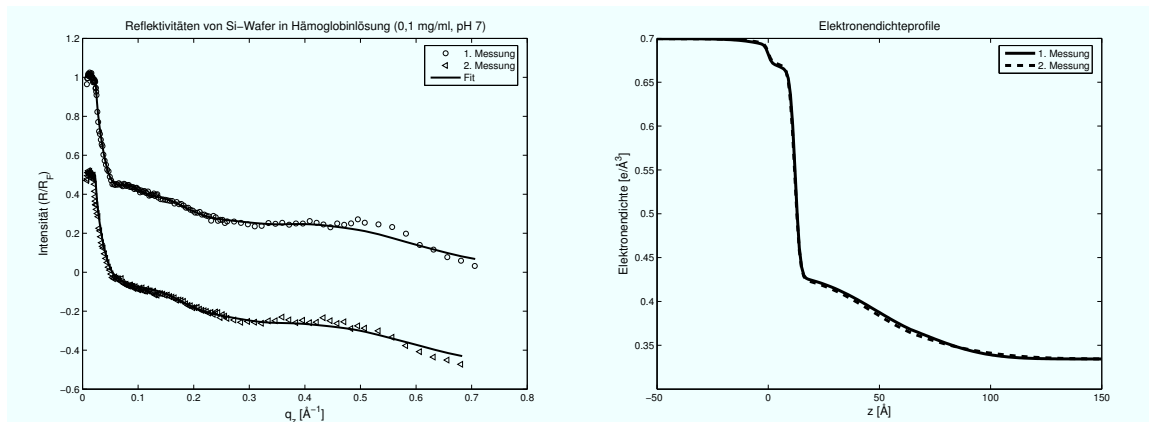


Abbildung 6.21: Darstellung der gemessenen und berechneten Reflexivitäten vom Silizium-Wafern in Hämoglobinlösung bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml und pH 7 (links). Rechts sind die Dichteprofile vom Schichtsystem dargestellt.

Mit Hilfe der Gleichung (6.7) aus Kapitel (6.1.2) wurden die Proteindichteprofile der adsorbierten Hämoglobinschichten berechnet. Die Werte für das Volumen, die Elektronenzahl und molare Masse von Lysozym in Gleichung (6.7) wurden durch die entsprechenden Werte von Hämoglobin aus Kapitel 6.1.4 ersetzt. Die Proteindichteprofile sind in Abbildung 6.22 wiedergegeben.

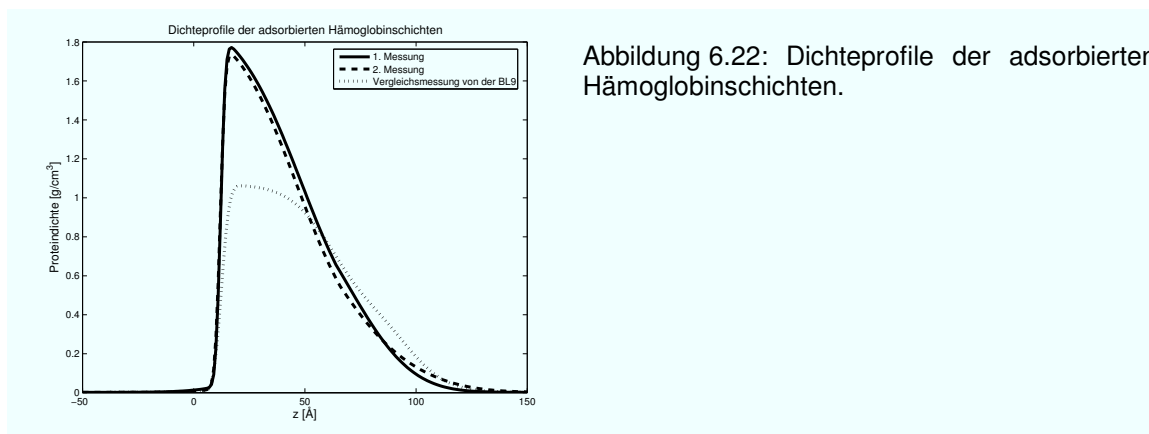


Abbildung 6.22: Dichteprofile der adsorbierten Hämoglobinschichten.

Auch hier stimmen wie bei der Messung mit Lysozym die beiden Profile der Messungen an der ID15A sehr gut mit einander überein, zeigen aber vor allem in der maximalen Dichte eine hohe Abweichung zu der Messung an der BL9. Die maximale Dichte überschreitet sogar den Wert für die Dichte eines Hämoglobinmoleküls $M_{häm}/v_{häm}=1,24 \text{ g/cm}^3$. Die Breite der Schicht scheint sich allerdings verringert zu haben. Beides kann auf eine starke Denaturierung von Hämoglobin hindeuten, bei der womöglich auch die Tetramerstruktur des

Proteins verloren geht. Der hierdurch frei werdende Hohlraum innerhalb des Hämoglobinmoleküls (siehe Kapitel 4.2) trägt dann insgesamt zu einer Verdichtung innerhalb der Schicht bei.

Aus den Proteindichteprofilen wurden mittels Integration die Werte für die Oberflächenkonzentration in Tabelle 6.8 berechnet.

	Γ_{ads} [mg/m ²]
1. Messung	8,22
2. Messung	8,00

Tabelle 6.8: Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Hämoglobins der beiden Messungen.

Zwar weichen auch hier die Werte für die Oberflächenkonzentration leicht von den Werten aus den Messungen an der Strahllinie BL9 ab, insgesamt fällt aber wegen der geringeren Schichtdicke die Abweichung kleiner aus als im Fall von Lysozym.

6.3. Diskussion der Ergebnisse

Um zu demonstrieren, dass mit Hilfe der Röntgenreflektometrie bei hoher Energie die in-situ-Untersuchung der Proteinadsorption an fest-flüssig-Grenzflächen möglich ist, wurden insgesamt Röntgenreflektivitätsmessungen an adsorbiertem Lysozym und Hämoglobin durchgeführt. Als Substrate wurden Silizium-Wafer mit einer nativen Oxidschicht, polyelektrolytisch beschichtete Silizium-Wafer mit positiver und negativer Oberflächenladung und OTS-beschichtete Silizium-Wafer mit einer hydrophoben Grenzfläche gewählt.

Für die Adsorption von Lysozym auf Silizium zeigt sich bei den Messungen an der Strahllinie BL9, dass die Struktur der adsorbierten Schicht weitgehend mit den Modellen aus Kapitel 2.8 beschrieben werden kann. Insbesondere konnten in diesem Fall auch Parameter wie Schichtdicke, Rauigkeit und Dispersion direkt interpretiert werden. Bei der konzentrationsabhängigen Messungen wurden sowohl die Ausbildung von Monolagen als auch die Ausbildung von Doppellagen beobachtet. Bei den pH-abhängigen Messungen zeigen die Messungen, dass bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes von Lysozym, aufgrund der gegenseitigen Abstoßung der positiven geladenen Lysozymmoleküle, kompaktere Konfigurationen der Lysozymmoleküle auf der Oberfläche zunächst verhindert werden. Mit steigendem pH-Wert und der damit verbundenen Abnahme der positiven Ladung der Moleküle stellen sich auch kompaktere Konfigurationen der Lysozymmoleküle ein.

Für die Messungen mit Hämoglobin zeigen die Modellierungen der Elektronendichteprofile, dass für die adsorbierten Proteinschichten zwei

Schichten angenommen werden müssen. Darüberhinaus können die Strukturen der adsorbierten Hämoglobinschichten nur anhand des gesamten Elektronendichteprofiles interpretiert werden. Wie die Modellierung der Reflektivität in Abbildung 6.10 zeigt, gibt eine einfache Modellierung der Schicht wie im Fall von Lysozym nur in einem kleineren q_z -Bereich die gemessene Reflektivität wieder. Das bedeutet, dass unter Berücksichtigung eines größeren q_z -Bereiches eine genauere Auflösung des Elektronendichteprofiles ermöglicht wird. Die Tatsache, dass die Struktur der jeweiligen adsorbierten Hämoglobinschichten nur anhand des gesamten Elektronendichteprofiles interpretiert werden kann, ist ein Zeichen dafür, dass die häufig verwendeten Modelle (Effektive-Dicht-Modell und Box-Modell) für das Elektronendichteprofil an ihre Grenzen stoßen. Sie können zwar immer noch dazu verwendet werden, um das Elektronendichteprofil zu parametrisieren, die einzelnen Parameter wie Schichtdicke, Rauigkeit und Dispersion können jedoch nicht mehr als von einander unabhängig betrachtet werden. Aus diesem Grund ist die eindeutige Interpretation dieser Parameter wie im Fall der Messung von Lysozym auf Silizium an der BL9 nicht mehr möglich. Die Interpretation des Gesamtprofils und die Bestimmung der Werte für die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Hämoglobins legen außerdem nahe, dass man davon ausgehen muss, dass die Hämoglobinmoleküle nach der Adsorption nicht mehr in ihrem nativen Zustand vorliegen. Begründen kann man dies damit, dass Hämoglobin im Gegensatz zu Lysozym kein hartes Protein ist und nach der Adsorption Konformationsänderungen unterliegt.

Die Untersuchungen der Adsorption von Hämoglobin und Lysozym auf polyelektrolytisch beschichteten Silizium-Wafern zeigen, dass man in nahezu allen Fällen unabhängig von der Oberflächenladung des Schichtsystems die Reflektivitätsdaten nicht einfach durch die Annahme einer adsorbierten Schicht oberhalb des bestehenden polyelektrolytischen Schichtsystems erklären kann. Die Adsorption von Proteinmolekülen bewirkt offenbar auch eine Strukturveränderung des gesamten polyelektrolytischen Schichtsystems. Aufgrund des geringen Elektronendichtekontrastes zwischen der polyelektrolytischen Schicht und der adsorbierten Proteinschicht kann allerdings nicht geklärt werden, ob und wie weit die Proteinmoleküle das polyelektrolytische Schichtsystem durchdringen. Schließt man eine Desorption der Polyelektrolytmoleküle bei der Messung in der Proteinlösung aus, kann man mit Hilfe der Informationen über das Elektronendichteprofil der Charakterisierungsmessung des polyelektrolytischen Substrates und der Messung in Proteinlösung die Oberflächenkonzentration des adsorbierten Proteins bestimmen. Die Vergleiche der Oberflächenkonzentrationen von adsorbierten Proteinen auf polyelektrolytischen Schichten mit denen von

adsorbierten Proteinen auf reinen Silizium-Wafern zeigen insgesamt sowohl für Lysozym als auch für Hämoglobin eine verminderte adsorbierte Menge der Proteine am isoelektrischen Punkt. Begründen kann man dies durch eine reduzierte Beweglichkeit der Proteinmoleküle auf einer polyelektrolytisch beschichteten Oberfläche. Auf diese Weise können nach der Adsorption auf eine polyelektrolytisch beschichtete Oberfläche keine höheren Packungsdichten der Proteinmoleküle durch Diffusion auf der Oberfläche entstehen. Die Messung von Lysozym bei pH 7, also unterhalb des isoelektrischen Punktes (positiv geladenes Protein), zeigt aber auch eine stärkere Adsorption des Proteins auf eine negativ geladene PSS-Schicht im Vergleich zu der Messung mit reinen Silizium-Wafern. Offenbar spielt die Gesamtladung des Proteins für die Adsorption auf eine polyelektrolytische Oberfläche eine entscheidende Rolle.

Die Messung der Adsorption von Lysozym auf die hydrophobe OTS-Schicht zeigt, dass durch die Adsorption von Lysozym auf die OTS-Schicht die Elektronendichte der Wasserverarmungszone erhöht wird. Erklären kann man diesen Sachverhalt durch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen der OTS-Schicht und dem Lysozymmolekül über die hydrophoben Bereiche des Moleküls. Dadurch dringen die hydrophoben Bereiche des Proteins verstärkt in die Wasserverarmungszone ein und erhöhen somit die Elektronendichte in der Wasserverarmungszone.

Zusätzliche Messungen mit hoch fokussierter Synchrotronstrahlung an der Strahllinie ID15A der europäischen Synchrotronstrahlungsanlage haben gezeigt, dass man Strahlschäden an der zu untersuchenden Proteinprobe beim höheren Strahlungsflussdichten nicht mehr ausschließen kann. Insbesondere im Fall von Lysozym weisen die Messergebnisse für die adsorbierten Mengen große Unterschiede zu den Messergebnissen an der Strahllinie BL9 auf. Der Umstand, dass die adsorbierte Lysozymschicht nicht mehr mit einer einfachen Schicht modelliert werden kann, kann als ein weiteres Zeichen dafür gedeutet werden, dass das Protein nicht mehr in seiner nativen Form vorliegt. Dies zeigt vor allem, dass generell bei Messungen an biologischen und organischen Proben ein Kompromiss gefunden werden muss zwischen einer hohen Strahlungsflussdichte für eine bessere Statistik der Messung und der Vermeidung von Strahlschäden an der zu untersuchenden Probe. Für diesen Zweck erweisen sich Strahlungsquellen mit einer hohen Energie jedoch einer Fokussierung wie an der BL9 (Flussdichte: $7 \cdot 10^8$ Photonen/s/mm²) als geeigneter.

7. Zusammenfassung und Ausblick

7.1. Zusammenfassung

Der Effekt der Proteinadsorption spielt überall dort eine Rolle, wo Proteine mit Grenzflächen in Kontakt treten. Um den Effekt der Proteinadsorption zu untersuchen ist es wichtig, dass diese *in situ* d.h. mit der umgebenden Proteinlösung erfolgt. Die Methode, die im Rahmen dieser Arbeit für die Untersuchung der Proteinadsorption an einer fest-flüssig-Grenzfläche verwendet wurde, ist die Röntgenreflektometrie bei hoher Energie. Durch die hohe Photonenenergie des Röntgenstrahls wird seine Absorption in der flüssigen Phase der Proteinlösung vermindert. Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich diese Methode sehr gut dazu eignet die Struktur adsorbierter Proteinschichten mit hoher Auflösung *in situ* zu untersuchen. Im einzelnen wurde die Adsorption der Proteine Lysozym und Hämoglobin auf unterschiedlichen Substraten untersucht. Als Substrate wurden Silizium-Wafer mit einer nativen Oxidschicht, polyelektrolytisch beschichtete Silizium-Wafer und mit OTS beschichtete Silizium-Wafer verwendet. Im Fall der Adsorption von Lysozym auf Silizium war es möglich die adsorbierte Schicht durch ein einfaches Schichtmodell zu beschreiben. Insbesondere konnten hierbei die pH-Abhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit der adsorbierten Schichten systematisch untersucht werden. Im Fall der Adsorption von Hämoglobin auf Silizium zeigte die quantitative Auswertung, dass es nicht mehr möglich ist die adsorbierte Proteinschicht mit einem einfachen Schichtmodell zu beschreiben. Auch konnte gezeigt werden, dass man durch die Berücksichtigung eines größeren q_z -Bereiches eine höhere Auflösung des Dichteprofiles erhält.

Im Rahmen der Messungen der Proteine Hämoglobin und Lysozym auf polyelektrolytisch beschichteten Silizium-Wafern zeigte sich, dass die Adsorption des Proteins auf das polyelektrolytische Schichtsystem nicht durch eine einfache Schicht oberhalb des polyelektrolytischen Schichtsystems beschrieben werden kann. Mit der Adsorption des Proteins finden offensichtlich auch Strukturveränderungen im polyelektrolytischen Schichtsystem statt. Zugleich ist der Kontrast zwischen der Elektronendichte des adsorbierten Proteins und der Elektronendichte der polyelektrolytischen Schichten gering, sodass es sich als insgesamt schwierig erweist die Struktur des adsorbierten Proteins zu untersuchen. Dennoch besteht die Möglichkeit mit Hilfe des Charakterisierungsprofils des polyelektrolytischen Schichtsystems die Menge des adsorbierten Proteins zu ermitteln. Im Detail konnte gezeigt werden, dass am isoelektrischen Punkt des Proteins die Tendenz auf ein polyelektrolytisches Schichtsystem zu adsorbieren geringer ist als auf Silizium-Wafer mit einer

nativen Oxidschicht. Andererseits konnte im Fall geladener Lysozymmoleküle unterhalb des isoelektrischen Punktes gezeigt werden, dass durch eine anziehende Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Lysozymmolekülen und der negativ geladenen PSS-Schicht eine im Vergleich zu unbeschichteten Silizium-Wafern stärkere Adsorption stattfindet.

Anhand der die Untersuchung der Adsorption von Lysozym auf hydrophoben OTS-beschichteten Silizium-Wafern konnte gezeigt werden, dass durch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen der OTS-Schicht und den hydrophoben Bereichen der Lysozymmoleküle Adsorption oberhalb der Wasserverarmungszone der OTS-Schicht stattfindet und zugleich durch das Eindringen der Lysozymmoleküle in die Wasserverarmungszone die Elektronendichte in diesem Bereich erhöht wird.

Ferner konnte durch den Vergleich der Messdaten von adsorbierten Proteinen auf Silizium an der Strahllinie BL9 bei DELTA und der Strahllinie ID15A an der ESRF gezeigt werden, dass bei einer zu hohen Strahlungsflussdichte wie sie an der ID15A vorliegt (Flussdichte: $2,6 \cdot 10^{14}$ Photonen/s/mm²) die Entstehung von Strahlschäden nicht mehr zu vermeiden ist. Sinnvoller sind daher Strahlungsquellen mit einer hohen Photonenenergie allerdings einer schwachen Fokussierung.

7.2. Ausblick

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eignet sich die Röntgenreflektometrie bei hoher Energie dazu die Struktur von adsorbierten Proteinen in situ zu untersuchen. Daher kann diese Methode auch künftig neben anderen Methoden eingesetzt werden, um andere im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführten Probensysteme zu untersuchen. Neben der Adsorption anderer Proteine wie Insulin und Amylin, die von großer biologischer Relevanz sind, könnte sich auch der Einfluss von Salzen und anderen Kosolvenzien auf die Adsorptionseigenschaft durch Veränderung der Protein-Protein- und Protein-Substrat-Wechselwirkung als wichtiges Forschungsgebiet erweisen. Auch die Verwendung anderer Substrate als die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten könnte besser zum Verständnis der Wechselwirkungsmechanismen beitragen, die für die Adsorption von Proteinen verantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Modellierungen der Elektronendichteprofile mit dem Box-Modell und dem Effektive-Dichte-Modell aus Kapitel 2.8. Bei beiden Modellen konnte die vertikale Struktur des adsorbierten Proteins nur anhand des gesamten Dichteprofiles interpretiert werden. Dieses Resultat legt nahe, dass für die Modellierung des Elektronendichteprofiles adsorbierter Proteine andere Verfahren zur Erstellung von Schichtmodellen herangezogen werden müssen. Ein Ansatz zur Simulation des Elektronendichteprofiles aus Daten des

jeweilige Proteins (PDB-Datei) ist in [98] am Beispiel von Ribonuklease (RNase) angegeben. Solche Simulationen können sich als hilfreich erweisen, um genauere Informationen über die Packungsdichte, Orientierung und Konformation der adsorbierten Proteine zu erhalten. Ein weiterer Aspekt, der ebenfalls künftig untersucht werden kann, ist die laterale Struktur der adsorbierten Proteinschicht. Um Informationen über der laterale Struktur zu erhalten, sind Messungen der diffusen Röntgenstreuung von der fest-flüssig-Grenzfläche nötig. Dies erweist sich bei in situ Messungen allerdings als schwierig, da beim Durchgang des Röntgenstrahls durch die flüssige Phase stets auch diffuse Streustrahlung am Flüssigkeitsvolumen entsteht. Überwinden ließe sich dieses Problem, indem man den einfallenden Strahl vom Bereich unterhalb des Substrates an die fest-flüssig-Grenzfläche leitet und zugleich für das Substrat ein Material mit niedriger Streuung in dem zu messenden q -Bereich wählt.

8. Anhang

8.1. Die Abélès-Matrix-Methode

Eine andere Methode als das in Kapitel 2.5 vorgestellte Parratt-Verfahren zur Berechnung der Reflektivität eines Schichtsystems ist die Transfermatrix-Methode von Abélès [1,6]. Die Herleitung dieser Methode erfolgt unter der Annahme einer ebenen, zeitlich periodischen elektromagnetischen Welle. Ist bei einer linear polarisierten Welle der elektrische Feldvektor senkrecht zur Einfallsebene gerichtet, nennt man die Welle transversal elektrisch (*TE*); ist der magnetische Feldvektor senkrecht zur Einfallsebene gerichtet, nennt man die Welle transversal magnetisch (*TM*). Da die Stetigkeitsbedingungen an Grenzflächen für *TM*- und *TE*-Wellen unabhängig voneinander gelten, kann jede beliebige Polarisation als eine Superposition dieser beiden Polarisationsrichtungen angenommen werden. Im Folgenden wird die *x-z*-Ebene als Einfallsebene gewählt. Die Grenzfläche liegt in der *x-y*-Ebene. Weiterhin soll *z* die einzige Richtung sein, von der die materialabhängigen Größen ε und μ abhängen. Für eine *TE*-Welle gilt $E_x=E_z=0$.

Die Maxwell'schen Gleichungen in Materie lauten für den Fall der *TE*-Welle:

$$\frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} = 0 \quad (8.1a) \quad \frac{\partial E_y}{\partial z} + \frac{i\omega\mu}{c} H_x = 0 \quad (8.2a)$$

$$\frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} + \frac{i\omega\varepsilon}{c} E_y = 0 \quad (8.1b) \quad \frac{i\omega\mu}{c} H_y = 0 \quad (8.2b)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} = 0 \quad (8.1c) \quad \frac{\partial E_y}{\partial x} - \frac{i\omega\mu}{c} H_z = 0 \quad (8.2c)$$

Die Gleichungen der *TM*-Welle ($H_x=H_z=0$) ergeben sich, indem einerseits \vec{E} und \vec{H} und andererseits ε und $-\mu$ untereinander vertauscht werden¹. Daher wird hier die Betrachtung auf den Fall der *TE*-Welle beschränkt.

Aus den Gleichungen (8.1a), (8.1b), (8.1c) und (8.2b) folgt, dass H_x , H_z und E_y von *y* unabhängig sind. Mit Hilfe der Gleichungen (8.2a) und (8.2c) lassen sich H_x und H_z aus (8.1b) eliminieren und man erhält die Gleichung für E_y

¹ In den meisten Fällen (auch für Röntgenstrahlen) kann $\varepsilon = n^2$ (n =Brechungsindex) und $\mu = 1$ gesetzt werden.

$$\frac{\partial^2 E_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z^2} + n^2 k^2 E_y = \frac{d \ln \mu}{dz} \frac{\partial E_y}{\partial z}, \quad (8.3)$$

mit $n^2 = \varepsilon \mu$ und $k = \frac{\omega}{c}$.

Gleichung (8.3) löst man mit dem Separationsansatz

$$E_y(x, z) = X(x) U(z). \quad (8.4)$$

Daraus ergibt sich der Ausdruck

$$\frac{1}{X} \frac{d^2 X}{dx^2} = \frac{d \ln \mu}{dz} \frac{1}{U} \frac{dU}{dz} - \frac{1}{U} \frac{d^2 U}{dz^2} - n^2 k^2. \quad (8.5)$$

Damit diese Gleichung für beliebige x und y gültig ist, müssen die rechte und die linke Seite der Gleichung jeweils konstant sein. Somit lässt sich (8.5) aufspalten in die Ausdrücke

$$\frac{1}{X} \frac{d^2 X}{dx^2} = -K^2 \quad (8.6)$$

und

$$\frac{d^2 U}{dz^2} - \frac{d \ln \mu}{dz} \frac{dU}{dz} + n^2 k^2 U = K^2 U. \quad (8.7)$$

Aus (8.6) folgt für E_y

$$E_y = U(z) e^{i(Kx - \omega t)}. \quad (8.8)$$

$U(z)$ ist im Allgemeinen eine komplexe Funktion mit der Phase $\phi(z)$. Für E_y lautet die Fläche konstanter Phase

$$\phi(z) + K \cdot x = \text{konstant}. \quad (8.9)$$

Der Winkel θ zwischen der Flächennormalen und der x -Achse ist gegeben durch

$$\tan \theta = \frac{1}{K} \frac{d\phi(z)}{dz}. \quad (8.10)$$

Im Spezialfall einer homogenen ebenen Welle gelten:

$$\phi(z) = k_z z \text{ und } K = k_x. \quad (8.11)$$

Aus den Gleichungen (8.2a) und (8.2c) folgt, dass die Ausdrücke für H_x und H_z durch eine ähnliche Form wie für E_y gegeben sind. Diese lauten:

$$H_x = V(z) e^{i(Kx - \omega t)}, \quad (8.12)$$

$$H_z = W(z) e^{i(Kx - \omega t)}. \quad (8.13)$$

Mit Hilfe der Gleichungen (8.1b), (8.2a) und (8.2c) erhält man nach Elimination von $W(z)$ folgende Beziehungen für die Amplituden $U(z)$, $V(z)$:

$$\frac{dV}{dz} = i \left(\frac{K^2 c}{\omega \mu} - \frac{\omega \varepsilon}{c} \right) U(z), \quad (8.14)$$

$$\frac{dU}{dz} = -i \frac{\omega \mu}{c} V(z). \quad (8.15)$$

Die Lösung der gekoppelten Differentialgleichungen (8.14) und (8.15) beschreibt die Amplitude des elektromagnetischen Feldes abhängig von der vertikalen Richtung z . Man beachte, dass die materialabhängigen Größen ε und μ beliebige Funktionen von z sind. Daher ist eine geschlossene Lösung nicht in jedem Fall möglich. Im Folgenden wird eine iterative Matrixmethode für die Lösung vorgestellt.

Aus der Theorie der Differentialgleichungen [8] folgt, dass das Gleichungssystem (8.14), (8.15) linear unabhängige partikuläre Lösungen (U_1, V_1) und (U_2, V_2) besitzt. Die allgemeine Lösung lautet:

$$\begin{pmatrix} U(z) \\ V(z) \end{pmatrix} = a \begin{pmatrix} U_1(z) \\ V_1(z) \end{pmatrix} + b \begin{pmatrix} U_2(z) \\ V_2(z) \end{pmatrix}, \quad (8.16)$$

oder in Matrixschreibweise

$$\begin{pmatrix} U(z) \\ V(z) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} U_1(z) & U_2(z) \\ V_1(z) & V_2(z) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a \\ b \end{pmatrix}. \quad (8.17)$$

Seien U_0 und V_0 die Werte für $U(z)$ und $V(z)$ bei $z = 0$, dann folgt

$$\begin{pmatrix} U_0 \\ V_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} U_1(0) & U_2(0) \\ V_1(0) & V_2(0) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a \\ b \end{pmatrix}. \quad (8.18)$$

Wählt man die willkürlich gewählten Funktionen $U_1(z)$, $V_1(z)$, $U_2(z)$ und $V_2(z)$ so, dass

$$\begin{aligned} U_1(0) &= V_2(0) = 1, \\ U_2(0) &= V_1(0) = 0 \end{aligned} \quad (8.19)$$

gilt, folgt aus den Gleichungen (8.17) und (8.18)

$$\begin{pmatrix} U(z) \\ V(z) \end{pmatrix} = M(z) \begin{pmatrix} U_0 \\ V_0 \end{pmatrix}, \quad (8.20)$$

mit

$$M(z) = \begin{pmatrix} U_1(z) & U_2(z) \\ V_1(z) & V_2(z) \end{pmatrix}. \quad (8.21)$$

$M(z)$ hat hierbei die Bedeutung einer Transfermatrix, die in dem jeweiligen Medium die Komponenten des elektrischen und des magnetischen Feldes in der x - y -Ebene bei $z = 0$ in die bei einem beliebigen z überführt. Die Matrix $M(z)$ wird auch als die charakteristische Matrix des Mediums bezeichnet.

Die Komponenten der Matrix $M(z)$ für den Fall eines homogenen Mediums werden im Folgenden bestimmt. Hierzu wird von konstanten ε und μ ausgegangen. Für K und $\phi(z)$ gelten die Bedingungen (8.11).

Wie man leicht nachrechnen kann, erfüllen die Funktionen

$$\begin{aligned} U(z) &= A \cos(k_z z) + B \sin(k_z z), \\ V(z) &= \frac{c k_z}{i \mu \omega} (A \sin(k_z z) - B \cos(k_z z)) \end{aligned} \quad (8.22)$$

die Gleichungen (8.14) und (8.15).

Wählt man die Konstanten A und B so, dass die Anfangsbedingungen (8.19) erfüllt sind, erhält man für $U_1(z)$, $V_1(z)$, $U_2(z)$ und $V_2(z)$

$$\left. \begin{aligned} U_1(z) &= \cos(k_z z) \\ V_1(z) &= \frac{c k_z}{i \mu \omega} \sin(k_z z) \\ U_2(z) &= \frac{\mu \omega}{i c k_z} \sin(k_z z) \\ V_2(z) &= \cos(k_z z). \end{aligned} \right\} \quad (8.23)$$

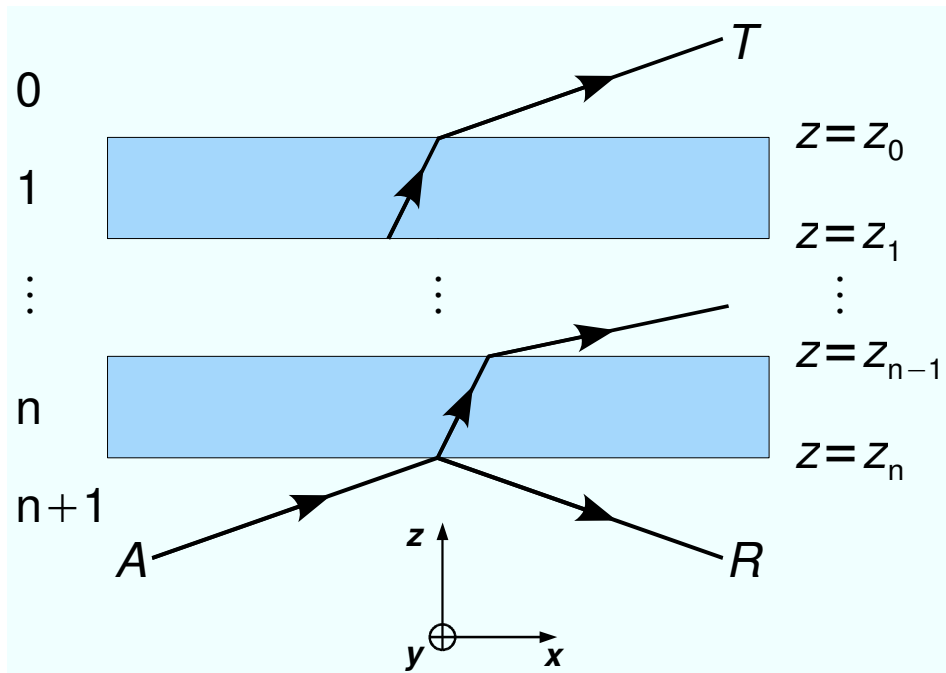


Abbildung 8.1: Skizze des Schichtsystems zur Berechnung der Transfermatrix $M(z)$.

Handelt es sich um ein Schichtsystem, das aus mehreren homogenen Schichten mit je einer charakteristischen Matrix $M_j(z)$ zusammengesetzt ist (Abbildung 8.1), dann erhält man für $M(z)$:

$$\left. \begin{aligned} M(z) &= M_n(z - z_n) && \text{für } z_n \leq z \leq z_{n-1} \\ M(z) &= M_{n-1}(z - z_{n-1}) M_n(z_{n-1} - z_n) && \text{für } z_{n-1} \leq z \leq z_{n-2} \\ &\vdots && \vdots \\ M(z) &= M_1(z - z_1) M_2(z_1 - z_2) \cdots M_{n-1}(z_{n-2} - z_{n-1}) M_n(z_{n-1} - z_n) && \text{für } z_1 \leq z \leq z_0 \\ M(z) &= M_0(z - z_0) M_1(z_0 - z_1) \cdots M_{n-1}(z_{n-2} - z_{n-1}) M_n(z_{n-1} - z_n) && \text{für } z_0 \leq z \end{aligned} \right\} \quad (8.24)$$

mit

$$M_j(z) = \begin{bmatrix} \cos(k_{j,z}z) & \frac{i}{\rho_j} \sin(k_{j,z}z) \\ i\rho_j \sin(k_{j,z}z) & \cos(k_{j,z}z) \end{bmatrix}, \quad \rho_j = -\frac{ck_{j,z}}{\mu^{(j)}\omega}. \quad (8.25)$$

Hierbei bezeichnet $k_{j,z}$ die z -Komponente des Wellenvektors im Medium j und z_j die Höhe der Grenzfläche unterhalb des Mediums j (siehe Abbildung 8.1). Die Stetigkeit an den Grenzflächen ist durch die Stetigkeitsbedingungen der Tangentialkomponenten des \vec{E} - und \vec{H} -Feldes (bzgl. der x - y -Ebene) gewährleistet.

Um eine Beziehung für die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten eines Schichtsystems zu erhalten, werden für den einfallenden, reflektierten und transmittierten Strahl ebene Wellen der Form

$$\begin{aligned} E_y^{(i)} &= E_{y0}^{(i)} e^{i(k_{n,z}z + k_{n,x}x - \omega t)} = A(z) e^{i(k_{n,x}x - \omega t)}, \\ E_y^{(r)} &= E_{y0}^{(r)} e^{i(-k_{n,z}z + k_{n,x}x - \omega t)} = R(z) e^{i(k_{n,x}x - \omega t)}, \\ E_y^{(t)} &= E_{y0}^{(t)} e^{i(k_{0,z}z + k_{0,x}x - \omega t)} = T(z) e^{i(k_{0,x}x - \omega t)} \end{aligned} \quad (8.26)$$

angesetzt. Das Minuszeichen bei k_z deutet darauf hin, dass sich die Welle in negativer z -Richtung ausbreitet. Die entsprechenden Ausdrücke für H_x erhält man aus der Beziehung:

$$H_x = -\frac{ck_z}{\mu\omega} E_y. \quad (8.27)$$

Diese lauten:

$$\begin{aligned} H_x^{(i)} &= -\frac{ck_{n,z}}{\mu^{(n)}\omega} A(z) e^{i(k_{n,x}x - \omega t)}, \\ H_x^{(r)} &= \frac{ck_{n,z}}{\mu^{(n)}\omega} R(z) e^{i(k_{n,x}x - \omega t)}, \\ H_x^{(t)} &= -\frac{ck_{0,z}}{\mu^{(0)}\omega} T(z) e^{i(k_{0,x}x - \omega t)}. \end{aligned} \quad (8.28)$$

Unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen an den Grenzflächen $z=z_0$ und $z=z_n$ ergeben sich für $U(z)$ und $V(z)$ die Ausdrücke:

$$\begin{aligned} U(z_0) &= T(z_0), & U(z_n) &= A(z_n) + R(z_n), \\ V(z_0) &= -\frac{ck_{0,z}}{\mu^{(0)}\omega} T(z_0), & V(z_n) &= -\frac{ck_{n+1,z}}{\mu^{(n+1)}\omega} (A(z_n) - R(z_n)). \end{aligned} \quad (8.29)$$

Aus Gleichung (8.20) folgt

$$\begin{pmatrix} U(z_0) \\ V(z_0) \end{pmatrix} = M(z_0) \begin{pmatrix} U(z_n) \\ V(z_n) \end{pmatrix}. \quad (8.30)$$

Setzt man die Ausdrücke aus (8.29) in Gleichung (8.30) ein, so folgt für die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten eines Schichtsystems

$$r = \frac{R}{A} = -\frac{(m_{21} + \rho_{n+1} m_{22}) - (m_{11} + \rho_{n+1} m_{12}) \rho_0}{(m_{21} - \rho_{n+1} m_{22}) - (m_{11} - \rho_{n+1} m_{12}) \rho_0}, \quad (8.31)$$

$$t = \frac{T}{A} = -\frac{2\rho_{n+1}}{(m_{21} - \rho_{n+1} m_{22}) - (m_{11} - \rho_{n+1} m_{12}) \rho_0} \quad (8.32)$$

mit

$$\rho_0 = -\frac{ck_{0,z}}{\mu^{(0)}\omega}, \quad \rho_{n+1} = -\frac{ck_{n+1,z}}{\mu^{(n+1)}\omega}. \quad (8.33)$$

Im Spezialfall einer einzigen glatten Grenzfläche ist M gegeben durch

$$M = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (8.34)$$

Aus (8.31) und (8.32) erhält man wieder die Gleichungen für den Fresnel'schen Reflexions- und Transmissionskoeffizienten (vgl. (2.26) und (2.28) aus Kapitel 2.4)

$$\tilde{r}_{10} = \frac{\rho_1 - \rho_0}{\rho_1 + \rho_0}, \quad (8.35)$$

$$\tilde{t}_{10} = \frac{2\rho_1}{\rho_1 + \rho_0}. \quad (8.36)$$

Bei einer rekursiven Anwendung des Matrix-Verfahrens findet man mit Hilfe von (8.24) und (8.29) den Ausdruck

$$M_n(z_{n-1}-z_n) \begin{pmatrix} A(z_n)+R(z_n) \\ \rho_{n+1}(A(z_n)-R(z_n)) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A(z_{n-1})+R(z_{n-1}) \\ \rho_n(A(z_n)-R(z_n)) \end{pmatrix}. \quad (8.37)$$

Einsetzen der Ausdrücke für M_n und Auflösen der Gleichung ergibt

$$r_{n+1,n} = \frac{R(z_n)}{A(z_n)} = \frac{\rho_{n+1}-\rho_n+(\rho_{n+1}+\rho_n) \cdot r_{n,n-1} \cdot e^{2ik_{n,z}d_n}}{\rho_{n+1}+\rho_n+(\rho_{n+1}-\rho_n) \cdot r_{n,n-1} \cdot e^{2ik_{n,z}d_n}}, \quad (8.38)$$

mit der Schichtdicke $d_n = z_{n-1} - z_n$ und dem Reflexionskoeffizienten $r_{n,n-1} = \frac{R(z_{n-1})}{A(z_{n-1})}$ an der Grenzfläche $n-1$. Verwendet man schließlich noch den Ausdruck $\tilde{r}_{n+1,n} = \frac{\rho_{n+1}-\rho_n}{\rho_{n+1}+\rho_n}$ für den Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten der Grenzfläche n , ergibt sich die Rekursionsgleichung (2.37) aus Kapitel 2.5:

$$r_{n+1,n} = \frac{\tilde{r}_{n+1,n} + r_{n,n-1} \cdot e^{2ik_{n,z}d_n}}{1 + \tilde{r}_{n+1,n} \cdot r_{n,n-1} \cdot e^{2ik_{n,z}d_n}}.$$

9. Literaturverzeichnis

- [1] Abélès, F., *Recherches sur la propagation des ondes électromagnétiques sinusoidales dans les milieux stratifiés: applications aux couches minces*, Annales de Physique 5 p. 596-706 (1950).
- [2] Als-Nielsen, Jens; McMorrow, Des, *Elements of Modern X-Ray Physics*, John Wiley & Sons (2001).
- [3] Ball, Vincent; Ramsden, Jeremy J., *Analysis of hen egg white lysozyme adsorption on Si(Ti)O₂ aqueous solution interfaces at low ionic strength: a biphasic reaction related to solution self-association*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 17 p. 81-94 (2000).
- [4] Beckmann, P.; Spizzichino, A., *The scattering of electromagnetic waves from rough surfaces*, Pergamon Press (1963).
- [5] Blake, C. C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips D. C.; Sarma, V. R., *Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution*, Nature 206 (22) p. 757-761 (1965).
- [6] Born, M.; Wolf, E., *Principles of Optics*, Pergamon Press, 6th edition (1980).
- [7] Braslau, A.; Pershan, P. S.; Swislow, G.; Ocko, B. M.; Als-Nielsen, J., *Capillary waves on the surface of simple liquids measured by x-ray reflectivity*, Physical Rev. A 38 (5) p. 2457 (1988).
- [8] Bronstein, Semendjajew, Musiol, Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik*, Verlag Harri Deutsch, 4. Auflage (1999).
- [9] Bruzzesi, M. Rosaria; Chiancone, Emilia; Antonini, Eraldo, *Association-Dissociation Properties of Lysozyme*, Biochemistry 4 (9) p. 1796-1800 (1965).
- [10] Butt, Hans Jürgen; Graf, Karlheinz; Kappl, Michael, *Physics and Chemistry of Interfaces*, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2nd Edition (2006).
- [11] Canfield, Robert E.; Liu, Anne K., *The Disulfide Bonds of Egg White Lysozyme (Muramidase)*, The Journal of Biological Chemistry 240 (5) p. 1997-2002 (1965).
- [12] Creighton, T. E., *Proteins*, W. H. Freeman & Co (1993).
- [13] Czeslik, Claus, *Factors Ruling Protein Adsorption*, Z. Phys. Chem. 218 p. 771–801 (2004).

-
- [14] Czeslik, Claus, *Erwünscht und unerwünscht: Proteinadsorption an festen Grenzflächen*, Chem. Unserer Zeit 40 S. 238–245 (2006).
- [15] Czeslik, Claus; Seemann, Heiko; Winter, Roland, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Teubner, 2. Auflage (2007).
- [16] Daillant, Jean; Gibaud, Alain, *X-Ray and Neutron Reflectivity: Principles and Applications*, Springer (1999).
- [17] Decher et al., *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*, Science 277 p. 1232 (1997).
- [18] Decher, G.; Schlenoff, J. B., *Multilayer Thin Films*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2003).
- [19] Dekker, A.; Reitsma, K.; Beugeling, T.; Bantjes, A.; Feijen, J.; Kirkpatrick, C. J.; van Aken, W. G., *Surface modification of hydrophobic polymers for improvement of endothelial cell-surface interactions*, Clinical Materials 11 p. 157-162 (1992).
- [20] Denk, Matthias, *Structural Investigation of Solid-Liquid Interfaces Metal-Semiconductor Interface*, Dissertation Universität Stuttgart (2006).
- [21] Diamond, R.; Phillips, D.C.; Blake, C.C.F.; North, A.C.T., *Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme*, J. Mol. Biol. 82 p. 371-391 (1974).
- [22] Dickerson, R. E.; Geis, I., *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie (1971).
- [23] Doerr, A. K.; Tolan, M.; Prange, W.; Schlomka, J. P.; Seydel, T.; Press, W., *Observation of Capillary Waves on Liquid Thin Films from Mesoscopic to Atomic Length Scales*, Physical Review Letters 83 (17) p. 3470-3473 (1999).
- [24] Doshi, Dhaval A.; Watkins, Erik B.; Israelachvili, Jacob N.; Majewski, Jaroslaw, *Reduced water density at hydrophobic surfaces: Effect of dissolved gases*, PNAS 102 (27) p. 9458–9462 (2005).
- [25] Dzyaloshinskii, I. E.; Lifshitz, E. M.; Pitaevskii, L. P., *The general theory of van der Waals forces*, Advances in Physics 10 (38) p. 165-209 (1961).
- [26] Engemann, Simon Christoph, *Premelting at the ice–SiO₂ interface A high-energy x-ray microbeam diffraction study*, Dissertation Universität Stuttgart (2005).

- [27] Everest, Michael A.; Black, Victoria M.; Haehlen, Andrew S.; Haveman, Greg A.; Kliewer, Christopher J.; Neill, Holly A., *Hemoglobin Adsorption to Silica Monitored with Polarization-Dependent Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy*, J. Phys. Chem. B 110 (39) p. 19461-19468 (2006).
- [28] Evers, F.; Shokuie, K.; Paulus, M.; Sternemann, C.; Czeslik, C.; Tolan, M., *Exploring the Interfacial Structure of Protein Adsorbates and the Kinetics of Protein Adsorption: An In Situ High-Energy X-ray Reflectivity Study*, Langmuir 24 (18) p. 10216-10221 (2008).
- [29] Evers, Florian, *In-situ-Hochenergie-Röntgenreflexionsexperimente zur Untersuchung der Proteinadsorption an Fest-Flüssig-Grenzflächen*, Diplomarbeit Technische Universität Dortmund (Januar 2008).
- [30] Fermi, G.; Perutz, M. F.; Shaanan, B., *The Crystal Structure of Human Deoxyhaemoglobin at 1.74 Å Resolution*, J. Mol. Biol. 175 p. 159-174 (1984).
- [31] Feynman, R. P.; Leighton, R. B.; Sands, M., *The Feynman Lectures On Physics vol. II*, Addison-Wesley Publishing Company, Sixth printing (1977).
- [32] Fleming, Alexander, *On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions*, Proceedings of the Royal Society of London 93 (653) p. 306-317 (1922).
- [33] Fragneto-Cusani, Giovanna, *Neutron reflectivity at the solid/liquid interface: examples of applications in biophysics*, J. Phys.: Condens. Matter 13 (21) p. 4973–4989 (2001).
- [34] Gibaud, A.; Vignaud, G.; Sinha, S. K., *The correction of geometrical factors in the analysis of X-ray reflectivity*, Acta Cryst. A 49 p. 642-648 (1993).
- [35] Haken, H.; Wolf, H. C., *Molekülphysik und Quantenchemie*, Springer Verlag, 5. Auflage (2006).
- [36] Hamaker, H. C., *The London—van der Waals attraction between spherical particles*, Physica 4 (10) p. 1058-1072 (1937).
- [37] Haynes, Charles A.; Norde, Willem, *Globular proteins at solid/liquid interfaces*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2 (6) p. 517-566 (1994).
- [38] Henke, B. L.; Gullikson, E. M.; Davis, J. C., *X-Ray Interactions Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at 50-30,000 eV, Z=1-92*, Atomic Data and Nuclear Data Tables 54 p. 181-342 (1993).

-
- [39] Honkimäki, V.; Reichert, H.; Okasinski, J. S.; Dosch, H., *X-ray optics for liquid surface/interface spectrometers*, J. Synchrotron Rad. 13 p. 426–431 (2006).
- [40] Hoogeveen, Nynke G.; Stuart, Martien A.; Fler, Gerard J., *Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes*, Langmuir 12 p. 3675-3681 (1996).
- [41] Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, 2nd Edition (1991).
- [42] Jackler, G.; Czeslik, C.; Steitz, R.; Royer, C. A., *Spatial distribution of protein molecules adsorbed at a polyelectrolyte multilayer*, Physical Rev. E 71 (041912) p. 041912-1 (2005).
- [43] Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C., *Effect of Temperature on the Adsorption of Lysozyme at the Silica/Water Interface Studied by Optical and Neutron Reflectometry*, Langmuir 18 (17) p. 6565 - 6570 (2002).
- [44] Jackson, J. D., *Classical Electrodynamics*, John Wiley & Sons ,Inc., 2nd Edition (1975).
- [45] Janiak, Christoph, *Proteinentfernung von Kontaktlinsen: Damit der Durchblick erhalten bleibt*, Chemie in unserer Zeit 35 (6) S. 348-354 (2001).
- [46] Joanny, J. F., *Polyelectrolyte adsorption and charge inversion*, The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems 9 (1) p. 117-122 (1999).
- [47] Kiessig, H., *Untersuchungen zur Totalreflexion von Röntgenstrahlen*, Annalen der Physik 402 (6) p. 715-768 (1931).
- [48] Kirkpatrick, S.; Gelatt, C. D.; Vecchi, M. P., *Optimization by Simulated Annealing*, Science 220 (4598) p. 671 - 680 (1983).
- [49] Kondo, Akihiko; Fukuda, Hideki, *Effects of Adsorption Conditions on Kinetics of Protein Adsorption and Conformational Changes at Ultrafine Silica Particles*, Journal of Colloid and Interface Science 198 p. 34-41 (1998).
- [50] Kondo, Akihiko; Mihara, Jun , *Comparison of Adsorption and Conformation of Hemoglobin and Myoglobin on Various Inorganic Ultrafine Particles*, Journal of Colloid and Interface Science 177 p. 214-221 (1996).
- [51] Kondo, Akihiko; Murakami, Fumiyasu; Higashitani, Ko, *Circular dichroism studies on conformational changes in protein molecules upon adsorption on ultrafine polystyrene particles*, Biotechnology and Bioengineering 40 (8) p. 889-894 (1992).

- [52] Krywka, C., *Entwicklung und Aufbau einer Apparatur zur Beugung unter streifendem Einfall an Flüssigkeitsoberflächen*, Diplomarbeit Universität Dortmund (2005).
- [53] Ladam, Guy; Schaaf, Pierre; Cuisinier, Frédéric J. G.; Decher, Gero; Voegel, Jean-Claude, *Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films*, Langmuir 17 (3) p. 878-882 (2001).
- [54] Lagarias, Jeffrey C.; Reeds, James A.; Wright, Margaret H.; Wright, Paul E., *Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions*, SIAM Journal of Optimization 9 p. 112-147 (1998).
- [55] Latour, Robert A., *Biomaterials: Protein-Surface Interactions*, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering DOI: 10.1081 p. 1-15 (2005).
- [56] Laurent, Delphine; Schlenoff, Joseph B., *Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes*, Langmuir 13 p. 1552-1557 (1997).
- [57] London, F., *The general theory of molecular forces*, Trans. Faraday Soc. 33 p. 8-26 (1936).
- [58] Lu, J. R.; Su, T. J.; Thirtle, P. N.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R.; Cubitt, R., *The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection*, Journal of Colloid and Interface Science 206 p. 212–223 (1998).
- [59] Malmsten, M., *Biopolymers at interfaces*, Marcel Dekker, 2nd Edition (2003).
- [60] Marquardt, Donald W., *An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters*, Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics 11 (2) p. 431-441 (1963).
- [61] Martin, Blake W.; Mirov, Sergey; Martyshkin, Dmitri; Venugopalan, Ramakrishna; Shaw, Andrew M., *Hemoglobin adsorption isotherm at the silica-water interface with evanescent wave cavity ring-down spectroscopy*, J. Biomedical Optics 10 (2) p. 024025 (2005).
- [62] Mezger, Markus; Reichert, Harald; Schröder, Sebastian; Okasinski, John; Schröder, Heiko; Dosch, Helmut; Palms, Dennis; Ralston, John; Honkimäki, Veijo, *High-resolution in situ x-ray study of the hydrophobic gap at the water–octadecyl-trichlorosilane interface*, PNAS 103 (49) p. 18401-18404 (2006).
- [63] Mortimer, Charles E.; Müller, Ulrich, *Chemie, Das Basis Wissen der Chemie*, Thieme, 8. Auflage (2003).

-
- [64] Nelder, J. A.; Mead, R., *A Simplex Method for Function Minimization*, The Computer Journal 7 (4) p. 308-313 (1965).
- [65] Nock, Steffen; Wagner, Peter, *Proteomics: Die post-genomische Revolution*, Chemie in unserer Zeit 34 (6) S. 348-354 (2000).
- [66] Norde, W.; Haynes, C. A., *Reversibility and the mechanism of protein adsorption*, ACS Symposium Series 602 Proteins at interfaces 2-Fundamentals and applications p. 26-40 (1995).
- [67] Northrup, Scott H.; Erickson, H. P., *Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation*, PNAS 89 p. 3338-3342 (1992).
- [68] Onclin, Steffen; Ravoo, Bart Jan; Reinhoudt, David N., *Gestaltung der Siliciumoxidoberfläche durch selbstorganisierte Monoschichten*, Angewandte Chemie 117 p. 6438-6462 (2005).
- [69] Parratt, L. G., *Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays*, Physical Review 95 (2) p. 359-369 (1954).
- [70] Pauling, Linus; Corey, Robert B., *Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets*, PNAS 37 (11) p. 729-740 (1951).
- [71] Paulus, M.; Lietz, D.; Sternemann, C.; Shokuie, K.; Evers, F.; Tolan, M.; Czeslik, C.; Winter, R., *An access to buried interfaces: the X-ray reflectivity set-up of BL9 at DELTA*, J. Synchrotron Rad. 15 p. 600-605 (2008).
- [72] Perutz, M. F.; Muirhead, H.; Cox, J. M.; Goaman, L. C. G., *Three-dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhaemoglobin at 2.8Å Resolution: II - The Atomic Model*, Nature 219 p. 131-139 (1968).
- [73] Perutz, M. F.; Muirhead, H.; Cox, J. M.; Goaman, L. C. G.; Mathews, F. S.; McGandy, E. L.; Webb, L. E., *Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8Å resolution: (1) X-ray analysis*, Nature 219 p. 29-32 (1968).
- [74] Picart, Catherine; Sengupta, Kheya; Schilling, Joerg; Maurstad, Gjertrud; Ladam, Guy; Bausch, Andreas R.; Sackmann, Erich, *Microinterferometric Study of the Structure, Interfacial Potential, and Viscoelastic Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films on a Planar Substrate*, J. Phys. Chem. B 108 (22) p. 7196-7205 (2004).
- [75] Plech, A.; Salditt, T.; Münster, C.; Peisl, J., *Investigation of Structure and Growth of Self-Assembled Polyelectrolyte Layers by X-ray and Neutron Scattering under Grazing Angles*, Journal of Colloid and Interface Science 223 p. 74-82 (1999).

- [76] Poynor, Adelé; Hong, Liang; Robinson, Ian K.; Granick, Steve, *How Water Meets a Hydrophobic Surface*, Physical Rev. Lett. 97 (26) p. 266101 (2006).
- [77] Quirynen, M.; Marechal, M.; van Steenberghe, D.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C., *The bacterial colonization of intra-oral hard surfaces in vivo: influence of surface free energy and surface roughness*, Biofouling 4 p. 187-198 (1991).
- [78] Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C., *Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations*, Biophysical Journal 5 p. 909 (1965).
- [79] Reich, Christian; Hochrein, Marion B.; Krause, Bärbel; Nickel, Bert, *A microfluidic setup for studies of solid-liquid interfaces using x-ray reflectivity and fluorescence microscopy*, Review of Scientific Instruments 76 (095103) p. 1-7 (2005).
- [80] Reichert, H.; Honkimäki, V.; Snigirev, A.; Engemann, S.; Dosch, H., *A new X-ray transmission-reflection scheme for the study of deeply buried interfaces using high-energy microbeams*, Physica B 336 p. 46-55 (2003).
- [81] Roth, Charles M. ; Lenhoff, Abraham M., *Electrostatic and van der Waals Contributions to Protein Adsorption: Computation of Equilibrium Constants*, Langmuir 9 p. 962-972 (1993).
- [82] Safo, Martin K.; Abraham, Donald J., *The X-ray structure determination of bovine carbonmonoxy hemoglobin at 2.1 Å resolution and its relationship to the quaternary structures of other hemoglobin crystal forms*, Protein Sci. 10 p. 1091-1099 (2001).
- [83] Sagiv, J., *Organized Monolayers by Adsorption, I. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces*, Journal of the American Chemical Society 102 (92) p. 92-98 (1980).
- [84] Santos, Jose H.; Matsuda, Naoki; Qi, Zhi-mei; Yoshida, Takamitsu; Takatsu, Akiko; Kato, Kenji, *Adsorption Behavior of Cytochrome c, Myoglobin and Hemoglobin in a Quartz Surface Probed Using Slab Optical Waveguide (SOWG) Spectroscopy*, Analytical Sciences 19 (2) p. 199-204 (2003).
- [85] Schelten, Jacob; Schlecht, Peter; Schmatz, Werner; Mayer, Adalbert, *Neutron Small Angle Scattering of Hemoglobin*, The Journal of Biological Chemistry 247 (17) p. 5436-5441 (1972).

-
- [86] Schmitt, Johannes; Grünewald, Torsten; Decher, Gero; Pershan, Peter S.; Kjaer, Kristian; Lösche, Mathias, *Internal Structure of Layer-by-Layer Adsorbed Polyelectrolyte Films: A Neutron and X-ray Reflectivity Study*, *Macromolecules* 26 p. 7058-7063 (1993).
- [87] Schönhoff, Monika, *Self-assembled polyelectrolyte multilayers*, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 p. 86-95 (2003).
- [88] Schwabl, Franz, *Quantenmechanik*, Springer, 5. Auflage (1998).
- [89] Seeck, O. H., *Untersuchung des Wetting-Systems CCL4 auf Si-SiO2 mittels diffuser Röntgenstreuung*, Diplomarbeit Universität Kiel (1993).
- [90] Seeck, O. H. [u.a.], *LSFIT-Software zur Reflektivitätsbestimmung von Schichtsystemen*,
- [91] Silberzan, P.; Leger, L.; Ausserre, D.; Benattar, J. J., *Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers*, *Langmuir* 7 (8) p. 1647–1651 (1991).
- [92] Sinha, S. K.; Sirota, E. B.; Garoff, S.; Stanley, H. B., *X-ray and neutron scattering from rough surfaces*, *Physical Review B* 38 (4) p. 2297-2311 (1988).
- [93] Stettner, Jochim, *Charakterisierung von rauhen MBE-CoSi2/Si-Schichtsystemen mittels Röntgenstreuung*, Dissertation Christian-Albrecht-Universität Kiel (1995).
- [94] Storn, Rainer; Price, Kenneth, *Differential Evolution—A Simple and Efficient Heuristic for Global Optimization over Continuous Spaces*, *Journal of Global Optimization* 11 p. 341–359 (1997).
- [95] Struther Arnott, Alan J. Wonacott, *Atomic coordinates for an α -helix: Refinement of the crystal structure of α -poly-L-alanine*, *Journal of Molecular Biology* 21 (2) p. 371-383 (1966).
- [96] Suortti, P.; Schulze, C., *Fixed-Exit Monochromators for High-Energy Synchrotron Radiation*, *J. Synchrotron Rad.* 2 p. 6-12 (1995).
- [97] Tidswell, I. M.; Ocko, B. M.; Pershan, P. S.; Wasserman, S. R.; Whitesides, G. M.; Axe, J. D., *X-ray specular reflection studies of silicon coated by organic monolayers (alkylsiloxanes)*, *Physical Rev. B* 41 (2) p. 1111 (1990).
- [98] Tiemeyer, Sebastian, *Proteinadsorption an Langmuirfilmen*, Diplomarbeit Technische Universität Dortmund (2009).
- [99] Tolan, Metin, *X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films*, Springer-Verlag (1999).

- [100] Tolan, Metin; Weis, Thomas; Westphal, Carsten; Wille, Klaus, *DELTA: Synchrotron light in nordrhein-westfalen*, Synchrotron Radiation News 16 (2) p. 9-11 (2003).
- [101] Ueki, Tatzuo; Inoko, Yoji; Kataoka, Mikio; Amemiya, Yoshiyuki; Hiragi, Yuzuru, *X-Ray Scattering Study on Hemoglobin Solution with Synchrotron Radiation : A Simple Analysis of Scattering Profile at Moderate Angles in Terms of Arrangement of Subunits*, J. Biochem. 99 p. 1127-1136 (1986).
- [102] Voet, Donald; Voet, Judith G.; Pratt, Charlotte W., *Lehrbuch der Biochemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH (2002).
- [103] Vroman, L.; Adams, A.; Fischer, G.; Munoz, P. , *Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces*, Blood 55 (1) p. 156-159 (1980).
- [104] Vroman, Leo, *Methods of Investigating Protein Interactions on Artificial and Natural Surfaces*, Annals of the New York Academy of Sciences 516 p. 300-305 (1987).
- [105] Wasserman, Stephen R.; Tao, Yu-Tai; Whitesides, George M., *Structure and Reactivity of Alkylsiloxane Monolayers Formed by Reaction of Alkyltrichlorosilanes on Silicon Substrates*, Langmuir 5 (4) p. 1074-1087 (1988).
- [106] White, D. J., *Processes contributing to the formation of dental calculus*, Biofouling 4 p. 209-218 (1991).
- [107] Winter, R.; Noll, F., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner (1998).
- [108] <http://www-cxro.lbl.gov>.

Danksagung

Am Ende der Arbeit möchte ich mich bei allen Leuten, die mir geholfen haben, bedanken.

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Metin Tolan für die Vergabe des interessanten naturwissenschaftlich interdisziplinären Arbeitsthemas danken.

Große Unterstützung bekam ich während der Arbeit von Dr. Michael Paulus. Außer für wichtige Hinweise zur Auswertung der Daten sei ihm auch für seine Unterstützung während der Messzeiten sowohl an DELTA als auch an der ESRF gedankt.

Ein weiterer Dank geht an PD Dr. Claus Czeslik. Er lieferte für diese Arbeit wichtige Vorschläge für Probensysteme und Systematiken, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden konnten.

Dr. Christian Sternemann möchte ich ebenfalls für seine Unterstützung während der DELTA-Messzeiten danken.

Für ihre Betreuung während der Messzeit an der ID15A der ESRF möchte ich Dr. Federica Venturini und Dr. Sebastian Schröder danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Maschinengruppen von DELTA und ESRF für die Versorgung mit Synchrotronstrahlung.

Bei Florian Evers bedanke ich mich sowohl für seine Unterstützung während der Messzeiten als auch für die zahlreichen Diskussionen, die für die Interpretation der Messergebnisse sicherlich sehr hilfreich waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt der Fakultät Physik für die Fertigstellung der Probenzellen und anderen mechanischen Bauteilen.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dirk Schemionek und Frau Gisela Pike vom Präparationslabor der Fakultät Physik sowohl für die Bereitstellung von Chemikalien als auch für das Zuschneiden von Silizium-Wafern.

Danksagung

Thorsten Witt und Georg Jülicher möchte ich für die Beseitigung von zahlreichen Problemen an meinem Rechner und für die Beschaffung technischer Geräte danken.

Insgesamt möchte ich mich auch im einzelnen nochmals bei Dr. M. Paulus, F. Lehmkühler, C. Jeworrek, Dr. C. Sternemann und F. Evers für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich noch bei der Technischen Universität Dortmund und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung der Arbeit.

Mein letzter Dank schließlich geht an meine Mutter für ihre moralische Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation - abgesehen von der Beratung durch meine wissenschaftlichen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie wurde weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Frühere Promotionsversuche wurden von mir nicht vorgenommen.

Dortmund, Februar 2009

(Kaveh Shokuie)