

**Selektive chemische Modifikation von Siliziumnitrid-
Oberflächen für neuartige biosensorische
Applikationen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nele Lange
aus Berlin

Berlin 2017

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Februar 2014 bis Januar 2017 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. S. Unger an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) und Frau Prof. Dr. Nora Kulak der Freien Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, sowie am BESSY-II-Elektronenspeicherring des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie GmbH.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang E. S. Unger

2. Gutachter: Prof. Dr. Nora Kulak

Tag der Disputation:

Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Nora Kulak und Prof. Dr. Wolfgang Unger für die Möglichkeit dieses Thema in ihren Arbeitsgruppen zu bearbeiten, für die Betreuung, die Übernahme des Gutachtens, die zahlreichen Diskussionen sowie die Chance am BESSY II zu arbeiten.

Weiterhin danke ich allen Kollegen vom Fachbereich 6.1 der BAM. Bei Dr. Paul Dietrich bedanke ich mich für die Projektidee und die Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Bei Dipl.-Ing. Andreas Lippitz für die BESSY Unterstützung, Einweisung ins ESCA-lab, die Plasmakammer und die Geduld beim ersten Umgang mit UHV-Apparaturen. Dieter Treu danke ich für die zahlreichen XPS Messungen am KRATOS XPS Gerät. Dr. Markus Holzweber und Dipl.-Phys. Thomas Wirth für die anregenden Diskussionen und dadurch gewonnen neuen Ideen und sowie für die ToF-SIMS Messungen. Henryk Kalbe, Dr. Thomas Heinrich, Carolin Nietzold und Ievgeny Domski danke ich für die Unterstützung während der zahlreichen BESSY-Messzeiten und der Aufmunterung besonders während der Nachtschichten. Dr. Alexei Nefedov (Karlsruhe Institute of Technology, KIT) von der HE-SGM Kooperationsgruppe am BESSY II und bei Dr. Olaf Schwarzkopf, Dr. Antje Vollmer und Matthias Mast (BESSY II) für den Support während der Messungen am HZB. Bei Dr. Thomas Hübert vom Fachbereich 8.1 bedanke ich mich für die Bereitstellung der Laborräume. Jörg Schlichka und Marc Detjens vom Fachbereich 8.1 danke ich für die Unterhaltung während der zahlreichen Stunden im Labor. Andreas Schulz und Dr. Heike Traub aus dem Fachbereich 1.1 danke ich für die ICP-MS und LA-ICP-MS Messungen. Bei Dr. Andrea Hornemann (PTB) bedanke ich mich für die IR-Messungen.

Ein weiterer Dank geht an die AG Kulak der FU Berlin für die Hilfe während der DNA-Spaltungsexperimente, besonders an Carsten Lüdtke, der mir seinen Kupfer(II)phenanthrolin-Komplex zur Verfügung gestellt hat, und an Jan Hormann für die Unterstützung und Hilfe bei allen DNA-Spaltversuchen, für die Diskussionen und zahlreichen neuen Ideen. Weiterhin danke ich meinen Praktikanten Sabrina, Tadashi und besonders Anja, die mir während der letzten Zeit an der BAM viel geholfen hat.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während meines Studiums und während der Dissertation immer unterstützt und aufgebaut haben.

Besonders danke ich Mela für stundenlanges Korrekturlesen. Ein Dankeschön geht an meine Eltern. Ihr habt mir das Studium ermöglicht und mich immer in allem unterstützt.

Bei meinem Mann Mischa bedanke ich mich, für die Unterstützung während meines Studiums und der Dissertation. Du hast mir immer den Rücken freigehalten, mich abgelenkt und mich auf andere Gedanken gebracht. DANKE!

Kurzzusammenfassung

Biosensoren gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. So erfolgt die Identifizierung des Analyten mit Biosensoren deutlich schneller und unkomplizierter als mit herkömmlichen analytischen Methoden. Aufgrund des Schlüssel-Schloss-Prinzips ist zudem die Detektion von Biosensoren äußerst selektiv. Die Herstellung dieser Sensoren erfolgt häufig trotz der Unzuverlässigkeit der Silanchemie über die Silanisierung der Si-H- bzw. Si-OH-Bindungen an der Silizium-Oberfläche. Die Abhängigkeit von Temperatur- und pH-Wert, sowie die Veränderung der Filmdicke bei nur kleinen Schwankungen des Wassergehalts während der Umsetzung werden oft vernachlässigt. Seltener wird die Si-NH_x-Bindung genutzt, um dünne organische Filme zu erzeugen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Funktionalisierungsstrategie entwickelt, die die Silanchemie vermeidet. Die Idee basiert auf der Herstellung einer Azid-terminierten Oberfläche erzeugt aus Oberflächenaminen des materialintrinsic Stickstoffs von Siliziumnitrid (Si₃N₄). Diese Azidgruppen bildeten die Grundlage für die Click-Chemie mit geeigneten Alkin-terminierten (Bio)molekülen und die anschließende Immobilisierung von ausgewählten Analyten. Die Funktionalisierungsstrategie umfasst die Erzeugung von NH_x-terminierten Si₃N₄-Oberflächen durch Flusssäureätzung gefolgt von deren Umwandlung in Azidgruppen durch verschiedene Methoden. Im Anschluss wurden Alkine durch die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC, Click-Chemie) an die Azid-terminierte Oberfläche immobilisiert. Der Erfolg der einzelnen Reaktionsschritte wurde durch oberflächenanalytische Methoden, durch XPS, NEXAFS und ToF-SIMS, überprüft. Die Charakterisierung der gebildeten Triazolringe erfolgte anhand des N 1s-XP-Spektrums sowie der NEXAFS C K-Kante. Die CF₃-Gruppe wurde anhand der C 1s und F 1s-XP-Spektren, sowie der NEXAFS F K-Kante identifiziert. ToF-SIMS Untersuchungen bestätigten ebenfalls die Bindung des Alkins an die Si₃N₄-Oberfläche. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die direkte Anbindung eines Biomoleküls an die Si₃N₄-Oberfläche getestet. Hierfür wurde das Biotin/Streptavidin-System durch eine Click-Reaktion an der Oberfläche verankert. Die erfolgreiche Biotin/Streptavidin-Interaktion wurde ebenfalls mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS nachgewiesen. Der Erfolg der Click-Reaktionen war sowohl bei der Methodenentwicklung als auch bei der Immobilisierung des Modellfilms vom genutzten Lösungsmittel abhängig.

Neben der direkten Immobilisierung von (Bio)molekülen an die Si_3N_4 -Oberfläche durch die Click-Chemie gelang es auch einen Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex als künstliche Nuklease über Amid-Kopplung an die Si-NH_x -Oberfläche zu binden. Hierbei diente ein OCF_3 -Substituent des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes als XPS-Sonde. Die Identifizierung des Komplexes erfolgte anhand der OCF_3 -Komponente im C 1s- und F 1s-XP-Spektrum und der NEXAFS F K-Kante, sowie des Cu 2p-XP-Spektrums. Die ToF-SIMS-Massenspektren bestätigten ebenfalls die Bindung des Komplexes. Die Kupfermenge wurde mit der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) zu $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bestimmt, was 87×10^{12} Kupferatome pro cm^2 entspricht. Nach der Verifizierung des immobilisierten Komplexes erfolgte die Untersuchung der Spaltaktivität der auf der Si_3N_4 -Oberfläche gebundenen künstlichen Nuklease gegenüber Plasmid-DNA. Hierbei wurde eine Zunahme der Spaltaktivität mit zunehmender DNA-Inkubationszeit festgestellt. Weiterhin ist bemerkenswert, dass der verwendete Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex erst auf der Oberfläche seine Spaltaktivität entfaltet. Kontrollproben in Lösung zeigten im Gegensatz zu dem immobilisierten Komplex keine Spaltaktivität.

Abstract

In recent years, biosensors have become more and more important. The identification of the analyte is much faster and easier by using biosensors instead of classical analytical methods. Biosensors are enormously selective due to the key-lock principle. For example, biosensors found applications in medical diagnostics. The used sensors are often produced *via* silanization of Si-H or Si-OH bonds at surfaces of silicon wafers. However, the known problems of the silane chemistry, as its dependency on temperature, water content of the solution and pH, as well as the hardly controllable film thickness, often lead to low performance in real applications. However, so far Si-NH_x bonds have been used rarely to produce thin organic layers for biosensing applications.

This work presents the development of a novel functionalization strategy for silicon nitride (Si₃N₄) surfaces bypassing the problems of the unreliable silane chemistry. The aim was to prepare azide-terminated surfaces as foundation for the modification by forming Si-NH_x bonds in the surface layer of Si₃N₄ films. These azide groups served as a basis for click chemistry with suitable alkyne-terminated (bio)molecules for subsequent immobilization of selected analytes. Our functionalization route comprises the generation of NH_x-terminated Si₃N₄ surfaces by fluoride etching followed by the conversion into azide groups by various methods. Fluorine-substituted alkyne-terminated molecules were immobilized at the azide-terminated surface *via* copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC, click chemistry). The success of the reaction has been proven by surface chemical analysis using XPS, NEXAFS and TOF-SIMS. Triazole components after the click chemistry were identified within N 1s XP spectra as well as with the NEXAFS C K edge. The CF₃ groups of the alkynes were identified with XPS C 1s and F 1s spectra as well as the NEXAFS F K absorption edge. Afterwards, the binding of biomolecules was tested by the immobilized biotin/streptavidin system on the surface *via* click chemistry. The successful biotin/streptavidin interaction was proven with XPS, NEXAFS and ToF-SIMS. We found a solvent effect of the click reaction result with the test alkyne as well as for the immobilization of the biotin/streptavidin film.

Additionally, a copper(II)trifluoromethoxy phenanthroline complex used as an artificial nuclease was immobilized on surface aminogroups *via* amide coupling. Here, an OCF₃ substituent serves as XPS marker for easy detection. The complex was identified with the help of C 1s, F 1s and Cu 2p XP spectra, with NEXAFS C K- and F K-edge spectra as well as ToF-SIMS

spectra. The amount of immobilized copper on the surface was determined with ICP-MS to be $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (87×10^{12} copper atoms per cm^2). After the verification of the immobilized complex, the DNA cleavage activity of the artificial nuclease against plasmid DNA was investigated. Here, an increased nuclease activity was observed with increased incubation time. Furthermore, it is remarkable that the used copper(II) complex reached its cleavage activity only as surface-bound species. While the complex in solution did not show any cleavage activity in control experiments.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Siliziumnitrid und seine Anwendungsmöglichkeiten	1
1.1.1.	Abscheidung von Siliziumnitrid-Filmen durch die chemische Gasphasenabscheidung..	3
1.2.	Biosensoren.....	6
1.3.	Oberflächenfunktionalisierung für die Herstellung neuer Biosensoren	11
1.4.	Zielsetzung.....	14
2.	Oberflächenanalytische Verfahren: Methodische Grundlagen	16
2.1.	Synchrotronstrahlung für die spektroskopische Anwendung.....	16
2.2.	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	18
2.3.	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS)	27
2.4.	Flugzeitsekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS)	32
3.	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1.	Überblick	35
3.2.	Amino-terminierte Siliziumnitrid-Oberflächen (Si-NH _x).....	36
3.2.1.	Stand der Forschung.....	36
3.2.2.	Oberflächencharakterisierung der Siliziumnitrid-Filme	39
3.2.3.	Chemische Derivatisierung für die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (CD-XPS)	45
3.2.4.	Zusammenfassung.....	51
3.3.	Erzeugung einer Azid-terminierten Siliziumnitrid-Oberfläche	53
3.3.1.	Stand der Forschung.....	53
3.3.2.	Herstellung und Charakterisierung von N ₃ -terminierten Siliziumnitrid-Oberflächen...	57
3.3.3.	Zusammenfassung.....	59
3.4.	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mit Fluor-substituierten Alkinen	60
3.4.1.	Stand der Forschung.....	60
3.4.2.	Herstellung und Charakterisierung von organischen Schichten auf Siliziumnitrid-Oberflächen.....	65
3.4.2.1.	Lösungsmittelabhängigkeit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition...	72
3.4.2.2.	Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.....	76
3.4.2.3.	Verifizierung der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition mit Propargylchlorid	78
3.4.3.	Zusammenfassung.....	80
3.5.	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition mit Biotin und Streptavidin–Modellsystem...	81

3.5.1.	Stand der Forschung.....	81
3.5.2.	Herstellung und Charakterisierung von Biotin/Streptavidin-Schichten auf Siliziumnitrid-Oberflächen.....	83
3.5.2.1.	Lösungsmittelabhängigkeit der Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition.....	90
3.5.3.	Zusammenfassung.....	92
3.6.	Immobilisierung künstlicher Nukleasen zur DNA-Spaltung auf Siliziumnitrid-Oberflächen .	93
3.6.1.	Stand der Forschung.....	93
3.6.2.	Herstellung und Charakterisierung künstlicher Nukleasen auf Siliziumnitrid-Oberflächen.....	101
3.6.3.	Untersuchung der Spaltaktivität von immobilisierten Cu(II)phen-Komplexen	111
3.6.4.	Zusammenfassung.....	116
4.	Schlussfolgerung und Ausblick	117
4.1.	Schlussfolgerung.....	117
4.2.	Ausblick	119
5.	Experimenteller Teil	120
5.1.	Oberflächencharakterisierung.....	120
5.1.1.	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)	120
5.1.2.	Infrarot-Spektroskopie	121
5.1.3.	NEXAFS	121
5.1.4.	ToF-SIMS.....	122
5.1.5.	ICP-MS	123
5.2.	Versuchsvorschriften.....	125
5.2.1.	Oberflächenpräparation.....	125
5.2.2.	NH _x -terminierte Si ₃ N ₄ -Oberflächen	125
5.2.3.	Derivatisierung für die XPS-Analyse	125
5.2.4.	Erzeugung einer Azid-terminierten Oberfläche	126
5.2.5.	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit fluorsubstituierten Alkinen... ..	127
5.2.6.	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit Biotin und Interaktion mit Streptavidin-Modellsystem	128
5.2.7.	Immobilisierung künstlicher Nukleasen für die DNA-Spaltung auf Si-NH _x Oberflächen... ..	128
5.2.8.	Agarose-Gelelektrophorese	129
5.2.9.	UV/VIS-Absorptionsspektroskopie.....	130
6.	Literaturverzeichnis.....	131

7.	Spektrenanhang	142
7.1.	Verzeichnis der funktionalisierten Oberflächen	142
7.2.	Gereinigte Siliziumnitrid-Oberfläche.....	144
7.3.	Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC in Ethanol.....	149
7.4.	Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC in tert-Butanol/Wasser.....	155
7.5.	Azidierung mit Natriumazid mit tert-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC in Ethanol.....	161
7.6.	Azidierung mit Natriumazid mit tert-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC in tert-Butanol/Wasser.....	166
7.7.	Negativkontrolle (BHF+CuAAC)	172
7.8.	Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC mit Biotin in Methanol und Interaktion mit Streptavidin.....	174
7.9.	Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC mit Biotin in DMF und Interaktion mit Streptavidin	181
7.10.	Azidierung mit Natriumazid mit tert-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC mit Biotin in Methanol und Interaktion mit Streptavidin	187
7.11.	Azidierung mit Natriumazid mit tert-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC mit Biotin in DMF und Interaktion mit Streptavidin.....	193
7.12.	Negativkontrolle: Si-NH _x -Oberfläche inkubiert mit Streptavidin	199
7.13.	Negativkontrolle: Si-N ₃ -Oberfläche (Prozess C) inkubiert mit Streptavidin	205
7.14.	Negativkontrolle: Si-N ₃ -Oberfläche (Prozess A) inkubiert mit Streptavidin.....	211
7.15.	Negativkontrolle: Si-N ₃ -Oberfläche (Prozess D) inkubiert mit Streptavidin.....	217
7.16.	Negativkontrolle: Si-NH _x -Oberfläche inkubiert mit CuL2	223
8.	Abbildungsverzeichnis.....	228
9.	Tabellenverzeichnis	237
10.	Publikationsliste	239
11.	Erklärung	240

Abkürzungen

APTES	(3- <u>A</u> minopropyl)triethoxysilan
APTMS	(3- <u>A</u> minopropyl)trimethoxysilan
AR-XPS	<u>A</u> ngle- <u>R</u> esolved XPS
ATR	<u>A</u> ttenuated <u>T</u> otal <u>R</u> eflection
BE	<u>B</u> indungs <u>e</u> nergie
BESSY	<u>B</u> erliner <u>E</u> lektronenspeicherring-Gesellschaft für <u>S</u> ynchrotronstrahlung m. b. H
BHF	Gepufferte Flußsäure
CAE	<u>C</u> onstant <u>A</u> alyzer <u>E</u> nergy
CD-XPS	<u>C</u> hemical <u>D</u> erivatization XPS
CuAAC	<u>C</u> opper(I)-Catalyzed <u>A</u> zide- <u>A</u> lkyne <u>C</u> ycloaddition
CVD	<u>C</u> hemical <u>V</u> apour <u>D</u> eposition
DMF	<u>D</u> imethylformamid
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
\vec{E}	<u>E</u> lektrischer <u>F</u> eldvektor
ESCA	<u>E</u> lektronenspektroskopie für die <u>C</u> hemische <u>A</u> nalyse
EtOH	Ethanol
EXAFS	<u>E</u> xtended <u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>F</u> ine <u>S</u> tructure
EY	<u>E</u> lectron <u>Y</u> ield
FY	<u>F</u> luorescence <u>Y</u> ield
GIR	<u>G</u> razing <u>I</u> ncidence <u>R</u> eflection
HE-SGM	<u>H</u> igh <u>E</u> nergy <u>S</u> spherical <u>G</u> rating <u>M</u> onochromator
HOMO	<u>H</u> ighest <u>O</u> ccupied <u>M</u> olecular <u>O</u> rbital
HOPG	<u>H</u> ighly <u>O</u> rded <u>P</u> yrolytic <u>G</u> raphite
ICP-MS	<u>I</u> nductively <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
KE	<u>K</u> inetische <u>E</u> nergie
LPCVD	<u>L</u> ow <u>P</u> ressure <u>C</u> hemical <u>V</u> apour <u>D</u> eposition

LUMO	<u>L</u> owest <u>U</u> noccupied <u>M</u> olecular <u>O</u> rbital
MeOH	Methanol
MOPS-Puffer	3-(N- <u>M</u> orpholino) <u>p</u> ropan <u>s</u> ulfonsäure
NaN ₃	Natriumazid
NEXAFS	<u>N</u> ear <u>E</u> dge <u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>F</u> ine <u>S</u> tructure
PECVD	<u>P</u> lasma <u>E</u> nhanced <u>C</u> hemical <u>V</u> apour <u>D</u> eposition
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol
PEY	<u>P</u> artial <u>E</u> lectron <u>Y</u> ield
RNA	<u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
SAM	<u>S</u> elf- <u>A</u> ssembled <u>M</u> onolayer
sccm	<u>S</u> tandard <u>C</u> ubic <u>C</u> entimeters per <u>M</u> inute
Si ₃ N ₄	Siliziumnitrid
SPAAC	<u>S</u> train- <u>P</u> romoted <u>A</u> zide- <u>A</u> lkyne <u>C</u> ycloaddition
SPR	<u>S</u> urface <u>P</u> lasmon <u>R</u> esonance Spectroscopy
^t BuOH	<i>tert</i> -Butanol
^t BuONO	<i>tert</i> -Butylnitrit
\overline{TDM}	<u>T</u> ransition <u>D</u> ipole <u>M</u> oment
TEY	<u>T</u> otal <u>E</u> lectron <u>Y</u> ield
TFBA	4-(<u>T</u> rifluormethyl) <u>b</u> enzaldehyd
TfN ₃	Triflylazid (Trifluormethansulfonylazid)
TOF-SIMS	<u>T</u> ime- <u>o</u> f- <u>F</u> light <u>S</u> econdary <u>I</u> on <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)aminomethan
UHV	<u>U</u> ltra <u>h</u> och <u>v</u> akuum (< 10 ⁻⁸ mbar)
UPS	<u>U</u> ltraviolett- <u>P</u> hotoelektronens <u>p</u> ektroskopie
UV/Vis	<u>U</u> ltraviolett / <u>V</u> isible
XPS	<u>X</u> -ray <u>P</u> hotoelectron <u>S</u> pectroscopy

1. Einleitung

1.1. Siliziumnitrid und seine Anwendungsmöglichkeiten

Siliziumnitrid (Si_3N_4) hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Anwendung findet keramisches Si_3N_4 , in seinen Modifikationen α - und β - Si_3N_4 , oder amorphes Si_3N_4 . Keramisches Siliziumnitrid wird zum Beispiel wegen seiner Härte bei Führungsrollen, Lagerringen und Walzkörpern eingesetzt.^[1] Die Grundlage beider Modifikationen, α - und β - Si_3N_4 , bildet eine Silizium-Stickstoff-Tetraedereinheit (Abbildung 1), wobei das Silizium sp^3 -hybridisiert vorliegt und tetraedrisch von vier Stickstoffatomen umgeben ist.^[1-2] Die Tetraeder sind jeweils über die Stickstoffatome mit einer weiteren Tetraedereinheit verbunden, so dass jedes Siliziumatom vier Stickstoffatome als nächste Nachbarn und jedes Stickstoffatom je drei Siliziumatome als nächste Nachbarn hat. α - und β - Si_3N_4 unterscheiden sich in der Abfolge ihrer Si-N-Schichten. Während β - Si_3N_4 Si-N-Schichten mit der Sequenz ABABAB... aufweist, hat α - Si_3N_4 eine Si-N-Schicht Sequenz ABCDABCD... (Abbildung 2). Die AB-Schichten sind sowohl in der α - als auch in der β -Modifikation gleich. Die CD-Schichten des α - Si_3N_4 sind wie die AB-Schicht, jedoch an der C-Gleitebene gespiegelt. Weiterhin weist α - Si_3N_4 eine trigonale Symmetrie und β - Si_3N_4 eine hexagonale Symmetrie auf.^[2] Der Phasenübergang von α - Si_3N_4 zum β - Si_3N_4 tritt bei Temperaturen von ca. 1500 °C auf. Der umgekehrte Übergang wurde bisher nicht beobachtet.

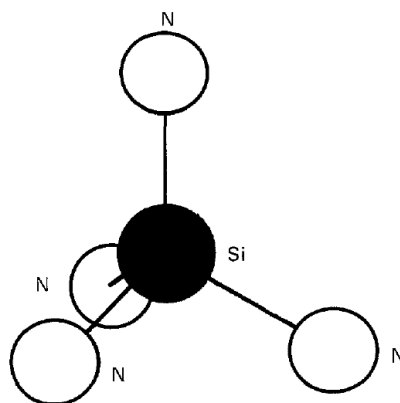


Abbildung 1: Silizium-Stickstoff Tetraedereinheit der α - und β -Siliziumnitrid-Modifikationen.^[2]

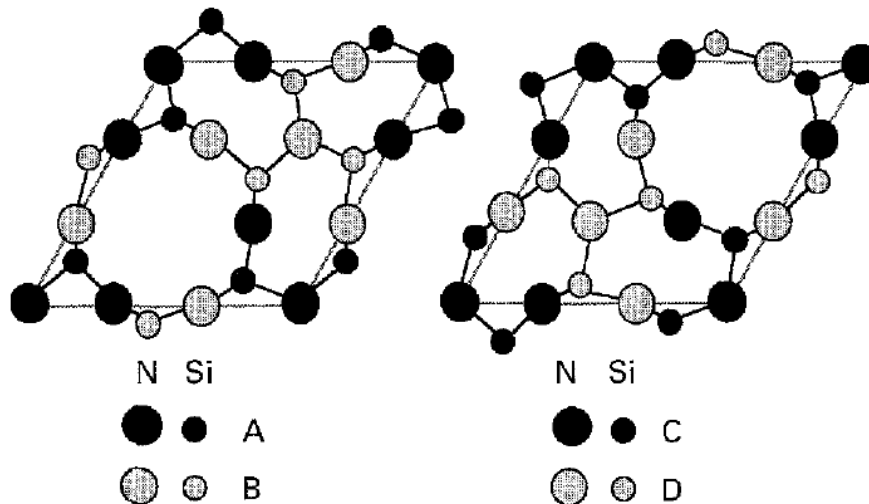


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Si-N-Schichten der α - und β -Siliziumnitrid-Modifikationen. Im β - Si_3N_4 tritt eine ABABAB...-Sequenz und im α - Si_3N_4 eine ABCDABCD...-Sequenz auf.^[2]

Amorphes Si_3N_4 ist wie das kristalline Si_3N_4 aus SiN_4 - und Si_3N -Struktureinheiten aufgebaut, jedoch mit fehlender Fernordnung. Amorphes Si_3N_4 wird aufgrund seiner Eigenschaften als Halbleiter in Solarzellen (optische Bandlücke $\sim 5 \text{ eV}^{[3-4]}$) und der Mikroelektronikindustrie eingesetzt. So dient es in der Halbleiterindustrie aufgrund seiner dielektrischen Eigenschaften als Passivierungs- und mechanische Schutzschicht für integrierte Schaltkreise aber auch als Spitzenmaterial für das Rasterkraftmikroskop (AFM).^[5-6]

In den letzten Jahren fanden dünne Siliziumnitridfilme Anwendung bei röntgenspektroskopischen Untersuchungen von flüssigen Proben. Hierbei werden dünne Si_3N_4 Fenster (100 nm Si_3N_4 auf Silizium) hergestellt, welche für Röntgenstrahlung durchlässig sind. Die dünnen Fenster grenzen an eine Zelle mit der zu untersuchenden Flüssigkeit.^[7] Die Untersuchung des Analyten erfolgt im Ultrahochvakuum.

Siliziumnitrid lässt sich gut funktionalisieren und zeigt ausgezeichnete Biokompatibilität,^[8-10] so dass es sich hervorragend als Biosensormaterial eignet. Darüber hinaus dient es als Barrierschicht bei Biosensormaterialien gegen kleine Ionen und Moleküle (z.B. Na^+ , K^+ , H_2O , O_2 , H_2) und schützt so den Sensor vor dem wässrigen Medium der zu detektierenden Stoffe. Weiterhin wird Siliziumnitrid als optischer Wellenleiter genutzt, da es im Vergleich zu

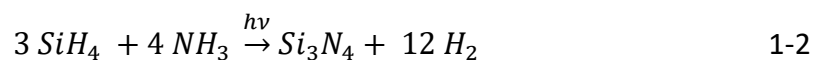
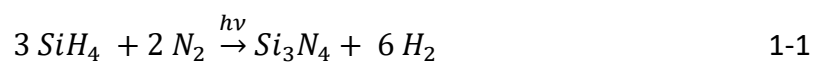
polymeren Wellenleitern leichter herzustellen und robuster ist.^[11] So wird funktionalisiertes Siliziumoxinitrid im Mach-Zehnder-Interferometer eingesetzt, um Streptavidin und biotingelabelte Antikörper zu binden.^[12] Hierbei dient das Mach-Zehnder-Interferometer als hoch sensitiver Transducer zur Detektion von organischen Molekülen im Analyten durch die Änderung der Brechungsindizes des Analyten. Durch den Einsatz von Biosensoren kann auf die aufwendigen klassischen Analyseverfahren verzichtet werden.

1.1.1. Abscheidung von Siliziumnitrid-Filmen durch die chemische Gasphasenabscheidung

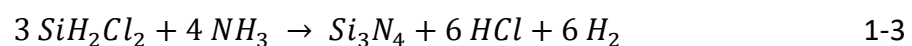
Dünne Si_3N_4 -Filme werden mittels chemischer Gasphasenabscheidung (CVD) auf Siliziumwafern hergestellt.^[1] Bei der CVD werden chemische Verbindungen in die Gasphase gebracht und dann zur Substratoberfläche transportiert. Die Abscheidung des Produktes kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen kann die Reaktion zwischen den Gasen beim Transport zur Substratoberfläche erfolgen. Hierbei zerfallen die Gase in reaktive Zwischenstufen, welche auf die Oberfläche adsorbieren und anschließend zum Produkt und Nebenprodukten reagieren. Erfolgt die Reaktion bereits in der Gasphase, kann es zu einer erhöhten Homogenität des erzeugten Filmes kommen, wenn aktivierte Precursorverbindungen gebildet werden. Hierbei besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sich gebildete Nebenprodukte in die Schicht einlagern und diese so verunreinigen. Zum anderen können die Gase an der Substratoberfläche unzersetzt adsorbieren und anschließend durch Energiezufuhr in das gewünschte Produkt und Nebenprodukte reagieren. Die Nebenprodukte desorbieren jeweils von der Oberfläche und werden dann abtransportiert. Im Allgemeinen steigt die Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen mit zunehmender Temperatur und Druck, da sich hierbei die Zahl der Zusammenstöße ausgehend von den zu reagierenden Molekülen erhöht. Während des Beschichtungsprozesses bilden die adsorbierten Produkte homogene Filme durch Diffusion an die Oberfläche. Um optimale Filmeigenschaften zu erhalten, sollten die Reaktionsgase gut verdampfbar sein, um eine gute Reproduzierbarkeit zu erreichen. Weiterhin sollten sie kostengünstig, nicht giftig und thermisch stabil sein.

Siliziumnitridfilme werden überwiegend durch die LPCVD (Low Pressure Chemical Vapour Deposition) oder PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition) auf Siliziumwafern abgeschieden.

Bei der plasmaunterstützten chemischen Gasphasenabscheidung (PECVD) wird das Reaktionsgemisch in einem Plasma angeregt, wodurch die Abscheidungsreaktion kontrolliert werden kann. Ein Plasma ist ein gasförmiges Gemisch bestehend aus Elektronen, Atomen, Molekülen und Ionen. Wird fester Materie Energie zugeführt, geht diese zunächst in den flüssigen Zustand und danach in den gasförmigen Zustand über. Bei weiterer Energiezufügung wird die Materie in elektrisch geladene und neutrale Teilchen zerlegt.^[13] Diese hochreaktiven Teilchen werden ausgenutzt, um gezielt Schichten aus den Reaktionsgemischen auf Oberflächen abzuscheiden.^[14] Zur Herstellung dünner Siliziumnitridfilme wird das Reaktionsgemisch, meist das Monosilan SiH_4 , mit Hilfe eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes ionisiert. Hierbei kommt es zunächst, durch Stöße hervorgerufen, zur Bildung einiger Atome und Moleküle. Durch die im Anschluss gebildeten Ionen kommt es zu einer Erhöhung der Stöße untereinander, wodurch eine größere Menge von Ionen gebildet wird, was im Folgenden zu einer Stoßkaskade und anschließend der Zündung des Plasmas führt. Glasartige Siliziumnitridfilme werden überwiegend aus der Reaktion vom Monosilan mit molekularem Stickstoff (Gleichung 1-1) bzw. Ammoniak (Gleichung 1-2) abgeschieden.



Bei der LPCVD wird Siliziumnitrid bei Temperaturen von 700-850 °C aus Dichlorsilan und Ammoniak mit guter Reproduzierbarkeit gebildet:



Durch die LPCVD können ebenfalls Schichten von einigen Nanometern bis vielen Mikrometern nach den oben beschriebenen Reaktionswegen erzeugt werden. Der Vorteil der Beschichtung mittels LPCVD besteht in der Abscheidung der Reaktionsgemische bei reduziertem Druck. Dadurch verringert sich die Geschwindigkeit des Transportes der Reaktionsgemische zum Substrat, wodurch homogenere Schichten im Vergleich zur Abscheidung bei Atmosphärendruck erzeugt werden können. In dieser Arbeit bildet LPCVD Siliziumnitrid die Grundlage für Erzeugung einer neuartigen Funktionalisierungsstrategie für die biosensorische Nutzung.

1.2. Biosensoren

Das Prinzip eines Biosensors beruht auf der Immobilisierung einer biologischen Komponente (Sonde) auf einem physikalischen Signalwandler (Transducer) (Abbildung 3). Diese Sonde, zum Beispiel DNA, Enzyme, Antikörper, Proteine oder Mikroorganismen, geht spezifische Interaktionen mit dem Analyten^[15] nach dem sogenannten Schlüssel-Schloss-Prinzip ein.^[16] Hierbei kann es zum Beispiel zu messbaren pH-Wert-Änderungen, Änderung des Brechungsindices oder der Konzentration kommen, was wiederum zu Änderungen von optischen Eigenschaften oder elektrochemischen Größen führt. Der Transducer erfasst diese Änderung mit hoher Nachweisempfindlichkeit, verstärkt dieses Signal und gibt es in Form eines elektrischen Signals wieder.^[17]

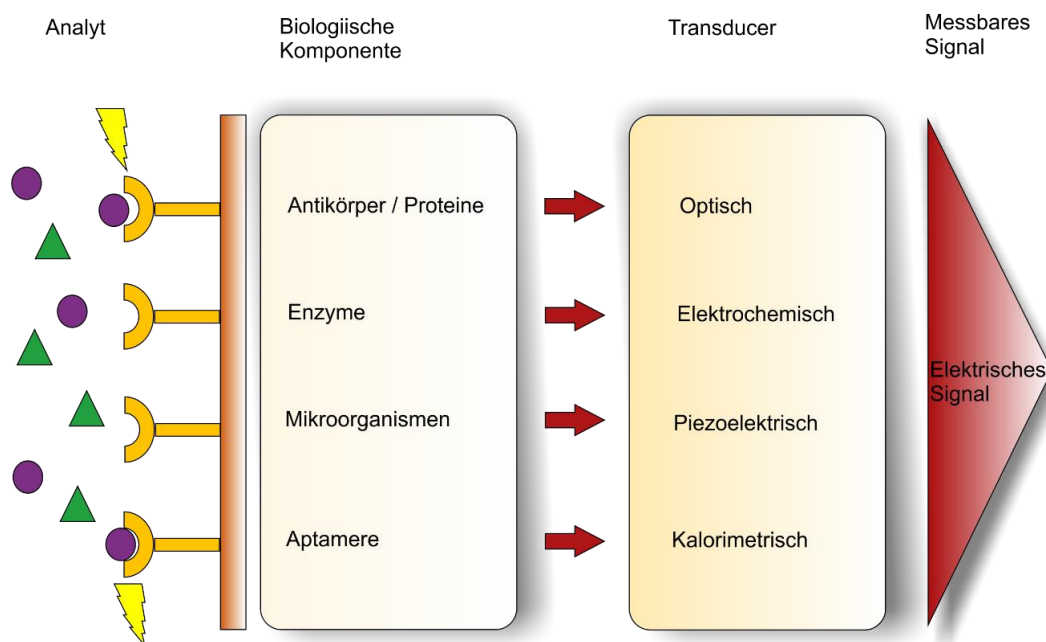
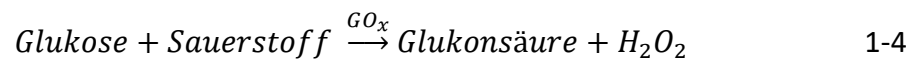


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Biosensors. Das Prinzip beruht auf der Bindung einer biologischen Komponente an einen Transducer, die in spezifische Wechselwirkung mit dem zu bestimmenden Analyten tritt. Das durch die Interaktion generierte Signal wird von dem Transducer in ein messbares und auswertbares Signal umgewandelt.^[18]

Biosensoren finden in der Medizin Anwendung u. a. zur Bestimmung von Stoffwechselprodukten wie Blutzucker, Cholesterin, Harnstoff oder als Drogentest.^[19] Vorteile bei dem Einsatz von Biosensoren sind zum Beispiel die Erfassung auch geringster Mengen und Schwankungen, die einfache Diagnostik,^[20] geringe Kosten, Ortsunabhängigkeit und die

Selbstkontrolle von Patienten. Weiterhin sind Biosensoren in der Umweltanalytik bei der Bestimmung von toxischen Verbindungen im Trinkwasser mit Empfindlichkeiten bis zu 0.1 g/L nützlich.^[21] Gegenüber den klassischen Analysemethoden haben sie in der Bio- und Umwelttechnologie einige Vorteile, da aufgrund ihrer Miniaturisierung und der damit verbundenen Mobilität kosten- und zeitintensive Probenahmen vermieden werden können. Durch die Kombination der biologischen Komponente mit dem Transducer werden die Ergebnisse schnell erhalten. Außerdem können Biosensoren kostengünstig und in hoher Stückzahl produziert werden und nach der Verwendung problemlos entsorgt werden.

Der erste Biosensor wurde 1962 von Clark und Lyons entwickelt.^[22] Dieser Sensor basiert auf der enzymbasierten Glucosebestimmung im Blut. Hierbei wird das Enzym Glucoseoxidase (GO_x), welches katalytisch wirkt, zwischen zwei Membranen vor einer pH- oder Sauerstoffelektrode aufgebracht. Durch die Oxidation von Glucose entsteht Wasserstoffperoxid, was elektrochemisch bestimmt werden kann. Dadurch kann auf die Glucosekonzentration geschlossen werden.^[22]



Die Klassifizierung von Biosensoren erfolgt nach dem Funktionsprinzip. Zu den physikalischen Methoden zählen die kalorimetrischen und piezoelektrischen Detektionsmethoden.^[20, 23] Bei der **Kalorimetrie** kommt es, bedingt durch chemische Reaktionen, zu Wärmefreisetzung. Die Temperaturerhöhung verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration und ist somit ein Maß für die Stoffmenge der Reaktionspartner. Halbleiter-Transistoren erfassen die frei werdende Wärmemenge, eine Substratkonzentration von bis zu 0.1 mmol/L ist detektierbar. Bei der **piezoelektrischen Detektion** kommen mit Enzymen oder Antikörper beschichtete Quarzkristalle, die sogenannten Quarzmikrowaagen, zum Einsatz. Nach der Anregung des Quarzkristalls kommt es zu Resonanzschwingungen, welche nach der Bindung des Rezeptors gedämpft werden. Da die Schwingungsfrequenz eines Quarzes umgekehrt proportional zur Wurzel seiner Masse ist, kann einfach die Masse des Rezeptors bestimmt werden.^[24-26] Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die nur einmalige Verwendung der Sensoren.

Zu den elektrochemischen Methoden zählen die amperometrische und potentiometrische Detektion. Das **amperometrische Prinzip** basiert auf der Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen, die bei der Reaktion mit dem Analyten eine Änderung des Stromflusses hervorrufen. Die daraus abgeleitete Messgröße ist die Stoffmenge. Das **potentiometrische Detektionsprinzip** basiert auf der direkten Immobilisierung der biologischen Komponente auf einem Silizium Halbleiterchip. Hierbei dient der pH-Wert als Messgröße. Der Stromfluss nimmt mit zunehmender H^+ -Konzentration zu, aus der Protonenkonzentration wird ein proportionales Signal erhalten. Eingesetzt werden elektrochemische Sensorsysteme zur Detektion von Glukose^[27] oder zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration.^[28]

Optische Biosensoren sind Gegenstand intensiver Forschung^[9, 29-30] und werden zur Detektion von Toxinen,^[31-32] Drogen^[33-34] und Pathogenen^[35] verwendet. Hierbei erfolgt die Identifizierung des Analyten durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung. Stehen der Transducer und der Analyt in direktem Kontakt, wird die Wechselwirkung zwischen den Makromolekülen mit sehr hoher Empfindlichkeit registriert. Neben ihrer hohen Sensitivität sind optische Biosensoren relativ unempfindlich gegenüber hohen Temperaturen, Reaktionsmedien und elektromagnetischen Wellen.^[29, 33, 35] Ein weiterer großer Vorteil ist die Herstellung aus unterschiedlichen Materialien, wie Silizium, Glas, Polymeren, Metallen oder Siliziumnitrid. Die Detektion von optischen Wellenleitern basiert auf der Aufnahme der Brechungsindizes, optischer Absorption oder Ramanspektroskopie. Hierbei wird häufig ein Lichtwellenleiter mit z.B. Enzymen beschichtet, welcher nach der Bindung des Analyten seine Lumineszenz- oder Absorptionseigenschaften ändert. Trifft hierbei ein Lichtstrahl auf die Grenzfläche eines Systems mit verschiedenen Brechungsindizes ($n_2 < n_1$) wird das Licht reflektiert. Immobilisierte Biomoleküle auf einem Wellenleiter haben einen höheren Brechungsindex verglichen mit Wasser oder Luft. Passiert ein Lichtstrahl die biologische Komponente, verlangsamt sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit des elektromagnetischen Feldes, wodurch ein quantifizierbares Signal erhalten wird, was proportional zur Materialmenge auf der Sensoroberfläche ist. Ein bekanntes Beispiel optischer Sensoren sind Glasfaserkabel zur Übertragung von Licht über weite Strecken und das sehr häufig verwendete Verfahren der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). Bei dieser Methode wird der einfallende Lichtstrahl durch ein Prisma unter Totalreflexion auf einen aufgedampften Metallfilm geleitet (Abbildung 4). Dabei kommt es zur Bildung von energiereichen Wellen, den

sogenannten Plasmonen, an der Metall/Proben Grenzfläche. Im Falle der Resonanz bei einem Resonanzwinkel θ stimmen die Energie der einfallenden Photonen mit der Energie der Plasmonen überein, was zur Übertragung der Photonenenergie auf die Plasmonen führt. Dadurch kommt es zu einem scharfen Abfall der Intensität des reflektierten Lichtes. Dieser Intensitätsunterschied dient als sensorische Messgröße.^[36]

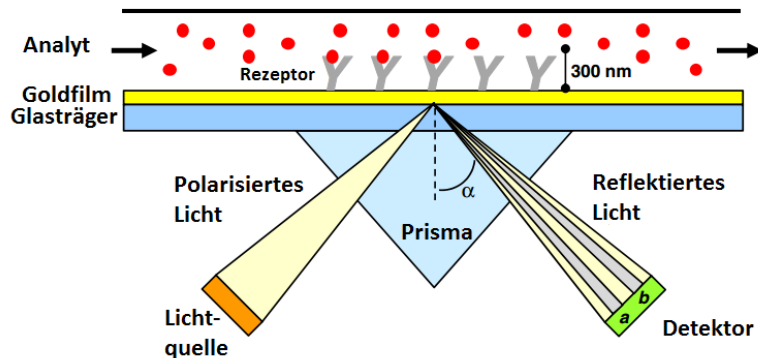


Abbildung 4: Schematische Darstellung des SPR-Experimentes.^[37]

In den letzten Jahrzehnten haben Biochips verstärkt an Bedeutung gewonnen. Hierbei handelt es sich um eine Methode für den biologischen und biochemischen Nachweis von Messung auf engstem Raum (Abbildung 5). Die meisten Biochips sind eine Kombination aus Microarrays und Halbleiter-basierten Sensoren. Mithilfe von Microarrays ist es möglich, mehrere Probensysteme auf einer kleinen Fläche parallel zu analysieren. Ein Microarray besteht aus tausenden geordneten Spots, die in Reihen und Spalten angeordnet sind. So können beispielsweise mit DNA-Microarrays tausende Gene parallel untersucht werden. Jeder Spot enthält mehrere identische DNA-Stränge. Dadurch ist jeder Spot einzigartig und kann ein Gen binden. Die Analyse erfolgt anschließend durch die Registrierung der Sequenz und des Orts jedes einzelnen Spots von einer Computer-Datenbank.^[38]

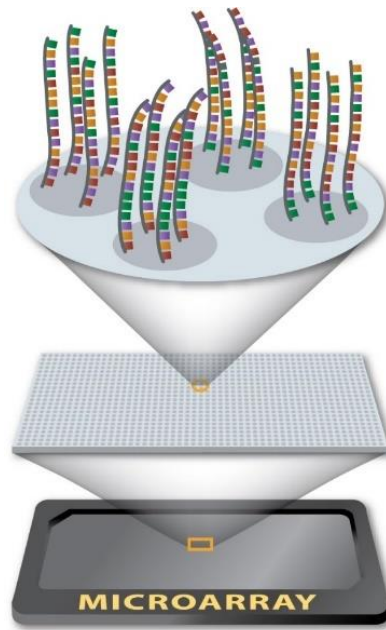


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Microarrays.^[38] Durch die Auftragung von Spots (definierten Punkten) nebeneinander, ist es möglich Proben parallel zu untersuchen.

Die Herstellung dieser sensitiven und selektiven biosensorischen Detektionssysteme setzt systematische Untersuchungen zur Immobilisierung der biologischen Komponente („Probe“) voraus. Die Mechanismen zur Modifizierung der Oberflächen werden im nächsten Kapitel näher betrachtet.

1.3. Oberflächenfunktionalisierung für die Herstellung neuer Biosensoren

In Kapitel 1.1 wurde bereits beschrieben, dass Biosensoren auf der Immobilisierung von biologischen Komponente an einem festen Trägermaterial basieren. Um eine hohe Selektivität und die daraus resultierende Sensitivität der Biosensoren zu gewährleisten, ist es wichtig, eine geeignete Funktionalisierungsstrategie zu entwickeln, verbunden mit der ausführlichen Analyse des immobilisierten Systems. So ist die kontrollierte Immobilisierung von Biomolekülen Bestandteil intensiver Forschung.^[39-42]

Moleküle können durch verschiedene Mechanismen an die Oberfläche gebunden werden, wodurch neue Funktionalitäten eingeführt werden. Eine der einfachsten Methoden ist die Physisorption. Hierbei wird das Biomolekül nur durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, an die Oberfläche mit einer Adsorptionsenthalpie von unter 50 kJ/mol gebunden. Hierbei handelt es sich um einen schnellen Vorgang, da keine Aktivierungsenergie überwunden werden muss. Obwohl mit dieser Methode eine große Zahl von Molekülen immobilisiert werden können,^[43-44] werden in der Literatur auch Nachteile beschrieben. So beschrieben Yemti et al. die Desorption von bereits adsorbierter Rezeptoren.^[45] Weiterhin kann es zu Verschiebungen der adsorbierten Rezeptoren kommen, wodurch es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann.^[9] Daher basieren die meisten Funktionalisierungsmethoden nicht auf der Physisorption, sondern auf der Chemisorption. Hierbei werden Moleküle kovalent an die Oberfläche gebunden. Aufgrund der dabei zu überwindenden Aktivierungsbarriere läuft diese Reaktion langsamer im Vergleich zur Physisorption ab. Bei erhöhten Temperaturen kann das Einstellen des Gleichgewichtes jedoch begünstigt werden. Eine der bekanntesten Strategien dünne Filme auf Oberflächen zu erzeugen, ist die Bildung von selbst-organisierenden Monoschichten (SAM),^[46-48] wobei eine kovalente, sehr stabile Bindung zwischen den organischen Komponenten und dem Substrat ausgebildet wird.^[49] SAM bilden sich spontan beim Eintauchen in oberflächenaktive Lösungen. Hierzu gehören die Bindung von Alkanthiolen auf Goldoberflächen und die Bindung von Silanen auf Siliziumoberflächen (Abbildung 6).

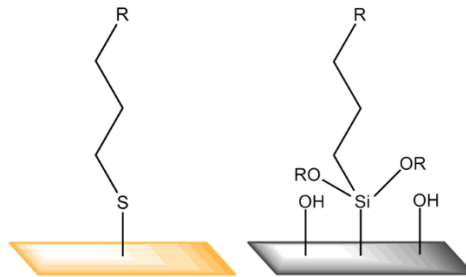


Abbildung 6: SAM-Monolayer auf Gold-Oberflächen bzw. Silizium-Oberflächen.

Die Einführung von neuen Funktionalitäten durch die Silanisierung der Oberfläche hat eine große Bedeutung in der Biosensorik. Die Hydroxylgruppen können hierbei durch die Reinigung der Oberfläche mit Piranha-Lösung oder UV/Ozon aufgebaut werden kann. Die so erzeugten reaktiven Hydroxylgruppen reagieren anschließend in einer Kondensationsreaktion mit dem Silan (Abbildung 7). Häufig beschrieben wird die Umsetzung von Glasoberflächen oder Siliziumoberflächen mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) oder 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).^[50]

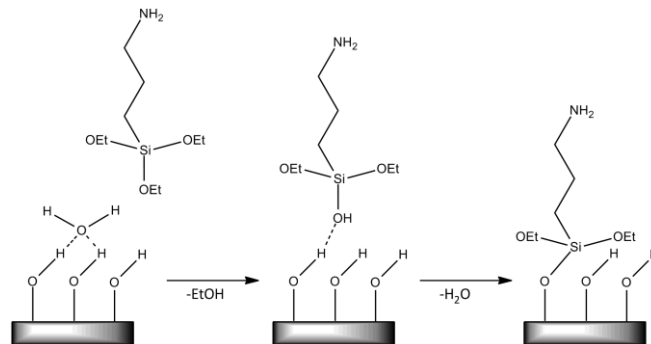


Abbildung 7: Silanisierung einer Silizium Oberfläche mit APTES.

Unterschiede bei der Verwendung von APTES und APTMS liegen in der Reaktivität der Verbindungen. Aufgrund der großen Reaktivität von APTMS werden die Reaktionen in reinen organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Dadurch lassen sich dünnere und kontrollierte Schichten mit Aminopropylgruppen erzeugen. Bei der Bildung von Monoschichten mit APTES muss die Reaktion mit Wasser katalysiert werden.^[51] Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass es zu Reaktionen zwischen den Aminogruppen des Silans und den Hydroxylgruppen der Oberfläche kommen kann, wobei keine geordnete Schicht erhalten

wird.^[52-53] Die so erzeugten dichten Amino-endständigen Filme bilden die Grundlage vieler Reaktionen und eröffnen somit die Möglichkeit vielseitiger Anwendungen, wie die direkte Bindung von Antikörpern oder unter Ausbildung stabiler Amidbindung die Bindung von N-Hydroxy-succinimid-Biotin (NHS-Biotin).^[54] Neben der Erzeugung Amino-funktionalisierter Oberflächen können Epoxygruppen, Carboxylgruppen, Isocyanate oder Thiolgruppen eingeführt werden. Doch die häufig verwendeten Silanisierungsreaktionen weisen einige Nachteile auf, die häufig vernachlässigt werden. Beispielsweise ist die Silanchemie stark temperatur- und pH-Wert abhängig. Bereits bei kleinen Veränderungen des Wassergehaltes kommt es zu einer dramatischen Veränderung der Filmdicke.^[55-57] Weiterhin können durch mögliche Nebenreaktionen Quervernetzungen der Silane auftreten.^[58] Weitere Parameter, die die Reproduzierbarkeit der Silanfilme beeinflussen, sind Lösungsmittelabhängigkeiten, Reaktionszeiten, Reaktionstemperaturen und das Alter der eingesetzten Silane.^[52] Aufgrund dieser Probleme wird intensiv nach alternativen Funktionalisierungsmethoden gesucht.

1.4. Zielsetzung

Aufgrund der in Kapitel 1.1 dargestellten vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten von Siliziumnitrid hat in jüngerer Zeit neben der Nutzung als Halbleitermaterial das Interesse an diesem Material als Träger für die Transmissionselektronenmikroskopie^[59-60] und als dünne Membran für röntgenspektroskopische Untersuchungen von Flüssigkeiten bzw. für *in situ*-Experimente von zum Beispiel Katalysatoren im Ultrahochvakuum (UHV) zugenommen.^[61-62] Der Siliziumnitridfilm stellt hierbei ein für Röntgenstrahlung transparentes Fenster als Barriere vom UHV zur Messzelle dar, in welcher sich die flüssige Probe zur Untersuchung befindet. Um Si_3N_4 für die biosensorische Anwendung nutzen zu können, müssen biomolekulare Sonden an die Oberfläche gebunden werden, um anschließend den zu untersuchenden Analyten selektiv zu binden und dadurch ein messbares Signal zu erzeugen. Konventionelle Funktionalisierungsstrategien nutzen Si-OH-Gruppen der nativen oder künstlichen Siliziumoxinitridschicht, um Sonden durch Silanisierungsreaktionen an die Oberfläche zu binden. Trotz der großen Präsenz der Silanchemie in aktuellen Publikationen und ihrer leichten Durchführung gibt es zahlreiche Nachteile, wie z.B. hoher Zeitaufwand, häufig saure oder basische Reaktionsbedingungen und die limitierte Reproduzierbarkeit der Immobilisierung, die jedoch meist vernachlässigt werden. Die direkte Funktionalisierung unter Ausnutzung der Si-N-Bindungen wurde bislang nur selten beschrieben.^[29, 55, 63] Die Modifizierung der Si-NH_x-Bindungen (Oberflächenamine) bietet zahlreiche Vorteile. Stickstoff ist in großen Mengen bereits im Substrat enthalten, Amine können mit einfachen Methoden erzeugt und anschließend für weitere Reaktionen verwendet werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer neuen Synthesestrategie für Siliziumnitrid unter Ausnutzung reaktiver Azidgruppen für die einfache, schnelle Herstellung neuartiger Biosensoren. Hierbei wird aufgrund der Reproduzierbarkeitsprobleme auf die üblicherweise eingesetzte Silanisierung der Oberfläche verzichtet. Nach der Umwandlung von Oberflächenaminen in reaktive Azide sollen zur Methodenentwicklung zunächst einfache Modellalkine, die fluorhaltige Markeratome tragen und als Sonde für die quantitative XPS dienen, durch die Click-Chemie direkt an die Si_3N_4 -Oberfläche gebunden werden. Nach der systematischen Untersuchung der einzelnen Reaktionsschritte sowie der Stabilität der erzeugten Monolagen wird Biotin als erstes zu testendes Biomolekül auf der Si_3N_4 -Oberfläche verankert und die Interaktion mit Streptavidin untersucht.

Eine weitere Möglichkeit Biomoleküle direkt an die Oberfläche zu binden, ist die Ausnutzung der Si-NH_x-Bindungen. In weiteren Experimenten dienen Oberflächenamine als Grundlage für die Verankerung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure, gefolgt von der Komplexierung mit Kupfer(II)phenanthrolin mit einem OCF₃-Rest, der als XPS-Sonde dient.

Die einzelnen Reaktionsschritte werden systematisch mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), Flugzeitsekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS) und Röntgen-Nahkanten-Absorptionsspektroskopie (NEXAFS) untersucht. Letztendlich wird die Nukleaseaktivität des immobilisierten Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexes mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2. Oberflächenanalytische Verfahren: Methodische Grundlagen

2.1. Synchrotronstrahlung für die spektroskopische Anwendung

Im Allgemeinen wird elektromagnetische Strahlung emittiert, wenn auf bewegte geladene Teilchen eine elektrische oder magnetische Kraft wirkt, und es dadurch zu einer Änderung der Teilchenenergie oder der Bewegungsrichtung kommt.^[64]

Bei der Erzeugung von Synchrotronstrahlung werden Elektronen durch starke Ablenkmagnete (Undulatoren und Wiggler) auf eine Kreisbahn gezwungen und auf relativistische Geschwindigkeiten ($v = 299\,792.44\text{ m/s}$) beschleunigt.^[65-66] Die dabei emittierte elektromagnetische Strahlung wird Synchrotronstrahlung genannt. Die Erzeugung von Synchrotronstrahlung kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen können Teilchen ständig produziert und einmalig durch ein Magnetfeld geleitet werden und anschließend vernichtet werden. Hierbei handelt es sich um das Prinzip der durch Linearbeschleuniger erzeugten Synchrotronstrahlung.^[66] Eine häufige Anwendung findet auch das Prinzip der Synchrotronerzeugung in Speicherringen, wie auch im BESSY II (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m. b. H). Der Aufbau vom BESSY II ist in Abbildung 8 dargestellt. Zunächst wird ein Elektronenstrahl mit 70 kV von einer Glühkathode erzeugt.^[65] In einem Microtron- und Synchrotronring wird der Elektronenstrahl auf bis zu 1.7 GeV beschleunigt. Anschließend werden die beschleunigten Elektronen in den Speicherring eingeleitet, wo sie eine Lebensdauer von 8-10 Stunden haben. Der Beschleunigungsprozess dauert 50 ms und die Wiederholungsfrequenz beträgt 10 Hz.^[65] Der Gesamtstrom von 259 mA im Speicherring wird durch die wiederholte Injektion von Elektronen erreicht, die in mehreren Schritten beschleunigt werden. Durch Magnete werden die Elektronen auf eine kreisförmige Umlaufbahn gezwungen. Quadrupole und Sextupole sind dafür verantwortlich, dass die Elektronen nicht auseinanderdriften und der Strahl über einen längeren Zeitraum gespeichert werden kann. Damit die beschleunigten Elektronen nicht an Luftmolekülen gestreut werden, wird im Ultrahochvakuum (10^{-10} mbar) gearbeitet.^[65]

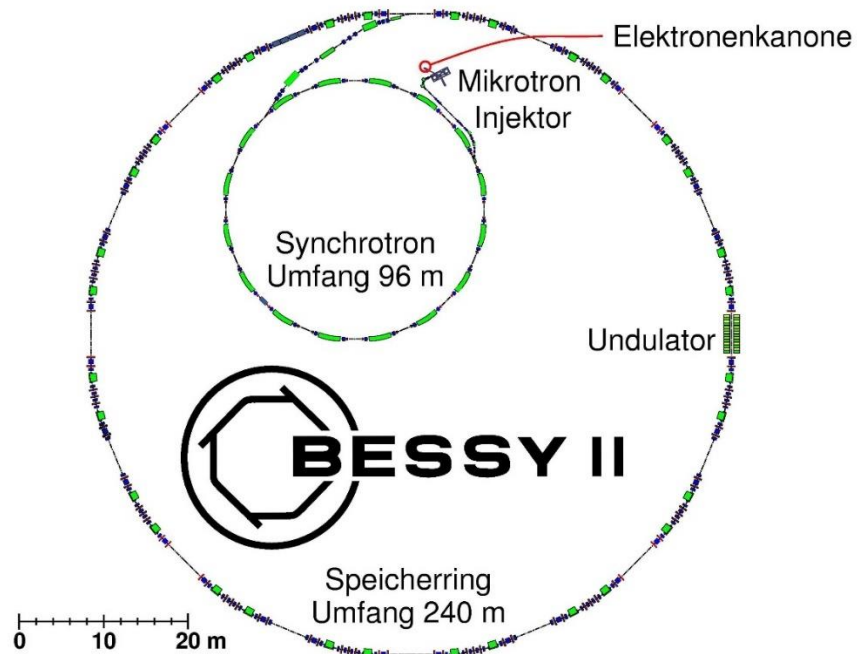


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Speicherringes BESSY II.^[65]

Durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung kann ein breites Frequenzspektrum von infraroter Strahlung bis zur Röntgenstrahlung genutzt werden. Die Synchrotronstrahlung ist in der Speicherringebene linear polarisiert und ober- und unterhalb der Ringebene elliptisch polarisiert. Aufgrund ihrer hohen Intensität findet Synchrotronstrahlung besonders im Frequenzbereich der Röntgenstrahlung große Anwendung, da die nutzbare Brillanz tausendfach höher ist als die der im Labor genutzten Röntgenröhren. Mittels eines Monochromators wird die Synchrotronstrahlung auf den benötigten spektralen Bereich eingestellt und durch Beamlines zum Experiment geführt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden an der HE-SGM (high-energy spherical-grating monochromator)-Dipol-Beamline an der Synchrotronstrahlungsquelle BESSY II durchgeführt, die durch das Nutzen von weicher Röntgenstrahlung (100-850 eV) hohe Oberflächenempfindlichkeiten in der Photoelektronen- und Röntgenabsorptionsspektroskopie ermöglicht. Die Oberflächenempfindlichkeit (ca. 1 nm) ist im Vergleich zur Labor-XPS mit einer Aluminium-K α -Röntgenquelle (ca. 10 nm) deutlich besser.^[67]

2.2. Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) ist eine häufig angewendete oberflächenanalytische Methode, mit der alle Elemente (außer H und He) qualitativ und quantitativ bestimmt werden können.^[68] Daher ist die Methode auch unter ESCA (engl. Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) bekannt. Die Informationen werden typischerweise mit Aluminium-K α - oder Magnesium-K α -Anregung aus den ersten 10 nm des Materials gewonnen. Sie geben Aufschluss über die chemische Umgebung, die Bindung und die Oxidationsstufen.

Entsprechend der gewählten Anregungsquelle wird zwischen der Ultravioletphotoelektronenspektroskopie (UPS), bei der mit UV-Strahlung ($\lambda = 250\text{-}2\text{ nm}$ bzw. $5\text{-}50\text{ eV}$) angeregt wird und der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) unterschieden. Bei der XPS werden die Festkörper mit Röntgenstrahlung ($\lambda = \sim 10\text{-}0.01\text{ nm}$ bzw. $\sim 100\text{-}10^6\text{ eV}$) angeregt. Hierbei werden kernnahe Elektronen herausgeschlagen, um Informationen über die chemische Zusammensetzung der Probe, Oxidationszustände und die Art der Bindungen zu erhalten.^[68] Bei der Verwendung von UV-Strahlung werden dagegen Elektronen aus höheren Energieniveaus angeregt, die Aussagen über die Art der chemischen Bindung, deren Elektronenstruktur und die Molekülorbitale des untersuchten Valenzbandes ermöglichen.

Die Untersuchung der Proben mit der Röntgenphotoelektronenspektroskopie erfolgt im Ultrahochvakuum (UHV) bei Drücken von $10^{-8}\text{-}10^{-10}$ mbar. Im Labor werden die Proben meistens mit monochromatischer Al-K α -Strahlung (1486.7 eV) oder Mg-K α -Strahlung (1253.6 eV) angeregt.^[69] Es kann jedoch auch mit durchstimmbarer Photonenenergie durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung angeregt werden. Der schematische Aufbau eines Röntgenphotoelektronenspektrometers ist in Abbildung 9 dargestellt.

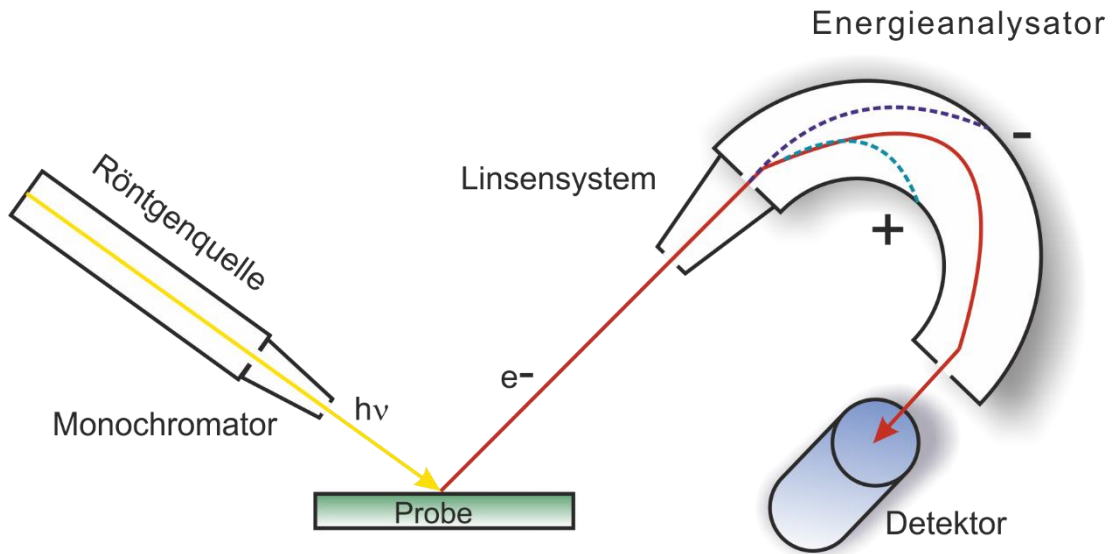


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Röntgenphotoelektronenspektrometers. Die Probe wird mit Röntgenstrahlung angeregt, Photoelektronen werden emittiert, gelangen durch ein Linsensystem, bestehend aus elektrostatischen und magnetischen Linsen, in den Energieanalysator. Die nach ihrer kinetischen Energie sortierten Elektronen gelangen zum Detektor und werden dann durch eine Software in Spektren umgewandelt.

Die Anregung der Elektronen erfolgt durch eine definierte Energie $h\nu$. Die emittierten Elektronen gelangen durch eine Eintrittsöffnung in ein Linsensystem bestehend aus magnetischen und elektrostatischen Linsen, durch die die Photoelektronen abgebremst werden. Anschließend erreichen die Elektronen den Energieanalysator. Hierbei handelt es sich um einen Halbkugelanalysator, der aus zwei konzentrisch angebrachten Hemisphären besteht. An den Hemisphären wird ein Potential angelegt, so dass nur Elektronen eines bestimmten engen Energiebereiches (E_{kin}), je nach angelegter Potentialdifferenz, den Analysator passieren können. Die energetische Mitte des Fensters wird als Passenergie bezeichnet und kann variiert werden. Häufig werden die Messungen mit konstanten Passenergien (CAE, Constant Analyzer Energy) aufgenommen. Hierbei treffen Elektronen, die eine kinetische Energie größer als das vorgewählte Energiefenster besitzen, auf die äußere Hemisphäre. Elektronen mit niedrigerer Energie treffen auf die positiv geladene, innere Hemisphäre auf und gelangen nicht zum Detektor. Während einer XPS-Messung wird das an den Hemisphären angelegte Potential durchgestimmt und damit die energetische Lage des Energiebereiches variiert. So wird nacheinander jede Energie des zu messenden Spektrums angesteuert. Anschließend treffen die nach ihrer kinetischen Energie sortierten Elektronen auf den Detektor. Es kommen unterschiedliche Detektoren zum Einsatz. In älteren Geräten

werden Channeltrons bzw. Sekundärelektronenvervielfacher verwendet. In moderneren Geräten kommen Delay Line Detektoren (DLD) zum Einsatz, wodurch 2D aufgelöste Informationen der Probe erhalten werden können (Imaging mode).

Die Grundlage der Photoelektronenspektroskopie bildet der photoelektrische Effekt (Abbildung 10). Dieser wurde 1887 erstmalig von H. Hertz beschrieben.^[70] Die theoretische Beschreibung lieferte A. Einstein 1905.^[71] Nach dieser Erklärung können kernnahe Elektronen mit einer für das Atom und das emittierende Energieniveau charakteristischen kinetischen Energie (KE) aus einem Atom herausgeschlagen werden, wenn die Energie der eingestrahnten Photonen $h\nu$ ausreichend groß ist. Die kinetische Energie der emittierten Elektronen (KE) ist durch die Differenz der eingestrahnten Energie ($h\nu$) und der Bindungsenergie der Elektronen (BE) gegeben.^[68, 72]

$$KE = h\nu - BE$$

2-1

Die Bindungsenergie der Elektronen ist elementspezifisch und entspricht der Energie, mit der ein Elektron im Atom gebunden ist, wodurch der direkte Elementnachweis eindeutig geführt werden kann. In Abhängigkeit der chemischen Umgebung kann es zu einer Verschiebung der Bindungsenergie der Elektronen kommen. Hierbei wird die chemische Verschiebung („chemical shift“) beispielsweise durch den Bindungszustand und die Wertigkeit und Art der umgebenden Liganden beeinflusst. Die Bindungsenergie kann dabei je nach der Größe der effektiven Kernladung bis zu ca. 10 eV variieren.

Durch das Herauslösen eines Elektrons aus dem Atom bleiben energetisch ungünstige Lochzustände, der Photoionisationszustand, zurück, welche durch intraatomare Relaxationsprozesse mit Elektronen aus höheren Energieniveaus aufgefüllt werden.^[68] Die Energie kann radiativ in Form von Photonen mit einer definierten Energie, der Differenz zwischen der aufgefüllten und aufzufüllenden Schale, abgegeben werden. Hierbei handelt es sich um Fluoreszenzphotonen, die in der Röntgen-Emissionsspektroskopie untersucht werden. Ein weiterer nicht radiativer Relaxationsprozess ist die Emission eines weiteren Elektrons aus dem Atom aufgrund der frei werdenden Energie beim Auffüllen des

Lochzustand (Abbildung 10). Dieser Effekt wurde in den 1920er Jahren von L. Meitner^[73] und P. Auger^[74] beschrieben.

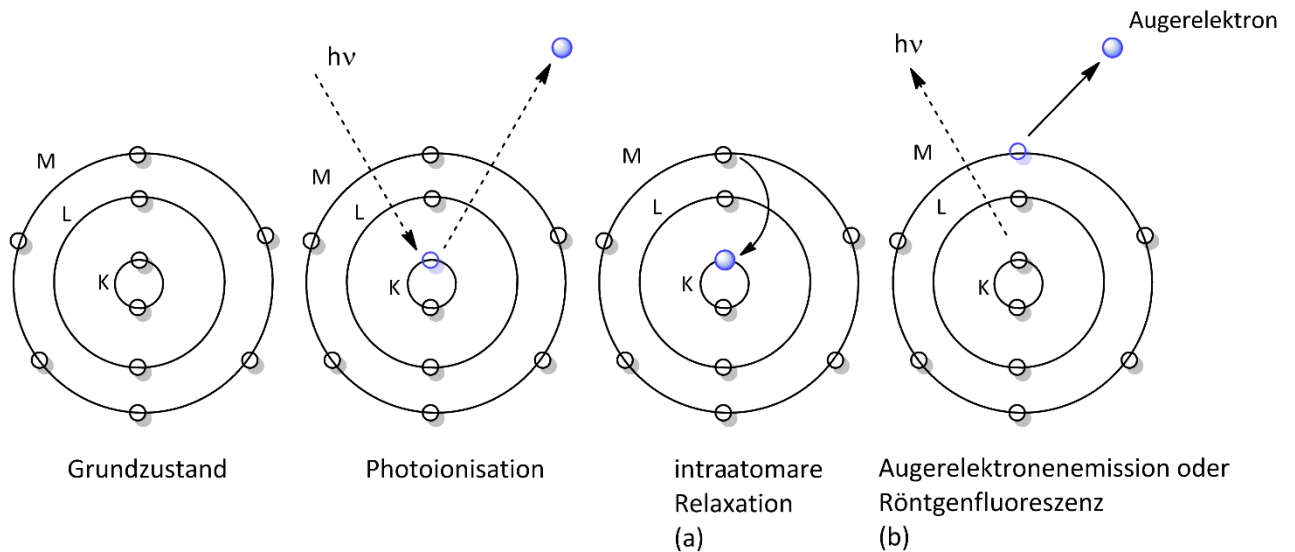


Abbildung 10: Schematische Darstellung des photoelektrischen Prozesses. Photoelektronen werden durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung freigesetzt. Es schließen sich sekundäre Emissionsprozesse, d.h. die Emission von Augerelektronen und Fluoreszenz (a) und (b) an.

Steht die zu untersuchende Probe in leitendem Kontakt mit dem Spektrometer, muss die Austrittsarbeit ϕ des Spektrometers berücksichtigt werden. Zum Herausschlagen eines Elektrons muss die Probe mit einer konstanten Energie $h\nu > \phi_{Sp}$ bestrahlt werden. Dessen kinetische Energie ist die Differenz der eingestrahlenen Energie $h\nu$, der Bindungsenergie der Elektronen BE und der Austrittsarbeit ϕ_{Sp} :

$$KE = h\nu - BE - \phi_{Sp} \quad 2-2$$

Da die kinetische Energie während der Messung bestimmt wird und die Anregungsenergie und die Austrittsarbeit des Spektrometers bekannt sind, kann die Bindungsenergie nach Umstellen der Gleichung 2-2 ermittelt werden.

$$BE = h\nu - KE - \phi_{sp} \quad 2-3$$

Bei der Messung von nichtleitenden Proben ist eine Probenaufladung, resultierend aus dem andauernden Elektronenverlust in der analysierten Oberfläche, zu beachten. Dabei müssen die emittierten Elektronen zusätzlich das Aufladungspotential überwinden, was zu geringeren kinetischen Energien und scheinbar höheren Bindungsenergien der Photoelektronenpeaks führt. Der Aufladung von nichtleitenden Proben kann durch den Beschuss der Probe mit niederenergetischen Elektronen entgegengewirkt werden. Außerdem werden die Spektren z.B. auf die aliphatische C 1s-Komponente mit einer Bindungsenergie von 285.0 eV kalibriert und korrigiert („charge compensation calibration“), um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.^[75]

Die Photoelektronenspektroskopie beruht darauf, dass kinetische Energien von Elektronen, die durch die Absorption von Photonen aus den verschiedenen Orbitalen herausgeschlagen wurden, beobachtet werden.^[68] Ist die Energie der Strahlung bekannt, können die Ionisierungsenergien der Elektronen in den verschiedenen Orbitalen aus der kinetischen Energie der Elektronen bestimmt werden. Bei der Interpretation von Photoelektronenspektren muss beachtet werden, dass sich die Bindungsenergie (BE) aus der Differenz der Zustandsenergien nach der Photoionisation E_f („final state“, Endzustand) und vor der Ionisation E_i („initial state“, Anfangszustand) ergibt:

$$BE = E_f - E_i \quad 2-4$$

Sowohl die Energie des Anfangszustandes als auch die Energie des Endzustandes können, in Abhängigkeit der Atomsorte und –verband und der Probenart, zur Änderung der Peakposition und im XP-Spektrum führen. Die Bindungsenergie entspricht nach Koopmans Theorem (Gleichung 2-5) der negativen Energie ϵ_k des Orbitals aus dem das Elektron herausgeschlagen wurde.^[68] Dies ist jedoch nur unter der Annahme gültig, dass sich die verbleibenden Elektronen in der Hülle nach der Erzeugung des Lochzustandes nicht neu verteilen:

$$BE = -\varepsilon_k \quad 2-5$$

In der Realität sortieren sich während der Emission des Photoelektrons die verbleibenden Elektronen im Emitteratom durch intra- und extraatomare Relaxationsprozesse jedoch neu an, um die Energie des ionisierten Atoms zu minimieren (Endzustandseffekt). Durch die Neuordnung der Elektronen während der Emission des Photoelektrons werden niedrigere Bindungsenergien beobachtet. Bei schlechter Abschirmung des Rumpfloches vergrößern sich die Bindungsenergien, da in diesem Fall der Betrag der Relaxationsenergie E_r kleiner ist.

$$BE = -\varepsilon_k - E_r \quad 2-6$$

Es wird zwischen intra- und extraatomaren Relaxationsprozessen unterschieden. Durch die Erzeugung eines Lochzustandes ist die effektive Kernladung größer, was zu Kontraktionen der verbleibenden Elektronenhülle hin zum Atomkern führt. Weiterhin ist der Beitrag der Elektronen in äußeren Schalen eines Emitteratoms zur intramolekularen Relaxation größer als der Beitrag der Elektronen in inneren Schalen. Die extraatomare Abschirmung erfolgt durch die Verschiebung negativer Ladung von Nachbaratomen, was jedoch stark von der Polarisierbarkeit der chemischen Umgebung abhängig ist. In elektrisch leitfähigen Proben können Elektronen benachbarter Atome wesentlich leichter zur Abschirmung des Lochzustands beitragen als Elektronen im ionischen Atomverband. Weitere zu den Endzustandseffekten gehörende Prozesse sind Multiplettaufspaltungen und Shake-up Satelliten. Die Anfangszustände beschreiben den Grundzustand des Atoms vor der Anregung. Hierzu gehört die Veränderung der Energie des Atoms im Anfangszustand durch zum Beispiel die Bildung von chemischen Bindungen mit anderen Atomen. Die dabei auftretende Differenz der gemessenen Bindungsenergiewerte eines Elementes in verschiedenen chemischen Bindungszuständen wird als chemische Verschiebung bezeichnet.^[68]

Die hohe Oberflächenempfindlichkeit der XPS ergibt sich aus der Wechselwirkung der Photoelektronen mit der Materie, die auf dem Weg zum Analysator passiert wird. Hierbei gilt,

je länger der Weg ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen inelastisch gestreut werden und ihre kinetische Energie (KE) abgeben. Dies kann dazu führen, dass die Elektronen die Probe gar nicht oder mit stark verringerter Energie verlassen und nur im Spektrenuntergrund auftreten. Um das Ausmaß der inelastischen Streuung zu erfassen, wird die mittlere freie Weglänge λ für Elektronen bestimmt, welche die mittlere Distanz der Elektronen einer Energie (KE) zwischen zwei aufeinander folgenden inelastischen Stößen beschreibt. Die mittlere freie Weglänge ist von der kinetischen Energie der Photoelektronen und der Beschaffenheit des analysierten Materials (Dichte, elementare Zusammensetzung, Struktur), welches sie durchqueren, abhängig. Die Informationstiefe ist mit einer Strecke von 3λ definiert, was der Tiefe entspricht, aus der 95 % der emittierten Photoelektronen einer bestimmten kinetischen Energie stammen. Durch Verändern des Emissionswinkels θ kann aufgrund der veränderten Austrittstiefe die Oberflächensensitivität erhöht werden (Abbildung 11).

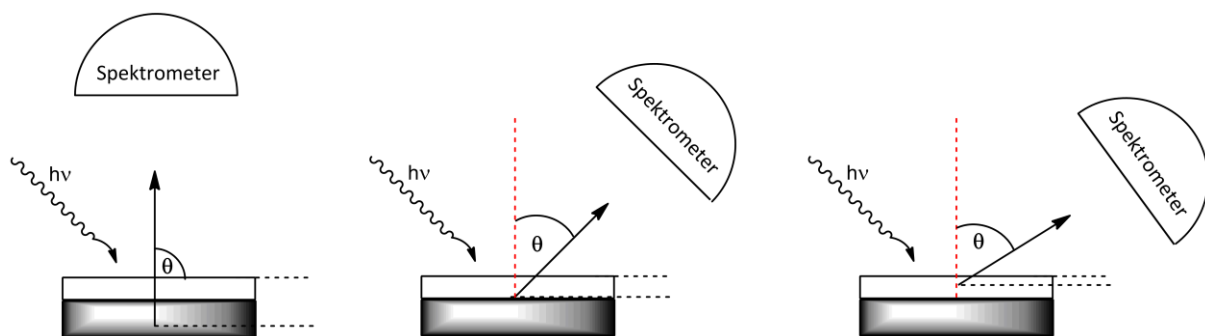


Abbildung 11: Erhöhung der Oberflächensensitivität von XPS durch die Veränderung des Winkels zur Oberflächennormalen. Durch Verstellen des Emissionswinkels θ ändert sich die Informationstiefe aus der die detektierten Elektronen, die die Oberfläche verlassen können, stammen. Bei größer werdendem Emissionswinkel θ erhöht sich die Oberflächensensitivität, da die Elektronen aus oberflächennäheren Schichten (durch gestrichelte Linien charakterisiert) stammen.

Aus den Übersichtsspektren kann die Elementzusammensetzung einer Probe ermittelt werden (Abbildung 12). Aus der Reihenfolge der Photoemissionslinien kann der Schlaufenaufbau der Atome beschrieben werden. Da der Aufbau der Elektronenhülle für jedes Element charakteristisch ist, können die Signallagen chemischen Elementen zugeordnet werden. Der spektrale Untergrund eines XP-Spektrums hat eine stufenförmige Struktur. Die Intensität des Untergrundes nimmt nach einem Signal zu höheren Bindungsenergien hin abrupft zu und im Verlauf des Spektrums wieder langsam ab. Grund hierfür ist die inelastische

Streuung der Elektronen, die aus der Photo- bzw. Auger-Emission stammen. Ein Teil der Elektronen aus diskreten Niveaus wird auf dem Weg durch die feste Probe abgebremst und erreicht den Detektor mit geringerer kinetischer Energie.

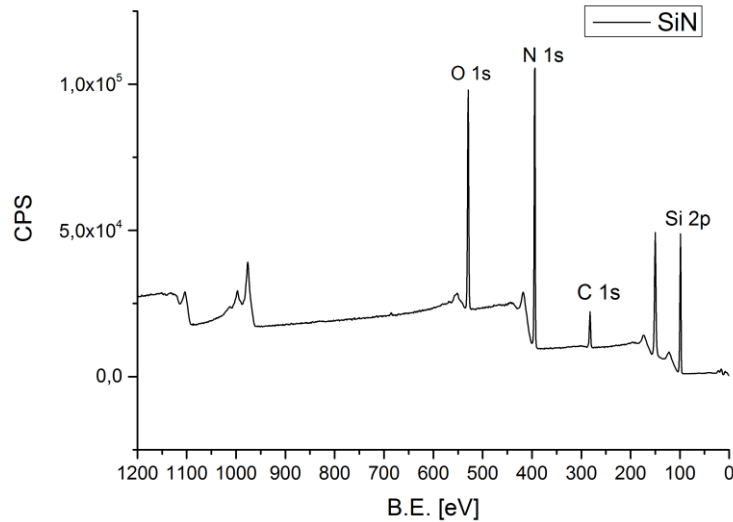


Abbildung 12: Übersichtsspektrum einer Siliziumnitrid-Oberfläche (80 nm Si₃N₄ auf Silizium).

Aus den erhaltenen Photoelektronenpeaks können Informationen über die Elementzusammensetzung der Probe in Atomprozent (at.%) oder die Elementatomzahlverhältnisse gewonnen werden. Hierbei entspricht die Intensität der Fläche unterhalb der Emissionspeaks:

$$I_{ij} = K \cdot T(KE) \cdot L_{ij}(\gamma) \cdot \sigma_{ij} \int_0^{\infty} \int n_i(z) \cdot \exp\left(\frac{-z}{\lambda(KE) \cos \theta}\right) dz \quad 2-7$$

I_{ij} = Peakfläche j des Elementes i

K = Geräteparameter, der den Photonenfluss, die bestrahlte Fläche und den Akzeptorwinkel des Analysators enthält

$T(KE)$ = Transmissionsfunktion des Analysators

$L_{ij}(\gamma)$ = Winkelasymmetriefaktor für das Orbital j des Elementes i

σ_{ij} = Wechselwirkungsquerschnitt der Photoionisation für das Rumpforbital j des Elementes i

$n_i(z)$ = Konzentration des Elementes i bei dem Abstand z unterhalb der Oberfläche

$\lambda(KE)$ = mittlere freie Weglänge der Photoelektronen

θ = Emissionswinkel des Photoelektrons in Bezug auf Oberflächennormale

Gleichung 2-7 gilt unter der Annahme einer amorphen und isotropen Oberfläche, da es bei kristallinen Proben zu Abweichungen aufgrund von Beugungen der Photoelektronen am Kristallgitter und dadurch bedingten Interferenzen kommen kann. Die Konzentration n_i kann unter der Annahme, dass die Elemente bis zu einer Tiefe $z > 3\lambda$ homogen verteilt sind, wie folgt bestimmt werden:

$$I_{ij} = K \cdot T(KE) \cdot L_{ij}(\gamma) \cdot \sigma_{ij} \cdot n_i \cdot \lambda(KE) \cos \theta \quad 2-8$$

Da alle Parameter bekannt sind, kann nun die Konzentration n_i bestimmt werden. Daraus kann wiederum die atomare Zusammensetzung der Probe berechnet werden:

$$\% n_i = \left(\frac{n_i}{\sum n_i} \right) \cdot 100 \quad 2-9$$

2.3. Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS)

Mit der kantennahen Röntgenabsorptionsfeinstruktur Spektroskopie (NEXAFS, engl. Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) erfolgt die Charakterisierung gesättigter und ungesättigter Bindungen. Es können Informationen über die Orientierung der immobilisierten Moleküle sowie über die elektronischen Strukturen erhalten werden. Die Untersuchung von Oberflächen mittels NEXAFS ist auf die Verwendung von Synchrotronstrahlung angewiesen.

Bei der Absorptionsspektroskopie kann zwischen der kantennahen (NEXAFS oder XANES) und kantenfernen (EXAFS) Absorptionsfeinstruktur unterschieden werden (Abbildung 13). Die kantennahe Region befindet sich bis etwa 50 eV oberhalb der Absorptionskante. Die kantenferne Region schließt sich direkt an die NEXAFS-Region an.

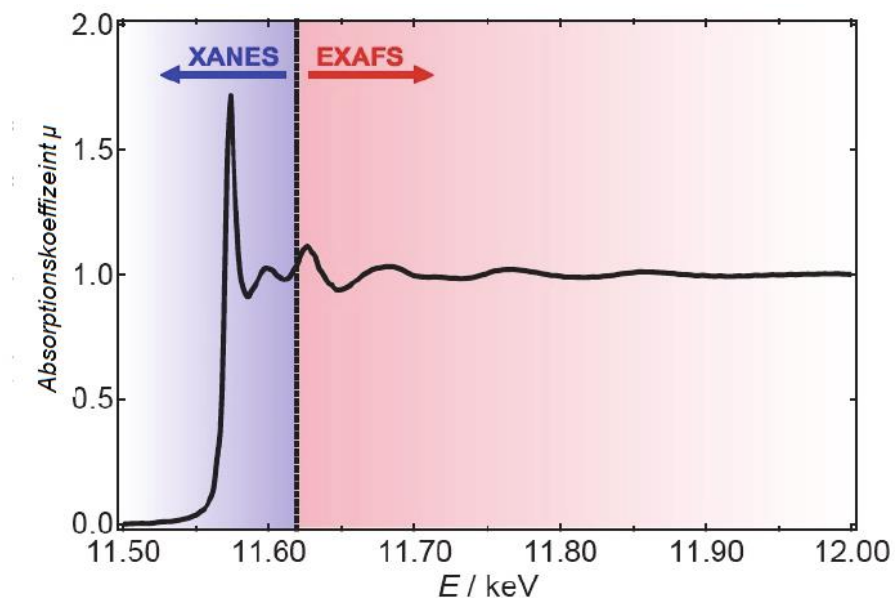


Abbildung 13: Schematische Darstellung der NEXAFS- und EXAFS-Regionen.^[76]

Während mit EXAFS die Art, Anzahl und die Entfernung von Nachbaratomen eines chemischen Elementes in Molekülen bestimmt werden kann, werden mit NEXAFS Informationen über unbesetzte Elektronenzustände sowie die Häufigkeit und räumliche Lage der Atome und Moleküle auf der Oberfläche erhalten. Aus den NEXAFS-Spektren werden qualitative Informationen über die elektronische Struktur und die chemische Umgebung der einzelnen Atomzentren der Proben erhalten. Beim Annähern an die Absorptionskante werden zunächst

Elektronen aus Rumpfniveau in unbesetzte, antibindende Molekülorbitale und Rydbergorbitale (π^* , σ^* , R) angeregt (Abbildung 14). Erreicht die Strahlung die Energie, die mit der Bindungsenergie der Rumpfelektronen übereinstimmt (Ionisationspotential, IP), steigt das Messsignal sprunghaft an (Absorptionskante). Die Höhe des Kantensprungs gibt das Maß der Intensitätsabschwächung (Absorption) des einfallenden Röntgenlichtes an. Die Absorption wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$I = I_0 \cdot \exp(-d \cdot \alpha) \quad 2-10$$

Wobei d die Weglänge, die das Licht durch ein homogenes Medium zurücklegt, und α der Absorptionskoeffizient ist.

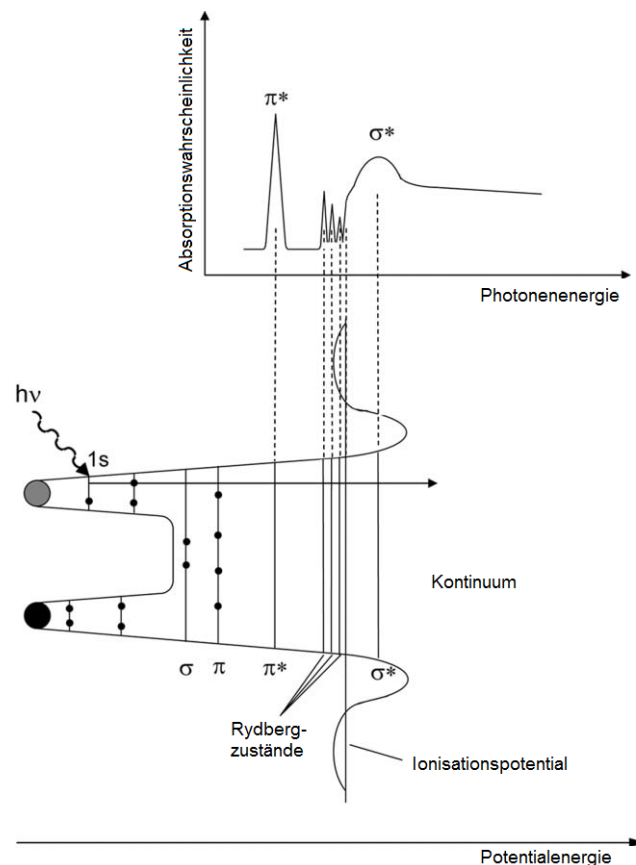


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Potentials (unten) und des dazugehörigen NEXAFS K-Kanten Spektrums (oben) eines zweiatomigen Moleküls.^[77]

Der energetisch ungünstige Lochzustand kann im Folgenden durch Emission eines Fluoreszenzphotons oder durch Emission von Augerelektronen relaxieren. Diese Emissionen werden im praktischen Absorptionsexperiment detektiert. Die in Festkörpern generierten Augerelektronen können von benachbarten Atomen inelastisch gestreut werden und an weiteren Atomen können wiederum Elektronen rückgestreut werden, wodurch eine Elektronenkaskade entsteht.^[77] Die entstehenden Lochzustände in den Atomrümpfen korrespondieren mit dem Absorptionskoeffizienten. Die bei der Photo- und Augeremission sowie bei der Fluoreszenz freiwerdenden Elektronen bzw. Photonen sind ein Maß für die Anzahl der Lochzustände in den kernnahen Orbitalen und somit für den Absorptionskoeffizienten. Im Experiment werden Elektronen (EY, electron yield) und auch die Fluoreszenzemission (FY, fluorescence yield) detektiert, wobei nur die Detektion von Elektronen eine Oberflächenempfindlichkeit aufweist. Der Grund hierfür ist die niedrigere kinetische Energie von Elektronen. Die sich hierfür ergebende freie Weglänge in der Materie ist für Energien zwischen 250 und 600 eV typischerweise kleiner als 1 nm. Die austretenden Elektronen können in zwei verschiedenen Messmoden gemessen werden. Im partiellen EY-Modus werden sekundäre Elektronen mit einer niedrigen kinetischen Energie diskriminiert, was durch eine dem Detektor vorgeschaltete retardierende Bremsspannung erreicht wird. Dieser Aufnahmemodus ist besonders oberflächensensitiv und eignet sich für die Untersuchung von Adsorbaten und dünnen Schichten auf der Oberfläche, da hierbei ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erhalten wird im Vergleich zur Detektion von allen austretenden Elektronen mit dem total-electron-yield (TEY) Modus. Weiterhin können die elastisch gestreuten Augerelektronen mit dem Auger-electron-yield mode (AEY) aufgenommen werden, wobei ein Energieanalysator benötigt wird, der nur Elektronen einer bestimmten kinetischen Energie (der des ausgewählten Auger-Überganges) detektiert.

Zusätzlich zu den Informationen über die elektronischen Strukturen der Proben können mit der NEXAFS-Spektroskopie Informationen über die Orientierung der adsorbierten Moleküle erhalten werden. Dafür macht man sich die anisotrope Absorption der linear polarisierten Synchrotronstrahlung, den sogenannten linearen Dichroismus, zu nutze. Hierbei werden NEXAFS-Spektren bei mindestens zwei unterschiedlichen Winkeln aufgenommen. Es besteht eine Abhängigkeit zwischen dem elektrischen Feldvektor \vec{E} der Synchrotronstrahlung und dem Übergangsdipolmoment der antibindenden Orbitale \vec{TDM} , wobei das

Übergangsdipolmoment die Umverteilung der Ladung nach dem Elektronenübergang beschreibt. Hierbei ist zu beachten, dass die Übergangswahrscheinlichkeit P_{if} kernahe Elektronen in unbesetzte Molekülorbitale anzuregen sowohl vom Anfangszustand i als auch vom Endzustand abhängig ist.

$$I \propto P_{if} \propto |\langle f | \vec{E} \cdot \overrightarrow{TDM} | i \rangle|^2 \quad 2-11$$

Im Allgemeinen sind Molekülorbitale und somit auch die chemischen Bindungen definiert im Raum orientiert (Abbildung 15 a). Vereinfacht stehen die π^* - und σ^* -Orbitale senkrecht zueinander und werden durch Vektoren bzw. Flächen beschrieben. Abbildung 15 b zeigt die schematische Darstellung der Winkelabhängigkeit der NEXAFS C K-Kante eines aromatischen Systems. Für dieses Beispiel gilt, dass bei paralleler Ausrichtung des elektrischen Feldvektors \vec{E} zum Übergangsdipolmoment \overrightarrow{TDM} der antibindenden Orbitale der Moleküle die Intensität ihr Maximum erreicht. Wird im Experiment der Einstrahlwinkel γ der Synchrotronstrahlung variiert, lassen sich Aussagen über die räumliche Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche treffen. So nimmt die Intensität der π^* -Resonanz mit zunehmendem Einstrahlwinkel ab, da das Übergangsdipolmoment zunehmend senkrecht zum elektrischen Feldvektor steht. Dagegen verstärkt sich die σ^* -Resonanz durch zunehmend parallel stehende Vektoren. Weiterhin gilt, dass die Intensität der Resonanz von der Übergangswahrscheinlichkeit und der Überlappung der linear polarisierten Synchrotronstrahlung mit dem Übergangsdipolmoment \overrightarrow{TDM} der Orbitale abhängt.^[78]

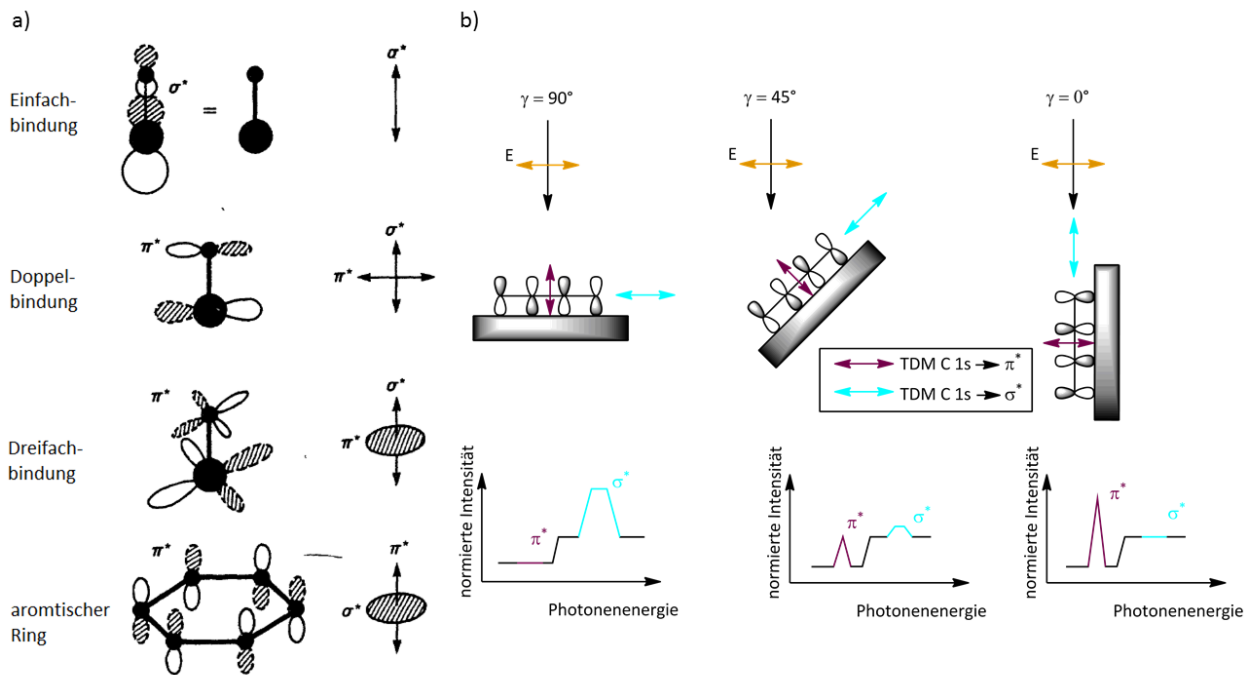


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Orientierung der π^* - und σ^* -Orbitale im Raum (a).^[78] Schematische Darstellung der Winkelabhängigkeit von NEXAFS gezeigt an der C K-Kante des immobilisierten Benzols (b). Die maximale π^* -Resonanz wird erreicht, wenn das Übergangsdipolmoment (TDM) parallel zum elektrischen Feldvektor (E) steht (links), die maximale σ^* -Resonanz, bei senkrecht zueinander stehenden Übergangsdipolmoment und elektrischen Feldvektor, ist rechts dargestellt.^[79]

2.4. Flugzeitsekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS)

ToF-SIMS ist eine sehr sensitive analytische Methode zur Untersuchung von Oberflächen mit der elementare und molekulare Informationen über die zu untersuchenden Oberflächen, dünnen Schichten oder Grenzflächen von Proben erhalten werden.

Die Probe wird mit Primärionen mit einer Energie von 0.2 – 25 keV bombardiert.^[80] Dabei wird die Energie auf die Atome durch Kollisionen übertragen, was schließlich zu einer Stoßkaskade zwischen den Atomen führt. Ein Teil der Energie wird zurück zur Oberfläche transportiert, was in der Emission von Atomen und Atomclustern, von denen einige ionisiert sind, resultiert (Abbildung 16). Es entstehen sowohl neutrale als auch positiv und negativ geladene Teilchen.

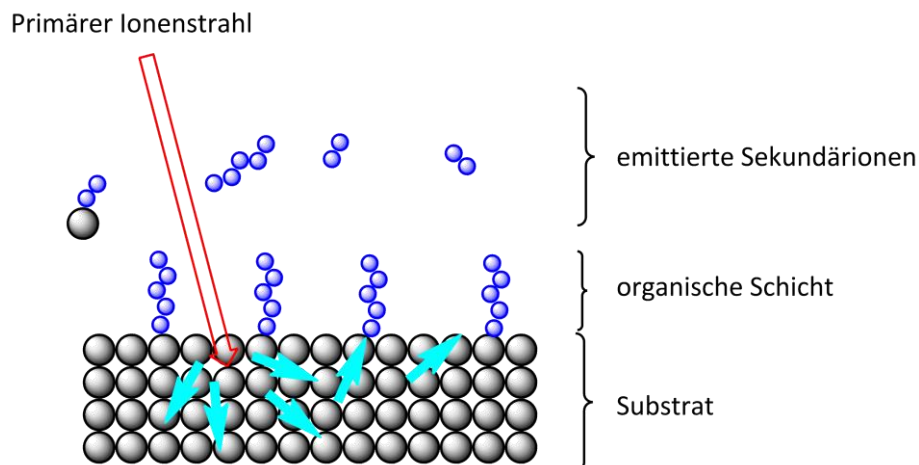


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Prinzips der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS). Durch den Beschuss der Probe mit Primärionen kommt es zu Kollisionen und schließlich Stoßkaskaden, wodurch Sekundärionen emittiert werden. Die Sekundärionen können im Anschluss nach ihrer Masse diskriminiert und detektiert werden.

Die freigesetzten Sekundärpartikel werden von einem elektrischen Feld, das am Extraktor angelegt ist, eingefangen. Durch ein angelegtes Potential werden die Sekundärpartikel auf eine bestimmte kinetische Energie beschleunigt und legen anschließend eine Strecke mit definierter Länge z zurück.^[80] Dabei werden die Partikel nach ihrer Masse m bzw. ihrem m/z -Verhältnis durch einen Massenanalysator, wie zum Beispiel ein Quadrupol-Massenanalysator, ein Sektorfeld, oder ein Flugzeitmassenanalysator (*time-of-flight, ToF*) aufgetrennt, da sich

leichte Partikel schneller als schwerere bewegen und den Detektor schneller erreichen. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zV}} \quad 2-12$$

Der Driftweg der Sekundärionen wird durch einen Ionenspiegel verdoppelt und damit die Massenauflösung vergrößert. Am Ende des Driftweges werden die Sekundärionen vom Detektor registriert. Heute kommen meistens Multichannelplate-Detektoren zum Einsatz (Abbildung 17). Die Oberflächensensitivität dieser Methode wird dahingehend abgeschätzt, dass nur Sekundärpartikel, die zu 95 % aus den zwei obersten Schichten des Festkörpers stammen, erfasst werden.^[81]

Bei der statischen SIMS wird die Probe mit einem sehr niedrigen Primärionenfluss beschossen. Bei einer Ionendosis $<10^{13}$ Ionen/cm² wird statistisch gesehen keine Stelle auf der Oberfläche durch die Primärionen mehrmals getroffen, was dazu führt, dass das Massenspektrum nur Informationen über die unbeschädigte Oberfläche enthält. Bei dem Beschuss der Oberfläche mit einem hohen Primärionenfluss wird die oberste Atomlage kontinuierlich abgetragen und daraus werden elementspezifisch Tiefenverteilungsinformationen (SIMS-Tiefenprofil) erhalten.^[82] Bei der Aufnahme eines ToF-SIMS-Tiefenprofils wird eine definierte Fläche auf der zu analysierenden Oberfläche mit einem fokussierten Ionenstrahl abgerastert und ein Krater zu erzeugt. Bei dem Abtragen des Oberflächenmaterials werden Sekundärionen erzeugt, die im Massenanalysator gesammelt und analysiert werden. Auf diese Weise kann die Zusammensetzung einzelner Schichten in einem Material untersucht werden. Bei einem Tiefenprofil wird die Intensität bestimmter Sekundärionen gegen die Sputterzeit aufgetragen. Ist der Materialabtrag, der in einer bestimmten Zeit stattfindet (Sputterrate), bekannt, kann aus der Sputterzeit die Messtiefe berechnet werden. Aus solch einem Tiefenprofil werden Informationen über den Konzentrationsverlauf der selektierten Elemente in der Tiefe der Probe erhalten.^[82]

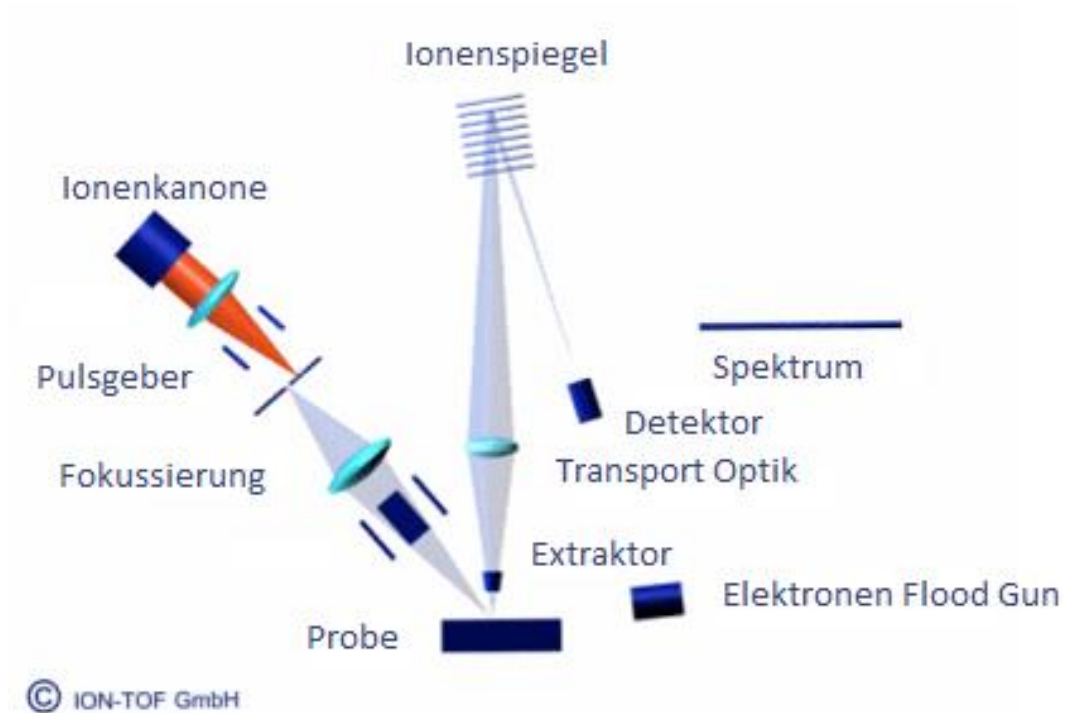


Abbildung 17: Schematische Darstellung des ToF-SIMS-Experimentes. Die Primärpartikel werden mit einer Ionenkanone erzeugt und nach dem Passieren des Pulsgebers fokussiert auf die Probe geleitet. Die emittierten Sekundärpartikel werden von einem Extraktor eingefangen, beschleunigt und anschließend von einem Ionenspiegel umgelenkt und vom Detektor registriert. Bild von der Website der ION-TOF GmbH entnommen.^[81]

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Überblick

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der entwickelten Funktionalisierungsstrategie diskutiert. Die Grundlage hierfür bilden dünne Siliziumnitridfilme, welche durch Erzeugung von Oberflächenaminen und gefolgt von der Überführung in Azidgruppen selektiv mittels der Click-Chemie modifiziert werden sollen. Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) diente in dieser Arbeit als Alternative zur Silanchemie. Zunächst erfolgte die Modellentwicklung mit Fluor-substituierten Alkinen, gefolgt von der Erzeugung eines Biotin/Streptavidin-Biofilms als Modellsystem. Nach Entwicklung des Verfahrens für die selektive Modifizierung von Siliziumnitrid wurde in weiteren Experimenten die Nukleaseaktivität von immobilisierten Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexen gegenüber Plasmid-DNA pBR322 untersucht.

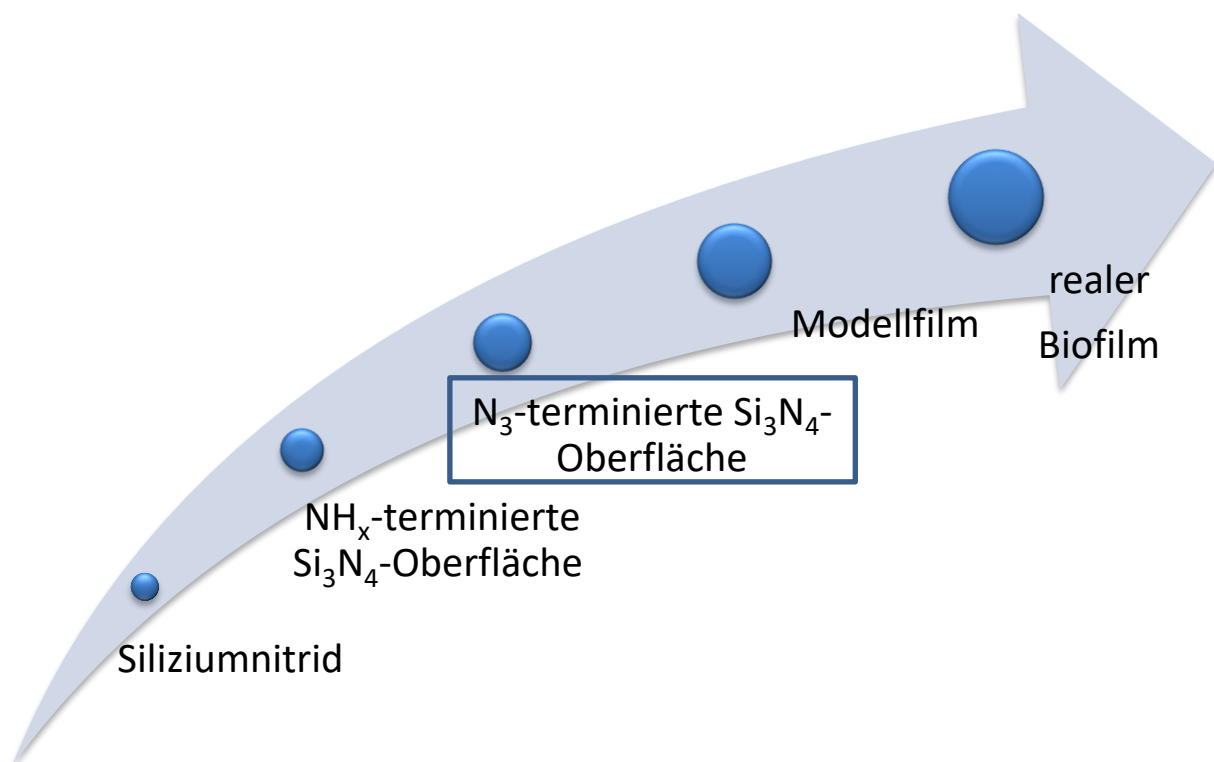


Abbildung 18: Überblick der Entwicklung einer Funktionalisierungsstrategie für Siliziumnitridfilme. Oberflächenamine dienen als Grundlage zur Erzeugung Azid-terminierter Si_3N_4 -Oberflächen, wodurch sich die Modifizierung der Oberfläche durch die vielfältige Click-Chemie eröffnet.

3.2. Amino-terminierte Siliziumnitrid-Oberflächen (Si-NH_x)

3.2.1. Stand der Forschung

Aminogruppen sind wichtige funktionelle Gruppen und bilden aufgrund ihrer Reaktivität die Grundlage vieler Reaktionen^[83-85] in der organischen und anorganischen Synthese. In der Festphasenpeptidsynthese wird beispielsweise zunächst die Aminosäure über die Carboxylgruppe an ein Harz gebunden, während die Aminogruppe mittels einer Fmoc-Gruppe geschützt wird. Im nächsten Schritt wird die entschützte Aminosäure für die Kopplung der nächsten Aminosäure eingesetzt. In der Sandmeyer-Reaktion werden aromatische Amine nach Diazotierung durch Nukleophile, meist Halogene, ersetzt, was zum Beispiel Anwendung bei der Synthese von 4-Brom-2-nitrotoluol im Rahmen der Totalsynthese des Farbstoffs Purpur findet.^[86]

Auch in der Oberflächenchemie haben Aminogruppen breite Anwendungsoptionen. Hier ist eine häufig verwendete Methode zur Einbringung von Aminofunktionalitäten die Silanisierung von OH-terminierten Silizium-Oberflächen mit Aminosilanen, wie zum Beispiel 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) oder 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS).^[50] Dadurch eröffnen sich neue Herstellungswege für die Entwicklung von Biosensoren und biomimetischer Oberflächen. Ein Problem der Silanisierung der Oberflächen und der Reaktivität der Aminogruppen besteht in möglichen Nebenreaktionen^[87] und Oxidationsprozessen, wodurch eine zuverlässig reproduzierbare Herstellung von biosensorischen Plattformen schwierig ist. In den letzten 20 Jahren gab es einige Gruppen, die eine direkte Oberflächenmodifikation von Siliziumnitrid vorschlugen.^[29, 39, 57, 63] Die Erzeugung von Oberflächenaminogruppen wird dabei nur selten beschrieben. Eine Möglichkeit Si-NH_x-Gruppen zu erzeugen, besteht in der Ätzung der Si₃N₄-Oberfläche mit Flusssäure (HF) bzw. gepufferter Flusssäure (BHF).^[88-89]

Eine weitere Option, Aminogruppen auf Si₃N₄ unter Vermeidung der Silanchemie einzuführen, ist die Ausnutzung eines Plasmas. Einige Studien zeigten erfolgreich die Herstellung von Aminen durch die Ausnutzung eines wasserbasierten Sauerstoffplasmas. Habraken und Kuiper beschrieben die Bildung von Si-NH Bindungen durch die Oxidation von Siliziumnitrid in Anwesenheit von Wasserstoff. Hierbei handelt es sich um ein Intermediat, das bei der Oxidierung gebildet wird.^[90] Stine et al. stellten eine plasma-basierte

Funktionalisierungsstrategie für Siliziumnitrid-Oberflächen vor, in der primäre Oberflächenamine mit Glutaraldehyd funktionalisiert wurden. Anschließend wurde die kovalente Bindung von Proteinen untersucht.^[55] Es gibt aber nur wenige Studien, die eine direkte Modifizierung der Oberfläche ohne die Ausnutzung von Linkern, wie Silanen oder Glutaraldehyd, beschreiben.^[57, 91] Im Gegensatz dazu werden in dieser Arbeit unterschiedliche Strategien zur Erzeugung von Aminogruppen auf Si₃N₄ und deren Anwendungen in einer direkten Funktionalisierung erprobt und diskutiert.

Neben den möglichen Reaktionen von Aminen ist die Charakterisierung der funktionalisierten Oberflächen mit XPS ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Die in dieser Arbeit die Grundlage für alle folgenden Reaktionen bildenden Oberflächenamine (NH_x) wurden mit gepufferter Flusssäure (BHF) erzeugt. Da Aminogruppen auf Si₃N₄ mittels XPS schwer zu charakterisieren sind, werden zum besseren Nachweis die Amine mit einem mit XPS-Marker, 4-(Trifluormethylbenzaldehyd) (TFBA), derivatisiert. Bei der sogenannten chemischen Derivatisierungs-XPS (CD-XPS) wird der Effekt ausgenutzt, dass chemische Verschiebungen aufgrund von Elektronegativitätsdifferenzen bei der Funktionalisierung auftreten. Aufgrund der chemischen Verschiebungen kann so zwischen funktionellen Gruppen bzw. Oxidationszuständen der Atome unterschieden werden. Im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum kann zum Beispiel die Komponente bei 293.0 eV der CF₃-Gruppe zugeordnet werden. Hierfür eignen sich besonders fluorsubstituierte Verbindungen, da Fluor aufgrund seines Ionisierungsquerschnitts mit XPS mit sehr hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Der C 1s Komponentenpeak der CF₃-Gruppe ist somit von den C 1s-Komponentenpeaks anderer Gruppen, wie CC, CH, C-O, C=O, C-N, deutlich abgegrenzt und eindeutig nachzuweisen. Bei Reaktionen primärer Amine mit TFBA werden Imine gebildet (Abbildung 19).

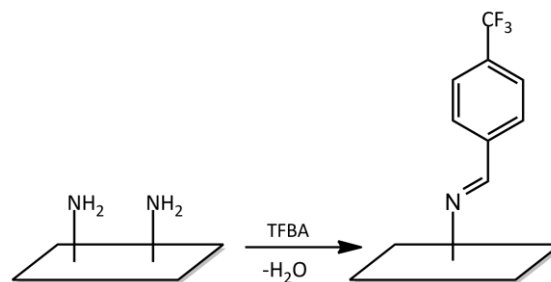


Abbildung 19: Derivatisierung einer NH_x-terminierten Si₃N₄-Oberfläche mit TFBA.

Die frisch erzeugten Amine (NH_x) können nach der chemischen Derivatisierung mit TFBA mittels XPS quantifiziert werden. Hierbei wird die Derivatisierungsausbeute nach Gleichung 3-1 aus der im C 1s-XP-Spektrum ermittelten relativen Peakfläche des CF₃-Komponentenpeaks (CF_{3,exp}) und der theoretisch möglichen CF₃-Konzentration einer quantitativ derivatisierten Oberfläche (CF_{3,stoich.}) erhalten.

$$X = \frac{CF_{3,exp.}}{CF_{3,stoich.}} * 100\% \quad 3-1$$

CF_{3,exp.} wird aus dem Fit des C 1s-XP-Spektrums und CF_{3,stoichm.} aus der theoretischen Stöchiometrie einer vollständig derivatisierten Oberfläche (das Verhältnis der CF₃-Gruppe zur Anzahl der C-Atome im Molekül) erhalten.

3.2.2. Oberflächencharakterisierung der Siliziumnitrid-Filme

Die ersten Experimente zur Erzeugung direkt gebundener Monolagen auf Siliziumnitrid bestanden in der Entwicklung der optimalen Strategie zur Erzeugung von Aminogruppen aus dem Substrat. Entsprechend den in der Literatur gefundenen Protokollen wurden organische Verunreinigungen mit Isopropanol im Ultraschallbad entfernt, gefolgt von der Reinigung der Oberflächen mit UV/Ozon.^[92-93] Die native Oxidschicht und somit die Erzeugung von Si-NH_x-Oberflächen (NH_x, x=1-2) erfolgte anschließend durch die Behandlung mit Flusssäure bzw. gepufferter Flusssäure. Sundaram et al. beschrieben die Ätzung von Si₃N₄ mit Phosphorsäure.^[89] Weiterhin wurden Amine auf Oberflächen durch die Verwendung eines Plasmas generiert. Zum einen wurde durch Nutzen von Ammoniak als Plasma Stickstoff auf die Oberfläche aufgebracht und dadurch Amine erzeugt. Zum anderen wurde von Habraken und Kuiper beschrieben, dass Bindungen zwischen Silizium und Stickstoff im Substrat durch ein wasserbasiertes Sauerstoff-Plasma gebrochen und dadurch Si-NH_x- und Si-OH-Bindungen generiert werden. Alle Reinigungs- und Ätzschritte wurden detailliert mit XPS und ToF-SIMS kontrolliert.

Bei der Betrachtung der ungereinigten, nativen Oberfläche wurden in der XPS Analyse deutlich Kohlenstoff- (10 at.%) und Sauerstoffanteile (18 at.%) beobachtet. Die Kohlenstoffkontaminationen konnten mit Isopropanol im Ultraschallbad, gefolgt von einer Behandlung mit UV/O₃, deutlich reduziert werden (3.6 at.%).^[94] Die Reinigungsschritte wurden bei unterschiedlichen Expositionszeiten untersucht (Abbildung 20). Während die Reinigung mit Isopropanol nur leicht entfernbare Verunreinigungen beseitigte, wurde durch die UV/O₃-Behandlung eine deutliche Reduzierung der Kohlenstoff-Konzentration erzielt, wobei ab der 20-minütigen Behandlung der Oberfläche geringere Kohlenstoff-Konzentrationen erreicht wurden.

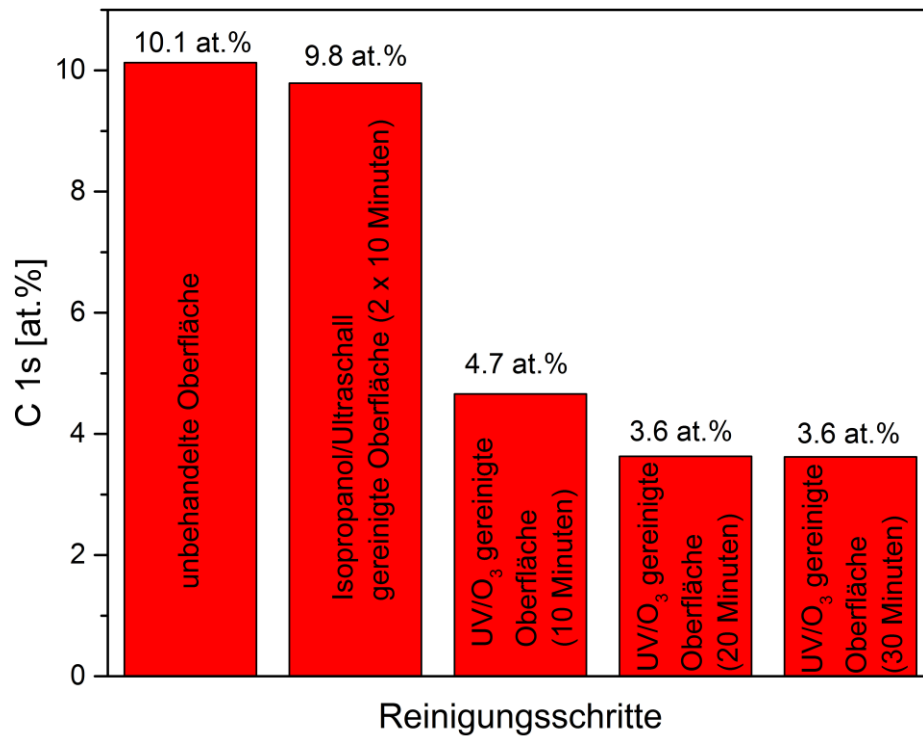


Abbildung 20: Entfernung von Kohlenstoffkontaminationen von der Si₃N₄ Oberfläche durch die Behandlung mit Isopropanol bzw. mit Isopropanol gefolgt von einer UV/O₃-Behandlung.

Neben der Entfernung der Kohlenstoff-Verunreinigungen musste die native Oxidschicht von der Oberfläche entfernt werden, um die Si-NH_x-Bindungen erzeugen zu können. Hierzu wurden die Si₃N₄-Oberflächen mit Flusssäure (1 %, 2.5 %), gepufferter Flusssäure bzw. Phosphorsäure geätzt (Abbildung 21). Anhand der Reduzierung des Sauerstoffanteils im XP-Übersichtsspektrum erfolgte die Bewertung des Reinigungserfolges. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die Sauerstoffkonzentrationschicht bei der Behandlung der Oberfläche mit UV/O₃ nicht verändert. Nach Sundaram et al. kann Si₃N₄ mit Phosphorsäure geätzt werden.^[89] Dadurch konnte jedoch keine Verringerung der Oxidspezies beobachtet werden. Lediglich die Behandlung der Oberflächen mit Flusssäure bzw. gepufferter Flusssäure kann die Sauerstoffkonzentration deutlich reduzieren, was aus der Literatur bereits bekannt ist.^[55, 95]

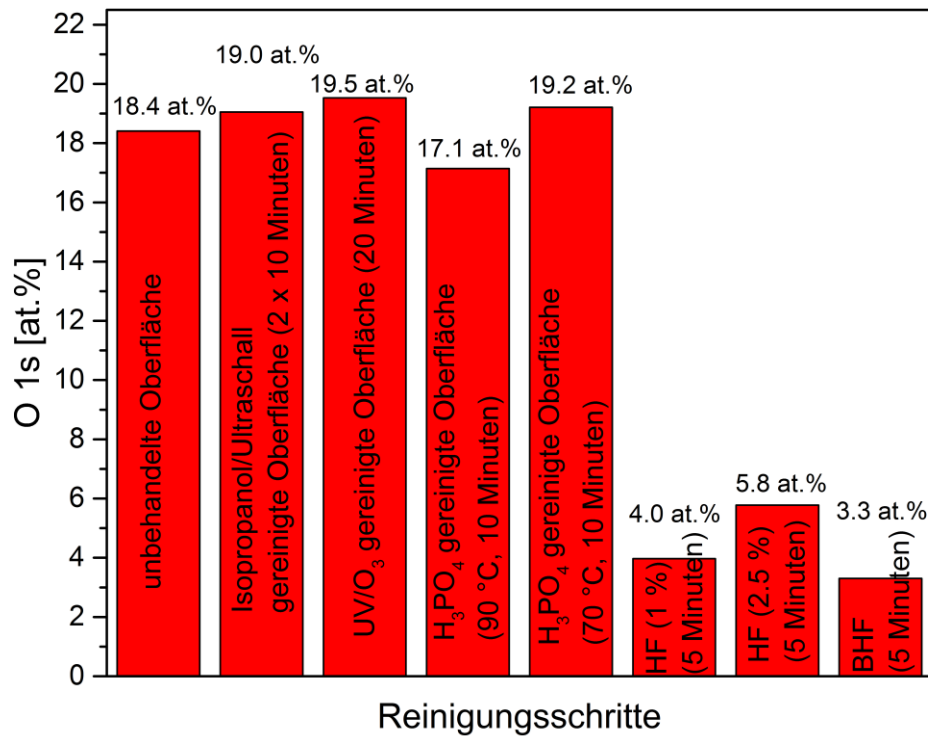


Abbildung 21: Optimierung der Reinigungsmethode zur Entfernung der Sauerstoffschicht von der Si₃N₄-Oberfläche.

Die native Oxidschicht wird durch die Behandlung mit Flusssäure fast vollständig entfernt. Nach der Reinigung bleiben jedoch immer ca. 3 at.-% Sauerstoff auf der Oberfläche. Diese Sauerstoffspezies basieren auf Siliziumoxinitriden, die bei der Abscheidung des Siliziumnitridfilms in Subschichten gebildet werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich die Ätzrate von Flusssäure mit steigender Konzentration und längerer Reinigungszeit erhöht bzw. ob gepufferte Flusssäure die Oxidschicht effektiver entfernt. Tabelle 1 zeigt die Sauerstoffkonzentration nach der Reinigung der Oberflächen (1-5 Minuten) mit 1 %iger bzw. 2.5 %iger Flusssäure und gepufferter Flusssäure (BHF, 40 %ige Ammoniumfluorid-Lösung in Wasser gemischt mit konzentrierter Flusssäure (49 %) im Verhältnis 7:1). Während bei der Verwendung von Flusssäure, sowohl bei der Erhöhung der Konzentration als auch bei längerer Reinigungsdauer, nur geringfügige Unterschiede erkennbar sind, kann durch das Ätzen mit BHF die Sauerstoffkonzentration um 1 at.-% verringert werden. Des Weiteren sind die Ergebnisse besser reproduzierbar im Vergleich zur Reinigung mit HF, was mit der

Wirkungsweise der gepufferten Flusssäure erklärt werden kann. Konzentrierte Flusssäure ätzt die native Oxidschicht sehr schnell, was die Kontrolle des Prozesses erschwert. Daher wird häufig gepufferte Flusssäure eingesetzt. Aufgrund des Ammoniumfluorids bleibt die Konzentration der freien Fluorid-Ionen während des Ätzens konstant, was zu einer konstanten Ätzrate und somit zur gleichmäßigen und kontrollierten Entfernung der Oxidschicht führt.

Tabelle 1: Abnahme des Sauerstoffgehalts von Si₃N₄-Oberflächen, die mit Flusssäure (1 % bzw. 2.5 %) bzw. mit gepuffertes Flusssäure gereinigt wurden.

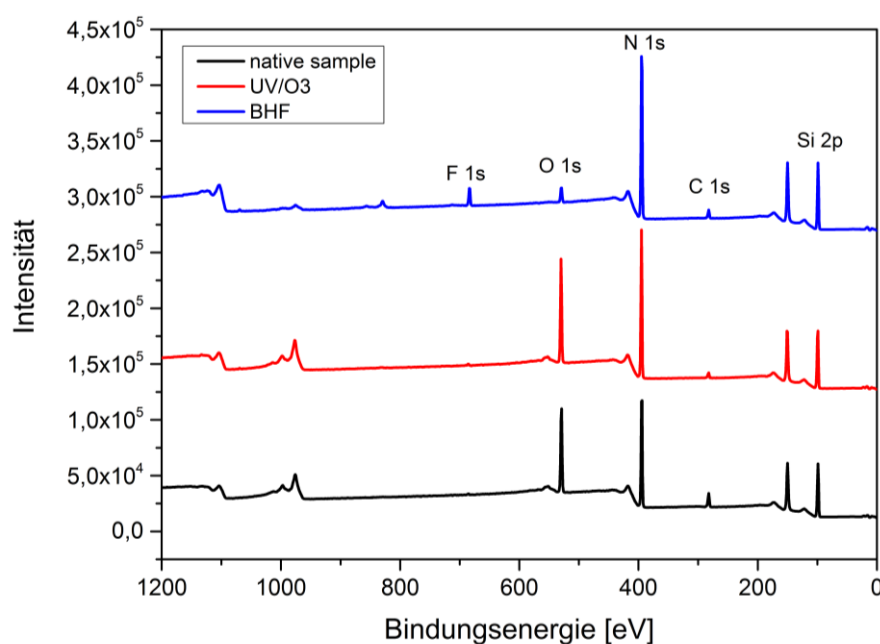
t (min)	Sauerstoffgehalt aus dem O 1s Photoelektronenpeak in at.%		
	HF 1 %	HF 2,5 %	BHF (7:1)
0		18.4 (±0.4 %)	
1	4.2 (±0.2 %)	5.8 (±0.2 %)	3.7 (±0.2 %)
2	7.2 (±0.2 %)	4.2 (±0.2 %)	3.8 (±0.2 %)
3	3.1 (±0.2 %)	4.2 (±0.2 %)	3.5 (±0.2 %)
5	4.0 (±0.2 %)	5.8 (±0.2 %)	3.3 (±0.2 %)

Der optimale Reinigungsprozess der verwendeten Si₃N₄-Oberflächen (80 nm Siliziumnitridfilm auf Silizium) besteht aus einer 10-minütigen Waschprozedur in Isopropanol im Ultraschallbad, gefolgt von der Behandlung mit UV/O₃ für 20 Minuten und durch Eintauchen in BHF für fünf Minuten. Die Reinigung der Oberflächen für die Click-Chemie wurde auf eine Minute mit BHF reduziert, da diese Experimente mit nur 40 nm dicken Siliziumnitridfilmen durchgeführt wurden, was eine verkürzte Ätzzeit erforderte.

In Abbildung 22 sind die XP-Übersichtsspektren einer nativen (schwarz), UV/O₃ gereinigten (rot) und BHF gereinigten (blau) Probe dargestellt. Die dazugehörigen Elementanalysen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Deutlich erkennbar ist die Reduzierung der Kohlenstoffkontamination nach der Reinigung mit UV/O₃ (C 1s = 3.6 at.%) sowie die fast vollständige Entfernung der Oxidschicht der Oberfläche durch die Behandlung mit BHF (O 1s = 3.3 at.%), wodurch mehr Stickstoff (N 1s = 55.3 at.%) für die folgenden Reaktionen zur Verfügung steht. Nach der Behandlung der Oberfläche mit BHF bleibt jedoch immer ein Rest von anorganischem Fluor (F 1s = 2.8 at.%) auf der Oberfläche zurück.

Tabelle 2: XPS Elementzusammensetzung einer nativen, UV/O₃-gereinigten und BHF-gereinigten Probe

Elementzusammensetzung in at.%						
Probe	O 1s (at.%)	F 1s (at.%)	C 1s (at.%)	N 1s (at.%)	Si 2p (at.%)	N/Si
Nativ	18.4 (±0.2 %)	0.2 (±0.2 %)	10.1 (±0.2 %)	39.9 (±0.3 %)	31.4 (±0.2 %)	1.2
UV/O ₃ (20 min)	19.5 (±0.2 %)	0.2 (±0.2 %)	3.6 (±0.2 %)	43.3 (±0.2 %)	33.2 (±0.2 %)	1.3
BHF (5 min)	3.3 (±0.2 %)	2.8 (±0.2 %)	5.6 (±0.2 %)	55.3 (±0.2 %)	35.0 (±0.2 %)	1.6

**Abbildung 22:** Surveyspektren einer nativen (schwarz), UV/O₃ gereinigten (rot) und BHF-gereinigten Probe (blau).

Die Ergebnisse zeigen, dass mit einer Flusssäurebehandlung keine komplette Entfernung des Sauerstoffs aus der Oberfläche erreicht wurde. Dies liegt an der Existenz von Siliziumoxinitriden in tieferen Subschichten, welche während des Abscheidungsprozesses gebildet werden.^[63]

Die Ergebnisse der ToF-SIMS-Tiefenprofile einer nativen und einer mit BHF-gereinigten Probe unterstützen die XPS Ergebnisse. Gezeigt ist der Vergleich der Sekundärionenausbeuten in der Tiefe, wobei keine Matrixelemente berücksichtigt wurden (Abbildung 23). Die Tiefenprofile sind mit einer Sputterzeit von 300 s dargestellt.

Die native Probe weist an der Probenoberfläche eine relativ hohe Sauerstoffkonzentration auf, welche in tieferen Schichten geringer ist. Die Ausbeute der Siliziumoxinitrid-Sekundärionen ist an der Oberfläche höher als in tieferen Schichten. Das weist darauf hin, dass sich Siliziumoxinitrid bei der Herstellung vermehrt an der Oberfläche bildet. Auf der nativen Oberfläche konnte Fluor in allen Schichten des Substrates nachgewiesen werden, was von der Flusssäure Behandlung des Wafersubstrats während der Herstellung stammt. Im ToF-SIMS-Tiefenprofil einer BHF-gereinigten Probe ist im Vergleich zur nicht gereinigten Probe auf der Oberfläche eine deutlich geringere Sauerstoffkonzentration zu finden. Die Konzentration der Siliziumoxinitrid-Sekundärionen an der Oberfläche der gereinigten Probe ist ebenfalls geringer im Vergleich zur nicht gereinigten Probe. Wie bereits mit XPS ist jedoch auch mit ToF-SIMS zu erkennen, dass das Siliziumoxinitrid durch die Reinigung mit gepufferter Flusssäure nicht vollständig entfernen werden kann. Der Vergleich beider Tiefenprofile zeigt, dass Siliziumoxinitrid herstellungsbedingt in der gesamten Schicht existiert.^[63]

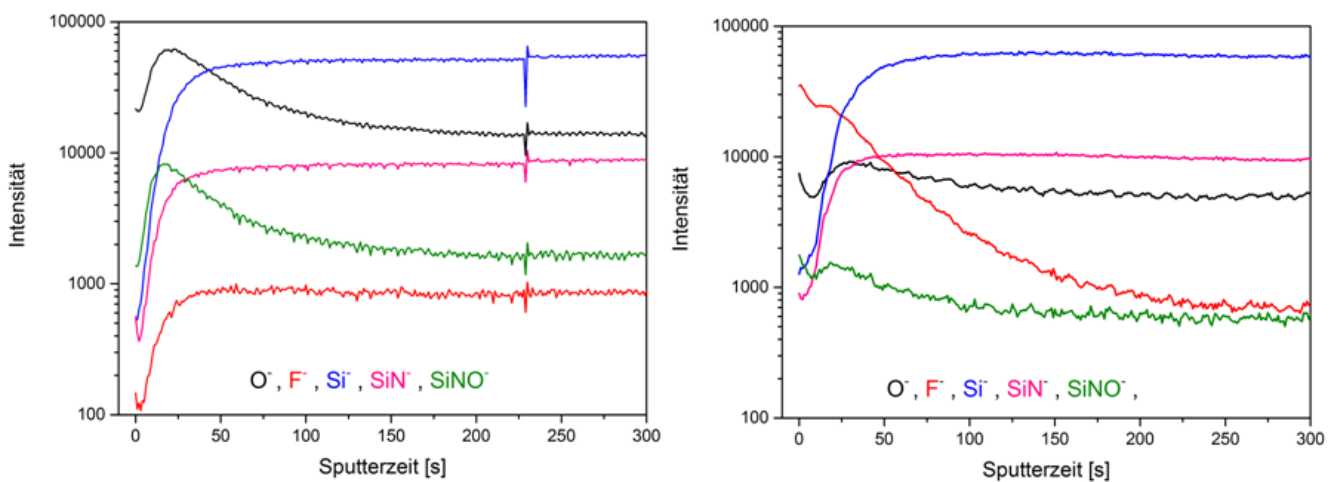


Abbildung 23: ToF-SIMS-Tiefenprofil einer nativen, ungereinigten Probe (links) und BHF-gereinigten Si₃N₄ Probe (rechts).

3.2.3. Chemische Derivatisierung für die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (CD-XPS)

Wie in Kapitel 3.2.1 bereits beschrieben, sind Aminogruppen auf Siliziumnitrid aufgrund des dominanten Nitridpeaks aus dem Substrat mit XPS schwer nachweisbar. Daher erfolgt der Nachweis der Si-NH_x-Bindungen indirekt nach der Derivatisierung mit TFBA (Abbildung 24). Die Trifluormethyl-Gruppe dient als Sonde für die XPS und kann aufgrund ihrer chemischen Verschiebung im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum nachgewiesen werden.

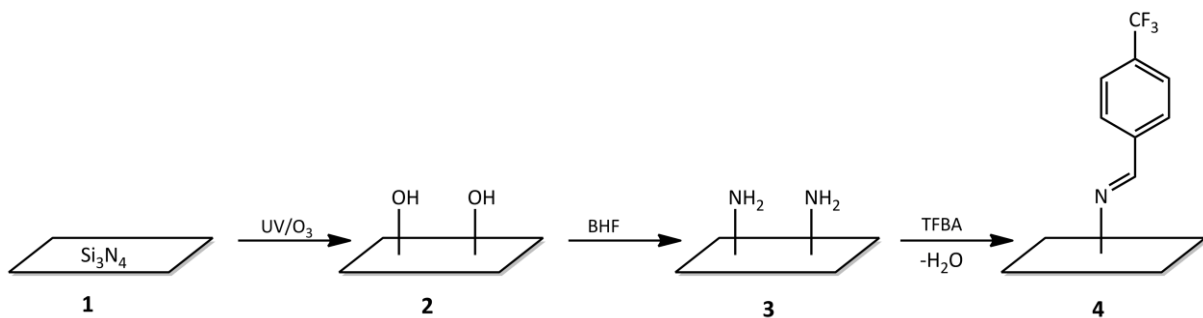


Abbildung 24: Schematische Darstellung der optimalen Reinigungsmethode der verwendeten Si₃N₄-Oberflächen. Nach der Reduzierung von Kohlenstoffkontaminationen mit Isopropanol und UV/O₃ folgt die Entfernung der nativen Sauerstoffschicht mit BHF. Die erzeugten Aminogruppen wurden nach der Derivatisierung mit TFBA mittels CD-XPS quantifiziert.

Zunächst wurde der optimale Prozess zur Bestimmung der erzeugten Aminogruppen auf den Si₃N₄-Filmen ermittelt. Hierzu wurden die frisch geätzten Proben sowohl in der Gasphase als auch in Lösung in *n*-Hexan mit TFBA derivatisiert. Aus dem Vergleich der Derivatisierung in der Gasphase und in Lösung folgt eine effektivere Derivatisierungsausbeute in der Gasphase (Tabelle 3). Die chemische Derivatisierung in Lösung hat gegenüber der Derivatisierung in der Gasphase den Nachteil, dass die Oberfläche im direkten Kontakt mit dem Lösungsmittel und dem Reagenz steht. Dadurch kann es neben Kontaminationen auf der Oberfläche auch zu einer Wanderung der Oberflächengruppen in Subschichten kommen, wodurch der quantitative Nachweis mit oberflächenempfindlichen Methoden wie XPS erschwert wird. [96]

Tabelle 3: Hochaufgelöste C 1s- und F 1s-XP-Daten (Labor-XPS) von derivatisierten Oberflächen. Untersucht wurde die Derivatisierung in der Gasphase und in der Lösung in Hexan.

Komponentenpeakfläche (%)						
Derivatisierungsmethode	C 1s				F 1s	
	CC, CH	CN/C-O	C=O	CF ₃	F _{organisch}	F _{anorganisch}
Gasphase, 30 min	80.8	13.5	3.4	2.5	27.4	72.6
Lösung, 2 h (RT)	82.8	14.5	2.0	0.8	6.5	93.5
Lösung, 3 h (RT)	72.1	22.3	4.8	0.7	7.0	93.0
Lösung, 3 h (30°C)	62.7	31.8	4.0	1.6	15.3	84.7

Im C 1s-XP-Spektrum einer in der Gasphase derivatisierten Oberfläche **4** konnten vier Komponenten identifiziert werden (Abbildung 25 a). Der Peak bei 285.0 eV kann CC- und CH-Bindungen des aromatischen Ringes des TFBA zugeordnet werden. Der Peak bei 286.2 eV wird der CN-Bindung des Imins sowie CO-Bindungen von Verunreinigungen zugeordnet. Der Peak bei 288.9 eV wird COOH-Gruppen zugeordnet, die durch Verunreinigungen verursacht werden. Die CF₃-Gruppe des TFBA tritt bei 293.0 eV auf und war auf der gereinigten Oberfläche nicht anwesend (Tabelle 4). Da durch die Reinigungsschritte nicht alle Kontaminationen entfernt werden können, sind nach der Reaktion ebenfalls noch Verunreinigungen nachzuweisen. Die Derivatisierungsausbeute nach Gleichung 3-1 wurde aus der experimentell ermittelten CF₃-Komponentenpeakfläche und dem theoretischen Wert einer vollständig derivatisierten Oberfläche mit $(20 \pm 3) \%$ berechnet.

Im F 1s-XP-Spektrum (Abbildung 25 b) einer mit TFBA derivatisierten Oberfläche kann aufgrund der chemischen Verschiebung zwischen der organischen und anorganischen Fluorkomponente unterschieden werden. Das F 1s-XP-Spektrum einer gereinigten und derivatisierten Probe zeigt einen Peak bei 688.6 eV (CF₃), der dem organischen Fluor aus TFBA zuzuordnen ist. Das zweite Signal bei 686.7 eV (F⁻) kann auf die Behandlung der Oberfläche mit Flußsäure zurückgeführt werden. ^[55]

Tabelle 4: Hochaufgelöste C 1s-XP-Daten einer BHF geätzten (**3**) und einer mit TFBA derivatisierten Probe (**4**). Die Spektren wurden mit Labor-XPS bei einer Anregungsenergie von $h\nu = 1486.7$ eV und einem Emissionswinkel von 0° aufgenommen.

Oberfläche	Experimentell ermittelte Komponentenpeakfläche (%)				Theoretisch erwartete Peakfläche (%)		
	CC, CH	C=N	Kontamin.	CF ₃	CC, CH	C=N	CF ₃
3	84.9	11.8	3.3	-	-	-	-
4	80.8	13.5	3.4	2.5	75.0	12.5	12.5

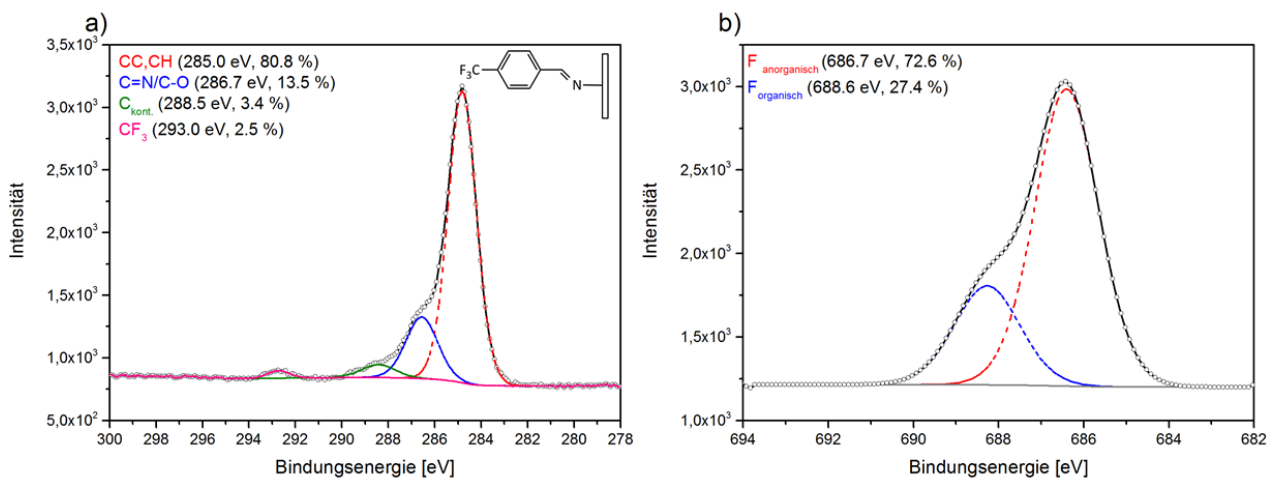


Abbildung 25: Hochaufgelöste C 1s- und F 1s-XP-Spektren einer TFBA-derivatisierten Siliziumnitrid-Oberfläche (**4**). Die Spektren wurden mit Labor-XPS bei einer Anregungsenergie von $h\nu = 1486.7$ eV und einem Emissionswinkel von 0° ($z_{95}=10$ nm) aufgenommen.

In weiteren Experimenten wurden zur Erhöhung der Aminogruppendichte frisch geätzte Si₃N₄-Oberflächen einem wasserbasierten Sauerstoffplasma bzw. Ammoniakplasma ausgesetzt (Abbildung 26).

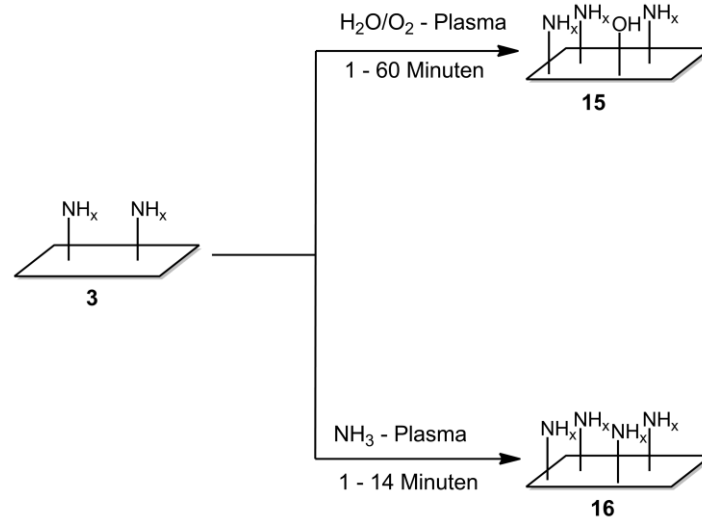


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Erzeugung einer höheren Aminogruppendichte auf Si₃N₄-Oberflächen durch die Behandlung mit einem wasserbasierten Sauerstoffplasma bzw. Ammoniakplasma.

Die XPS-Analyse der mit einem feuchten Sauerstoffplasma behandelten und nachfolgend derivatisierten Oberflächen in Abhängigkeit der Zeit zeigen eine signifikant erhöhte CF₃-Konzentration nach einer Plasmabehandlungszeit von 20 Minuten (Abbildung 27). Habraken und Kuiper beschrieben, dass es durch die Anwesenheit einer Wasserstoffquelle zu Bindungsbrüchen zwischen Silizium und Stickstoff kommt und dadurch Aminogruppen gebildet werden.^[90, 97] Stine et al. beschrieben in ihrer Studie die feuchte Oxidation von Siliziumnitrid bei einer relativen Feuchte von 70 %.^[55] Eine Aussage, ob die beschriebenen Bedingungen eingehalten wurden, konnte nicht gemacht werden, da die Messung der relativen Feuchte bei der verwendeten Plasmaapparatur nicht möglich war. Bei schwankender relativer Feuchte in der Plasmakammer steht eine unterschiedliche Menge Wasser zur Verfügung, wodurch sich die Anzahl reaktiver Spezies im Plasma und dadurch der Bindungsbruch im Siliziumnitrid verändert. Aufgrund der schwer reproduzierbaren Ergebnisse und der nicht möglichen Kontrolle der relativen Feuchte in der Plasmakammer wurde die Strategie, Aminogruppen durch ein wasserbasiertes Sauerstoffplasma zu erzeugen, nicht weiterverfolgt.

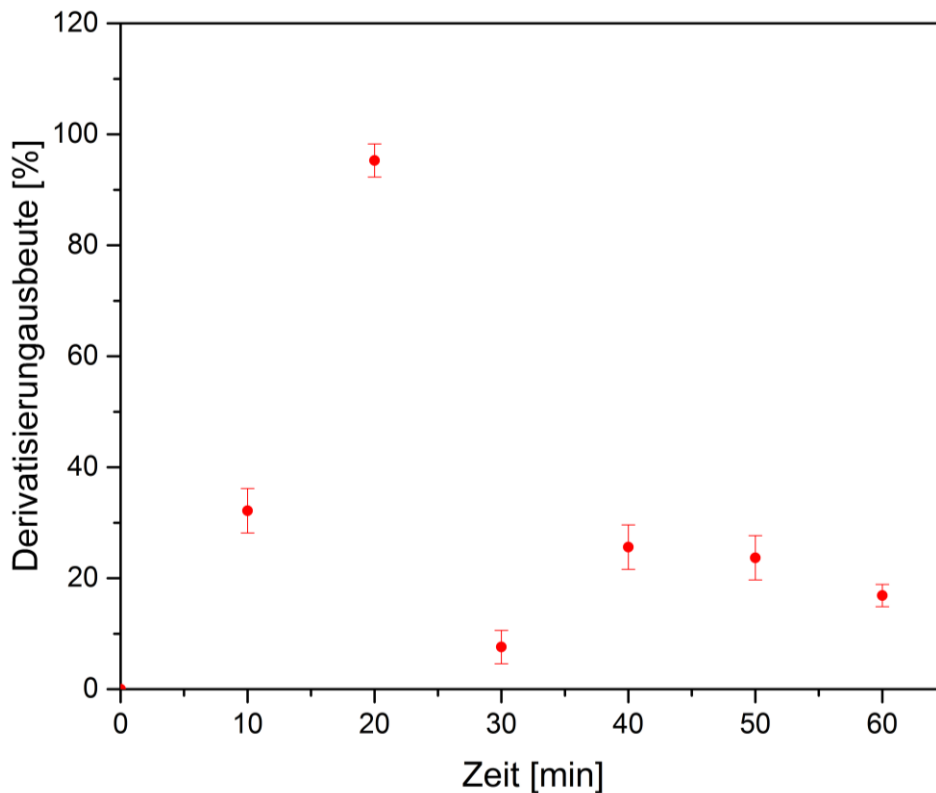


Abbildung 27: XPS-Analyse von einer mit einem feuchten Sauerstoffplasma behandelten und mit TFBA derivatisierten Oberfläche. Aufgetragen wurde die Intensität die Aminogruppenkonzentration bestimmt aus dem CF₃-Komponentenpeak im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum nach Gleichung 3-1 in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeit.

Außer dem wasserbasierten Sauerstoffplasma wurden die Si₃N₄-Oberflächen auch einer Behandlung mit einem Ammoniakplasma unterzogen (Abbildung 26). Hierfür wurden die frisch gereinigten Oberflächen bei einem Druck von 0.2 mbar und einem Gasfluss von 20 sccm NH₃-Gas zeitabhängig plasmabehandelt. Die Oberflächen wurden jeweils vor und nach der Plasmabehandlung mit XPS untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Unterschiede in der Elementzusammensetzung der Proben beobachtet werden. Die Untersuchung der Oberflächen nach der Derivatisierung mit TFBA ergaben bereits nach einer Behandlungszeit von zwei Minuten eine signifikante CF₃-Konzentration (Abbildung 28) und somit eine substantielle Aminogruppendichte. Es scheint eine Sättigung der Oberfläche mit Aminogruppen erreicht zu sein. Bei längeren Behandlungszeiten zeigen sowohl das feuchte Sauerstoffplasma als auch das Ammoniakplasma einen deutlichen Abfall der Aminogruppenkonzentration, was durch eine stattfindende Konkurrenzreaktion zwischen der Funktionalisierung der Oberflächen und dem Sputterabtrag durch die Plasmapartikel erklärt

werden kann. Habraken und Kuiper beschrieben hierzu am Beispiel des feuchten Sauerstoffplasmas, dass zunächst Aminogruppen erzeugt werden, bei anhaltender Plasmabehandlung jedoch Si-OH, Si-NH und Si-NH₂ Gruppen gebildet werden und schließlich Ammoniak abgespalten wird.^[90, 97] Da beide Plasmabehandlungen weder zuverlässige noch reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wurde diese Strategie nicht weiter untersucht.

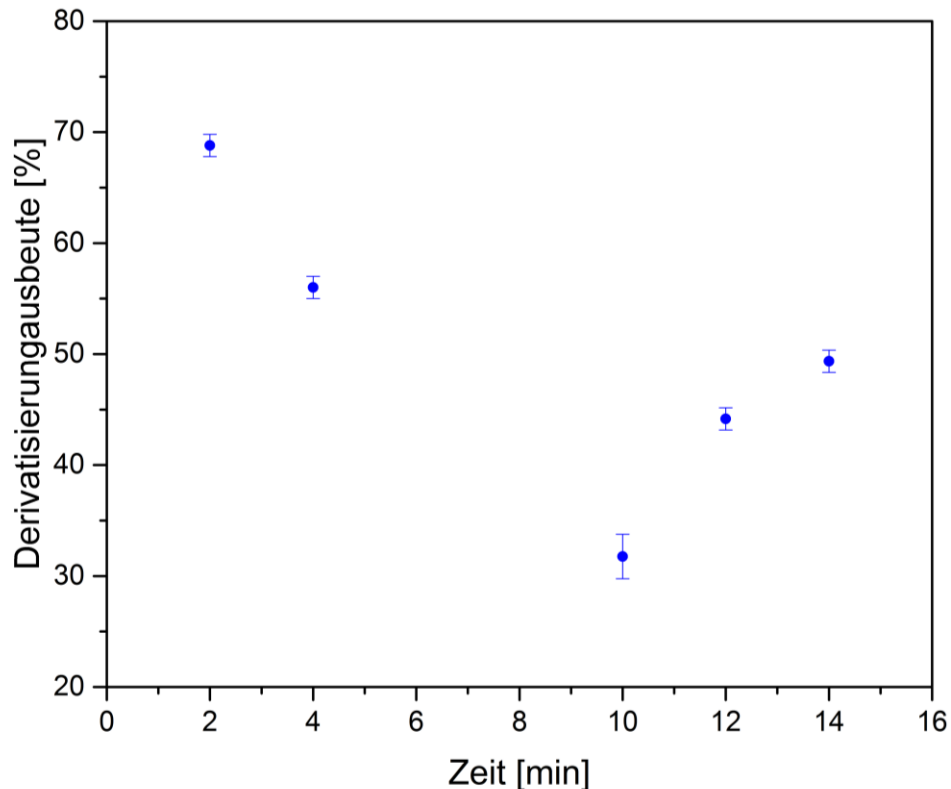


Abbildung 28: XPS-Analyse von einer mit einem NH₃-Plasma behandelten und mit TFBA derivatisierten Oberfläche. Aufgetragen wurde die Intensität die Aminogruppenkonzentration bestimmt aus dem CF₃-Komponentenpeak im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum nach Gleichung 3-1 in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeit.

Trotz der Behandlung der Si₃N₄-Oberfläche mit dem feuchten Sauerstoffplasma oder dem Ammoniakplasma ist im Vergleich zur Erzeugung der Aminogruppen mit BHF offensichtlich eine signifikant höhere Aminogruppenkonzentration erreichbar. Der nötige Aufwand einen stabilen Plasmaprozess zu entwickeln, mit dem man reproduzierbare Ergebnisse erhalten würde, wäre aber erheblich. Aufgrund der zuverlässigeren Resultate und des einfacheren Prozesses wurden in dieser Arbeit nur die durch Flusssäureätzung erzeugten Si-NH_x-Oberflächen benutzt. Die Plasmabehandlung der Oberflächen als alternative Möglichkeit zur

Erzeugung einer höheren Aminogruppenkonzentration sollte jedoch in weiteren Arbeiten berücksichtigt werden.

3.2.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die native Siliziumnitridschicht analysiert und anschließend die im Rahmen der vorgestellten Experimente beste Methode zur Erzeugung von Si-NH_x-Bindungen ermittelt. Dafür wurden zunächst unterschiedliche Reinigungsmethoden untersucht. Die Bewertung erfolgte anhand der C 1s- und O 1s-Konzentration auf der Oberfläche, bestimmt aus den XPS-Übersichtsspektren. Alle Schritte sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die optimale Reinigungsmethode für die in dieser Arbeit verwendeten Oberflächen bestand in der Entfernung von Kohlenstoff-Kontaminationen mit Isopropanol und UV/O₃ gefolgt von einer fünf-minütigen Behandlung mit BHF zur Entfernung der nativen Oxidschicht.

Anschließend wurde mit CD-XPS mit 4-Trifluormethylbenzaldehyd (TFBA) als XPS-Sonde überprüft, ob adressierbare Si-NH_x-Gruppen erzeugt wurden. Die berechnete Ausbeute der erzeugten Aminogruppen für eine mit BHF für fünf Minuten gereinigte Oberfläche war 20 % und sollte in weiteren Experimenten mit alternativen Methoden verbessert werden. Durch die Verwendung eines Plasmas konnte zwar die Ausbeute der erzeugten Aminogruppen deutlich gesteigert werden, jedoch ließen sich die Ergebnisse nur schwer reproduzieren.

Das XPS Si/N-Atomzahlverhältnis einer nativen unbehandelten Siliziumnitrid-Oberflächen betrug 0.8. Nach der Reinigung mit Isopropanol, UV/O₃ und H₃PO₄ änderte sich das Si/N-Atomverhältnis nicht. Nach der Reinigung mit HF bzw. BHF wurde ein Si/N-Atomverhältnis von 0.6 bzw. 0.7 berechnet.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der unterschiedlichen Reinigungsschritte und Strategien zur Aminogruppenbildung an der Si₃N₄-Oberfläche

Reinigungsmethode	Reinigungszeit (min)	C (at.%)	O (at.%)	Si/N	Bemerkung
Isopropanol	2 x 10	10	18	0.8	Entfernung von Kontaminationen
UV/O ₃	20	4	20	0.8	Entfernung von C-Kontaminationen
BHF	5	6	3	0.6	Erzeugung von NH _x
HF (1 %)	5	9	4	0.6	Erzeugung von NH _x
HF (2.5 %)	5	8	6	0.7	Erzeugung von NH _x
H ₃ PO ₄	20	11	16	0.8	Erzeugung von NH _x
H ₂ O/O ₂ -Plasma	1-60	3-8	20-30	0.9	Erzeugung von NH _x
NH ₃ -Plasma	1-14	5-20	10-20	0.9	Erzeugung von NH _x

3.3. Erzeugung einer Azid-terminierten Siliziumnitrid-Oberfläche

3.3.1. Stand der Forschung

Azide dienen häufig als Schutzgruppe für Amine und aufgrund ihrer hohen Reaktivität können leicht neue Funktionalitäten eingeführt werden. Durch die reaktive Nutzung der Azidgruppe eröffnen sich zahlreiche Möglichkeiten wie die Click-Chemie. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die hochexplosive Stickstoffwasserstoffsäure (HN₃) von Curtius hergestellt.^[98-99] Aufgrund von neuen Anwendungsoptionen in der Synthese von Heterocyclen,^[100] wie zum Beispiel Triazolen und Tetrazolen, dem Einsatz als Treibmittel und als funktionelle Gruppe in Medikamenten gewannen Azide in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts vermehrte an Interesse. So spielen Azidonukleoside eine wichtige Rolle in der AIDS-Therapie.^[101-102] Ein Nachteil bei dem Umgang mit Aziden ist, dass einige bereits bei geringer Energiezufuhr durch Schlag, Druck oder bei Temperaturerhöhung unter Stickstoffentwicklung zerfallen. Aufgrund ihrer explosiven Eigenschaften finden Schwermetallazide daher Anwendung als Initialzündler in der Sprengstofftechnik und Natriumazid wird in Airbags^[103] verwendet.

Die vielfältigen Möglichkeiten der Azidchemie resultieren aus den physikochemischen Eigenschaften der Azide. Aus den mesomeren Grenzstrukturen der Azidgruppe ist der reaktive Charakter zu erkennen. Aromatische Azide werden durch Konjugation mit dem aromatischen π -System stabilisiert. Die mesomeren Strukturen c und d, die von Pauling postuliert wurden, erklären die hohe 1,3-dipolare Reaktivität von Aziden und deren leichte Zersetzung (Abbildung 29). Weiterhin kann anhand der Struktur die Regioselektivität von Aziden erklärt werden. Ein elektrophiler Angriff erfolgt von dem Stickstoffatom N¹ (höhere Elektronendichte), ein nucleophiler Angriff dagegen an das Stickstoffatom N³ (geringere Elektronendichte).

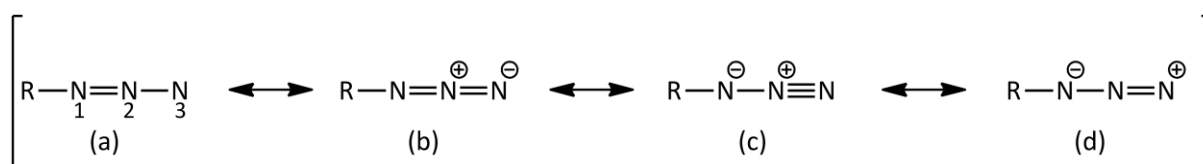


Abbildung 29: Mesomere Grenzformeln eines Azids (a-d), Struktur d zeigt den 1,3-dipolaren Charakter der Azidgruppe.

Oberflächenazide lassen sich auf unterschiedlichen Wegen erzeugen. Die üblichen Synthesewege auf Oberflächen sind die Einführung von N₃-Gruppen durch die Substitution von Halogenen oder Additionsreaktionen. In dieser Arbeit wurden Azidgruppen mit Natriumazid in Anwesenheit von 18-Krone-6 als Phasentransferkatalysator eingeführt. Diese Reaktion folgt nach Ma et al. einem S_N2-Mechanismus.^[104] Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Gruppe um Ma et al. die Reaktion an silanisierten Oberflächen durchführte, aufgrund des Abstandes zur Oberfläche kann daher ein Rückseitangriff erfolgen. Ein Rückseitangriff an Gruppen direkt an der Oberfläche ist jedoch aus sterischen Gründen nicht möglich. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt.

Eine weitere effektive Methode Azidgruppen einzuführen, ist die Diazo-Transfer-Reaktion. Hierbei wird eine Diazogruppe (–N₂) auf ein Amin transferiert, um anschließend ein Azid zu bilden. Eines der am häufigsten genutzten Diazo-Reagenzien ist Triflylazid (TfN₃), was aufgrund seiner Reaktionsfähigkeit unmittelbar vor der Reaktion aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumazid hergestellt werden muss (Abbildung 30).

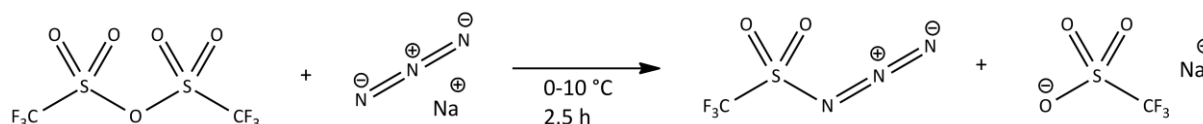


Abbildung 30: Erzeugung von Triflylazid (TfN₃) aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumazid.

In der Diazo-Transfer-Reaktion werden die Azide dann in Anwesenheit eines Kupfer-Katalysators in guten Ausbeuten erzeugt. Bereits in den 1970er Jahren wurde die hohe Reaktivität von Triflylazid und dessen Vorteile gegenüber anderen Diazo-Transfer-Reagenzien wie *p*-Toluolsulfonylazid von Cavender *et al.* beschrieben.^[105] In den 1990er Jahren fanden Azidgruppen Anwendung in der Aminoglykosid-Synthese, veröffentlicht von Greenberg *et al.*,^[106] wodurch sich industrielle Anwendungsmöglichkeiten eröffneten (Abbildung 31).

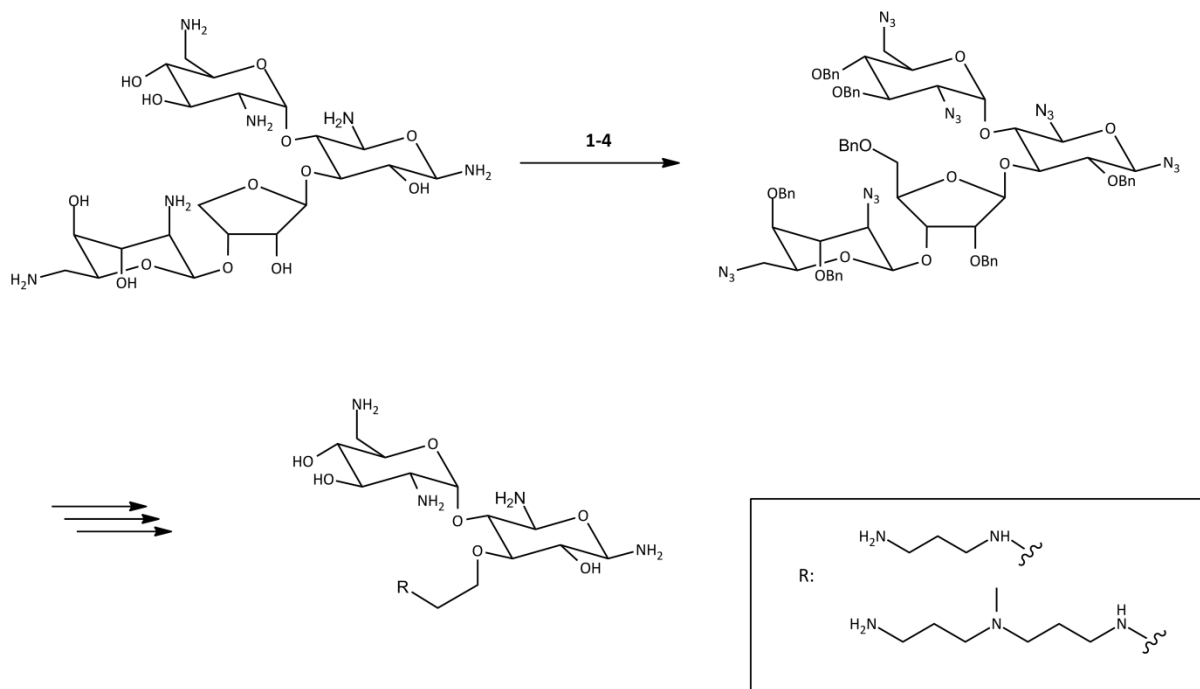


Abbildung 31: Ausnutzung der Azidgruppe zur Herstellung von Aminoglykosiden.^[106] (Reagenzien: **(1)** TfN₃, Et₃N, CuSO₄, MeOH/H₂O/CH₂Cl₂, **(2)** Ac₂O, Pyridin, **(3)** NaOMe, MeOH, 58% von Neomycinsulfat, **(4)** BnBr, NaH, Bu₄NI, DMF, 80%). Nach einer Abfolge von Reaktionen wird das Aminoglykosid gebildet.

Ein Problem bei der Verwendung von Triflylazid besteht jedoch in der hohen Explosivität. Aus diesem Grund und wegen des steigenden Interesses an der Click-Chemie wurden in den letzten 20 Jahren zahlreiche neue Diazo-Transfer-Reagenzien entwickelt. Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid galt für lange Zeit als stabil und umgänglich.^[107-108] Trotz der kinetischen Stabilität der Verbindungen beobachteten Ye et al. während der Herstellung von Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid Gasbildung vom Hydrochlorid, was in Anwesenheit von Natriumazid zur giftigen und explosiven Stickstoffwasserstoffsäure (HN₃) reagiert. Weiterhin wurde die Bildung explosiver Verbindungen, wie Sulfuryldiazid beobachtet. Einige Forschungsgruppen beobachteten bei der Lagerung von Imidazol-1-sulfonyl Hydrochlorid aufgrund des hygroskopischen Verhaltens die Bildung eines braunen Öls, was ebenfalls der hoch explosiven Stickstoffwasserstoffsäure zuzuordnen war.^[109] Aufgrund dieser unberechenbaren Eigenschaften von Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid wurde in dieser Arbeit auf dessen Einsatz verzichtet und ausschließlich Triflylazid, Natriumazid und Natriumazid in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit verwendet.

Trotz der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ist der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach der Untersuchung der Diazo-Transfers-Reaktion von Valin mit ¹⁵N-markiertem Imidazol-1-sulfonylazid mit multinuklearer NMR wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit eines Angriffes auf das terminale Stickstoffatom von Samuelson et al. beschrieben (Abbildung 32). [110-111]

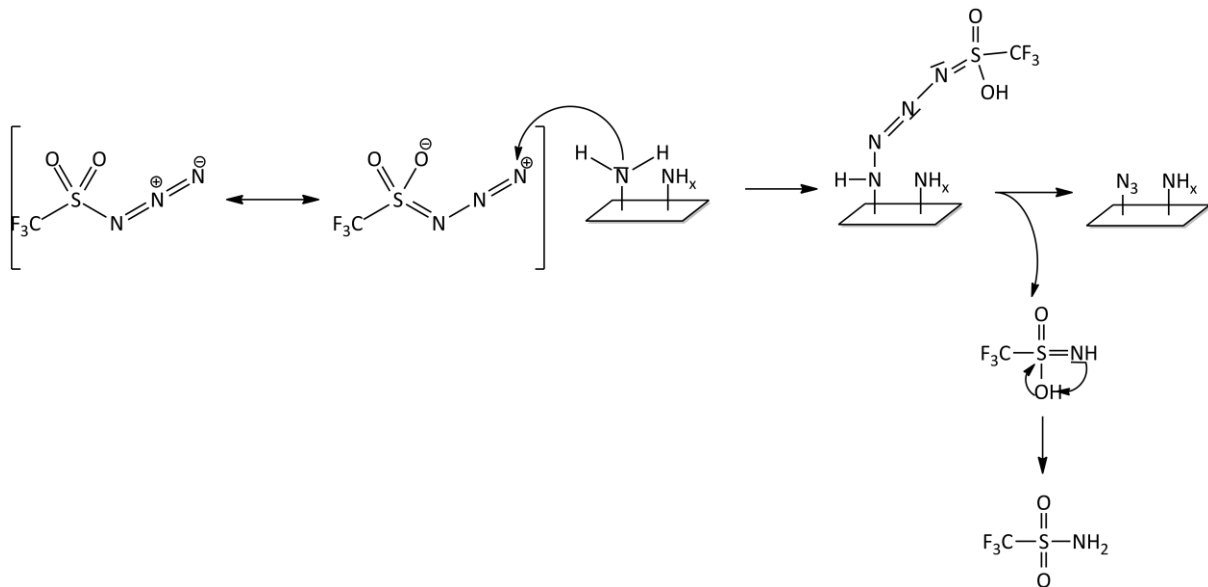


Abbildung 32: Reaktionsmechanismus einer Diazo-Transfer-Reaktion mit Triflylazid an die Si-NH_x-Oberfläche. Der Angriff erfolgt auf das terminale N-Atom der Azidgruppe.

3.3.2. Herstellung und Charakterisierung von N₃-terminierten Siliziumnitrid-Oberflächen

Azidgruppen an der Oberfläche wurden durch die Reaktion frisch hergestellter Aminogruppen mit Natriumazid (Prozess A), durch Diazo-Transfer, mit Natriumnitrit in Salzsäure gefolgt von Natriumazid (Prozess B), mit Trifluormethansulfonylazid (Prozess C) und mit Natriumazid in Anwesenheit von ^tBuONO (Prozess D) erzeugt (Abbildung 33).

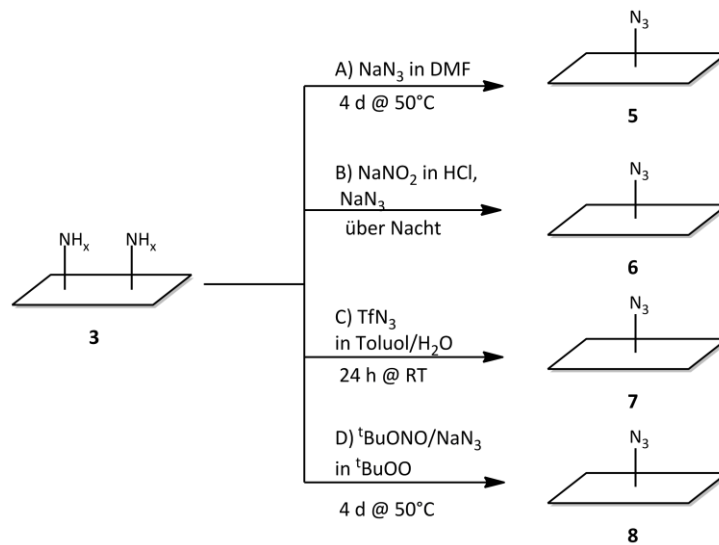


Abbildung 33: Erzeugung einer N₃-terminierten Oberfläche auf einem mit Aminen ausgestattetem Si₃N₄ Substrat. Dargestellt sind die Azidierung mit Natriumazid (Prozess A), mit Natriumnitrit gefolgt von Natriumazid (Prozess B), mit Triflylazid (Prozess C) und mit Natriumazid in Anwesenheit von ^tBuONO (Prozess D).

Die Proben wurden innerhalb fünf Minuten nach der Reaktion mit XPS analysiert. Chemische Informationen werden aus den hochaufgelösten N 1s-XP-Spektren erhalten. Azide haben charakteristische Signale bei 401 eV und 404 eV. ^[47] Eine mit einem Azidosilan beschichtete Si₃N₄-Oberfläche diente als Referenz (Abbildung 34). Hierbei wird das Signal bei 404.5 eV dem elektronenarmen Stickstoffatom in der mittleren Position zugeordnet. Das Signal bei 400.3 eV beschreibt die beiden äußeren energiereicheren Stickstoffatome (Abbildung 29).^[47]

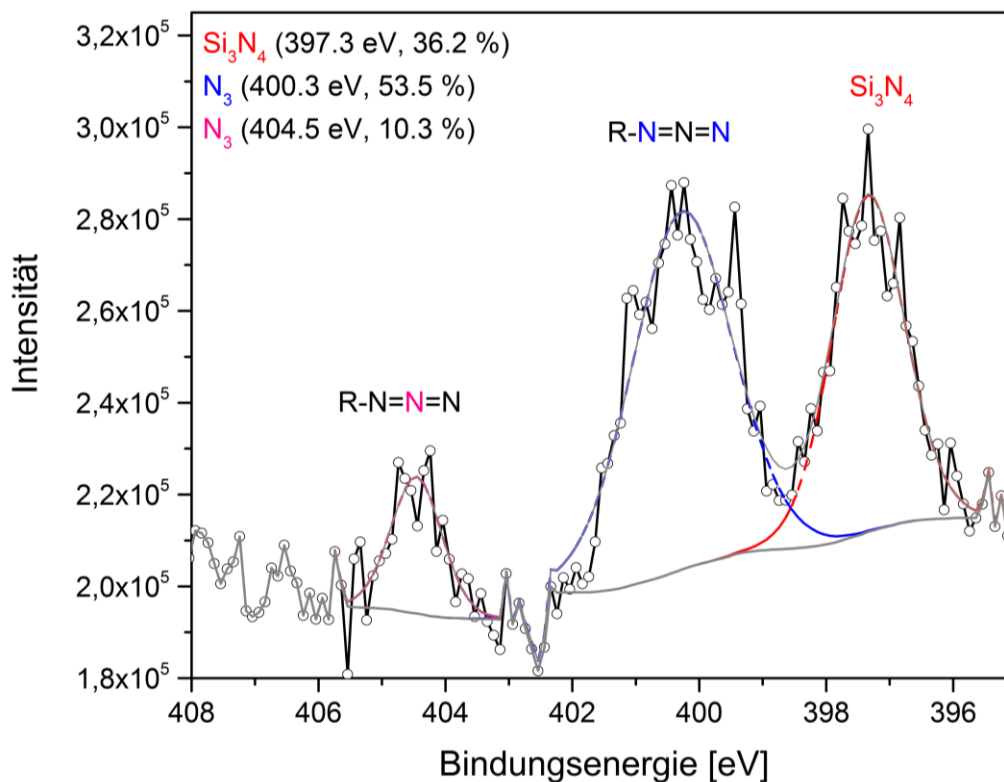


Abbildung 34: Hochauflöstes N 1s-SR-XP-Spektrum einer Si₃N₄-Oberfläche mit einem Azidosilanfilm, aufgenommen bei einem Emissionswinkel von 0° ($z_{95}=4.5$ nm). Zu sehen sind neben dem Substratnitrid bei 397.3 eV die charakteristischen Azidsignale bei 400.3 eV und 404.5 eV.

Die Proben zeigten jedoch nach allen Reaktionen (Prozess A, B, C und D, Abbildung 33) keine azidtypischen Signale im N 1s-SR-XP-Spektrum wie sie an der Azidosilanfilm-Referenz zu finden sind. Azidverbindungen sind instabil, so dass diese bei der Anregung mit Röntgenstrahlung zerstört werden können,^[47, 112] was den Nachweis erschwert. Weiterhin ist es schwierig, das im Vergleich zum dominanten Nitridpeak bei 397 eV schwache Azidsignal zu identifizieren, was mit der relativ geringen Dichte an Aminogruppen und daraus gebildeten Azidgruppen zusammenhängt.

Auch bei der sensitiveren und zerstörungsfreien IR-Spektroskopie (ATR und GIR) von Proben, die mit BHF gereinigt und mittels Prozess B behandelt wurden, konnten keine Azid-Schwingungen beobachtet werden. Lediglich bei der mit Natriumazid (Prozess A) behandelten Probe konnte eine schwache symmetrische Valenzschwingung bei $\nu_{sym}(N_3) = 1380\text{ cm}^{-1}$ ^[113] und eine Valenzschwingung bei $\nu(SiN) = 1074\text{ cm}^{-1}$ ^[113] im GIR-Spektrum beobachtet werden (Abbildung 35), welche einer Azidgruppe zugeordnet werden kann. Die Azid-

Konzentration befand sich, wie bei der XPS, im Bereich der Nachweisgrenze. Daher wurden frisch generierte N_3 -Oberflächen sofort in einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition weiterverwendet und anschließend indirekt mit XPS analysiert.

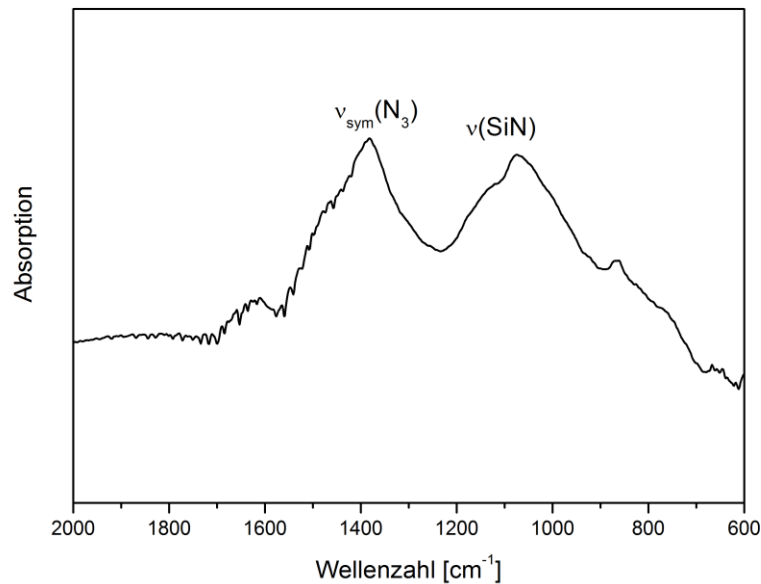


Abbildung 35: GIR-Spektrum einer mit Natirumazid in DMF/H₂O (Prozess A) azidierten Si_3N_4 -Oberfläche.

3.3.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden N_3 -terminierte Si_3N_4 -Oberflächen durch vier unterschiedliche Azidierungsmethoden erzeugt. Aufgrund des schwierigen Nachweises neben dem intensiven Nitrid-Signal des Substrats sowie der Instabilität von Azidgruppen konnte keine direkte detaillierte Analyse durchgeführt werden. Der Nachweis erfolgte daher indirekt nach der Durchführung der Click-Chemie mit XPS und ToF-SIMS.

3.4. Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mit Fluor-substituierten Alkinen

3.4.1. Stand der Forschung

In der Natur werden Verbindungen häufig durch die Verknüpfung von C-C-Bindungen unter Ausnutzung der Carbonylchemie gebildet, wobei spezifisch, katalytisch wirkende Enzyme zum Einsatz kommen.^[114] Um vollständig ablaufende Reaktionen zu erhalten, muss während der Synthese zumeist das Reaktionsgleichgewicht durch Entfernen von Wasser (Prinzip von Le Chatelier) verschoben werden. Weitere Möglichkeiten die Reaktionen zu beeinflussen, sind parallel ablaufende exotherme Reaktionen oder intramolekulare Ringschlüsse. Die eingesetzten Katalysatoren erreichen dabei jedoch nicht die Regioselektivität und Effizienz der natürlichen Enzyme. Trotzdem setzt die pharmazeutische Industrie meistens auf Carbonylreaktionen, um neue Medikamente zu synthetisieren. Die aufwendigen Synthesen benötigen oft viele Jahre, um von der Forschung bis zur Produktionsreife des fertigen Medikaments zu gelangen. Dabei treten häufig Probleme bei der Verfahrensentwicklung im Produktionsmaßstab auf, die meistens erst spät berücksichtigt werden.^[114]

Kolb et al. beschrieben 2001 eine effektive alternative Synthesestrategie von Naturstoffen, die sich am Aufbau von Makromolekülen, wie Polysacchariden, Polypeptiden oder Polynucleotiden, orientiert. Die Moleküle werden dabei durch Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen aus kleinen Einheiten verknüpft und müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. So müssen die Verbindungen sowohl modular aufzubauen sein als auch große Anwendungen finden. Außerdem müssen die Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen, mit leicht entfernbaren oder umweltfreundlichen Lösungsmitteln ablaufen und selektiv zu hohen Ausbeuten führen.^[115] Weiterhin sollen sich die Produkte durch Umkristallisation ohne Chromatographie reinigen lassen und unter physiologischen Bedingungen stabil sein.^[114] Die Click-Reaktionen verfügen alle über eine thermodynamische Triebkraft und führen selektiv zu einem Produkt durch Verknüpfung der Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung.^[116] Nach Sharpless ist die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen nach Huisgen eine der effektivsten Methoden neuartige Verbindungen zu synthetisieren. Sie wurde bereits in den 1960er Jahren von R. Huisgen entwickelt und bildet die Grundlage der heutigen „Click-Chemie“. Der Begriff „Click-Chemie“ wurde jedoch erst 2001 von K. B. Sharpless eingeführt^[114, 117] und folgende Reaktionen zählen zur Click-Chemie:

- Addition an C-C-Mehrfachbindungen (Epoxidierungen und Michael-Additionen)
- nichtaldolartige Carbonylreaktionen (Bildung von Harnstoffen, Thioharnstoffen, aromatischen Heterocyclen, Oximen, Hydrazonen und Amidinen)
- nucleophile Substitutionen (Ringöffnung von Epoxiden, Aziridinen, Aziridiniumionen und Episulfoniumionen)
- Cycloadditionen (1,3-dipolare Cycloadditionen, Diels-Alder-Reaktionen)

Bei der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen werden in einer konzertierten und pericyclischen Reaktion zwei π -Elektronen des Alkins und vier Elektronen des Azids verschoben (Abbildung 36). Die Edukte müssen jedoch eine energetisch ähnliche Lage der höchsten besetzten Orbitale (HOMO) und der niedrigsten unbesetzten Orbitale (LUMO) besitzen. Durch die Verwendung einer Vielzahl von Alkinen ist es möglich, zahlreiche neue Funktionalitäten einzuführen und dadurch neue Verbindungen zu erzeugen. Nachteile der 1,3-dipolaren Cycloaddition sind jedoch die meist erhöhten Reaktionstemperaturen und die Bildung einer Mischung der 1,4- und 1,5-Regioisomere.^[117]

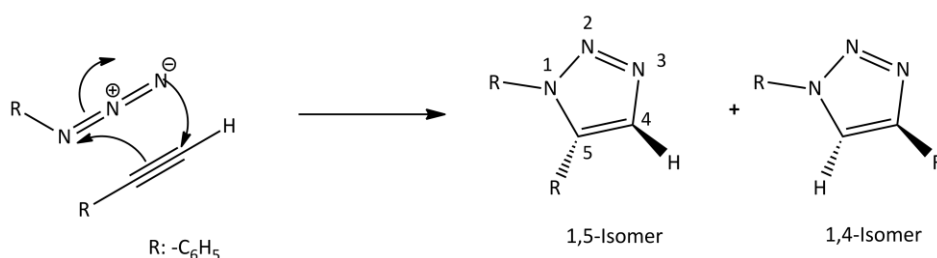


Abbildung 36: Reaktionsmechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen.

Das Problem der Regiospezifität lösten Sharpless et al. durch die Zugabe eines Kupfer(I)-Katalysators, welcher *in situ* aus Kupfer(II)sulfat in Anwesenheit von Natriumascorbat erzeugt wird.^[117] Sowohl die Gruppe um Sharpless als auch die Gruppe Meldal beschrieben unabhängig voneinander die ausschließliche Bildung des 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols und damit die regiospezifische Reaktion.^[116-118] Weiterhin läuft die Kupfer-katalysierte Reaktion bei Raumtemperatur und in wässrig, ethanolischen Lösungsmitteln bei neutralen pH-Werten ab. Durch die Zugabe des Katalysators konnte die Reaktionsgeschwindigkeit um das 10^7 - bis 10^8 -fache gegenüber der unkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition erhöht werden.^[119] Doch der Mechanismus der CuAAC ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Nach

Sharpless *et al.* koordiniert im ersten Schritt der CuAAC der Kupfer-Katalysator an die Dreifachbindung des Alkins unter Bildung eines Kupfer(I)acetylid **I** (Abbildung 37). Im nächsten Schritt kann die Azidgruppe an das Kupfer-Zentrum binden und es entsteht eine aktivierte Spezies **II**. Diese reagiert anschließend zum sechsgliedrigen Kupfer enthaltenen Intermediat **III**, woraus das thermisch und hydrolytisch stabile Triazol mit hoher Regioselektivität und in hohen Ausbeuten gebildet wird.^[117] Bräse *et al.* beschrieben dagegen eine konzertierte [3+2]-Cycloaddition (Abbildung 37 B, direkter Weg).^[100]

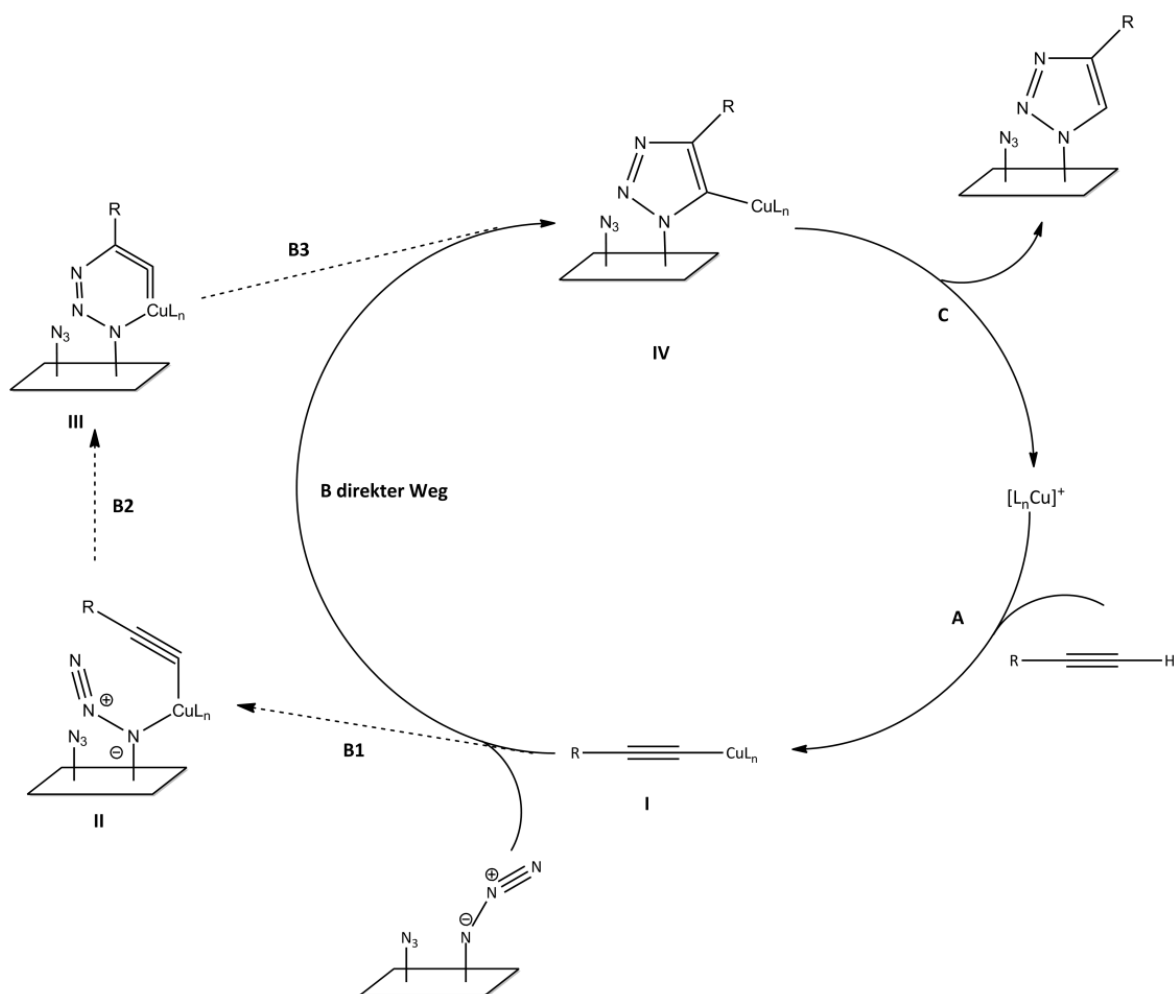


Abbildung 37: Reaktionsmechanismus der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition an der Oberfläche nach Barry K. Sharpless^[117] und Stefan Bräse.^[100]

Aufgrund der hohen Ausbeuten, der milden Reaktionsbedingungen und der Regiospezifität findet die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) hohe Anwendungspotentiale und erfreut sich großer Beliebtheit.^[120-123] Daher wird sie häufig als Synonym für die Click-

Chemie verwendet. So kommt die CuAAC beispielsweise in der Synthese von Rotaxanen und Catenanen,^[124-126] zur Synthese von Kohlenhydratderivaten in der Arzneimittelforschung^[127-129] und zur Herstellung von geordneten Blockcopolymeren zum Einsatz.^[130] Neben der Verwendung der Click-Chemie zur Synthese unterschiedlicher Verbindungen gibt es zahlreiche Forschungsgruppen, die die CuAAC nutzen, um gezielt organische Schichten auf Oberflächen zu erzeugen.^[120, 123, 131-133] So stellte die Gruppe um Schalley Rotaxan-Photoschalter her (Abbildung 38), die an einen Azido-SAM auf Goldoberflächen immobilisiert wurden.^[134-135]

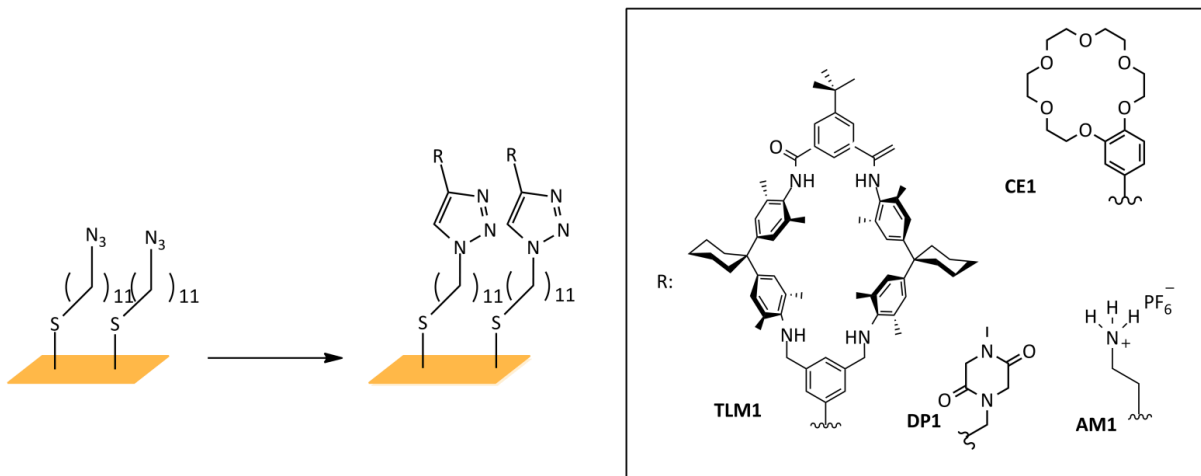


Abbildung 38: Anbindung von Rotaxanen an die Gold-Oberfläche über die CuAAC.^[121]

Chidsey et al. beschrieben die Modifizierung von Elektroden mit Ferrocen durch die Click-Chemie, um Elektronentransferprozesse an hochgeordneten Goldelektroden-Oberflächen zu untersuchen (Abbildung 39).^[133]

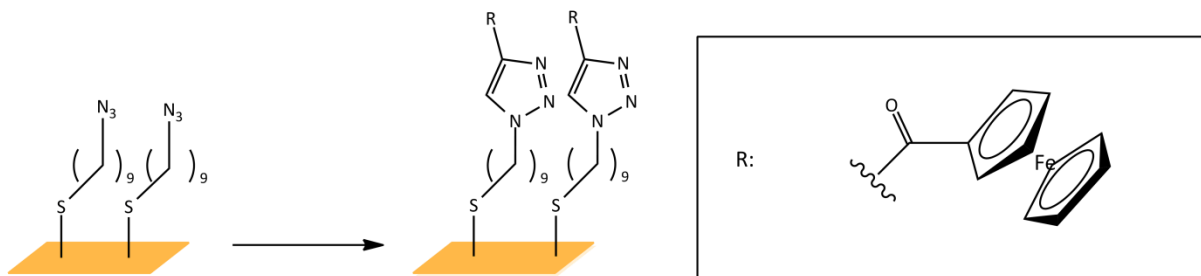


Abbildung 39: Anbindung von Ferrocen an die Gold-Oberfläche über die CuAAC zur Untersuchung von Elektronentransferprozessen.^[133]

Weiterhin gibt es einige Veröffentlichungen, die die selektive und effiziente Funktionalisierung von Oberflächen durch Click-Chemie beschreiben, um Sensoren herzustellen.^[40, 136-138] Die für die CuAAC benötigten Azidgruppen werden dabei in der Regel durch die Erzeugung von SAMs mittels Azidosilanen oder Azidothiolen eingeführt, wobei die bereits diskutierten Schwierigkeiten der Silanisierungsreaktion wie die schlechte Reproduzierbarkeit und schlecht kontrollierbare Schichtdicke vernachlässigt werden. Die Einführung von Azidgruppen direkt an der Oberfläche wurde bisher nur selten beschrieben.^[91]

In dieser Arbeit wird die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) verwendet, um unter milden Reaktionsbedingungen Alkine direkt an die azid-terminierte Oberfläche eines Si_3N_4 /Siliziumwafer-Substrats zu immobilisieren und so die unzuverlässige Silanchemie bei der Herstellung von Biosensoren auf Siliziumwafern zu vermeiden.

3.4.2. Herstellung und Charakterisierung von organischen Schichten auf Siliziumnitrid-Oberflächen

Einen wesentlichen Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Entwicklung einer neuartigen Funktionalisierungsstrategie zur Erzeugung von organischen Monoschichten auf Siliziumnitrid dar. Dafür wurden die frisch erzeugten Oberflächenamine durch verschiedene Diazo-Transfer-Reaktionen (Reaktionen A-D) in Azidgruppen überführt, um diese anschließend der CuAAC, im Folgenden Click-Chemie genannt, zugänglich zu machen. Die Methodenentwicklung erfolgte mit fluorierten Alkinen, 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol (Abbildung 40). Da der direkte Nachweis der Azidgruppen auf Si₃N₄ aufgrund der zu geringen Anzahl nicht möglich war, erfolgte der Nachweis indirekt nach erfolgter Click-Chemie, da der gebildete fluorsubstituierte Triazolringe mit XPS einfach detektierbar ist. Die Analyse der Oberflächen erfolgte mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS.

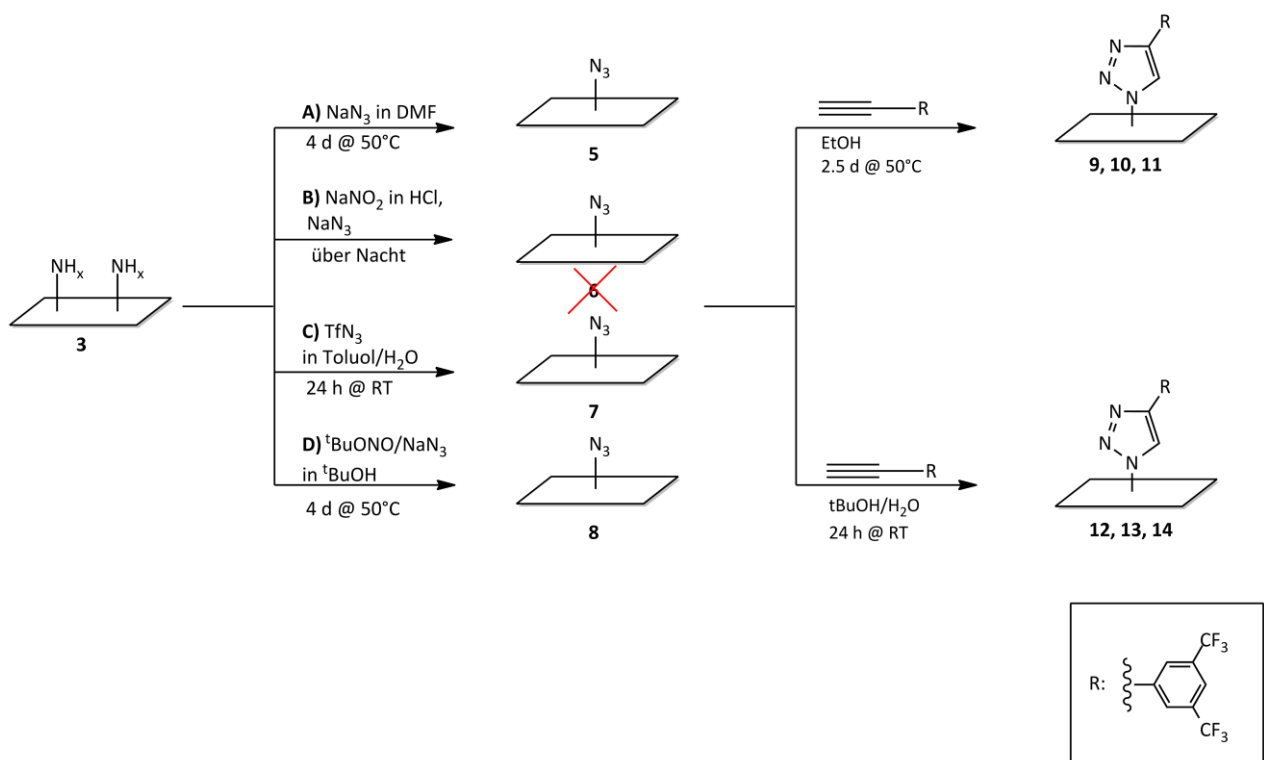


Abbildung 40: Erzeugung von organischen Schichten durch Click-Chemie. Die Click-Chemie wurde jeweils mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol bzw. *tert*-Butanol/Wasser durchgeführt.

Die Elementzusammensetzung einer gereinigten Probe **3**, einer nach Prozess C azidierten Probe **7** sowie eine in Ethanol geklickte Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C **9**,

Prozess A **10** und Prozess D **11** ist in Tabelle 6 dargestellt. Im Vergleich zu der NH_x-terminierten **3** bzw. N₃-terminierten **7** Oberfläche wurde auf den geclickten Oberflächen **9-11** eine deutlich höhere Kohlenstoffkonzentration nachgewiesen, was durch die Bindung des Alkins an die Oberfläche zu erklären ist. Weiterhin konnte auf den Oberflächen **9** und **10** nach der Click-Reaktion Fluor nachgewiesen werden, was ebenfalls auf die erfolgreiche Reaktionssequenz Aminierung, Azidierung und Click-Reaktion hinweist. Lediglich auf der nach Prozess D azidierten und geclickten Oberfläche **11** konnte kein Hinweis auf organisches Fluor und somit das immobilisierte Alkin gefunden werden. Die im Vergleich zur gereinigten Oberfläche erhöhte Sauerstoffkonzentration auf den geclickten Oberflächen kann auf Oxidationsprozesse während der Reaktionen zurückgeführt werden. Zusätzlich wurde das Signal des Si₃N₄-Substrats gedämpft, was auf eine erfolgreiche Click-Chemie hinweist.

Tabelle 6: XPS Elementzusammensetzung und Element-Bindungsenergien (BE) einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche (**3**), einer Azid-terminierten Si₃N₄-Oberfläche (**7**) und einer geclickten Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C (**9**), Prozess A (**10**) und Prozess D (**11**) gefolgt von der CuAAC in Ethanol.

Probe	Si 2p (at.%)	C 1s (at.%)	N 1s (at.%)	O 1s (at.%)	F 1s (at.%)
3	35.0 (±0.2 %)	2.0*(±0.2 %)	55.3 (±0.3%)	2.7 (±0.2 %)	2.0 # (±0.2 %)
7	32.8 (±0.2 %)	9.2 (±0.2 %)	44.6 (±0.3 %)	11.9 (±0.2 %)	0.4 # (±0.3 %)
9	29.0 (±0.2 %)	15.7 (±0.2 %)	39.3 (±0.2 %)	11.5 (±0.2 %)	3.3 ^{a)} (±0.2 %)
10	27.9 (±0.1 %)	16.1 (±0.1 %)	37.1 (±0.2 %)	16.3 (±0.2 %)	0.5 ^{a)} (±0.2 %)
11	23.4 (±0.1%)	23.2 (±0.2 %)	29.9(±0.2 %)	19.9 (±0.2 %)	0.4 # (±0.2 %)

* Von nicht entfernbaren organischen kohlenstoffhaltigen Kontaminationen, # anorganisches Fluor von der Flusssäure-Ätzung, ^{a)} organisches Fluor von der CF₃-Gruppe des Alkins

Die Azidierung nach Prozess C gefolgt von der Click-Chemie mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol durchgeführt für 2.5 Tage bei 50 °C in Ethanol wird exemplarisch erläutert. Gezeigt werden die C 1s-, F 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren (Synchrotron-XP-Spektren) nach den Reaktionsschritten. In der C 1s-Region der geclickten Oberfläche **9** sind neben CC/CH-Komponenten bei 285.0 eV, welche dem aromatischen Ring und dem gebildeten Triazol-Ring zuzuordnen sind, auch Triazol-spezifische CN-Bindungen bei 286.5 eV und der CF₃-Substituent des Alkins bei 293.3 eV zu finden (Abbildung 41 a). Diese Komponenten treten eindeutig erst nach der Reaktionssequenz Azidierung und Click-Reaktion auf. Auf der Negativkontrolle konnten ebenfalls keine Hinweise auf das Alkin gefunden werden (Spektrenanhang 7.7). Eine Immobilisierungseffizienz der Reaktion von (15±1) % wurde nach

Gleichung 3-1 aus der experimentell ermittelten CF₃-Peakfläche (2.9 %) und einer vollständig derivatisierten Oberfläche (20 %) bestimmt. Auch in der F 1s-Region wurde die CF₃-Gruppe bei 689.8 eV gefunden (Abbildung 41 b). Der nach der Click-Chemie gebildete Triazol-Ring (399.9 eV) wurde im N 1s-SR-XP-Spektrum neben dem Nitridpeak (Substrat) (397.9 eV) identifiziert. (Abbildung 41 c).

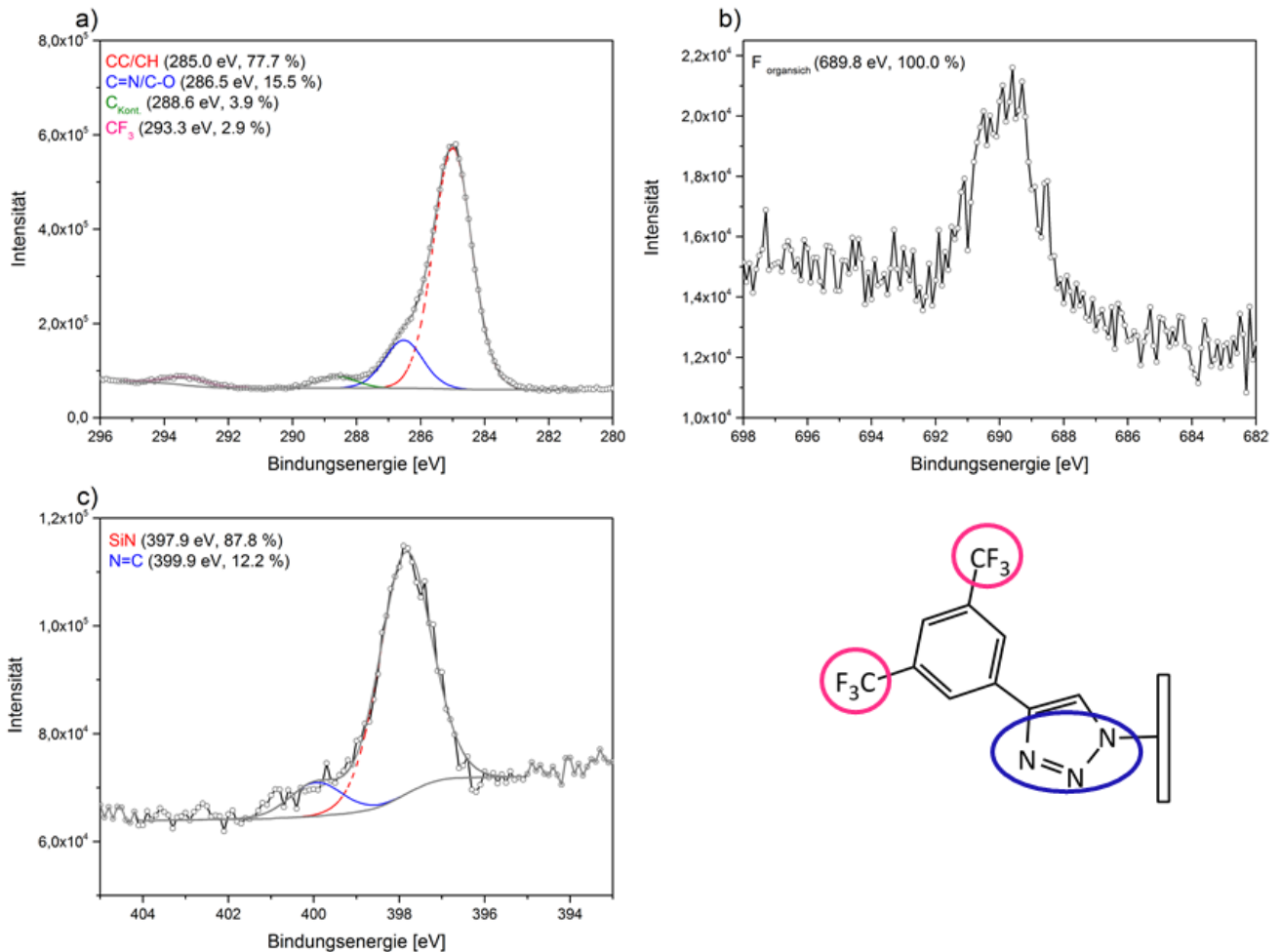


Abbildung 41: Hochaufgelöste C 1s- (a), F 1s- (b) und N 1s- (c) SR-XP-Spektren von nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche **9** ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV), $z_{95}=0.7$ nm für F 1s ($h\nu=780$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Auch das NEXAFS C K-Kanten- und F K-Kanten-Spektrum bestätigen die Immobilisierung des Alkins. Die C K-Kante der geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche **9** zeigt eine erhöhte σ_{C-H}^* bzw. $\pi_{C=N}^*$ -Resonanz (Abbildung 42 a) und in der F K-Kante tritt eine Resonanz der CF₃-Gruppe auf (Abbildung 42 b). Durch die Identifikation des auf der Oberfläche gebundenen Alkins konnte

ein indirekter Nachweis der gebildeten Azidgruppen und ein direkter Nachweis der erfolgreichen Click-Reaktion geführt werden.

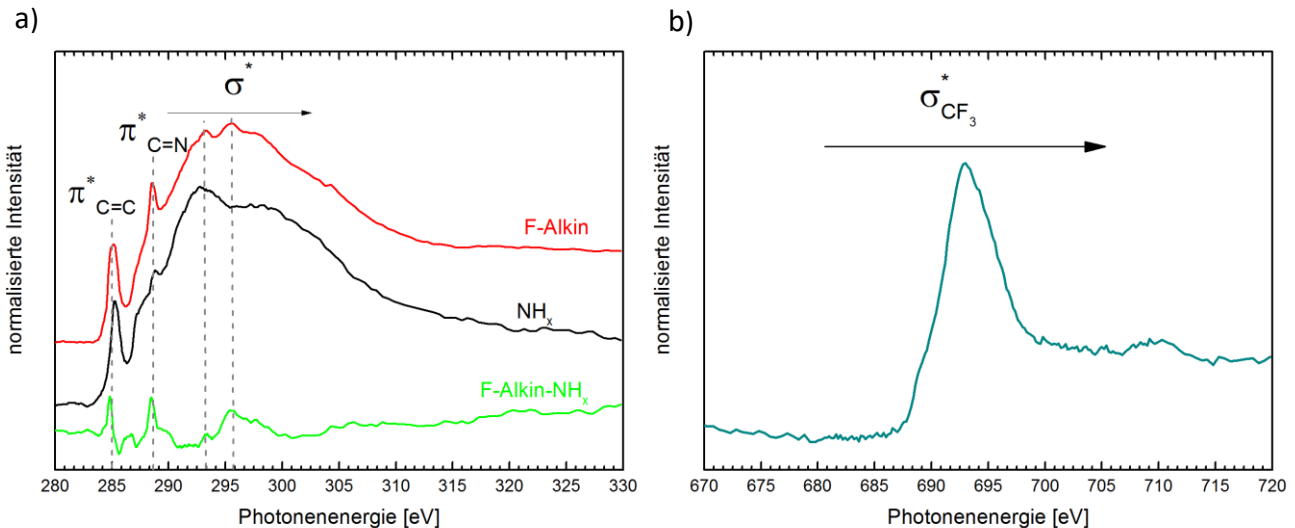


Abbildung 42: NEXAFS C K-Kante und F K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche **9**, aufgenommen bei 55°. Die C K-Kante zeigt die geklickte Probe im Vergleich zu einer gereinigten Oberfläche **3**. In der F K-Kante sind σ^* -Resonanzen der CF₃-Gruppe zu sehen.

Zusätzlich zu den XPS- und NEXAFS-Messungen der azidierten und geklickten Oberflächen wurden alle Proben mit statischer ToF-SIMS untersucht. Abbildung 43 zeigt das ToF-SIMS-Massenspektrum gemessen im positiven Ionenmodus in einem Massenbereich von m/z 0 bis 242 einer nach Prozess C azidierten und in Ethanol geklickten Oberfläche **9**. Sekundärionenfragmente, die auf die erfolgreiche Immobilisierung des Alkins an die Azidgruppen schließen lassen, wurden bei $m/z = 69.99$ (CF₃⁺) und $m/z = 213.02$ (C₈H₃F₆⁺) gefunden. Weiterhin wurde das Fragment bei $m/z = 68.03$ (C₂H₂N₃⁺) mit dem gebildeten Triazolring in Verbindung gebracht, was auch auf die erfolgreiche Bindung hinweist. Bei dem Vergleich der ToF-SIMS-Massenspektren von einer gereinigten Oberfläche **3** und einer azidierten Oberfläche **7** sind diese Sekundärionenfragmente nicht zu finden.

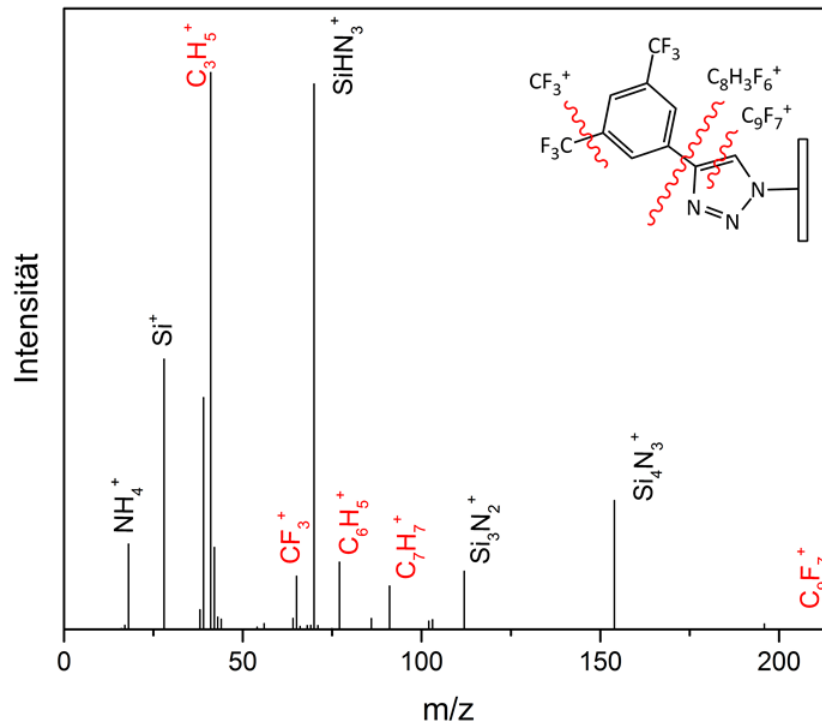


Abbildung 43: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer nach Prozess C azidierten und in Ethanol geclickten Oberfläche 9.

Zur Erzeugung gut reproduzierbarer organische Monoschichten wurden verschiedene Diazo-Transfer-Reaktionen durchgeführt, die indirekt nach der Click-Reaktion nachgewiesen wurden. Die Bewertung der Reaktionen erfolgte mittels der Funktionalisierungsausbeuten, die jeweils aus der Peakfläche des CF₃-Signals aus dem hochaufgelösten C 1s-SR-XP-Spektrum berechnet wurden.

Tabelle 7: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Daten von einer mit BHF gereinigten Oberfläche (**3**) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C (**9**), Prozess A (**10**) und Prozess D (**11**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Probe	Komponentenpeakfläche (%)								
	C 1s					N 1s			
	CC,CH	C-N/C=N	Kont.	CF ₃	Ausbeute CF ₃ (%)	Si ₃ N ₄	C=N	N ₃ (δ^-)	N ₃ (δ^+)
3	90.3	8.2	1.6	-	-	-	-	-	-
9	77.7	15.5	3.9	2.9	15 (± 1 %)	87.8	12.2	-	-
10	76.3	17.9	5.2	0.7	5 (± 2 %)	69.9	19.3	7.6	3.3
11	85.9	10.0	4.1	-	-	100	-	-	-

In Tabelle 7 ist deutlich erkennbar, dass die nach Prozess C azidierte und geclickte Si₃N₄-Oberfläche **9**, die höchste Ausbeute lieferte im Vergleich zu den anderen Azidierungsmethoden. Hier konnte das immobilisierte Alkin eindeutig im hochaufgelösten C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektrum identifiziert werden. Die Immobilisierungseffizienz war 15 % bezogen auf die CF₃-Konzentration im C 1s-SR-XP-Spektrum.

Die Click-Reaktion nach der Azidierung nach Prozess A, Oberfläche **10** konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Bei dieser Reaktion konnte die organische Fluorkomponente der CF₃-Gruppe sowohl im C 1s- als auch im F 1s-SR-XP-Spektrum nachgewiesen werden, jedoch mit einer deutlich geringeren Funktionalisierungsausbeute von 5 %. Weiterhin wurden im N 1s-SR-XP-Spektrum, neben dem Nitridpeak bei 397.9 eV und der Triazolkomponente bei 400.2 eV, zwei weitere Signale bei 401.9 eV und 403.9 eV gefunden. Diese werden den Azidgruppen zugeordnet (Abbildung 29). Triazole haben im Gegensatz zu Azidgruppen einen verbreiterten Peak, der zu niedrigeren Bindungsenergien von ungefähr 400 eV verschoben ist. Aus der nicht reagierten Azid-Komponenten im N 1s-SR-XP-Spektrum ist zu schließen, dass die Reaktion nach einer Reaktionszeit von 2.5 Tagen noch nicht vollständig abgelaufen ist. Sekundärionenfragmente, die auf die erfolgreiche Immobilisierung des Alkins an die Azidgruppen schließen lassen, wurden bei dieser Probe ebenfalls nachgewiesen. Sekundärionenfragmente bei $m/z = 69.99$ (CF₃⁺) und $m/z = 213.02$ (C₈H₃F₆⁺) sowie bei $m/z = 68.03$ (C₂H₂N₃⁺) wurden mit dem Substituenten (CF₃) und dem gebildeten Triazolring in Verbindung gebracht. Die Intensität ist jedoch deutlich geringer im Vergleich zur Probe **9** und unspezifische Kohlenwasserstoffe überlagern das Spektrum. Wahrscheinlich

wurden vorwiegend Kontaminationen, die durch Oxidationsprozesse hervorgerufen wurden nachgewiesen. Das SIMS-Massenspektrum befindet sich im Anhang Kapitel 7.3.

Im Gegensatz zu den Oberflächen **9** und **10** ließen sich bei der nach Prozess D azidierten und anschließend geclickten Oberfläche **11** mit XPS keine Hinweise auf eine erfolgreiche Bindung des Alkins an die Oberfläche finden. Im ToF-SIMS-Massenspektrum wiederum waren Fragmente bei $m/z = 69.99$ (CF_3^+) und $m/z = 213.02$ ($\text{C}_8\text{H}_3\text{F}_6^+$) sowie bei $m/z = 68.03$ ($\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3^+$) zu finden, die mit dem Substituenten (CF_3) und dem gebildeten Triazolring in Verbindung gebracht werden. Die Intensität ist jedoch deutlich geringer im Vergleich zur Probe **9** und unspezifischen Kohlenwasserstoffe überlagern das Spektrum (Anhang Kapitel 7.5).

Die gleichen Click-Reaktionen wurden auf BHF gereinigten Si₃N₄-Oberflächen ohne vorherige Azidierungsschritte durchgeführt. Hier konnten keine Hinweise auf immobilisiertes Alkin gefunden werden. Diese Kontrolle konnte verifizieren, dass die Anwesenheit von Azidgruppen, erzeugt aus Aminen, als Grundlage für die CuAAC auf Si₃N₄ zwingend erforderlich sind. Weiterhin wurden Negativkontrollen ohne die Anwesenheit des Alkins durchgeführt. Hier konnten ebenfalls weder im C 1s- noch im F 1s- oder N 1s-SR-XP-Spektrum Hinweise auf das Alkin gefunden werden.

In diesen Untersuchungen wurde zunächst die Bindung von Alkinen direkt an die Azid-terminierte Si₃N₄-Oberfläche ohne weitere Linkermoleküle gezeigt. Die Azidgruppen konnten indirekt nach erfolgter Click-Reaktion auf den Proben **9** und **10** nachgewiesen werden. Hierbei konnte eine deutlich höhere Immobilisierungsausbeute der Click-Reaktion nach der Azidierung durch Prozess C erzielt werden. Triflylazid ist in der organischen Synthese ein häufig eingesetztes Diazo-Transfer-Reagenz. Nach Cavender et al. wird die hohe Reaktivität von Triflylazid durch die stark elektronenziehende Triflylgruppe erklärt. In dieser Studie konnte mit TfN₃ im Vergleich zu den anderen Azidierungsprozessen (A und B) eine größere Menge Azid auf Si₃N₄ erzeugt werden und somit konnte auch die Immobilisierungsausbeute nach der Click-Reaktion erhöht werden.

Bei azidierten Oberflächen nach Prozess D konnten keine Hinweise auf das angebundene Alkin und somit keine Hinweise auf adressierbare Azide gefunden werden. Da diese Reaktion jedoch nur für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, könnte die Anzahl der reaktiven Azidgruppen zu gering sein.

3.4.2.1. Lösungsmittelabhängigkeit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition

Da die geringen Ausbeuten, schlechte Wiederholbarkeit sowie hohen Reaktionstemperaturen und langen Reaktionszeiten untypisch für die Click-Chemie sind, wurde die Reaktion in einer 1:1-Mischung aus *t*-Butanol und Wasser nach einem Protokoll von K.B.Sharpley et al.^[117] erneut durchgeführt. Hierbei wurde die Reaktionszeit auf 24 Stunden verkürzt und die Temperatur auf Raumtemperatur reduziert.

In den C 1s-SR-XP-Spektren, exemplarisch für eine nach Prozess C azidierte und geklickte Oberfläche **12** dargestellt, konnten neben CC- und CH-Bindungen des aromatischen Systems des Alkins (285.0 eV), CN-Bindungen des nach der Click-Reaktion gebildeten Triazolrings und CO-Einfachbindungen (286.7 eV) auch C-Kontaminationen (289.1 eV) und die CF₃-Gruppe (293.0 eV) nachgewiesen werden (Abbildung 44 a). Das F 1s-SR-XP-Spektrum bestätigte die Immobilisierung des Alkins an die Si₃N₄-Oberfläche durch das Auftreten eines Peaks bei 689.5 eV hervorgerufen von dem CF₃-Substituenten (Abbildung 44 b).

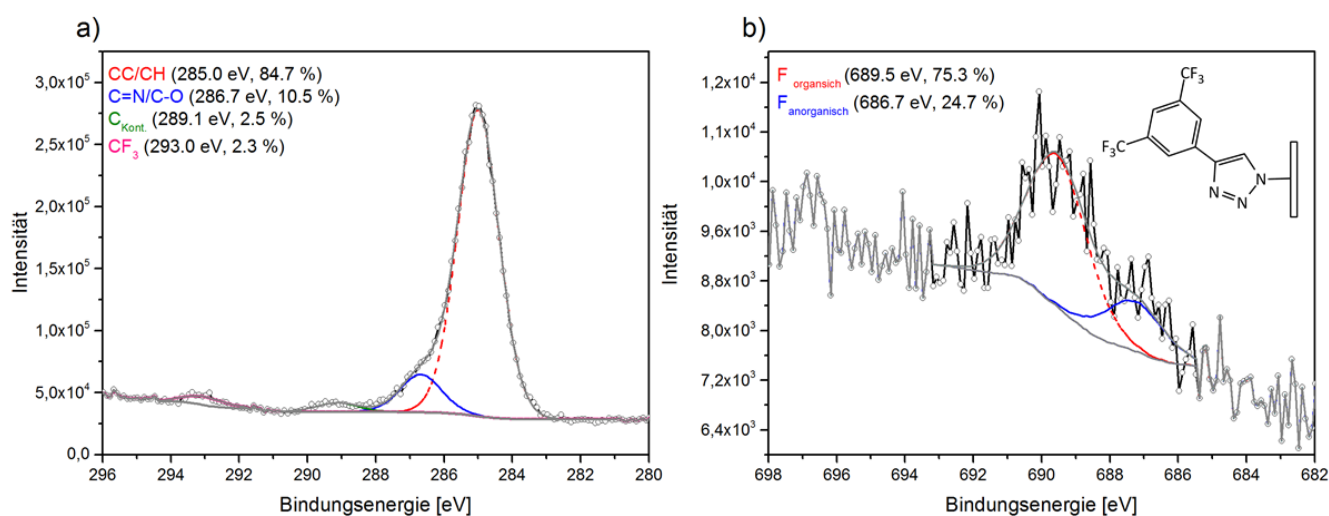


Abbildung 44: Hochaufgelöste C 1s- (a) und F 1s- (b) SR-XP-Spektren einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche **12** ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=0.7$ nm für F 1s ($h\nu=780$ eV)).

Außerdem zeigt das NEXAFS C K-Kanten-Spektrum der Oberfläche **12** π^* -Resonanzen vom aromatischen System des Alkins (285.00 eV) und das F K-Kanten-Spektrum eine σ^* -Resonanz vom CF₃-Substituenten (Abbildung 45).

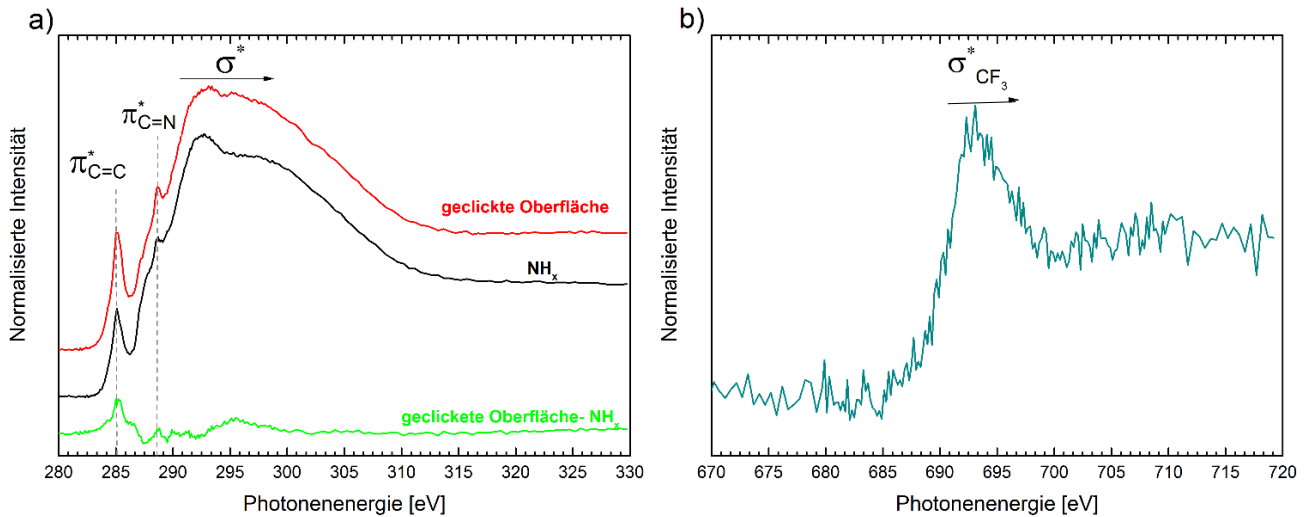


Abbildung 45: NEXAFS C K-Kante und F K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in ^tButanol/Wasser geclickten Siliziumnitrid-Oberfläche **12**, aufgenommen bei 55°. Die C K-Kante zeigt die geclickte Probe im Vergleich zu einer gereinigten Oberfläche **3**. Die F K-Kante zeigt σ^* -Resonanzen der CF₃-Gruppe.

Im ToF-SIMS-Massenspektrum, gemessen im positiven Ionenmodus, wurden auch bei dieser Probe **12** Sekundärionenfragmente vom immobilisierten Alkin bei $m/z = 69.99$ (CF₃⁺), $m/z = 49.99$ (CF₂⁺) und $m/z = 31.00$ (CF⁺) gefunden. Weiterhin wurde das Fragment des CF₃-substituierten Benzolringes C₈H₃F₆⁺ $m/z = 213.02$ gefunden (Abbildung 46).

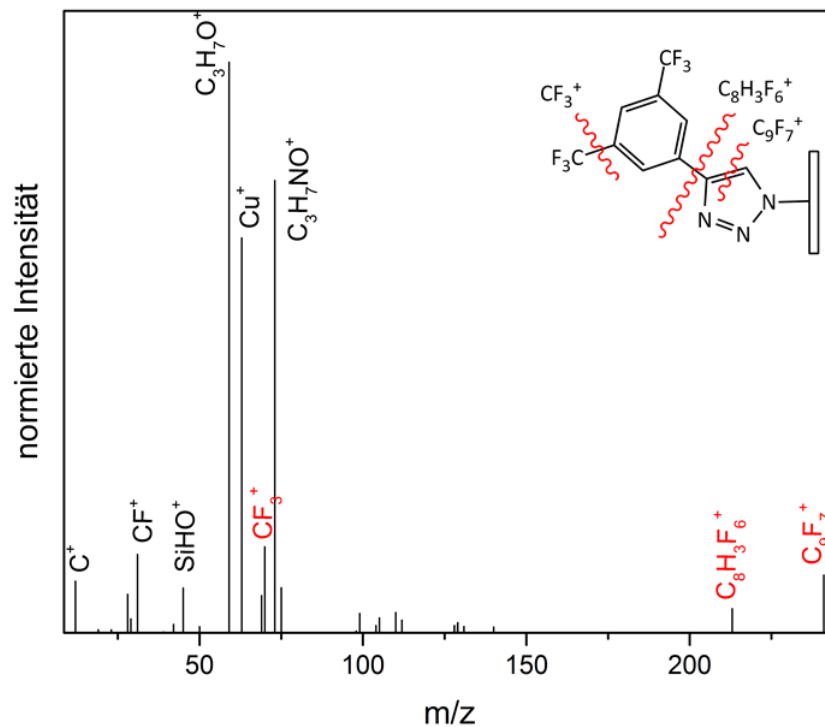


Abbildung 46: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in ^tBuOH/H₂O geklickten Oberfläche **12**. Die Sekundärionen vom immobilisierten Alkin wurden gezeigt.

In Tabelle 8 sind die experimentell ermittelten Peakflächen der C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren der azidierten (Prozesse A, C und D) und geklickten Si₃N₄ Oberflächen **12-14** im Vergleich zu einer unbehandelten Probe **3** dargestellt. Die Immobilisierungseffizienz der Proben **12-14** wurde jeweils nach Gleichung 3-1 zu (12-22±1) % bestimmt. Im N 1s-SR-XP-Spektrum konnte bei den Oberflächen **13-14** das Siliziumnitrid (397.0 eV) von den nach der Click-Reaktion gebildeten Triazolringen bei 400.2 eV unterschieden werden. Weiterhin konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit aller drei Azidierungsmethoden festgestellt werden. Die ToF-SIMS-Massenspektren der Proben **13-14** zeigten ebenfalls Fragmente bei m/z = 69.99 (CF₃⁺) und m/z = 213.02 (C₈H₃F₆⁺) sowie bei m/z = 68.03 (C₂H₂N₃⁺), die mit dem Substituenten (CF₃) und dem gebildeten Triazolring in Verbindung gebracht werden. Die Spektren befinden sich im Anhang Kapitel 7.5 und 7.6.

Tabelle 8: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Daten einer mit BHF gereinigten Oberfläche (**3**) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Oberfläche nach der Azidierung mit Prozess C (**12**), Prozess A (**13**) und Prozess D (**14**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Probe	Komponentenpeakfläche (%)								
	C 1s					N 1s			
	CC,CH	C-N/C=N	Kont.	CF ₃	Ausbeute (%)	Si ₃ N ₄	C=N	N ₃ (δ^-)	N ₃ (δ^+)
3	90.3	8.2	1.6	-	-	-	-	-	-
12	84.8	10.5	3.8	2.3	12 (± 1 %)	95.4	4.6	-	-
13	78.2	15.0	2.4	4.4	22 (± 1 %)	93.88	6.1	-	-
14	84.2	10.5	2.8	2.5	14 (± 1 %)	96.8	3.3	-	-

Der direkte Vergleich der Ergebnisse der Click-Reaktion in Ethanol (Tabelle 7) mit der Click-Reaktion in einer Mischung aus *tert*-Butanol und Wasser (Tabelle 8) zeigt eine deutliche Steigerung der Immobilisierungseffizienz, trotz der geringeren Reaktionszeit und Reaktionstemperatur bei der Oberflächenfunktionalisierung nach Sharpless. In der Literatur wurde beschrieben, dass viele Click-Reaktionen in wässrigen Lösungsmitteln besser ablaufen als in organischen Lösungsmitteln. Gründe hierfür sind die Erhöhung der Reaktivität durch eine schlechtere Solvatation von Wasser, was eine höhere freie Energie der organischen Verbindungen bewirkt; eine schnelle Anpassung an veränderte H-Brückenbindungen während der Reaktion; einen Selektivitätsgewinn durch die Unterscheidung von harten/weichen Nucleophilen/Elektrophilen; große Wärmekapazität und günstiger Siedepunkt sowie kein störender Einfluss von Hydroxy- und Aminogruppen von Amiden.^[114]

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass es möglich ist, (Bio)Moleküle direkt an azidierte Si₃N₄-Oberflächen zu binden. Die erfolgreiche Click-Reaktion ist jedoch von der Wahl des Lösungsmittels abhängig. So konnten bei der in Ethanol durchgeführten Reaktion nur geringe Mengen des immobilisierten Alkins nachgewiesen werden. Bei der Nutzung einer Mischung aus *tert*-Butanol und Wasser konnte die Immobilisierungseffizienz dagegen deutlich gesteigert werden. Eine Temperatur- bzw. Zeitabhängigkeit konnte ebenfalls festgestellt werden. Obwohl Himo et al.^[119] in ihrer Studie die Stabilität der CuAAC über einen breiten Temperatur- und pH-Bereich beschreiben, konnten auf Si₃N₄-Oberflächen bei höheren Temperaturen und längeren Reaktionszeiten keine reproduzierbaren Schichten erzeugt werden.

3.4.2.2. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition

Zusätzlich zur Überprüfung der Lösungsmittelabhängigkeit der Click-Reaktion wurde die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Immobilisierung des Alkins an die Si₃N₄-Oberfläche untersucht. Hierfür wurde die Click-Reaktion in *tert*-Butanol/Wasser jeweils für 24, 48 und 72 Stunden bei Raumtemperatur und 50 °C durchgeführt. Tabelle 9 zeigt die Immobilisierungseffizienz der azidierten und bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten geclickten Proben. Für alle drei bei Raumtemperatur für 24 Stunden durchgeführten Diazo-Transfer-Reaktionen, wurden sehr gute Ergebnisse erhalten. Bereits bei längerer Reaktionszeit aber gleichbleibender Temperatur kam es teilweise scheinbar zur Ausbildung mehrerer Schichten. Hierbei wurden Immobilisierungsausbeuten von über 100 % erreicht. Bei der Erhöhung der Reaktionstemperatur wurde das Alkin scheinbar durch die zerstört und stand so nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung.

Tabelle 9: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Click-Reaktion in *tert*-Butanol/Wasser. Gezeigt ist die Immobilisierungsausbeute bestimmt aus der ermittelten CF₃-Konzentration im hochaufgelösten C 1s-SR-XP-Spektrum ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm) bezogen auf eine vollständig funktionalisierte Oberfläche.

		C 1s		
		Prozess A	Prozess C	Prozess D
Temperatur (°C)	Zeit (h)	Ausbeute CF ₃ (%)	Ausbeute CF ₃ (%)	Ausbeute CF ₃ (%)
Raumtemperatur	24	22 (±1 %)	12 (±1 %)	14 (±1 %)
Raumtemperatur	48	18(±1 %)	165* (±1 %)	34 (±1 %)
Raumtemperatur	72	48(±1 %)	79 (±6 %)	-
50 °C	24	6(±1 %)	-	-
50 °C	48	4(±1 %)	10 (±24 %)	105* (±1 %)
50 °C	72	137*(±1 %)	6 (±23 %)	-

*Ausbildung von Multilagen, Immobilisierungsausbeute > 100 %

3.4.2.3. Verifizierung der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition mit Propargylchlorid

Zusätzlich wurde die Click-Chemie mit Propargylchlorid, sowohl in Ethanol als auch in ^tButanol/Wasser, überprüft (Abbildung 47). Hierzu wurden die jeweils mit Prozess C bzw. Prozess A azidierten und geclickten Si₃N₄-Oberflächen mit XPS untersucht.

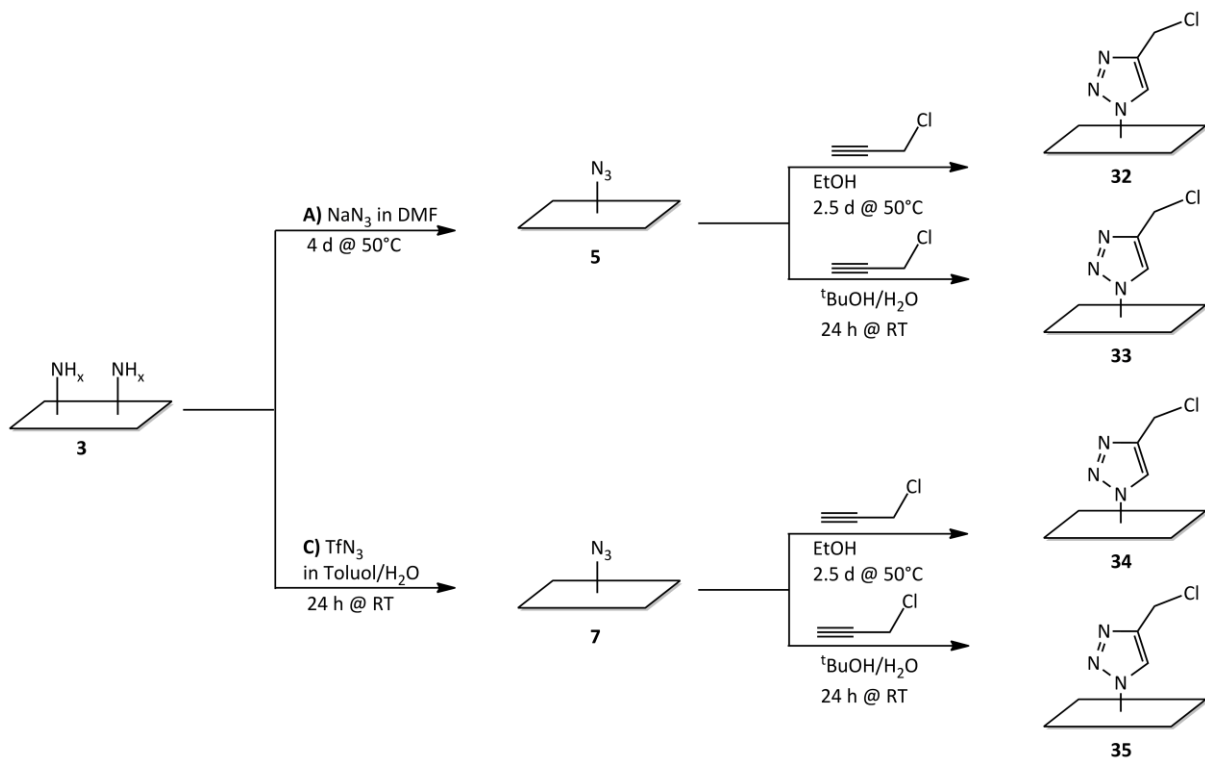


Abbildung 47: Erzeugung von organischen Schichten durch Click-Chemie durchgeführt mit Propargylchlorid in Ethanol bzw. *tert*-Butanol/Wasser.

Aus der Elementzusammensetzung wurde ebenfalls die Lösungsmittelabhängigkeit sowie der Einfluss der Azidierungsmethode deutlich (Tabelle 10). Chlor wurde auf allen Proben nachgewiesen. Während die Click-Chemie in ^tBuOH/H₂O nach der Azidierung mit Prozess D eine deutlich erhöhte Chlor-Konzentration zeigt verglichen mit der Click-Chemie in Ethanol, konnte nach der Azidierung mit Prozess A kein Unterschied festgestellt werden. Weiterhin ist die deutlich erhöhte Kohlenstoffkonzentration der mit Prozess C azidierten und in ^tBuOH/H₂O geclickten Oberfläche von 42 at.% auffällig. Die aufgenommenen hochaufgelösten Cl 2p-SR-XP-Spektren der Proben unterstützen die Ergebnisse der Elementzusammensetzung aus den XPS-Übersichtsspektren. Die mit Prozess C azidierte und in ^tBuOH/H₂O geclickte Probe zeigte dabei die deutlichsten Signale. Hierbei konnte in der Cl 2p-Region deutlich ein Chlor-Dublett

identifiziert werden (Abbildung 48). Bei der Click-Reaktion nach der Azidierung durch Prozess A konnte hingegen kein Chlor-Dublett gefunden werden und verlief somit schlechter.

Tabelle 10: XPS Elementzusammensetzung von azidierten und mit Propargylchlorid geklickten Si₃N₄ Oberflächen. Gezeigt sind die Azidierungen mit Prozess C (TfN₃) jeweils nach der Click-Reaktion in Ethanol (**34**) bzw. ^tBuOH/H₂O (**35**) und Prozess A (NaN₃) jeweils nach der Click-Reaktion in Ethanol (**32**) bzw. ^tBuOH/H₂O (**33**).

Probe	Si 2p (at.%)	Cl 2p (at.%)	C 1s (at.%)	N 1s (at.%)	O 1s (at.%)	Cu 2p (at.%)
32	30.3 (±0.2 %)	0.5 (±0.2 %)	13.6 (±0.2%)	39.9 (±0.2 %)	15.4 (±0.2 %)	0.5 (±0.2 %)
33	19.4 (±0.2 %)	1.0 (±0.2 %)	41.8 (±0.2 %)	24.0 (±0.2 %)	13.8 (±0.2%)	0.1 (±0.2 %)
34	29.1 (±0.1 %)	0.5 (±0.2 %)	14.5 (±0.2 %)	39.0 (±0.2 %)	15.8 (±0.2 %)	1.1 (±0.2 %)
35	32.1 (±0.2 %)	0.4 (±0.2 %)	9.3 (±0.2 %)	41.3 (±0.2 %)	15.8 (±0.3 %)	0.7 (±0.2 %)

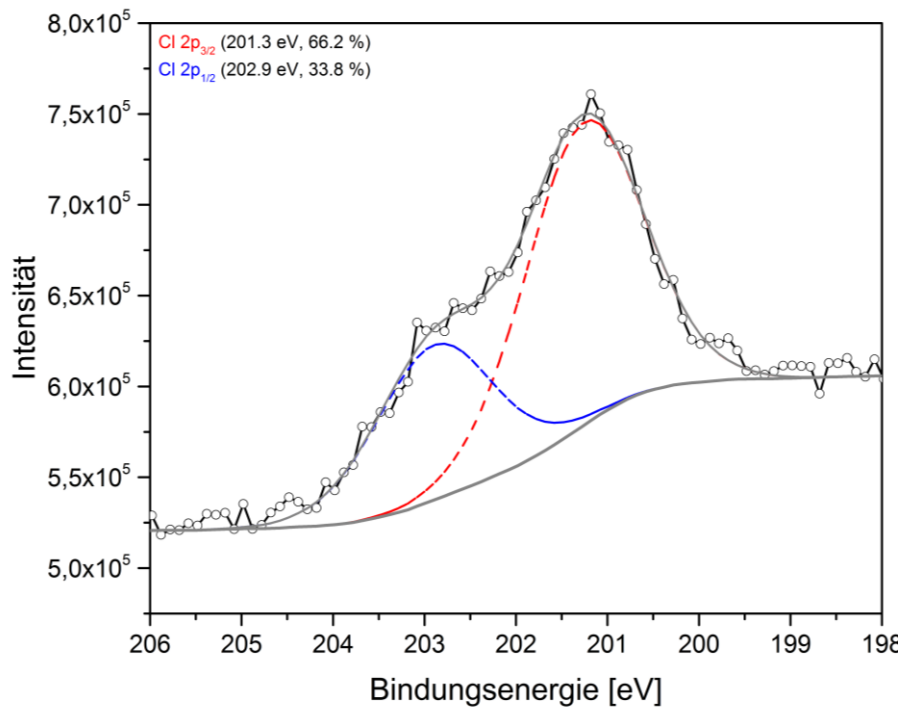


Abbildung 48: Hochaufgelöstes Cl 2p-SR-XP-Spektrum einer Si₃N₄-Oberflächen (**35**), die nach Prozess C azidiert und mit Propargylchlorid in ^tButanol/Wasser funktionalisiert wurde ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=1.5$ nm für Cl 2p ($h\nu=300$ eV)).

Die Ergebnisse der Click-Chemie mit Propargylchlorid bestätigen ebenfalls die erfolgreiche Immobilisierung der Alkine direkt an die Si₃N₄-Oberfläche und stützen die Ergebnisse der Click-Chemie mit dem Fluor-substituierten Alkin. Es wurde deutlich, dass der Diazo-Transfer Prozess C eine größere Menge adressierbarer Azidgruppen erzeugt, die für die folgende Click-Chemie

genutzt werden als die Azidierung durch Prozess A. Weiterhin konnte auch bei diesen Experimenten eine Lösungsmittelabhängigkeit festgestellt werden.

3.4.3. Zusammenfassung

Es wurde erfolgreich gezeigt, dass eine direkte Immobilisierung an die N₃-terminierte Si₃N₄-Oberfläche möglich ist und der materialintrinsic Stickstoff für neuartige Funktionalisierungsstrategien nutzbar ist. Es wurde zudem festgestellt, dass die Click-Chemie in Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittelsystem mit verschiedenen Ausbeuten abläuft (Tabelle 11). Während die drei getesteten Azidierungsmethoden nach der Click-Chemie in ^tButanol/Wasser mit Ausbeuten von ca. 15-22 % abliefen, zeigte die Click-Chemie in Ethanol nach dem Diazo-Transfer mit TfN₃ lediglich reproduzierbare Ausbeuten.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Click-Chemie. Gezeigt ist die Ausbeute des immobilisierten F-substituierten Alkins nach der Azidierung in den unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Azidierungsmethode	Ethanol (Ausbeute CF ₃ %)	^t Butanol/Wasser (Ausbeute CF ₃ %)
Prozess A	5	22
Prozess C	15	12
Prozess D	-	14

3.5. Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition mit Biotin und Streptavidin-Modellsystem

3.5.1. Stand der Forschung

Das Biotin/Streptavidin-System diente in dieser Arbeit als Modellsystem zur Entwicklung einer neuen Funktionalisierungsstrategie von Si_3N_4 zur Erzeugung von Biosensoren.

Streptavidin ist ein tetrameres Protein (Abbildung 49) mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, was aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Streptavidin ist aus vier Monomeren aufgebaut, die eine β -Faltblattstruktur aufweisen. Dabei bilden je zwei Protein-Untereinheiten antiparallel stehende Dimere, die durch Wasserstoffbrücken verknüpft sind. Die Dimere wiederum greifen ineinander und bilden die tetramere Struktur des Streptavidins.^[139]



Abbildung 49: Schematische Darstellung von Streptavidin. Dargestellt ist die tetramere Struktur des Streptavidins mit den vier Bindungstaschen inklusive gebundener Biotinmoleküle (PDB 5B5F).

Am jeweils offenen Ende des Streptavidin-Monomers befindet sich die Biotin-Bindungstasche mit den Protein-Bindungsschleifen, welche sich nach der Bindung des Biotins über die Bindungstasche falten (Abbildung 50).^[139] Die Stabilisierung der Tetramere erfolgt

anschließend durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Heteroatomen des Biotins und den Aminosäureresten des Streptavidins sowie durch starke van-der-Waals-Kräfte zwischen den Protein-Untereinheiten.^[140-141]



Abbildung 50: Schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur von Streptavidin. Die Biotin Bindungstasche befindet sich an den offenen Enden der Monomere und wird nach der Bindung durch Oberflächenschlaufen („surface loops“) verschlossen.^[142]

Aufgrund der außergewöhnlichen Bindungsaffinität zwischen Biotin und Streptavidin ($K_d \sim 10^{-15} \text{ M}$)^[143-145] und der sich daraus ergebenden spezifischen Bindung findet das Biotin-Streptavidin-System häufig Anwendung in der Methodenentwicklung für biologische Erkennungsprozesse,^[146-147] in Biosensoren^[148-149] und bei medizinischen Anwendungen.^[150-151] So gelang es funktionalisierte Nanodrähte für die sensorische Nutzung^[152] und neue mikrogravimetrische DNA-Sensoren auf Basis von Quarzkristall-Mikrowaagen^[153] zu entwickeln. Weiterhin lässt sich Biotin gut funktionalisieren, ohne dabei sein Bindungsverhalten zu verändern, wodurch eine Vielzahl weiterer Funktionalitäten eingeführt werden können. Zum Beispiel lassen sich Proteine und DNA biotinylieren, die anschließend an Streptavidin beschichtete Oberflächen gebunden werden. Daher sind sowohl Streptavidin als auch sein Homologon Avidin Gegenstand intensiver Forschung.^[150, 154-157] Da das Gen von Streptavidin vollständig entschlüsselt ist, können Geninformationen in Bakterien eingebaut werden und dadurch gezielte Modifikationen an den genetischen Informationen vorgenommen werden, um das Protein spezifisch zu verändern.

3.5.2. Herstellung und Charakterisierung von Biotin/Streptavidin-Schichten auf Siliziumnitrid-Oberflächen

In diesem Teil der Arbeit wurde die Nutzung der Azidgruppe für die direkte Anbindung von Biomolekülen untersucht. Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass kleine Testalkine direkt an die Si₃N₄-Oberfläche gebunden werden können, wurde in diesem Abschnitt ein Biomolekül durch die Click-Chemie direkt an die Oberfläche gebunden und mögliche sterische Hinderungen untersucht. Hierfür diente das Biotin/Streptavidin-System aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität ($K_d = 10^{-15}$ M) als Modellbiosensor.

Die Grundlage für die Click-Chemie bildeten die bereits optimierten Diazo-Transfer-Reaktionen. Anschließend wurde Biotin-PEG4-Alkin nach einem Protokoll von Mader et al.^[158] in MeOH/H₂O bzw. Maidenberg et al.^[159] in DMF/H₂O an die Oberfläche gebunden (Abbildung 51). Aufgrund der geringen Azidgruppendichte und der damit verbundenen geringen Schichtdicke des immobilisierten Biotins ist es schwierig Schwefel in diesem System mit XPS zu identifizieren. Daher erfolgte die Charakterisierung erst nach der Interaktion mit Streptavidin.

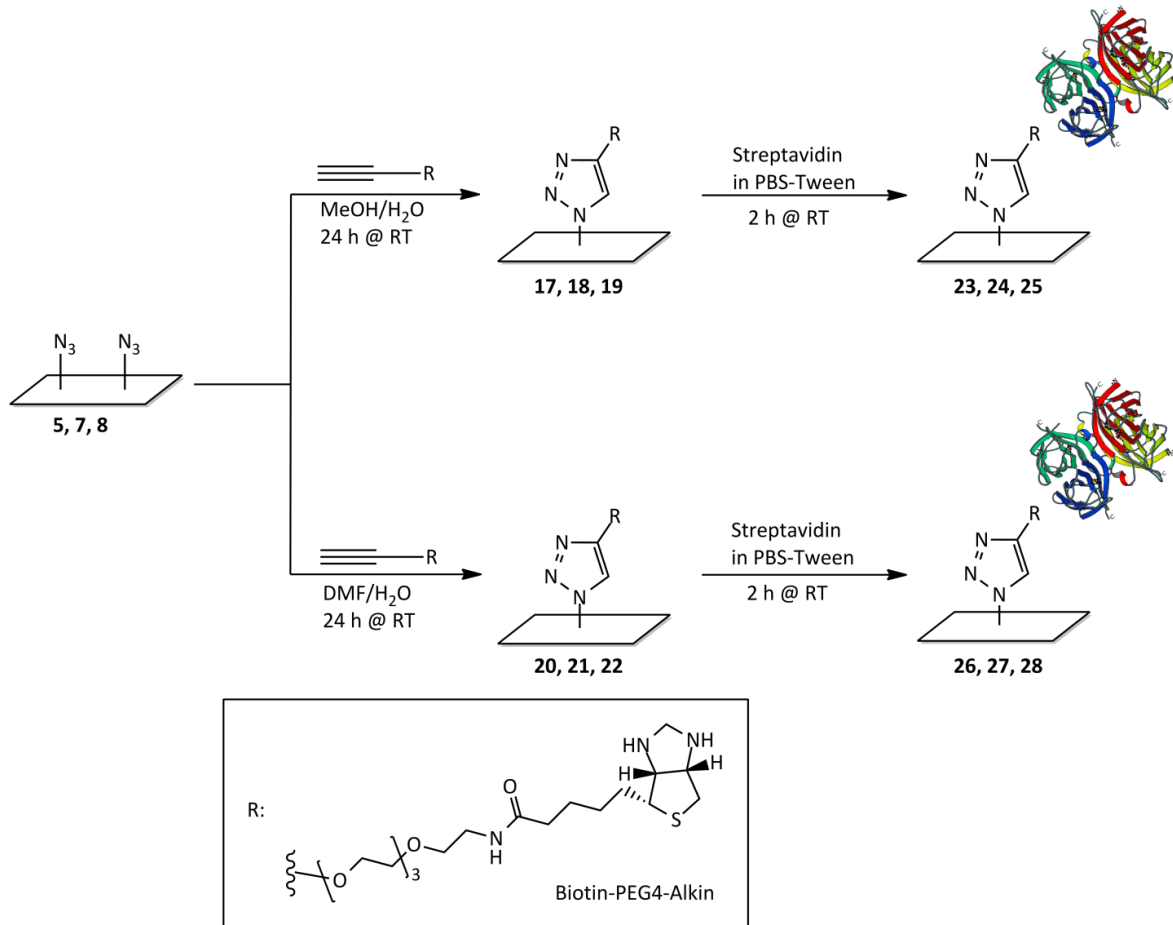


Abbildung 51: Erzeugung von Biotin/Streptavidin Schichten durch die Click-Chemie. Dargestellt ist die Click-Chemie mit Biotin-PEG4-Alkin durchgeführt in Methanol bzw. in DMF/Wasser.

Die Elementzusammensetzung einer gereinigten Probe **3**, einer nach Prozess C azidierten Probe **5** und von Proben nach der Azidierung nach Prozess C **23**, Prozess A **24** und Prozess D **25** gefolgt von der Click-Chemie mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol und der Interaktion mit Streptavidin sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Wie erwartet wurde auf den geklickten Oberflächen und mit Streptavidin interagierenden Oberflächen **23-25** eine deutlich höhere Kohlenstoffkonzentration im Vergleich zu der NH_x-terminierten bzw. N₃-terminierten Oberfläche nachgewiesen, was durch die Bindung des Biotins und der Interaktion mit Streptavidin an die Oberfläche zu erklären ist. Auf Oberflächen nach der Azidierung durch Prozess A **24** wurde im Vergleich zu den anderen Oberflächen eine deutlich erhöhte Kohlenstoffkonzentration nachgewiesen. Die im Vergleich zur gereinigten Oberfläche **3** erhöhte Sauerstoffkonzentration auf den geklickten Oberflächen **23-25** kann auf Oxidationsprozesse während der Reaktionen zurückgeführt werden. Weiterhin deutet die in

den XP-Spektren abnehmende Stickstoff- und Siliziumkonzentration auf eine Dämpfung der Photoelektronensignale des Si₃N₄-Substrates durch die neu gebildete organische Deckschicht hin.

Tabelle 12: XPS Elementzusammensetzung einer gereinigten (**3**), einer nach Prozess C azidierten (**5**) Si₃N₄-Oberfläche, sowie Oberflächen, die mit Biotin-PEG-4-Alkin in Methanol/Wasser funktionalisiert und mit Streptavidin behandelt wurden, je nach Azidierung nach Prozess C (**23**), Prozess A (**24**) und Prozess D (**25**).

Probe	Si 2p (at.%)	C 1s (at.%)	N 1s (at.%)	O 1s (at.%)	F 1s (at.%)	Cu 2p (at.%)
3	35.0 (±0.2 %)	2.0*(±0.2 %)	55.3(±0.3 %)	2.7 (±0.2 %)	2.0 (±0.2 %)	-
5	32.8 (±0.2 %)	9.2 (±0.2 %)	44.6 (±0.3 %)	11.9 (±0.2 %)	0.4 # (±0.3 %)	32.8 (±0.2 %)
23	31.5 (±0.2 %)	14.4 (±0.2 %)	42.6 (±0.2 %)	11.4 (±0.2 %)	0.1 (±0.2 %)	0.1 (±0.2 %)
24	28.7 (±0.2 %)	21.4 (±0.2 %)	37.8 (±0.2 %)	12.1 (±0.2 %)	-	-
25	32.6 (±0.2 %)	12.4 (±0.2 %)	42.6 (±0.2 %)	12.1 (±0.2 %)	0.3 (±0.2 %)	-

anorganisches Fluor von der Reinigung mit BHF

An dieser Stelle wird die Azidierung nach Prozess C, gefolgt von der Click-Chemie mit Biotin-PEG4-alkin und der Interaktion mit Streptavidin exemplarisch erläutert. Hierbei wurden sowohl im C 1s- als auch im N 1s-SR-XP-Spektrum Amidbindungen nachgewiesen.^[160] Die C 1s-Region zeigt neben CC- und CH-Bindungen bei 285.0 eV auch CN- bzw. CO-Bindungen vom Protein bei 286.7 eV und eine Amidkomponente bei 288.2 eV (Abbildung 52 a),^[160-161] welche auf einer unmodifizierten Oberfläche nicht zu finden sind. Das N 1s-SR-XP-Spektrum der Biotin/Streptavidin immobilisierten Oberfläche bestätigt ebenfalls die Biotin/Streptavidin-Interaktion. Hier treten Amid-Spezies bei 400.3 eV auf und sind deutlich vom Nitrid des Substrates zu unterscheiden (Abbildung 52 b).^[160]

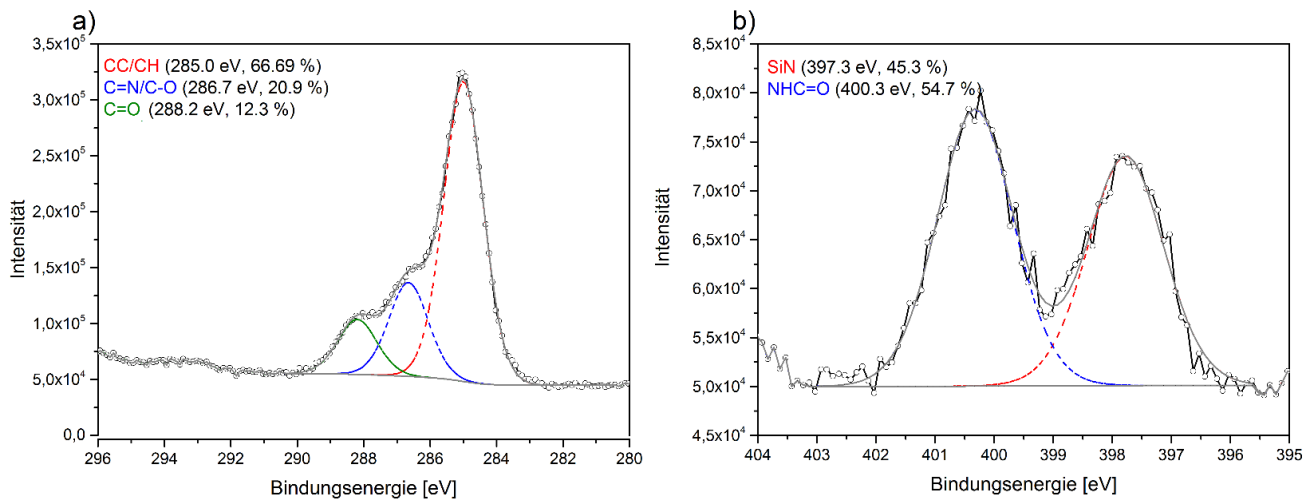


Abbildung 52: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren von Si₃N₄-Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C und der Funktionalisierung mit Biotin-PEG4-Alkin in MeOH/H₂O und Streptavidin (**23**). Deutlich erkennbar sind Amidbindungen bei 288.2 eV (C 1s) bzw. 400.3 eV (N 1s) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Der Vergleich der C 1s- und N 1s-SR-XPS-Daten der mit Biotin und Streptavidin behandelten Si₃N₄-Oberfläche **23** mit denen der unmodifizierten **3**, azidierten **7** und biotinylierten **17** Si₃N₄-Oberfläche (Tabelle 13) zeigt die deutlich erhöhte Amid-Komponente begründet durch das auf der Oberfläche gebundene Streptavidin. Unspezifische Wechselwirkungen von Streptavidin mit der NH_x- bzw. N₃-terminierten Si₃N₄-Oberfläche wurden durch Negativkontrollen, ohne vorherige Biotinylierung der Oberfläche, ausgeschlossen. Die Spektren befinden sich im Anhang Kapitel 7.12-7.15.

Tabelle 13: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (**17**) und mit Streptavidin (**23**) gebundenen Si₃N₄ Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C im Vergleich zu einer gereinigten NH_x-terminierten (**3**) und einer N₃-terminierten Si₃N₄ Oberfläche (**7**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Probe	Komponentenpeakfläche (%)				
	N 1s		C 1s		
	NHC=O	SiN	CC, CH	C=N, C-O	C=ONH
3	-	100	84.1	13.2	2.8
7	-	100	84.2	13.0	2.8
17	-	100	88.7	9.4	1.9
23	54.7	45.3	66.9	20.9	12.3

Zusätzlich beweisen sowohl die NEXAFS C K-Kante als auch die O K-Kante die Biotin/Streptavidin-Interaktion (Abbildung 53), wobei die typischen Amid-spezifischen Resonanzen bei 288.3 eV ($\pi_{N-C=O}^*$)^[162] bzw. 532.4 eV ($\pi_{C=O}^*$)^[163] auftreten.

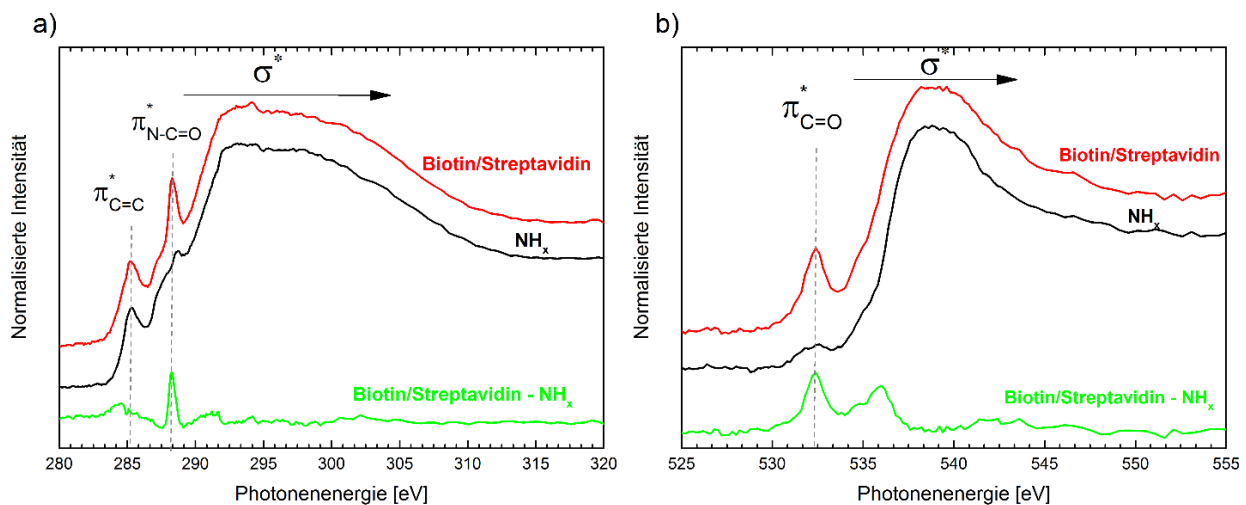


Abbildung 53: NEXAFS C K-Kante und O K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit Biotin (MeOH/H₂O) und Streptavidin modifizierten Si₃N₄-Oberfläche (**23**) (rote Linie) im Vergleich zu einer unmodifizierten Oberfläche (**3**) (schwarze Linie). Die Differenzspektren wurden ebenfalls dargestellt (grüne Linie).

Auch das ToF-SIMS-Massenspektrum belegt die Immobilisierung des Biotin/Streptavidin-Systems an die Si₃N₄-Oberfläche (Abbildung 54). Es wurden sowohl Aminogruppen- und Kohlenwasserstoff-Fragmente des Streptavidins als auch Siliziumnitrid-Sekundärionenfragmente aus dem Substrat nachgewiesen. Proteinspezifische

Sekundärionenfragmente von den Aminosäuren des Streptavidins wurden bei $m/z = 56.05$ ($C_3H_6N^+$), $m/z = 70.07$ ($C_4H_8N^+$), $m/z = 130.07$ ($C_9H_8N^+$) sowie bei $m/z = 136.07$ ($C_8H_{10}NO^+$) gefunden und stimmen mit in der Literatur veröffentlichten Daten überein.^[164-165]

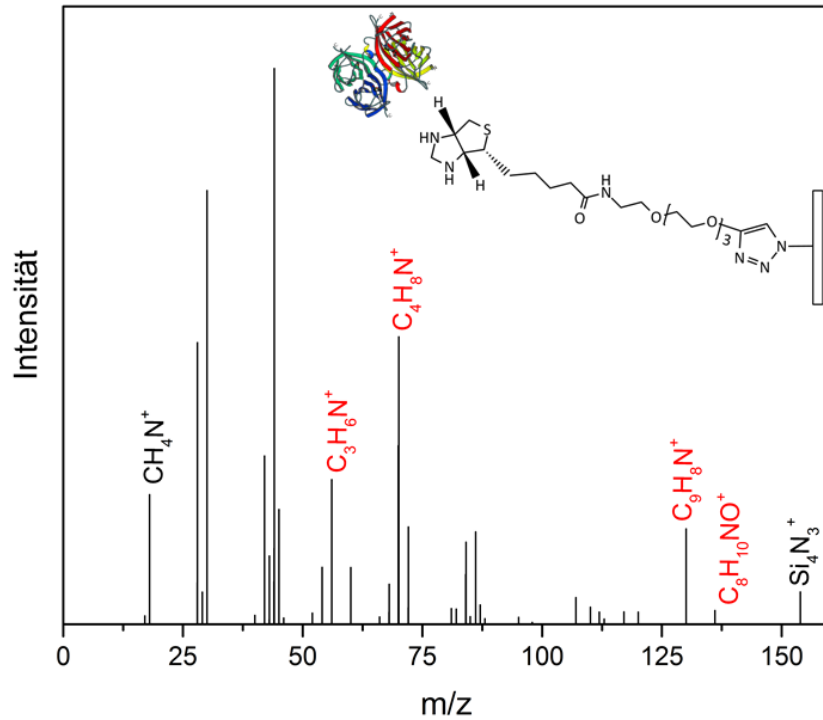


Abbildung 54: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer mit TfN₃ azidierten und in Methanol geclickten Oberfläche (**23**).

Detaillierte Tiefeninformationen wurden mit winkel-aufgelöster XPS (AR-XPS) erhalten. Dafür wurden die Biotin/Streptavidin-Filme sowohl bei 0° als auch bei 60° gemessen. Die hochaufgelösten SR-XP-Spektren sind exemplarisch für die Azidierung nach Prozess C, gefolgt von der Click-Chemie (Oberfläche **23**), dargestellt. Auf die Bindung des Streptavidins an das Biotin weist das signifikant erhöhte Amid-Signal bei 400 eV im N 1s-SR-XP-Spektrum aufgenommen bei einem Winkel von 60° ($z_{95}=2.3$ nm) gegenüber dem bei 0° ($z_{95}=4.5$ nm) aufgenommenen Signal hin (Abbildung 55).

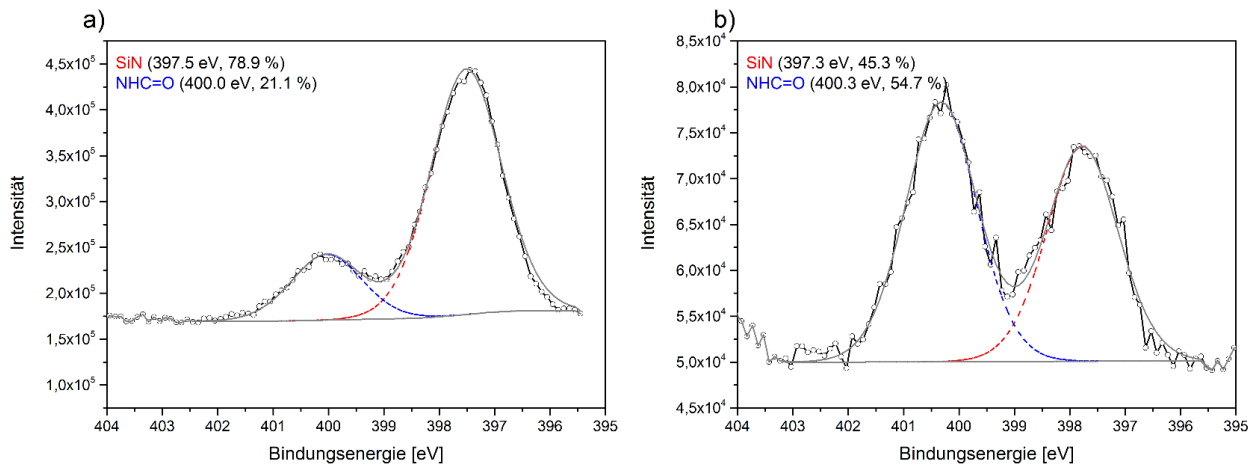


Abbildung 55: Hochauflösende N 1s-SR-XP-Spektren von biotinylierten und Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberflächen (**23**) nach der Azidierung mit Prozess C ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm (a); $\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm (b) für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Es wurde festgestellt, dass die XPS- und NEXAFS-Analysen von Proben der drei Azidierungsmethoden gefolgt von der Biotin/Streptavidin Interaktion quantitativ die gleichen Signale zeigen (Tabelle 14). Biotinylierte und mit Streptavidin interagierende Oberflächen zeigen ebenfalls sowohl nach der Azidierung nach Prozess A als auch nach der Azidierung nach Prozess D Amidbindungen in den C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren.^[160-161] Weiterhin konnten, wie auch bei der Azidierung nach Prozess C, proteinspezifische Resonanzen in der NEXAFS C K-Kante und O K-Kante nachgewiesen werden. Die ToF-SIMS-Massenspektren von Proben nach der Azidierung mit Prozess A sowie der Biotin/Streptavidin-Interaktion **24** und nach der Azidierung mit Prozess D und der Biotin/Streptavidin-Interaktion **25** zeigen ebenfalls proteinspezifische Fragmente der Aminosäuren des Streptavidins bei $m/z = 56.05$ ($C_3H_6N^+$), $m/z = 70.07$ ($C_4H_8N^+$), $m/z = 130.07$ ($C_9H_8N^+$) sowie bei $m/z = 136.07$ ($C_8H_{10}NO^+$), jedoch mit einer deutlich geringeren Intensität verglichen mit der mit Prozess C azidierten und Biotin/Streptavidin immobilisierten Oberfläche **23**. Die Spektren befinden sich im Anhang, Kapitel 7.8 und 7.10. Es wird deutlich, dass nach dem Diazo Transfer mit Prozess C eine größere Menge des Proteins nachgewiesen wurde, was ebenfalls mit der größeren Menge der zur Verfügung stehenden N₃-Gruppen zusammenhängt.

Tabelle 14: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (MeOH/H₂O) und mit Streptavidin gebundenen Si₃N₄-Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C (**23**), Prozess A (**24**) und Prozess D (**25**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Azidierungsmethode	Komponentenpeakfläche (%)				
	N 1s		C 1s		
	NHC=O	SiN	CC, CH	C=N, C-O	C=ONH
23	54.7	45.3	66.9	20.9	12.3
24	31.4	68.6	68.1	26.6	5.3
25	29.1	70.9	71.8	18.7	9.5

3.5.2.1. Lösungsmittelabhängigkeit der Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

Auch bei der Entwicklung der Strategie zur Immobilisierung des Modellfilms Biotin/Streptavidin wurde die Lösungsmittelabhängigkeit der Click-Chemie untersucht. Hierfür wurde die Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin zusätzlich in einer Mischung aus DMF und Wasser (2:1) durchgeführt.

Die Bindung des Biotin/Streptavidin-Systems an die Si₃N₄-Oberflächen konnte nachgewiesen werden. Sowohl die C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren (Abbildung 56 und Tabelle 15) als auch die NEXAFS C K-Kante (Abbildung 57) zeigen quantitativ proteinspezifische Signale.^[160-161]

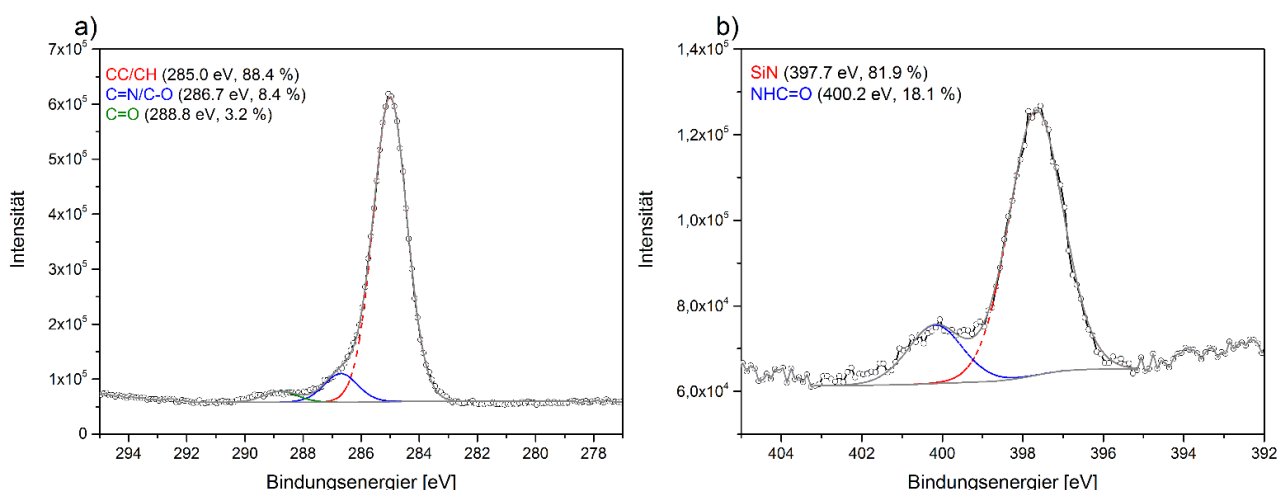


Abbildung 56: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren von Si₃N₄-Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C und der Funktionalisierung mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF/H₂O und Streptavidin (**26**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

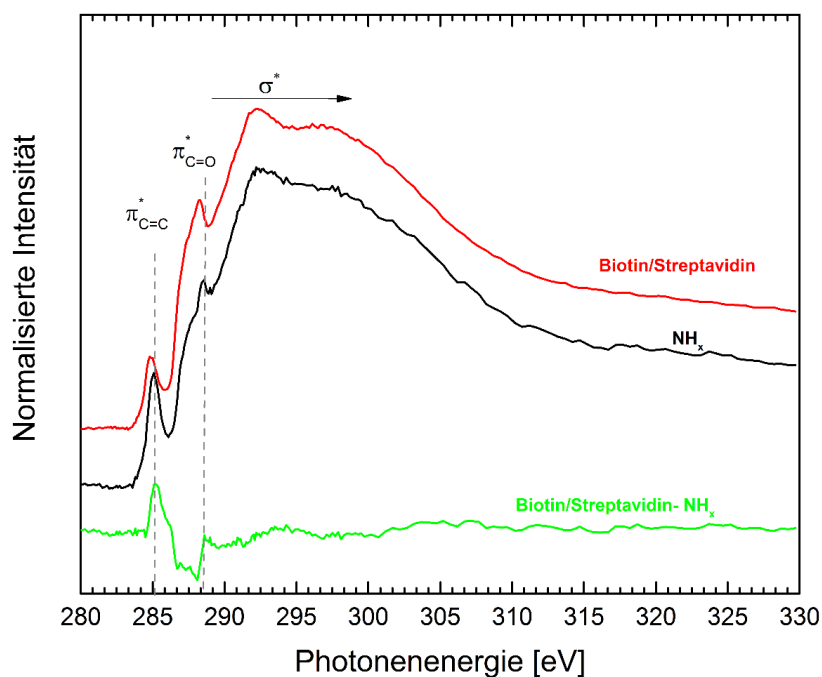


Abbildung 57: NEXAFS C K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit Biotin (DMF/H₂O) und Streptavidin modifizierten Si₃N₄-Oberfläche (**26**) (rote Linie) im Vergleich zu einer unmodifizierten Oberfläche (schwarze Linie) und dem Differenzspektrum (grüne Linie).

Beim Vergleich der Click-Reaktion von Biotin in Methanol/Wasser (Tabelle 14) mit der in DMF/Wasser (Tabelle 15) ist jedoch auffällig, dass die Reaktion in DMF deutlich schlechtere Ergebnisse lieferte. Wie bei der Click-Chemie bei der Methodenentwicklung in Kapitel 3.4 konnte bei der Click-Chemie mit Biotin eine Lösungsmittelabhängigkeit festgestellt werden. Die Erklärung für dieses Verhalten liefert auch hier die Betrachtung der verwendeten Lösungsmittel. Der höhere Wasseranteil bei der Reaktion in Methanol begünstigt den Erfolg der Click-Reaktion im Vergleich zur Click-Reaktion in DMF, was von Kolb et al. ausführlich beschrieben wurde.^[114]

Tabelle 15: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (DMF/H₂O) und mit Streptavidin gebundenen Si₃N₄ Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C (**26**), Prozess A (**27**) und Prozess D (**28**) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).

Azidierungsmethode	Komponentenpeakfläche (%)				
	N 1s			C 1s	
	NHC=O	SiN	CC, CH	C=N, C-O	C=ONH
26	18.1	81.9	88.4	8.4	3.2
27	18.1	81.9	84.1	12.9	3.0
28	20.3	79.7	83.4	11.5	5.2

3.5.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Bindung von Biotin/Streptavidin an die N₃-Gruppen der Oberfläche untersucht. Entgegen der Vermutung, dass eine Immobilisierung des Modellsystems Biotin/Streptavidin aus sterischen Gründen nur schlecht direkt an die Oberfläche möglich wäre, war die Anbindung erfolgreich, wie mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS bestätigt wurde. Auch hier wurde, wie bei der Immobilisierung des Fluor-substituierten Alkins eine Lösungsmittelabhängigkeit festgestellt.

3.6. Immobilisierung künstlicher Nukleasen zur DNA-Spaltung auf Siliziumnitrid-Oberflächen

3.6.1. Stand der Forschung

In diesem Teil der Arbeit wurde die Immobilisierung eines Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexes auf eine NH_x-terminierte Si₃N₄-Oberfläche und die durch den immobilisierten Komplex induzierte DNA-Spaltung untersucht.

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) bildet die Grundlage lebender Organismen. Das langkettige Biomolekül enthält die Erbinformation in Form von Genen. Die Gene wiederum enthalten Informationen für die Ribonukleinsäuren (RNA), die die Informationen für die Synthese von Proteinen enthalten, welche für die biologische Entwicklung von Lebewesen und dem Zellstoffwechsel essentiell sind. Der Aufbau der DNA besteht aus Desoxinukleotiden, kurz auch Nukleotide, welche über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind und das Rückgrat der DNA bilden (Abbildung 58). Die DNA baut sich aus zwei in entgegengesetzte Richtungen laufende Polynukleotidketten auf, die eine Doppelhelix ausbilden. Jeweils in der Mitte der Doppelhelix stehen sich zwei „gepaarte“ Basenpaare gegenüber. Die komplementären Purin- und Pyrimidinbasen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin sind durch Wasserstoffbrücken verknüpft und führen so zur Stabilisierung der DNA.

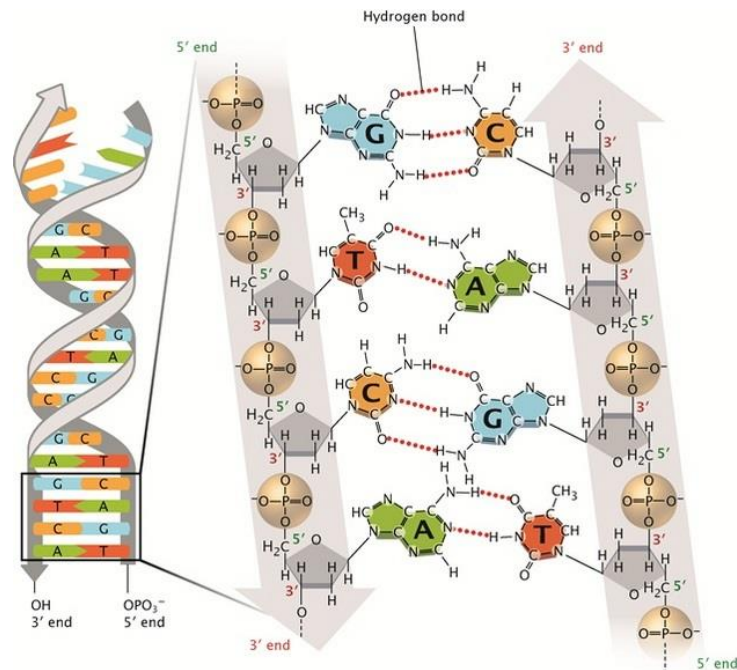


Abbildung 58: Doppelhelix-Struktur der DNA (links), Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang. Das Phosphatrückgrat verläuft parallel zueinander, so dass die komplementären Basenpaare sich gegenüber stehen und Wasserstoffbrücken ausbilden (rechts).^[166]

Einen größeren Anteil zur Stabilität der DNA tragen jedoch die Stapelwechselwirkungen von aufeinanderfolgenden Basen bei. Das negativ geladene Phosphatrückgrat bietet einen zusätzlichen Schutz gegenüber nukleophilen Angriffen, wodurch die sehr lange Haltbarkeit von mehreren Milliarden Jahren unter physiologischen Bedingungen erklärt wird.^[167] Bei der Ausbildung der Doppelhelix aus den Einzelsträngen kommt es aufgrund des Winkels zwischen den glykosidischen Bindungen der Zuckereinheiten, die mit den Basen verbunden sind, zur Ausbildung einer kleinen und einer großen Furche. An diesen Stellen liegen die Basen an der Oberfläche und sind somit frei zugänglich für Proteine, die spezifisch an die DNA binden. Kommt es zu Änderungen der Sequenzabfolge der Basenpaare hat dies entsprechende Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins und somit auf seine Funktion bzw. in einigen Fällen auf die gesamte Zelle. Durch das Auftreten von Mutationen in Driver-Genen, z.B. kann es in der betroffenen Zelle zu einem Wachstumsvorteil und der Bildung von Tumoren kommen.^[168]

Die Entwicklung von Reagenzien, die gezielt und selektiv DNA und Proteine spalten, hat in den letzten Jahren enorm zugenommen. Aufgrund der drastisch gestiegenen Zahl der

Krebskranken, wird intensiv an der Herstellung neuer Krebsmedikamente geforscht. Eine Schlüsselrolle bei der DNA-Spaltung nehmen natürliche Nukleasen ein. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die Metallionen enthalten, die die Phosphodiester- und Amidbindungen der DNA gezielt spalten können. Heutzutage jedoch kann auch durch die Anwendung von Metallkomplexen mit organischen Liganden DNA gezielt und selektiv gespalten werden. Hierbei haben sich besonders Kupfer(II)phenanthrolin-, Kupfer(II)cyclen- oder auch Cobalt(III)cyclen-Komplexe als effektive DNA-Spalter erwiesen.^[169] Der exakte Mechanismus des selektiven Zerschneidens ist jedoch noch nicht vollständig bekannt.

Die DNA-Spaltung wurde bislang überwiegend in Lösung durchgeführt. Mit der Übertragung der DNA-Spaltung auf einen festen Träger kann die künstliche Nuklease direkt zur DNA gebracht werden, um dort selektiv die fehlerhaften Stellen zu entfernen. Gupta et al. beschrieben außerdem eine bessere Spaltaktivität bzw. Flexibilität immobilisierter Nukleasen gegenüber Nukleasen in Lösung. Doch trotz des hohen Anwendungspotentials und einiger Vorteile der DNA-Spaltung auf der Oberfläche gibt es bislang nur zwei Veröffentlichungen.^[170-171] Zharnikov und Gupta untersuchten die Photonukleaseaktivität von Kupfer(II)polypyridyl-Nukleasen gegenüber *ct*DNA in TRIS-Puffer unter UVA-Bestrahlung. Die Nukleasen wurden über eine Silanisierungsreaktion an die Silizium-Oberfläche gebunden.^[170] Die Arbeitsgruppe um Diogenes untersuchte an Kupfer(II)-Clip-Phenanthrolin-Komplexen auf Gold-Oberflächen den Mechanismus und den Einfluss von Hydroxylradikalen auf die DNA-Spaltung.^[171]

Die meist planaren organischen Liganden der Metallkomplexe können durch Interkalation in die DNA binden (Abbildung 59) und bilden häufig sehr stabile Addukte aus, die zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Gruppen am Interkalator und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat stabilisiert werden.

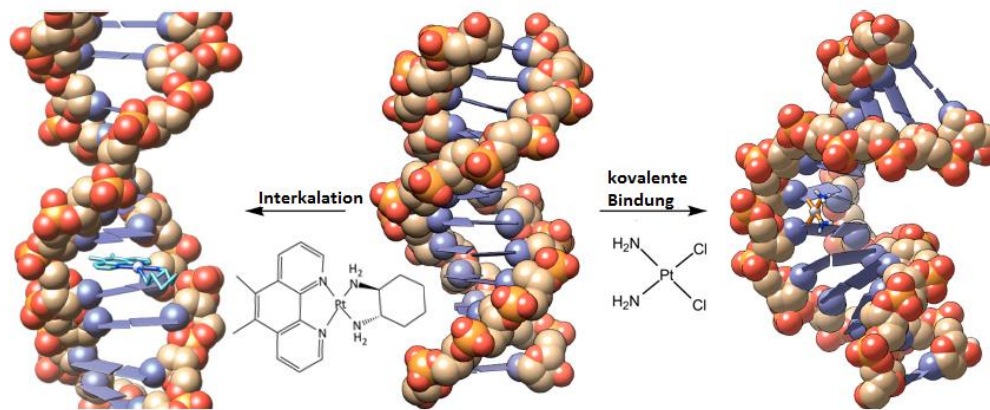
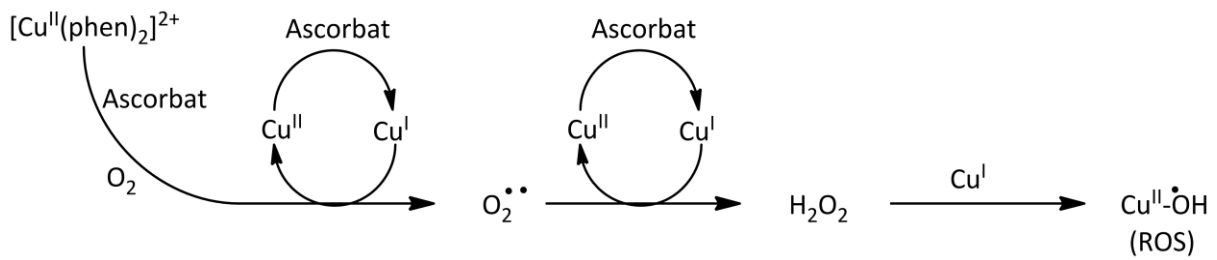


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Interkalation eines Metallkomplexes in die DNA (links) sowie die kovalente Bindung von Cis-Platin an die DNA und die dadurch bedingte Veränderung der DNA-Struktur.^[172]

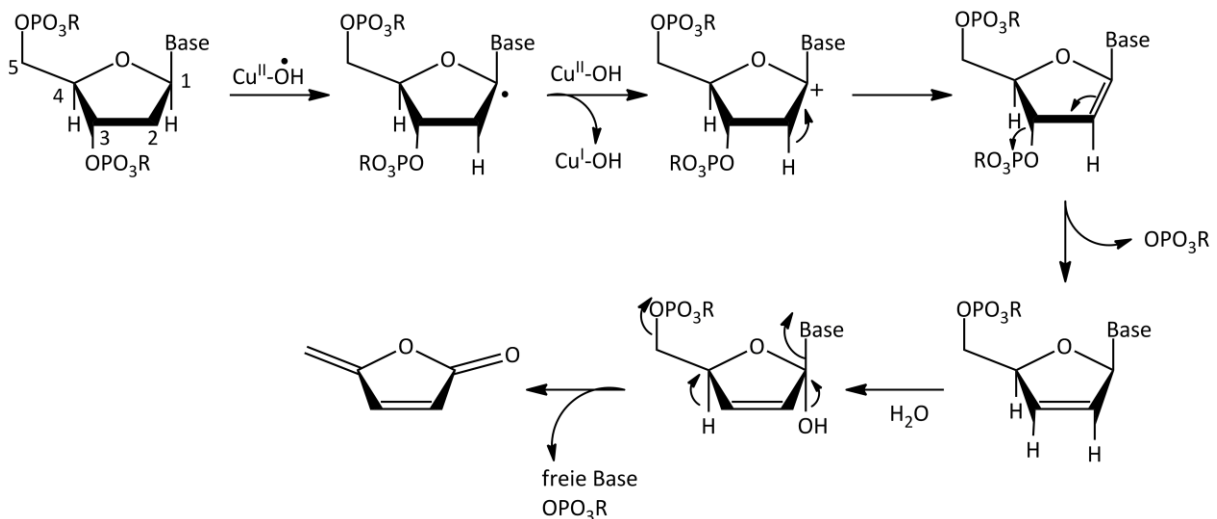
Viele bekannte Interkalatoren sind erfolgreich eingesetzte Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Daunomycin, Adriamycin oder Amsacrin. Weitere bekannte Interkalatoren sind Anthracycline, Polypyridyl-Komplexe oder organische interkalierende Verbindungen, wie Naphthalin, Acridinorange oder Phenanthrolin.

Die DNA kann nach unterschiedlichen Mechanismen gespalten werden. Es wird zwischen der hydrolytischen, photochemischen und der oxidativen Spaltung unterschieden. Für die oxidative DNA-Spaltung eignen sich besonders Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexe, was bereits in den 1970er Jahren beobachtet wurde.^[173] Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung auf der Reduktion des Kupfer(II)-Komplexes zum Kupfer(I)-Komplex in Anwesenheit eines Reduktionsmittels zurückzuführen ist.^[174] Der Cu(I)-Komplex reagiert anschließend mit Sauerstoff zurück zum Cu(II)-Komplex sowie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dazu zählen unter anderem Hydroxylradikale (OH^\cdot), Superoxidationenradikale ($O_2^{\cdot-}$), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Peroxide (O_2^{2-}). Die ROS wiederum können mit dem Kupfer(I)-Komplex, unter Bildung von Wasserstoffperoxid reagieren. Heute gilt die Annahme, dass die DNA-Spaltung durch den $[Cu(phen)_2]^{2+}$ -Komplex durch die Bildung von metallgebundenen Kupfer-Oxo-Spezies, z.B. $Cu^{II}-OH$ oder Cu^I-OOH , initiiert wird (Schema 1).^[175]



Schema 1: Redoxreaktion des Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexes während der DNA-Spaltung.^[173, 176]

Es wird angenommen, dass die reaktiven Sauerstoffspezies durch die Interkalation der Kupfer(I)phenanthrolin-Komplexe zwischen die Basen der DNA in die Nähe der DNA gebracht werden und so die Spaltung initiieren. Es folgt die Abstraktion des Wasserstoffs am C1-Atom zum Keton gefolgt von einer Reaktionssequenz zum 5-Methylfuranon (Schema 2).^[177]



Schema 2: Ein möglicher Mechanismus der oxidativen DNA-Spaltung initiiert durch reaktive Sauerstoffspezies.^[177]

Bei der photochemischen Spaltung wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass bestimmte Verbindungen im angeregten Zustand Reaktionen hervorrufen können, die zur Spaltung der DNA führen. Die Anregung erfolgt hierbei mit ultraviolettem oder sichtbarem Licht. Typische Photospalter haben organische Liganden mit einem großen π -System. Es gibt jedoch auch einige Metallkomplexe, bei denen das Metallzentrum die Photospaltung bewirkt.^[178-179]

Bei der hydrolytischen Spaltung werden die Phosphodiesterbindungen des DNA-Rückgrats hydrolysiert. Da die DNA gegenüber der Hydrolyse sehr stabil ist, wird sie durch bestimmte Enzyme, Nukleasen, Phosphatasen und Topoisomerasen katalysiert, und die Spaltung dadurch um das 10¹⁷-10²¹-fache beschleunigt. An diesen Enzymen orientieren sich die künstlich entwickelten Nukleasen. Die meisten Enzyme haben Zn(II), Mg(II) und Ca(II) als katalytisches Metallzentrum.^[180]

In dieser Arbeit wurde die oxidative Spaltung von DNA durch einen 5-Trifluormethoxy-1,10-Kupfer(II)phenanthrolin-Komplex auf einem Siliziumnitrid-Träger untersucht. Die OCF₃-Komponente diente als XPS-Sonde, da Fluor besonders empfindlich nachgewiesen werden kann und die OCF₃-Komponente aufgrund ihrer großen chemischen Verschiebung einfach zu identifizieren ist. Im Vergleich zu Fluor- bzw. Trifluormethylsubstituenten ist die Bindungsenergie der Trifluormethoxygruppe stärker zu höheren Bindungsenergien verschoben, was von dem stärker elektronenziehenden OCF₃-Substituenten hervorgerufen wird. Die 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure sowie der Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex wurden von Carsten Lüdtker im Rahmen seiner Doktorarbeit in der Freien Universität Berlin (AG Kulak) synthetisiert.^[181-182]

Die 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure wurde mittels Amid-Kopplung nach einem Protokoll von Christian Wende (AG Kulak, FU Berlin)^[183] an die NH_x-terminierte Siliziumnitrid-Oberfläche gebunden.^[184] Zunächst greift die durch DIPEA (Diisopropylethylamin) deprotonierte Carbonsäure das Phosphoratom des PyBOPs (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat) an. Nach der Abspaltung der Benzotriazoleinheit greift diese den Carbonylsauerstoff unter Bildung der aktivierten 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (Aktivester) an. Die Triebkraft der Reaktion ist die Bildung der P=O-Doppelbindung des entstehenden Phosphorsäuretriamids. Im letzten Schritt erfolgt nun der Angriff der NH_x-terminierten Oberfläche an die Carbonylfunktion des Aktivesters und die Kopplung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure an die Si₃N₄-Oberfläche. Der Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex wurde im nächsten Schritt durch Eintauchen der immobilisierten 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure in die methanolische Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex Lösung gebildet (Abbildung 60).

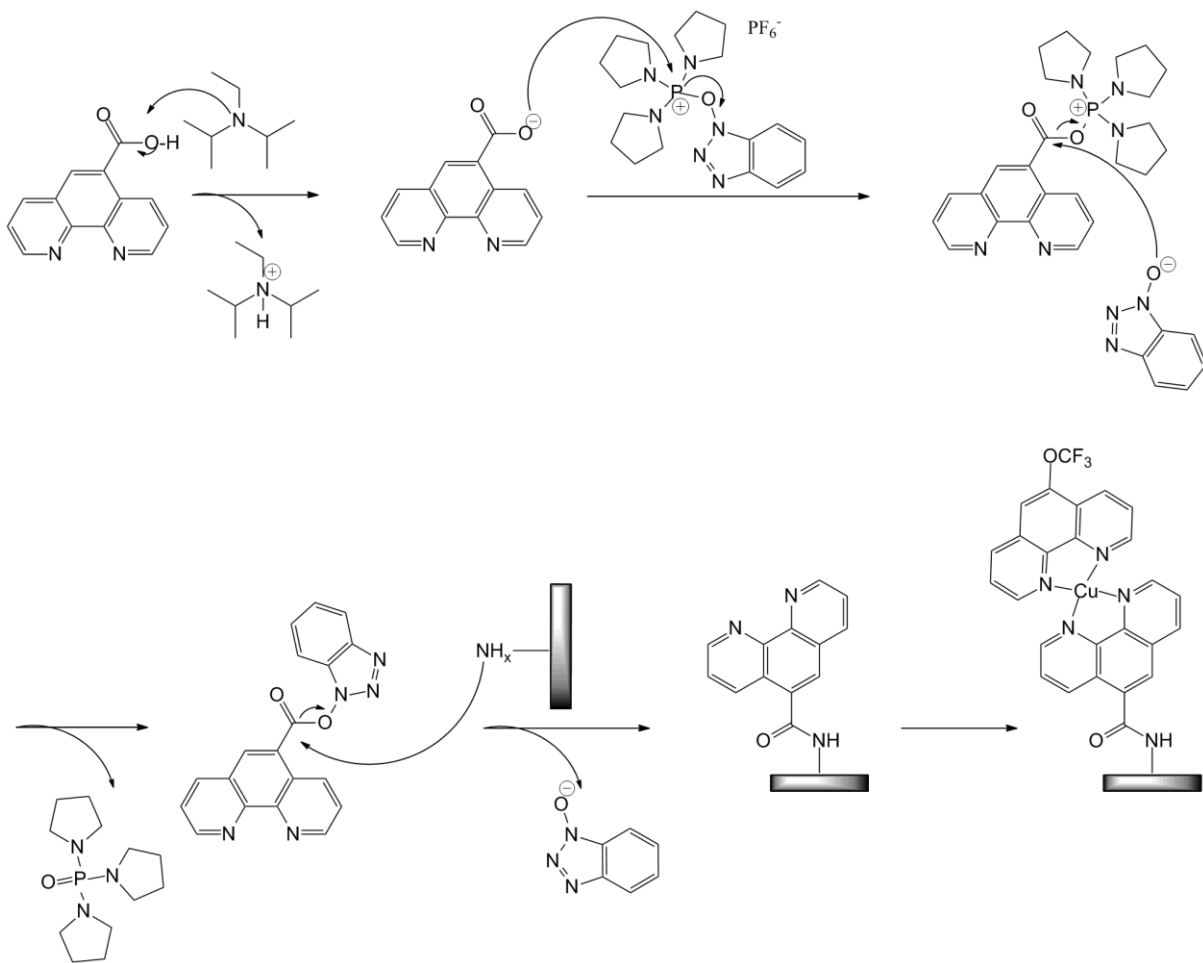


Abbildung 60: Mechanismus der Immobilisierung von 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure an die Si-NH_x-terminierte Siliziumnitrid-Oberfläche durch Amid-Kopplung.

Die DNA Spaltaktivität des immobilisierten Kupfer(II)-Komplexes wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wird die Oberfläche mit der Plasmid-DNA-Lösung inkubiert, gewaschen und anschließend wird die Lösung in die Taschen des Agarosegels geladen. Agarose ist ein aus *D*-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose aufgebautes Polysaccharid, welches nach Erhitzen in Wasser und Abkühlen ein quervernetztes Polymernetz bildet. Die Porengröße ist abhängig von der Agarosekonzentration. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt nach dem Anlegen einer Spannung, wie in Abbildung 61 links gezeigt. Hierbei laufen die negativ geladenen DNA-Fragmente zur positiven Anode. Die eingesetzte Plasmid-DNA liegt in der Form I (*supercoiled* Form) vor. Nach der Spaltung liegt die DNA in der *nicked, open circular* oder *relaxed* Form II vor. Erfolgt in relativer Nähe zum

ersten Bruch ein zweiter, liegt die DNA *linear* vor (Form III). Die möglichen DNA-Formen nach der Spaltung werden in Abbildung 61 rechts gezeigt. Supercoiled DNA (Form I) bewegt sich, aufgrund geringerer Wechselwirkungen mit dem Gel, schneller durch das Agarose-Gel als die *lineare* (Form III) bzw. die *nicked* (Form II) DNA.

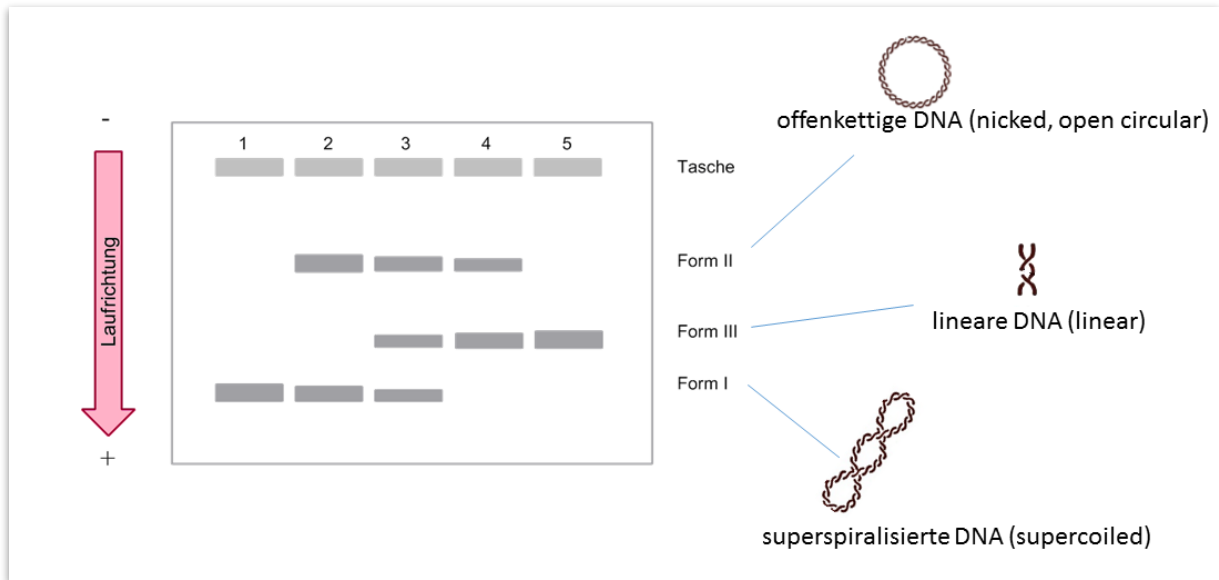


Abbildung 61: Schema der Agarose-Gelelektrophorese (links). Die DNA-Lösung wird in die Taschen geladen, die Auftrennung erfolgt nach dem Anlegen einer Spannung nach der Größe der DNA (Form I, II oder III) (rechts).

Die Detektion der aufgetrennten Fragmente erfolgt mit Ethidiumbromid (Abbildung 62). Ethidiumbromid ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der nach der Interkalation in die Basen der DNA sein Anregungs- und Emissionsspektrum verändert. Durch die Anregung mit UV-Bestrahlung kann daraufhin die DNA durch den fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden.

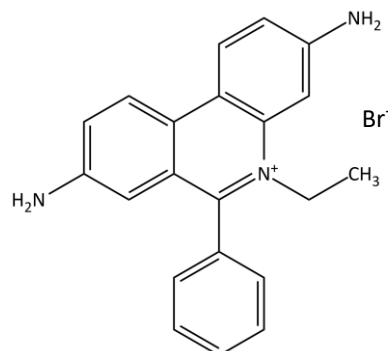


Abbildung 62: Ethidiumbromid wird zum Nachweis von RNA und DNA zum Anfärben bei der Gelelektrophorese verwendet.

3.6.2. Herstellung und Charakterisierung künstlicher Nukleasen auf Siliziumnitrid-Oberflächen

Ausgehend von den synthetisierten Kupfer(II)phenanthrolin-Komplexen (Carsten Lütke (FU Berlin)) wurde zunächst die 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (**L1**) durch Amid-Kopplung an die frisch präparierten Si-NH_x-Oberflächen gebunden, gefolgt von der Komplexbildung in Methanol mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex (**CuL2**) (Abbildung 63). Diese Oberflächen wurden anschließend mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS untersucht.

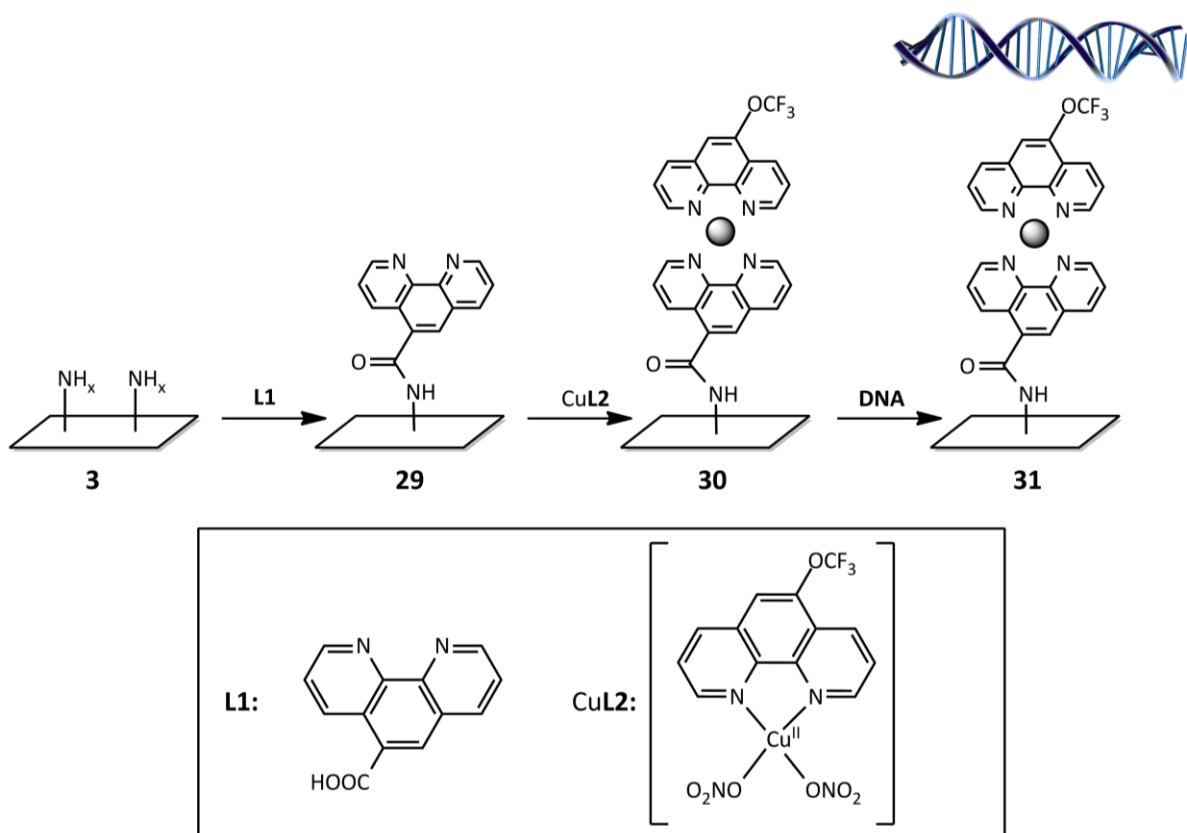


Abbildung 63: Kopplung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (**L1**) an die NH_x-terminierte Oberfläche, gefolgt von der Komplexbildung mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex (**CuL2**) und anschließender Interkalation in die DNA. (Die genaue Struktur des Komplexes **CuL2** ist nicht bekannt).

Die Elementzusammensetzung einer mit der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure **29** und einer mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten Oberfläche **30** ist in Tabelle 16 im Vergleich zu einer gereinigten Oberfläche **3** dargestellt. Aus den Übersichtsspektren konnte eine deutlich erhöhte Kohlenstoffkonzentration im Vergleich zur

gereinigten Oberfläche festgestellt werden, was auf eine erfolgreiche Immobilisierung der Carbonsäure hinweist. Weiterhin ist eine reduzierte Stickstoff- und Siliziumoberflächenkonzentration in den XP-Spektren nachzuweisen, was auf die erfolgreiche Bindung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure hinweist, wodurch wiederum die Photoelektronensignale des Si₃N₄-Substrates gedämpft werden. Die Immobilisierung des Kupfer(II)-Komplexes hat eine weitere Erhöhung der Kohlenstoffkonzentration und eine Reduzierung der Stickstoff- und Siliziumkonzentration zur Folge. Weiterhin konnte für die Oberfläche **30** sowohl Kupfer (0.4 at.%) als auch eine erhöhte Fluorkonzentration (1.4 at.%) nachgewiesen werden. Die Betrachtung der Elementzusammensetzung der immobilisierten Oberfläche liefert Hinweise auf die erfolgreiche Bindung des Liganden **L1**, gefolgt von der Komplexbildung mit Cu**L2**. Weitere Informationen werden aus den hochaufgelösten SR-XP-Spektren erhalten.

Tabelle 16: XPS Elementzusammensetzung einer gereinigten (**3**), einer mit 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure modifizierten Si₃N₄-Oberfläche (**29**) und einer mit Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex funktionalisierten Si₃N₄-Oberfläche (**30**).

Probe	O 1s (at.%)	C 1s (at.%)	N 1s (at.%)	F 1s (at.%)	Cu 2p (at.%)	Si 2p (at.%)
3	3.0 (±0.2 %)	2.0 (±0.2 %)	53.3 (±0.3 %)	2.0 [#] (±0.2 %)	-	35.0 (±0.2 %)
29	10.0 (±0.2 %)	10.5 (±0.2 %)	44.7 (±0.2 %)	0.9 [#] (±0.2 %)	-	33.9 (±0.2 %)
30	11.4 (±0.2 %)	15.2 (±0.2 %)	40.2 (±0.2 %)	1.4 [*] (±0.2 %)	0.3 (±0.2 %)	31.5 (±0.2 %)
Negativ- kontrolle	9.9	10.0	45.2	1.0 [#]	-	33.9

[#] anorganische Fluorkomponente von der Flusssäureätzung; ^{*} organische Fluorkomponente von dem OCF₃-Substituenten

Da die relevanten Beiträge (CN-Bindungen) aus dem hochaufgelösten N 1s-SR-XP-Spektrum von dem dominierenden Nitridpeak des Substrats überlagert werden, erfolgte eine indirekte Identifizierung des Liganden **L1** mit XPS nach der Komplexbildung mit dem Komplex Cu**L2**. Im NEXAFS C K-Kanten-Spektrum einer mit dem Liganden **L1** immobilisierten Si₃N₄-Oberfläche **29** konnten jedoch Resonanzen für die Anregung in π^{*}-Orbitale bei 284.6 eV und 285.6 eV gefunden werden, welche vom Phenanthrolin-Rest hervorgerufen werden. Die Resonanz bei 284.9 eV wird mit den C=C-Bindungen des Liganden **L1** in Verbindung gebracht, wohingegen die Resonanz bei der Photonenenergie von 285.6 eV von den C=N-Bindungen des

Phenanthrolins stammen. Eine Aufspaltung der π^* -Resonanz wurde bereits für Terpyridin-Reste beschrieben, die über einen ähnlichen strukturellen Aufbau verfügen.^[185-187] Außerdem wurden CH^{*}-Resonanzen bei 287.1 eV detektiert, welche vom aromatischen System des Liganden **L1** hervorgerufen werden und auf der gereinigten Oberfläche **3** nicht nachzuweisen sind. Die Resonanz bei 288.1 eV ist den Amid-Bindungen (C=O), über die die Kopplung des Liganden **L1** erfolgte, und Kontaminationen der Oberfläche zuzuordnen (Abbildung 64).^[186]

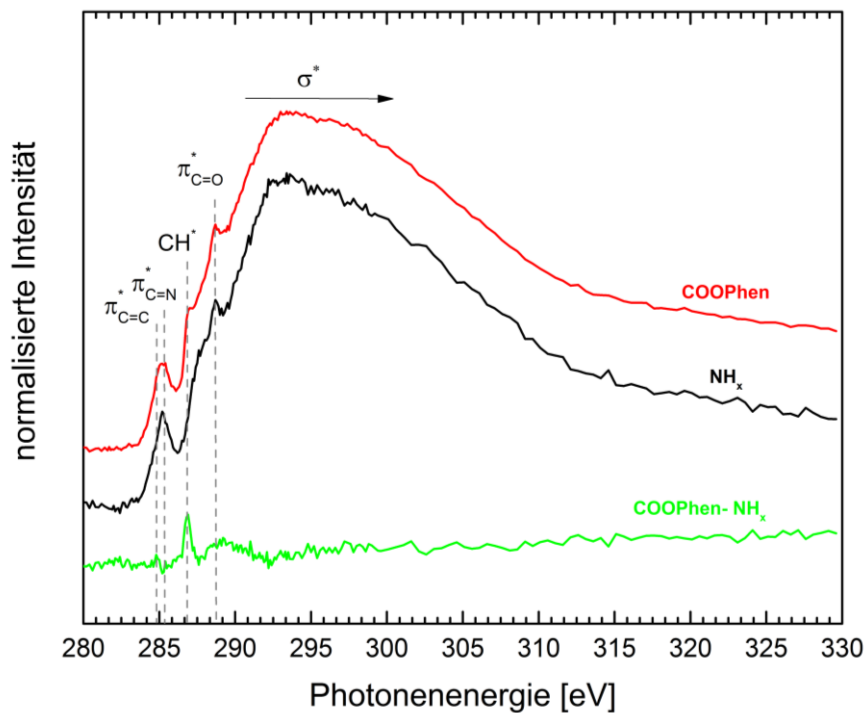


Abbildung 64: NEXAFS C K-Kante einer mit 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (**L1**) immobilisierten Si₃N₄-Oberfläche **29** (rot) verglichen mit einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche **3** (schwarz) und dem Differenzspektrum (grün).

Die im Anschluss erfolgte Bildung des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes **30** konnte eindeutig mit XPS (Abbildung 65) und NEXAFS (Abbildung 66) nachgewiesen werden. Im hochaufgelösten C 1s-SR-XP-Spektrum wurde bei 285.0 eV neben dem aromatischen Gerüst des Phenanthrolins, CN-Bindungen bei 286.6 eV und C=O-Signale bei 288.3 eV nachgewiesen. Hierbei können Beiträge verursacht durch Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden. Die OCF₃-Gruppe wurde eindeutig bei 294.9 eV detektiert, was mit Werten aus der Literatur überein stimmt (Abbildung 65 a).^[188] Die Immobilisierungseffizienz von (85±2) % wurde aus der experimentell ermittelten relativen Peakfläche der OCF₃-Gruppe

(3.3 %) im C 1s-SR-XP-Spektrum und der theoretisch zu erwartende Anteil einer vollständig immobilisierten Oberfläche (3.9 %) bestimmt. Weiterhin wurde Kupfer eindeutig bei 933.2 eV und 953.0 eV identifiziert (Abbildung 65 d).^[189-190] In der Cu 2p-Region (Abbildung 65 d) sind jedoch mehrere Kupfer-Spezies zu finden, vorwiegend handelt es sich hierbei jedoch um Cu(I)- bzw. Cu(0)-Spezies und um nur sehr wenig Cu(II). Die Röntgenstrahlung könnte zu einer Reduktion des eingesetzten Kupfer(II)-Komplexes führen und Cu(I) bzw. Cu(0) hervorrufen.^[191-192]

Die auf der Oberfläche immobilisierte Kupfermenge wurde mit der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) auf 0.08 µg/cm² ermittelt, was 87 x 10¹² Kupferatomen pro cm² entspricht. Hierfür wurden je drei komplexierte Si₃N₄-Oberflächen über Nacht in hochreine Salpetersäure (1 %) getaucht, um den Komplex von der Oberfläche zu lösen und den organischen Liganden zu zerstören. Die verdünnte und mit einem internen Standard versetzte Lösung wurde anschließend zur Bestimmung der Kupfermenge verwendet. Die vollständige Abtrennung des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes wurde mittels Laserablation ICP-MS (LA-ICP-MS) bestätigt. Hierfür wurden jeweils drei Linienscans aufgenommen und ausgewertet. Die Linienscans der Proben zeigten meist keine erhöhten Kupfer-Intensitäten. Kupfer wurde lediglich an einem Punkt eines Linienscans detektiert, was vermutlich vom Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex stammt. Daraus lässt sich auf die nahezu vollständige Ablösung des Komplexes schließen.

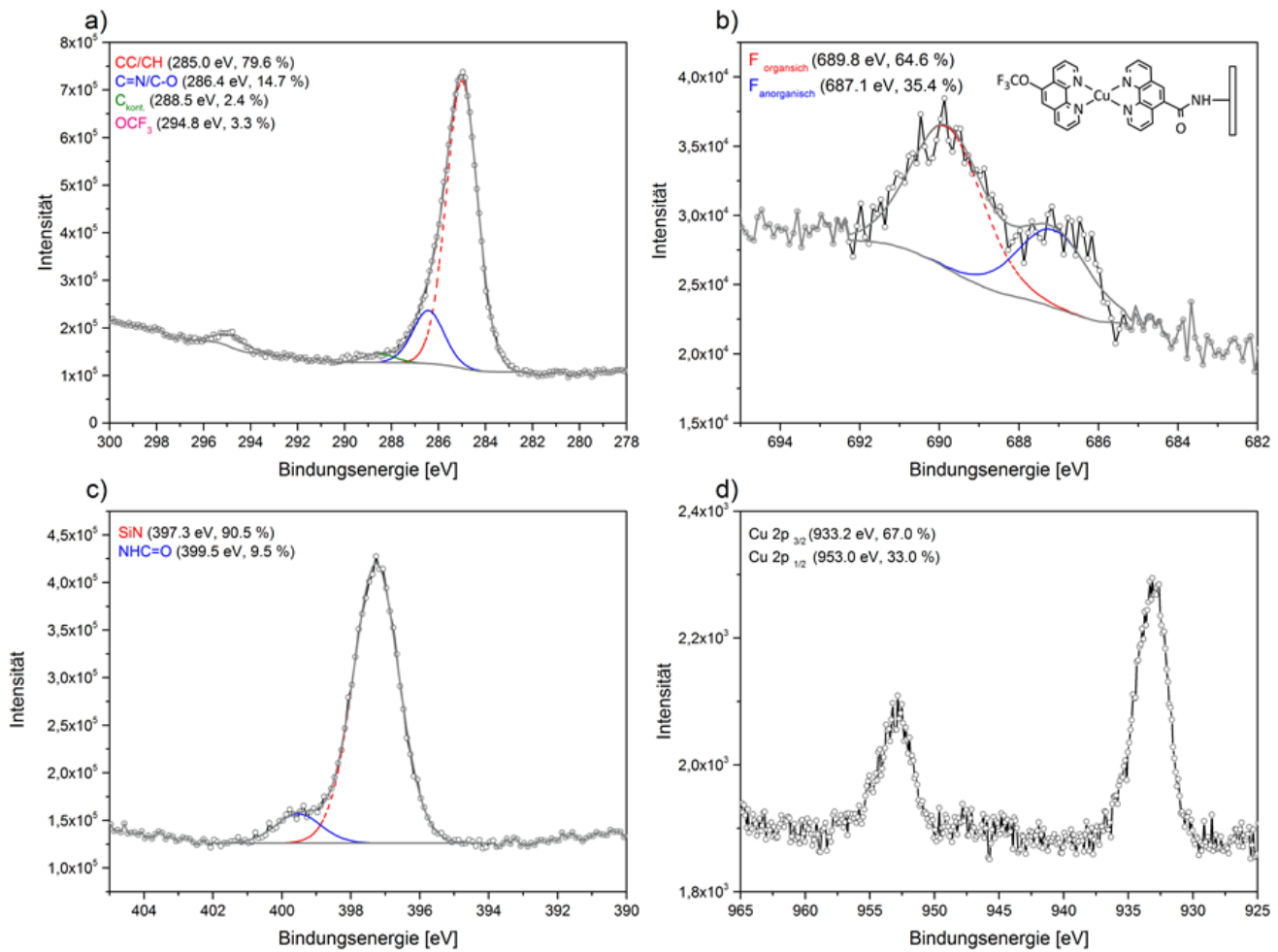


Abbildung 65: Hochaufgelöste C 1s-, F 1s-, N 1s-SR-XP-Spektren und Cu 2p-Labor-XP-Spektren einer mit einem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten Si₃N₄-Oberfläche (**30**). Die OCF₃-Gruppe wurde im C 1s-SR-XP-Spektrum bei 294.8 eV nachgewiesen (a). Das F 1s-SR-XP-Spektrum zeigt die organische Fluorkomponente der Trifluormethoxygruppe bei 689.8 eV (b). Die gebildete Amidgruppe wurde im N 1s-SR-XP-Spektrum bei 399.5 eV nachgewiesen (c). Die Existenz des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes wurde durch das Cu 2p-Labor-XP-Spektrum nachgewiesen (d) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV), $z_{95}=2.0$ nm, $z_{95}=4.5$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV) und $z_{95}=10$ nm für Cu 2p ($h\nu=1487$ eV)).

Auch in dem NEXAFS C K-Kanten-Spektrum des auf der Oberfläche befindlichen Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes **30** wurde die gesplittete π^* -Resonanz des Phenanthrolin-Gerüsts (C=C und C=N) bei 284.5 eV und 285.6 eV^[185-187] sowie eine π^* -Resonanz (C=O) bei 288.1 eV^[186] gefunden. Verglichen mit der C K-Kante einer nur mit **L1** immobilisierten Oberfläche **29** (Abbildung 66 a) und einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche (Abbildung 66 b) haben sich die Signale jedoch verstärkt. Außerdem wurde in der F K-Kante des an der Oberfläche immobilisierten Komplexes **30** eine σ^* -Resonanz (C-F) nachgewiesen

(Abbildung 66 c), welche von der OCF_3 -Gruppe hervorgerufen wird und im Vergleich zur F K-Kante einer gereinigten Oberfläche **3** zu höheren Photonenergien verschoben ist.

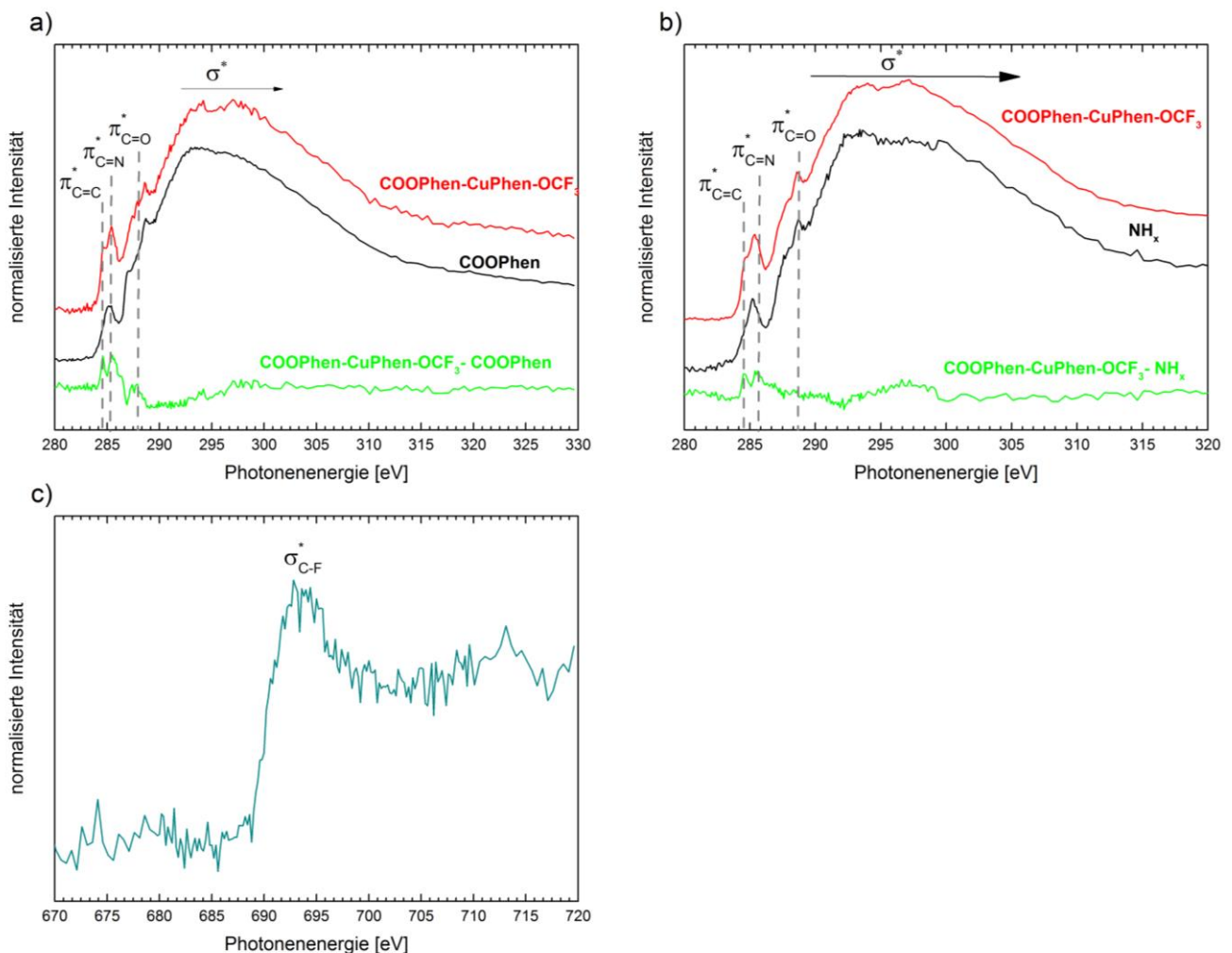


Abbildung 66: NEXAFS C K-Kante der mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten Si_3N_4 -Oberfläche (**30**) im Vergleich zur Oberfläche mit der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (**29**) (a) und Si_3N_4 Oberfläche mit immobilisiertem Komplex (**30**) im Vergleich zur Si-NH_x Oberfläche (**3**) (b). Das Differenzspektrum wurde ebenfalls abgebildet (grün). Die F K-Kante zeigt $\sigma^*(\text{C-F})$ Resonanz des OCF_3 -Substituenten (c). Die Spektren wurden bei einem Winkel von 55° aufgenommen.

Um unspezifische Bindungen des Komplexes CuL2 an die NH_x -terminierte Oberfläche auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurde der Komplex CuL2 ohne die vorherige Bindung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure **L1** mit der NH_x -terminierten Si_3N_4 -Oberfläche in Kontakt gebracht. In der Elementzusammensetzung der Oberfläche konnte weder Kupfer noch organisches Fluor nachgewiesen werden (Tabelle 16).

In den C 1s- und F 1s-SR-XP-Spektren konnten keinerlei Hinweise auf die OCF₃-Komponente des Liganden nachgewiesen werden. Lediglich im Labor-XPS Spektrum konnte Kupfer im hochaufgelösten Cu 2p-XP-Spektrum gefunden werden. Im Übersichtsspektrum konnte jedoch kein Kupfer nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Menge des an der Si₃N₄-Oberfläche gebundenen Kupfer-Komplexes CuL2 so gering, dass sie vernachlässigt werden kann. Daher wird nicht von unspezifischen Bindungen zwischen dem Komplex CuL2 und den Aminogruppen der Oberfläche ausgegangen (Spektrenanhang 7.16).

Zusätzlich zur Untersuchung mit XPS wurden sowohl Oberflächen mit dem Liganden L1 (29) als auch Oberflächen mit dem immobilisierten Komplex CuL2 (30) mit ToF-SIMS untersucht und eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Auf die erhaltenen ToF-SIMS Daten wurde eine PCA angewendet, um die einzelnen Reaktionsschritte, die Bindung von L1 und die Komplexbildung mit CuL2, voneinander zu unterscheiden. Der Score-Plot der PCA der positiven Sekundärionen einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche und einer mit der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (L1) immobilisierten Oberfläche 29 zeigt deutlich die Trennung des Substrates von der Probe 29 auf der PC1 (Abbildung 67 a). Das gereinigte Substrat ist auf dem Loadings-Plot im negativen Bereich zu finden, die Fragmente nach der Bindung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure befinden sich hingegen im positiven Bereich. Die Bindung von L1 konnte eindeutig aufgrund der und Phenanthrolin typischen Sekundärionen-Fragmente (Phen⁺, C₁₁H₈N⁺...) identifiziert werden (Abbildung 67 b).

Im nächsten Schritt wurde eine erneute PCA durchgeführt, um Probe 29 und somit die Bindung von L1 von der Probe 30 und der Bildung des Komplexes L1+CuL2 unterscheiden zu können (Abbildung 67 c und d). Hierbei konnte die Bindung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure ebenfalls deutlich von der Schicht nach der Komplexbildung getrennt werden (Abbildung 67 c). Bei der Betrachtung des Loadings-Plots wurden die Fragmente des Liganden L1 (Phen⁺, C₁₁H₈N⁺...) sowie des Substrates (Si₅N₄⁺, Si₃N₂⁺...) im negativen Bereich der PC1 gefunden. Die Sekundärionen-Fragmente des Komplexes L1+CuL2 (CF₃⁺, Cu⁺, PhenOCF₃⁺, CuPhenOCF₃⁺) hingegen wurden im Loadings-Plot der PC1 im positiven Bereich gefunden. Durch die Anwendung der PCA auf die ToF-SIMS-Daten der Oberflächen 3, 29, 30 konnte die Kupfer(II)-Komplexbildung eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem war es durch die höhere Empfindlichkeit der ToF-SIMS im Vergleich zu XPS möglich die Bindung von L1 an die NH_x-terminierte Oberfläche nachzuweisen.

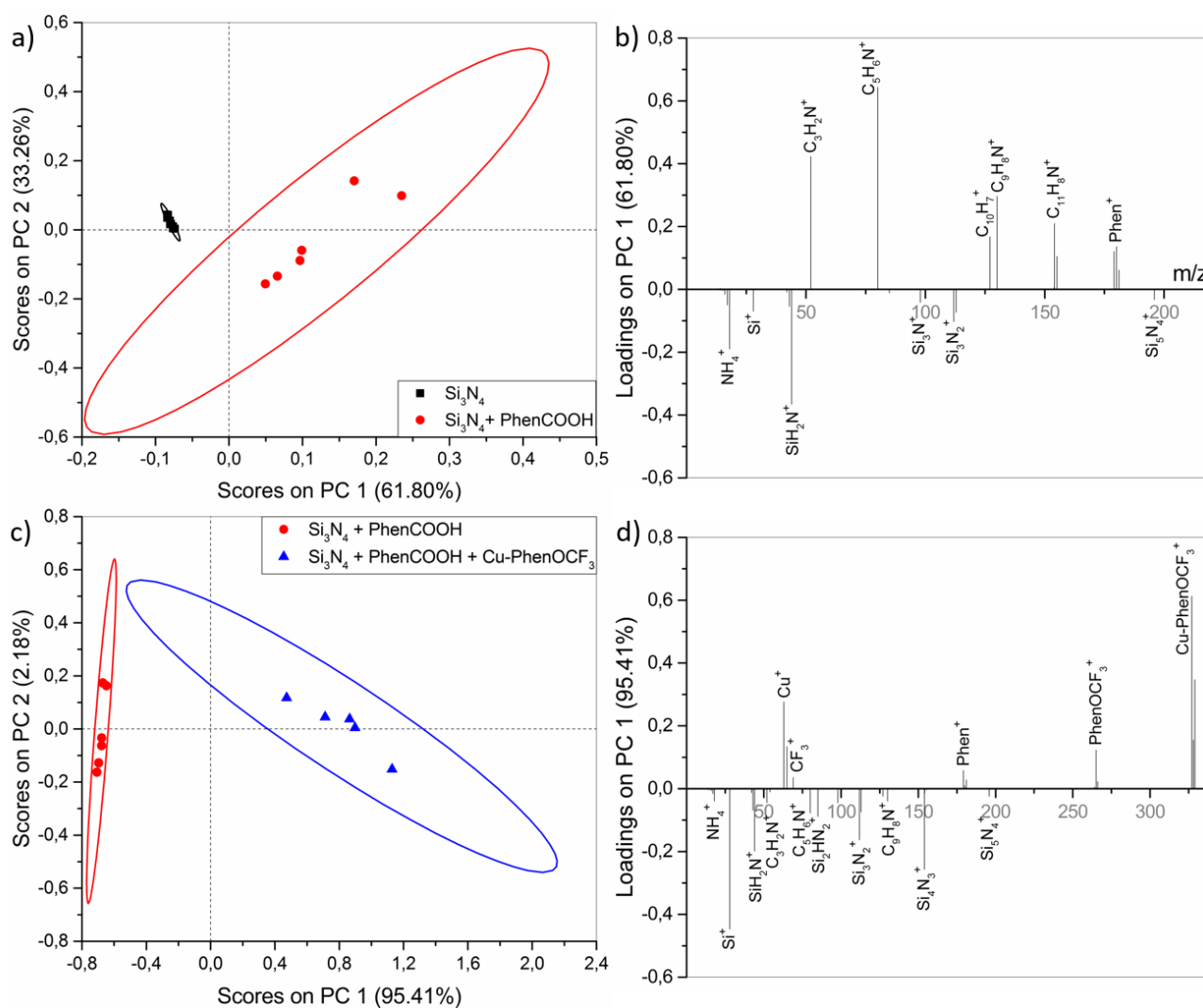


Abbildung 67: Score- und Loading-Plots der Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Si_3N_4 -Oberflächen nach der Bindung von **L1** PhenCOOH (**29**) (Abbildung a und b) sowie nach dem zweiten Reaktionsschritt nach der Komplexbildung von **L1** und Cu**L2** (**30**) (Abbildung c und d).

Nachdem die Immobilisierung des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes erfolgreich nachgewiesen wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Inkubation mit pBR322 *supercoiled* Plasmid-DNA zur Untersuchung der DNA-Spaltaktivität des auf der Oberfläche gebundenen Komplexes. Zunächst wurden die inkubierten Oberflächen mit XPS untersucht. Bei der Betrachtung des C 1s-SR-XP-Spektrums ist auffällig, dass die OCF₃-Komponente des Kupfer(II)-Komplexes verschwunden ist, was durch die Inkubation mit der DNA zu erklären ist (Abbildung 68 a). Dabei interkaliert der Komplex in die DNA, was zur Folge hat, dass die OCF₃-Gruppe durch die DNA abgeschirmt wird. Im P 2p-SR-XP-Spektrum ist Phosphor aus dem

Phosphat-Rückgrat der DNA eindeutig nachzuweisen (Abbildung 68 b), was mit Werten aus der Literatur übereinstimmt.^[193-194]

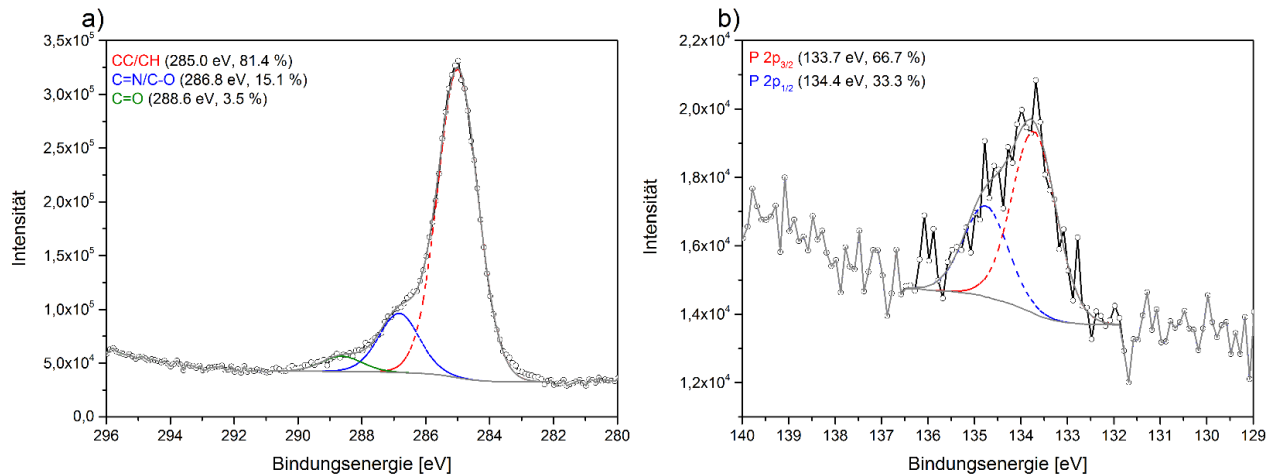


Abbildung 68: Hoचाufgelöste C 1s- und P 2p-SR-XP-Spektren einer mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten und mit DNA inkubierten Si₃N₄-Oberfläche **31**. Gezeigt wird das Verschwinden der OCF₃-Gruppe des Komplexes im C 1s-SR-XP-Spektrum sowie das Auftreten eines Phosphor-Peaks im P 2p-SR-XP-Spektrum nach der Inkubation mit pBR322-Plasmid-DNA ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=1.2$ nm für P 2p ($h\nu=230$ eV)).

Im N 1s-SR-XP-Spektrum sind sowohl bei einem Winkel von 0 ° als auch bei 60 ° neben dem Substratnitrid bei 397.4 eV Aminogruppen (NH₂) der Nucleobasen der DNA bei 399.2 eV^[195-197] und Amidbindungen (NHC=O) der Basen der DNA bei 400.4 eV zu finden (Abbildung 69).^[193, 198-199] Durch die Variation des Emissionswinkels kann die Tiefeninformation im XP-Spektrum verändert werden. Dadurch kann auf den Schichtaufbau des untersuchten Systems geschlossen werden. Aufgrund der Verstärkung der DNA-spezifischen Amino- und Amidgruppen-Signale bei einem Emissionswinkel von 60 ° ($z_{95}=2.3$ nm) im Vergleich zu dem Spektrum bei 0 ° ($z_{95}=4.5$ nm) kann auf die Interkalation der DNA in die immobilisierte Nuklease geschlossen werden.

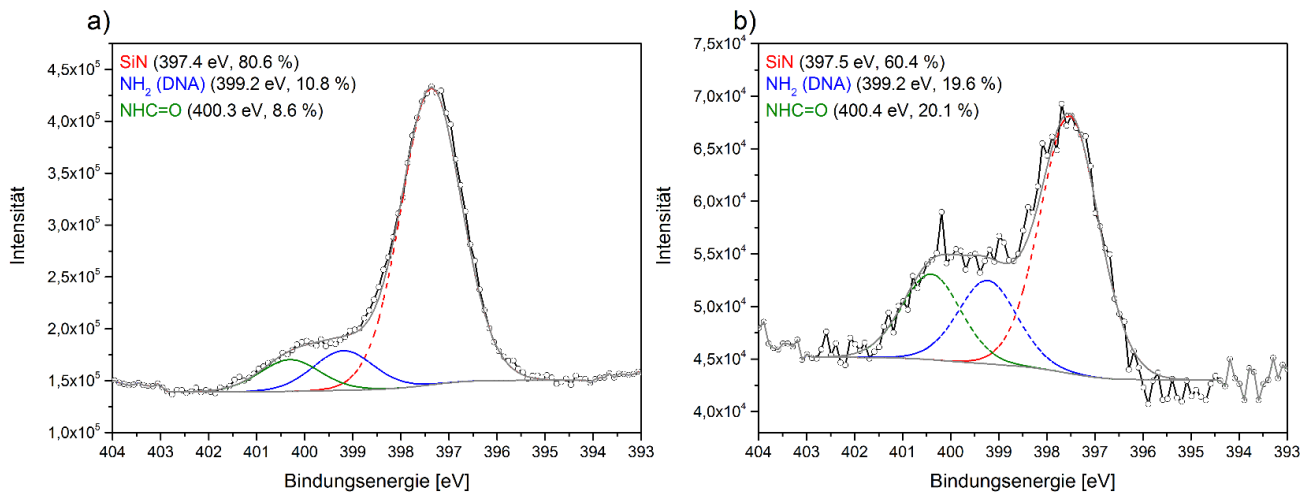


Abbildung 69: Hochaufgelöste N 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-komplex immobilisierten und mit pBR322-Plasmid-DNA inkubierten Si₃N₄-Oberfläche. Gezeigt wird das Signal der NH₂-Gruppen und Amidbindungen der DNA bei einer erhöhter Oberflächenempfindlichkeit bei einem Emissionswinkel von 60 ° ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm; $\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)) die für einen Schichtaufbau mit der DNA in der äußersten Oberfläche sprechen.

In der Elementzusammensetzung der DNA-inkubierten Proben konnten jedoch nur Spuren von Phosphor nachgewiesen werden, was daran liegt, dass die DNA-Konzentration auf der Oberfläche sich an der Nachweisgrenze der XPS befindet. Durchgeführte Negativkontrollproben zeigten, dass die DNA auch an der NH_x-terminierten Si₃N₄-Oberfläche adsorbiert. Da die DNA sowohl an der komplexierten als auch an der gereinigten Oberfläche adsorbiert, ist ein gründlicher Reinigungsprozess erforderlich, um die gespaltene DNA mittels Gelelektrophorese untersuchen zu können. Nach dem erfolgreichen Nachweis der Immobilisierung künstlicher Nukleasen direkt auf Si₃N₄-Oberflächen und dem Nachweis von immobilisierter DNA wird in den folgenden Experimenten die Spaltaktivität des Komplexes untersucht.

3.6.3. Untersuchung der Spaltaktivität von immobilisierten Cu(II)phen-Komplexen

In Kapitel 3.6.1.1 wurde gezeigt, dass es möglich ist künstliche Nukleasen direkt an die Siliziumnitrid-Oberfläche unter Ausnutzung der Oberflächenamine zu binden. In diesem Abschnitt wird die Spaltaktivität der immobilisierten, künstlichen Nuklease auf Siliziumnitrid untersucht. Hierzu wurden die Oberflächen mit pBR322 *supercoiled* Plasmid-DNA in MOPS-Puffer (50 mM) bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In dieser Arbeit MOPS-Puffer anstelle des herkömmlich verwendeten Tris-Puffers eingesetzt, aufgrund der hohen Bindungskonstante von Tris gegenüber Kupfer(II). Dadurch wird eine konkurrierende Spaltung hervorgerufen durch einen Tris-Kupfer(II)-Komplex, vermieden.^[200] L-Ascorbinsäure (0.32 mM) diene als Reduktionsmittel. Zum Vergleich wurde jeweils in der ersten Tasche des Gels eine DNA-Leiter aufgetragen, die aus der *supercoiled* Form I, der *nicked* Form II und der *linearen* Form III besteht. Außerdem diene eine NH_x-terminierte Si₃N₄-Oberfläche als Negativkontrolle zur Überprüfung, ob die Spaltung von dem immobilisierten Kupfer(II)phenanthrolin-Komplex ausgeht. Die Positivkontrolle, bestehend aus einem 1:1-Kupfer(II)phenanthrolin-Komplex in Lösung (Abbildung 70), diene, ebenso wie die Referenz einer Mischung der DNA und des Reduktionsmittels, zur Überprüfung der Spaltaktivität der Nukleasen. Die Positivkontrolle wurde vor der Inkubation *in situ* aus einem 1:1-Gemisch des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex CuL2 und der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure L1 hergestellt. Hierbei ergibt sich jedoch das Problem, dass neben dem 1:1-Komplex (L1+CuL2) auch folgende Kombinationen der Liganden L1+L1, CuL2+CuL2 auftreten können, was durch ein 1:1-Verhältnis der eingesetzten Liganden L1 und CuL2 versucht wurde zu reduzieren.

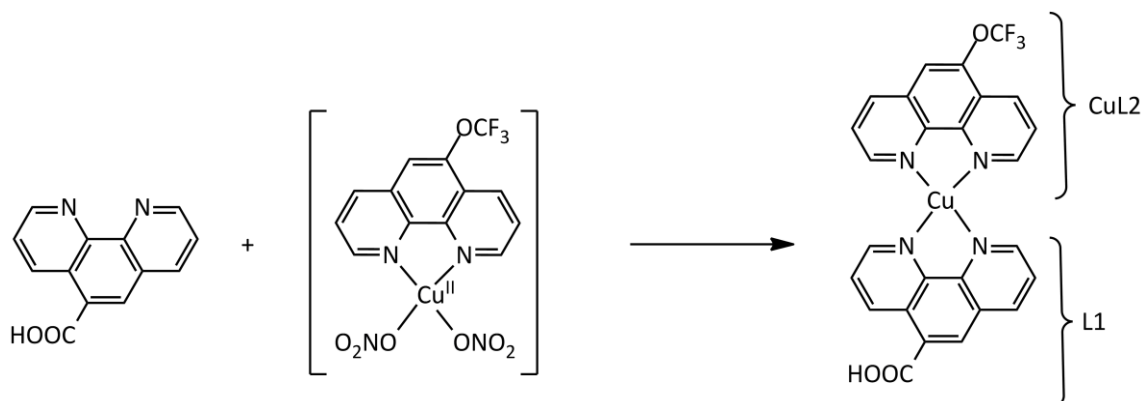


Abbildung 70: Bildung des 1:1-Komplexes des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes aus 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (**L1**) und dem Dinitrato(1,10-phenanthrolin-5-trifluormethoxy)-Kupfer(II)-Komplex (**CuL2**).

Die Bildung des Komplexes wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie überprüft. Hierfür wurden jeweils UV/Vis-Spektren des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex **CuL2** und der frisch hergestellten Positivprobe aufgenommen. Aus der Verschiebung des Maximums des d-d-Überganges nach der Komplexbildung ($\lambda_{\text{max}} = 753 \text{ nm}$) im Vergleich zum Maximum des d-d-Überganges des Komplexes **CuL2** ($\lambda_{\text{max}} = 709 \text{ nm}$) wird auf eine erfolgreiche Bildung des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes geschlossen (Abbildung 71). Der d-d-Übergang des Cu(phen)-Komplexes in Wasser wurde in der Literatur mit 709 nm angegeben und stimmt mit dem ermittelten Wert für den OCF₃-substituierten Cu(phen)-Komplexes überein.^[183]

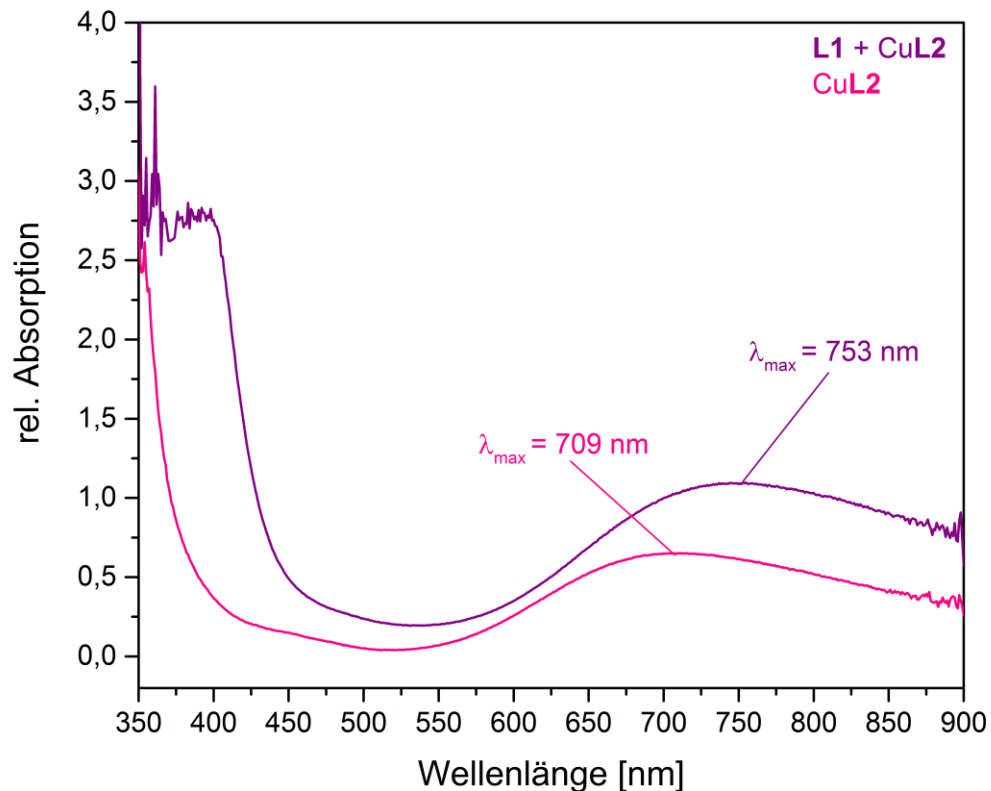


Abbildung 71: UV/Vis-Spektrum des Cu-Komplexes (CuL2) und des gebildeten 1:1-Komplexes (L1+CuL2).

Die Inkubation der Oberflächen mit DNA erfolgte jeweils über 0.5 Stunden, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Die Oberflächen wurden nach der Inkubation jeweils mit 100 μL Wasser gespült. Zur Referenz und der Positivprobe wurden ebenfalls 100 μL Wasser dazugegeben, um die gleiche Konzentration zu erhalten. Bei der Betrachtung der Gele in Abbildung 72 ist auffällig, dass lediglich bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden DNA der Formen II und III nachgewiesen werden konnten. Die Oberflächen mit Inkubationszeiten von 0.5 h, 2 h und 4 h zeigten keine Hinweise auf ungespaltene oder gespaltene DNA. Da bei diesen Proben Phosphor eindeutig mit XPS nachgewiesen wurde, liegt die Ursache vermutlich in der Adsorption der DNA an die Oberfläche, so dass sich die gespaltene DNA noch auf der Probe befindet. Für die folgenden Experimente wurde das auf der Oberfläche verbleibende Wasser abgenommen und zur Inkubationslösung gegeben. Die durchgeführten Negativkontrollen zeigen, ebenso wie die hergestellten Positivkontrollen, keine Veränderung der Spaltaktivität

gegenüber der Kontrolle, was auf eine zu geringe Konzentration der Positivkontrolle (1 µM) schließen lässt.

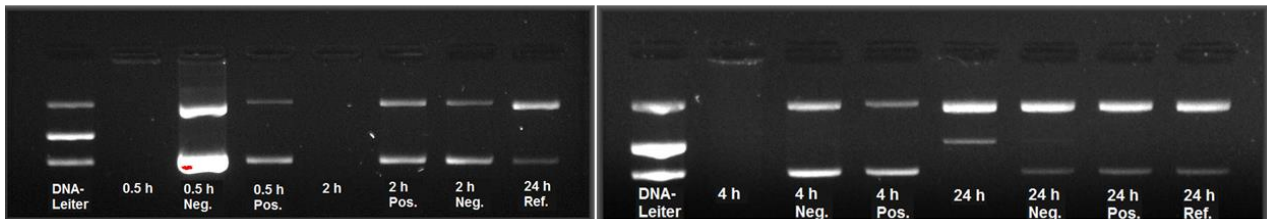


Abbildung 72: Spaltaktivität des immobilisierten Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes auf Si₃N₄ gegenüber pBR322-Plasmid-DNA in MOPS-Puffer (50 mM) und L-Ascorbinsäure (0.32 mM) für 0.5 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente ein 1 µM 1:1-Komplex.

In den folgenden Experimenten wurden alle Oberflächen zweimal mit 50 µL MOPS-Puffer (50 mM) gewaschen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass auf der Oberfläche befindliche DNA-Fragmente in die Inkubationslösung gespült werden. Außerdem wurde die Konzentration der Positivkontrolle auf 10 µM erhöht. Die Negativkontrollen wurden, analog zur Reaktion, erst mit DMF und anschließend mit Methanol behandelt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. So wurde für jede Probe eine Kontrollprobe angefertigt. Bei dem Vergleich der Gele aus Abbildung 72 und Abbildung 73 ist ein erfolgreicher Waschprozess erkennbar. DNA konnte bei allen Inkubationszeiten nachgewiesen werden. Es wird mit längerer Inkubationszeit eine steigende Nukleaseaktivität beobachtet. Während nach einer Inkubationszeit von 0.5 h noch deutlich ungespaltene DNA der Form I sowie einen höheren Anteil der *nicked* DNA der Form II nachzuweisen ist, wurde die Plasmid-DNA bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h vollständig gespalten. Es wurde im Vergleich zur Inkubationszeit von 0.5 h, ein deutlich höherer Anteil linearer DNA Form III (34 %) nachgewiesen. Es tritt jedoch noch eine Spaltung überwiegend zur *nicked* DNA Form II auf. Bei weiterer Erhöhung der Inkubationszeit auf 4 h verstärkt sich die vollständige Fragmentierung zur *nicked* DNA Form II (25 %) und der *linearen* DNA Form III (75 %). Wird nun die 24 stündige Inkubation der Proben betrachtet, fällt das Verbleiben der DNA in der Tasche auf. Aufgrund der bereits nach der 4-stündigen Inkubationszeit beobachteten sehr guten Nukleaseaktivität und der großen Menge an der *linear* DNA-Form III wird vermutet, dass eine vollständige Spaltung in kleine Fragmente nach 24 h erfolgte, wodurch keine Banden im Gel detektiert

werden können. Vermutlich bleiben die kleinen DNA-Fragmente aufgrund stärkerer Wechselwirkungen in der Geltasche hängen, wohingegen die *supercoiled*, *nicked* und *linear* DNA eindeutig aufgetrennt werden können.

Weiterhin zeigen die Negativkontrollen die 0.5 h und 2 h inkubiert wurden keine Hinweise auf DNA, wohingegen die Negativkontrollen bei 4 h und 24 h eindeutig DNA aufweisen. Hierbei wird deutlich, dass der Waschprozess der Oberflächen eine essentielle Rolle einnimmt. Außerdem weisen auch die Negativkontrollen eine leichte Spaltaktivität zur Form II auf. Die hergestellte Positivprobe dagegen weist keine Spaltung der DNA auf, was vermutlich auf die geringe Konzentration von 10 µM zurückzuführen ist. Außerdem ist aufgrund der katalytischen Wirkung des auf der Oberfläche immobilisierten Komplexes eine höhere Spaltaktivität gegenüber der Plasmid-DNA wahrscheinlich.

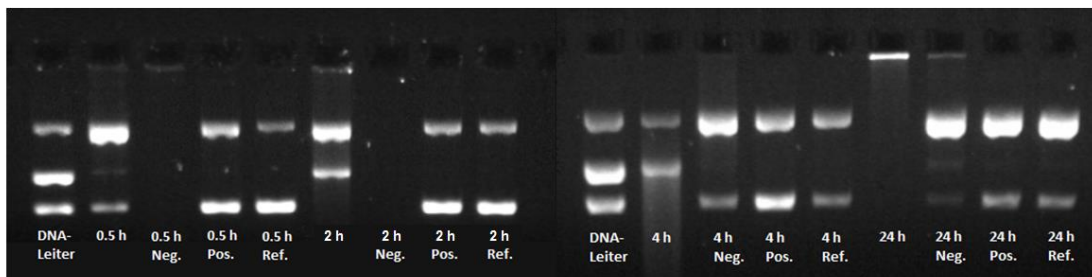


Abbildung 73: Spaltaktivität des immobilisierten Cu(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes auf Si₃N₄ gegenüber pBR322-Plasmid-DNA in MOPS-Puffer (50 mM) und L-Ascorbinsäure (0.32 mM) für 0.5 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 37 °C. Gezeigt sind sowohl die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese als auch die prozentuale Zusammensetzung der geschnittenen DNA der Formen II bzw III.

3.6.4. Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde die Spaltaktivität des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes immobilisiert auf Si₃N₄-Oberflächen als künstliche Nuklease überprüft. Dafür wurde zunächst die 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure über Amid-Bindungen an die Si-NH_x-Bindungen der Si₃N₄-Oberfläche gekoppelt, gefolgt von der Komplexbildung mit dem Kupfer(II)phenanthrolin-Komplex. Durch die an der Position 5' substituierte OCF₃-Gruppe, welche als XPS-Sonde fungierte, konnte die erfolgreiche Komplexbildung auf Si₃N₄ nachgewiesen werden. Die Kupfermenge auf der Oberfläche wurde mittels ICP-MS auf 0.08 µg/cm² (87 x 10¹² Kupferatome pro cm²) bestimmt.

Die Spaltaktivität des immobilisierten Komplexes gegenüber pBR322 Plasmid-DNA wurde durch Gelelektrophoreseexperimente untersucht. Dabei konnte eine Spaltaktivität bereits bei DNA-Inkubationszeiten von 2 Stunden festgestellt werden, welche sich jedoch durch erhöhte Inkubationszeiten weiter verbesserte. Es ist jedoch äußerst wichtig auf einen ausgiebigen Waschprozess zu achten, da die DNA an der Oberfläche adsorbiert und dann nicht mehr für die Gelelektrophorese zur Verfügung steht.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

4.1. Schlussfolgerung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung einer neuen milden und effizienten Funktionalisierungsstrategie für Siliziumnitrid unter Vermeidung der häufig unzuverlässigen Silanchemie. Der schrittweise Aufbau der organischen Schichten wurde mit oberflächenanalytischen Methoden verfolgt. So wurden zunächst unterschiedliche Methoden zur Bildung von NH_x -Gruppen getestet, die die Grundlage für alle weiteren Reaktionen bilden. Neben den bekannten Methoden wie die Reinigung der Oberflächen mit Flusssäure, wurde auch die Reinigung mit Phosphorsäure überprüft. Gepufferte Flusssäure stellte die effektivste Vorbereitung zur Erzeugung der Oberflächenamine dar. Die Bildung der NH_x -Gruppen wurde nach der Derivatisierung mit TFBA durch die charakteristische Verschiebung der Photoemissionslinien mittels XPS verifiziert.

Im Anschluss wurden organische Schichten durch die Click-Reaktion und Amid-Kopplung erzeugt. Alle Reaktionsschritte wurden mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS untersucht. Zunächst wurden die NH_x -Gruppen in reaktive Azide umgewandelt, um die Oberfläche für die Click-Chemie zugänglich zu machen. Die Einführung der Azidgruppen erfolgte hierbei durch drei unterschiedliche Methoden: mit Triflylazid, mit Natriumazid bzw. mit Natriumazid in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit. Da das dominante Nitridsubstrat die deutlich geringeren Azidsignale in den XP-Spektren überlagert, wurden die erzeugten Azidgruppen indirekt nach erfolgreicher Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (Click-Chemie) nachgewiesen. Die Bindung des CF_3 -substituierten Alkins wurde sowohl in Ethanol als auch in *tert*-Butanol/Wasser durchgeführt. Die CF_3 -Gruppe sowie die gebildete 1,2,3-Triazolkomponente wurden eindeutig im C 1s-, F 1s- und N 1s-SR-XP-Spektrum und der NEXAFS C K-Kante und F K-Kante nachgewiesen. Die ToF-SIMS-Massenspektren stützten die Bildung des 1,2,3-Triazols. Hierbei konnten CF_3 - und Triazol-Sekundärionenfragmente bestimmt werden. Durch die Wahl des Lösungsmittels und der Reaktionszeit konnte die Effizienz der Reaktion beeinflusst werden. Während die Click-Reaktion in Ethanol nur nach der Azidierung mit Triflylazid erfolgreich war, konnte das Alkin bei der Click-Reaktion in *tert*-Butanol/Wasser nach allen drei Azidierungsmethoden erfolgreich nachgewiesen werden.

Die beim schrittweisen Aufbau der Amino- (3), Azid- (5-8) bzw. geklickten (9-14) Schichten und den bei der detaillierten Charakterisierung der Oberflächen gewonnenen Erfahrungen wurden genutzt, um ein noch komplexeres System, ein Modellbiosensor, zu erzeugen. Hierfür wurde Biotin/Streptavidin immobilisiert und untersucht. Die Biotin/Streptavidin-Interaktion wurde nach allen drei Azidierungsmethoden erfolgreich mit XPS, NEXAFS und ToF-SIMS nachgewiesen. In den C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren traten Amid-spezifische Komponenten auf und auch in den NEXAFS C- und O K-Kanten konnten proteinspezifische Resonanzen identifiziert werden. Die ToF-SIMS-Massenspektren stützten die Befunde der XP- und NEXAFS-Spektroskopie. Hier wurden ebenfalls Sekundärionenfragmente des Streptavidins nachgewiesen. Somit konnte eine Immobilisierung von sterisch anspruchsvollen Biomolekülen mit der hier entwickelten Methode direkt an die funktionalisierte Si₃N₄-Oberfläche gezeigt werden.

Eine weitere Möglichkeit, um Schichten auf Si₃N₄ zu erzeugen, besteht in der Ausnutzung von Oberflächen-Si-NH_x-Bindungen. Diese Oberflächenamine wurden adressiert, um Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexe über Amid-Bindungen zu immobilisieren. Die Bindung des Kupfer(II)-Komplexes wurde mit XPS verifiziert. Die C 1s-Region zeigte deutlich die OCF₃-Komponente. Amid-Komponenten und C=N-Bindungen des Phenanthrolin-Gerüsts wurden in der N 1s-Region sowie durch die Aufspaltung der π*-Resonanz der NEXAFS C K-Kante nachgewiesen. Zudem zeigten die ToF-SIMS-Massenspektren Sekundärionenfragmente des Kupfer(II)-Komplexes. Nach der Sicherstellung der Bindung des Komplexes auf der Si₃N₄-Oberfläche wurde dessen Spaltaktivität gegenüber Plasmid-DNA pBR322 untersucht. Die Adsorption von DNA konnte mit XPS bestätigt werden. Die anschließende Untersuchung der Spaltaktivität des Komplexes erfolgte mit Agarose-Gelelektrophorese-Experimenten. Hierbei wurde eine erhöhte Spaltaktivität mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt. Weiterhin scheint der Komplex seine Spaltaktivität erst auf der Oberfläche zu entfalten. Durchgeführte Positivproben in flüssiger Umgebung wiesen, im Gegensatz zu dem gebundenen Komplex, keine Spaltaktivität auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Ausnutzung des Stickstoffs im Si₃N₄ möglich ist, um komplexe organische Filme mittels Click-Chemie zu erzeugen.

4.2. Ausblick

Im Folgenden werden kurz Optionen diskutiert, die sich durch die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen.

Durch die Erzeugung von Azidgruppen direkt an der Si_3N_4 -Oberfläche eröffnen sich zahlreiche Möglichkeiten Moleküle durch die Click-Chemie an die Oberfläche zu binden. Neben der hier durchgeführten Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition bietet besonders die Staudinger-Ligation großes Potential. Diese Reaktion ist für ihre sehr milden Reaktionsbedingungen bekannt. Es wird überwiegend in wässrigem Milieu sowie bei Raumtemperatur gearbeitet. Sie eignet sich daher besonders für die Verknüpfung von empfindlichen Biomolekülen und wird bereits in lebenden Zellen eingesetzt, um das Verständnis der Kommunikation von Zellen miteinander und mit der umgebenden Matrix zu untersuchen.^[201] Die Reaktion nutzt dabei wieder die Vorteile der Bioorthogonalität, der hohen Nucleophilie sowie der Selektivität der Azidgruppen aus. Dadurch bietet die Staudinger-Ligation enorme Möglichkeiten empfindliche Biomoleküle bzw. Zellen an die Si_3N_4 -Oberfläche zu binden.^[202] Dies wäre wiederum im Rahmen der Biosensorik von großem Interesse.

Im Hinblick auf die DNA-Spaltung auf Oberflächen ist die Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Nuklease interessant, besonders für die technische Anwendung in der medizinischen Diagnostik. Für diesen Aspekt müsste die Selektivität der DNA-Spaltreaktion erreicht werden – ein Punkt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht erreicht wurde.

Auch die Immobilisierung von weiteren künstlichen Nukleasen, wie zum Beispiel Kupfer(II)cyclenen sowie der Vergleich der Spaltaktivität auf Oberflächen gegenüber der Spaltaktivität in Lösung stellen eine interessante Fragestellung dar.

5. Experimenteller Teil

5.1. Oberflächencharakterisierung

5.1.1. Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

Synchrotron-XPS (SR-XPS) wurde an der HE-SGM (High Energy–Spherical-Grating Monochromator) -Dipol-Beamline am BESSY II in Berlin durchgeführt. Es wurden folgende Anregungsenergien verwendet: Übersichtsspektrum 700 eV mit einer Passenergie von 100 eV, F 1s 780 eV, O 1s 620 eV, N 1s 500 eV, C 1s 385 eV, S 2p 260 eV und Si 2p 210 eV mit einer Passenergie von 50 eV.

Zusätzlich wurden die Proben mit einem Axis Ultra DLD Spektrometer von Kratos Analytical, UK, gemessen. Die Anregung erfolgte mit monochromatischer Al-K α -Strahlung (1486,6 eV) mit einer Durchlassenergie für die Elektronen von 80 eV für die Übersichtsspektren und 20 eV für die Rumpfniveauspektren. Der Elektronenemissionswinkel betrug 0 ° und der Winkel zwischen der Quelle und dem Analysator betrug 60 °. Die Bindungsenergieskala des Spektrometers wurde nach einem Verfahren von Kratos Analytical kalibriert, wobei Bindungsenergieangaben nach ISO 15472^[203] verwendet wurden. Die Spektren wurden durch Einstellen der „Hybrid lens“ und „slot modi“, mit einer ungefähren Analysenfläche von 300 x 700 μm^2 , aufgenommen. Der Ladungsneutralisator wurde verwendet, um statische Ladungsbedingungen zu erreichen.^[204] Die gemessenen Spektren wurden auf die aliphatische C 1s Komponente mit einer Bindungsenergie von 285.0 eV referiert.^[75]

In dieser Arbeit wurden alle Oberflächen mit SR-XPS und Labor-XPS gemessen. Mit SR-XPS kann eine deutlich höhere Oberflächenempfindlichkeit gegenüber der Labor-XPS erzielt werden und somit wird weniger tief in das Substrat eingedrungen. Dadurch können Aufladungseffekte, hervorgerufen durch das Substrat, besser ausgeglichen werden. Außerdem können Protein-Komponenten aus der organischen Schicht im N 1s-SR-XPS-Spektrum nachgewiesen werden, die aufgrund der größeren Informationstiefe mit Labor-XPS nicht sichtbar sind.

Die XPS-Messdaten wurden mit Casa XPS, Version 2.3.16 bearbeitet. Die hochaufgelösten XPS-Spektren wurden durch die Annäherung eines Peakform-Modells aus dem Produkt einer Gauß- und Lorentzfunktion ausgewertet. Die elementare Zusammensetzung wurde aus den

Übersichtsspektren mit Kratos-Sensitivitätsfaktoren berechnet. Die Fehlerberechnung erfolgte auf Basis einer Monte Carlo Simulation, die eine Fehlermatrix erstellt und Bestandteil der Casa XPS Software ist.^[205] Die Spektren wurden anschließend mit Origin 9.1G dargestellt.

5.1.2. Infrarot-Spektroskopie

Infrarot Spektroskopie (IR-Spektroskopie) wurde an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) mit einem FTIR-Spektrometer von Bruker Optics GmbH gekoppelt mit einem IR-Mikroskop (Hyperion 3000) mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR, engl. attenuated total reflection) und streifendem Einfallswinkel (GIR, engl. grazing incidence infrared spectroscopy) gemessen.

5.1.3. NEXAFS

NEXAFS-Messungen wurden an der HE-SGM (High Energy – Spherical Grating Monochromator) Dipol Beamline am BESSY II in Berlin durchgeführt. Die Röntgenabsorptionsspektren der K-Absorptionskante von Kohlenstoff, Sauerstoff und Fluor wurden im TEY-Modus (Total Electron Yield) aufgenommen. Die K-Absorptionskante von Stickstoff wurde nicht aufgenommen, da aufgrund des Substratstickstoffs keine Unterscheidungen mit jeglichen Stickstoff-Komponenten gemacht werden können. Die emittierten Sekundärelektronen wurden mit einem Channelplate-Detektor detektiert. Die Energieauflösung $E/\Delta E$ des Monochromators wurde an der π^* -Resonanz von Carbonylen bei 287.4 eV mit ~ 2500 bestimmt. Die Proben wurden mit einem Einstrahlwinkel γ von 55° zwischen der Siliziumnitrid-Oberfläche und der einfallenden Synchrotronstrahlung gemessen. Der Energiebereich der Kanten wurde mindestens zweimal abgefahren und die übereinanderliegenden Messkurven gemittelt. Im Anschluss wurden die Spektren mit der Transmissionsfunktion, die vor jeder Messzeit von einer frisch gesputterten Goldschicht aufgenommen wurde, sowie dem aufgenommenen Ringstrom korrigiert. Außerdem wurde die Energieachse anhand der C 1s $\rightarrow \pi^*$ -Resonanz bei 285.4 eV einer Graphitoberfläche (Highly Ordered Pyrolytic Graphite (HOPG); Advanced Ceramic Corp., Cleveland, USA) kalibriert. In der weiteren Datenverarbeitung wurde in den erhaltenen Spektren die Zählrate in der Vorkantenregion abgezogen und die Zählrate nach dem Kantensprung auf 1 normiert.

Zusätzlich zu den NEXAFS-Spektren wurden die Differenzspektren dargestellt, um auch nur geringe durch die Reaktion verursachte Änderungen der Resonanzen darzustellen. Die Darstellung der Spektren erfolgte mit Origin 9.0 G.

5.1.4. ToF-SIMS

Die Messungen wurden an einem Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometer TOF-SIMS IV der Firma ION-TOF GmbH (Münster, Deutschland) durchgeführt. Als Primärionenquelle diente eine Bismut-Flüssig-Metallionen-Quelle (LMIG) mit einer Energie von 25 keV, die in einem 45° Winkel zur Probenoberfläche montiert wurde. Die LMIG arbeitete bei einem Emissionsstrom von 0.5 μA im sogenannten „high-current Bunched“ Modus, mit hoher Massenauflösung und niedriger laterale Auflösung. Bi^{3+} -Primärionen wurden durch Massenfilter selektiert. Die Pulsbreite der Bi^{3+} -Pulse wurde reduziert, um einen Zielstrom von ca. 0.13 pA zu erhalten, der bei einer Zykluszeit von 100 μs (z.B. eine Wiederholungsrate von 10 kHz) unter Verwendung eines Faraday-Bechers, bestimmt wurde. Die Primärionendosis wurde auf 5×10^{11} Ionen/ cm^2 eingestellt, womit statische SIMS-Messbedingungen sichergestellt wurden. Die analysierte Fläche betrug $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ mit einer Auflösung von 64×64 Pixel. Aufladungen der Oberfläche wurden durch den Beschuss mit niedrigenergetischen Elektronen kompensiert. Das Vakuum in der Analysenkammer war während der Messungen zwischen 10^{-8} und 10^{-9} mbar.

Die ToF-SIMS-Spektren wurden im positiven Ionenmodus mit 5-9 Messpunkten pro analysierter Probe aufgenommen. Die Massenskala wurde intern mit einer Anzahl von wohldefinierten und leicht zuordenbaren Sekundärionen kalibriert, wobei der Fehler in der Kalibrierung für die ausgewählten sekundären Ionen unter 15 ppm gehalten wurde.

Principal Component Analysis (PCA)

Die Principal Component Analysis ist ein statistisches Verfahren, um große Datenmengen, die z.B. bei der ToF-SIMS erzeugt werden, zu interpretieren. ToF-SIMS ist ein häufig eingesetztes Verfahren, um Filme auf Oberflächen zu untersuchen, da die Methode über eine sehr gute Oberflächensensitivität auf molekularem Level verfügt und gleichzeitig Tiefenprofile erstellen und im Bildgebungsmodus (depht-profiling und imaging mode) arbeiten kann. Aufgrund

der Möglichkeit chemische Informationen zu erhalten, wird ToF-SIMS häufig zur Kontrolle bei der Erzeugung von hochgeordneten Schichten eingesetzt.

Mit Hilfe der PCA als multivariante statistische Analysemethode können signifikante Unterschiede in einem gegebenen Datenset identifiziert werden. Das Datenset ist dabei als Matrix mit Reihen, die die Proben enthalten und Spalten, die die Variablen enthalten, definiert. Im Fall der ToF-SIMS-Daten sind die Proben die Massenspektren und die Variablen die individuellen m/z -Verhältnisse. Die PCA berechnet die Kovarianzmatrix aus dem originalen Datenset und generiert dadurch ein Set Achsen, die sogenannten Principle Components (PC), die die maximale Richtung der Varianzen der Datensets angibt. Mit der PCA werden drei neue Matrizen erzeugt, die die Scores, Loadings und Residuals enthalten. Die PCA ist ein Hilfsmittel, um komplexe Massenspektren zu interpretieren. Die Auftragung der Scores im Score-Plot gibt die Varianz der Proben bzw. Probengruppen an. Der dazugehörige Loading Plot zeigt, welche Massen zur Varianz beitragen sowie die Fragmentierung der Proben bzw. der Probengruppe. Kurz zusammengefasst können mit Hilfe der PCA Schlüsselfragment-Peaks identifiziert werden, Proben charakterisiert werden und ein Überblick über die Standardreproduzierbarkeit in einem Probenet erhalten werden.^[206]

5.1.5. ICP-MS

Die komplexierten Oberflächen sowie eine gereinigte Oberfläche als Referenz wurden zur Ablösung des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes von der Oberfläche je in 0.5 mL Salpetersäure (1 %) und 1.5 mL Wasser getaucht. Anschließend wurde Yttrium (250 $\mu\text{g/L}$) als interner Standard sowie ein Kupfer-Standard (2.5 mg/L, Fa. Merck CertiPur) zugegeben. Für die Messung wurde das Eluat (250 μL) zu Wasser gegeben (6 mL). Die Kalibrierung erfolgte durch die Zugabe eines Kupfer-Standards (*S1: 200 μL , S2: 500 μL , S3: 1000 μL , S4: 2000 μL) zur verdünnten Elutionslösung. Die Messung der Lösung erfolgte anschließend mit einem ICP-MS Element2 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland).*

Die Überprüfung der vollständigen Ablösung des Kupfer-Komplexes von der Oberfläche erfolgte im Anschluss mit LA-ICP-MS. Die LA-ICP-MS wurde mit Hilfe eines Glas-Objektträgers

vor der Messung der Proben hinsichtlich Empfindlichkeit, Signalstabilität (RSD < 5 %) und Oxidbildungsrate (ca. 0,4 % für ThO/Th) optimiert. Die Auswahl geeigneter Laserablationsparameter für die Messung der Si₃N₄-Oberflächen wurde mit der komplexierten Probe durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde in einem Modus betrieben, der die Messung zeitaufgelöster Signale erlaubt. Folgende Einstellungen für das Laserablationssystem und die ICP-MS wurden gewählt:

Tabelle 17: Parameter Laserablationssystem NWR213

Parameter Laserablationssystem NWR213 (ESI Electro Scientific Industries, Inc., Bozeman, MT, USA)	
Laser-Wellenlänge (nm)	213 (5. harmonische Nd:YAG-Laser)
Laserablationsmethode	Linien-scan
Helium Trägergas-Flussrate (L/min)	1.0
Warmlaufen Laser vor Beginn der Ablation (s)	20
Laserspot-Durchmesser (µm)	100
Scanrate (µm/s)	70
Frequenz (=Schuss pro s) (Hz)	20
Laserenergie (mJ)	0.25 (20 %)
Energiedichte (J/cm ²)	3.1

Es wurden jeweils die Intensitäten der beiden Cu-Isotope 63 und 65 und für das Matrixelement Si und des Isotops mit der Masse 29 aufgezeichnet. Vor, zwischen und nach der Messung der Proben wurde je 1- bis 3-mal ein sogenannter Gasblank gemessen, d.h. es wurde eine Messung bei ausgeschaltetem Laser durchgeführt, um den von den Geräten und verwendeten Gasen verursachten Untergrund zu ermitteln. Von den Proben wurden jeweils drei Linien-scans mit einem Laserspotdurchmesser von 100 µm und einer Linienlänge von 980 µm untersucht. Die Auswahl der Positionen erfolgte willkürlich über die Probenoberfläche verteilt, orientierte sich aber daran, für die jeweilige Probe möglichst repräsentative Bereiche zu analysieren. Als Vergleich wurden zwei Linien-scans einer Glasprobe mit bekanntem Kupfergehalt (NIST SRM 612) gemessen.

5.2. Versuchsvorschriften

Es wurden Silizium Wafer mit einer 80 nm Siliziumnitrid-Schicht (Microchemicals) bzw. 40 nm Siliziumnitrid-Schicht (Infineon) verwendet. Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich oder AlfaAesar bezogen. Die Oberflächen wurden mit gepufferten Flusssäure (BHF), einer Mischung aus Ammoniumfluorid (25 %-50 %), Ammoniumhydrogendifluorid (25 %-50 %) und Fluorwasserstoffsäure (5 %-7 %) von Sigma-Aldrich, gereinigt. Es wurde ausschließlich Nanopure Wasser aus einem Reinstwassersystem MicroPure der Firma TKA mit einer Leitfähigkeit von $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden alle Experimente mindestens dreimal wiederholt.

5.2.1. Oberflächenpräparation

Vor der eigentlichen Funktionalisierung erfolgte eine detaillierte Untersuchung der verwendeten Siliziumnitrid-Oberflächen. Hierbei sollte die optimale Reinigungsmethode der Oberflächen entwickelt werden. Zunächst wurden die Proben jeweils für 1-30 Minuten mit Isopropanol, UV/Ozon (UV/O_3), Phosphorsäure, Flusssäure und BHF behandelt. Anhand der Reduzierung der Sauerstoff- und Kohlenstoffkonzentration im XP-Übersichtsspektrum wurde die optimale Reinigungsmethode ausgewählt. Des Weiteren dienten TOF-SIMS-Tiefenprofile der nativen, unbehandelten Oberfläche und der mit Flusssäure gereinigten Oberfläche der Charakterisierung der Oberfläche.

5.2.2. NH_x -terminierte Si_3N_4 -Oberflächen

Alle verwendeten Siliziumnitrid-Proben wurden vor den Reaktionen zunächst für 10 Minuten in Isopropanol im Ultraschallbad und anschließend in UV/Ozon (UV/O_3) für 20 Minuten gereinigt. Durch Eintauchen in BHF für 1 Minute wurde die native Oxidschicht entfernt und die Amine (NH_x) erzeugt. Die Proben wurden anschließend ausgiebig mit Wasser gespült.

5.2.3. Derivatisierung für die XPS-Analyse

Da die erzeugten Amine (NH_x) in Anwesenheit des dominanten Nitridpeaks des Siliziumnitrids schwer mittels XPS nachzuweisen sind, müssen diese zunächst mit einem spezifischen Label

derivatisiert werden. Hierfür wurden die Proben mit 4-Trifluormethylbenzaldehyd (TFBA) in einer speziellen Gasphasenapparatur^[207] für 30 Minuten derivatisiert. Zur Quantifizierung wurde die organische Fluorkomponente im F 1s-XP-Spektrum und die Trifluormethylkomponente (CF₃) im C 1s-XP-Spektrum genutzt.

5.2.4. Erzeugung einer Azid-terminierten Oberfläche

Für die verschiedenen Azidierungsreaktionen wurden immer frisch präparierte NH_x-terminierte Si₃N₄ Proben verwendet.

Prozess A. Frisch geätzte Proben wurden bei 50 °C in einer Lösung aus Natriumazid (39.6 mg, 0.600 mmol) in 12 mL DMF mit einer kleinen Menge 18-Krone-6 für 4 Tage unter Lichtausschluss gerührt. Danach wurde mit Methanol, Toluol und Methanol gespült.^[104]

Prozess B. Die Proben wurden in 15 mL Salzsäure (1 %) auf 0 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde Natriumnitrit (1.6 mg; 0.023 mmol) in 6 mL Wasser zugegeben, anschließend wurde eine Stunde bei 0-5 °C gerührt. Die Proben wurden aus der Lösung entfernt, kurz mit Wasser gespült und unter Rühren über Nacht mit Natriumazid (1.5 mg; 0.023 mmol) in 6 mL Wasser behandelt.^[208]

Prozess C. Frisch gereinigte Si₃N₄-Proben wurden in eine wässrige Lösung (4 mL) aus Kupfersulfat (2.2 mg, 0.014 mmol) und Natriumhydrogencarbonat (78.0 mg, 0.929 mmol) eingetaucht. Anschließend wurden eine Trifluormethansulfonylazid-Lösung (0.51 mL) zugetropft, gefolgt von Methanol (2 mL). Die blaue Reaktionslösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.^[209] Danach wurden die Proben ausgiebig mit Toluol, Wasser und Methanol (je 10 mL) gespült und sofort für die Click-Reaktion weiterverwendet.

Vor jeder Reaktion wurde eine Triflylazid-Stammlösung frisch hergestellt. Hierfür wurde Natriumazid (0.54 g, 8.38 mmol) in einer Mischung aus Wasser und Toluol (je 1.37 mL) unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Trifluormethansulfonsäureanhydrid (0.89 mL, 5.29 mmol) wurde vorsichtig zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Temperatur auf 10 °C erhöht und weitere zwei Stunden gerührt. Danach wurde eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung dazu gegeben bis keine Gasbildung mehr auftrat. Die zwei Phasen wurden separiert und die

wässrige Phase wurde zweimal mit Toluol (je 2 mL) gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden sofort für den Diazo-Transfer verwendet. Nicht verwendete Azid-Lösung wurde sofort mit einer ethanolischen Iod-Lösung in Anwesenheit von Natriumthiosulfat neutralisiert.

Prozess D. Die Proben wurden in einer Mischung aus Natriumazid (20.0 mg, 0.61 mmol) gelöst in Wasser (1 mL) und ^tButanol (4 mL) gerührt. Anschließend wurde tropfenweise ^tButylnitrit (4 mL, 66.3 mmol) dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Wasser (4 mL) zugegeben. Die Proben wurden ausgiebig mit Wasser gewaschen.^[210]

Azidosilan-SAM: Vor der Reaktion wurden die Si₃N₄-Oberflächen 30 Minuten mit Piranha gereinigt. Anschließend wurde die Oberfläche in eine 5 mM Lösung des Azidosilans (11-Azidiundecyl)(triethoxy)silan) in Toluol bei 80 °C (24 h) getaucht.

5.2.5. Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit fluorsubstituierten Alkinen

Zur Methodenentwicklung wurden zunächst einfache Testalkine in einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) an die Oberfläche gebunden.

CuAAC A. Die Proben wurden in 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol (8.9 mg, 0.037 mmol) in 12 mL Ethanol gerührt. Danach wurde eine frisch hergestellte Lösung aus Kupfersulfat (0.64 mg; 0.004 mmol) und Natriumascorbat (1.6 mg; 0.008 mmol) in 2.5 mL Wasser dazu gegeben. Anschließend wurde 4 Tage bei Raumtemperatur bzw. 2.5 Tage bei 50 °C sowohl unter Lichtausschluss als auch bei Tageslicht gerührt.^[47] Als Blindprobe wurden die gleichen Reaktionen auf Oberflächen durchgeführt, bei denen die Oxidschicht nicht entfernt wurde und die nicht azidiert wurden.

CuAAC B. Die Proben wurden in 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol (8.9 mg, 0.037 mmol) in einer Mischung aus ^tButanol und Wasser (je 6 mL) gerührt. Danach wurde eine frisch hergestellte Lösung aus Kupfersulfat (0.64 mg; 0.004 mmol) und Natriumascorbat (1.6 mg; 0.008 mmol) in 2.5 mL Wasser dazu gegeben. Anschließend wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.^[117]

5.2.6. Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit Biotin und Interaktion mit Streptavidin–Modellsystem

Biotin-Streptavidin diente als erstes Modellsystem, aufgrund seiner gut erforschten Eigenschaften. Zunächst wurde eine Biotin-PEG4-Alkine Stammlösung hergestellt. Das Biotin-Derivat (5.0 mg, 0.011 mmol) wurde in einer Mischung aus Methanol und Wasser (50 mL, 1:1)^[158] bzw. DMF und Wasser (50 mL, 2:1)^[159] gelöst. Anschließend wurden eine wässrige Kupfersulfat-Lösung (0.2 mL, 20 mM), eine wässrige Natriumascorbat-Lösung (0.2 mL, 10 mM) und Triethylamin (0.2 mL, Et₃N) zugegeben.

Die frisch hergestellten N₃-terminierten Oberflächen wurden in die Biotin-Lösung getaucht. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Proben mit Wasser und Methanol für je fünf Minuten gespült und mit Stickstoff getrocknet. Im Anschluss an die Immobilisierung von Biotin wurden die Proben in einer 0.1 mg/mL Streptavidin-Lösung in PBS-Tween für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für je fünf Minuten zweimal mit PBS-Tween Puffer, dreimal mit PBS-Puffer und Wasser unter ständiger Bewegung gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen.

5.2.7. Immobilisierung künstlicher Nukleasen für die DNA-Spaltung auf Si-NH_x Oberflächen

Ligand L1: 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure wurde durch Amid-Kopplung an frisch terminierte NH_x-Oberflächen gebunden. Die Kopplung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (56.0 mg, 0.25 mmol) erfolgte in DMF (5 mL) in Anwesenheit des Aktivierungsreagenz PyBOP (130.0 mg, 0.25 mmol) sowie DIPEA (300 µL, 1.72 mmol) für 24 Stunden unter Rühren. Anschließend wurde die Probe ausgiebig mit DMF (2x5 mL) gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Die halbierten Proben wurden jeweils mit der Hälfte der Reagenzien behandelt.

Komplex CuL2: Die Bindung des Kupfer-Komplexes erfolgte durch das Eintauchen der mit 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure immobilisierten Probe für 5 Minuten in den 50 mM methanolischen Dinitrato(1,10-phenanthrolin-5-trifluormethoxy)-Kupfer(II)-Lösung.

5.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Spaltaktivität des Bis-Phenanthrolin-Kupfer(II)-Komplexes wurde mit einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Das Gel wurde aus Agarose (300 mg) in 30 mL 0.5X TBE-Puffer hergestellt. Nach dem Erhitzen in Mikrowelle für 1 Minute wurde zur Detektion der DNA-Banden, 0.2 mg mL^{-1} Ethidiumbromid zugesetzt.

Zur Untersuchung der DNA-Spaltaktivität der immobilisierten Komplexe auf Si_3N_4 wurden die Oberflächen in Eppendorfgläsern in MOPS Puffer getaucht und in Anwesenheit von $250 \text{ }\mu\text{M}$ Ascorbinsäure mit Plasmid-DNA pBR322 für 0.5 h, 2 h, 4 h bzw. 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die 1 cm^2 großen Oberflächen wurden für die Untersuchung der Spaltaktivität halbiert.

Die Inkubation der mit dem Komplex immobilisierten Si_3N_4 -Oberflächen erfolgte mit 50 mM MOPS-Puffer ($\text{pH}=4$) in Anwesenheit von $250 \text{ }\mu\text{M}$ L-Ascorbinsäure mit $0.0125 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Plasmid-DNA pBR322 für 0.5 h, 2 h, 4 h und 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Auf das Probenvolumen von $500 \text{ }\mu\text{L}$ wurde mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Nach der Inkubation wurden die Lösungen sofort für die Gelelektrophorese verwendet bzw. bis zur Untersuchung in flüssigem Stickstoff ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) eingefroren. Die Oberflächen wurden mit $100 \text{ }\mu\text{L}$ Millipore Wasser oder verdünntem Puffer abgespült und die verbliebene Waschlösung von den Oberflächen in die Inkubationslösung pipettiert. Vor der Beladung der Geltaschen (Volumen ca. $10 \text{ }\mu\text{L}$ pro Tasche) wurde mit je $1.5 \text{ }\mu\text{L}$ Ladepuffer (3.7 mM Bromphenolblau und 1.2 M Saccharose in Millipore-Wasser) versetzt. Es wurde eine *Rotiphorese*[®] *PROfessional I*-Gelkammer (Carl Roth) verwendet, in der die Gele bei 40 V für 2 h in 0.5X TBE-Puffer aufgetrennt wurden (Spannungsgerät: *Consort EV243*). Um die korrekte Zuordnung der einzelnen DNA-Formen zu gewährleisten, wurden bei jedem Gel $0.3 \text{ }\mu\text{L}$ einer DNA-Leiter, die von Dr. Jan Hormann zur Verfügung gestellt wurde, in die erste Tasche gefüllt.

Die Auswertung der Gele erfolgte über das Programm *ImageLab 5.0* und die Darstellung über das Programm *Excel 2016*. Die Intensitäten der Banden wurden auf die Referenz bezogen und für die Form I-DNA wurde mit einem Korrekturfaktor von 1.22 multipliziert,^[211] da Ethidiumbromid schlechter in die supercoiled-DNA interkaliert, als in die offenkettige oder lineare Form.

5.2.9. UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektren wurden mit dem Gerät *Cary Series UV-VIS Spectrophotometer* der Firma *Agilent Technologies* aufgenommen. Die Spektren wurden in Ethanol in einem Bereich zwischen 190 nm und 900 nm aufgenommen und eine Backgroundmessung mit Ethanol durchgeführt. Die Auswertung und Darstellung der Spektren erfolgte über die Programme *Cary WinUV* und *Origin 9.1G*.

6. Literaturverzeichnis

- [1]. Riley, F. L., Silicon Nitride and Related Materials. *Journal of the American Ceramic Society* **2000**, 83 (2), 245-165.
- [2]. Wang, C. M.; Pan, X. Q.; Ruhle, M.; Riley, F. L.; Mitomo, M., Silicon nitride crystal structure and observations of lattice defects. *Journal of Materials Science* **1996**, 31 (20), 5281-5298.
- [3]. Anderson, D. A.; Spear, W. E., Electrical and optical properties of amorphous silicon carbide, silicon nitride and germanium carbide prepared by the glow discharge technique. *Philosophical Magazine* **1977**, 35 (1), 1-16.
- [4]. Goodman, A. M., Photoemission of Electrons and Holes into Silicon Nitride. *Applied Physics Letters* **1968**, 13 (8), 275-&.
- [5]. Wildling, L.; Unterauer, B.; Zhu, R.; Rupprecht, A.; Haselgruebler, T.; Rankl, C.; Ebner, A.; Vater, D.; Pollheimer, P.; Pohl, E. E.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H. J., Linking of Sensor Molecules with Amino Groups to Amino-Functionalized AFM Tips. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22 (6), 1239-1248.
- [6]. Bowers, C. M.; Carlson, D. A.; Shestopalov, A. A.; Clark, R. L.; Toone, E. J., A general and efficient cantilever functionalization technique for AFM molecular recognition studies. *Biopolymers* **2012**, 97 (10), 761-765.
- [7]. Ciarlo, D. R., Silicon nitride thin windows for biomedical microdevices. *Biomedical Microdevices* **2002**, 4 (1), 63-68.
- [8]. Diao, J. P.; Ren, D. C.; Engstrom, J. R.; Lee, K. H., A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors. *Analytical Biochemistry* **2005**, 343 (2), 322-328.
- [9]. Banuls, M. J.; Puchades, R.; Maquieira, A., Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 777, 1-16.
- [10]. Tlili, A.; Jarboui, M. A.; Abdelghani, A.; Fathallah, D. M.; Maaref, M. A., A novel silicon nitride biosensor for specific antibody-antigen interaction. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2005**, 25 (4), 490-495.
- [11]. Wu, P.; Hoglebe, P.; Grainger, D. W., DNA and protein microarray printing on silicon nitride waveguide surfaces. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, 21 (7), 1252-1263.
- [12]. Busse, S.; Kashammer, J.; Kramer, S.; Mittler, S., Gold and thiol surface functionalized integrated optical Mach-Zehnder interferometer for sensing purposes. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1999**, 60 (2-3), 148-154.
- [13]. BMBf *Plasmatechnik - Prozessvielfalt + Nachhaltigkeit*; 2000; p 6.
- [14]. Unger, E., Die Erzeugung dünner Schichten. *Chemie in unserer Zeit* **1991**, 3, 148-158.
- [15]. Hall, E. A. H., *Biosensoren*. Springer Verlag, 1995.
- [16]. Gründler, P., Thermometrische und kalorimetrische Sensoren. In *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*, Springer Verlag, 2004; pp 138-142.
- [17]. Blum, L. J.; Coulet, P. R., *Biosensor Principles and Applications*. Marcel Dekker, Inc: New York, 1991.
- [18]. Uludağ, Y. What is a biosensor? <https://yildizuludag.wordpress.com/2009/06/04/what-is-a-biosensor/>.
- [19]. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews* **2008**, 108 (2), 462-493.
- [20]. Soper, S. A.; Brown, K.; Ellington, A.; Frazier, B.; Garcia-Manero, G.; Gau, V.; Gutman, S. I.; Hayes, D. F.; Korte, B.; Landers, J. L.; Larson, D.; Ligler, F.; Majumdar, A.; Mascini, M.; Nolte, D.; Rosenzweig, Z.; Wang, J.; Wilson, D., Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, 21 (10), 1932-1942.
- [21]. Farre, M.; Barcelo, D., Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (5), 299-310.

- [22]. Clark, L. C.; Lyons, C., Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102* (1), 29-&.
- [23]. Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S., *Biosensors Fundamentals and Applications*. Oxford University Press: Suffolk, 1989.
- [24]. Guilbault, G. G.; Luong, J. H., Gas-Phase Biosensors. *Journal of Biotechnology* **1988**, *9* (1), 1-9.
- [25]. Suleiman, A. A.; Guilbault, G. G., Piezoelectric (PZ) Immunosensors and their Applications. *Analytical Letters* **1991**, *24* (8), 1283-1292.
- [26]. Andle, J. C.; Vetelino, J. F., Acoustic-Wave Biosensors. *Sensors and Actuators a-Physical* **1994**, *44* (3), 167-176.
- [27]. Enfors, S. O., Oxygen-Stabilized Enzyme Electrode for D-Glucose Analysis in Fermentation Broths. *Enzyme and Microbial Technology* **1981**, *3* (1), 29-32.
- [28]. Rahni, M. A. N.; Guilbault, G. G., Immobilized Enzyme Electrode for the Determination of Oxalate in Urine. *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 523-526.
- [29]. Karymov, M. A.; Kruchinin, A. A.; Tarantov, Y. A.; Balova, I. A.; Remisova, L. A.; Vlasov, Y. G., Fixation of DNA Directly on Optical Wave-Guide Surfaces for Molecular Probe Biosensor Development. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1995**, *29* (1-3), 324-327.
- [30]. Dolatabadi, J. E. N.; Mashinchian, O.; Ayoubi, B.; Jamali, A. A.; Mobed, A.; Losic, D.; Omid, Y.; de la Guardia, M., Optical and electrochemical DNA nanobiosensors. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30* (3), 459-472.
- [31]. Ligler, F. S.; Sapsford, K. E.; Golden, J. P.; Shriver-Lake, L. C.; Taitt, C. R.; Dyer, M. A.; Barone, S.; Myatt, C. J., The array biosensor: Portable, automated systems. *Analytical Sciences* **2007**, *23* (1), 5-10.
- [32]. Taitt, C. R.; Shriver-Lake, L. C.; Ngundi, M. M.; Ligler, F. S., Array Biosensor for Toxin Detection: Continued Advances. *Sensors* **2008**, *8* (12), 8361-8377.
- [33]. Cooper, M. A., Optical biosensors: where next and how soon? *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (23-24), 1061-1067.
- [34]. Keusgen, M., Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **2002**, *89* (10), 433-444.
- [35]. Yoo, S. M.; Lee, S. Y., Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends in Biotechnology* **2016**, *34* (1), 7-25.
- [36]. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I., Biosensing with Surface-Plasmon Resonance - How it All Started. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10* (8), R1-R9.
- [37]. Patching, S. G., Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2014**, *1838* (1), 43-55.
- [38]. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/microarray/>.
- [39]. Coffinier, Y.; Boukherroub, R.; Wallart, X.; Nys, J. P.; Durand, J. O.; Stievenard, D.; Grandidier, B., Covalent functionalization of silicon nitride surfaces by semicarbazide group. *Surface Science* **2007**, *601* (23), 5492-5498.
- [40]. Qin, G. T.; Santos, C.; Zhang, W.; Li, Y.; Kumar, A.; Erasquin, U. J.; Liu, K.; Muradov, P.; Trautner, B. W.; Cai, C. Z., Biofunctionalization on Alkylated Silicon Substrate Surfaces via "Click" Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (46), 16432-16441.
- [41]. Manning, M.; Redmond, G., Formation and characterization of DNA microarrays at silicon nitride substrates. *Langmuir* **2005**, *21* (1), 395-402.
- [42]. Finstad, C. C.; Thorsness, A. G.; Muscat, A. J., The mechanism of amine formation on Si(100) activated with chlorine atoms. *Surface Science* **2006**, *600* (17), 3363-3374.
- [43]. Putzbach, W.; Ronkainen, N. J., Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* **2013**, *13* (4), 4811-4840.
- [44]. Funari, R.; Della Ventura, B.; Altucci, C.; Offenhausser, A.; Mayer, D.; Velotta, R., Single Molecule Characterization of UV-Activated Antibodies on Gold by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2016**, *32* (32), 8084-8091.

- [45]. Ymeti, A.; Kanger, J. S.; Greve, J.; Besselink, G. A. J.; Lambeck, P. V.; Wijn, R.; Heideman, R. G., Integration of microfluidics with a four-channel integrated optical Young interferometer immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20* (7), 1417-1421.
- [46]. Richter, S.; Traulsen, C. H. H.; Heinrich, T.; Poppenberg, J.; Leppich, C.; Holzweber, M.; Unger, W. E. S.; Schalley, C. A., Sequence-Programmable Multicomponent Multi layers of Nanometer-Sized Tetralactam Macrocycles on Gold Surfaces. *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (37), 18980-18985.
- [47]. Darlatt, E.; Traulsen, C. H. H.; Poppenberg, J.; Richter, S.; Kuhn, J.; Schalley, C. A.; Unger, W. E. S., Evidence of click and coordination reactions on a self-assembled monolayer by synchrotron radiation based XPS and NEXAFS. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2012**, *185* (3-4), 85-89.
- [48]. Dietrich, P. M.; Graf, N.; Gross, T.; Lippitz, A.; Schupbach, B.; Bashir, A.; Woll, C.; Terfort, A.; Unger, W. E. S., Self-Assembled Monolayers of Aromatic omega-Aminothiols on Gold: Surface Chemistry and Reactivity. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 3949-3954.
- [49]. Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (4), 1533-1554.
- [50]. Graf, N.; Yegen, E.; Lippitz, A.; Treu, D.; Wirth, T.; Unger, W. E. S., Optimization of cleaning and amino-silanization protocols for Si wafers to be used as platforms for biochip microarrays by surface analysis (XPS, ToF-SIMS and NEXAFS spectroscopy). *Surface and Interface Analysis* **2008**, *40* (3-4), 180-183.
- [51]. Pasternack, R. M.; Amy, S. R.; Chabal, Y. J., Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* **2008**, *24* (22), 12963-12971.
- [52]. Howarter, J. A.; Youngblood, J. P., Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **2006**, *22* (26), 11142-11147.
- [53]. Vandenberg, E. T.; Bertilsson, L.; Liedberg, B.; Uvdal, K.; Erlandsson, R.; Elwing, H.; Lundstrom, I., Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane on Silicon-oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *147* (1), 103-118.
- [54]. Focsan, M.; Campu, A.; Craciun, A. M.; Potara, M.; Leordean, C.; Maniu, D.; Astilean, S., A simple and efficient design to improve the detection of biotin-streptavidin interaction with plasmonic nanobiosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, *86*, 728-735.
- [55]. Stine, R.; Cole, C. L.; Ainslie, K. M.; Mulvaney, S. P.; Whitman, L. J., Formation of primary amines on silicon nitride surfaces: A direct, plasma-based pathway to functionalization. *Langmuir* **2007**, *23* (8), 4400-4404.
- [56]. Wang, A. F.; Tang, H. Y.; Cao, T.; Salley, S. O.; Ng, K. Y. S., In vitro stability study of organosilane self-assemble monolayers and multilayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *291* (2), 438-447.
- [57]. Banuls, M. J.; Gonzalez-Pedro, V.; Barrios, C. A.; Puchades, R.; Maquieira, A., Selective chemical modification of silicon nitride/silicon oxide nanostructures to develop label-free biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *25* (6), 1460-1466.
- [58]. Sindorf, D. W.; Maciel, G. E., Solid-State NMR-Studies of the Reactions of Silica Surfaces with Polyfunctional Chloromethylsilanes and Ethoxymethylsilanes. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (12), 3767-3776.
- [59]. Morkved, T. L.; Lopes, W. A.; Hahm, J.; Sibener, S. J.; Jaeger, H. M., Silicon nitride membrane substrates for the investigation of local structure in polymer thin films. *Polymer* **1998**, *39* (16), 3871-3875.
- [60]. Vlasiouk, I.; Apel, P. Y.; Dmitriev, S. N.; Healy, K.; Siwy, Z. S., Versatile ultrathin nanoporous silicon nitride membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (50), 21039-21044.
- [61]. Chapman, H. N.; Barty, A.; Bogan, M. J.; Boutet, S.; Frank, M.; Hau-Riege, S. P.; Marchesini, S.; Woods, B. W.; Bajt, S.; Benner, H.; London, R. A.; Plonjes, E.; Kuhlmann, M.; Treusch, R.; Dusterer, S.; Tschentscher, T.; Schneider, J. R.; Spiller, E.; Moller, T.; Bostedt, C.; Hoener, M.; Shapiro, D. A.;

- Hodgson, K. O.; Van der Spoel, D.; Burmeister, F.; Bergh, M.; Caleman, C.; Huldt, G.; Seibert, M. M.; Maia, F.; Lee, R. W.; Szoke, A.; Timneanu, N.; Hajdu, J., Femtosecond diffractive imaging with a soft-X-ray free-electron laser. *Nature Physics* **2006**, 2 (12), 839-843.
- [62]. Nielsen, M. H.; Li, D. S.; Zhang, H. Z.; Aloni, S.; Han, T. Y. J.; Frandsen, C.; Seto, J.; Banfield, J. F.; Colfen, H.; De Yoreo, J. J., Investigating Processes of Nanocrystal Formation and Transformation via Liquid Cell TEM. *Microscopy and Microanalysis* **2014**, 20 (2), 425-436.
- [63]. Arafat, A.; Giesbers, M.; Rosso, M.; Sudholter, E. J. R.; Schroen, K.; White, R. G.; Yang, L.; Linford, M. R.; Zuilhof, H., Covalent biofunctionalization of silicon nitride surfaces. *Langmuir* **2007**, 23 (11), 6233-6244.
- [64]. http://www.desy.de/expo2000/deutsch/dhtmlbrowser/webthemen/07_hasylab/synchrotronstrahlung.htm.
- [65]. http://www.helmholtz-berlin.de/mediathek/info/beschleunigerphysik-fuer-anfaenger/index_de.html.
- [66]. Falta, J.; Möller, T., *Forschung mit Synchrotronstrahlung - Eine Einführung in die Grundlagen und Anwendungen*. Vieweg+Teubner: Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, 2010.
- [67]. Girard-Lauriault, P. L.; Gross, T.; Lippitz, A.; Unger, W. E. S., Chemical and Elemental Depth Profiling of Very Thin Organic Layers by Constant Kinetic Energy XPS: A New Synchrotron XPS Analysis Strategy. *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (14), 5984-5991.
- [68]. Vickerman, J. C.; Gilmore, I. S., Electron Spectroscopy for Chemical Analysis. In *Surface Analysis - The Principal Techniques*, 2009; Vol. 2, pp 47 - 96.
- [69]. Aberg, T.; Howat, G.; Karlson, L.; Samson, J. A. R.; Siegbahn, H.; Starace, A. F., Experimental procedures and general features of photoelectron spectra. In *Handbuch der Physik*, W., M., Ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York, 1982; Vol. 31, pp 224-242.
- [70]. Hertz, H., Ueber einen Einfluss des ultravioletten Lichtes auf die elektrische Entladung. *Annalen der Physik* **1887**, 267, 983 - 100.
- [71]. Einstein, A., Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik* **1905**, 322, 132 - 148.
- [72]. Atkins, P. W.; Paula, J. d., Photoelektrischer Effekt. In *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH: 2006; Vol. 4.
- [73]. Meitner, L., Über die β -Strahl-Spektren und ihren Zusammenhang mit der γ -Strahlung. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **1922**, 11, 35-54.
- [74]. Vickerman, J. C.; Gilmore, I. S., Auger Electron Spectroscopy. In *Surface Analysis - The Principal Techniques*, 2009; Vol. 2, pp 9-45.
- [75]. Beamson, G.; Briggs, D., *High Resolution XPS of Organic Polymers*. Wiley Chichester, 1992; p 26.
- [76]. <https://www.researchgate.net/publication/257431119/figure/fig8/AS:297615083229193@1447968373352/fig-9-XAS-spectrum-of-a-molecule-PtPOP-in-solution-illustrating-the-two-regions-the.png>.
- [77]. Hähner, G., Near edge X-ray absorption fine structure spectroscopy as a tool to probe electronic and structural properties of thin organic films and liquids. *The Royal Society of Chemistry* **2006**, 35, 1244 - 1255.
- [78]. Stöhr, J., *NEXAFS Spectroscopy*. Springer: Heidelberg, 1992.
- [79]. Darlatt, E. Oberflächenanalytische Charakterisierung von auf Koordinations- und Klickchemie basierenden organischen Schichten mittels XPS, NEXAFS und ToF-SIMS. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2013.
- [80]. Vickerman, J. C.; Gilmore, I. S., *Surface Analysis - The principle Techniques*. 2 ed.; Wiley: 2009.
- [81]. IONTOF https://www.iontof.com/download/IONTOF_TOF-SIMS_5_Brochure.pdf.
- [82]. Vickerman, J. C., Molecular Surface Mass Spectrometry by SIMS-Modes of Analysis. In *Surface Analysis-The Principal Techniques*, 2009.

- [83]. Wang, Y. P.; Yuan, K.; Li, Q. L.; Wang, L. P.; Gu, S. J.; Pei, X. W., Preparation and characterization of poly(N-isopropylacrylamide) films on a modified glass surface via surface initiated redox polymerization. *Materials Letters* **2005**, *59* (14-15), 1736-1740.
- [84]. Flink, S.; van Veggel, F.; Reinhoudt, D. N., Functionalization of self-assembled monolayers on glass and oxidized silicon wafers by surface reactions. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2001**, *14* (7), 407-415.
- [85]. Tang, H.; Zhang, W.; Geng, P.; Wang, Q. J.; Jin, L. T.; Wu, Z. R.; Lou, M., A new amperometric method for rapid detection of Escherichia coli density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *562* (2), 190-196.
- [86]. Wolk, J. L.; Frimer, A. A., Preparation of Tyrian Purple (6,6'-Dibromoindigo): Past and Present. *Molecules* **2010**, *15* (8), 5473-5508.
- [87]. Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G., A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosensors & Bioelectronics* **2000**, *15* (9-10), 473-481.
- [88]. Liu, L.-H.; Debenedetti, W. J. I.; Peixoto, T.; Gokalp, S.; Shafiq, N.; Veyan, J.-F.; Michalak, D. J.; Hourani, R.; Chabal, Y. J., Morphology and chemical termination of HF-etched Si₃N₄ surfaces. *Applied Physics Letters* **2014**, *105* (26).
- [89]. Sundaram, K. B.; Sah, R. E.; Baumann, H.; Balachandran, K.; Todi, R. M., Wet etching studies of silicon nitride thin films deposited by electron cyclotron resonance (ECR) plasma enhanced chemical vapor deposition. *Microelectronic Engineering* **2003**, *70* (1), 109-114.
- [90]. Habraken, F.; Kuiper, A. E. T., Oxidation of Silicon (Oxy)Nitride and Nitridation of Silicon Dioxide: Manifestations of the same Chemical Reaction System? . *Thin Solid Films* **1990**, *193* (1-2), 665-674.
- [91]. Cao, P. G.; Xu, K.; Heath, J. R., Azidation of Silicon(111) Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (45), 14910-14911.
- [92]. Vig, J. R., UV Ozone Cleaning of Surfaces. *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films* **1985**, *3* (3), 1027-1034.
- [93]. Vig, J. R.; Lebus, J. W., UV-Ozone Cleaning of Surfaces. *Ieee Transactions on Parts Hybrids and Packaging* **1976**, *12* (4), 365-370.
- [94]. Seah, M. P.; Spencer, S. J., Ultrathin SiO₂ on Si. I. Quantifying and removing carbonaceous contamination. *Journal of Vacuum Science & Technology A* **2003**, *21* (2), 345-352.
- [95]. Rosso, M.; Giesbers, M.; Arafat, A.; Schroen, K.; Zuilhof, H., Covalently Attached Organic Monolayers on SiC and Si₃N₄ Surfaces: Formation Using UV Light at Room Temperature. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 2172-2180.
- [96]. Jagst, E. Surface Functional Group Characterization Using Chemical Derivatization X-ray Photoelectron Spectroscopy (CD-XPS) Freie Universität Berlin, 2010.
- [97]. Habraken, F.; Kuiper, A. E. T., Silicon-Nitride and Oxynitride Films. *Materials Science & Engineering R-Reports* **1994**, *12* (3), 123-175.
- [98]. Curtius, T., Über Stickstoffwasserstoffsäure (Azoimid) N₃H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, *23*, 3023.
- [99]. Curtius, T., Neues vom Stickstoffwasserstoff. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, *24*, 3341.
- [100]. Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44* (33), 5188-5240.
- [101]. Elbarbary, A. A.; Khodair, A. I.; Pedersen, E. B., Synthesis and Antiviral Evaluation of Hydantoin Analogos of AZT. *Archiv Der Pharmazie* **1994**, *327* (10), 653-655.
- [102]. Abdelrahman, A. A. H.; Abdelbary, H. M.; Pedersen, E. B.; Nielsen, C., Synthesis of 4-Methylthio Analogos of FLT and AZT and their Evaluation against HIV. *Archiv Der Pharmazie* **1995**, *328* (1), 67-70.
- [103]. Chang, S. J.; Lamm, S. H., Human health effects of sodium azide exposure: A literature review and analysis. *International Journal of Toxicology* **2003**, *22* (3), 175-186.

- [104]. Ma, Y. R.; Zheng, J. K.; Amond, E. F.; Stafford, C. M.; Becker, M. L., Facile Fabrication of "Dual Click" One- and Two-Dimensional Orthogonal Peptide Concentration Gradients. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (3), 665-671.
- [105]. Cavender, C. J.; Shiner, V. J., Trifluoromethanesulfonyl Azide - Its Reaction with Alkyl Amines to Form Alkyl Azides. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37* (22), 3567-&.
- [106]. Greenberg, W. A.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung, S. C.; Wong, C. H., Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: Correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (28), 6527-6541.
- [107]. Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Organic Letters* **2007**, *9* (19), 3797-3800.
- [108]. Ye, H.; Liu, R. H.; Li, D. M.; Liu, Y. H.; Yuan, H. X.; Guo, W. K.; Zhou, L. F.; Cao, X. F.; Tian, H. Q.; Shen, J.; Wang, P. G., A Safe and Facile Route to Imidazole-1-sulfonyl Azide as a Diazotransfer Reagent. *Organic Letters* **2013**, *15* (1), 18-21.
- [109]. Fischer, N.; Goddard-Borger, E. D.; Greiner, R.; Klapotke, T. M.; Skelton, B. W.; Stierstorfer, J., Sensitivities of Some Imidazole-1-sulfonyl Azide Salts. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (4), 1760-1764.
- [110]. Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H., The chemistry of amine-azide interconversion: Catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (36), 10773-10778.
- [111]. Pandiakumar, A. K.; Sarma, S. P.; Samuelson, A. G., Mechanistic studies on the diazo transfer reaction. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (18), 2917-2920.
- [112]. Gallardo, I. F.; Webb, L. J., Tethering Hydrophobic Peptides to Functionalized Self-Assembled Mono layers on Gold through Two Chemical Linkers Using the Huisgen Cycloaddition. *Langmuir* **2010**, *26* (24), 18959-18966.
- [113]. Dehnicke, K.; Schmitte, J., Tetrazido-Nitrido-Molybdat(VI);
Darstellung, IR-Spektrum und Kristallstruktur von $\text{AsPh}_4[\text{MoN}(\text{N}_3)_4]$. *Zeitschrift für Naturforschung* **1980**, *35 b*, 1070-1074.
- [114]. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-+.
- [115]. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F., Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (9), 4207-4220.
- [116]. Best, M. D., Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry* **2009**, *48* (28), 6571-6584.
- [117]. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41* (14), 2596-+.
- [118]. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3 -triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
- [119]. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (1), 210-216.
- [120]. Li, Y.; Cai, C. Z., Click Chemistry-Based Functionalization on Non-Oxidized Silicon Substrates. *Chemistry-an Asian Journal* **2011**, *6* (10), 2592-2605.
- [121]. Heinrich, T.; Traulsen, C. H. H.; Darlatt, E.; Richter, S.; Poppenberg, J.; Traulsen, N. L.; Linder, I.; Lippitz, A.; Dietrich, P. M.; Dib, B.; Unger, W. E. S.; Schalley, C. A., The versatility of "click" reactions: molecular recognition at interfaces. *RSC Advances* **2014**, *4* (34), 17694-17702.

- [122]. Manova, R. K.; Pujari, S. P.; Weijers, C.; Zuilhof, H.; van Beek, T. A., Copper-Free Click Biofunctionalization of Silicon Nitride Surfaces via Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition Reactions. *Langmuir* **2012**, *28* (23), 8651-8663.
- [123]. Wang, L. W.; Ran, Q.; Tian, Y. A.; Xu, J. J.; Xian, Y. Z.; Peng, R.; Jin, L. T., Covalent immobilization of redox protein via click chemistry and carbodiimide reaction: Direct electron transfer and biocatalysis. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *350* (2), 544-550.
- [124]. Hanni, K. D.; Leigh, D. A., The application of CuAAC 'click' chemistry to catenane and rotaxane synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (4), 1240-1251.
- [125]. Miljanic, O. S.; Dichtel, W. R.; Aprahamian, I.; Rohde, R. D.; Agnew, H. D.; Heath, J. R.; Stoddart, J. F., Rotaxanes and catenanes by click chemistry. *Qsar & Combinatorial Science* **2007**, *26* (11-12), 1165-1174.
- [126]. Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Lee, A. L.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T., Active metal template synthesis of rotaxanes, catenanes and molecular shuttles. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (6), 1530-1541.
- [127]. Aragao-Leoneti, V.; Campo, V. L.; Gomes, A. S.; Field, R. A.; Carvalho, I., Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron* **2010**, *66* (49), 9475-9492.
- [128]. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (24), 1128-1137.
- [129]. Aldhoun, M.; Massi, A.; Dondoni, A., Click Azide-Nitrile Cycloaddition as a New Ligation Tool for the Synthesis of Tetrazole-Tethered C-Glycosyl alpha-Amino Acids. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (24), 9565-9575.
- [130]. Quemener, D.; Davis, T. P.; Barner-Kowollik, C.; Stenzel, M. H., RAFT and click chemistry: A versatile approach to well-defined block copolymers. *Chemical Communications* **2006**, (48), 5051-5053.
- [131]. Bandyopadhyay, S.; Mukherjee, S.; Dey, A., Modular synthesis, spectroscopic characterization and in situ functionalization using "click" chemistry of azide terminated amide containing self-assembled monolayers. *Rsc Advances* **2013**, *3* (38), 17174-17187.
- [132]. Coates, M.; Griveau, S.; Bedioui, F.; Nyokong, T., Layer by Layer Electrode Surface Functionalisation Using Carbon Nanotubes, Electrochemical Grafting of Azide-Alkyne Functions and Click Chemistry. *Electroanalysis* **2012**, *24* (9), 1833-1838.
- [133]. Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Chidsey, C. E. D., "Clicking" functionality onto electrode surfaces. *Langmuir* **2004**, *20* (4), 1051-1053.
- [134]. Schwarz, F. B.; Heinrich, T.; Lippitz, A.; Unger, W. E. S.; Schalley, C. A., A photoswitchable rotaxane operating in monolayers on solid support. *Chemical Communications* **2016**, *52*, 14458-14461.
- [135]. Schwarz, F. B.; Heinrich, T.; Kaufmann, J. O.; Lippitz, A.; Puttreddy, R.; Rissanen, K.; Unger, W. E. S.; Schalley, C. A., Photocontrolled On-Surface Pseudorotaxane Formation with Well-Ordered Macrocyclic Multilayers. *Chemistry-a European Journal* **2016**, *22* (40), 14383-14389.
- [136]. Gouget-Laemmel, A. C.; Yang, J.; Lodhi, M. A.; Siriwardena, A.; Aureau, D.; Boukherroub, R.; Chazalviel, J. N.; Ozanam, F.; Szunerits, S., Functionalization of Azide-Terminated Silicon Surfaces with Glycans Using Click Chemistry: XPS and FTIR Study. *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (1), 368-375.
- [137]. Zhou, Y.; Wang, S.; Zhang, K.; Jiang, X., Visual Detection of Copper(II) by Azide- and Alkyne-Functionalized Gold Nanoparticles Using Click Chemistry. *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 7564-7566.
- [138]. Lau, Y. H.; Rutledge, P. J.; Watkinson, M.; Todd, M. H., Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (5), 2848-2866.
- [139]. Freitag, S.; LeTrong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E., Structural studies of the streptavidin binding loop. *Protein Science* **1997**, *6* (6), 1157-1166.
- [140]. Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R., Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* **1989**, *243* (4887), 85-88.

- [141]. Kang, S. M.; Lee, B. S.; Kim, W.-J.; Choi, I. S.; Kil, M.; Jung, H.-j.; Oh, E., Specific Binding of Streptavidin onto the Nonbiofouling Titanium/Titanium Oxide Surface through Surface-Initiated, Atom Transfer Radical Polymerization and Bioconjugation of Biotin. *Macromolecular Research* **2009**, *17* (3), 174-180.
- [142]. Luschtinetz, F. Cyanfarbstoff als Fluoreszenzsonden in biomimetischen und biologischen Systemen Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Fluoreszenzanisotropie-Untersuchungen. Universität Potsdam, Dissertation, 2010.
- [143]. Tausig, F.; Wolf, F. J., Streptavidin - A Substance with Avidin-like Properties Produced by Microorganisms. *Biochemical and biophysical Research Communications* **1964**, *14* (3), 205 - 209.
- [144]. Chalet, L.; Wolf, F. J., The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* **1964**, *106*, 1-5.
- [145]. Bayer, E. A.; Kulik, T.; Adar, R.; Wilchek, M., Close Similarity Among Streptavidin-like, Biotin-Binding Proteins from Streptomyces. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1995**, *1263* (1), 60-66.
- [146]. Lapin, N. A.; Chabal, Y. J., Infrared Characterization of Biotinylated Silicon Oxide Surfaces, Surface Stability, and Specific Attachment of Streptavidin. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (25), 8776-8783.
- [147]. Sivasankar, S.; Subramaniam, S.; Leckband, D., Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (22), 12961-12966.
- [148]. Lin, V. S. Y.; Moteshareei, K.; Dancil, K. P. S.; Sailor, M. J.; Ghadiri, M. R., A porous silicon-based optical interferometric biosensor. *Science* **1997**, *278* (5339), 840-843.
- [149]. Liu, X. J.; Tan, W. H., A fiber-optic evanescent wave DNA biosensor based on novel molecular beacons. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (22), 5054-5059.
- [150]. Barat, B.; Wu, A. M., Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. *Biomolecular Engineering* **2007**, *24* (3), 283-291.
- [151]. Jain, P. K.; Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (12), 1578-1586.
- [152]. Ramanathan, K.; Bangar, M. A.; Yun, M.; Chen, W.; Myung, N. V.; Mulchandani, A., Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (2), 496-497.
- [153]. Zhou, X. C.; Huang, L. Q.; Li, S. F. Y., Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, *16* (1-2), 85-95.
- [154]. Hurley, W. L.; Finkelstein, E.; Holst, B. D., Identification of Surface-Proteins on Bovine Leukocytes by a Biotin-Avidin Protein Blotting Technique. *Journal of Immunological Methods* **1985**, *85* (1), 195-202.
- [155]. Schlossbauer, A.; Kect, J.; Bein, T., Biotin-Avidin as a Protease-Responsive Cap System for Controlled Guest Release from Colloidal Mesoporous Silica. *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 3138 - 3141.
- [156]. Yam, C. M.; Pradier, C. M.; Salmain, M.; Marcus, P.; Jaouen, G., Binding of biotin to gold surfaces functionalized by self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine: Combined FT-IRRAS and XPS characterization. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *235* (1), 183-189.
- [157]. Schenk, F. C.; Boehm, H.; Spatz, J. P.; Wegner, S. V., Dual-Functionalized Nanostructured Biointerfaces by Click Chemistry. *Langmuir* **2014**, *30* (23), 6897-6905.
- [158]. Mader, H. S.; Link, M.; Achatz, D. E.; Uhlmann, K.; Li, X.; Wolfbeis, O. S., Surface-Modified Upconverting Microparticles and Nanoparticles for Use in Click Chemistries. *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16* (18), 5416-5424.
- [159]. Maidenberg, Y.; Zhang, S.; Luo, K.; Akhavein, N.; Koberstein, J. T., Mixed Si lane Mono layers for Controlling the Surface Areal Density of Click-Reactive Alkyne Groups: A Method to Assess

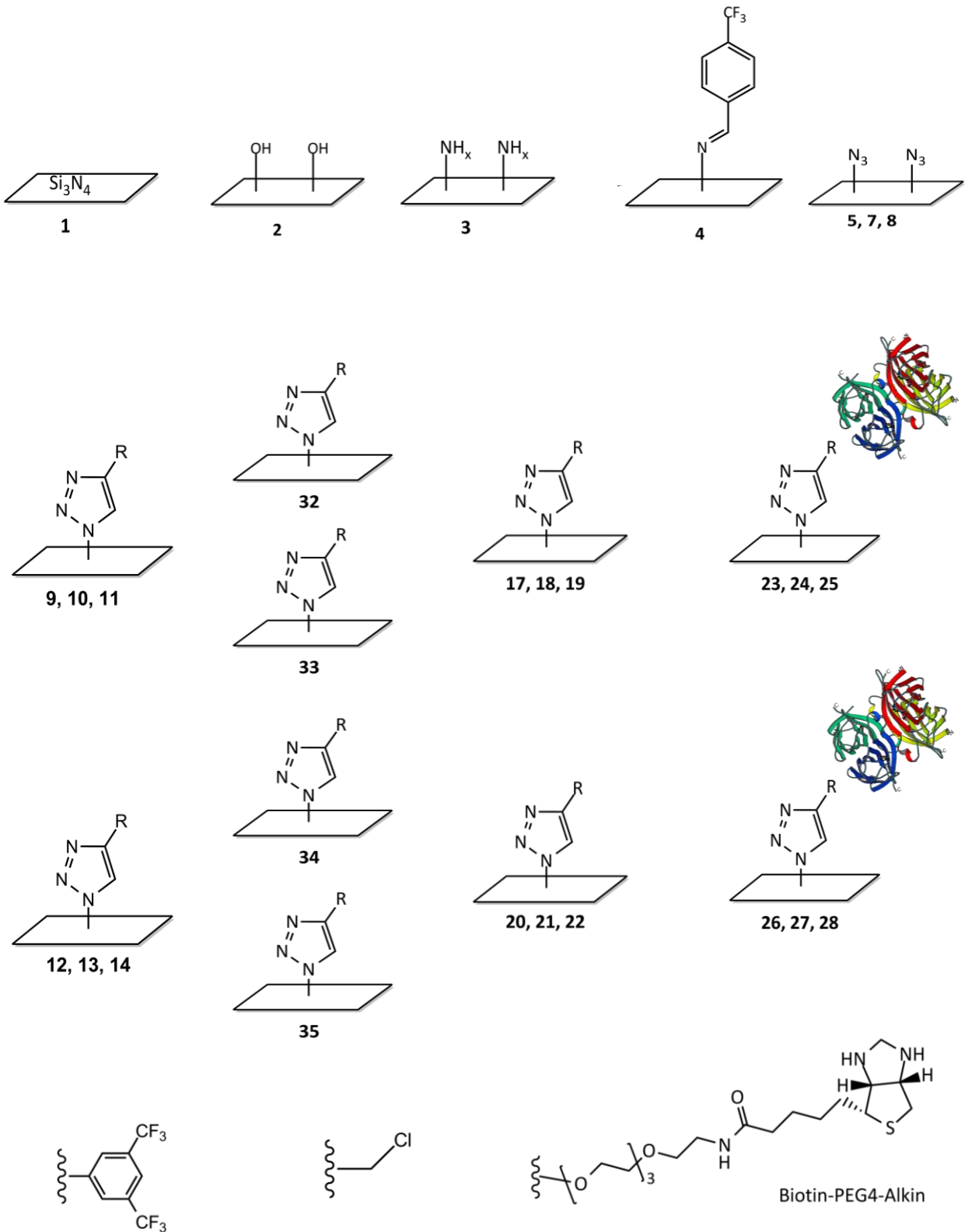
- Preferential Surface Adsorption on Flat Substrates and a Method to Verify Compositional Homogeneity on Nanoparticles. *Langmuir* **2013**, *29* (38), 11959-11965.
- [160]. Vanea, E.; Simon, V., XPS study of protein adsorption onto nanocrystalline aluminosilicate microparticles. *Applied Surface Science* **2011**, *257* (6), 2346-2352.
- [161]. Wagner, M. S.; McArthur, S. L.; Shen, M. C.; Horbett, T. A.; Castner, D. G., Limits of detection for time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): detection of low amounts of adsorbed protein. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2002**, *13* (4), 407-428.
- [162]. Shard, A. G.; Whittle, J. D.; Beck, A. J.; Brookes, P. N.; Bullett, N. A.; Talib, R. A.; Mistry, A.; Barton, D.; McArthur, S. L., A NEXAFS examination of unsaturation in plasma polymers of allylamine and propylamine. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (33), 12472-12480.
- [163]. Hemraj-Benny, T.; Banerjee, S.; Sambasivan, S.; Balasubramanian, M.; Fischer, D. A.; Eres, G.; Puretzky, A. A.; Geohegan, D. B.; Lowndes, D. H.; Han, W. Q.; Misewich, J. A.; Wong, S. S., Near-edge X-ray absorption fine structure spectroscopy as a tool for investigating nanomaterials. *Small* **2006**, *2* (1), 26-35.
- [164]. Kim, Y. P.; Hong, M. Y.; Shon, H. K.; Moon, D. W.; Kim, H. S.; Lee, T. G., Quantitative ToF-SIMS study of surface-immobilized streptavidin. *Applied Surface Science* **2006**, *252* (19), 6801-6804.
- [165]. Park, J. W.; Cho, I. H.; Moon, D. W.; Paek, S. H.; Lee, T. G., ToF-SIMS and PCA of surface-immobilized antibodies with different orientations. *Surface and Interface Analysis* **2011**, *43* (1-2), 285-289.
- [166]. Leslie A. Pray, Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. *Nature Education* **2008**, *1* (1), 100.
- [167]. Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J., Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32* (6), 485-493.
- [168]. Lord, C. J.; Ashworth, A., The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **2012**, *481* (7381), 287-294.
- [169]. Perera, C.; Hormann, J.; Kulak, N., Von künstlichen Nukleasen und Proteasen. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2013**, *7*, 448-450.
- [170]. Singh, V.; Mondal, P. C.; Kumar, A.; Jeyachandran, Y. L.; Awasthi, S. K.; Gupta, R. D.; Zharnikov, M., Surface confined heteroleptic copper(II)-polypyridyl complexes for photonuclease activity. *Chemical Communications* **2014**, *50* (78), 11484-11487.
- [171]. Romo, A. I. B.; Abreu, D. S.; Paulo, T. D.; Carepo, M. S. P.; Sousa, E. H. S.; Lemus, L.; Aliaga, C.; Batista, A. A.; Nascimento, O. R.; Abruna, H. D.; Diogenes, I. C. N., Hydroxyl Radical Generation and DNA Nuclease Activity: A Mechanistic Study Based on a Surface-Immobilized Copper Thioether Clip-Phen Derivative. *Chemistry-a European Journal* **2016**, *22* (29), 10081-10089.
- [172]. Deo, K. M.; Pages, B. J.; Ang, D. L.; Gordon, C. P.; Aldrich-Wright, J. R., Transition Metal Intercalators as Anticancer Agents-Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (11).
- [173]. Sigman, D. S.; Graham, D. R.; Daurora, V.; Stern, A. M., Oxygen-Dependent Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex - Inhibition of Escherichia-Coli DNA-Polymerase-I. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254* (24), 2269-2272.
- [174]. Reich, K. A.; Marshall, L. E.; Graham, D. R.; Sigman, D. S., Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline-Copper Ion Complex - Superoxide Mediates the Reaction Dependent on NADH and Hydrogen-Peroxide. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (12), 3582-3584.
- [175]. Thederahn, T. B.; Kuwabara, M. D.; Larsen, T. A.; Sigman, D. S., Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline Copper - Kinetic Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (13), 4941-4946.
- [176]. Pitie, M.; Pratviel, G., Activation of DNA Carbon-Hydrogen Bonds by Metal Complexes. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (2), 1018-1059.

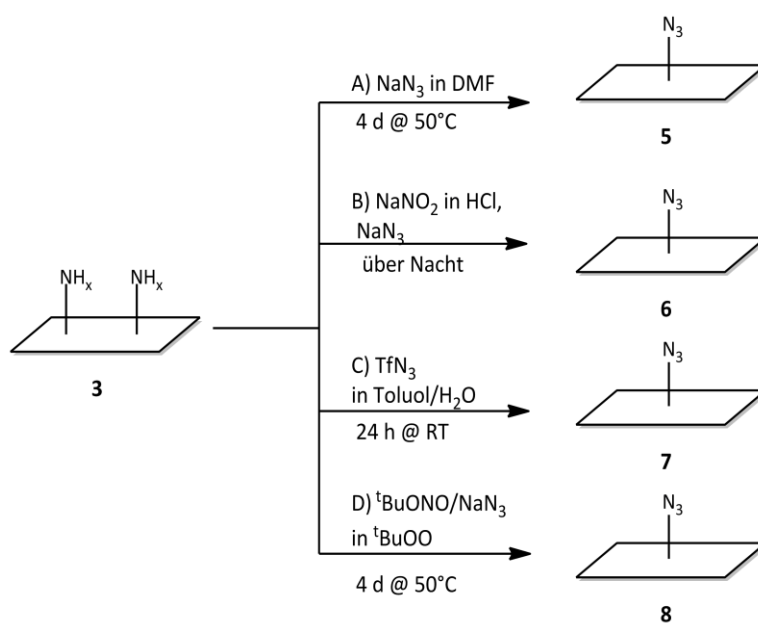
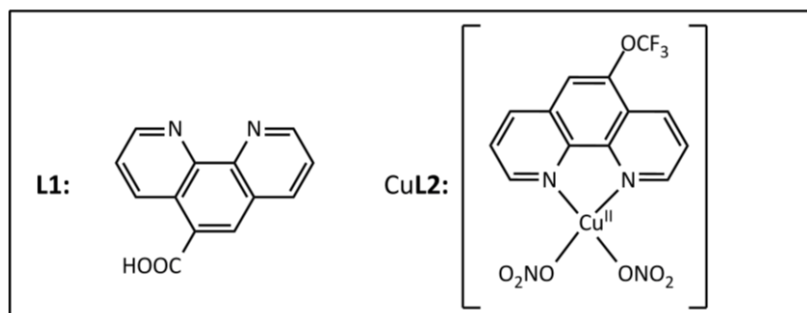
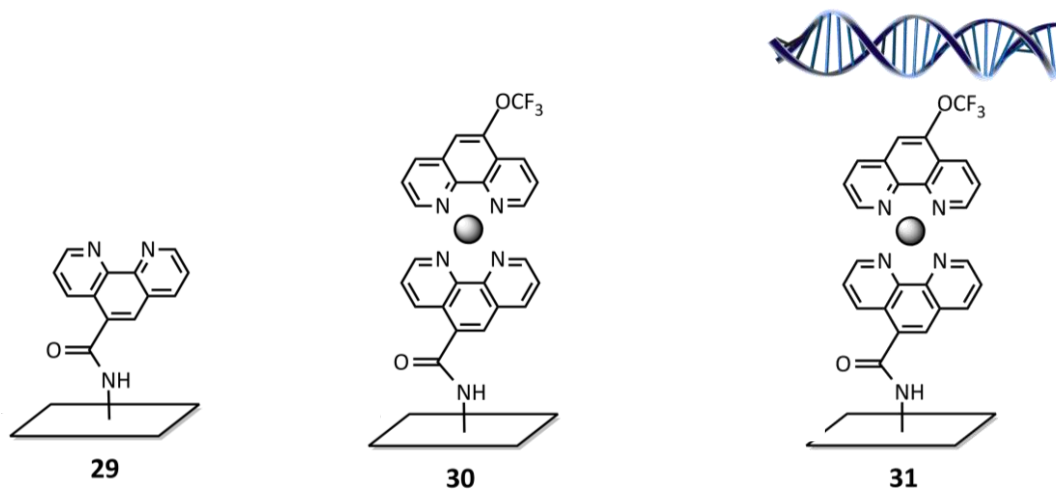
- [177]. Bales, B. C.; Pitie, M.; Meunier, B.; Greenberg, M. M., A minor groove binding copper-phenanthroline conjugate produces direct strand breaks via beta-elimination of 2-deoxyribonolactone. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (31), 9062-9063.
- [178]. K.R., S. G.; Mathew, B. B.; Sudhamani, C. N.; Naik, H. S. B., Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology*, **2014**, *2* (1), 1-9.
- [179]. Armitage, B., Photocleavage of nucleic acids. *Chemical Reviews* **1998**, *98* (3), 1171-1200.
- [180]. Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U., Artificial metallonucleases. *Chemical Communications* **2005**, (20), 2540-2548.
- [181]. Lüdtkke, C. Synthese fluorierter 1,10-Phenanthrolin-Derivate und Erfassung der biologischen Aktivität ihrer Kupfer(II)-Komplexe. Freie Universität Berlin, Dissertation, 2016.
- [182]. Ludtke, C.; Haupt, A.; Wozniak, M.; Kulak, N., Synthesis of fluorine-containing 1,10-phenanthrolines using mild versions of Skraup and Doebner-von Miller reactions. *Journal of Fluorine Chemistry* **2017**, *193*, 98-105.
- [183]. Wende, C. Über die biologische Aktivität von ATCUN und Phenanthrolinkomplexen des Kupfers und Nickels. Freie Universität Berlin, Dissertation, 2016.
- [184]. Merrifield, R. B., Solid-Phase Peptide-Synthesis after 25 Years - The Design and Synthesis of Antagonists of Glucagon. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia* **1988**, *19*, 31-67.
- [185]. Traulsen, C. H. H.; Darlatt, E.; Richter, S.; Poppenberg, J.; Hoof, S.; Unger, W. E. S.; Schalley, C. A., Intermixed Terpyridine-Functionalized Monolayers on Gold: Nonlinear Relationship between Terpyridyl Density and Metal Ion Coordination Properties. *Langmuir* **2012**, *28* (29), 10755-10763.
- [186]. Hamoudi, H.; Doring, K.; Chesneau, F.; Lang, H.; Zharnikov, M., Self-Assembly of Pyridine-Substituted Alkanethiols on Gold: The Electronic Structure Puzzle in the Ortho- and Para-Attachment of Pyridine to the Molecular Chain. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (1), 861-870.
- [187]. Battocchio, C.; Polzonetti, G.; Gambino, L.; Tuccitto, N.; Licciardello, A.; Marletta, G., Comparison between angular dependent NEXAFS analysis and theoretical calculations of molecular orientation of new functional mixed aromatic molecules deposited onto Au/Si(111). *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **2006**, *246* (1), 145-150.
- [188]. Ferrara, A. M.; da Silva, J. D. L.; do Rego, A. M. B., XPS studies of directly fluorinated HDPE: problems and solutions. *Polymer* **2003**, *44* (23), 7241-7249.
- [189]. Koski, K. J.; Cha, J. J.; Reed, B. W.; Wessells, C. D.; Kong, D.; Cui, Y., High-Density Chemical Intercalation of Zero-Valent Copper into Bi₂Se₃ Nanoribbons. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (18), 7584-7587.
- [190]. Hayez, V.; Franquet, A.; Hubin, A.; Terryn, H., XPS study of the atmospheric corrosion of copper alloys of archaeological interest. *Surface and Interface Analysis* **2004**, *36* (8), 876-879.
- [191]. Carugo, O.; Carugo, K. D., When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work. *Trends in Biochemical Sciences* **2005**, *30* (4), 213-219.
- [192]. Barr, L. T., Sample Damage. In *Modern ESCA-The Principles and Practice of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, 1994.
- [193]. Wang, Z. J.; Zhang, J.; Chen, P.; Zhou, X. Z.; Yang, Y. L.; Wu, S. X.; Niu, L.; Han, Y.; Wang, L. H.; Chen, P.; Boey, F.; Zhang, Q. C.; Liedberg, B.; Zhang, H., Label-free, electrochemical detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus DNA with reduced graphene oxide-modified electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26* (9), 3881-3886.
- [194]. Kumar, A.; Pattarkine, M.; Bhadbhade, M.; Mandale, A. B.; Ganesh, K. N.; Datar, S. S.; Dharmadhikari, C. V.; Sastry, M., Linear superclusters of colloidal gold particles by electrostatic assembly on DNA templates. *Advanced Materials* **2001**, *13* (5), 341-344.
- [195]. Tsud, N.; Bercha, S.; Sevcikova, K.; Acres, R. G.; Prince, K. C.; Matolin, V., Adenine adlayers on Cu(111): XPS and NEXAFS study. *Journal of Chemical Physics* **2015**, *143* (17).
- [196]. Feyer, V.; Plekan, O.; Sutara, F.; Chab, V.; Matolin, V.; Prince, K. C., Guanine adsorption on the Cu(110) surface. *Surface Science* **2011**, *605* (3-4), 361-365.
- [197]. Lin, Z.; Strother, T.; Cai, W.; Cao, X. P.; Smith, L. M.; Hamers, R. J., DNA attachment and hybridization at the silicon (100) surface. *Langmuir* **2002**, *18* (3), 788-796.

- [198]. Vanzetti, L.; Pasquardini, L.; Potrich, C.; Vaghi, V.; Battista, E.; Causa, F.; Pederzoli, C., XPS analysis of genomic DNA adsorbed on PEI-modified surfaces. *Surface and Interface Analysis* **2016**, *48* (7), 611-615.
- [199]. Shircliff, R. A.; Stradins, P.; Moutinho, H.; Fennell, J.; Ghirardi, M. L.; Cowley, S. W.; Branz, H. M.; Martin, I. T., Angle-Resolved XPS Analysis and Characterization of Mono layer and Multi layer Silane Films for DNA Coupling to Silica. *Langmuir* **2013**, *29* (12), 4057-4067.
- [200]. Nagaj, J.; Stokowa-Soltys, K.; Kurowska, E.; Fraczyk, T.; Jezowska-Bojczuk, M.; Bal, W., Revised Coordination Model and Stability Constants of Cu(II) Complexes of Tris Buffer. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (24), 13927-13933.
- [201]. Saxon, E.; Bertozzi, C. R., Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007-2010.
- [202]. Zhang, H. L.; Ma, Y.; Sun, X. L., Chemically-selective surface glyco-functionalization of liposomes through Staudinger ligation. *Chemical Communications* **2009**, (21), 3032-3034.
- [203]. ISO15472, Surface chemical analysis - X-ray photoelectron spectrometers - Calibration of energy scales. 2010.
- [204]. ISO19318, Surface chemical analysis - X-ray photoelectron spectroscopy - Reporting of methods used for charge control and charge correction. 2004.
- [205]. http://www.casaxps.com/help_manual/error_analysis.htm.
- [206]. Holzweber, M.; Heinrich, T.; Kunz, V.; Richter, S.; Traulsen, C. H. H.; Schalley, C. A.; Unger, W. E. S., Principal Component Analysis (PCA)-Assisted Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS): A Versatile Method for the Investigation of Self-Assembled Mono layers and Multi layers as Precursors for the Bottom-Up Approach of Nanoscaled Devices. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (12), 5740-5748.
- [207]. Gross, T.; Pippig, F.; Merz, B.; Merz, R.; Vohrer, U.; Mix, R.; Steffen, H.; Bremser, W.; Unger, W. E. S., Determination of OH Groups at Plasma Oxidised Poly(propylene) by TFAA Chemical Derivatisation XPS: An Inter-laboratory Comparison. *Plasma Processes and Polymers* **2010**, *7* (6), 494-503.
- [208]. Kulbokaite, R.; Ciuta, G.; Netopilik, M.; Makuska, R., N-PEG'ylation of chitosan via "click chemistry" reactions. *Reactive & Functional Polymers* **2009**, *69* (10), 771-778.
- [209]. Titz, A.; Radic, Z.; Schwardt, O.; Ernst, B., A safe and convenient method for the preparation of triflyl azide, and its use in diazo transfer reactions to primary amines. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (14), 2383-2385.
- [210]. Das, J.; Patil, S. N.; Awasthi, R.; Narasimhulu, C. P.; Trehan, S., An easy access to aryl azides from aryl amines under neutral conditions. *Synthesis* **2005**, (11), 1801-1806.
- [211]. Hertzberg, R. P.; Dervan, P. B., Cleavage of DNA with Methidiumpropyl-EDTA-Iron(II) - Reaction Conditions and Product Analyses. *Biochemistry* **1984**, *23* (17), 3934-3945.

7. Spektrenanhang

7.1. Verzeichnis der funktionalisierten Oberflächen





7.2. Gereinigte Siliziumnitrid-Oberfläche

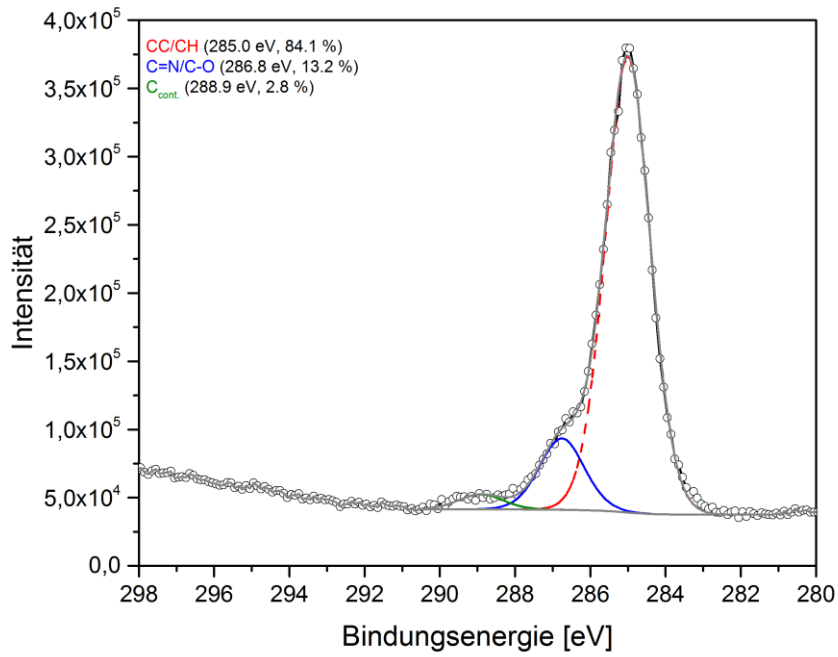


Abbildung 74: C 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

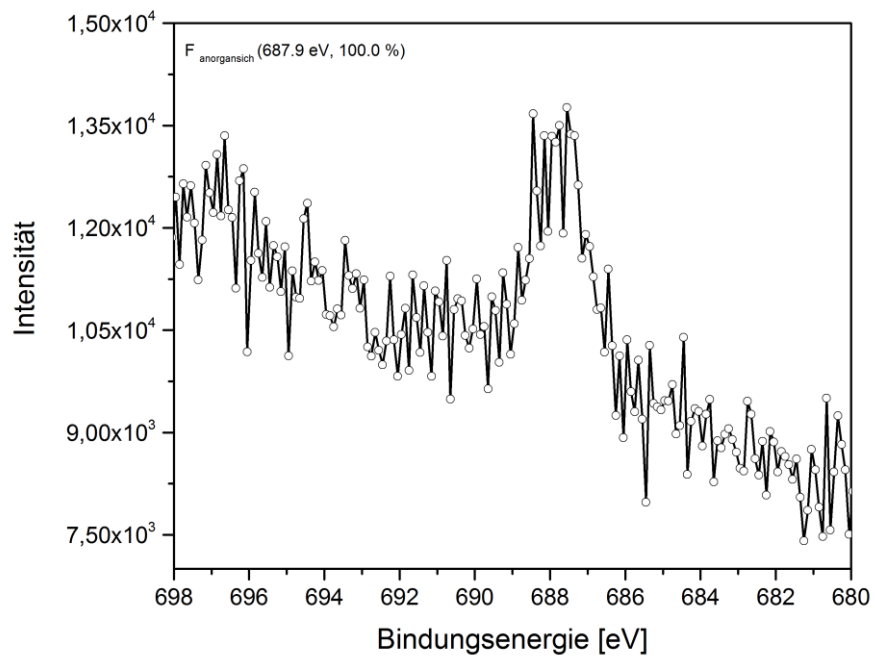


Abbildung 75: F 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).

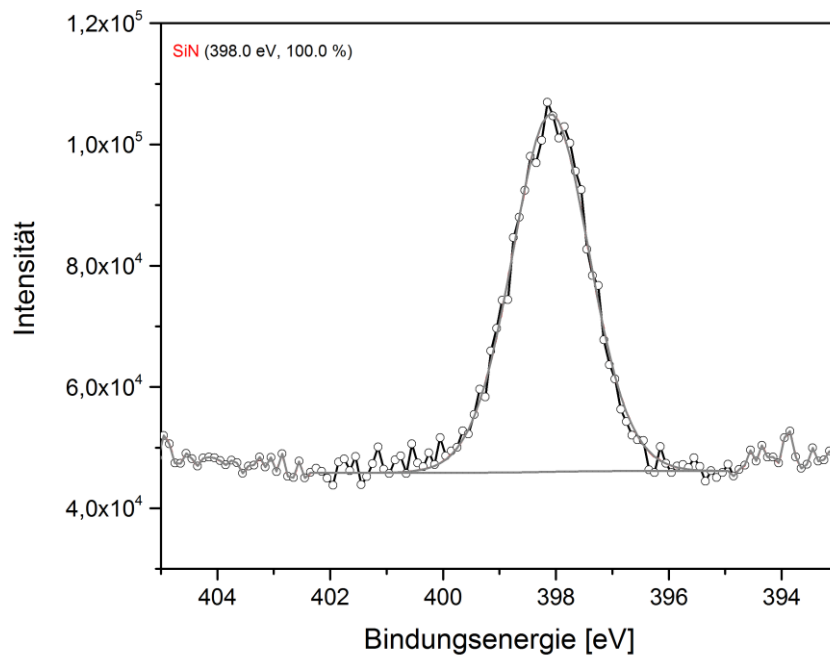


Abbildung 76: N 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

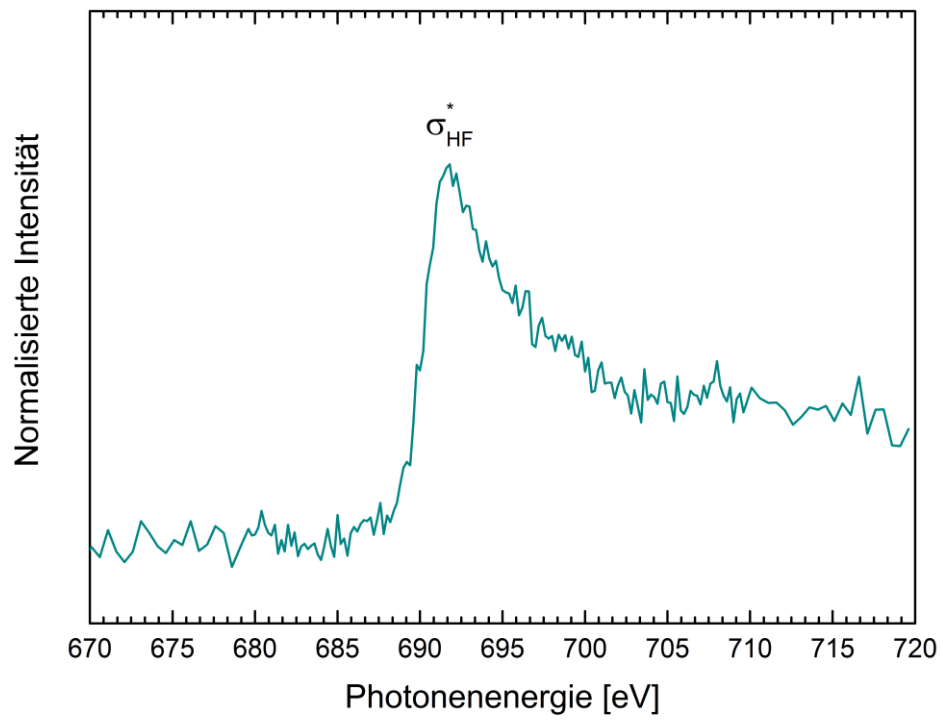


Abbildung 77: NEXAFS F K-Kante einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen

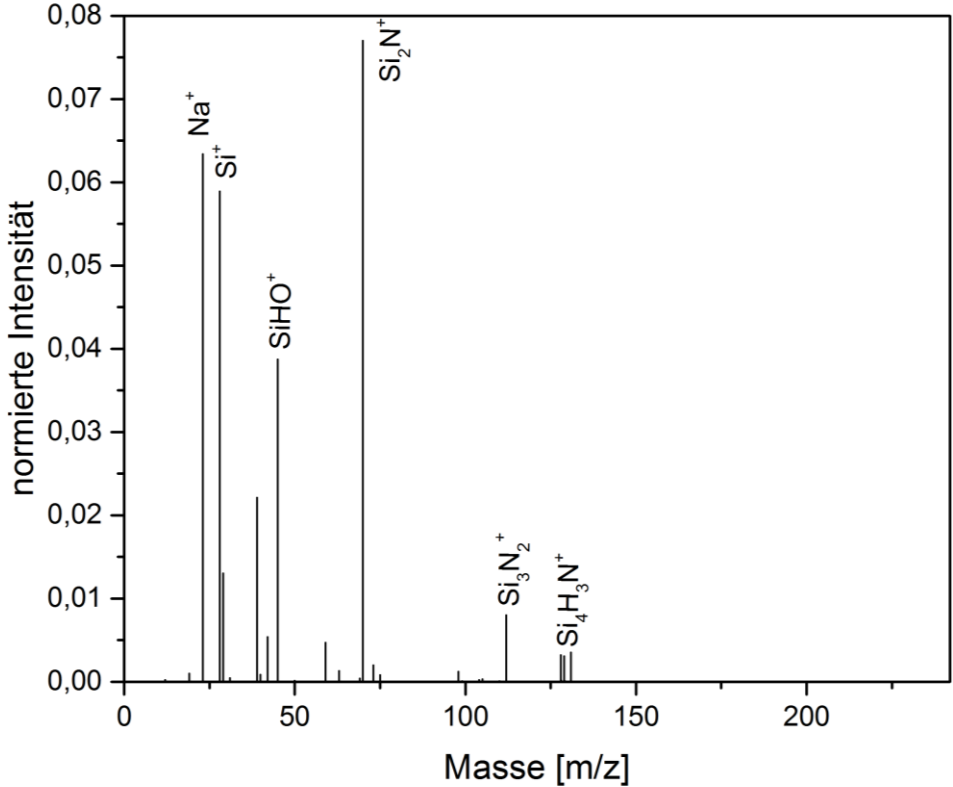


Abbildung 78: TOF-SIMS-Massenspektrum einer gereinigten Si₃N₄-Oberflächen.

7.3. Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC in Ethanol

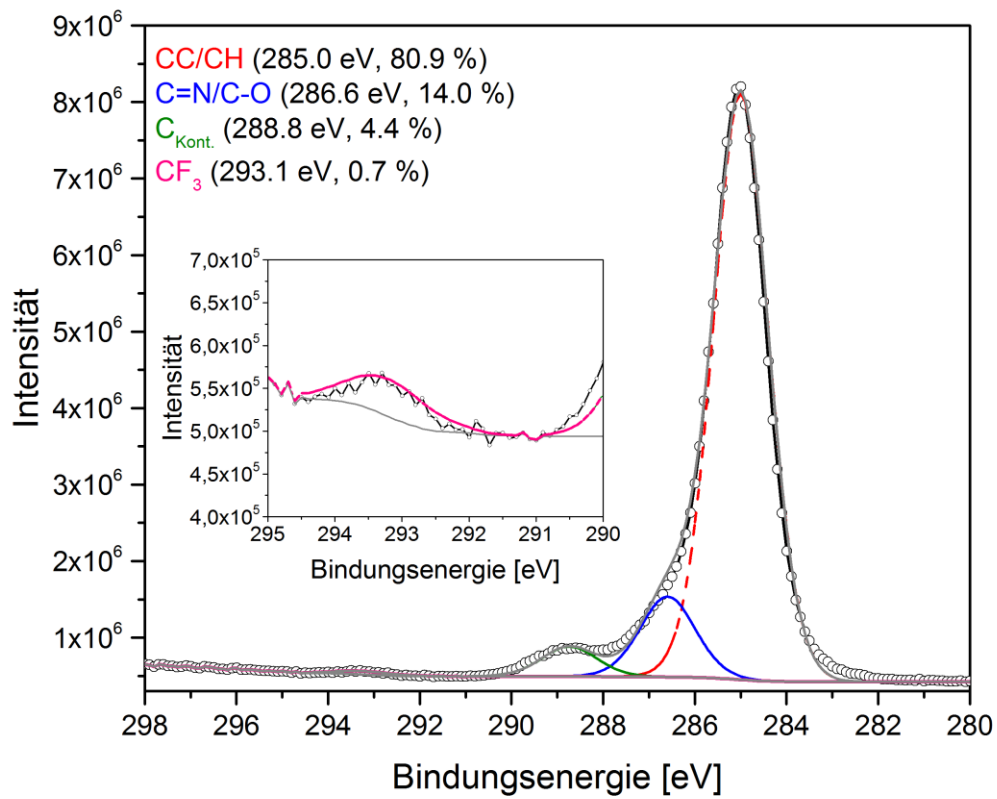
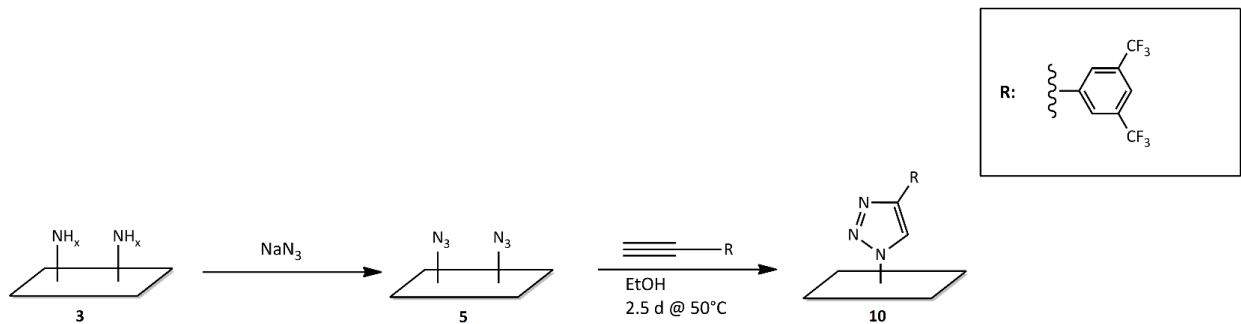


Abbildung 79: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

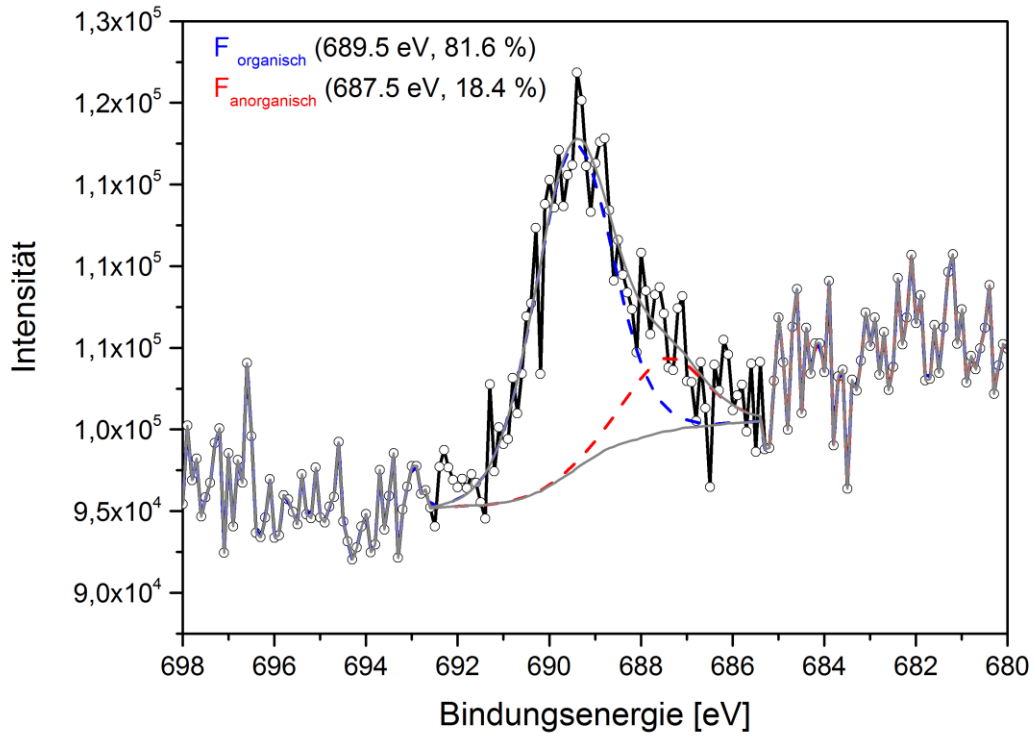


Abbildung 80: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=0.7 \text{ nm}$ ($h\nu=780 \text{ eV}$)).

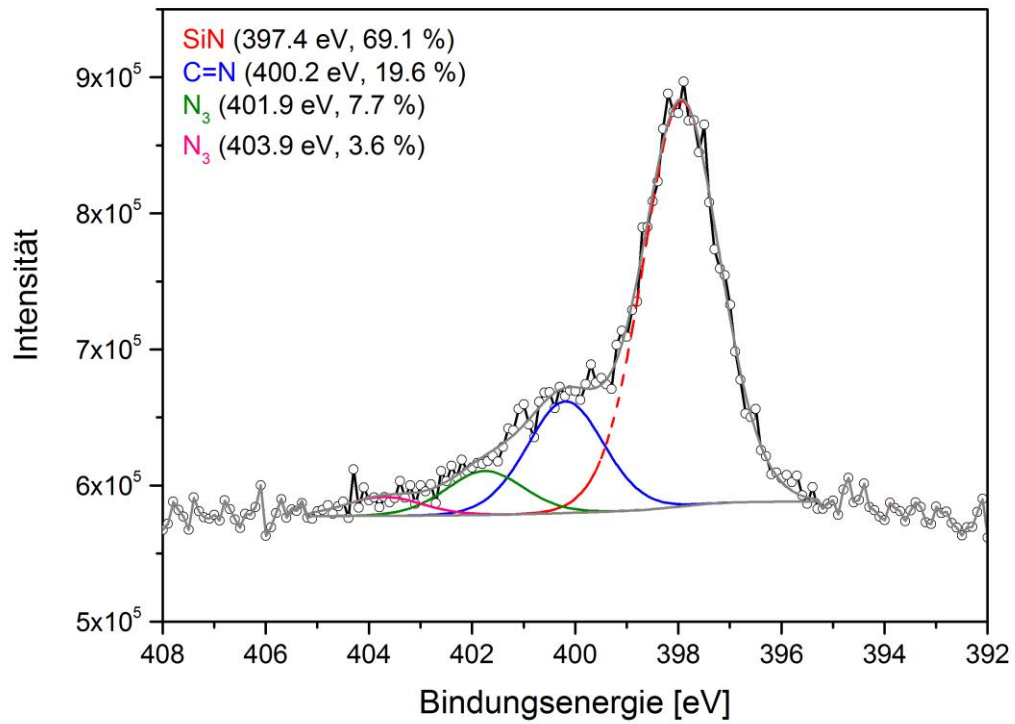


Abbildung 81: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN₃ azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclackten Si₃N₄-Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

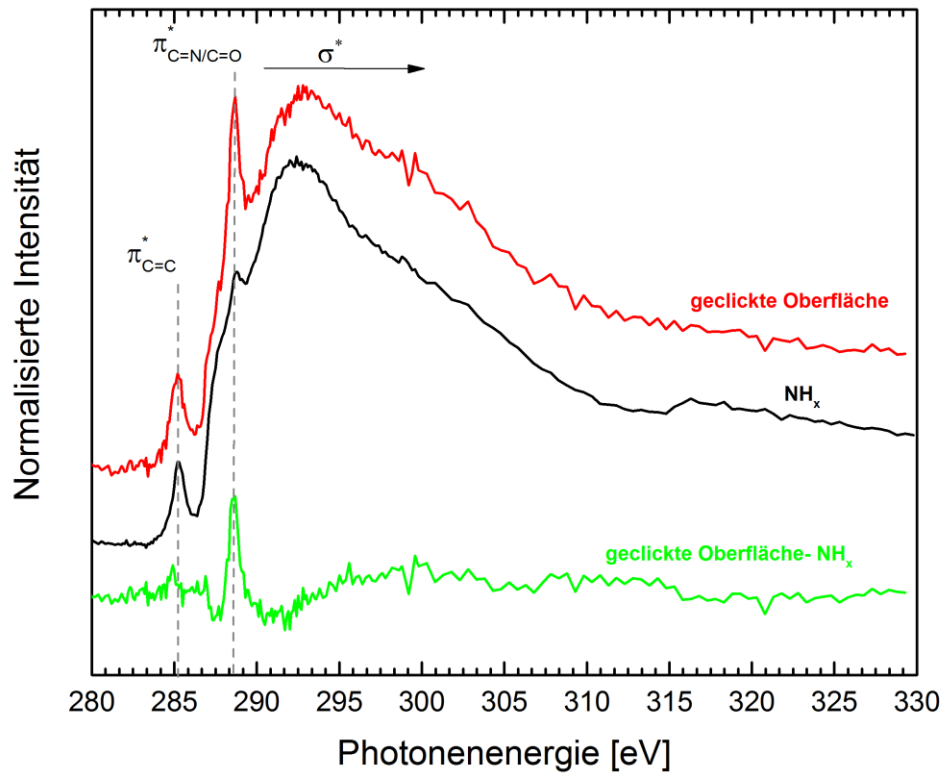


Abbildung 82: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen und dem Differenzspektrum.

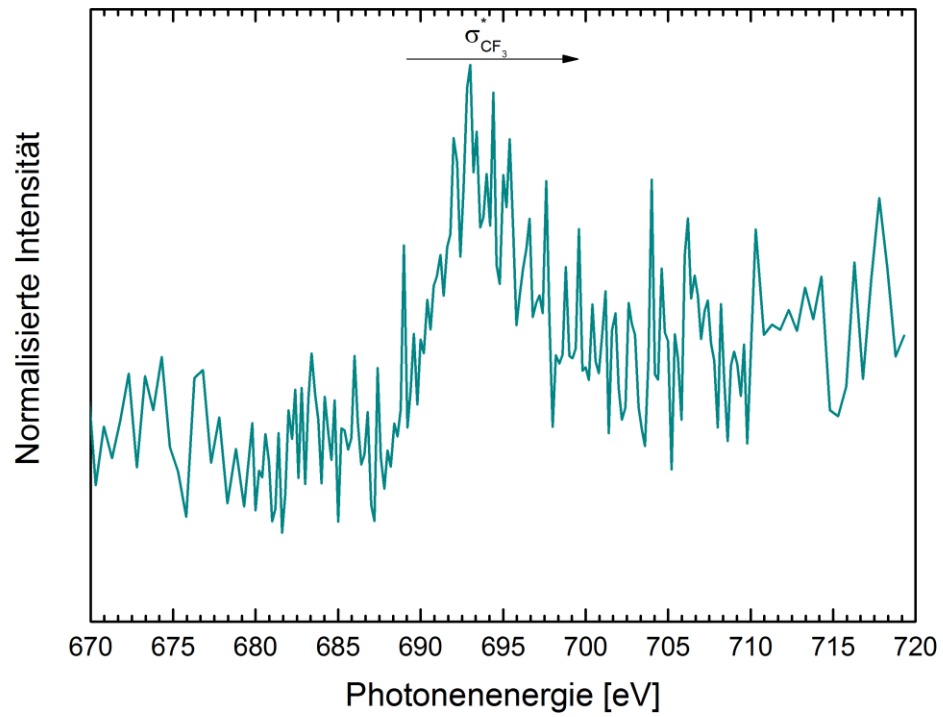


Abbildung 83: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclackten Si_3N_4 -Oberflächen.

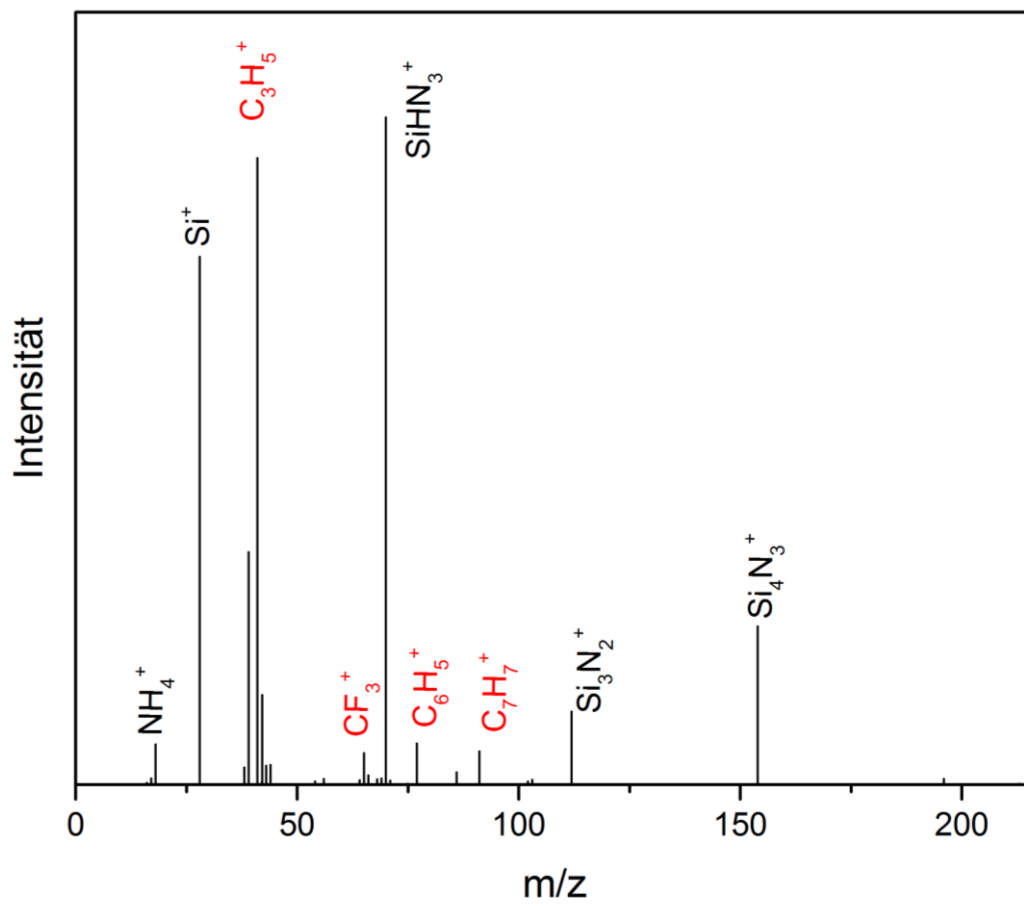


Abbildung 84: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclackten Si_3N_4 -Oberflächen.

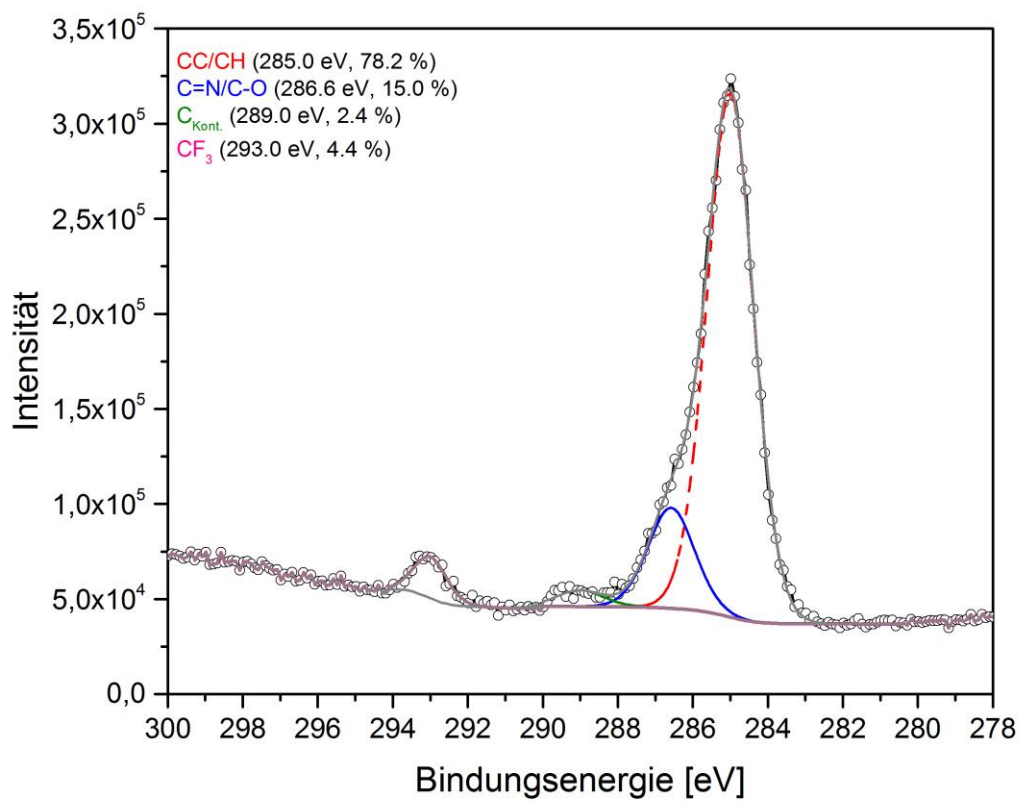
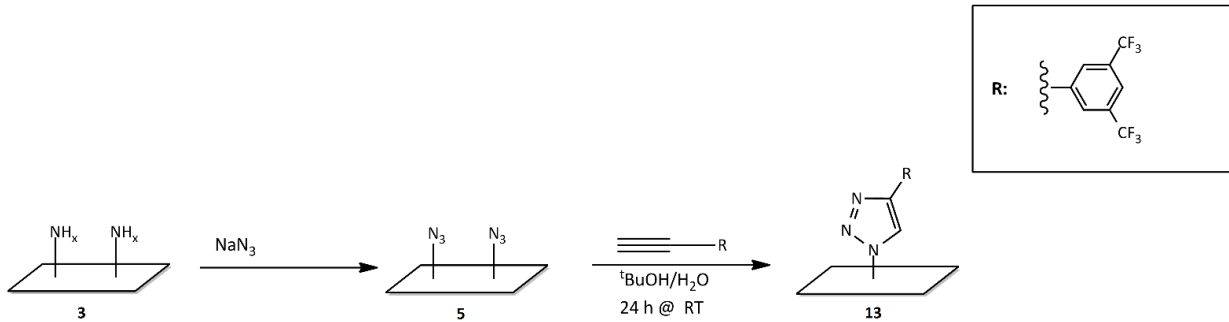
7.4. Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC in *tert*-Butanol/Wasser

Abbildung 85: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

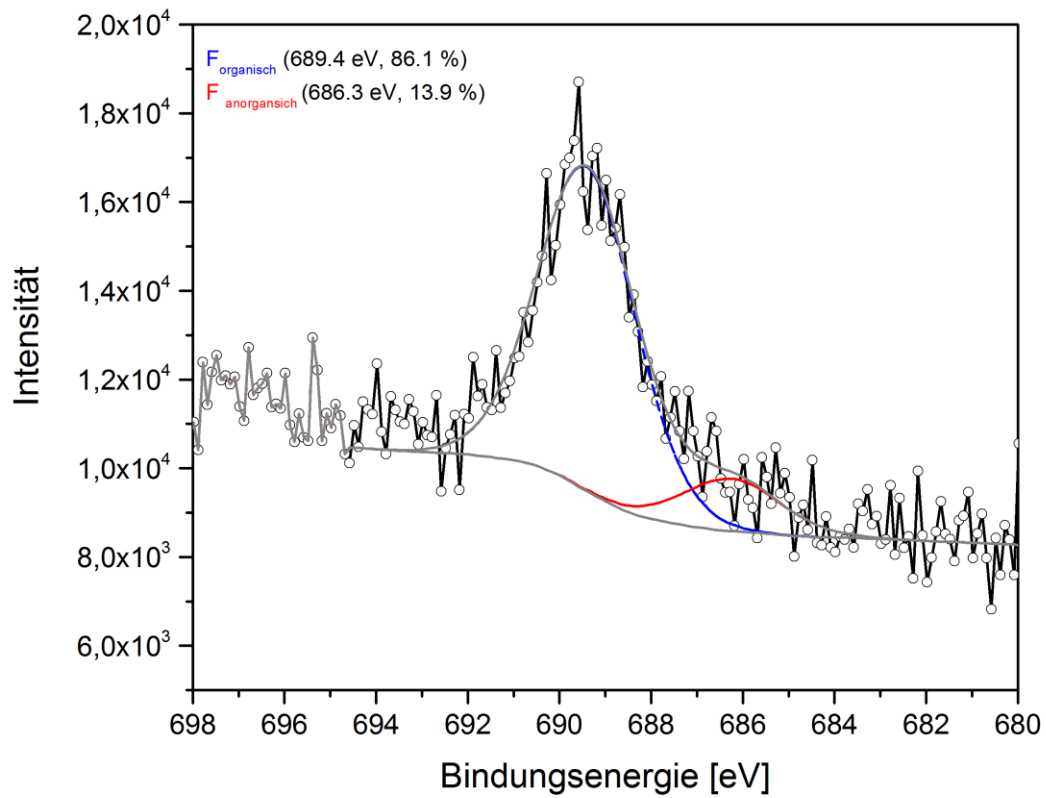


Abbildung 86: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).

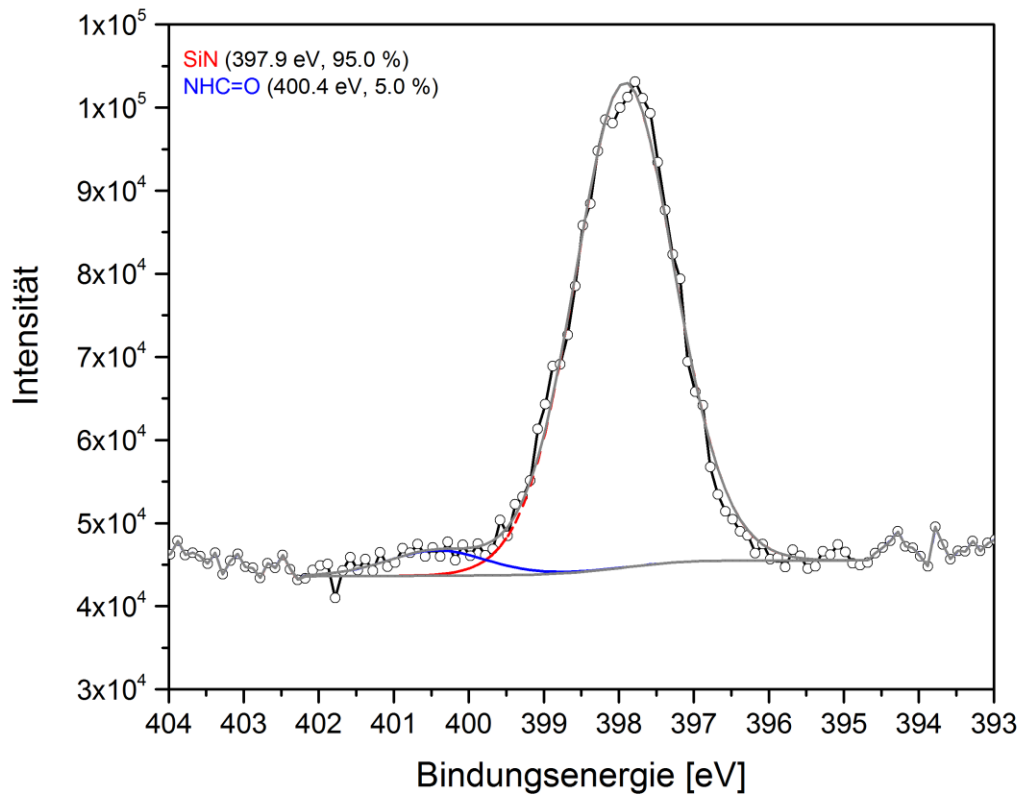


Abbildung 87: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

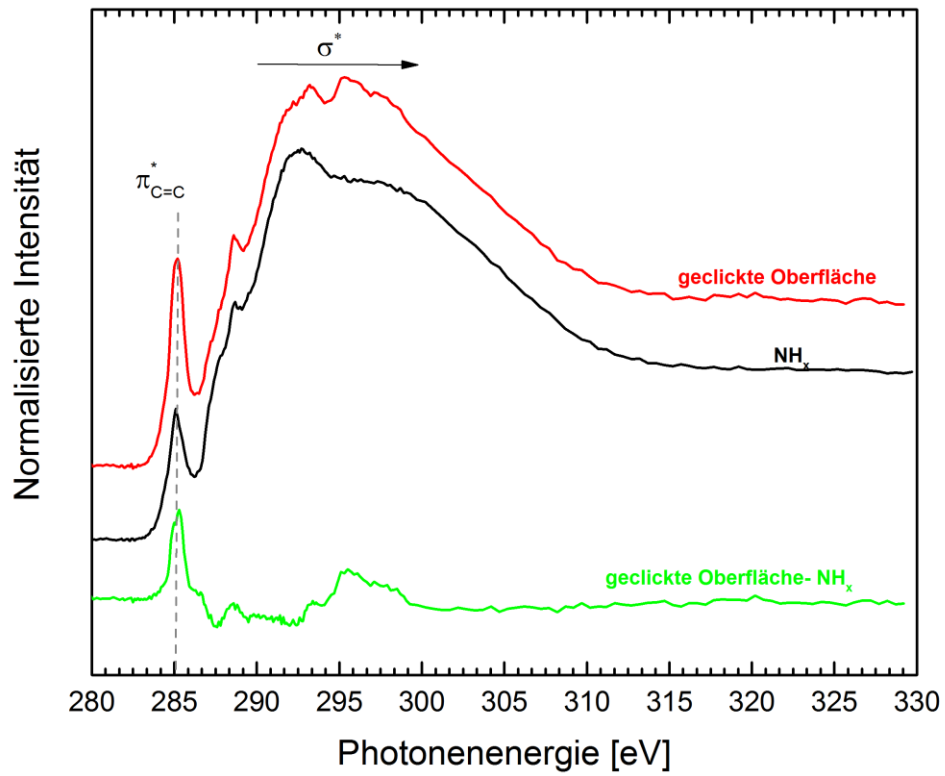


Abbildung 88: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.

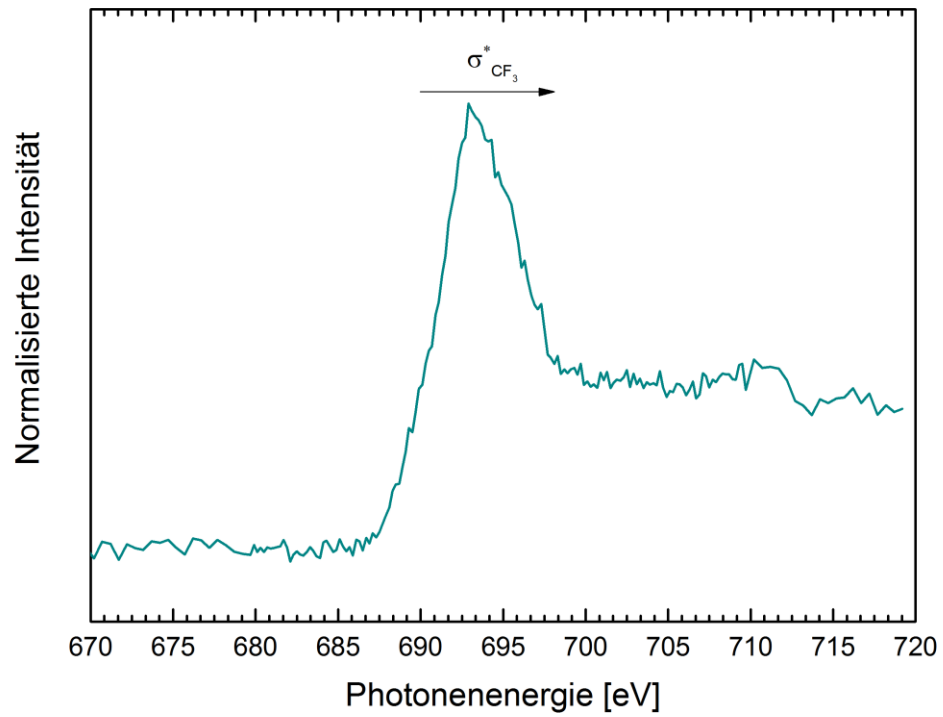


Abbildung 89: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclackten Si_3N_4 -Oberflächen.

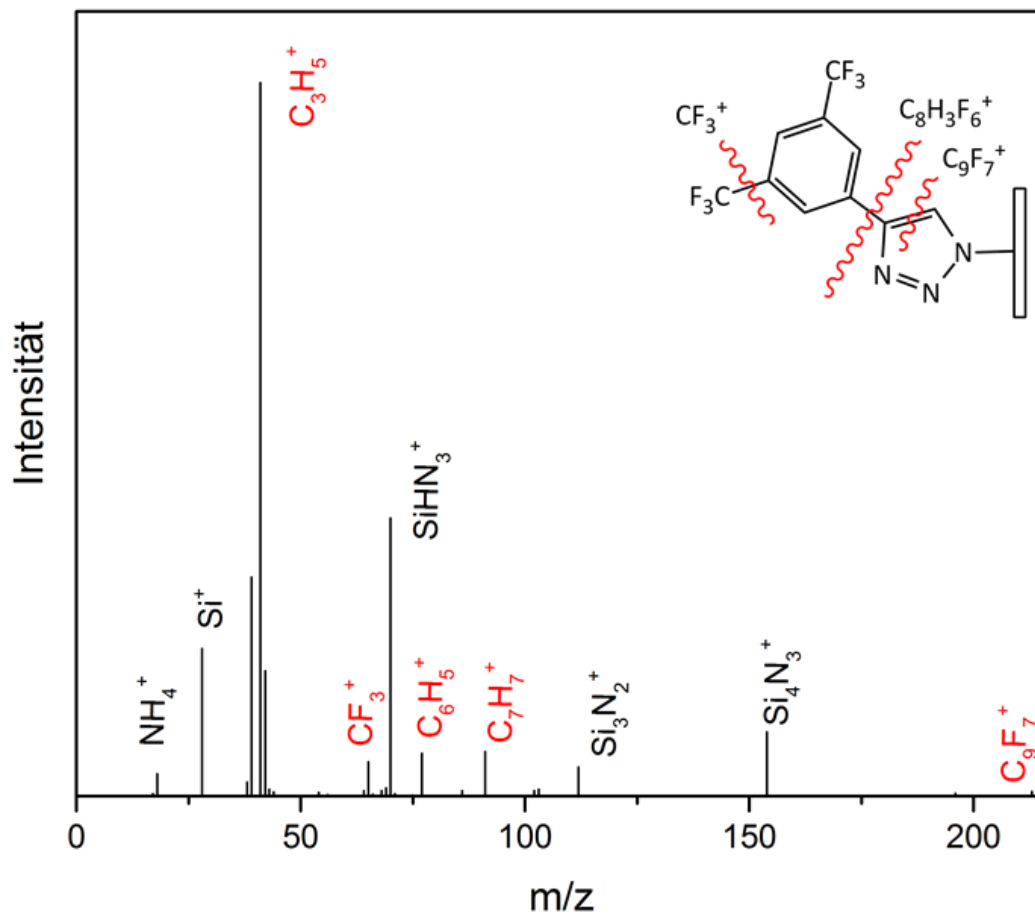


Abbildung 90: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)-benzol in *tert*-Butanol/Wasser gelickten Si_3N_4 -Oberflächen.

7.5. Azidierung mit Natriumazid mit *tert*-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC in Ethanol

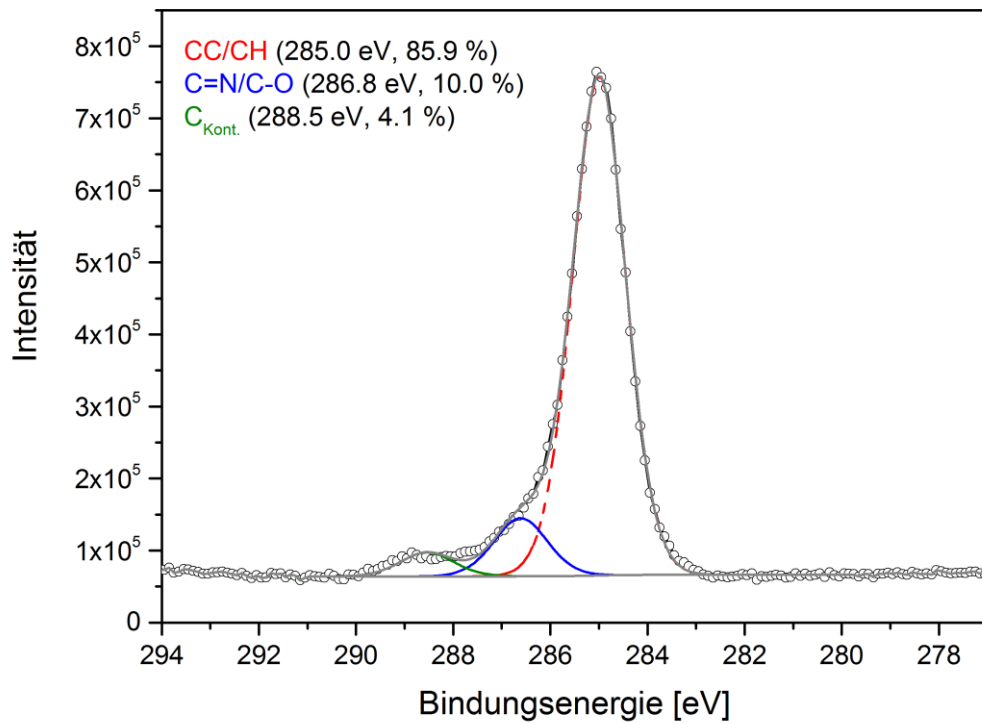
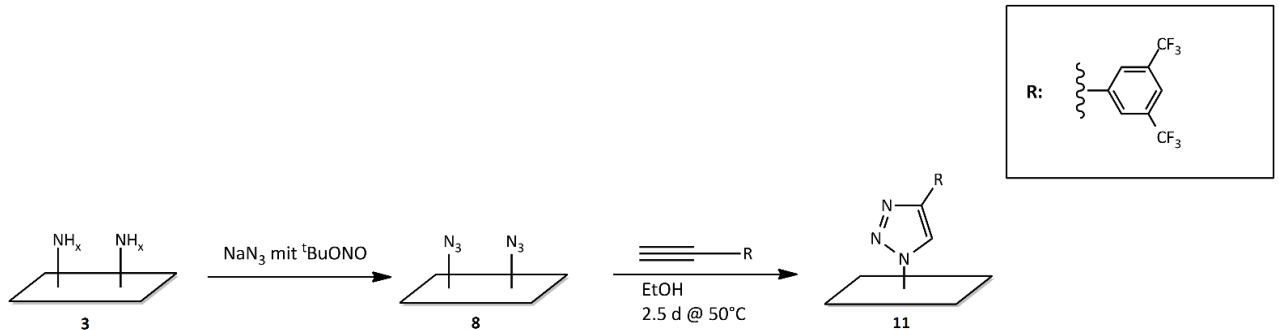


Abbildung 91: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

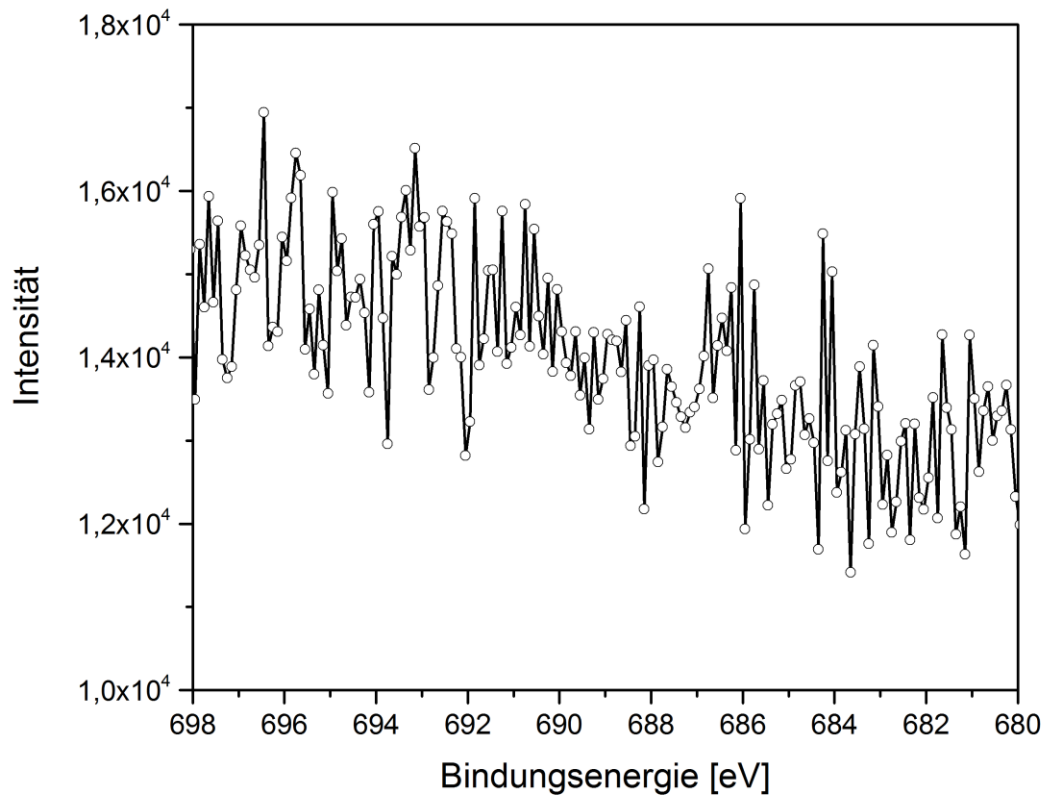


Abbildung 92: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).

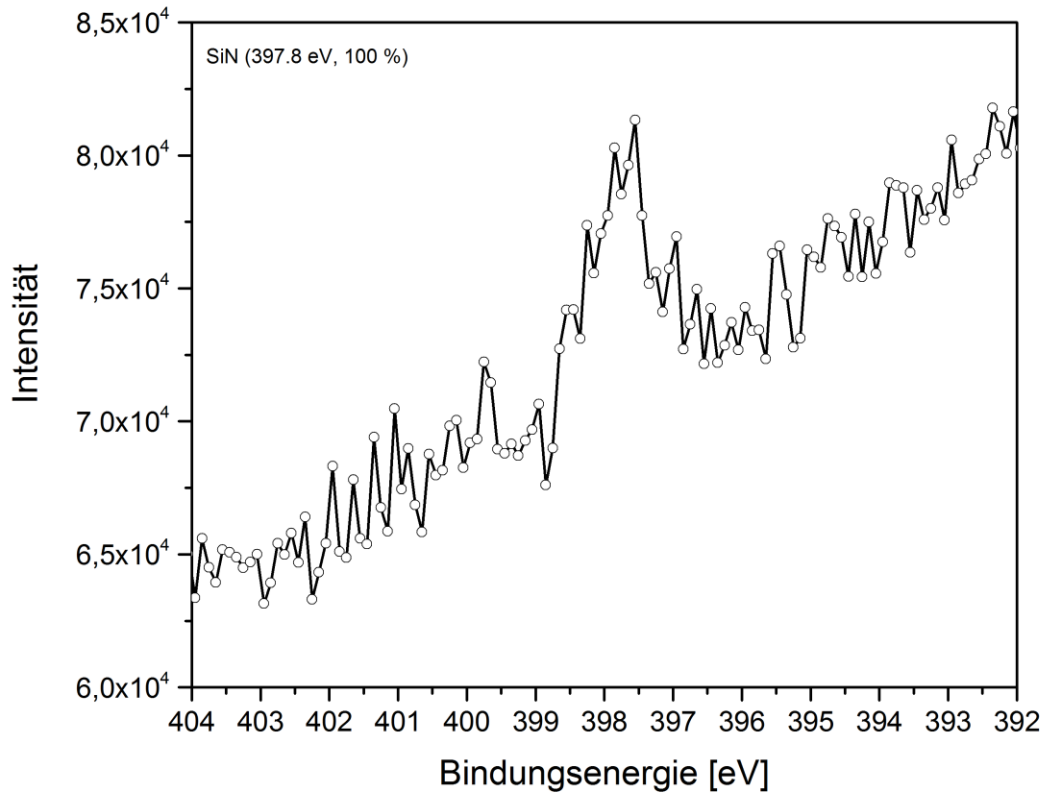


Abbildung 93: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

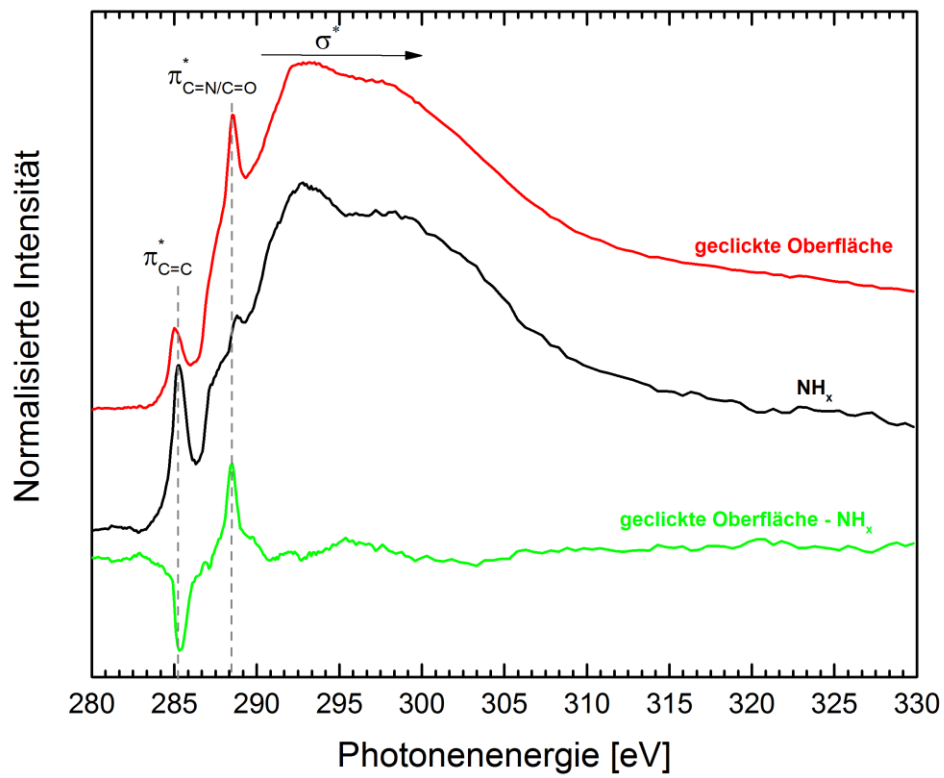


Abbildung 94: C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclckten Si_3N_4 -Oberflächen.

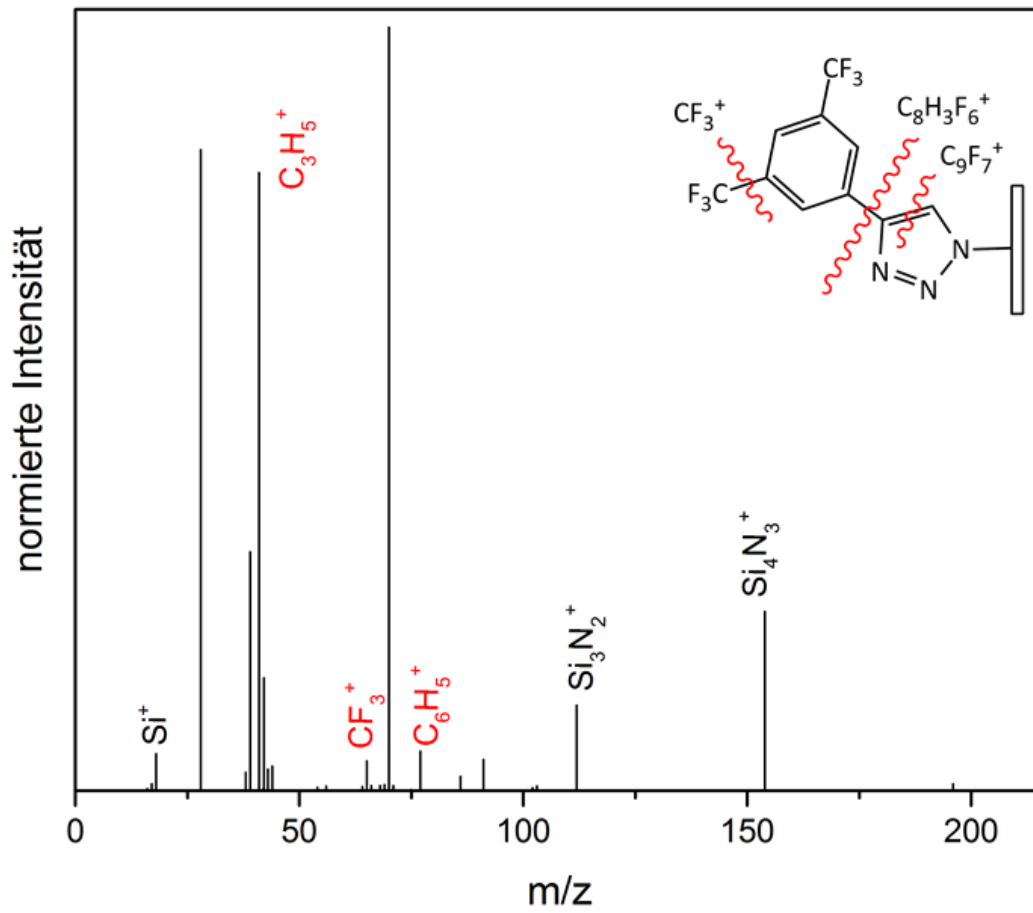


Abbildung 95: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN₃ in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si₃N₄-Oberflächen.

7.6. Azidierung mit Natriumazid mit *tert*-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC in *tert*-Butanol/Wasser

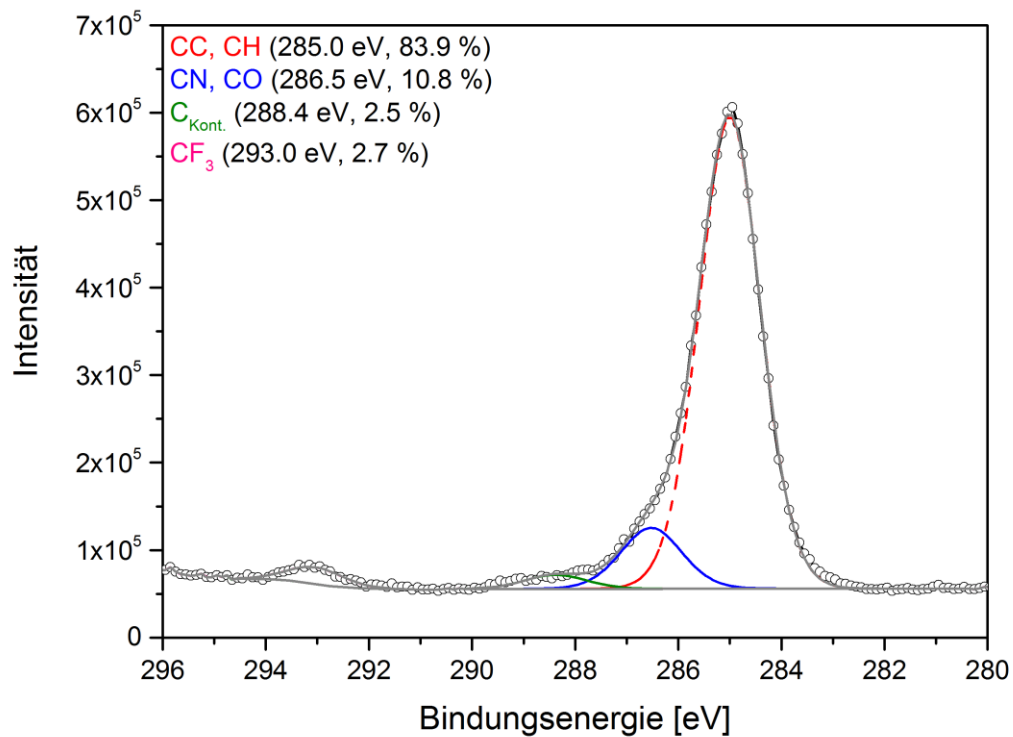
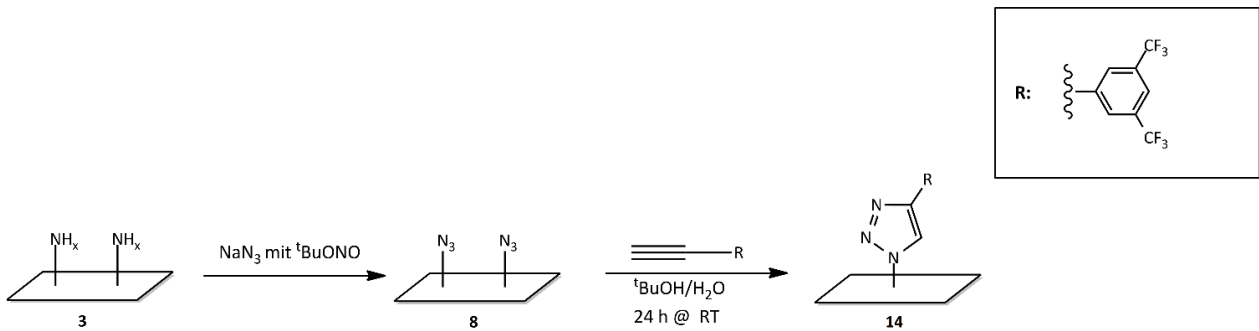


Abbildung 96: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN₃ in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geklickten Si₃N₄-Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

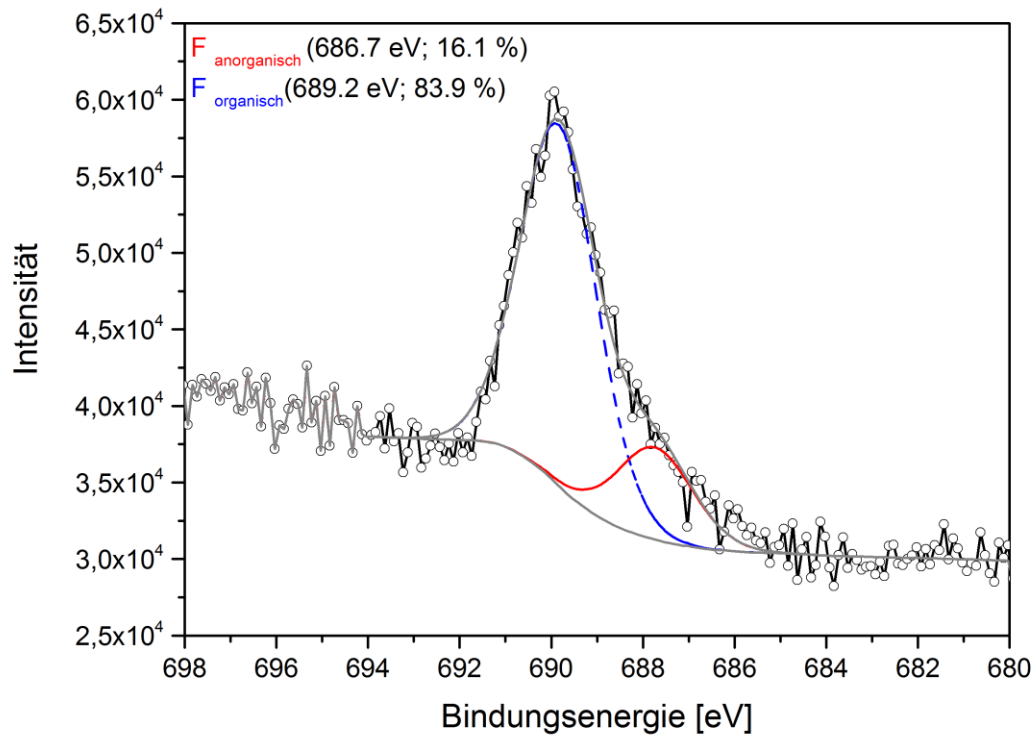


Abbildung 97: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).

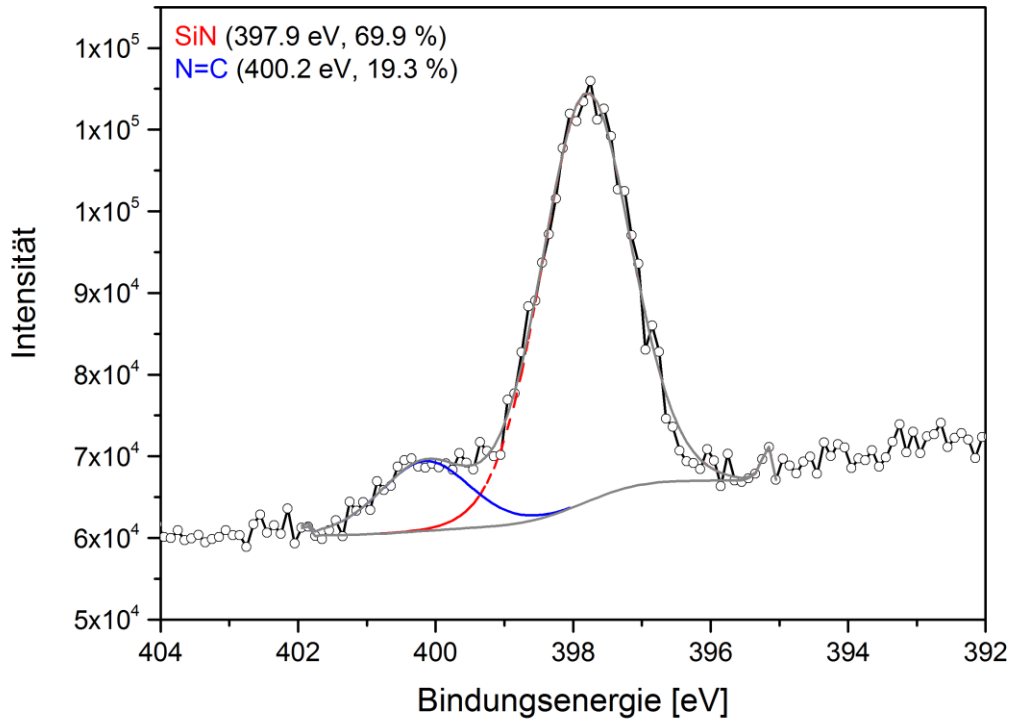


Abbildung 98: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser gedickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

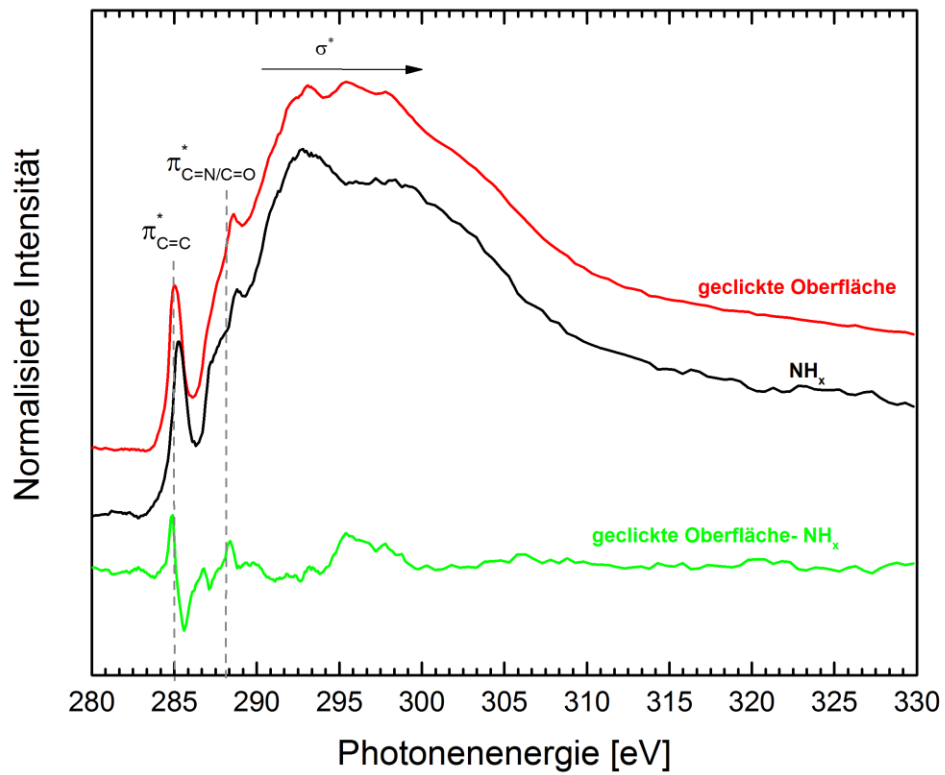


Abbildung 99: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.

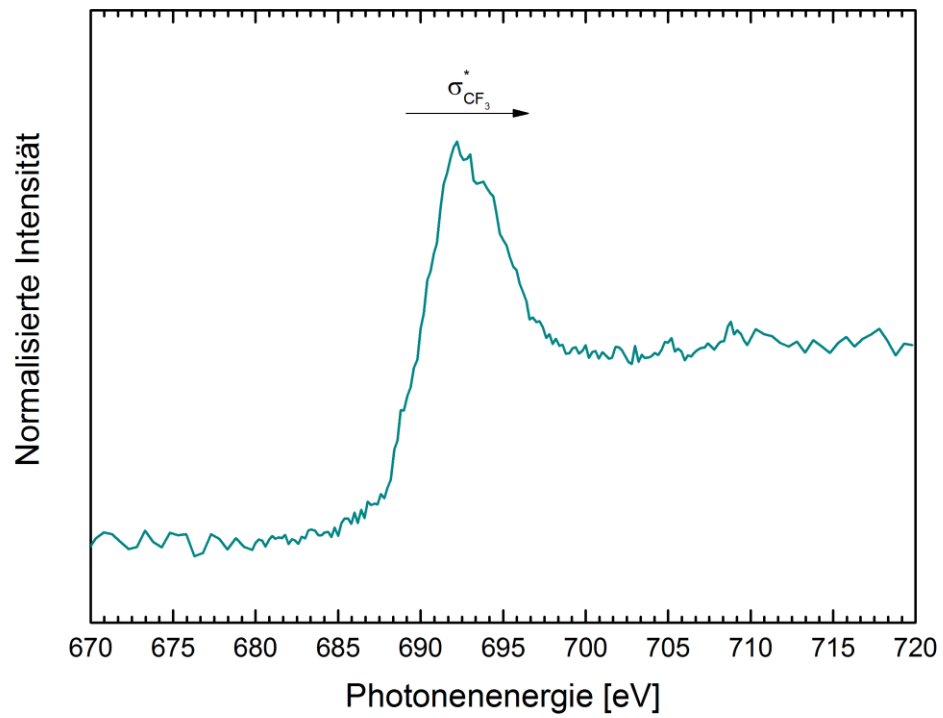


Abbildung 100: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclackten Si_3N_4 -Oberflächen.

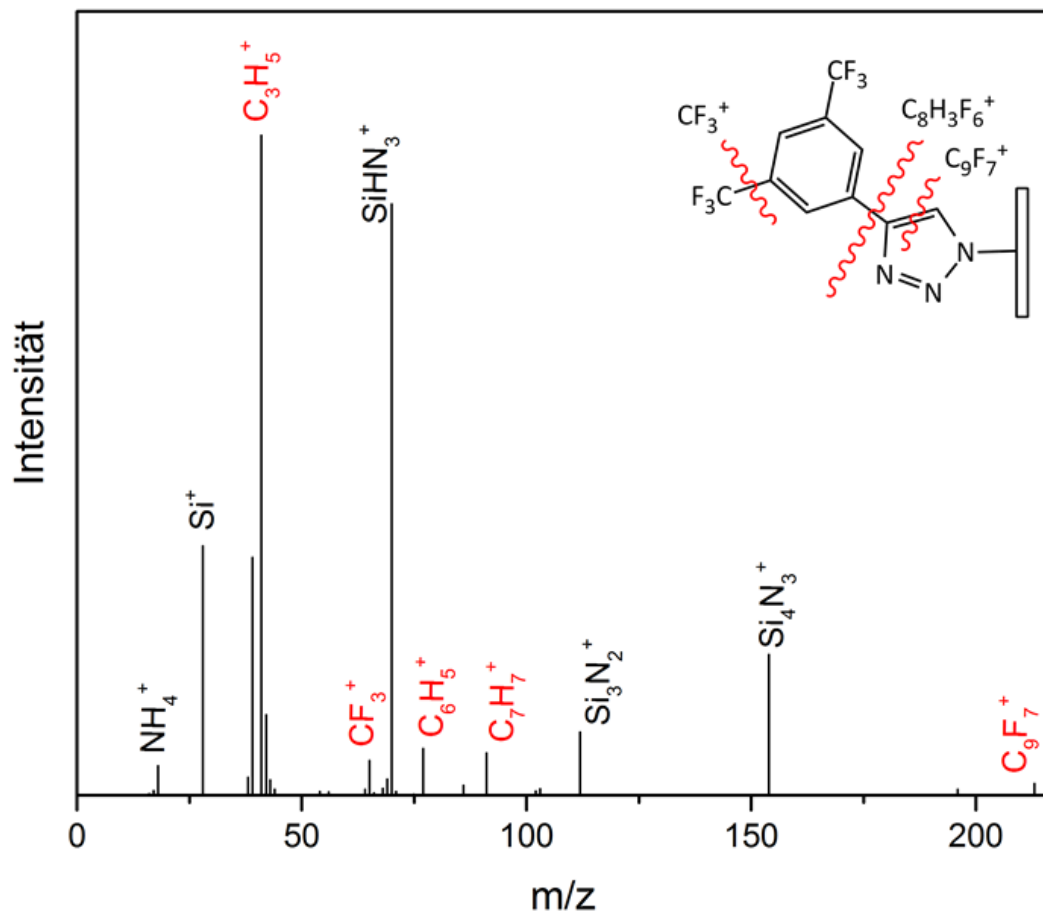


Abbildung 101: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 in Anwesenheit von *tert*-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in *tert*-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.

7.7. Negativkontrolle (BHF+CuAAC)

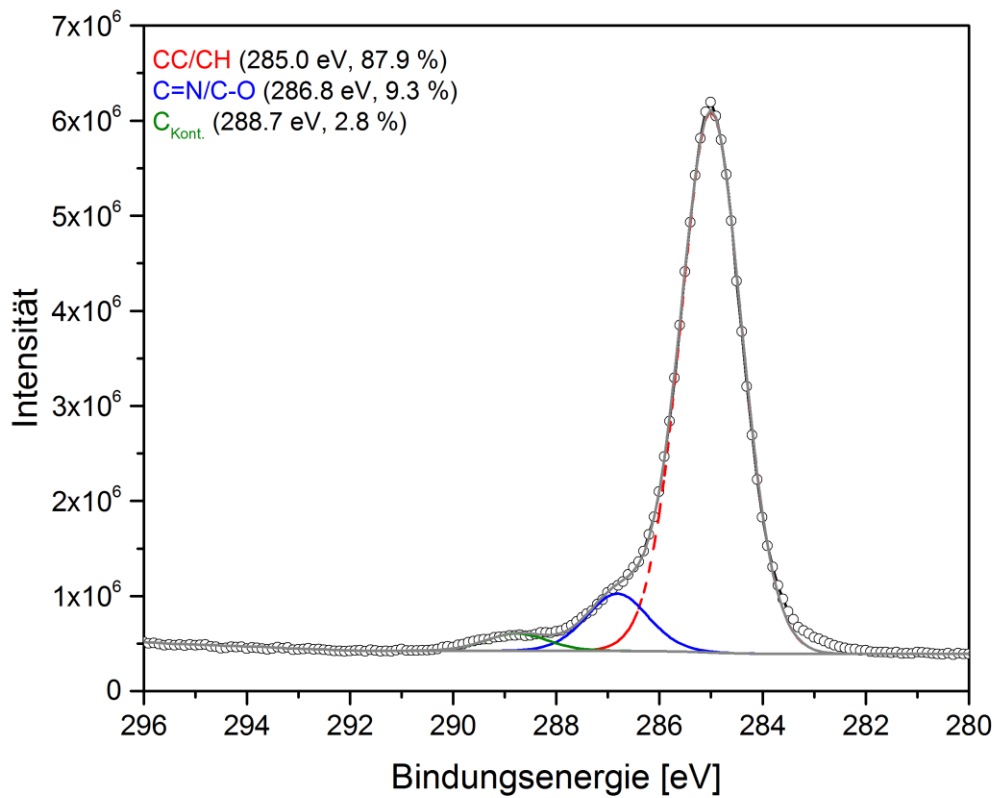
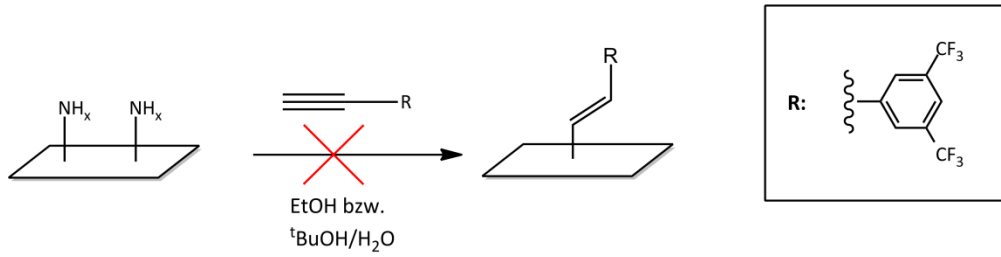


Abbildung 102: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol geklickten Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Azidierung (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

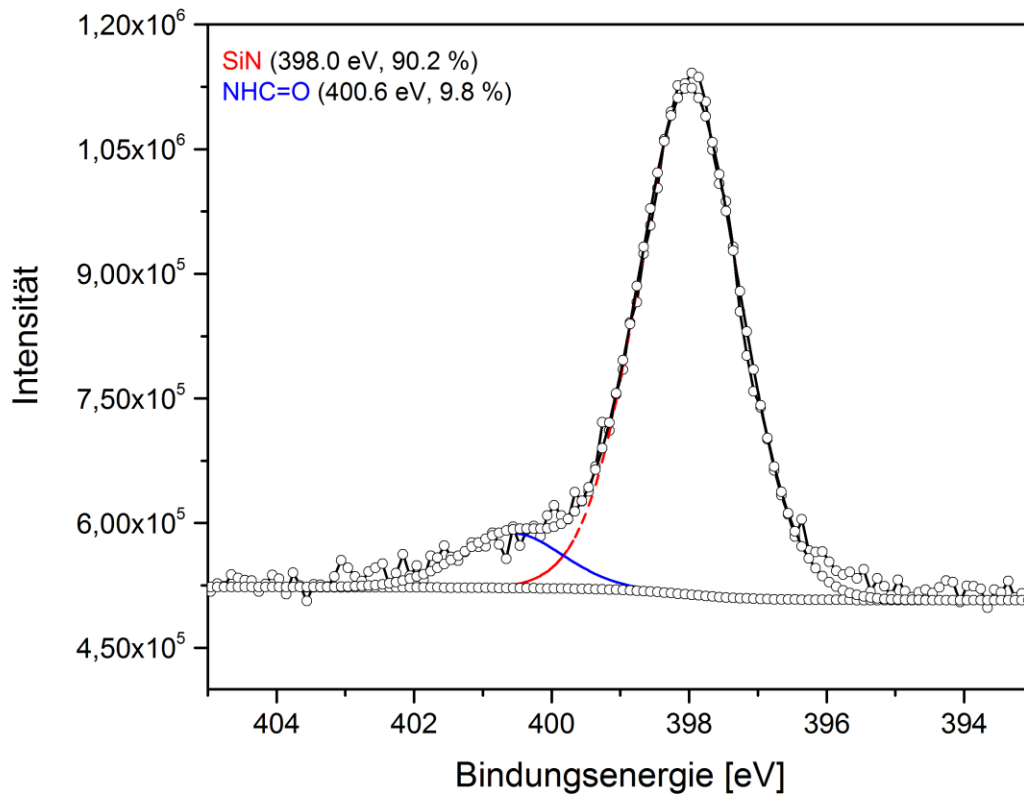


Abbildung 103: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol geclickten Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

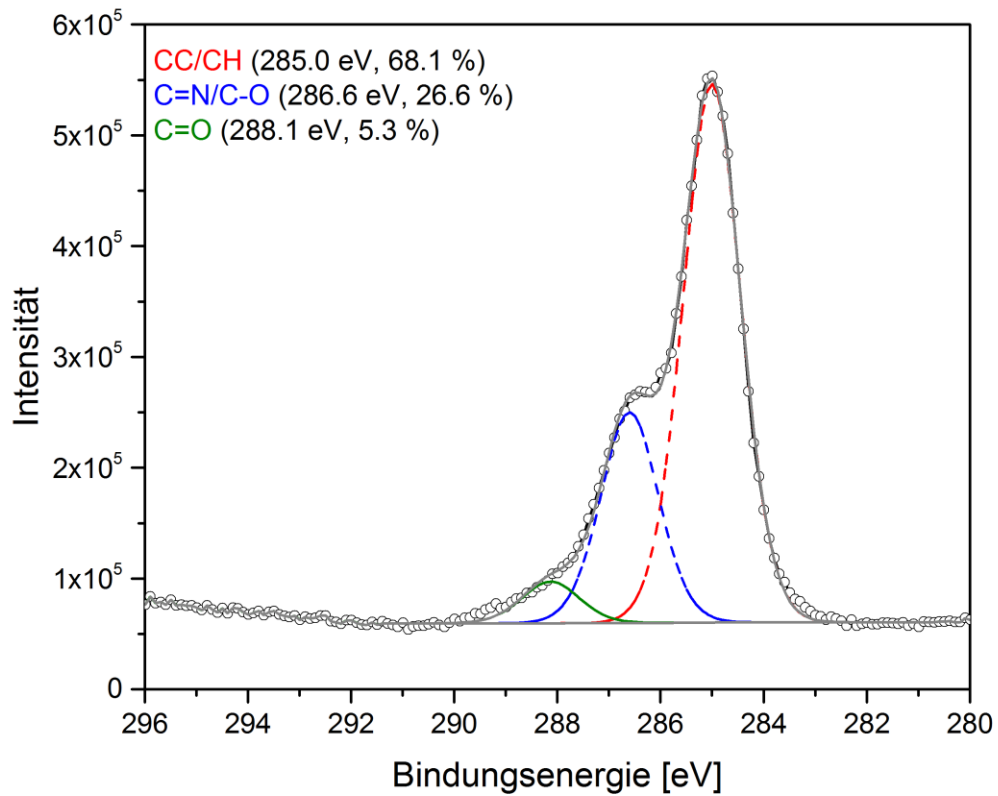


Abbildung 105: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

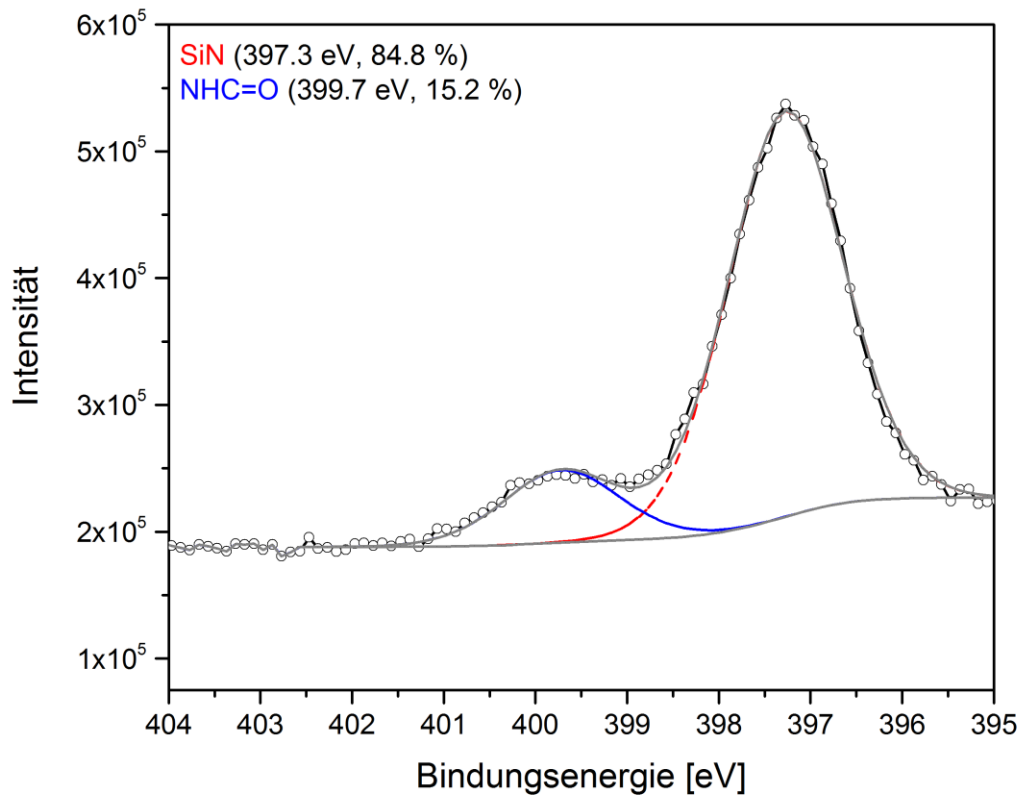


Abbildung 106: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

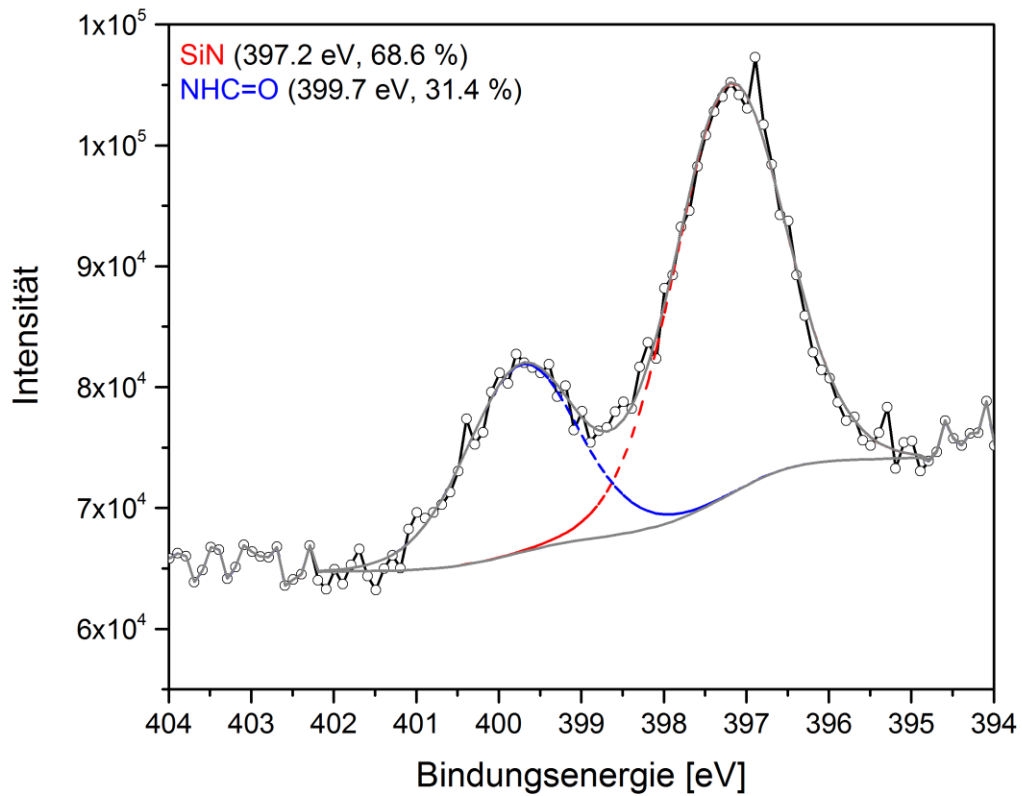


Abbildung 107: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

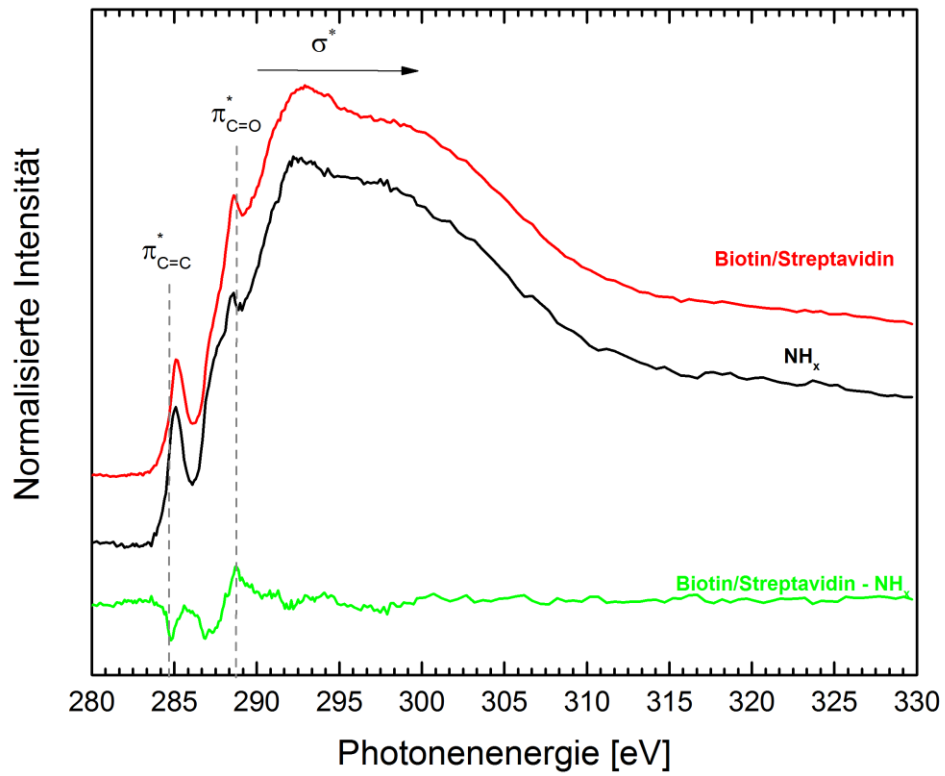


Abbildung 108: NEXAFS C K-Kante C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

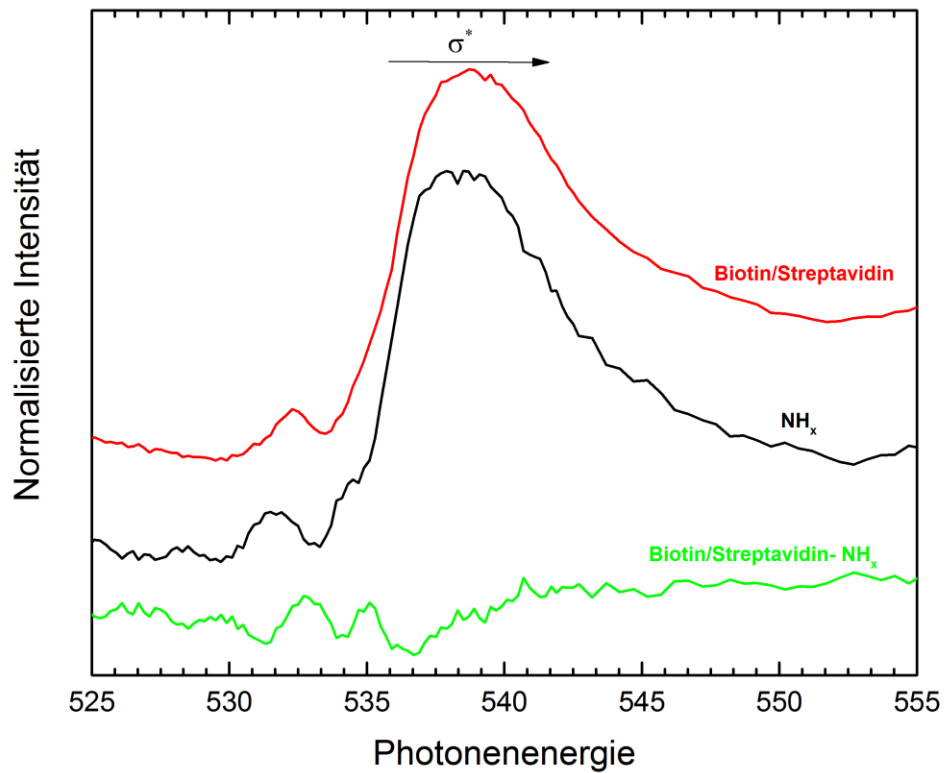


Abbildung 109: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

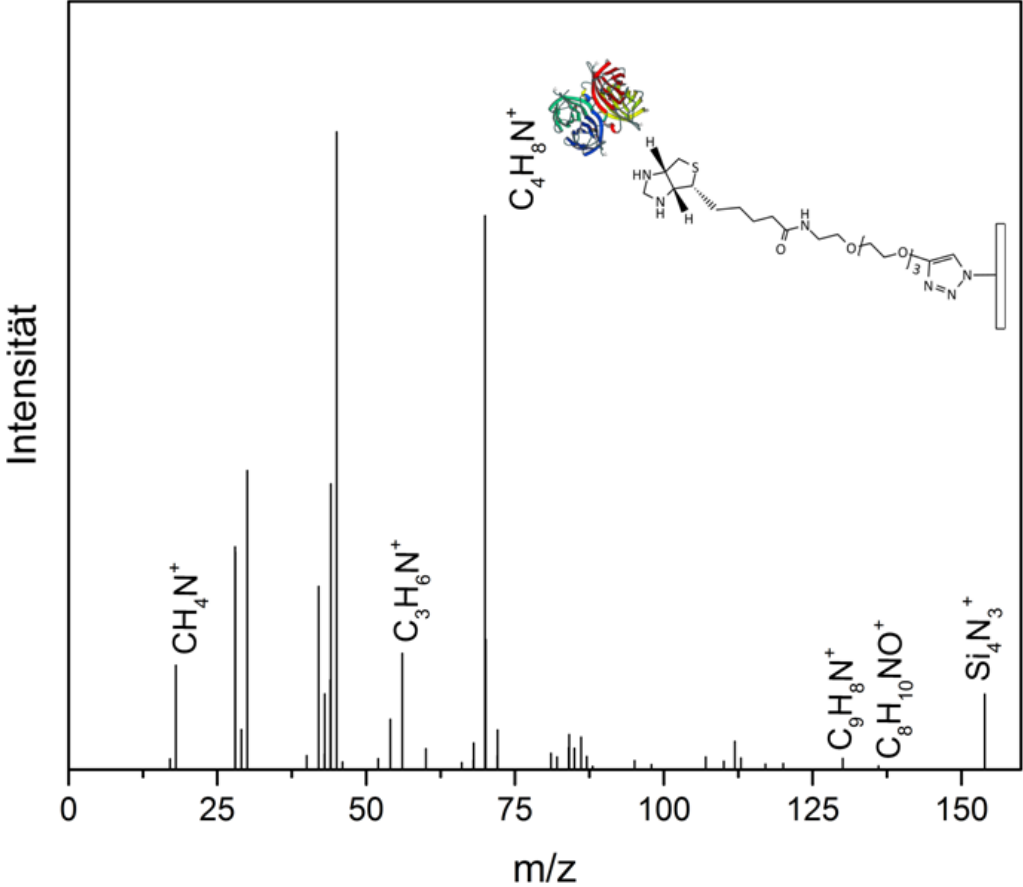


Abbildung 110: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen.

7.9. Azidierung mit Natriumazid (Prozess A) und CuAAC mit Biotin in DMF und Interaktion mit Streptavidin

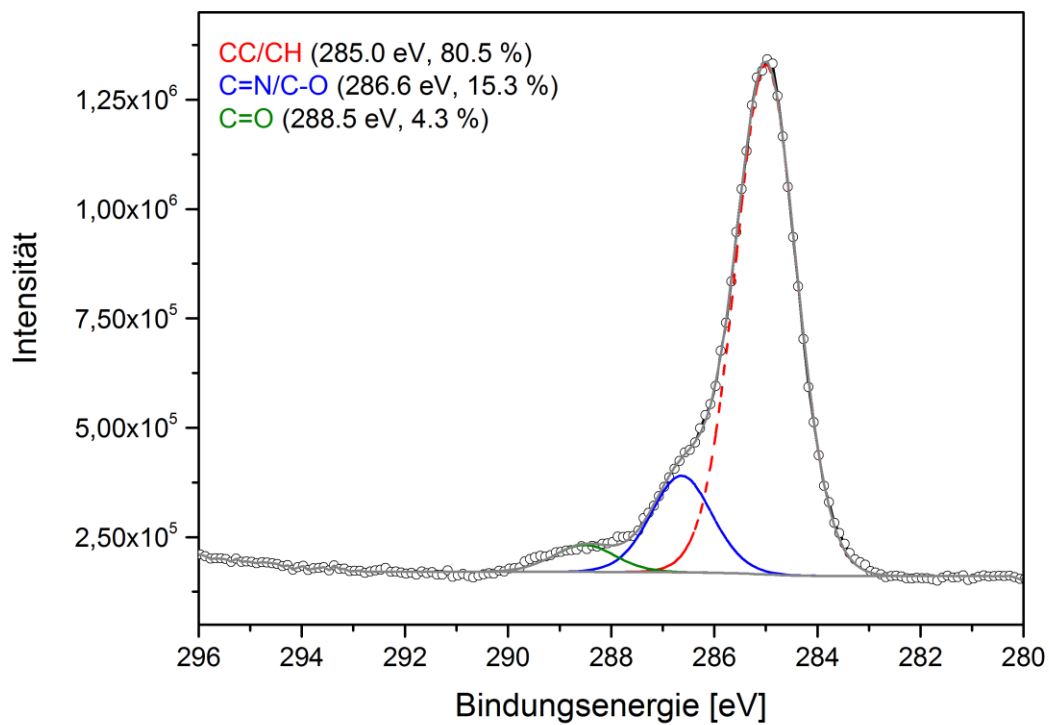
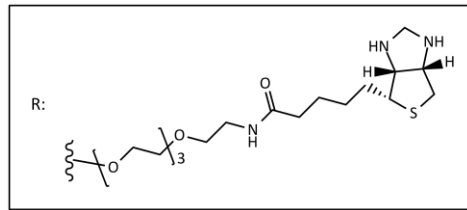
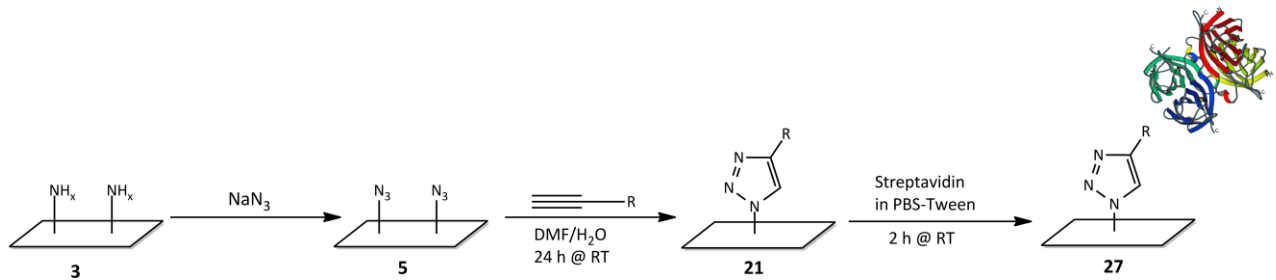


Abbildung 111: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

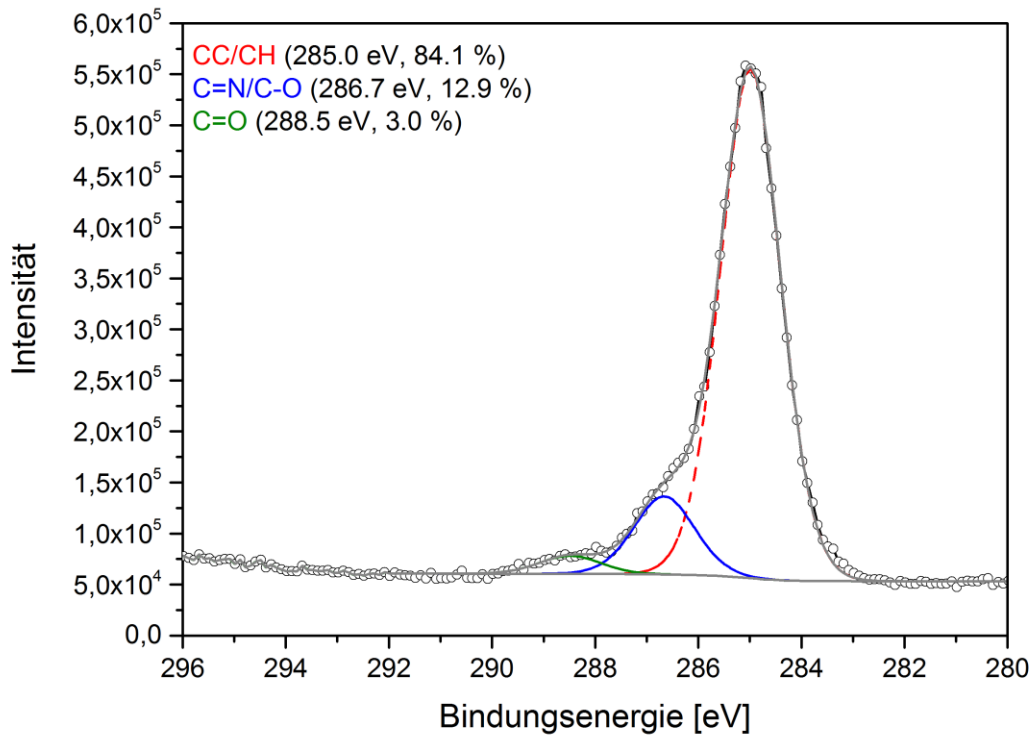


Abbildung 112: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

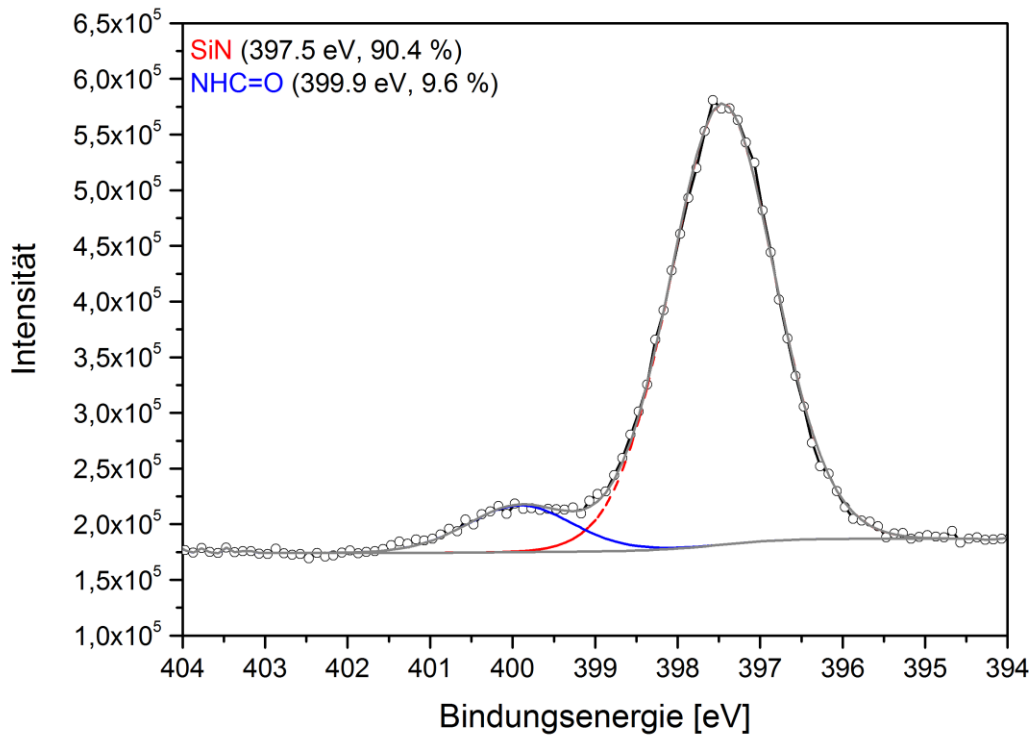


Abbildung 113: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

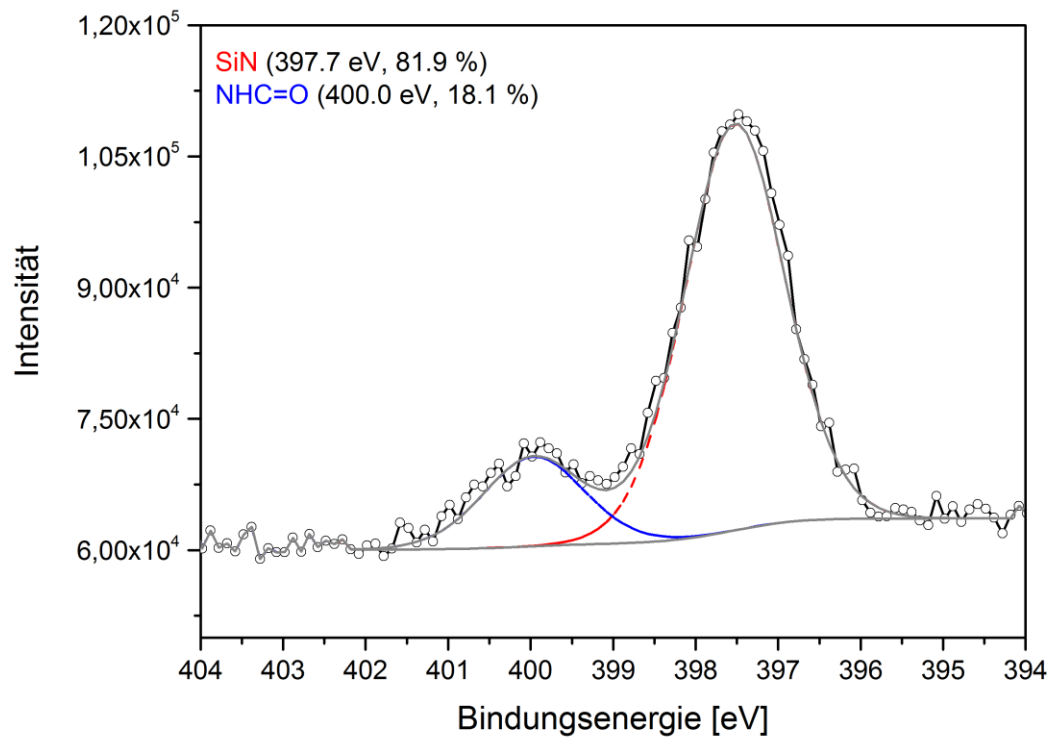


Abbildung 114: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

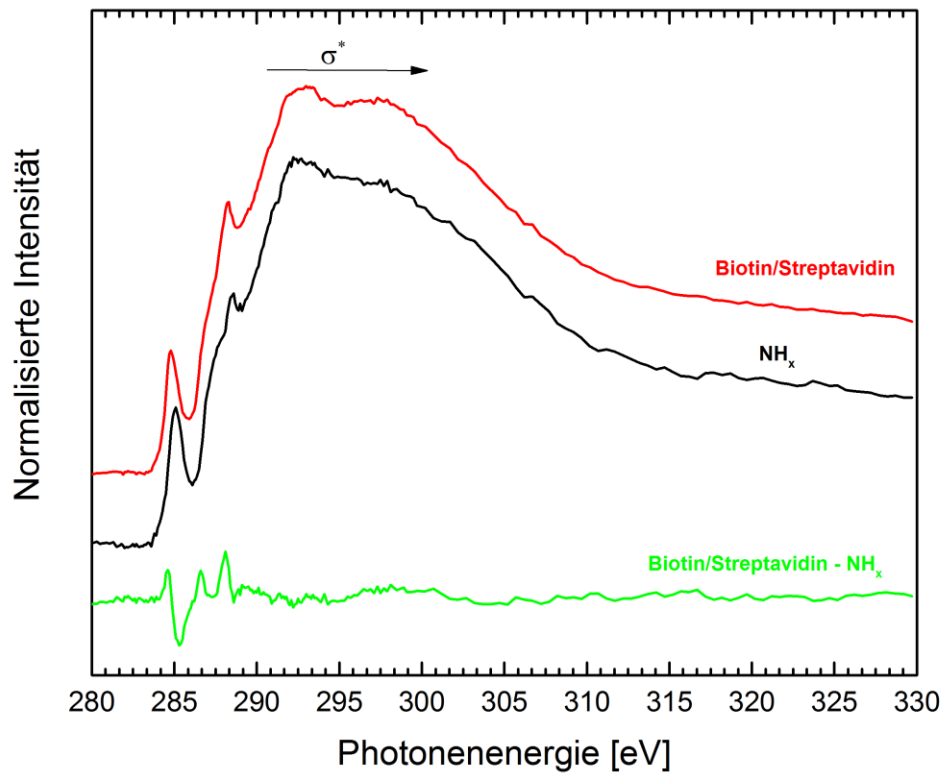


Abbildung 115: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

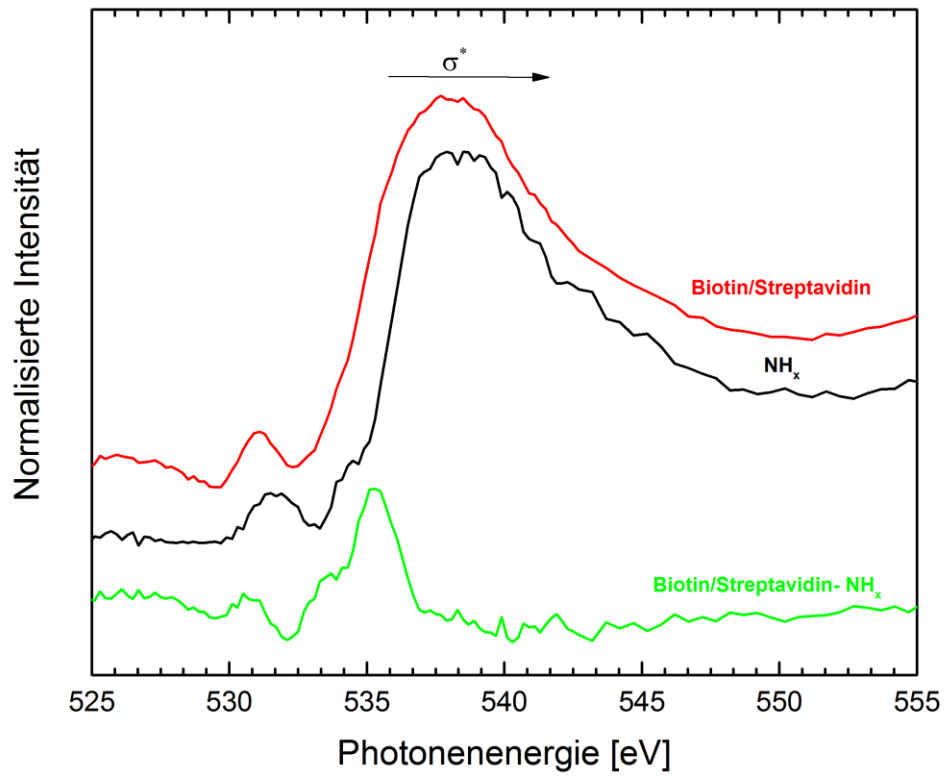


Abbildung 116: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

7.10. Azidierung mit Natriumazid mit *tert*-Butylnitrit (Prozess D) und CuAAC mit Biotin in Methanol und Interaktion mit Streptavidin

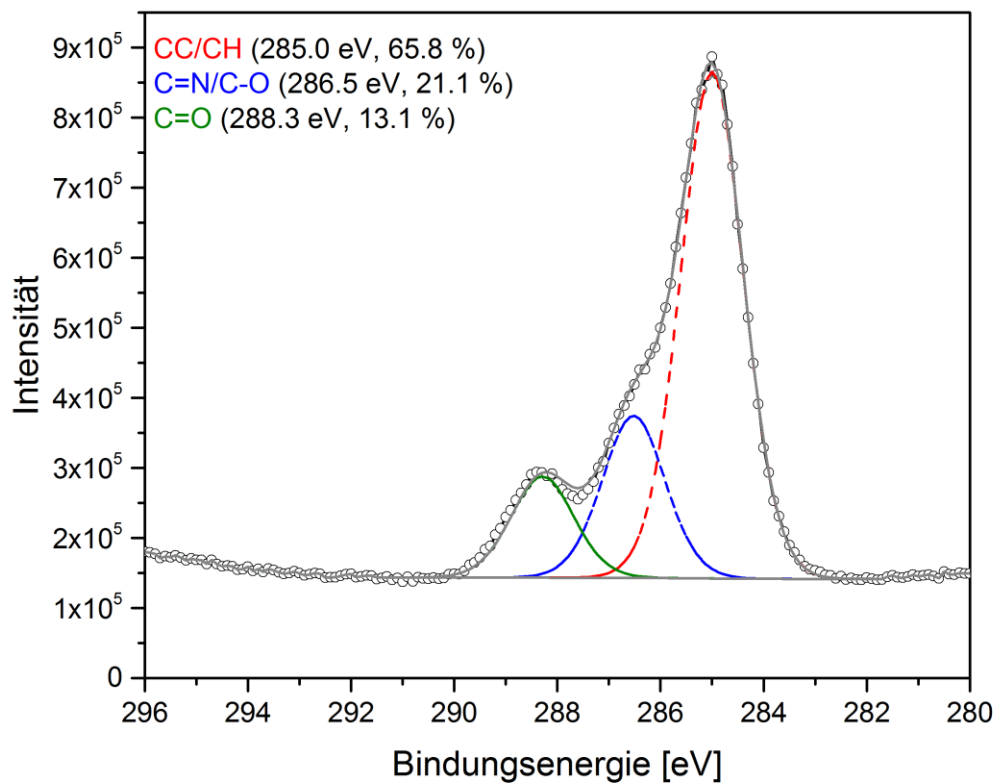
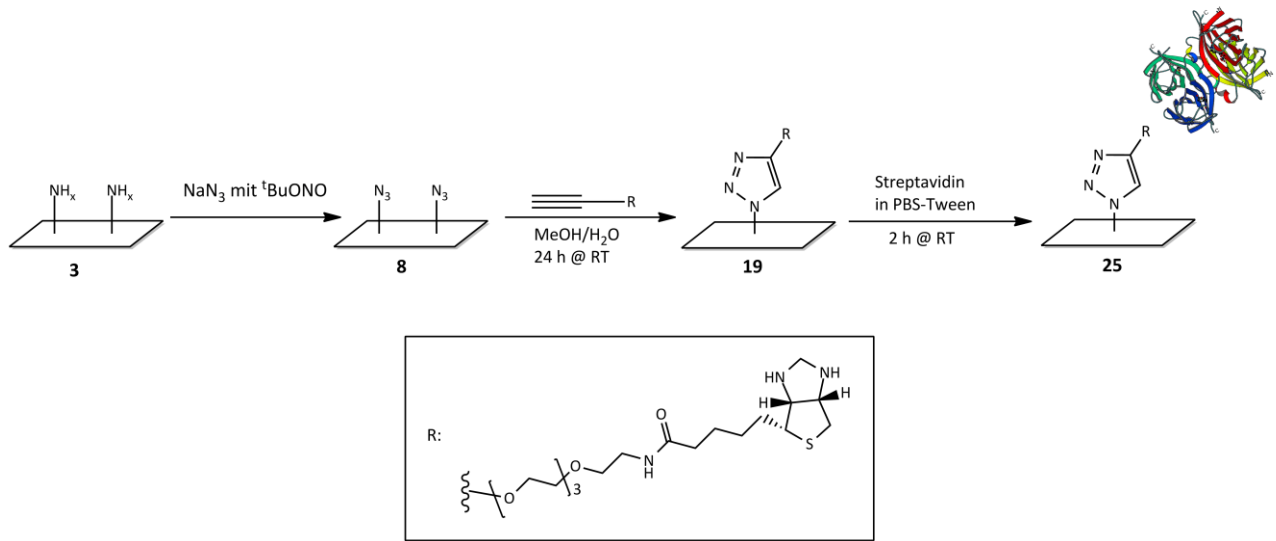


Abbildung 117: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

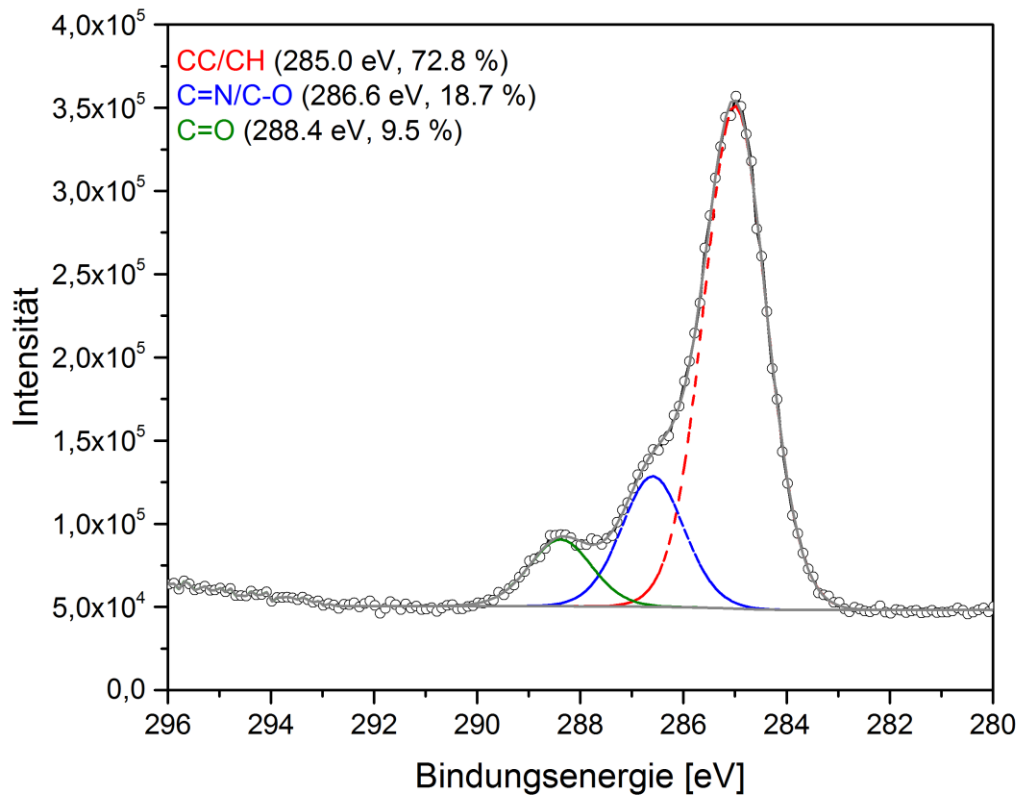


Abbildung 118: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN₃ in Anwesenheit von ^tBuONO azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

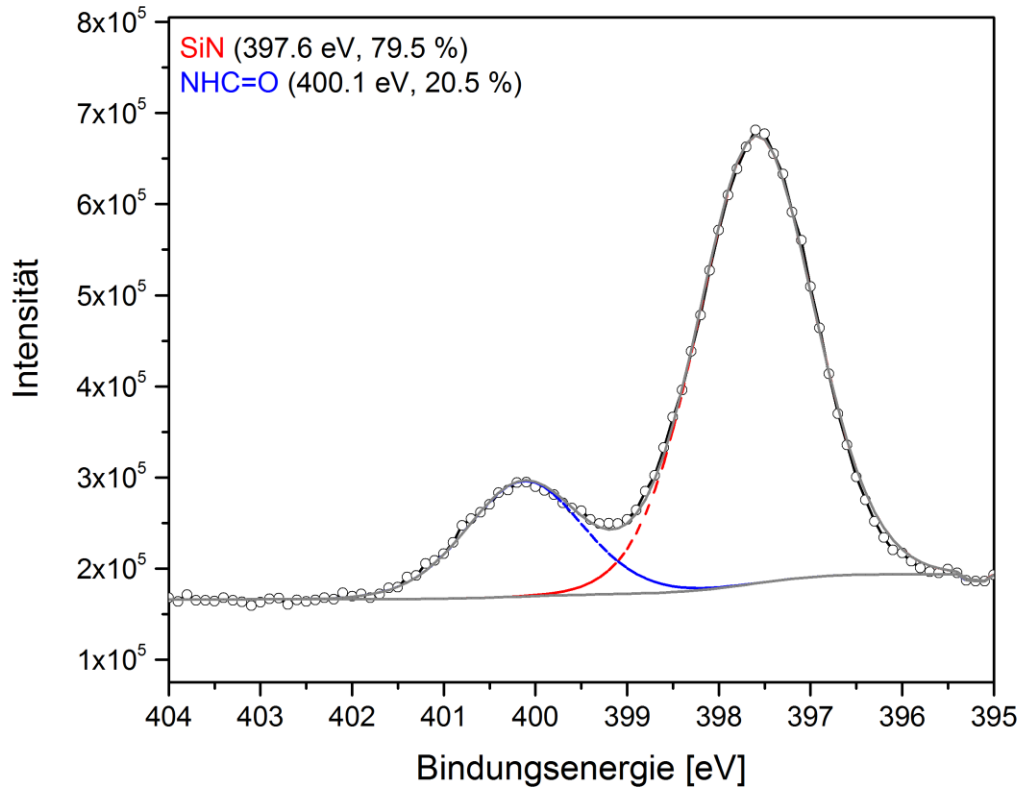


Abbildung 119: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

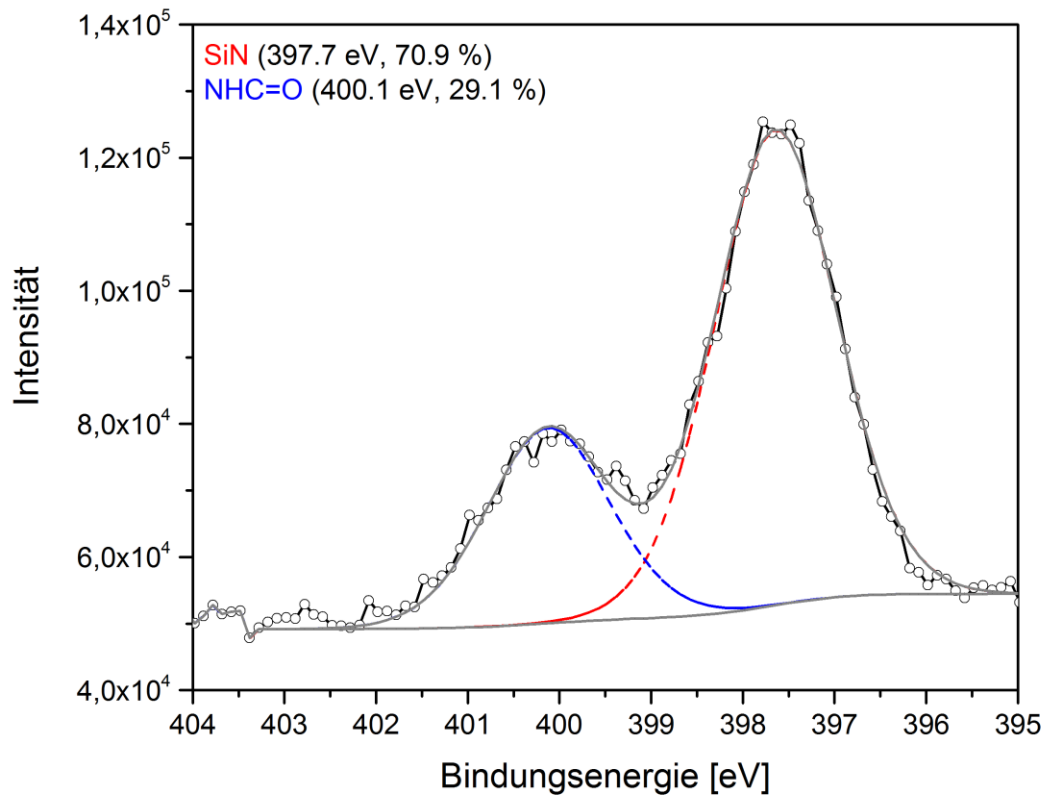


Abbildung 120: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

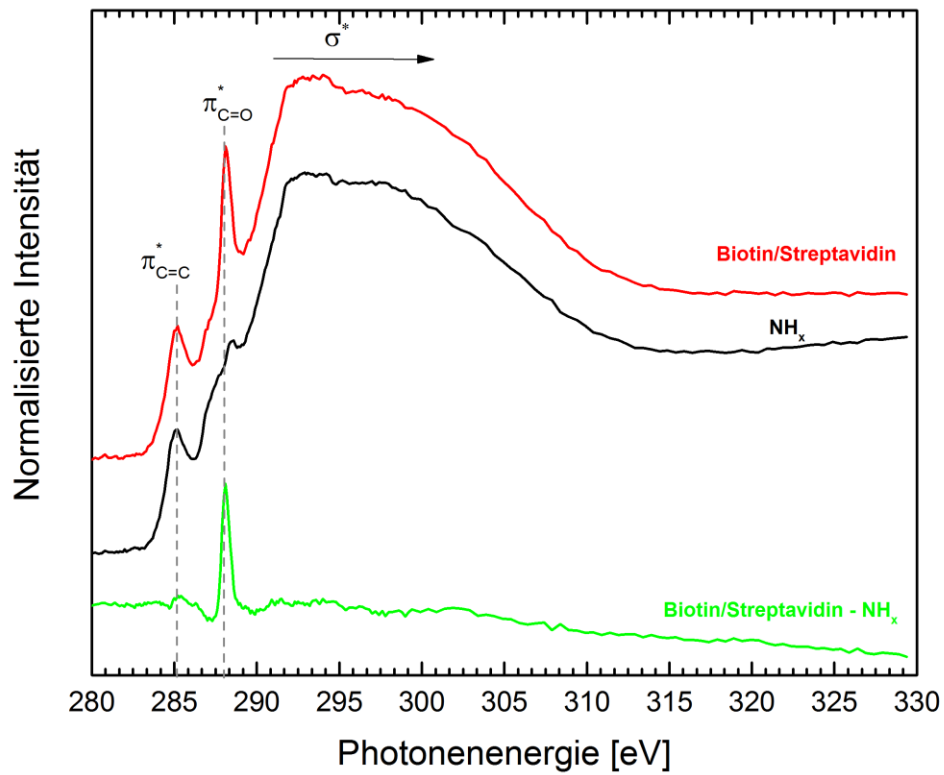


Abbildung 121: NEXAFS C K-Kante mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol gedickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

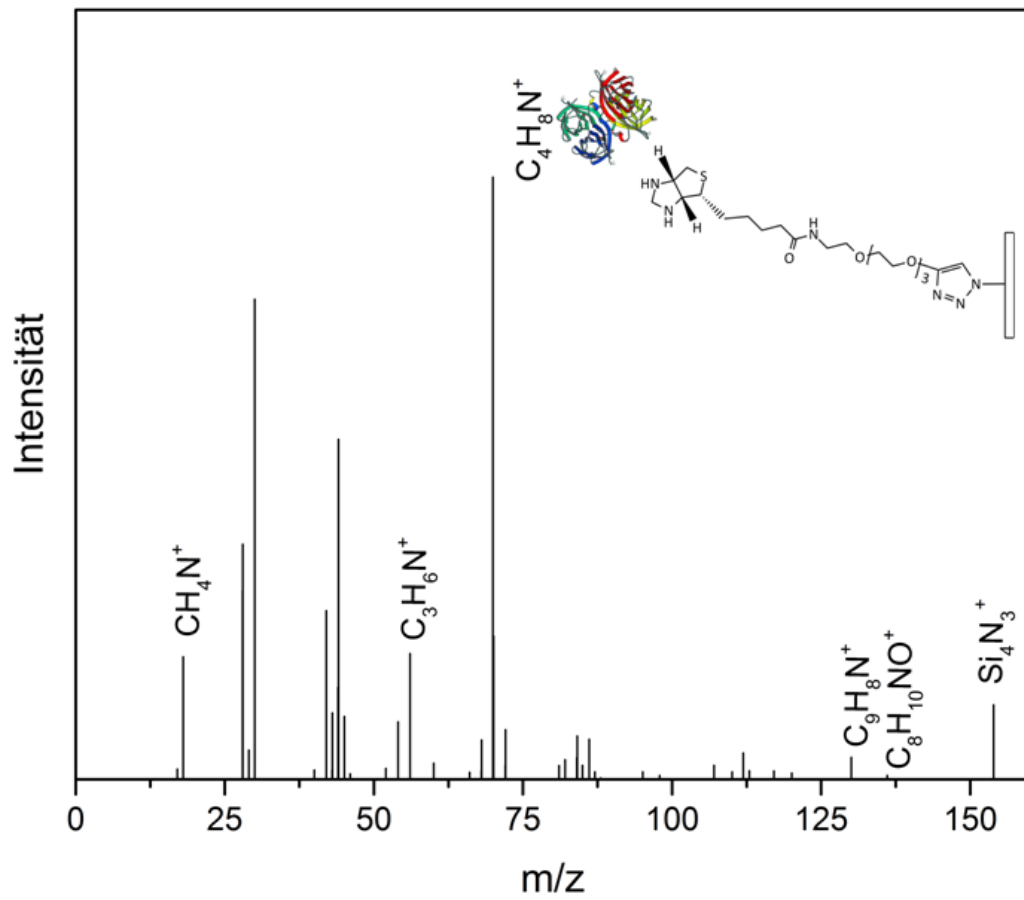


Abbildung 122: ToF-SIMS-Massenspektrum mit NaN_3 in Anwesenheit von 1BuONO azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche.

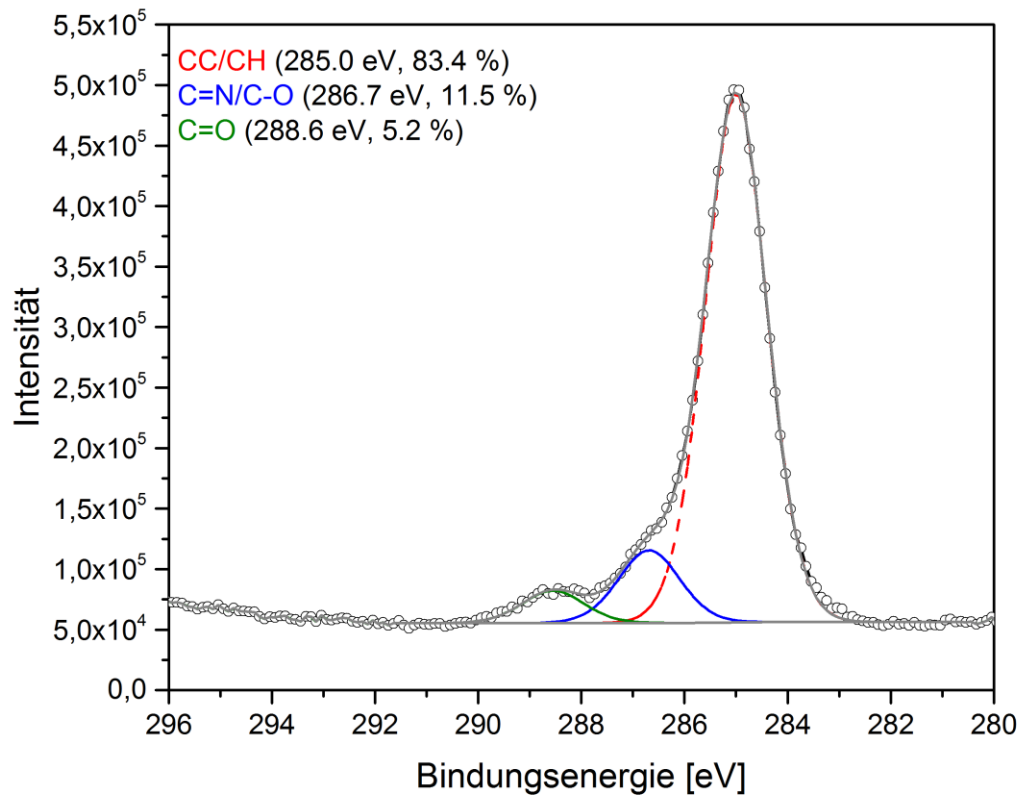


Abbildung 124: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN₃ in Anwesenheit von ^tBuONO azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

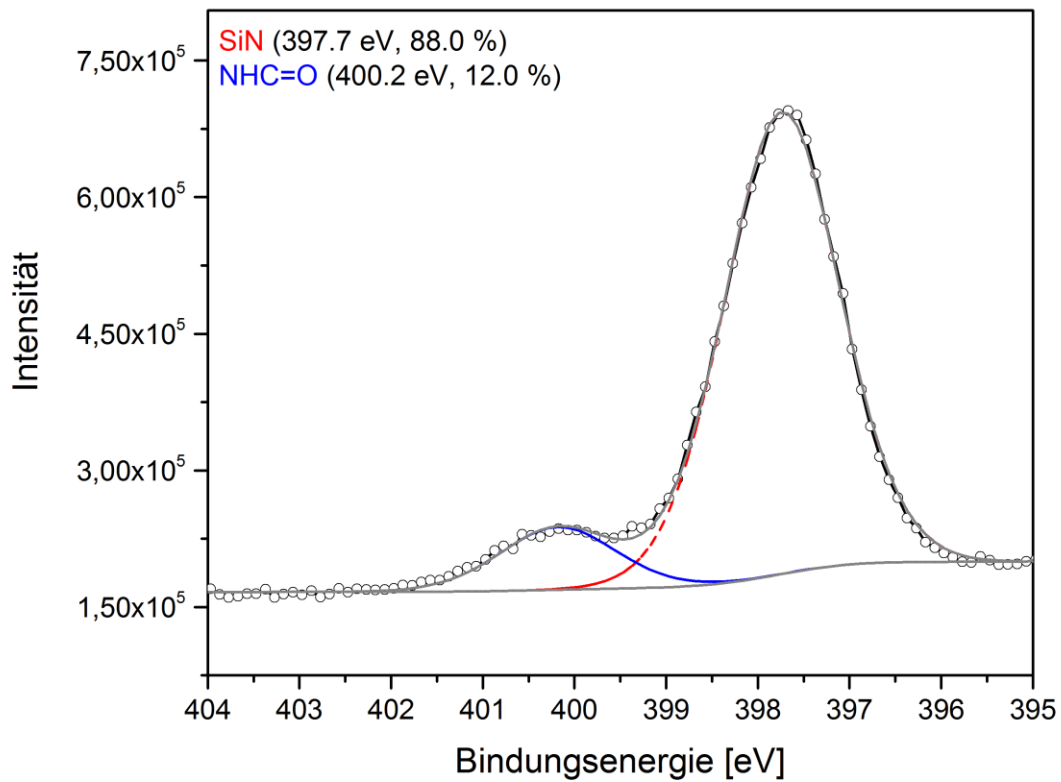


Abbildung 125: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclackten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

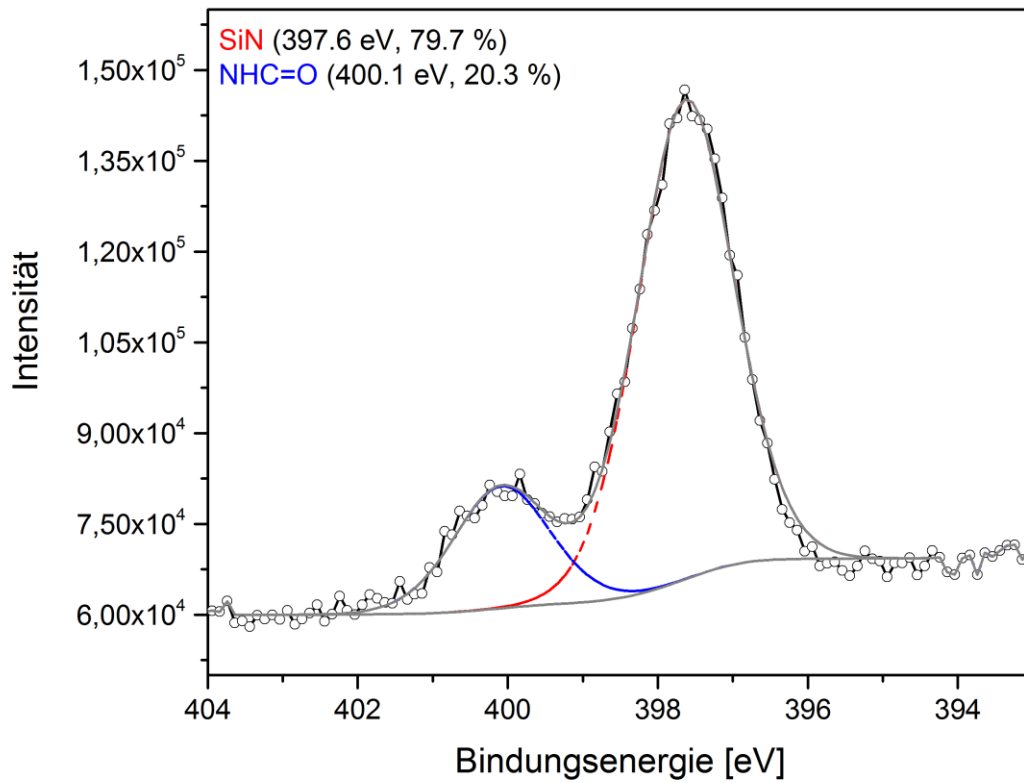


Abbildung 126: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

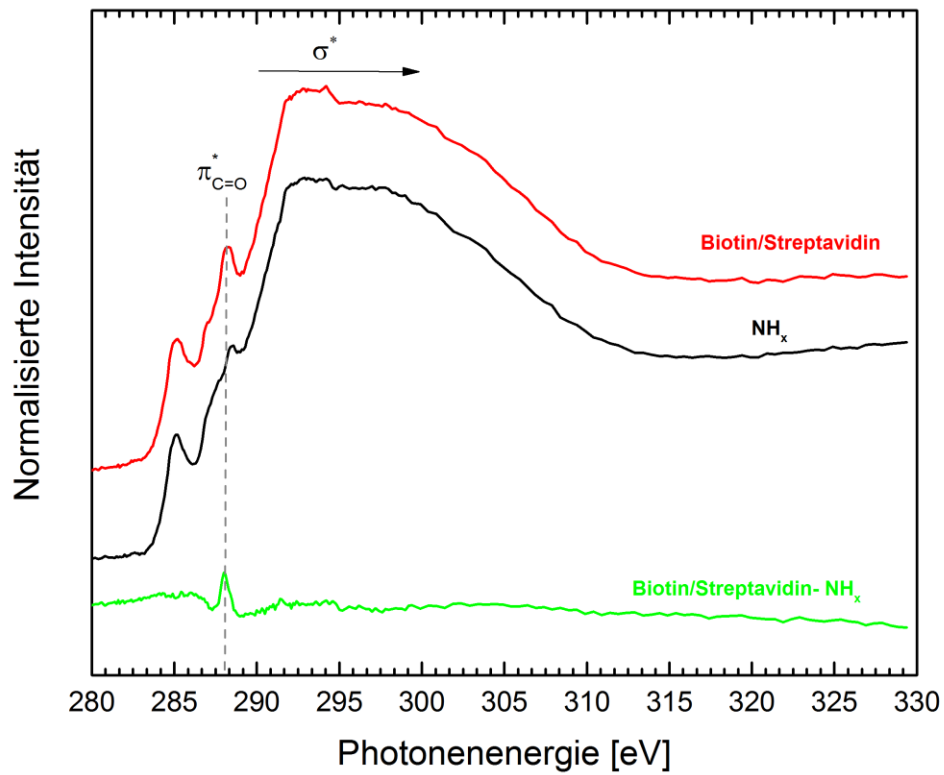


Abbildung 127: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

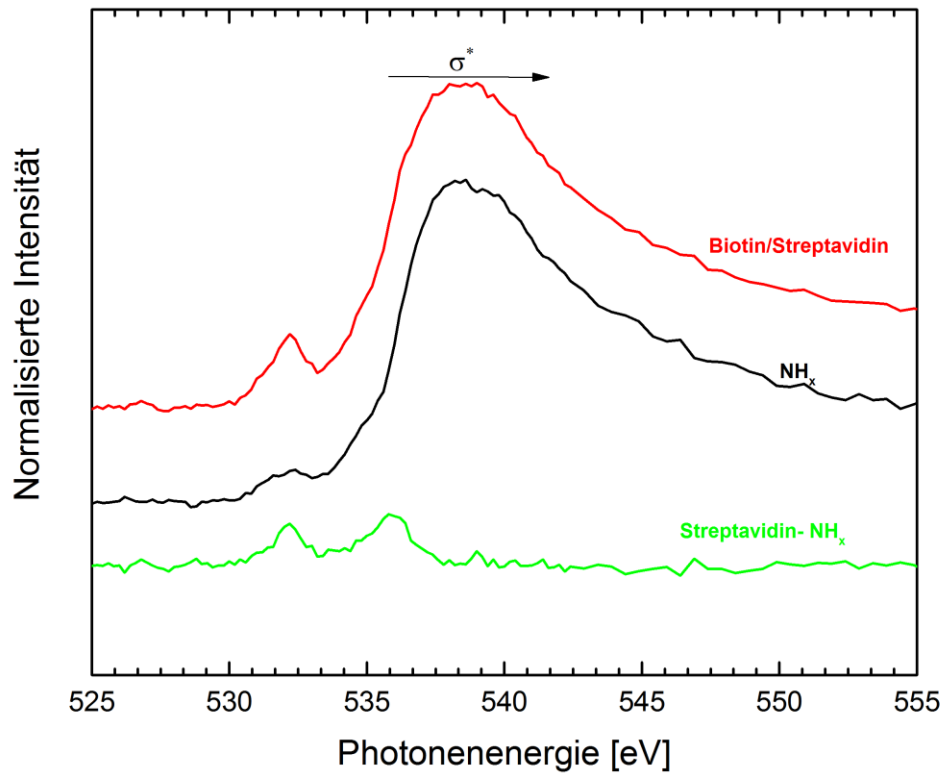


Abbildung 128: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von ${}^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

7.12. Negativkontrolle: Si-NH_x-Oberfläche inkubiert mit Streptavidin

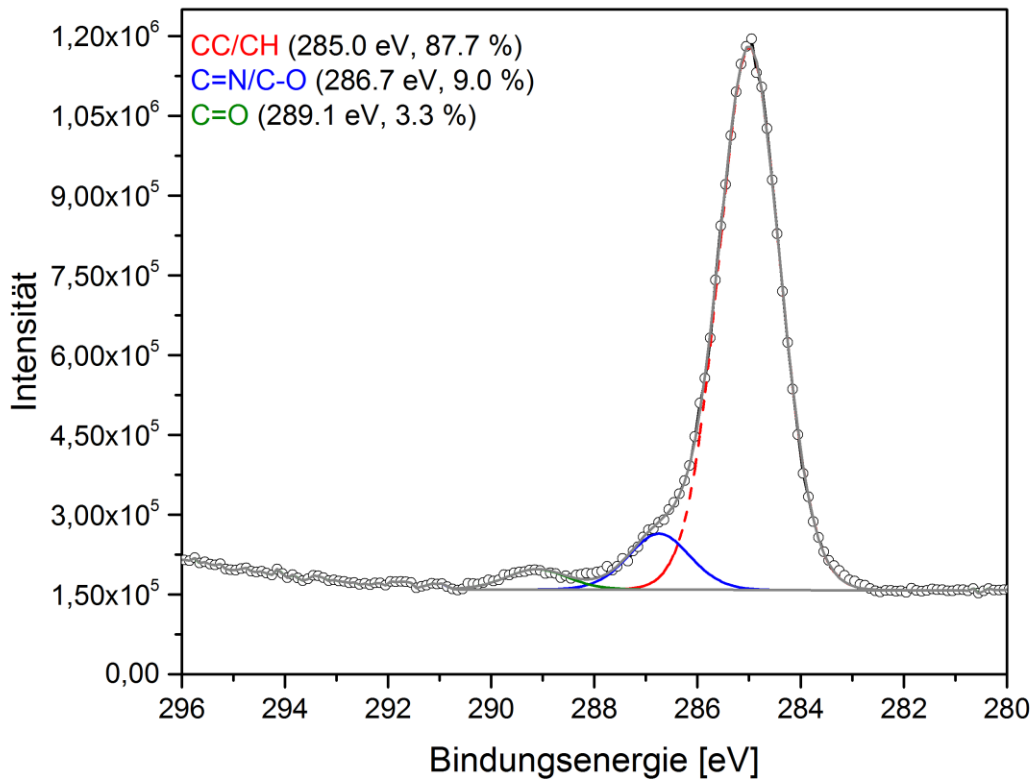
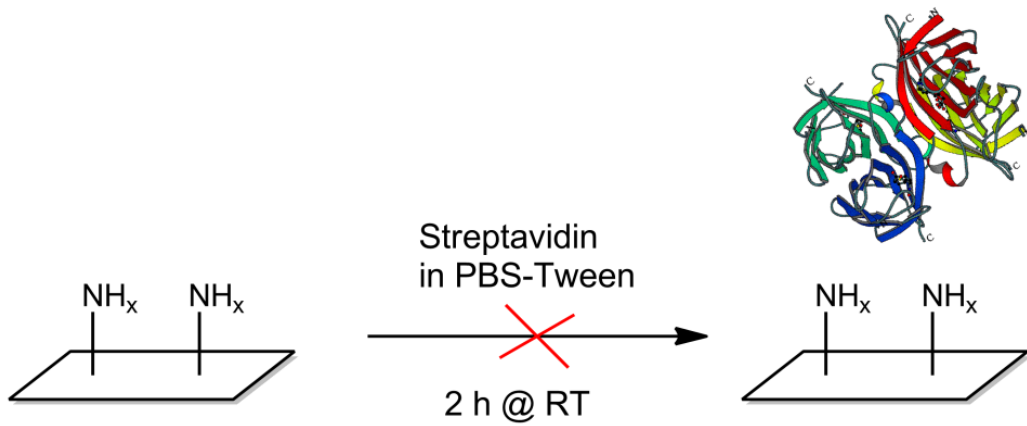


Abbildung 129: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).

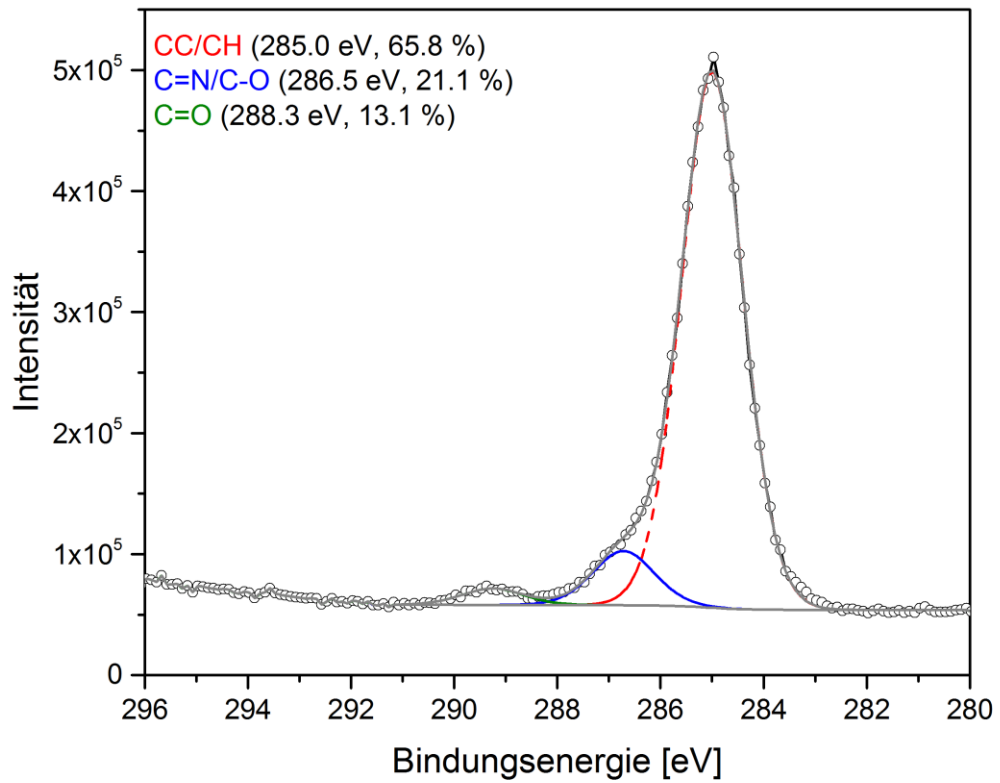


Abbildung 130: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

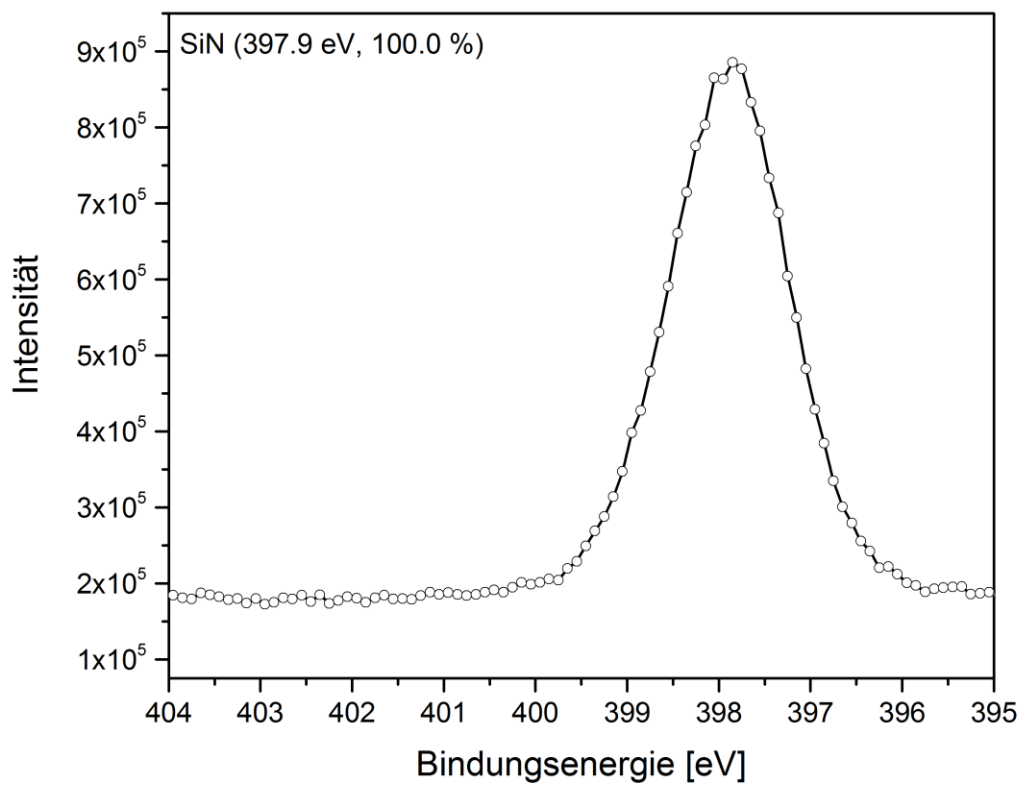


Abbildung 131: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

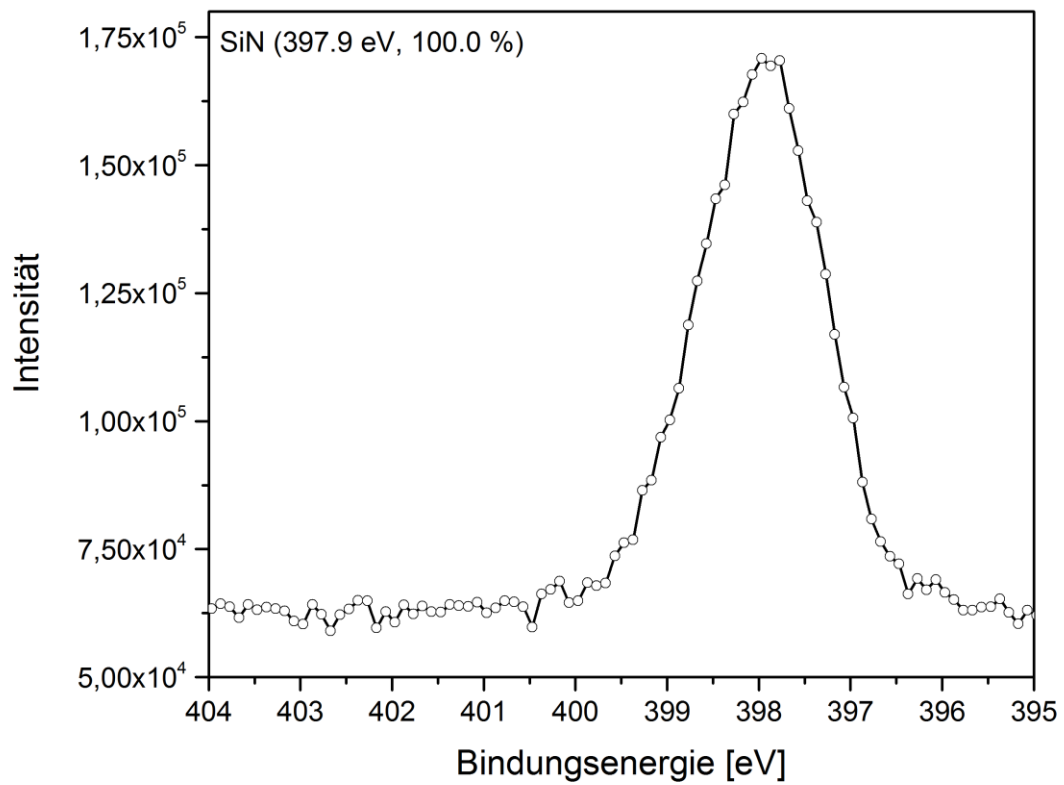


Abbildung 132: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

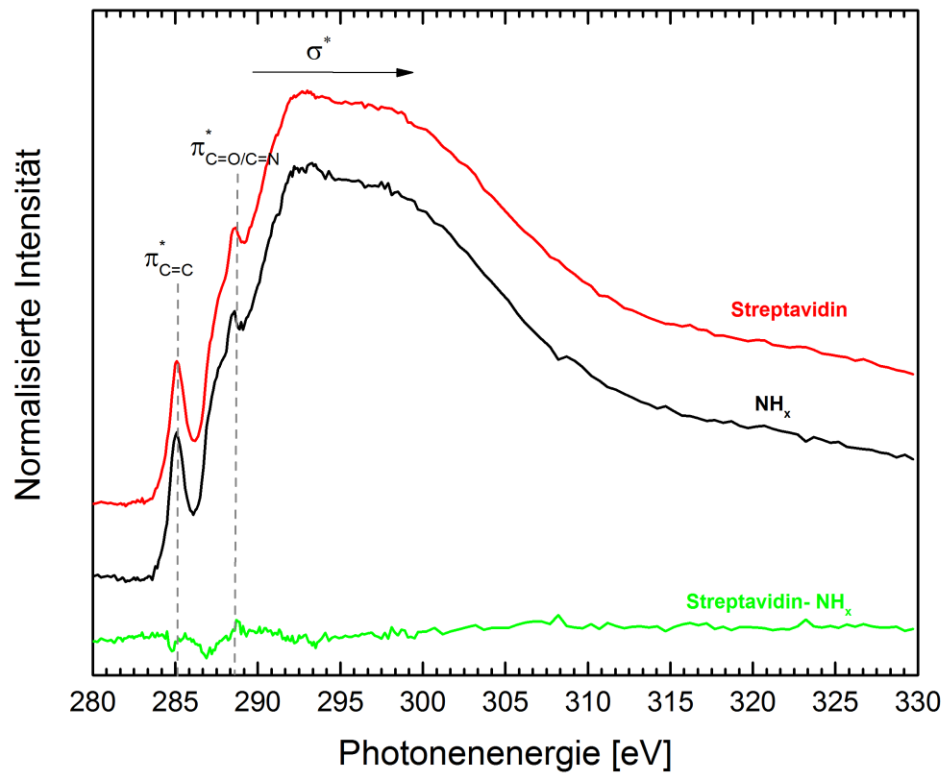


Abbildung 133: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche.

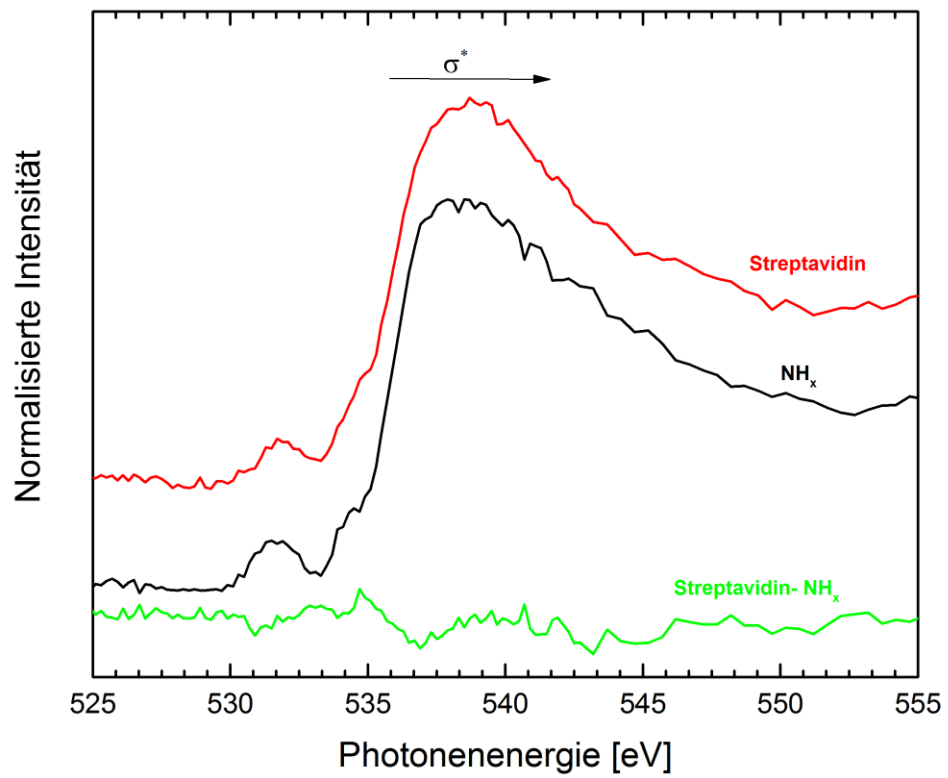


Abbildung 134: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

7.13. Negativkontrolle: Si-N₃-Oberfläche (Prozess C) inkubiert mit Streptavidin

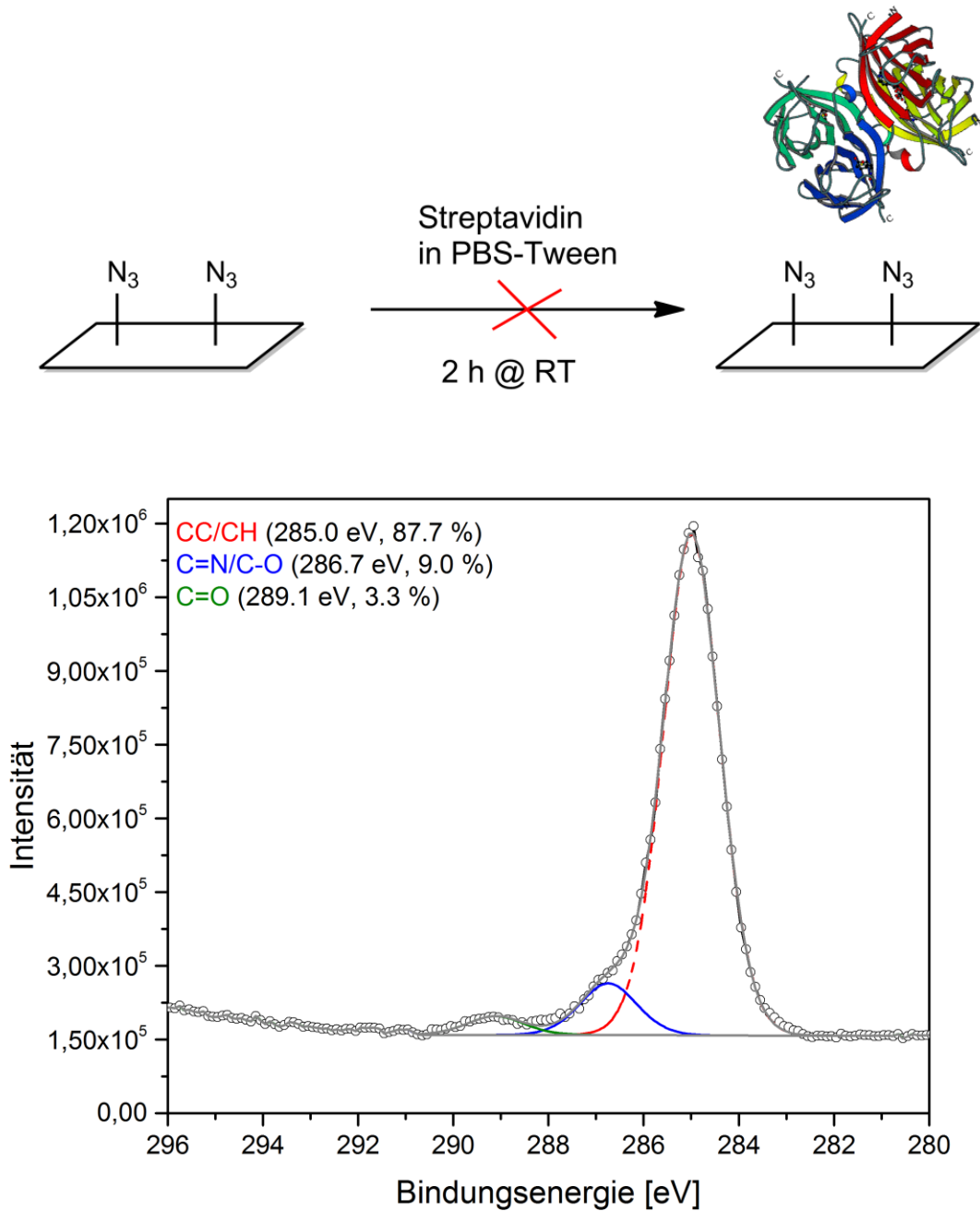


Abbildung 135: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).

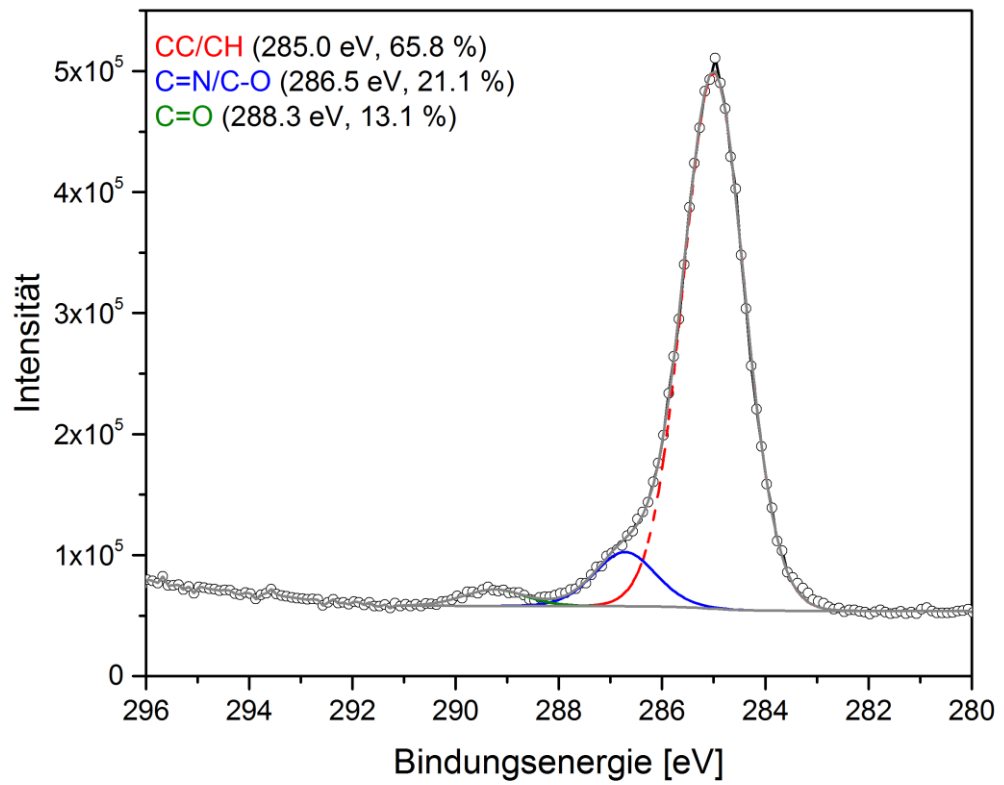


Abbildung 136: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

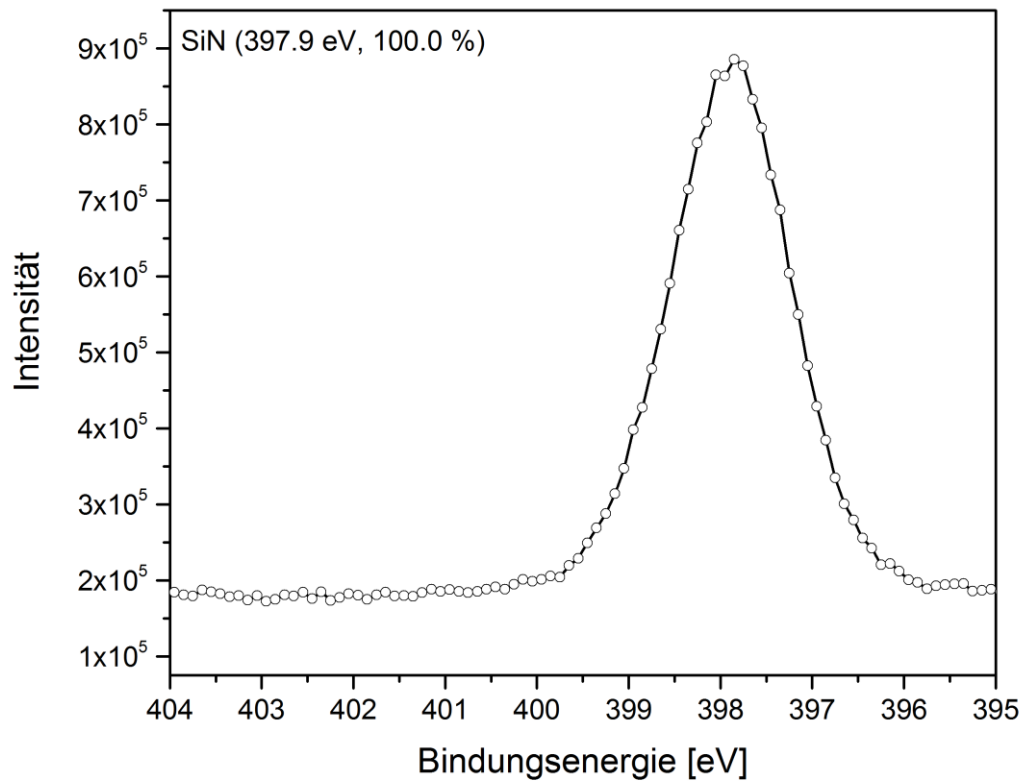


Abbildung 137: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

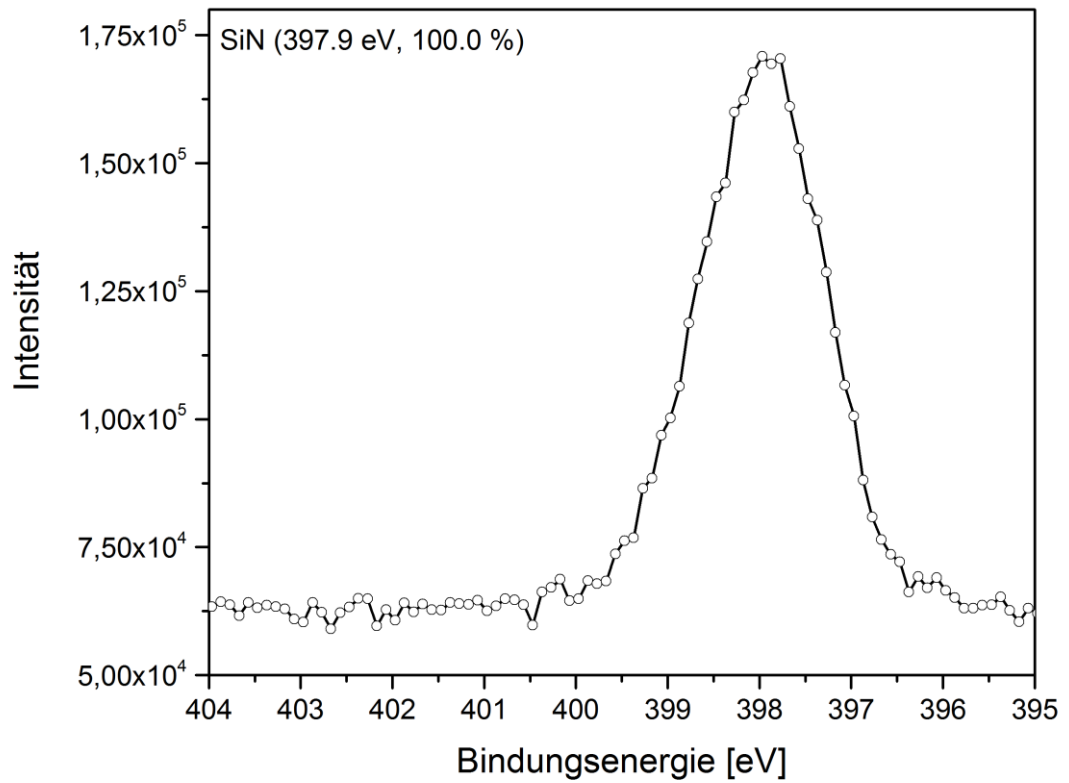


Abbildung 138: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

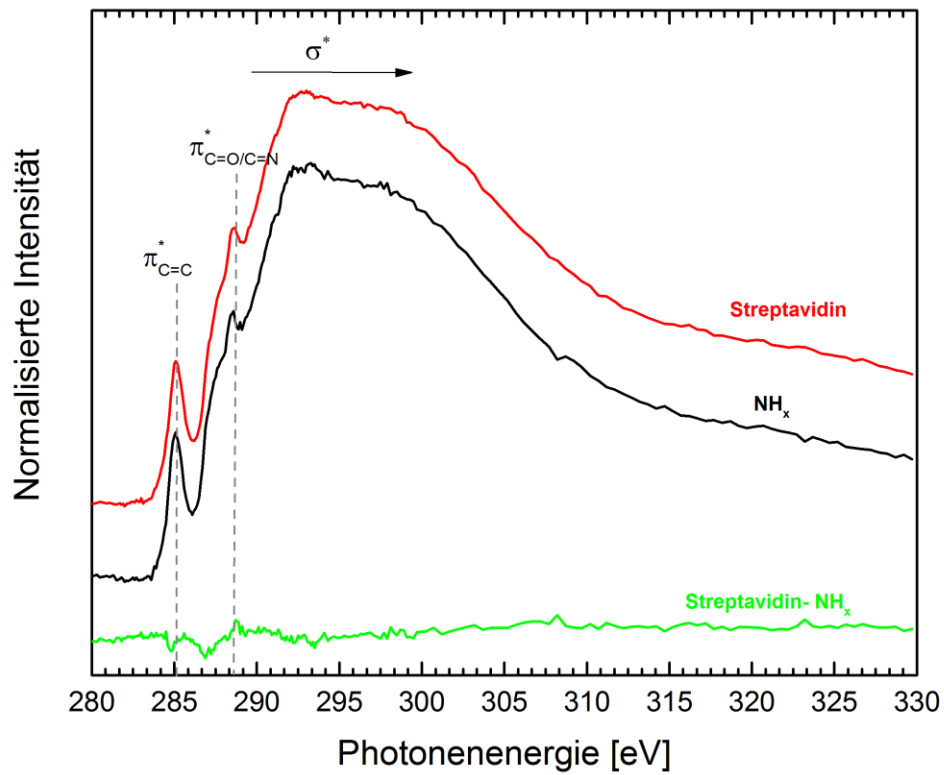


Abbildung 139: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten SiN₄-Oberfläche.

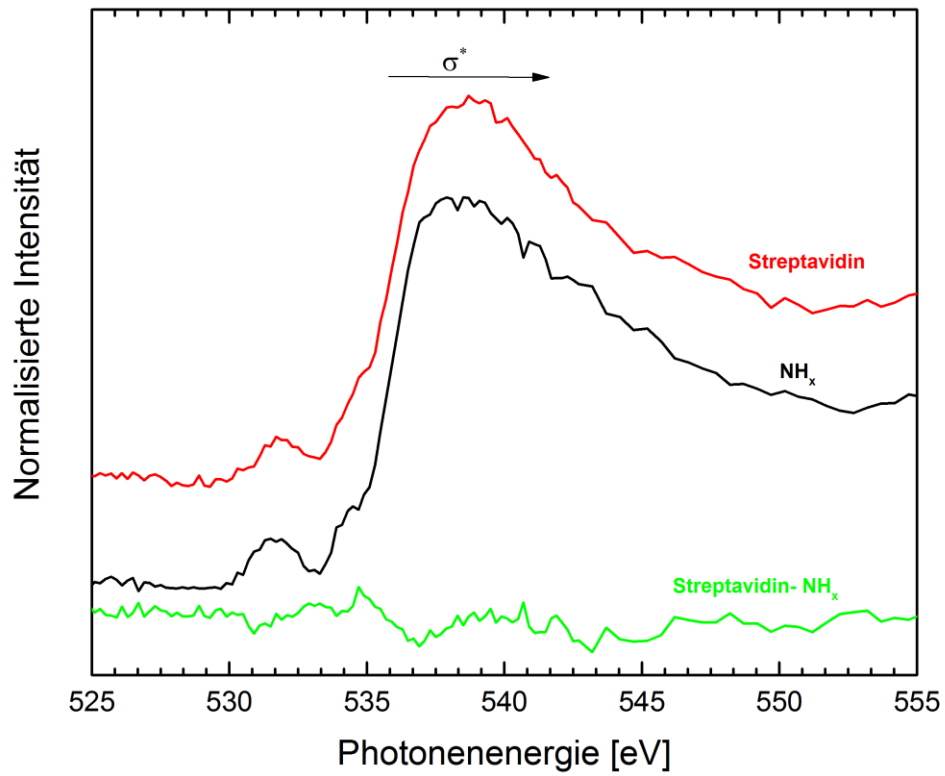


Abbildung 140: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

7.14. Negativkontrolle: Si-N₃-Oberfläche (Prozess A) inkubiert mit Streptavidin

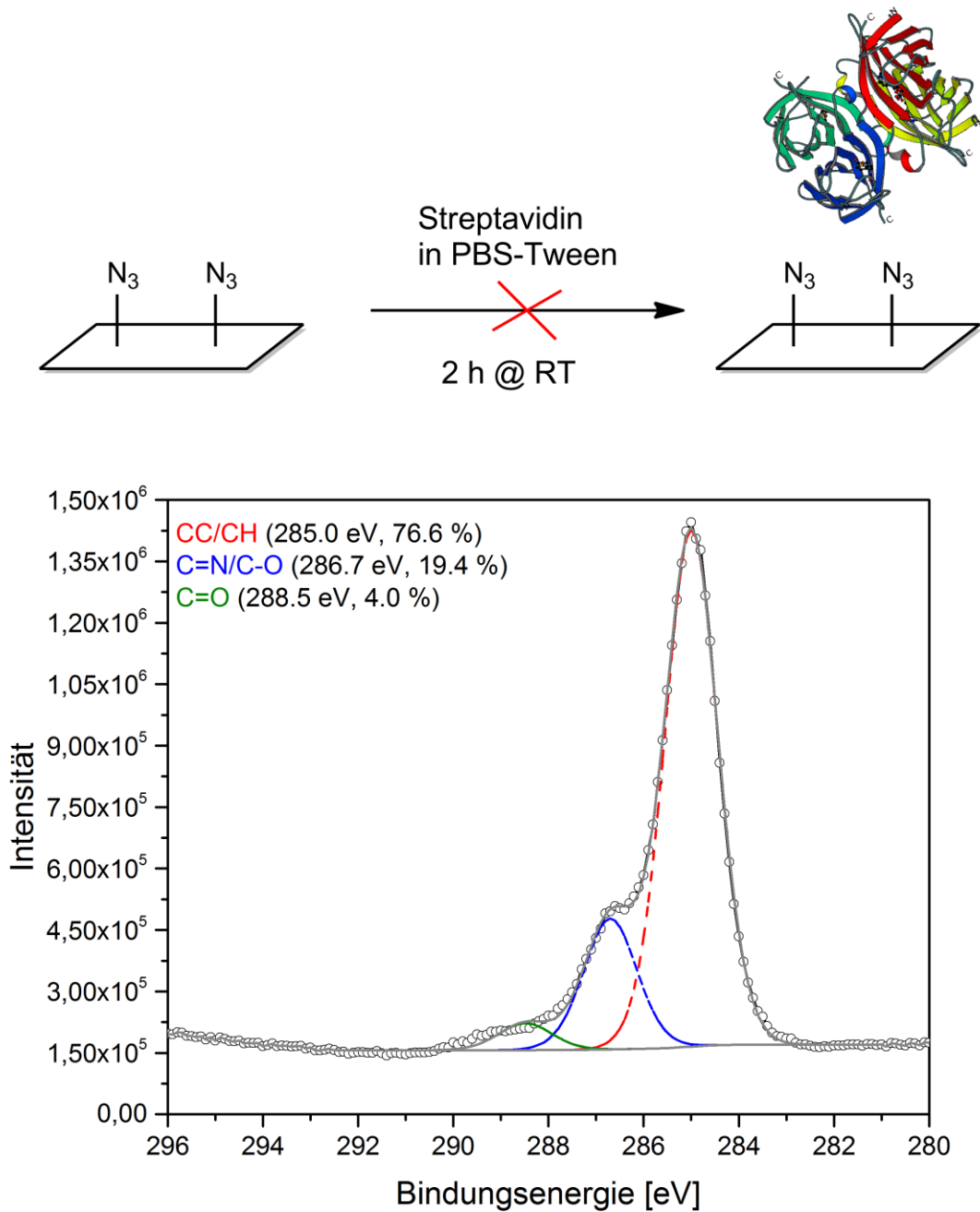


Abbildung 141: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).

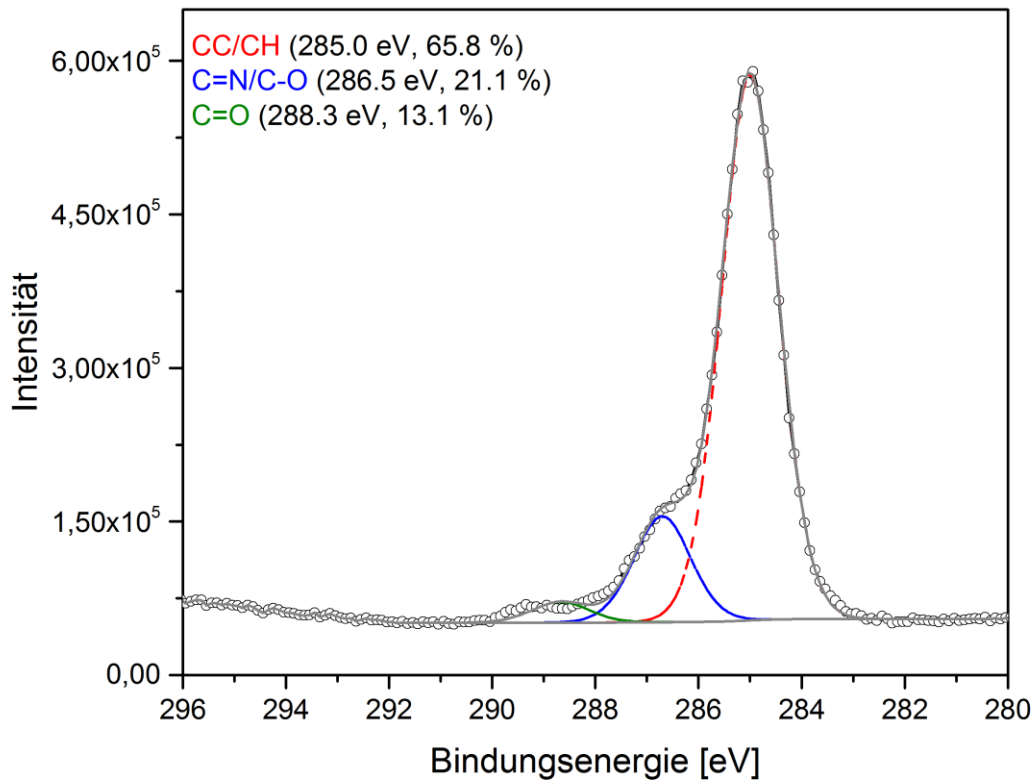


Abbildung 142: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).

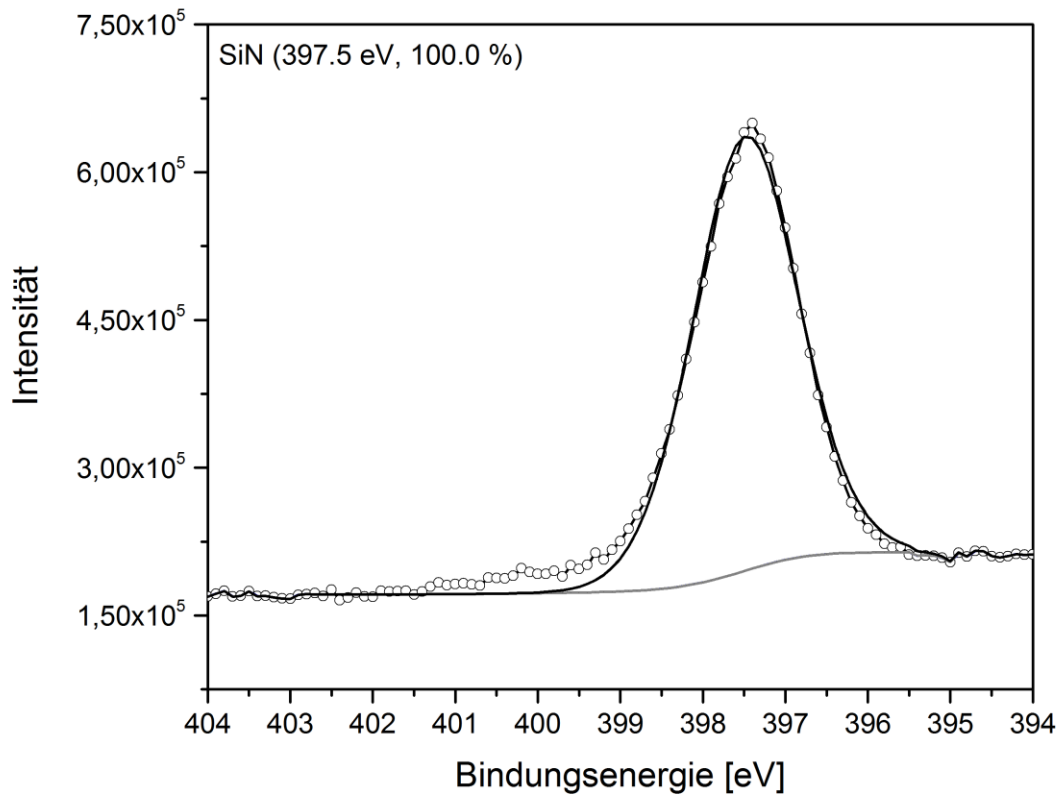


Abbildung 143: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

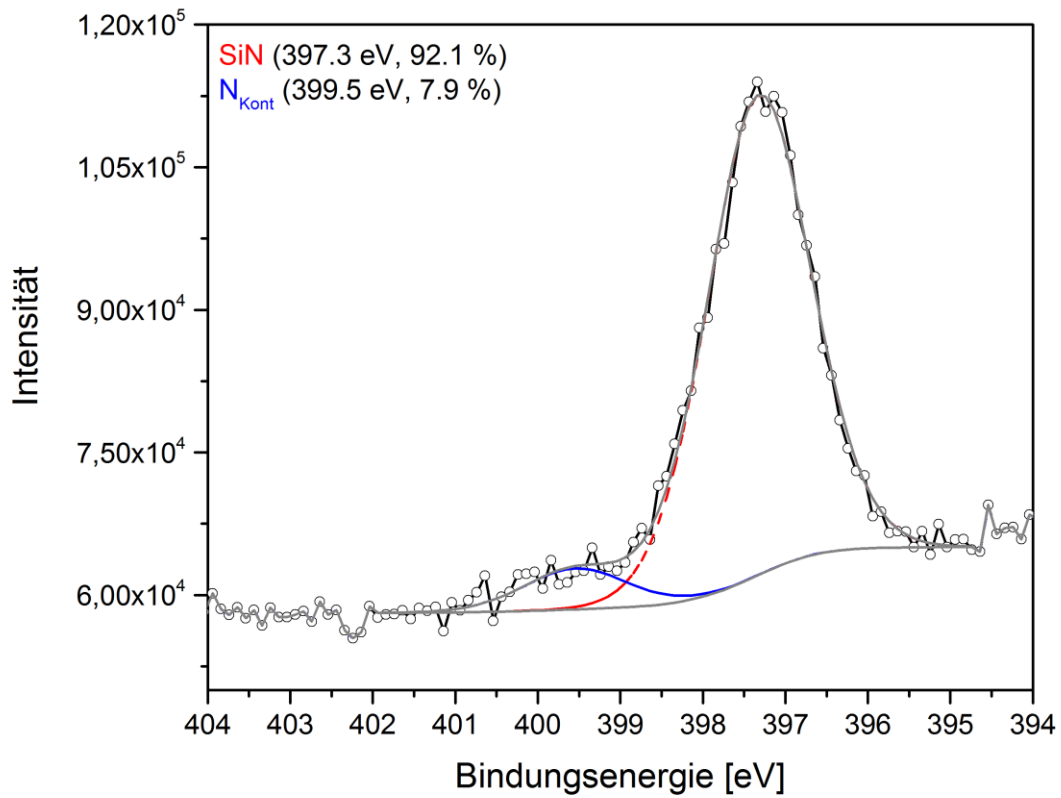


Abbildung 144: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

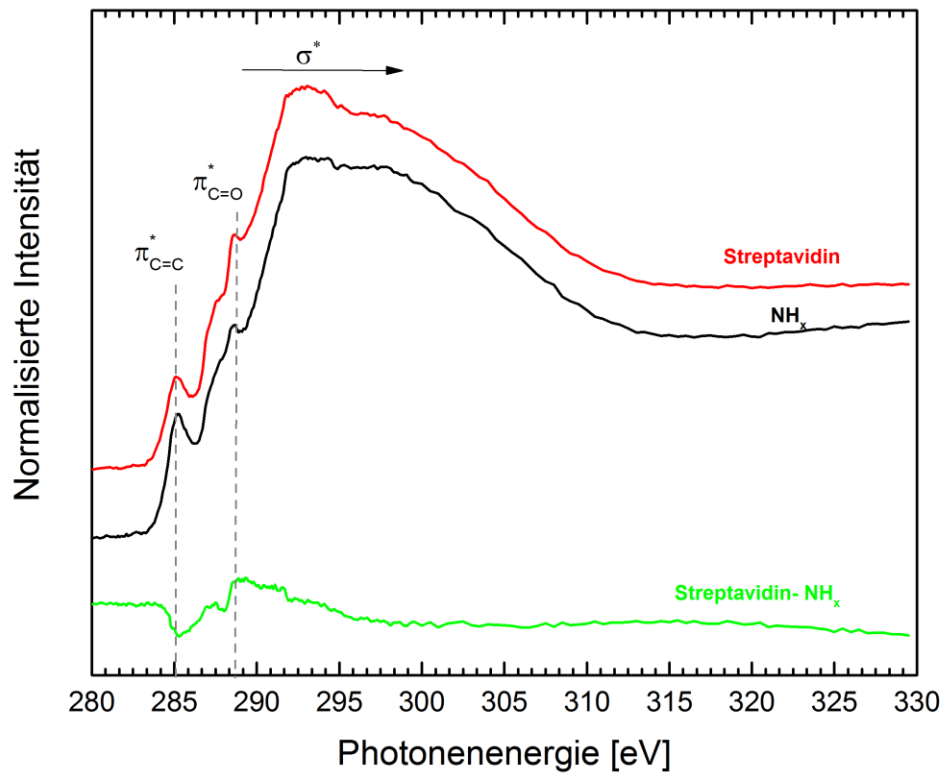


Abbildung 145: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

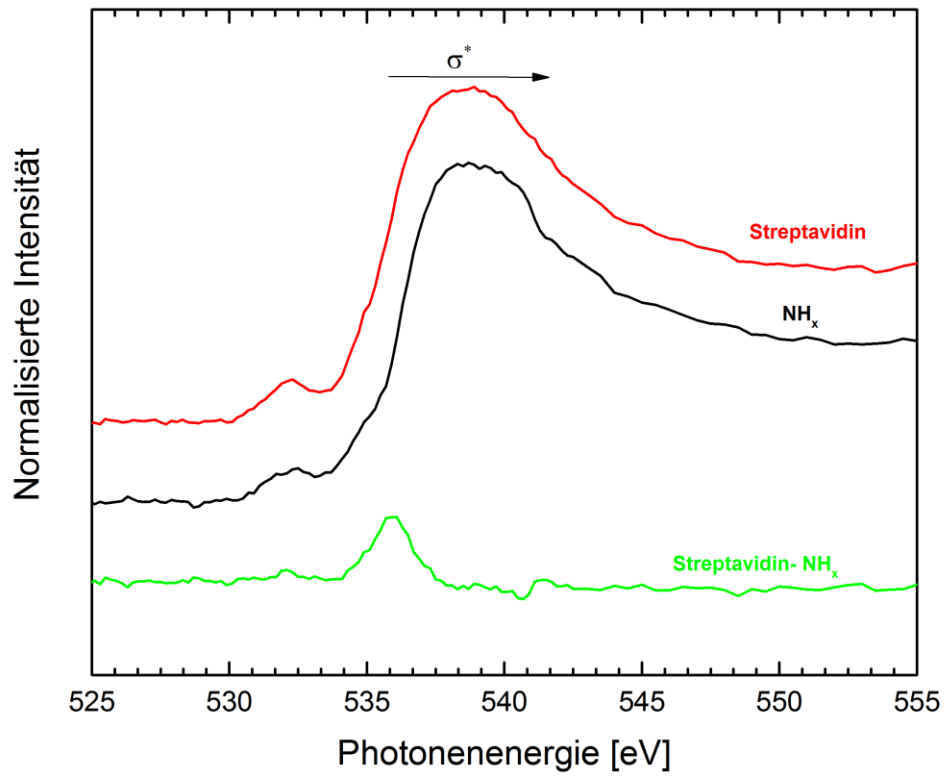


Abbildung 146: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

7.15. Negativkontrolle: Si-N₃-Oberfläche (Prozess D) inkubiert mit Streptavidin

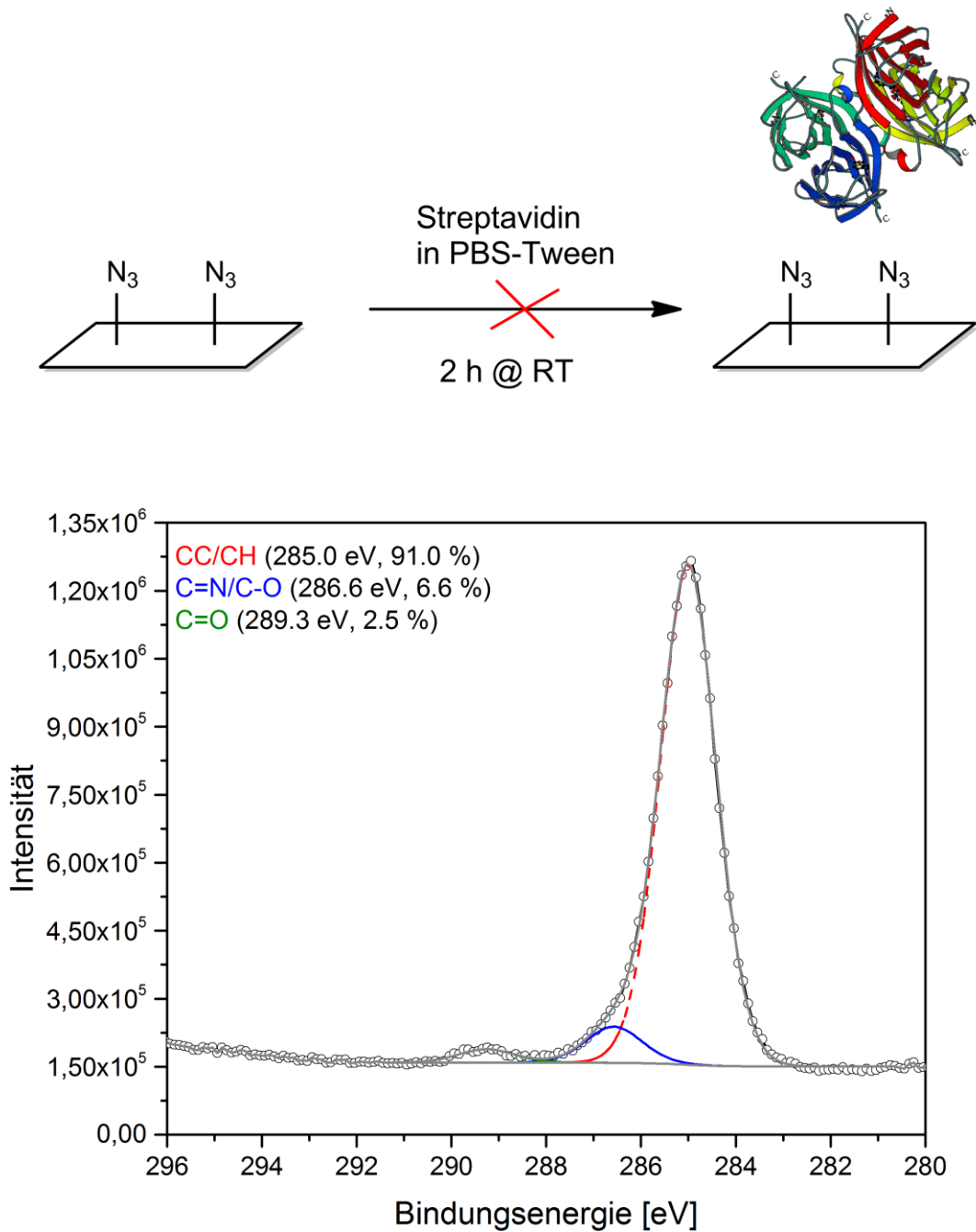


Abbildung 147: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).

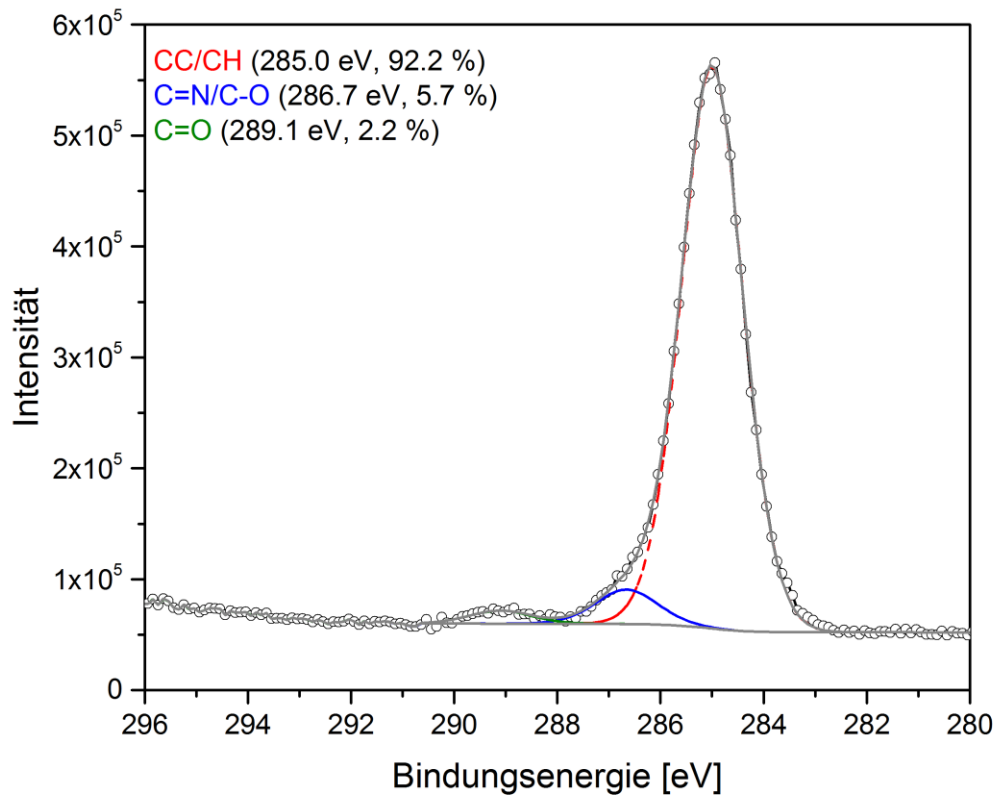


Abbildung 148: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=1.8 \text{ nm}$ ($h\nu=385 \text{ eV}$)).

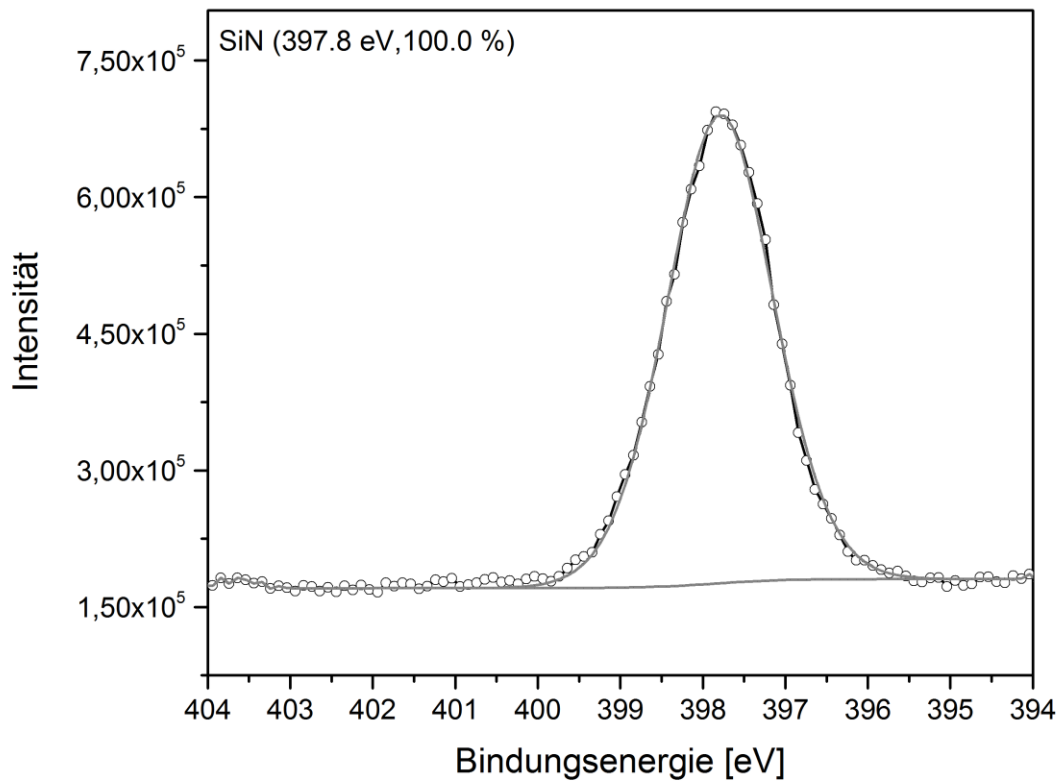


Abbildung 149: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5 \text{ nm}$ ($h\nu=500 \text{ eV}$)).

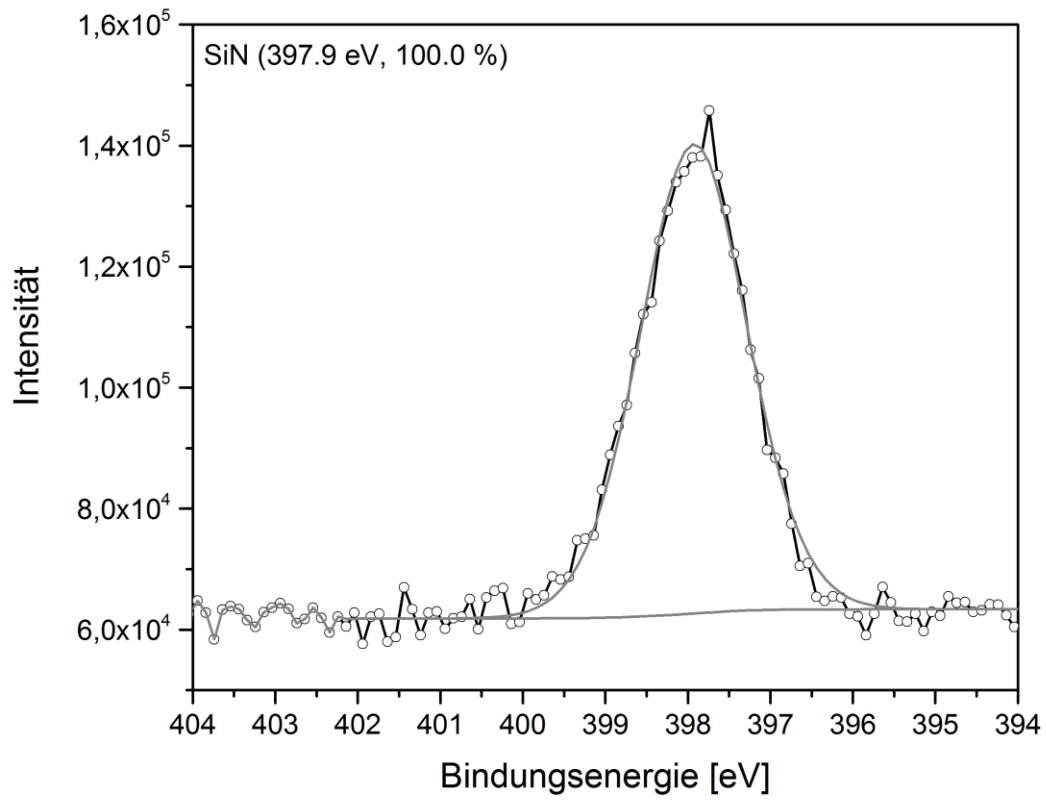


Abbildung 150: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\theta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).

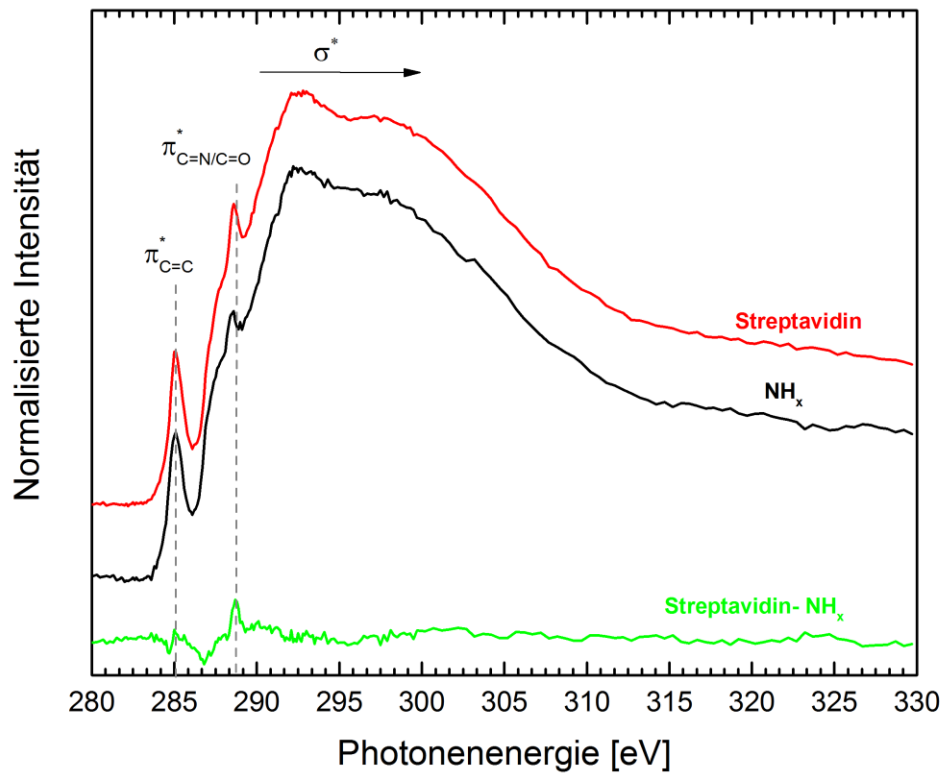


Abbildung 151: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.

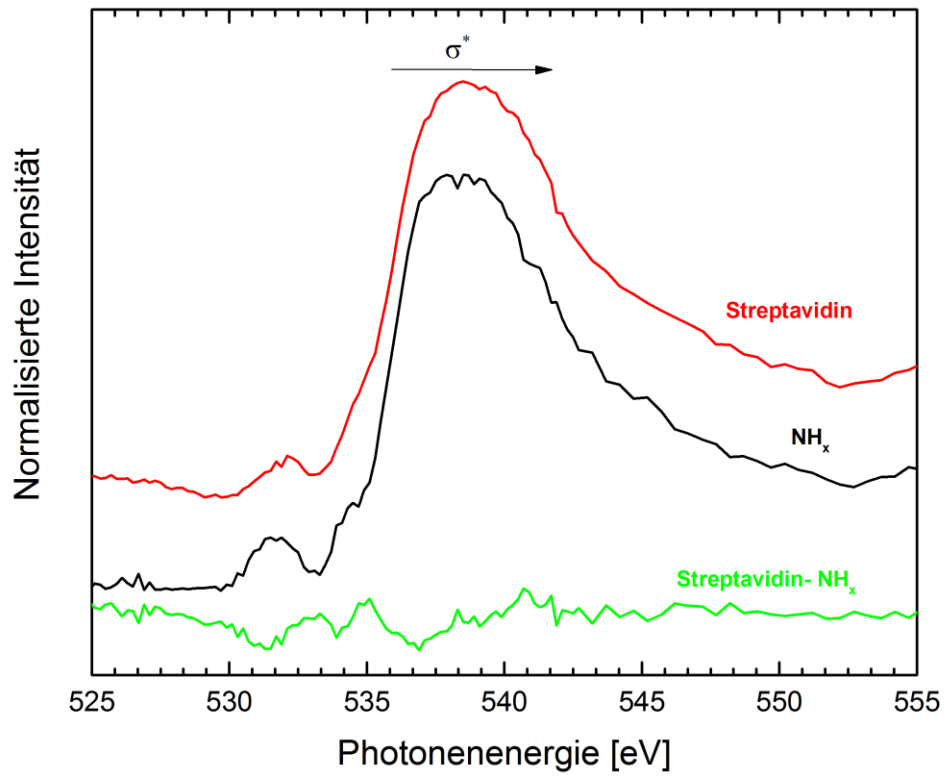


Abbildung 152: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si₃N₄-Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche.

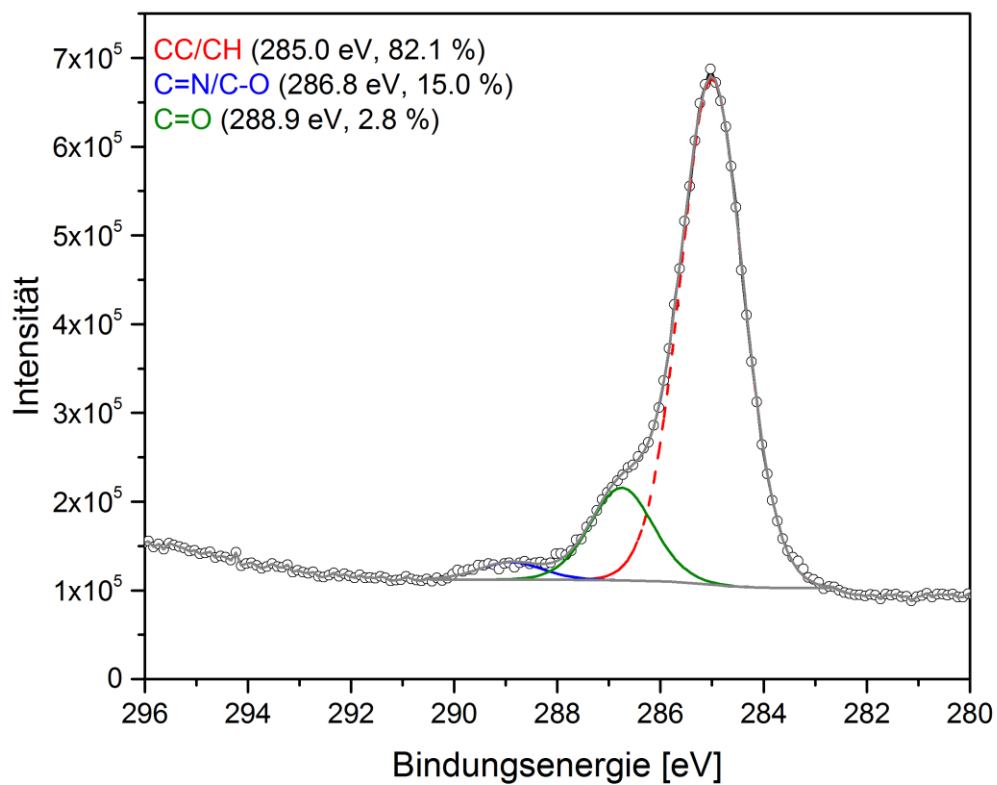
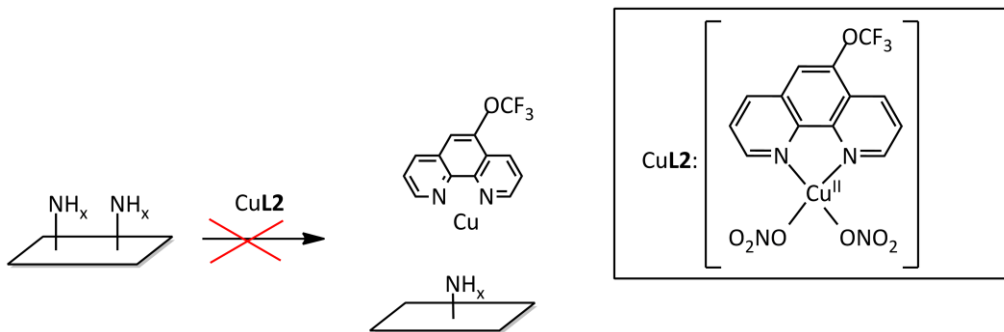
7.16. Negativkontrolle: Si-NH_x-Oberfläche inkubiert mit CuL2

Abbildung 153: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2-Komplex reagierten Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).

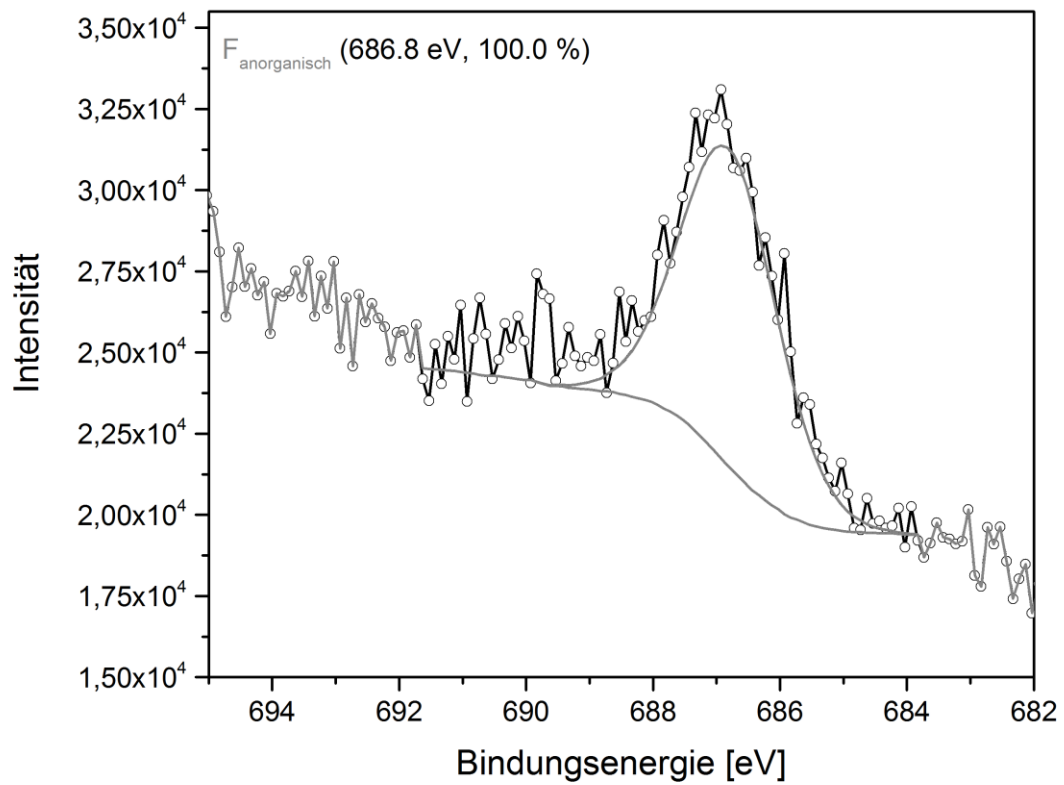


Abbildung 154: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2 -Komplex reagierten Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=2.0$ nm ($h\nu=780$ eV)).

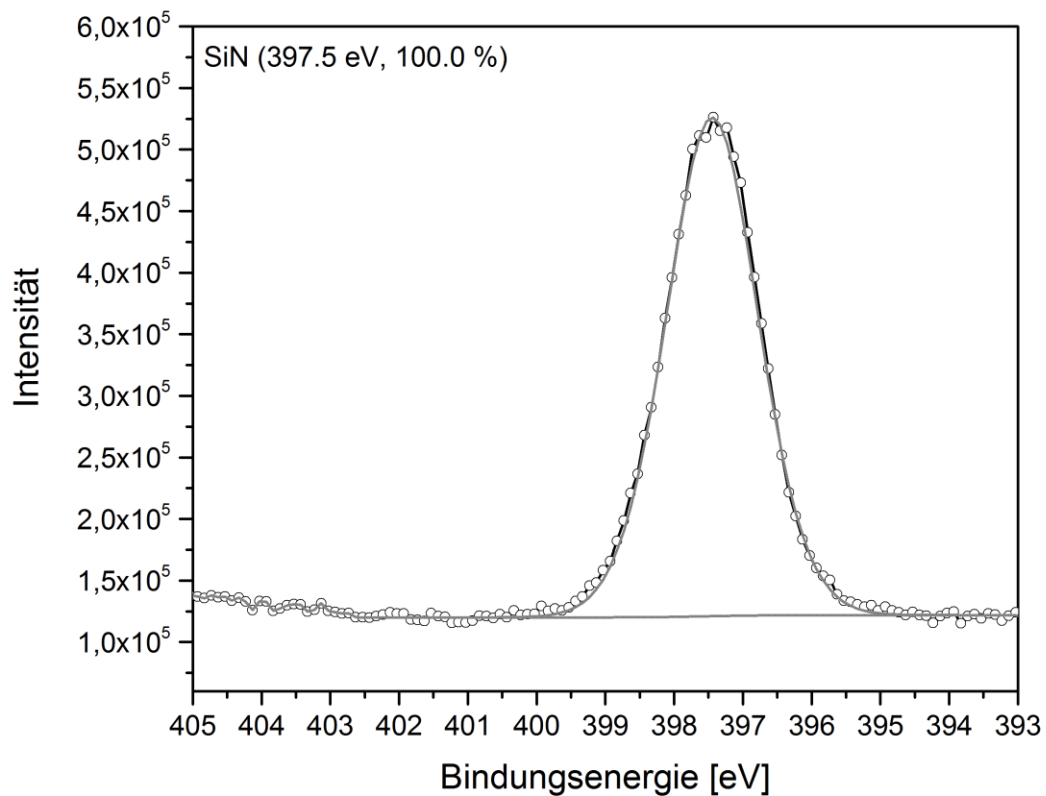


Abbildung 155: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2-Komplex reagierten Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).

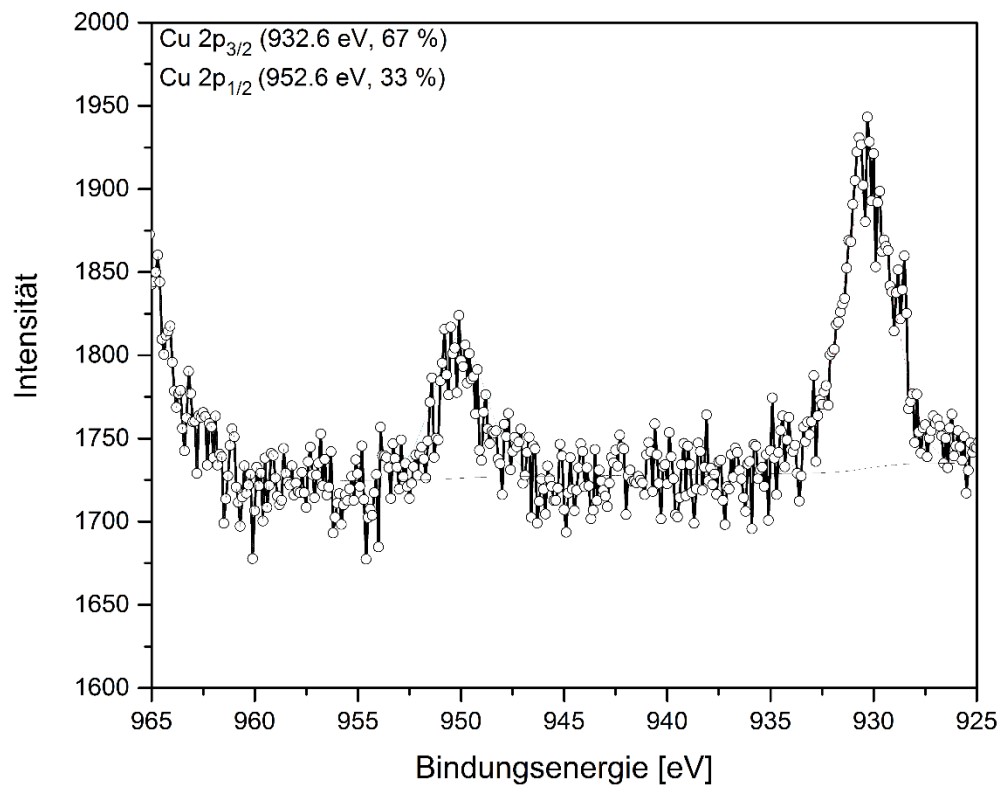


Abbildung 156: Cu 2p-Labor-XP-Spektren einer mit dem CuL2-Komplex reagierten Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\theta=0^\circ$, $z_{95}=10$ nm ($h\nu=1487$ eV)).

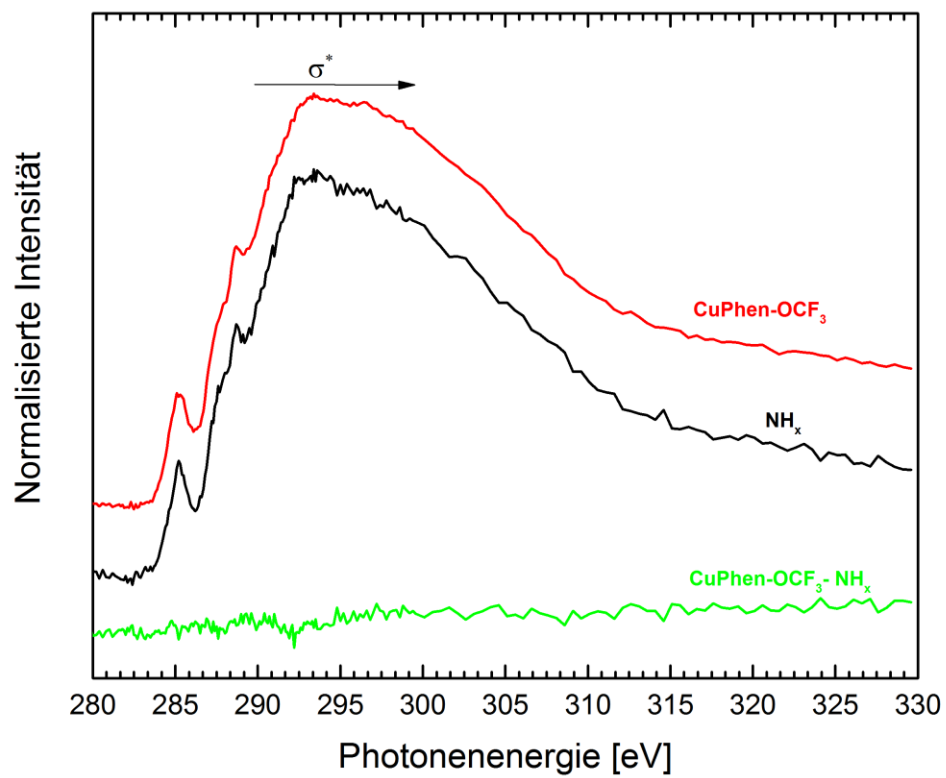


Abbildung 157: NEXAFS C K-Kante einer mit dem Komplex CuL2 Si₃N₄-Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer Si₃N₄-Oberfläche.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Silizium-Stickstoff Tetraedereinheit der α - und β -Siliziumnitrid-Modifikationen. ^[2]	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Si-N-Schichten der α - und β -Siliziumnitrid-Modifikationen. Im β - Si_3N_4 tritt eine ABABAB...-Sequenz und im α - Si_3N_4 eine ABCDABCD...-Sequenz auf. ^[2]	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Biosensors. Das Prinzip beruht auf der Bindung einer biologischen Komponente an einen Transducer, die in spezifische Wechselwirkung mit dem zu bestimmenden Analyten tritt. Das durch die Interaktion generierte Signal wird von dem Transducer in ein messbares und auswertbares Signal umgewandelt. ^[18]	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des SPR-Experimentes. ^[37]	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Microarrays. ^[38] Durch die Auftragung von Spots (definierten Punkten) nebeneinander, ist es möglich Proben parallel zu untersuchen.....	10
Abbildung 6: SAM-Monolayer auf Gold-Oberflächen bzw. Silizium-Oberflächen.....	12
Abbildung 7: Silanisierung einer Silizium Oberfläche mit APTES.....	12
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Speicherringes BESSY II. ^[65]	17
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Röntgenphotoelektronenspektrometers. Die Probe wird mit Röntgenstrahlung angeregt, Photoelektronen werden emittiert, gelangen durch ein Linsensystem, bestehend aus elektrostatischen und magnetischen Linsen, in den Energieanalysator. Die nach ihrer kinetischen Energie sortierten Elektronen gelangen zum Detektor und werden dann durch eine Software in Spektren umgewandelt.	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung des photoelektrischen Prozesses. Photoelektronen werden durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung freigesetzt. Es schließen sich sekundäre Emissionsprozesse, d.h. die Emission von Augerelektronen und Fluoreszenz (a) und (b) an.	21
Abbildung 11: Erhöhung der Oberflächensensitivität von XPS durch die Veränderung des Winkels zur Oberflächennormalen. Durch Verstellen des Emissionswinkels ϑ ändert sich die Informationstiefe aus der die detektierten Elektronen, die die Oberfläche verlassen können, stammen. Bei größer werdendem Emissionswinkel ϑ erhöht sich die Oberflächensensitivität, da die Elektronen aus oberflächennäheren Schichten (durch gestrichelte Linien charakterisiert) stammen.	24
Abbildung 12: Übersichtsspektrum einer Siliziumnitrid-Oberfläche (80 nm Si_3N_4 auf Silizium).	25
Abbildung 13: Schematische Darstellung der NEXAFS- und EXAFS-Regionen. ^[76]	27
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Potentials (unten) und des dazugehörigen NEXAFS K-Kanten Spektrums (oben) eines zweiatomigen Moleküls. ^[77]	28
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Orientierung der π^* - und σ^* -Orbitale im Raum (a). ^[78] Schematische Darstellung der Winkelabhängigkeit von NEXAFS gezeigt an der C K-Kante des immobilisierten Benzols (b). Die maximale π^* -Resonanz wird erreicht, wenn das Übergangsdipolmoment (TDM) parallel zum elektrischen Feldvektor (E) steht (links), die maximale σ^* -Resonanz, bei senkrecht zueinander stehenden Übergangsdipolmoment und elektrischen Feldvektor, ist rechts dargestellt. ^[79]	31
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Prinzips der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS). Durch den Beschuss der Probe mit Primärionen kommt es zu Kollisionen und schließlich Stoßkaskaden, wodurch Sekundärionen emittiert werden. Die Sekundärionen können im Anschluss nach ihrer Masse diskriminiert und detektiert werden.....	32
Abbildung 17: Schematische Darstellung des ToF-SIMS-Experimentes. Die Primärpartikel werden mit einer Ionenkanone erzeugt und nach dem Passieren des Pulsgebers fokussiert auf die Probe geleitet. Die emittierten Sekundärpartikel werden von einem Extraktor eingefangen, beschleunigt und anschließend von einem Ionenspiegel umgelenkt und vom Detektor registriert. Bild von der Website der ION-TOF GmbH entnommen. ^[81]	34

Abbildung 18: Überblick der Entwicklung einer Funktionalisierungsstrategie für Siliziumnitridfilme. Oberflächenamine dienen als Grundlage zur Erzeugung Azid-terminierter Si_3N_4 -Oberflächen, wodurch sich die Modifizierung der Oberfläche durch die vielfältige Click-Chemie eröffnet.....	35
Abbildung 19: Derivatisierung einer NH_x -terminierten Si_3N_4 -Oberfläche mit TFBA.	37
Abbildung 20: Entfernung von Kohlenstoffkontaminationen von der Si_3N_4 Oberfläche durch die Behandlung mit Isopropanol bzw. mit Isopropanol gefolgt von einer UV/ O_3 -Behandlung.	40
Abbildung 21: Optimierung der Reinigungsmethode zur Entfernung der Sauerstoffschicht von der Si_3N_4 -Oberfläche.....	41
Abbildung 22: Surveyspektren einer nativen (schwarz), UV/ O_3 gereinigten (rot) und BHF-gereinigten Probe (blau).	43
Abbildung 23: ToF-SIMS-Tiefenprofil einer nativen, ungereinigten Probe (links) und BHF-gereinigten Si_3N_4 Probe (rechts).	44
Abbildung 24: Schematische Darstellung der optimalen Reinigungsmethode der verwendeten Si_3N_4 -Oberflächen. Nach der Reduzierung von Kohlenstoffkontaminationen mit Isopropanol und UV/ O_3 folgt die Entfernung der nativen Sauerstoffschicht mit BHF. Die erzeugten Aminogruppen wurden nach der Derivatisierung mit TFBA mittels CD-XPS quantifiziert.	45
Abbildung 25: Hochaufgelöste C 1s- und F 1s-XP-Spektren einer TFBA-derivatisierten Siliziumnitrid-Oberfläche (4). Die Spektren wurden mit Labor-XPS bei einer Anregungsenergie von $h\nu = 1486.7$ eV und einem Emissionswinkel von 0° ($z_{95}=10$ nm) aufgenommen.	47
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Erzeugung einer höheren Aminogruppendichte auf Si_3N_4 -Oberflächen durch die Behandlung mit einem wasserbasierten Sauerstoffplasma bzw. Ammoniakplasma.	48
Abbildung 27: XPS-Analyse von einer mit einem feuchten Sauerstoffplasma behandelten und mit TFBA derivatisierten Oberfläche. Aufgetragen wurde die Intensität die Aminogruppenkonzentration bestimmt aus dem CF_3 -Komponentenpeak im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum nach Gleichung 3-1 in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeit.	49
Abbildung 28: XPS-Analyse von einer mit einem NH_3 -Plasma behandelten und mit TFBA derivatisierten Oberfläche. Aufgetragen wurde die Intensität die Aminogruppenkonzentration bestimmt aus dem CF_3 -Komponentenpeak im hochaufgelösten C 1s-XP-Spektrum nach Gleichung 3-1 in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeit.	50
Abbildung 29: Mesomere Grenzformeln eines Azids (a-d), Struktur d zeigt den 1,3-dipolaren Charakter der Azidgruppe.	53
Abbildung 30: Erzeugung von Triflylazid (TfN_3) aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumazid.	54
Abbildung 31: Ausnutzung der Azidgruppe zur Herstellung von Aminoglykosiden. ^[106] (Reagenzien: (1) TfN_3 , Et_3N , CuSO_4 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, (2) Ac_2O , Pyridin, (3) NaOMe , MeOH , 58% von Neomycinsulfat, (4) BnBr , NaH , Bu_4NI , DMF , 80%). Nach einer Abfolge von Reaktionen wird das Aminoglykosid gebildet.....	55
Abbildung 32: Reaktionsmechanismus einer Diazo-Transfer-Reaktion mit Triflylazid an die Si-NH_x -Oberfläche. Der Angriff erfolgt auf das terminale N-Atom der Azidgruppe.	56
Abbildung 33: Erzeugung einer N_3 -terminierten Oberfläche auf einem mit Aminen ausgestattetem Si_3N_4 Substrat. Dargestellt sind die Azidierung mit Natriumazid (Prozess A), mit Natriumnitrit gefolgt von Natriumazid (Prozess B), mit Triflylazid (Prozess C) und mit Natriumazid in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ (Prozess D).	57
Abbildung 34: Hochaufgelöstes N 1s-SR-XP-Spektrum einer Si_3N_4 -Oberfläche mit einem Azidosilanfilm, aufgenommen bei einem Emissionswinkel von 0° ($z_{95}=4.5$ nm). Zu sehen sind neben dem Substratnitrid bei 397.3 eV die charakteristischen Azidsignale bei 400.3 eV und 404.5 eV.	58
Abbildung 35: GIR-Spektrum einer mit Natriumazid in $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (Prozess A) azidierten Si_3N_4 -Oberfläche.	59
Abbildung 36: Reaktionsmechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen.....	61
Abbildung 37: Reaktionsmechanismus der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition an der Oberfläche nach Barry K. Sharpless ^[117] und Stefan Bräse. ^[100]	62
Abbildung 38: Anbindung von Rotaxanen an die Gold-Oberfläche über die CuAAC. ^[121]	63

Abbildung 39: Anbindung von Ferrocen an die Gold-Oberfläche über die CuAAC zur Untersuchung von Elektronentransferprozessen. ^[133]	63
Abbildung 40: Erzeugung von organischen Schichten durch Click-Chemie. Die Click-Chemie wurde jeweils mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol bzw. tert-Butanol/Wasser durchgeführt.	65
Abbildung 41: Hochaufgelöste C 1s- (a), F 1s- (b) und N 1s- (c) SR-XP-Spektren von nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche 9 ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV), $z_{95}=0.7$ nm für F 1s ($h\nu=780$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).	67
Abbildung 42: NEXAFS C K-Kante und F K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche 9, aufgenommen bei 55° . Die C K-Kante zeigt die geklickte Probe im Vergleich zu einer gereinigten Oberfläche 3. In der F K-Kante sind σ^* -Resonanzen der CF_3 -Gruppe zu sehen.	68
Abbildung 43: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer nach Prozess C azidierten und in Ethanol geklickten Oberfläche 9.	69
Abbildung 44: Hochaufgelöste C 1s- (a) und F 1s- (b) SR-XP-Spektren einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche 12 ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=0.7$ nm für F 1s ($h\nu=780$ eV)).	72
Abbildung 45: NEXAFS C K-Kante und F K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in ^t Butanol/Wasser geklickten Siliziumnitrid-Oberfläche 12, aufgenommen bei 55° . Die C K-Kante zeigt die geklickte Probe im Vergleich zu einer gereinigten Oberfläche 3. Die F K-Kante zeigt σ^* -Resonanzen der CF_3 -Gruppe.	73
Abbildung 46: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer nach Prozess C azidierten und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in ^t BuOH/H ₂ O geklickten Oberfläche 12. Die Sekundärionen vom immobilisierten Alkin wurden gezeigt.	74
Abbildung 47: Erzeugung von organischen Schichten durch Click-Chemie durchgeführt mit Propargylchlorid in Ethanol bzw. tert-Butanol/Wasser.	78
Abbildung 48: Hochaufgelöstes Cl 2p-SR-XP-Spektrum einer Si ₃ N ₄ -Oberflächen (35), die nach Prozess C azidiert und mit Propargylchlorid in ^t Butanol/Wasser funktionalisiert wurde ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=1.5$ nm für Cl 2p ($h\nu=300$ eV)). ..	79
Abbildung 49: Schematische Darstellung von Streptavidin. Dargestellt ist die tetramere Struktur des Streptavidins mit den vier Bindungstaschen inklusive gebundener Biotinmoleküle (PDB 5B5F).	81
Abbildung 50: Schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur von Streptavidin. Die Biotin Bindungstasche befindet sich an den offenen Enden der Monomere und wird nach der Bindung durch Oberflächenschlaufen („surface loops“) verschlossen. ^[142]	82
Abbildung 51: Erzeugung von Biotin/Streptavidin Schichten durch die Click-Chemie. Dargestellt ist die Click-Chemie mit Biotin-PEG4-Alkin durchgeführt in Methanol bzw. in DMF/Wasser.	84
Abbildung 52: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren von Si ₃ N ₄ -Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C und der Funktionalisierung mit Biotin-PEG4-Alkin in MeOH/H ₂ O und Streptavidin (23). Deutlich erkennbar sind Amidbindungen bei 288.2 eV (C 1s) bzw. 400.3 eV (N 1s) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).	86
Abbildung 53: NEXAFS C K-Kante und O K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit Biotin (MeOH/H ₂ O) und Streptavidin modifizierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche (23) (rote Linie) im Vergleich zu einer unmodifizierten Oberfläche (3) (schwarze Linie). Die Differenzspektren wurden ebenfalls dargestellt (grüne Linie).	87
Abbildung 54: ToF-SIMS-Massenspektrum im positiven Ionenmodus einer mit TfN ₃ azidierten und in Methanol geklickten Oberfläche (23).	88
Abbildung 55: Hochaufgelöste N 1s-SR-XP-Spektren von biotinylierten und Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberflächen (23) nach der Azidierung mit Prozess C ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm (a); $\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm (b) für N 1s ($h\nu=500$ eV)).	89
Abbildung 56: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Spektren von Si ₃ N ₄ -Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C und der Funktionalisierung mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF/H ₂ O und Streptavidin (26) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).	90

Abbildung 57: NEXAFS C K-Kante einer nach Prozess C azidierten und mit Biotin (DMF/H ₂ O) und Streptavidin modifizierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche (26) (rote Linie) im Vergleich zu einer unmodifizierten Oberfläche (schwarze Linie) und dem Differenzspektrum (grüne Linie).	91
Abbildung 58: Doppelhelix-Struktur der DNA (links), Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang. Das Phosphatrückgrat verläuft parallel zueinander, so dass die komplementären Basenpaare sich gegenüber stehen und Wasserstoffbrücken ausbilden (rechts). ^[166]	94
Abbildung 59: Schematische Darstellung der Interkalation eines Metallkomplexes in die DNA (links) sowie die kovalente Bindung von Cis-Platin an die DNA und die dadurch bedingte Veränderung der DNA-Struktur. ^[172]	96
Abbildung 60: Mechanismus der Immobilisierung von 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure an die Si-NH _x -terminierte Siliziumnitrid-Oberfläche durch Amid-Kopplung.	99
Abbildung 61: Schema der Agarose-Gelelektrophorese (links). Die DNA-Lösung wird in die Taschen geladen, die Auftrennung erfolgt nach dem Anlegen einer Spannung nach der Größe der DNA (Form I, II oder III) (rechts).	100
Abbildung 62: Ethidiumbromid wird zum Nachweis von RNA und DNA zum Anfärben bei der Gelelektrophorese verwendet.	100
Abbildung 63: Kopplung der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (L1) an die NH _x -terminierte Oberfläche, gefolgt von der Komplexbildung mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex (CuL2) und anschließender Interkalation in die DNA. (Die genaue Struktur des Komplexes CuL2 ist nicht bekannt).	101
Abbildung 64: NEXAFS C K-Kante einer mit 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (L1) immobilisierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche 29 (rot) verglichen mit einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche 3 (schwarz) und dem Differenzspektrum (grün).	103
Abbildung 65: Hochaufgelöste C 1s-, F 1s-, N 1s-SR-XP-Spektren und Cu 2p-Labor-XP-Spektren einer mit einem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche (30). Die OCF ₃ -Gruppe wurde im C 1s-SR-XP-Spektrum bei 294.8 eV nachgewiesen (a). Das F 1s-SR-XP-Spektrum zeigt die organische Fluorkomponente der Trifluormethoxygruppe bei 689.8 eV (b). Die gebildete Amidgruppe wurde im N 1s-SR-XP-Spektrum bei 399.5 eV nachgewiesen (c). Die Existenz des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes wurde durch das Cu 2p-Labor-XP-Spektrum nachgewiesen (d) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV), $z_{95}=2.0$ nm, $z_{95}=4.5$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV) und $z_{95}=10$ nm für Cu 2p ($h\nu=1487$ eV)).	105
Abbildung 66: NEXAFS C K-Kante der mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche (30) im Vergleich zur Oberfläche mit der 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (29) (a) und Si ₃ N ₄ Oberfläche mit immobilisiertem Komplex (30) im Vergleich zur Si-NH _x Oberfläche (3) (b). Das Differenzspektrum wurde ebenfalls abgebildet (grün). Die F K-Kante zeigt $\sigma^*(C-F)$ Resonanz des OCF ₃ -Substituenten (c). Die Spektren wurden bei einem Winkel von 55° aufgenommen.	106
Abbildung 67: Score- und Loading-Plots der Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Si ₃ N ₄ -Oberflächen nach der Bindung von L1 PhenCOOH (29) (Abbildung a und b) sowie nach dem zweiten Reaktionsschritt nach der Komplexbildung von L1 und CuL2 (30) (Abbildung c und d).	108
Abbildung 68: Hochaufgelöste C 1s- und P 2p-SR-XP-Spektren einer mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten und mit DNA inkubierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche 31. Gezeigt wird das Verschwinden der OCF ₃ -Gruppe des Komplexes im C 1s-SR-XP-Spektrum sowie das Auftreten eines Phosphor-Peaks im P 2p-SR-XP-Spektrum nach der Inkubation mit pBR322-Plasmid-DNA ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=1.2$ nm für P 2p ($h\nu=230$ eV)).	109
Abbildung 69: Hochaufgelöste N 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex immobilisierten und mit pBR322-Plasmid-DNA inkubierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche. Gezeigt wird das Signal der NH ₂ -Gruppen und Amidbindungen der DNA bei einer erhöhten Oberflächenempfindlichkeit bei einem Emissionswinkel von 60° ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm; $\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)) die für einen Schichtaufbau mit der DNA in der äußersten Oberfläche sprechen.	110
Abbildung 70: Bildung des 1:1-Komplexes des Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes aus 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure (L1) und dem Dinitrato(1,10-phenanthrolin-5-trifluormethoxy)-Kupfer(II)-Komplex (CuL2).	112
Abbildung 71: UV/Vis-Spektrum des Cu-Komplexes (CuL2) und des gebildeten 1:1-Komplexes (L1+CuL2).	113

Abbildung 72: Spaltaktivität des immobilisierten Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes auf Si_3N_4 gegenüber pBR322-Plasmid-DNA in MOPS-Puffer (50 mM) und L-Ascorbinsäure (0.32 mM) für 0.5 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente ein 1 μM 1:1-Komplex.	114
Abbildung 73: Spaltaktivität des immobilisierten Cu(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplexes auf Si_3N_4 gegenüber pBR322-Plasmid-DNA in MOPS-Puffer (50 mM) und L-Ascorbinsäure (0.32 mM) für 0.5 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 37 °C. Gezeigt sind sowohl die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese als auch die prozentuale Zusammensetzung der geschnittenen DNA der Formen II bzw III.	115
Abbildung 74: C 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	144
Abbildung 75: F 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).	145
Abbildung 76: N 1s-SR-XP-Spektren einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	146
Abbildung 77: NEXAFS F K-Kante einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen.	147
Abbildung 78: TOF-SIMS-Massenspektrum einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen.	148
Abbildung 79: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	149
Abbildung 80: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).	150
Abbildung 81: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	151
Abbildung 82: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberflächen und dem Differenzspektrum.	152
Abbildung 83: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	153
Abbildung 84: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	154
Abbildung 85: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	155
Abbildung 86: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).	156
Abbildung 87: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	157
Abbildung 88: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	158
Abbildung 89: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	159
Abbildung 90: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	160
Abbildung 91: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	161
Abbildung 92: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).	162
Abbildung 93: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	163

Abbildung 94: C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.....	164
Abbildung 95: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	165
Abbildung 96: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	166
Abbildung 97: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=0.7$ nm ($h\nu=780$ eV)).	167
Abbildung 98: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	168
Abbildung 99: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	169
Abbildung 100: NEXAFS F K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	170
Abbildung 101: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 in Anwesenheit von tert-Butylnitrit azidierten (Prozess D) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Si_3N_4 -Oberflächen.	171
Abbildung 102: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol geclickten Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV))......	172
Abbildung 103: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol geclickten Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV))......	173
Abbildung 104: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	174
Abbildung 105: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	175
Abbildung 106: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	176
Abbildung 107: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	177
Abbildung 108: NEXAFS C K-Kante C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	178
Abbildung 109: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.....	179
Abbildung 110: ToF-SIMS-Massenspektrum einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen.	180
Abbildung 111: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV))......	181
Abbildung 112: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geclickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV))......	182

Abbildung 113: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	183
Abbildung 114: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	184
Abbildung 115: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	185
Abbildung 116: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 azidierten (Prozess A) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	186
Abbildung 117: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	187
Abbildung 118: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	188
Abbildung 119: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	189
Abbildung 120: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberflächen ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	190
Abbildung 121: NEXAFS C K-Kante mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	191
Abbildung 122: ToF-SIMS-Massenspektrum mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in Methanol geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche.	192
Abbildung 123: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	193
Abbildung 124: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	194
Abbildung 125: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	195
Abbildung 126: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	196
Abbildung 127: NEXAFS C K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	197
Abbildung 128: NEXAFS O K-Kante einer mit NaN_3 in Anwesenheit von $^t\text{BuONO}$ azidierten (Prozess D) und mit Biotin-PEG4-Alkin in DMF geklickten und mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche im Vergleich zu einer gereinigten Si_3N_4 -Oberfläche.	198
Abbildung 129: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	199
Abbildung 130: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si_3N_4 -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	200

Abbildung 131: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	201
Abbildung 132: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	202
Abbildung 133: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	203
Abbildung 134: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Azidierung bzw. Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	204
Abbildung 135: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	205
Abbildung 136: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	206
Abbildung 137: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	207
Abbildung 138: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	208
Abbildung 139: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	209
Abbildung 140: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	210
Abbildung 141: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	211
Abbildung 142: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	212
Abbildung 143: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	213
Abbildung 144: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	214
Abbildung 145: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	215
Abbildung 146: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess A ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	216
Abbildung 147: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	217

Abbildung 148: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm ($h\nu=385$ eV)).	218
Abbildung 149: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	219
Abbildung 150: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=2.3$ nm ($h\nu=500$ eV)).	220
Abbildung 151: NEXAFS C K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	221
Abbildung 152: NEXAFS O K-Kante einer mit Streptavidin interagierenden Si ₃ N ₄ -Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess D ohne vorherige Click-Reaktion mit Biotin-PEG4-Alkin (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer gereinigten Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	222
Abbildung 153: C 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2 -Komplex reagierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=3.7$ nm ($h\nu=385$ eV)).	223
Abbildung 154: F 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2 -Komplex reagierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=2.0$ nm ($h\nu=780$ eV)).	224
Abbildung 155: N 1s-SR-XP-Spektren einer mit dem CuL2 -Komplex reagierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}=4.5$ nm ($h\nu=500$ eV)).	225
Abbildung 156: Cu 2p-Labor-XP-Spektren einer mit dem CuL2-Komplex reagierten Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) ($\vartheta=0^\circ$, $z_{95}= 10$ nm ($h\nu=1487$ eV)).	226
Abbildung 157: NEXAFS C K-Kante einer mit dem Komplex CuL2 Si ₃ N ₄ -Oberfläche ohne vorherige Immobilisierung des Liganden L1 (Negativkontrolle) im Vergleich zu einer Si ₃ N ₄ -Oberfläche.	227

9. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Abnahme des Sauerstoffgehalts von Si₃N₄-Oberflächen, die mit Flusssäure (1 % bzw. 2.5 %) bzw. mit gepufferter Flusssäure gereinigt wurden.</i>	42
<i>Tabelle 2: XPS Elementzusammensetzung einer nativen, UV/O₃-gereinigten und BHF-gereinigten Probe</i>	43
<i>Tabelle 3: Hochaufgelöste C 1s- und F 1s-XP-Daten (Labor-XPS) von derivatisierten Oberflächen. Untersucht wurde die Derivatisierung in der Gasphase und in der Lösung in Hexan.</i>	46
<i>Tabelle 4: Hochaufgelöste C 1s-XP-Daten einer BHF geätzten (3) und einer mit TFBA derivatisierten Probe (4). Die Spektren wurden mit Labor-XPS bei einer Anregungsenergie von $h\nu = 1486.7$ eV und einem Emissionswinkel von 0° aufgenommen.</i>	47
<i>Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der unterschiedlichen Reinigungsschritte und Strategien zur Aminogruppenbildung an der Si₃N₄-Oberfläche.</i>	52
<i>Tabelle 6: XPS Elementzusammensetzung und Element-Bindungsenergien (BE) einer gereinigten Si₃N₄-Oberfläche (3), einer Azid-terminierten Si₃N₄-Oberfläche (7) und einer geclickten Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C (9), Prozess A (10) und Prozess D (11) gefolgt von der CuAAC in Ethanol.</i>	66
<i>Tabelle 7: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Daten von einer mit BHF gereinigten Oberfläche (3) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in Ethanol geclickten Oberfläche nach der Azidierung nach Prozess C (9), Prozess A (10) und Prozess D (11) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).</i>	70
<i>Tabelle 8: Hochaufgelöste C 1s- und N 1s-SR-XP-Daten einer mit BHF gereinigten Oberfläche (3) und mit 1-Ethynyl-3,5-bis(trifluormethyl)benzol in tert-Butanol/Wasser geclickten Oberfläche nach der Azidierung mit Prozess C (12), Prozess A (13) und Prozess D (14) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).</i>	75
<i>Tabelle 9: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Click-Reaktion in tert-Butanol/Wasser. Gezeigt ist die Immobilisierungsausbeute bestimmt aus der ermittelten CF₃-Konzentration im hochaufgelösten C 1s-SR-XP-Spektrum ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm) bezogen auf eine vollständig funktionalisierte Oberfläche.</i>	77
<i>Tabelle 10: XPS Elementzusammensetzung von azidierten und mit Propargylchlorid geclickten Si₃N₄ Oberflächen. Gezeigt sind die Azidierungen mit Prozess C (TfN₃) jeweils nach der Click-Reaktion in Ethanol (34) bzw. ^tBuOH/H₂O (35) und Prozess A (NaN₃) jeweils nach der Click-Reaktion in Ethanol (32) bzw. ^tBuOH/H₂O (33).</i>	79
<i>Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Click-Chemie. Gezeigt ist die Ausbeute des immobilisierten F-substituierten Alkins nach der Azidierung in den unterschiedlichen Lösungsmitteln.</i>	80
<i>Tabelle 12: XPS Elementzusammensetzung einer gereinigten (3), einer nach Prozess C azidierten (5) Si₃N₄-Oberfläche, sowie Oberflächen, die mit Biotin-PEG-4-Alkin in Methanol/Wasser funktionalisiert und mit Streptavidin behandelt wurden, je nach Azidierung nach Prozess C (23), Prozess A (24) und Prozess D (25).</i>	85
<i>Tabelle 13: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (17) und mit Streptavidin (23) gebundenen Si₃N₄ Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C im Vergleich zu einer gereinigten NH_x-terminierten (3) und einer N₃-terminierten Si₃N₄ Oberfläche (7) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).</i>	87
<i>Tabelle 14: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (MeOH/H₂O) und mit Streptavidin gebundenen Si₃N₄-Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C (23), Prozess A (24) und Prozess D (25) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).</i>	90
<i>Tabelle 15: Hochaufgelöste N 1s- und C 1s-SR-XPS-Daten von biotinylierten (DMF/H₂O) und mit Streptavidin gebundenen Si₃N₄ Oberflächen nach der Azidierung mit Prozess C (26), Prozess A (27) und Prozess D (28) ($\vartheta=60^\circ$, $z_{95}=1.8$ nm für C 1s ($h\nu=385$ eV) und $z_{95}=2.3$ nm für N 1s ($h\nu=500$ eV)).</i>	92

<i>Tabelle 16: XPS Elementzusammensetzung einer gereinigten (3), einer mit 1,10-Phenanthrolin-5-carbonsäure modifizierten Si₃N₄-Oberfläche (29) und einer mit Kupfer(II)trifluormethoxyphenanthrolin-Komplex funktionalisierten Si₃N₄-Oberfläche (30).</i>	102
<i>Tabelle 17: Parameter Laserablationssystem NWR213</i>	124

10. Publikationsliste

Publikation

N. Lange, P.M. Dietrich, A. Lippitz, N. Kulak, W. E. S. Unger, New azidation methods for the functionalization of silicon nitride and application in copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), *Surf. Interface Anal.* **2016**, *48*, 621-625

Vortrag

XPS-Study of the formation of surface amino groups on silicon nitride and their application in click chemistry, **ECASIA 2015**, 16th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis, Granada, Spain

Posterpräsentation

Nuclease activity of copper(II)phenanthroline complexes immobilized on silicon nitride films, **8th Joint BESSY II User Meeting 2016**, Berlin Germany

A Direct Functionalization of Silicon Nitride Films: An Alternative to Silane Chemistry, **5. Berliner Chemie Symposium**, Berlin Germany

Formation of Surface Amino Groups and their Application in Click Chemistry: A Silane-Free Functionalization Strategy of Silicon Nitride, **7th Joint BESSY II User Meeting 2015**, Berlin Germany

XPS-Study of a New Azidation Method of Silicon Nitride, **Potsdam Days on Bioanalysis 2015**, Potsdam, Germany

Selective Modification of Silicon Nitride using Click Chemistry, **Potsdam Days on Bioanalysis 2014**, Potsdam-Golm, Germany

11. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und kenntlich gemachter Quellen angefertigt habe.