

Prozessentwicklung für die Automatisierung der Herstellung und Anwendung von hochdichten Peptidmicroarrays

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

der Fakultät für Maschinenbau, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. Sebastian Mathias Schillo

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2014

Hauptreferent: Prof. Dr. Volker Saile

Erster Korreferent: PD Dr. Alexander Nesterov-Müller

Zweiter Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Edgar Dörsam

Kurzfassung

Peptidmicroarrays, bestehend aus einer großen Vielfalt unterschiedlicher Peptide auf einer festen Oberfläche, können helfen, eine Vielzahl immunologischer und biochemischer Fragestellungen zu beantworten. Diese reichen von der Charakterisierung von Antikörpern im Serum von Patienten bis zur Erforschung von Protein-Bindungsdomänen oder Kinasen, die eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Signaltransduktion in Zellen spielen. Im Bereich der hochdichten Peptidmicroarrays gibt es bereits etablierte Prozesse, die jedoch für eine routinemäßige Verwendung jedoch nicht ausreichen und ergänzt werden müssen. Daher ist eine weitergehende Technologieentwicklung notwendig, die eine automatisierte Herstellung und die reproduzierbare Nutzung als Assay erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Prozesse entwickelt, die den Weg von händischer Arbeit in die Richtung automatisierter Prozesse mit einstellbareren Prozessparametern ebnet. Im Bereich der Herstellung wurde ein Verfahren entwickelt, welches Partikelschichten auf großer Fläche mit homogener und einstellbarer Schichtdicke im Mikrometerbereich ermöglicht. Nach der Konzeptionierung und dem Aufbau mehrerer Prototypen wurde die Beschichtung eingehend untersucht. Zudem wurden relevante Prozessparameter identifiziert. Mit diesem Wissen konnte unter Verwendung des sogenannten Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens die Eignung der Beschichtung für die routinemäßige Synthese von Peptidmicroarrays gezeigt werden. Die anschließende Weiterverarbeitung des Arrays durch den in der Arbeit entwickelten Transfer auf eine Zieloberfläche ermöglicht neben der Aufreinigung des Arrays auch neue Anwendungsmöglichkeiten, da sich die Synthesoberfläche für viele Assays nicht eignet. Der Übertrag ermöglicht daher beispielsweise die parallele Suche nach Peptiden mit katalytischen Eigenschaften durch einen Transfer auf einen Screening Chip. Nach der Konzeptionierung und dem Bau dreier Prototypen wurde der Übertrag hinsichtlich seiner kritischen Prozessparameter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit der entwickelten automatisierten Anlage, die eine Positionierung der Oberflächen für einen präzisen Übertrag der Peptidspots ermöglicht, ein robuster Prozess möglich ist. Als letzter Prozess wurde ein mikrofluidisches System für die Inkubation von Peptidmicroarrays mit Antikörpern oder dem Serum eines Patienten entwickelt. Im Vergleich zur Standard-Inkubation auf einem Schüttler konnte gezeigt werden, dass dieses System bei gleichzeitig verringerten Probevolumen reproduzierbarer arbeitet. Zudem ist während des Inkubationsprozesses eine Detektion der Bindungsereignisse über die integrierte Optik des Systems möglich. Dies eröffnet die Möglichkeit, Bindungskonstanten direkt zu bestimmen und somit Affinitäten der jeweiligen Peptide zu berechnen.

Abstract

Peptidemicroarrays consist of a large variety of peptides immobilized on a solid support. They are used in various biochemical applications such as protein-protein interactions or kinases, which are important for the regulation of the signal transduction in cells. Today many processes in the field ultra-high peptide-microarrays are performed manually and lack of reproducibility. Hence for the standard use of peptide-microarrays further technological development is required. In this thesis three automated processes are developed for the production, the purification and the incubation of ultra-high peptidemicroarrays. For the production of the arrays a deposition process of amino-acid-particles on a glass surfaces is required. After the design of the concept and the construction of several prototypes, the particle thin film is studied intensively. It is shown, that the particle thin film is homogenous over a large area and the reproducibility is within the specifications. To demonstrate the feasibility of the coating technique for the production process, a peptide array is synthesized. After the synthesis a transfer of the array on a target surface is necessary. This enables purification after synthesis and leads to novel applications, as the synthesis surface is not optimized for the readout of specific experiments. After the design of the concept, three prototypes were built and the transfer with a positioning of the surfaces is demonstrated. The automated device enables a transfer for the screening of catalytic peptides on a gold CMOS chip and a label free detection of antibodies. Furthermore up to 20 replicas can be produced: This is due to the high peptide concentration on the array, which is about 100 times higher than the concentration needed for the readout of the assay. After the transfer the array is incubated with analyte such as a patient's serum. In contrast to traditional incubation, the microfluidic device, developed in this thesis, is more robust with less usage of analyte. It features an online detection for the analysis of the binding process of antibodies to the peptides. Furthermore with the device, the incubation time is significantly reduced and the binding affinity can be determined.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	i
Abstract.....	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung.....	1
2 Peptidmicroarrays	3
2.1 Peptide – Aufbau und Synthese	3
2.2 Peptidmicroarrays - Einleitung und Herstellung.....	3
2.3 Herstellung mittels Selektivem Laser-Anschmelz-Verfahren.....	6
2.4 Folgeprozesse und Anwendungen	8
2.5 Entwicklungsmethodischer Ansatz der Arbeit.....	9
3 Aminosäurepartikelbeschichtung.....	11
3.1 Theorie der Partikelbeschichtung	11
3.1.1 Partikelherstellung und Charakterisierung	11
3.1.2 Partikelbeschichtung.....	12
3.1.3 Stand der Technik.....	13
3.2 Profilfindung	13
3.3 Ideenfindung	14
3.4 Vorversuche zur Ablagerung von Aminosäurepartikeln	14
3.5 Bewertung der Vorversuche.....	17
3.5.1 Bewertungskriterien für die durchgeführten Machbarkeitsstudien	17
3.5.2 Bewertung nach VDI 2225	17
3.6 Prinzipmodellierung der aerosolunterstützten Ablagerung von Aminosäurepartikeln	18
3.6.1 Aerosolerzeugung	19
3.6.2 Aerosolladung.....	20
3.6.3 Aerosolabscheidung.....	21
3.7 Gestaltmodellierung der Beschichtungsanlage	23
3.7.1 Konzept der Automatisierung	24
3.8 Methoden zur Charakterisierung der Schicht.....	27
3.8.1 Herstellung der Partikelschichten	28

3.8.2	Messung von Rauigkeit und Schichtdicke.....	28
3.8.3	Messung der Porosität.....	28
3.8.4	Messung der Partikelladung.....	30
3.8.5	Einfluss der Schichtdicke auf das Laserergebnis	30
3.8.6	Durchführung einer Dipeptidsynthese	31
3.9	Ergebnisse	32
3.9.1	Homogenität der Schicht.....	32
3.9.2	Einfluss der Felder auf die Abscheidung.....	32
3.9.3	Reproduzierbarkeit des Prozesses	34
3.9.4	Vergleich der Abscheiderate unterschiedlicher Partikeln	34
3.9.5	Porosität	35
3.9.6	Einfluss der Schichtdicke auf das Laserergebnis	36
3.9.7	Peptidsynthese als Machbarkeitsstudie	37
3.10	Diskussion der Ergebnisse	38
3.11	Einsatz der Beschichtung für andere Anwendungen.....	39
4	Entwurf eines automatisierten Herstellungsprozesses	41
4.1	In-Prozess-Schichtdickenmessung	41
4.2	Konzept der automatisierten Peptidarrayherstellung	45
5	Transfer von Peptidmicroarrays	47
5.1	Theorie des Transfers von Molekülbibliotheken.....	47
5.1.1	Transfer im Allgemeinen	47
5.1.2	Transfer von ultra-hochdichten Peptidmicroarrays.....	48
5.1.3	Transfer auf sensible Oberflächen	49
5.2	Profilfindung.....	49
5.3	Ideenfindung	50
5.3.1	Ideenfindung zum kraftgesteuerten Übertrag.....	50
5.3.2	Vorversuche zum kraftgesteuerten Übertrag	51
5.3.3	Ideenfindung zum positionsgesteuerten Übertrag.....	52
5.4	Prinzipmodellierung der Ideen.....	52
5.4.1	Unterteilung des Prozesses	52
5.4.2	Anforderungen.....	53
5.4.3	Gestaltmodellierung der Anlage für den kraftgesteuerten Übertrag.....	54
5.4.4	Positionierung der Oberflächen beim kraftgesteuerten Übertrag.....	54
5.4.5	Gestaltmodellierung der Anlage für den positionsgesteuerten Übertrag.....	57

5.5	Gestaltmodellierung	58
5.5.1	Maschine 1: Einsatz im Labormaßstab.....	58
5.5.2	Maschine 2: laterale Positionierung.....	59
5.5.3	Maschine 3: positionsgesteuerter Übertrag.....	63
5.6	Methoden	65
5.6.1	Druckmessfolie	65
5.6.2	Laterale Positioniergenauigkeit der kraftgesteuerten Anlage.....	65
5.6.3	Genauigkeit der positionsgesteuerten Anlage	66
5.7	Ergebnisse.....	67
5.7.1	Homogenität der Anpresskraft.....	67
5.7.2	Genauigkeit bei der Verwendung von Positionierstiften	69
5.7.3	Positioniergenauigkeit beim Prismenansatz.....	70
5.7.4	Vollflächiger Übertrag eines Peptidmicroarrays.....	71
5.7.5	Positionsgesteuerter Übertrag auf einen DropletMicroarray	71
5.8	Diskussion	74
6	Mikrofluidische Inkubationskammer.....	75
6.1	Theorie.....	75
6.1.1	Reaktionskinetik	75
6.1.2	Mikrofluidik.....	77
6.1.3	Mikrofluidische Grundlagen	77
6.2	Profilfindung.....	78
6.3	Stand der Technik.....	78
6.4	Ideenfindung	79
6.5	Prinzipmodellierung.....	80
6.5.1	Anforderungen	80
6.5.2	Technische Umsetzung.....	80
6.6	Gestaltmodellierung	82
6.7	Methoden für die Charakterisierung der Mikrofluidik und der Optik.....	83
6.7.1	Simulation mit ANSYS-FLUENT	83
6.7.2	Messung der Strömung im Kanal	84
6.7.3	µPIV	84
6.7.4	µAPT.....	85
6.8	Ergebnisse.....	86
6.8.1	Simulation der Strömung im Kanal.....	86
6.8.2	Charakterisierung der Geschwindigkeitsprofile	87

6.8.3	Vergleich der Flussrichtungen mit dem Biotin/Streptavidin System	91
6.8.4	Vergleich der Mikrofluidischen Inkubation mit dem Stand der Technik	94
6.8.5	Aufnehmen einer Bindungskonstante	95
6.8.6	Einfluss der Geschwindigkeit auf das Färbeergebnis	96
6.9	Diskussion	97
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	100
	Literaturverzeichnis.....	A
	Abbildungsverzeichnis.....	E
	Abkürzungsverzeichnis.....	H

1 Einleitung

Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms Anfang 2003 [1] richtet sich die Aufmerksamkeit der Forschung zunehmend auf das Verständnis des menschlichen Proteoms. Durch neue Technologien, wie beispielsweise die Hochdurchsatzsequenzierung von Genen, auch Next-Generation-Sequenzierung genannt, sind die Fortschritte erheblich. Im Gegensatz dazu bergen die Methoden im Bereich der Proteomik noch große Herausforderungen für den standardmäßigen Einsatz im Alltag. Dies lässt sich auf die hohe Komplexität der Technologien bei der Herstellung und im Einsatz in Experimenten zurückführen. Speziell für die Entwicklung neuartiger Medikamente und Therapien, die auf den Patienten gezielt zugeschnitten sind, ist eine weitergehende Technologieentwicklung im Bereich der Proteomik notwendig [2]. Dieser Bereich der sogenannten personalisierten Medizin wird auch im „Horizont 2020“-Förderprogramm, der Leitinitiative der Strategie Europa 2020, als Kernthema für zukünftige Innovation und Forschung im Bereich Technologie und Medizin dargestellt [3]. Bereits heute gibt es verschiedene Verfahren, die das Potenzial besitzen, eine personalisierte Medizin zu ermöglichen. Dazu zählen die Protein- und Peptidmicroarrays, die ein Auslesen von Teilen des Immunsystems eines Patienten ermöglichen. Das Auslesen erfolgt dabei durch eine Bindung der im Serum enthaltenen Antikörper an entsprechende Peptide auf einer starren Oberfläche. Über eine Korrelation dieser Bindungsereignisse und das Wissen über die Affinität der unterschiedlichen Peptide zu den Antikörpern lässt sich dann eine qualitative Aussage über die Menge und Sorte der im Serum vorhandenen Antikörper treffen. Aktuelle Forschungsthemen in diesem Bereich konzentrieren sich sowohl auf die Herstellung der Protein- und Peptidmicroarrays als auch auf die Entwicklung neuartiger Anwendungen. Bei der Herstellung geht der Trend zu immer dichteren Arrays: ultra-hochdichte Peptidmicroarrays senken zum einen die Synthesekosten pro Peptid und zum anderen die des benötigten Analyten, da sie als Hochdurchsatzscreening eingesetzt werden können. Die Entwicklung neuartiger Anwendungen ermöglicht die Suche nach Krebstherapeutika [4] oder die zukünftige Detektion von Katalysatoren auf Peptidbasis. Für reproduzierbare Aussagen der Experimente müssen daher standardisierte und damit reproduzierbare Prozesse und Anlagen entwickelt werden, die eine breite Anwendung finden, beispielsweise im klinischen Alltag.

1.1 Zielsetzung

Die bereits etablierten Prozesse für die Herstellung und Validierung der Experimente sind für ultra-hochdichte Peptidmicroarrays nur bedingt geeignet. Ziel der Arbeit ist die Ergänzung der vorhandenen Methoden durch robuste Prozesse, sodass zukünftig eine Technologieplattform im Bereich von Herstellung und Anwendung ultra-hochdichter Peptidmicroarrays möglich wird. Dabei soll vor allem der Anteil manueller Prozessschritte durch den Einsatz automatisierter Verfahren mit einstellbareren Prozessparametern reduziert werden. Im Speziellen werden drei reproduzierbare Prozesse entwickelt, um die hohe

Komplexität der ultra-hochdichten Peptidmicroarrays beherrschbar zu machen und die Anwendungen dieser Technologie so zu vereinfachen, dass sie in großem Maßstab eingesetzt werden kann.

Im Bereich der Herstellung von hochdichten Peptidmicroarrays wird unter anderem das sogenannte „Selektive Laser-Anschmelz-Verfahren“ genutzt. Für einen routinemäßigen Einsatz in der Peptidsynthese muss ein Beschichtungsprozess von Glassubstraten mit Aminosäurepartikeln entwickelt werden. Dabei ist die Homogenität der Partikelschicht auf der Fläche eines Glasobjektträgers von entscheidender Bedeutung. Nach der Herstellung sollte der Peptidmicroarray von der Syntheseoberfläche auf eine Zieloberfläche transferiert werden. Neben der dadurch erzielten Aufreinigung im Arrayformat können auch neue Assays entwickelt werden, da sich die Syntheseoberfläche nicht für alle Assays eignet. Der Übertrag ermöglicht daher beispielsweise eine Untersuchung der Ladungstransportmechanismen in Peptiden nach dem Übertrag der Peptide auf einen Screening-Chip oder das Screening von katalytischen Aktivitäten von Peptiden auf Polymermembranen. Nach der Herstellung und der Aufreinigung werden die Peptidmicroarrays je nach Anwendung mit Antikörpern oder dem Serum eines Patienten inkubiert. Aufgrund des hohen Verbrauchs an Analyt und der langen Inkubationszeit soll ein automatisierter Prozess für die Inkubation entwickelt werden, der eine In-Prozess-Messung der Bindungsereignisse ermöglicht. Dies eröffnet die Möglichkeit, Bindungskonstanten direkt zu bestimmen und somit Affinitäten der jeweiligen Peptide zu bestimmen.

Durch diese drei Prozesse werden sowohl im Bereich der Herstellung, der Aufreinigung und der Inkubation der ultra-hochdichten Peptidmicroarrays, die Grundlagen geschaffen, eine gemeinsame Technologieplattform zu ermöglichen. Mit dieser lassen sich zukünftig eine Vielzahl an Fragestellungen beantworten, beispielsweise das Auslesen des Immunsystems eines Patienten und der Kampf gegen Krankheiten durch das Verständnis der zugrundeliegenden Wirkmechanismen.

2 Peptidmicroarrays

Für ein Verständnis der zu entwickelnden Prozesse werden in diesem Kapitel die Grundlage der Synthese von Peptiden und die Herstellung von Peptidmicroarrays beschrieben und die Anwendungsmöglichkeiten dargestellt.

2.1 Peptide – Aufbau und Synthese

Als Peptide werden kurze Proteinfragmente bezeichnet, die aus linear verknüpften Aminosäuren bestehen. In der Natur gibt es 23 proteinogene Aminosäuren, die einen unterschiedlichen Aufbau aufweisen. Von diesen wird im Folgenden nur die sogenannte α -Aminosäure näher beschrieben. Diese besteht aus einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) und einem charakteristischen Rest am α -Kohlenstoffatom (siehe Abbildung 2.1).

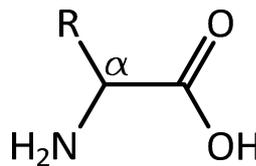


Abbildung 2.1 Aufbau einer α -Aminosäure

Der Rest bestimmt die spezifischen Eigenschaften (unpolar, ungeladen polar, geladen) der unterschiedlichen Aminosäuren. In der vorliegenden Arbeit werden die Peptide aus Aminosäuren auf Basis der Festphasensynthese nach Merrifield synthetisiert [5]. Die Peptidsynthese erfolgt dabei an einer festen, funktionalisierten Oberfläche. An diese Oberfläche werden aus der Lösung Aminosäuren mit einer aktivierten Aminogruppe gekuppelt. Um ein ungewolltes Reagieren zu verhindern, werden die Aminogruppe und die Seitenkette der Aminosäure mit einer Schutzgruppe versehen. Diese wird vor der Kupplung der nächsten Aminosäure des Peptids entfernt. Zudem ist die Aminogruppe aktiviert worden, um die Bindung mit der Carboxylgruppe zu ermöglichen. Der Ablauf der Synthese ist in Baumann zusammengefasst [6]. In dieser Arbeit werden Glassubstrate mit einer Aminogruppen-Funktionalisierung verwendet. Im Anhang A ist die Funktionalisierung näher beschrieben.

2.2 Peptidmicroarrays - Einleitung und Herstellung

Für die Erforschung der grundlegenden Eigenschaften von Proteinen eignen sich Peptide, da sie sich durch ihre geringe Komplexität auszeichnen: Im Gegensatz zu Proteinen falten sich die in der Arbeit verwendeten Peptide (bis zu 20 Aminosäuren) in der Regel nicht zu 3-dimensionalen Strukturen. Für Experimente können die Peptide entweder in Lösung vorliegen oder die Peptide werden auf einem festen

Substrat immobilisiert. Letzteres kann zwar die Bindung des Peptids an ein Zielmolekül aufgrund sterischer Hinderung einschränken, ermöglicht aber eine gute Handhabung des Trägers und eine schnelle Validierung der Experimente, beispielsweise mit Mikroskopen. Zudem sind Peptidarrays als Hochdurchsatzscreening-Verfahren einsetzbar, mit denen man parallel hunderte von Experimenten gleichzeitig evaluieren kann. Die Immobilisierung erfolgt in sogenannten Spots, Bereichen identischer Peptide, die in einem Arrayformat angeordnet werden. Ein wichtiges Merkmal ist die Auflösung des Arrays (Anzahl der Peptidspots pro cm^2). In diesem Zusammenhang sind die Spotgröße und der Abstand der Spotmittelpunkte, der sogenannte Pitch, wichtige Kenngrößen.

Die grundsätzliche Herausforderung bei der Herstellung von ultrahochdichten Peptidmicroarrays ist die gezielte räumliche Platzierung der Aminosäurederivate auf der Oberfläche, sodass die Spots des Arrays voneinander getrennt bleiben. Diese Platzierung wird im Folgenden als Strukturierung der Aminosäuren bezeichnet. Diese Strukturierung für die Herstellung von Peptidmicroarrays lässt sich in zwei Kategorien fassen:

Flüssigkeitsbasierte Verfahren: Die Synthese auf einem festem Substrat erfolgt mit Aminosäurederivaten aus der flüssigen Phase.

Partikelbasierte Peptidsynthese: Die Aminosäurederivate werden in einer festen und inerten Polymermatrix eingebettet. Diese kann zu Mikropartikeln verarbeitet und auf einem Substrat aufgebracht werden. Werden die Mikropartikel auf Temperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur erwärmt, verhalten sich diese als hochviskoses Lösungsmittel, in dem die Aminosäuren zur Oberfläche diffundieren und an das feste Substrat kuppeln können (vergleiche Abbildung 2.2).

Zu den flüssigkeitsbasierten Verfahren zählen die SPOT-Synthese [7] und die lithografische Synthese [8]. Die SPOT-Synthese arbeitet mit Aminosäurederivaten in Lösungsmitteln, die auf einen Träger (oftmals Cellulose) zielgenau pipettiert werden. Nach der Kupplung der Aminosäuren an die Oberfläche erfolgen weitere chemische Prozessschritte, bevor das nächste Aminosäurederivat pipettiert werden kann. Eine Weiterentwicklung der Methode führte zu einer automatisierten Herstellung mit Spotrobotern [9] oder einem Einsatz von Tintenstrahldruckern [10].

Im Gegensatz dazu wird die Strukturierung bei den fotolithografischen Peptidmicroarray-Herstellungsverfahren durch fotolabile Schutzgruppen der Aminosäuren ermöglicht. Durch eine Bestrahlung mit Licht werden die Schutzgruppen abgespalten und die Aminosäuren können reagieren. Die Strukturierung erfolgt dabei über eine Fotomaske. Der Vorteil besteht in der hohen Auflösung; die Nachteile sind Stabilitätsprobleme der Schutzgruppe und die geringe Flexibilität: für jede Aminosäure wird eine eigene Maske benötigt. Einige der Nachteile können durch Weiterentwicklung, beispielsweise maskenlose Technologien, ausgeglichen werden [11].

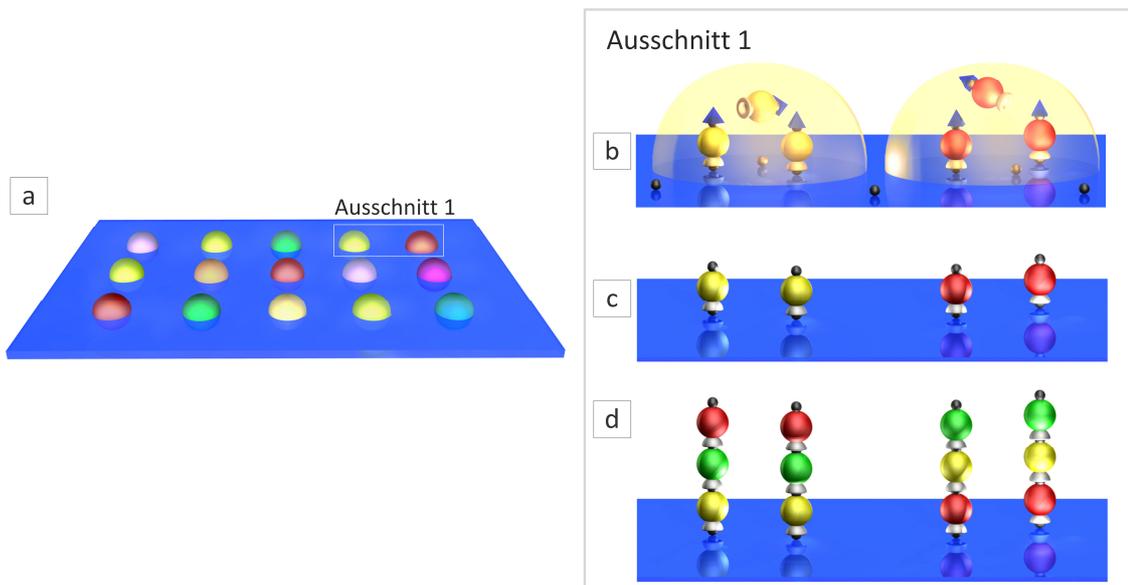


Abbildung 2.2 Prinzip der partikelbasierten Peptidsynthese. a) Auf einem funktionalisierten Glasträger werden Aminosäurepartikel strukturiert. b) Beim Erhitzen des Trägers über die Glasübergangstemperatur der Partikelmatrix wird diese hoch viskos, sodass die Aminosäuren im Inneren der Partikel diffundieren können und an das Substrat kuppeln. c) Durch verschiedene Waschschrte werden überschüssige Aminosäuren und die Partikelmatrix entfernt. Die freien Aminogruppen werden blockiert und die Schutzgruppe wird entfernt. c) Durch zyklisches Wiederholen der Schritte a)-c) wird ein Peptidmicroarray synthetisiert. [12]

Im Gegensatz zu den flüssigkeitsbasierten Verfahren haben die partikelbasierten Methoden zur Peptidmicroarrayherstellung mehrere Vorteile. Die in Partikel eingebetteten Aminosäuren sind lange Zeit stabil und degradieren nicht [13]. Zudem erfolgt die Kuppelung der Aminosäuren nach der Strukturierung aller Aminosäuren einer Lage, statt nach jeder Aminosäure. Dies ermöglicht eine Einsparung von bis zu 19 chemischen Prozessschritten pro Lage (näher beschrieben in Anhang A). Zur technischen Umsetzung der partikelbasierten Peptidsynthese wurden mehrere Verfahren entwickelt, die sich in der Strukturierung der Aminosäurepartikel unterscheiden.

Der Peptidlaserdrucker folgt den physikalisch-technischen Wirkprinzipien eines Farblaserdruckers. Bis zu 20 auf den Druckprozess angepasste Aminosäurepartikel werden über Druckwerke auf ein funktionalisiertes Glassubstrat gedruckt [13]. Nach dem Druck einer kompletten Aminosäurelage werden die Partikel in einem Ofen erwärmt und die Aminosäuren kuppeln. Der Vorteil des Peptidlaserdruckers besteht in dem wirtschaftlichen und robusten Druckprozess. Nachteilig ist die laterale Ausdehnung der Spots von $200\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$. Dies ergibt eine Spotdichte von $800\ \text{Peptiden pro cm}^2$.

Eine höhere Auflösung bietet der für die kombinatorische Synthese von Peptiden entwickelte CMOS-Mikrochip [14]. Die Pixel des Mikrochips können getrennt voneinander auf ein elektrisches Potenzial von bis zu 100 Volt gesetzt werden. Durch das elektrische Feld werden die als Aerosol in Luft dispergierten und geladenen Partikel in Richtung des Pixels beschleunigt und dort abgelagert. Die Strukturierung erfolgt in

diesem Fall durch ein gezieltes An- und Ausschalten der Pixel, und zwar mit entsprechender Ablagerung unterschiedlicher Partikelsorten auf jeweils einem anderen Pixel. Nach der Ablagerung aller Aminosäurepartikel auf der Chipoberfläche wird der Kupplungszyklus durchgeführt. Die Vorteile bestehen hier in der hohen Auflösung von 40.000 Peptidspots pro cm^2 und einer definierten Geometrie der Spots. Nachteile sind die aufwendige Funktionalisierung der Chipoberfläche und die harschen Synthesebedingungen: die Lösungsmittel können den Chip angreifen. Eine Weiterentwicklung kombiniert die hohen Auflösungen mit einem inerten Syntheseträger [15].

Ein weiteres Verfahren zur Strukturierung von Aminosäurepartikeln für die partikelbasierte Peptidsynthese ist das Selektive Laser-Anschmelz-Verfahren. Dieses stellt die Basis für die in der Arbeit entwickelten Prozesse dar und wird im Folgenden näher beschrieben.

2.3 Herstellung mittels Selektivem Laser-Anschmelz-Verfahren

Das Selektive Laser-Anschmelz-Verfahren nutzt einen Laserpuls, um eine Aminosäurepartikelschicht auf einem Träger zu strukturieren. Das Selektive Laser-Anschmelz-Verfahren lässt sich in mehrere Schritte unterteilen, die zyklisch durchlaufen werden [16]. Pro Prozesszyklus wird eine weitere Aminosäurelage des Peptidmicroarrays gekuppelt, bis die endgültige Peptidlänge erreicht ist. Der Prozess ist schematisch in Abbildung 2.3 gezeigt. Zuerst wird ein mit Aminogruppen funktionalisierter Glasträger mit einer Sorte von Aminosäurepartikeln beschichtet (Abbildung 2.3a). In Märkle wird dafür ein Aerosolgenerator verwendet, der die Partikel in Luft dispergiert und auf dem Substrat ablagert [16]. Dann werden die Partikel an der Stelle, an der später die entsprechende Aminosäure kuppeln soll, selektiv durch einen Laserpuls zu Spots von 10-30 μm Durchmesser angeschmolzen (Abbildung 2.3b). Eine Kupplung der Aminosäuren findet in diesem Schritt nicht statt, da die Zeitdauer des Laserpulses für eine Diffusion der Aminosäure zum Substrat zu gering ist. Im nächsten Prozessschritt (Abbildung 2.3c) werden nicht angeschmolzene Partikel mit Druckluft vom Substrat entfernt. Die mit dem Laser bestrahlten Spots haben durch ihre Geometrie bedingt eine größere Kontaktfläche mit dem Substrat, die eine höhere Adhäsionskraft zur Folge hat. Daher ist es möglich, nur die nicht fixierten Mikropartikel selektiv zu entfernen. Der beschriebene Prozess wird mit allen Aminosäurepartikeln einer Lage wiederholt (Abbildung 2.3c - e), bis der Träger vollständig strukturiert ist. Dann wird dieser chemisch weiterverarbeitet: die Aminosäuren kuppeln, die Aminogruppen der Oberfläche werden blockiert (das sogenannte capping) und die Aminosäuren für den nächsten Kupplungszyklus entschützt. Weitere Informationen sind in Anhang A dargestellt. Auf das Substrat mit den gekuppelten Aminosäuren wird nun eine weitere Beschichtung aufgebracht und belichtet (Abbildung 2.3 h). Die Prozessschritte Beschichtung, Belichten mit dem Laser und chemische Prozesse werden mehrfach durchlaufen, um einen hochdichten Peptidmicroarray zu erhalten (Abbildung 2.3 h).

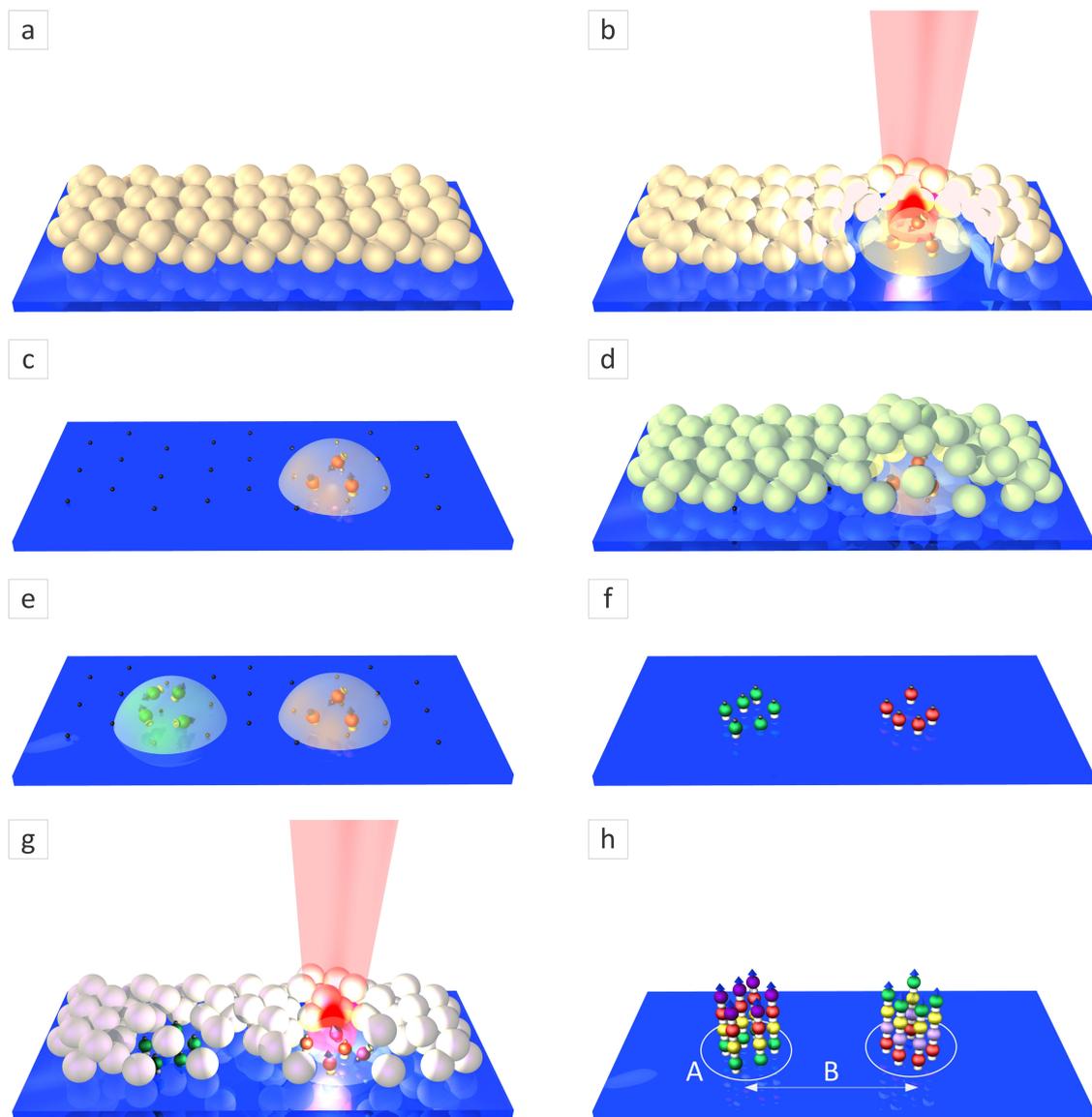


Abbildung 2.3 Verfahrensschritte des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahren. a) Ein funktionalisiertes Substrat wird homogen mit einer Sorte Aminosäurepartikel beschichtet. b) Die Partikelschicht wird strukturiert: Über einen Laserpuls werden Partikel lokal angeschmolzen. c) Nicht angeschmolzene Partikel werden entfernt. d)-f) Das Substrat wird mit einer weiteren Aminosäurepartikelsorte beschichtet und die Schicht wird strukturiert. f), g) Nach dem Kuppeln der Aminosäure wird die nächste Aminosäurelage hergestellt. h) Vollständig synthetisierter Peptidmicroarray mit Spot A und Pitch B.

Vorteile des Prozesses liegen in der hohen Peptiddichte des hergestellten Arrays mit einem Pitch von $50\ \mu\text{m}$ und einer Spotgröße von kleiner $20\ \mu\text{m}$. Des Weiteren kann der Pitch variiert werden, da dieser von der Position des Laserstrahls abhängig ist. Im Gegensatz dazu ist der Pitch des Peptidsynthesechips oder der Lithografischen Verfahren nicht veränderlich, da er vom Pixelabstand von der Strukturbreite der Belichtungsmaske abhängt. Nachteilig wirkt sich der hohe Partikelverbrauch aus. Spezialbausteine (z. B. Aminosäure mit einem Chromophoren als Rest), die für die Peptidsynthese in Partikel eingebettet wer-

den, sind teuer und liegen oft nur in geringen Mengen vor. Ein weiterer Nachteil liegt in der seriellen Abarbeitung der Partikelschichtstrukturierung, die die Herstellungszeit eines Peptidarrays limitiert. Eine Automatisierung und eine damit verbundene Optimierung der Prozessschritte für den zeitaufwendigen Prozess der Beschichtung und des Belichtens mit dem Laser sind daher erforderlich.

2.4 Folgeprozesse und Anwendungen

Die Ausbeute der Synthese von Peptiden ist abhängig von der Kupplungseffizienz zweier Aminosäuren während des Kupplungsschritts. Diese variiert je nach Aminosäurepaar zwischen 95 % und 60 % [17]. Dies bedeutet, dass sich mit fortschreitender Synthese eine steigende Anzahl von gecappten Peptiden, die nicht mehr verlängert werden, auf dem Syntheseträger befindet. So sind beispielsweise nach 20 Syntheszyklen, unter der Annahme einer hohen Kupplungseffizienz von 95 %, nur noch rund 36 % der Peptide vollständig synthetisiert. Die hohe Zahl an Syntheseabbruchprodukten, die die Bindung des Analyten beeinflussen können, vermindert daher die Aussagekraft der Experimente und macht ein Aufreinigen der Peptidmicroarrays sinnvoll. Das Aufreinigen kann, wie von Schirwitz und Löffler, gezeigt [18], durch einen Übertrag auf eine Zieloberfläche erfolgen: nur die vollständig synthetisierten Peptide werden übertragen, die Abbruchprodukte werden gewaschen.

Neben der Aufreinigung hat ein Übertrag weitere Vorteile. In vielen Fällen eignet sich die Synthesoberfläche nicht für den Assay. Andere Substrate wie beispielsweise Folien, auf Mikrochips aus Gold basierende Sensoren oder Tropfenarrays ermöglichen eine breitere Anwendung von Peptidmicroarrays. Ein weiterer Aspekt ist die Möglichkeit, Arrays zu vervielfältigen, da die Synthesedichte an Peptiden pro Fläche fertigungsbedingt mindestens 10-mal höher ist als notwendig. Dies ermöglicht einen wirtschaftlicheren Einsatz von hochdichten Mikroarrays in Hochdurchsatzverfahren, um beispielsweise immunologische Fragestellungen zu untersuchen.

Diese sogenannten Immunassays arbeiten mit Antikörpern aus Lösung, die mit dem Antigen, im vorliegenden Fall mit dem Peptidmicroarray, inkubiert werden. Diese Versuche benötigen eine große Anzahl an Pipettiervorgängen und die Inkubation findet meist auf einem Schüttler statt. Dies führt sowohl zu einem hohen Verbrauch an Analyt (z. B.: Antikörper) als auch zu einem großen Arbeitsaufwand, sodass die Effizienz der Prozesse gering ist. Eine Automatisierung der Prozessschritte kann daher einen Beitrag leisten, Anwendungen von Peptidarrays in Immunassays standardisiert durchzuführen. Dabei wäre es sinnvoll, die Inkubation und die Auslese der Bindungsaktivitäten in einem Gesamtsystem zu kombinieren. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in Form einer mikrofluidischen Inkubationskammer entwickelt.

2.5 Entwicklungsmethodischer Ansatz der Arbeit

Aufgrund der Komplexität der in Kapitel 2.3 beschriebenen Teilprozesse werden in dieser Arbeit verschiedene Methoden der Entwicklungsmethodik genutzt. Eine einheitliche Entwicklungsmethodik unterstützt das Konstruieren und Entwerfen technischer Produkte und Produktionsprozesse [19]. Diese umfasst eine Vielzahl von Werkzeugen wie beispielsweise standardisierte Vorgehenspläne oder Lösungsfindungsmethoden, um den Entwickler während der Projektphasen zu unterstützen.

*„Angesichts der großen Bedeutung einer rechtzeitigen Entwicklung marktfähiger Produkte ist ein Vorgehen zur Entwicklung guter Lösungen nötig, das **planbar, flexibel, optimierbar und nachprüfbar** ist. Ein solches Vorgehen ist nur realisierbar, wenn Konstrukteure über das notwendige Fachwissen hinaus **methodisch-systematisch** arbeiten können und eine solche Arbeitsmethodik verlangt bzw. durch organisatorische Maßnahmen unterstützt wird.“*

Pahl und Beitz, 2006

Da verschiedene Ansätze zur Entwicklungsmethodik existieren [20-22], sollen im Folgenden verschiedene Systeme kurz charakterisiert werden. Nach VDI 2221 sind vier Hauptphasen bei der methodischen Entwicklung zu unterscheiden: das Planen und Klären der Aufgabe, das Konzipieren mit der prinzipiellen Festlegung der Lösung, das Entwerfen mit der Modellierung der Gestalt und die Ausarbeitungsphase, bei der die Herstellung des Produktes festgelegt wird. Diese Hauptphasen werden im Entwicklungsmodell von Pahl und Beitz [19] weiter präzisiert. Wichtig ist die nicht sequentielle Natur des Produktentwicklungsprozesses. Durch eine Validierung muss das Ergebnis der jeweiligen Entwicklungsphasen mit dem erwünschten Resultat verglichen werden und es muss gegebenenfalls reagiert werden.

Diese Methoden werden in der vorliegenden Arbeit für die Entwicklung der Prozesse genutzt. Dabei ist jedes Kapitel entsprechend der Vorgehensweise unterteilt: Nach einer Einführung in die grundlegenden Bereiche der Theorie und der Präsentation des Stands der Technik wird die Entwicklungsaufgabe in einer Profildefinition zusammengefasst. Dann werden prinzipielle Lösungsmöglichkeiten erörtert und bewertet. Die Entwicklung der ausgewählten Lösung wird geschildert und die Ergebnisse werden in einem weiteren Kapitel diskutiert.

Die Einteilung der Arbeit erfolgt anhand der entwickelten Prozesse: In Kapitel 3 wird die Entwicklung der Beschichtung von Substraten mit Aminosäurepartikeln dargestellt. Die Integration der Prozessschritte des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens zu einer Anlage für die automatisierte Herstellung der Peptidarrays ist in Kapitel 4 beschrieben. Kapitel 5 stellt die Entwicklung des Übertrags von Peptidmicroarrays auf verschiedene Zieloberflächen dar. Kapitel 6 beschreibt die Entwicklung einer mikrofluidischen Kammer für die Inkubation mit Antikörpern und einer In-Prozess-Detektion der Antikörper-Peptidbindung.

3 Aminosäurepartikelbeschichtung

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben stellt die Beschichtung des Syntheseträgers mit Aminosäurepartikeln ein Teilprozess des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens dar. Dazu müssen die hergestellten Partikel homogen auf einer Fläche abgelagert werden. Die Entwicklung des Prozesses wurde hinsichtlich des nachfolgenden Laserschrittes optimiert, da die Geometrie der Spots maßgeblich von den Eigenschaften der Aminosäurepartikelschicht abhängt. Vor der Darstellung der systematischen Entwicklung des Beschichtungsprozesses werden im nächsten Abschnitt die relevante Theorie und der Stand der Technik zusammengefasst.

3.1 Theorie der Partikelbeschichtung

3.1.1 Partikelherstellung und Charakterisierung

Die in der Arbeit verwendeten Aminosäurepartikel bestehen aus einem chemisch inerten Polymerharz (Styrol-Acryl-Copolymer), aus Aminosäurederivaten und aus Grafitnanopartikeln, die zur Erhöhung der Absorption der Laserstrahlung eingebracht werden. Die Herstellung erfolgt entweder durch einen Mahlprozess mit einer Luftstrahlmühle oder einen Sprühtrocknungsprozess. Bei beiden Herstellungsverfahren werden die Bestandteile in einem Lösungsmittel (Dichlormethan) gelöst und vermischt. Bei dem Mahlprozess wird diese Mischung getrocknet, grob gemahlen und dann in einer Luftstrahlmühle fein gemahlen. Dabei werden die Partikel in einem Luftstrahl dispergiert und beschleunigt. Beim Aufeinanderprallen mehrerer Partikel werden diese zerkleinert. Durch Einstellung der Mahlparameter (Druck, Zeit) kann die gewünschte Partikelgröße erreicht werden. Beim Sprühtrocknungsprozess wird die flüssige Mischung mit hohem Druck mittels Sprühdüse in feine Tröpfchen dispergiert. Das Lösungsmittel verdampft und die festen Mikropartikel bleiben zurück. Die Herstellung erfolgte durch Münster und ist in [23] näher beschrieben.

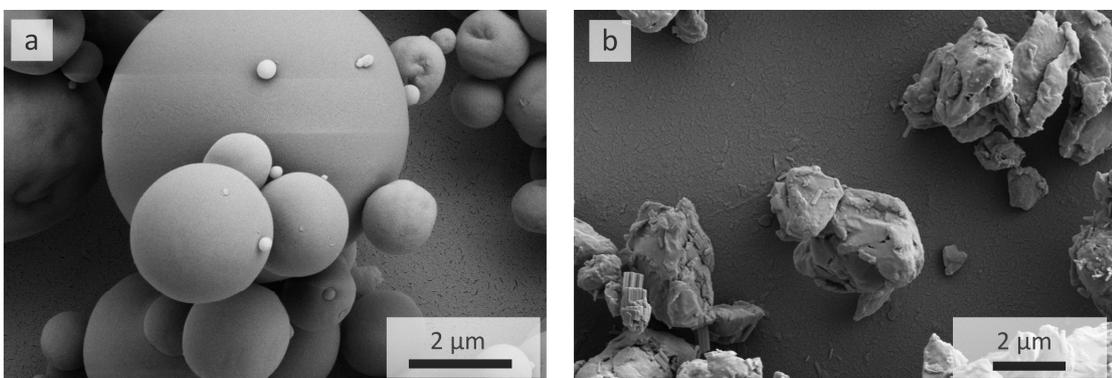


Abbildung 3.1 Geometrie der Aminosäurepartikel. a) Mit dem Sprühtrockner hergestellte Partikel, b) Partikel aus der Luftstrahlmühle. [23]

Aufgrund der Herstellung besitzen die Partikel unterschiedliche Eigenschaften. Für die Quantifizierung dieser Eigenschaften können unterschiedliche Merkmale definiert werden: die Größe der Partikel, deren Größenverteilung und die Geometrie der Partikel [24, 25]. Die Definition der Größe der Partikel geschieht meist als Äquivalenzdurchmesser einer Kugel mit demselben Volumen des Partikels [26]. Dies ist vor allem in Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Luftstrahlmühlenpartikel wichtig, da diese keine sphärische Geometrie besitzen. Somit kann sich die wahre Größe der Partikel von der nominalen unterscheiden. Eine weitere wichtige Kenngröße ist die Größenverteilung des Partikelkollektivs. Zur Ermittlung der Größenverteilung stehen mehrere Verfahren zur Verfügung: Neben Sieb- und Sedimentationsverfahren sind auch optische Verfahren weit verbreitet. Letztere eignen sich gut für die In-Prozess-Messung der Partikelgrößenverteilung. Eine ausführliche Übersicht ist in Kulkarni gegeben [27]. In der Arbeit wurde die Partikelgrößenverteilung mit dem Mastersizer 2000 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg) untersucht. Dieser dispergiert die Partikel in Luft und misst die Streuung eines Laserstrahls an den Partikeln in einem definierten Messvolumen. Über das gestreute Licht kann mittels theoretischer Modelle (Fraunhofer- oder Mie-Theorie) die Größenverteilung der Partikel berechnet werden.

3.1.2 Partikelbeschichtung

Um Mikro- und Nanopartikel verfahrenstechnisch einzusetzen zu können, werden diese meist in Flüssigkeiten oder Gasen dispergiert [26]. Nach dem Dispergiervorgang können Partikelbeschichtungen erzeugt werden, indem man die Partikel auf dem Substrat abscheidet und gegebenenfalls das Dispergiemedium entfernt. Ein Beispiel für dieses Vorgehen ist die Herstellung von Partikelschichten mittels Spin-Coating [28]. In der vorliegenden Arbeit gestaltet sich der Dispergiervorgang in Flüssigkeiten für die vorhandenen Aminosäurepartikel schwierig: Da die Oberfläche der Partikel hydrophob ist, lassen sich die Partikel nicht direkt in eine wässrige Dispersion bringen. Der Einsatz von Liganden oder Tensiden kann jedoch eine Dispergierung unterstützen. Eine Dispergierung der Partikel in Luft ist einfacher. Ein solches Gemisch von Gas und Partikel nennet man Aerosol [29]. Der verfahrenstechnische Einsatz von Aerosolen ist weit verbreitet, unter anderem für die Partikelbeschichtung. Dabei wird das zu beschichtende Substrat vom Aerosol umströmt und die Partikel lagern sich ab. Da die Partikel dem Strömungsfeld des Aerosols folgen, ist die Abscheiderate, definiert als Masse der abgeschiedenen Partikel zur Gesamtkonzentration des Aerosols, beim Eintritt auf dem Substrat gering. Diese lässt sich erhöhen, indem man elektrostatische Felder einsetzt, die die Ablagerung der Partikel auf dem Substrat unterstützen [30]. Eine Betrachtung der Kräftebilanzen und ihre Wirkung auf die Partikeltrajektorien wird in Freudigmann dargestellt [31]. Die elektrostatisch unterstützte Abscheidung setzt jedoch eine Aufladung der Partikel voraus, die durch mehrere Methoden erzielt werden kann. Industriell wird für die Aufladung der Partikel meist eine triboelektrische oder eine Ionisationsaufladung [32] eingesetzt. Eine Diskussion der physikalischen Prinzipien ist in Löffler und Hinds dargestellt [24, 29].

3.1.3 Stand der Technik

Pulverbeschichtung ist industriell weit verbreitet und kommt unter anderem in der Automobilindustrie für Lackierungen zum Einsatz [32]. Eine ausführliche Patentrecherche zur elektrostatischen Abscheidung ist in Freudigmann dargestellt [31]. Für die in der Arbeit genutzten biochemischen Kompositpartikel sind diese Verfahren jedoch nicht geeignet, da die Anforderungen an die Einstellbarkeit der Schichtdicke und die Homogenität im Mikrometerbereich der Schicht nicht erfüllt werden. Auch gängige Verfahren zur Erzeugung von Schichten im Mikro- und Nanometerbereich (Atomic-layer-Deposition, Sputtern, Aufdampfen) sind nicht kompatibel mit der Partikeltechnologie der Peptidarrayherstellung.

Gut geeignet ist jedoch die Vielzahl von Verfahren, die für die Verwendung von funktionalen Mikro- und Nanopartikeln entwickelt wurden. Ein Verfahren ist das sogenannte „Aerosol-Jet-Printing“ [33]. Der Aerosolstrahl wird auf ein Substrat fokussiert und Partikel lassen sich als Partikelschicht oder als Partikelstrukturen ablagern [33]. Dieses Konzept ist kommerziell verfügbar (Firma Optomec, Albuquerque, USA). Ein ähnliches Verfahren ist das „Cold Spray Coating“, bei dem trockene Partikel in einem beschleunigten Gasstrom dispergiert und auf ein Substrat abgeschieden werden [34]. Eine weitere Methode nennt sich „Aerosol Deposition“. Die Beschichtung findet bei hoher Partikelgeschwindigkeit und bei Unterdruck statt. Es werden keine elektrischen Felder genutzt. Die Partikel werden beim Auftreffen auf dem Substrat zertrümmert und bilden eine Schicht mit hoher Haftfestigkeit [35].

Für die Abscheidung der Aminosäurepartikel gibt es verschiedene Vorarbeiten [14, 36, 37]. Diese Entwicklungen basieren auf dem Aerosolgenerator der Firma R.O.T GmbH oder einer eigens entwickelten Aerosolkammer. Diese Vorarbeiten lassen sich für den Beschichtungsprozess des Selektiven Laser-Anschmelzverfahrens nicht einsetzen, da die für die Beschichtung wichtigen Parameter (z. B. Partikelaufladung, Dichte des Aerosols) nicht einstellbar sind. Daher kann mit diesen Verfahren keine definierte Schichtdicke reproduzierbar hergestellt werden. Die Homogenität und die Fläche der Beschichtung sind zudem zu gering.

3.2 Profilverfindung

Das Profil, eine abstrakte Beschreibung der technischen Entwicklung unter Berücksichtigung der Randbedingungen, kann wie folgt definiert werden:

Es soll ein technischer Prozess entwickelt werden, der Aminosäurepartikel auf einem Substrat mit einer homogenen Partikelschichtdicke abscheidet. Die Schicht muss für den anschließenden Laserschritt optimiert werden.

3.3 Ideenfindung

In dieser Phase des Entwicklungsprozesses werden prinzipielle Lösungswege ermittelt. Das übergeordnete Ziel besteht darin, eine möglichst große Vielfalt an Ideen zu generieren, aus dieser Variation eine technische Lösungsmöglichkeit auszuwählen und diese weiter zu konkretisieren. Für diesen Schritt wurden verschiedene Methoden genutzt: Literaturrecherche, Brainstorming im Team und Abstraktion bestehender Lösungen des Stands der Technik. Folgende Verfahren zur Partikelbeschichtung wurden erarbeitet:

1. Sedimentation: Statt einer Anströmung werden in diesem Fall die Sedimentationseigenschaften der dispergierten Teilchen genutzt. Die Teilchen fallen aufgrund ihres Gewichtes auf das Substrat. Da schwere Teilchen schneller sedimentieren als leichte Teilchen, kann die Teilchengröße der Beschichtung eingestellt werden.
2. Langmuir-Blogget-Verfahren: Hydrophobe Partikel schwimmen auf einem Wasserfilm und können aufgrund hydrophob-hydrophiler Wechselwirkungen auf dem Substrat abgelagert werden.
3. Beschichtung mit Aerosol: Diese Methode nutzt die Dispergierung der Partikel in Luft, um durch die Anströmung eines Substrates die Partikel auf diesem abzulagern.
4. Fluidisierung: Durch eine langsame Luftzufuhr und den Einsatz eines Rüttlers werden die Partikel teilweise dispergiert. Sie verhalten sich einem Fluid ähnlich, sodass sie auf einem Substrat abgelagert werden können.
5. Rakeln: Eine hochviskose Partikelpaste wird auf das Substrat gerakelt. Die Schichtdicke lässt sich über Abstandshalter einstellen.
6. Dispersion in Flüssigkeiten: Statt Luft kann Wasser oder ein anderes Lösungsmittel verwendet werden, um die Partikel zu dispergieren. Die Ablagerung als Schicht erfolgt dann entweder durch Sedimentation oder durch elektromagnetische Felder. Das Strukturieren der Partikel findet hier direkt in der Dispersion statt.

3.4 Vorversuche zur Ablagerung von Aminosäurepartikeln

In diesem Abschnitt wird die technische Umsetzung der oben beschriebenen prinzipiellen Lösungsmöglichkeiten dargestellt. Die technische Umsetzung erfolgte in Zusammenarbeit mit Baumann im Rahmen seiner Diplomarbeit [6], dabei wurden ausgewählte Ideen des Kapitels 3.3 realisiert. Diese lassen sich entsprechend ihres Dispersionsmediums einteilen (Abbildung 3.2).

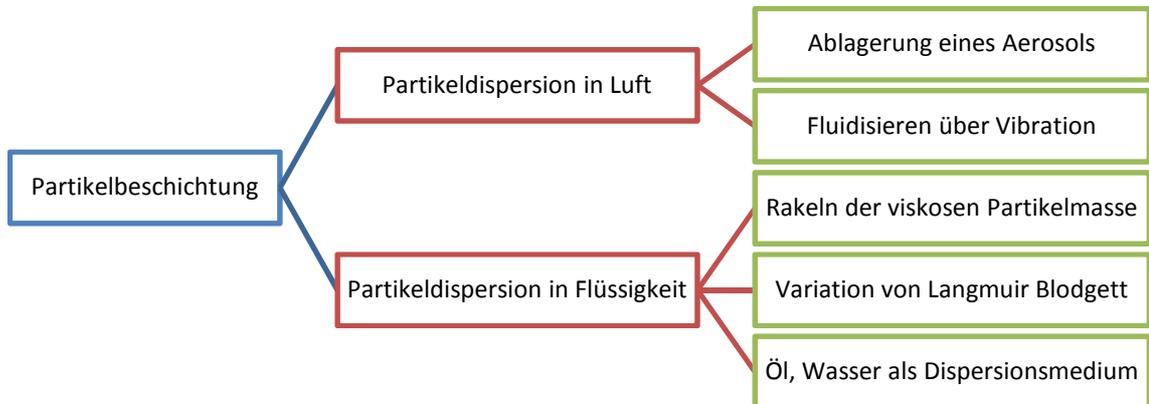


Abbildung 3.2 Einteilung von möglichen Verfahren zur Partikelbeschichtung anhand ihres Dispersionsmediums.

Im Folgenden werden die in Abbildung 3.2 beschriebenen Verfahren kurz dargestellt und anschließend entsprechend der Anforderungen an die Beschichtung bewertet.

Rakeln von hochviskosen Partikelpasten: Der Prozess zur Herstellung der Partikelschichten erfolgte über ein Verteilen der Partikelpaste auf dem Substrat mittels Rakel. Über Abstandshalter auf beiden Seiten des Substrates wurde die Dicke der Schicht eingestellt. Zur Erzeugung größerer Schichtdicken war diese Methode gut geeignet.

Handling von Partikeln in Wasser oder Öl: Aufgrund ihrer geringen Größe werden Mikro- und Nanopartikel oft in Lösung dispergiert, um Adhäsion an Flächen und Feinstaubbelastung zu vermeiden. Zudem können der Materialverbrauch gesenkt und ein Partikelrecycling ermöglicht werden. Die Versuche erfolgten in einer mikrofluidischen Kammer, die aus einer PTFE-Dichtung und zwei Glaträgern besteht. Die Dichtung wurde auf einen Glasobjektträger aufgelegt. Ein zweiter Objektträger mit zwei Bohrungen als Ein- und Auslass der Durchflusskammer wurde als oberer Abschluss angebracht (siehe Abbildung 3.3).

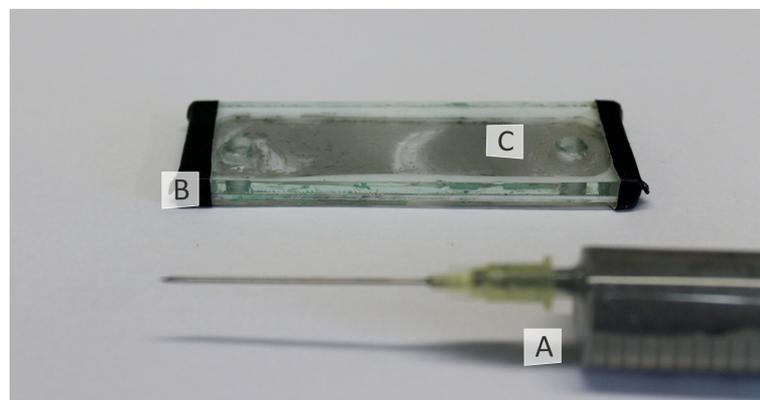


Abbildung 3.3 Mikrofluidik für die Handhabung von Partikeln. Die Partikeln, dispergiert in flüssigen Medien (A) werden in eine mikrofluidische Kammer (B) gespritzt und bilden nach dem Sedimentieren eine Partikelschicht aus (C).

Aufgrund der Hydrophobizität der in einer Harzmatrix eingebetteten Partikel wurden zwei Ansätze realisiert:

- Wässrige Dispersionen unter Verwendung oberflächenaktiver Substanzen, die als Vermittler zwischen Wasser und Partikeloberfläche agierten (beispielsweise Tenside). Eine Trocknung der wässrigen Lösung führte zu einer Partikelschicht, die anschließend strukturiert wurde.
- Suspendierung in hydrophoben, mit der Matrix verträglichen Dispergiermitteln (beispielsweise Silikonöle). Hierbei sedimentierten die Partikel und konnten direkt in Lösung strukturiert werden.

Fluidisieren der Partikel mit elektrostatischer Abscheidung: Eine weitere Möglichkeit, Partikelschichten herzustellen, ist die Dispergierung von Partikeln durch Vibrationen innerhalb geschlossener Kammern. Für die Beschichtung des Glassubstrates musste zusätzlich ein elektrisches Feld zur Ablagerung der Partikel appliziert werden. Nach Befüllung der Kammer mit Aminosäurepartikeln wurde diese verschlossen und die Elektroden wurden kontaktiert. Die Fluidisierung erfolgte über einen Vortex-Rüttler. Durch Kollision der Partikel mit den Wänden der Kammer kam es zur triboelektrischen (negativen) Aufladung und die Partikel konnten auf der positiv geladenen Elektrode abgeschieden werden.

Pneumatik-Zylinder als Aerosolgenerator: Der entwickelte Prototyp besteht aus einem Pneumatik-Zylinder mit einem feinmaschigen Sieb und einer Düse vor dem Auslass (vergleiche Abbildung 3.4a). Durch die Aktuierung des Zylinders wurden die eingefüllten Partikel in der Luft dispergiert und auf das Substrat hin beschleunigt. Das Sieb filterte große Partikelagglomerate, während die Düse den Aerosolstrahl auf das Substrat fokussierte. Das Abscheiden der Partikel konnte entweder direkt auf das Substrat oder in einer Polypropylen-Kammer mit einer Prallplatte erfolgen. Diese wurde in einem definierten Winkel zum Substrat montiert, das zuvor in die Kammer eingelegt worden war. Kleinere Partikelagglomerate wurden an der Prallplatte zerstört und fielen auf den zu beschichtenden Glasträger. Die Schichtdicke ließ sich über die Anzahl der Kolbenhübe einstellen. Durch die geometrische Anordnung des Kolbensystems und der Prallplatte sammeln sich überschüssige Partikel im hinteren Teil der Polypropylen-Kammer. Dieser Aufbau zeichnet sich durch die Möglichkeit des Partikelrecyclings, die Vermeidung von Feinstaubverbreitung und die Zerschlagung von Agglomeraten aus.

Variation der Langmuir-Blodgett-Technik: Abbildung 3.4b zeigt die Beschichtungsmethode. Ein Behältnis wurde mit deionisiertem Wasser befüllt und die Aminosäurepartikel wurden in einer definierten Menge auf die Flüssigkeitsoberfläche gegeben, sodass die gesamte Flüssigkeitsoberfläche bedeckt wurde. Ein funktionalisierter Glasträger wurde dann senkrecht durch den gleichmäßig verteilten Partikelfilm geschoben, nach dem Eintauchen in einem 30°-Winkel zur Wasseroberfläche angestellt und aus dem Wasser gezogen. Dabei lagerten sich Partikel auf dem Glas ab. Die Methode basiert auf hydrophoben-hydrophilen Wechselwirkungen des Systems: Da die Partikelmatrix stark hydrophob ist, lagern sich die Partikel auf dem ebenfalls hydrophoben Substrat als Partikel-Monolage ab.

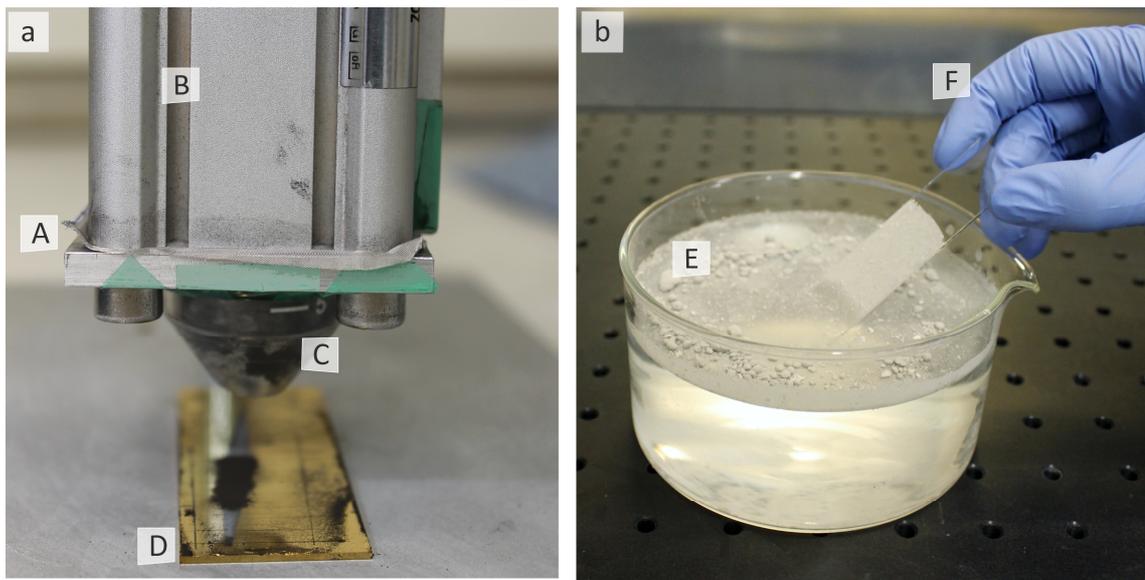


Abbildung 3.4 Pneumatik-Zylinder und Variation der Langmuir-Blodgett-Methode. a) In einem Pneumatikzylinder (B) werden Partikel auf das Substrat (D) mit Hilfe einer Düse (C) beschleunigt. Agglomerate werden über ein Netz (A) gefiltert. b) Eine Partikellage setzt sich in einem Becherglas mit deionisiertem Wasser auf der Oberfläche ab und wird durch Eintauchen eines Glasobjektträgers (F) auf diesem abgeschieden.

3.5 Bewertung der Vorversuche

3.5.1 Bewertungskriterien für die durchgeführten Machbarkeitsstudien

Eine Auswahl der Verfahren erfolgt aufgrund mehrerer Faktoren:

- Kompatibilität der Beschichtungsmethode mit nachfolgenden Schritten der Peptidsynthese: beispielsweise können Partikel nicht in Aceton dispergiert werden.
- Einstellbarkeit und Wiederholbarkeit der Schichtdicke: Schichten müssen in einem Bereich von 5 μm bis 50 μm definiert und wiederholbar aufgebracht werden.
- Hohe Güte der Schicht ohne Agglomerate oder Fehlstellen in der Schicht.
- Eignung für das Selektiven Laser Ansmelz-Verfahren: Abschätzung des Automatisierungsaufwand und der Kosten des Verfahrens.

3.5.2 Bewertung nach VDI 2225

Die in Baumann durchgeführte Bewertung der Machbarkeitsstudien erfolgte über eine Nutzwertanalyse nach VDI-Richtlinie 2225 [6]. Dazu wurden die Anforderungen an die Schicht definiert und diese entsprechend gewichtet. Baumann orientiert sich dabei nicht an der Partikelschicht, sondern an einem standardisierten Muster, das durch einen nachgelagerten Laserschritt erzeugt wurde [6]. Dies ermöglicht eine

schnellere Auswertung, die standardisiert mit Matlab durchgeführt wurde. Wichtige Bewertungsparameter sind unter anderem die Spotgröße, deren Standardabweichung sowie die Prozessdauer.

Das **Rakeln** von hochviskosen Partikelpasten war nicht erfolgreich, da aufgrund der Partikelgeometrie keine homogenen Schichten herstellbar waren. Das **Handling von Partikel in Wasser** war ebenfalls nicht erfolgreich, da die Partikel unter hohem Tensidgehalt dispergiert werden mussten. Nach dem Belichten mit dem Laser und Abspülen blieben wenige Spots erhalten. Dies konnte auch für das **Dispergieren der Partikel in Öl** beobachtet werden. Die Schichten, die durch **Fluidisieren** der Partikel mit elektrostatischer Abscheidung hergestellt wurden, entsprachen ebenfalls nicht den genannten Anforderungen. Die Schichten waren bei einer inhomogenen Schichtdicke agglomeratbehaftet. Die Bewertung der Machbarkeitsstudien mittels Nutzwertanalyse zeigt [6], dass nur die **elektrostatische Ablagerung** eines Aerosols in einer Abscheidekammer und die **Variation der Langmuir-Blodgett-Methode** ausreichend gute Ergebnisse liefern.

Daher wurden diese beiden Methoden genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Aerosolverfahren für die Beschichtung von Aminosäurepartikeln besser eignen. Die Variation der Langmuir-Blodgett-Methode erzeugte eine Beschichtung mit einer Partikelmonolage, die zwar sehr kleine Spots ermöglicht, aber weniger zuverlässig ist. Zudem war die Bedeckung des Substrates mit Partikeln im Vergleich zu den Aerosolverfahren geringer. Aufgrund der geringen Schichtdicke führen kleine Inhomogenitäten der Schicht zu großen Unterschieden in der Größe der Spots. Dies macht ein mehrfaches Beschichten und Belichten mit dem Laser notwendig, sodass hinsichtlich der Automatisierbarkeit die Effizienz und Wirtschaftlichkeit des Verfahrens nicht gegeben ist. Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass sich die Aerosolverfahren für den Einsatz im Peptidmicroarray-Herstellungsprozess grundsätzlich eignen. Das Verfahren der Beschichtung muss jedoch hinsichtlich der Homogenität und Einstellbarkeit der Schichtdicke sowie der hohen Anzahl an Agglomeraten weiter verbessert werden. Dies ist im nächsten Abschnitt dargestellt.

3.6 Prinzipmodellierung der aerosolunterstützten Ablagerung von Aminosäurepartikeln

In diesem Abschnitt wird das im vorhergegangenen Kapitel identifizierte Wirkprinzip (siehe Abbildung 3.5) technisch umgesetzt. Ein geladenes Aerosol wird in einem elektrischen Feld, das zwischen einer Netzelektrode und einer Elektrode hinter dem dielektrischen Glassubstrat erzeugt wird, abgeschieden. Wie in Löffler gezeigt wird die Abscheiderate durch das elektrische Feld deutlich erhöht [30].

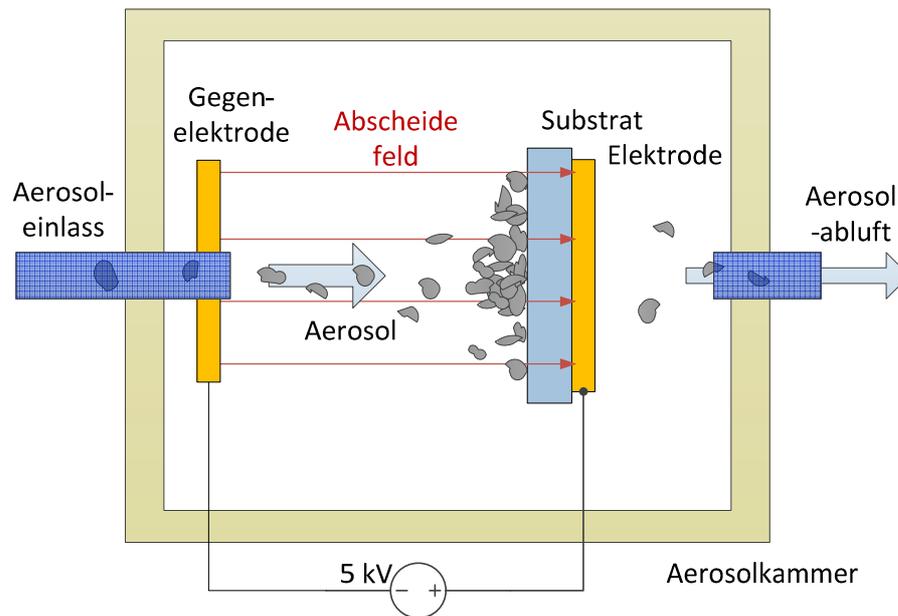


Abbildung 3.5 Konzept der elektrostatischen Aerosolabscheidung. Die geladenen Partikel im Aerosol werden auf das Substrat durch ein homogenes elektrisches Feld beschleunigt und lagern sich dort ab. Die Aerosolabluft wird aus der Beschichtungskammer gepumpt.

Im Folgenden werden die entwickelten Prototypen vorgestellt. Für die Umsetzung der Machbarkeitsstudie wurde zuerst eine Aufteilung in die grundlegenden Wirkprinzipien durchgeführt (vergleiche Abbildung 3.6).

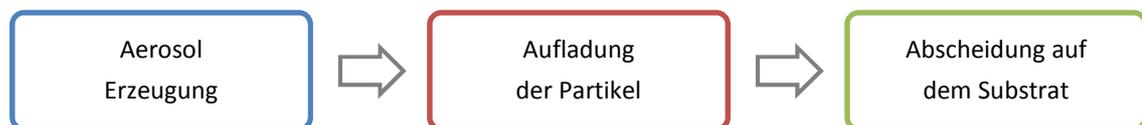


Abbildung 3.6 Elemente der elektrostatischen Aerosolbeschichtung.

Der erste Schritt ist die Erzeugung des Aerosols mittels eines Aerosolgenerators. Im zweiten Schritt werden die Partikel aufgeladen und durch ein elektrisches Feld auf ein Substrat beschleunigt. Dort werden sie im dritten Schritt abgelagert. Jeder dieser Teilschritte wird nun in den folgenden Abschnitten genauer untersucht.

3.6.1 Aerosolerzeugung

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einer Aerosolerzeugung aus festen und flüssigen Medien. Für die partikelbasierte Peptidsynthese eignen sich Pulverdispersierer besser, da die Aminosäurepartikel als Pulver vorliegen und man das Lösungsmittel nach der Deposition auf dem Substrat nicht verdampfen muss. Für die homogene Ablagerung der Aminosäurepartikel ist eine einstellbare und zeitlich konstante Partikeldichte im Aerosol notwendig.

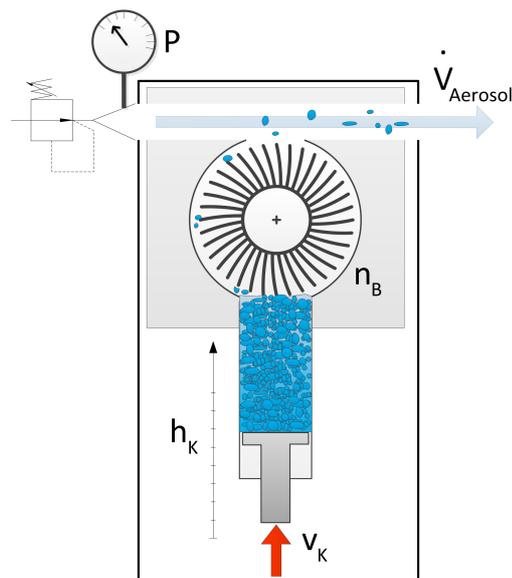


Abbildung 3.7 Schematischer Aufbau und Funktionsweise des Bürstendispergierers. v_k bezeichnet den Kolbenvorschub, h_k die Position des Kolbens im Zylinder, n_b die Umdrehungsgeschwindigkeit der Bürste, P den an den Aerosolgenerator angelegten Druck der Druckluft und $\dot{V}_{aerosol}$ den Aerosolvolumenstrom

Durch einen Vergleich der kommerziell verfügbaren Aerosolgeneratoren mit vorliegenden selbst entwickelten Systemen (siehe Kapitel 3.1.3) wurde der Bürstendivergierer „RBG 1000“ der Firma Palas, basierend auf dem Gebrauchsmuster DE000008515780U1 der Universität Karlsruhe, ausgesucht. Vorversuche haben gezeigt, dass der Generator bei der Erzeugung eines Aerosols mit konstanter Partikeldichte deutlich zuverlässiger arbeitet als die eigenen entwickelten Verfahren. Zudem sind die prozessrelevanten Parameter (Partikeldichte, Aerosolgeschwindigkeit) genauer einstellbar. Der Aufbau ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die verdichteten Aminosäurepartikel werden über einen Vorschubkolben gegen eine rotierende Präzisionsbürste gedrückt. Die Partikel werden mittels der Bürste in den Dispergierdeckel transportiert und dort in einem Gasstrom gleichmäßig dispergiert. Die Strömungsgeschwindigkeit und die Dichte der Partikel im Aerosol sind dabei über die Vorschubgeschwindigkeit des Kolbens, die Drehzahl der Bürste und den Druck der Luft genau einstellbar. In Rupp [39] werden eine weitergehende Beschreibung des Dispergierungsprozesses und Versuche zu den für die Aminosäurepartikel optimalen Betriebsparameter dargestellt.

3.6.2 Aerosolladung

Nach der Generierung des Partikel-aerosols müssen die Aminosäurepartikel für die elektrostatisch unterstützte Abscheidung auf einem Substrat aufgeladen werden. Als Ladungsmechanismus werden in der vorliegenden Arbeit sowohl die statische Aufladung als auch die sogenannte Felddaufladung genutzt, da diese eine weite Verbreitung in der industriellen Pulverbeschichtung haben und Komponenten des Systems nicht selbst entwickelt werden müssen.

Die statische Aufladung der Partikel erfolgt in dieser Arbeit über den triboelektrischen Effekt in einem Polytetrafluorethylen(PTFE)-Schlauch, durch den das Aerosol strömt. Das Material PTFE ist gut geeignet, da es in der triboelektrischen Reihe, die die Elektronenaffinität eines Materials angibt, im stark negativen Bereich liegt. Somit werden die Partikel bei Kontakt mit dem Schlauch positiv geladen.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Feldaufladung der Partikel dar: Das Aerosol umströmt in diesem Fall die eigen entwickelte Aufladelektrode. Diese ist als elektrisch leitende Spitze ausgeführt und mit einer Hochspannung zwischen 5 kV und 100 kV kontaktiert. Das entstehende elektrische Feld lädt die Partikel anhand des in Kapitel 3.1 beschriebenen Mechanismus der Koronaaufladung. Während der Durchführung der Versuche hat sich gezeigt, dass dieser Aufladungsmechanismus robuster gegenüber Umgebungseinflüssen ist. Vor allem im Sommer bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 50 % war die Reproduzierbarkeit der triboelektrischen Aufladung der Partikel nicht mehr gegeben.

3.6.3 Aerosolabscheidung

Nach der Erzeugung des Aerosols und der Ladung der Partikel müssen diese auf einem dielektrischen Substrat, dem funktionalisierten Glasobjektträger, gleichmäßig und möglichst homogen abgelagert werden. Speziell die dielektrische Eigenschaft des Substrates stellt eine große Herausforderung dar. In nahezu allen Anwendungen der Pulverbeschichtung werden leitende Substrate beschichtet [32]. Eine weitere Herausforderung stellt die Homogenität der Partikelschicht dar. Zudem soll die Beschichtung auf einer größeren Fläche ($>12 \text{ cm}^2$) erfolgen. Diese Problematik wird im Folgenden diskutiert.

Beschichtung einer großen Fläche

Im Rahmen seiner Diplomarbeit wurden zusammen mit Rupp zwei Konzepte erarbeitet, um die großflächige Beschichtung zu realisieren [39].

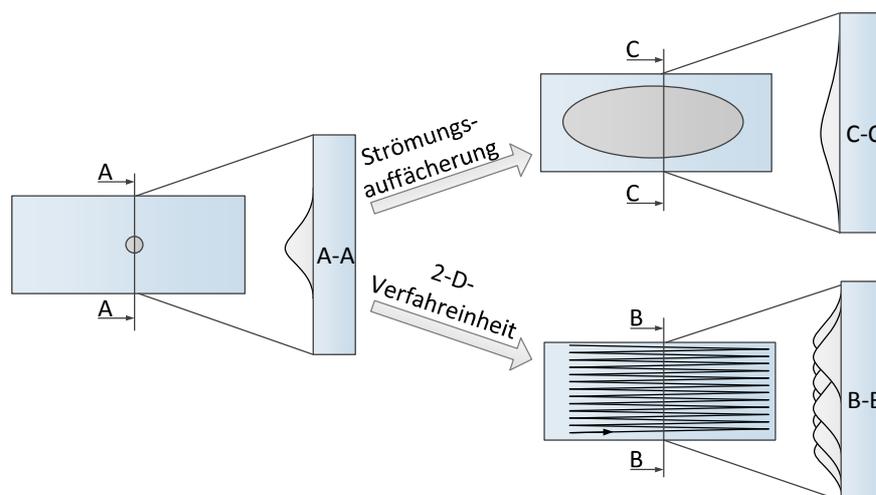


Abbildung 3.8 Konzept der Abscheidung der Partikel auf großer Fläche. Der Aerosolspot kann aufgefächert werden, oder mittels einer Verfahrenheit über das Substrat bewegt werden.

Das Konzept ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Wird das Aerosol auf dem Substrat abgelagert, entsteht ein Partikelspot mit einer in erster Näherung gaußförmigen Schichtdickenverteilung. Die beschichtete Fläche kann durch eine Auffächerung/Verbreiterung des Aerosolstromes (vgl. Abbildung 3.8), oder durch ein Verfahren des Substrats durch den Aerosolstrahl bewirkt werden. Während der erste Ansatz ein paralleler Prozess ist (die Beschichtung des gesamten Trägers findet gleichzeitig statt), wird die Schicht beim zweiten Konzept seriell durch das Verfahren hergestellt.

Paralleler Prozess - Verbreiterung des Aerosolstromdurchmessers: Zur Verbreiterung des Aerosolstromdurchmessers bieten sich verschiedene Möglichkeiten an: Die gezielte Beeinflussung der Strömung kann durch ein entsprechend konstruiertes Gehäuse oder durch das Einbringen von Strömungshindernissen in die Strömung erfolgen. In Rupp [39] werden eine Kugel und ein Sieb als Strömungshindernissen genutzt. Die Beschichtung mit den Strömungshindernissen ist homogen mit einer geringen Anzahl von Agglomeraten. Allerdings lassen sich deutliche Schichtdickenunterschiede in den Randbereichen der beschichteten Fläche erkennen. Rupp erklärt die verbesserte Beschichtung mit der Erzeugung von Turbulenzen hinter dem in die Strömung eingebrachten Strömungshindernis. Dadurch wird der effektive Durchmesser des Aerosolstroms aufgeweitet und die Partikel können gleichmäßiger abgelagert werden. Zudem werden Agglomerate durch die Hindernisse deutlich reduziert. Das ist vermutlich auf ein Zerschneiden der Agglomerate beim Aufprall auf die Hindernisse oder auf eine Filterung im Falle des Siebes zurückzuführen.

Serieller Beschichtungsprozess mit einer x,y-Verfahreinheit: Gleichzeitig wurde an einer seriellen Beschichtung geforscht, bei der das Substrat durch den Aerosolstrom bewegt wird. Die resultierende Schichtdicke und deren Welligkeit bzw. Homogenität lassen sich über die Verfahrensparameter gezielt beeinflussen. Durch den Einsatz der Zwei-Achs-Verfahreinheit lassen sich auch größere Substrate beschichten. Der Beschichtungsprozess ist dadurch flexibel auf unterschiedliche Substratgeometrien anwendbar. Durch das gezielte „Abfahren“ von gewünschten Beschichtungsflächen kann die Beschichtung selektiv und lokal erfolgen. Somit kann die Menge der eingesetzten Partikel reduziert werden. Für die Beschichtung wurden zwei Linearachsen LTM 200 (OWIS GmbH, Staufen) verwendet, ein entsprechender Portalaufbau wurde konstruiert. Das Verfahren in der einen Richtung erfolgt mit der hohen Geschwindigkeit von 10 mm/s, das Verfahren in der anderen mit 0,2 mm/s. Durch diese Strategie können zeitliche Schwankungen der Prozessparameter ausgeglichen werden, da jede Stelle des Substrates mehrfach beschichtet wird. Die resultierende Schichtdicke auf der Größe eines Glasobjektträgers entspricht den Spezifikationen [39].

Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Der parallele Prozess ermöglicht eine schnelle Beschichtung auf großer Fläche mit wenigen Agglomeraten. Nachteilig ist die geringe Reproduzierbarkeit. Es hat sich gezeigt, dass die Modifikation der Strömung gegenüber wechselnden Umwelteinflüssen, beispielsweise Temperatur oder Luftfeuchtigkeit, anfällig ist.

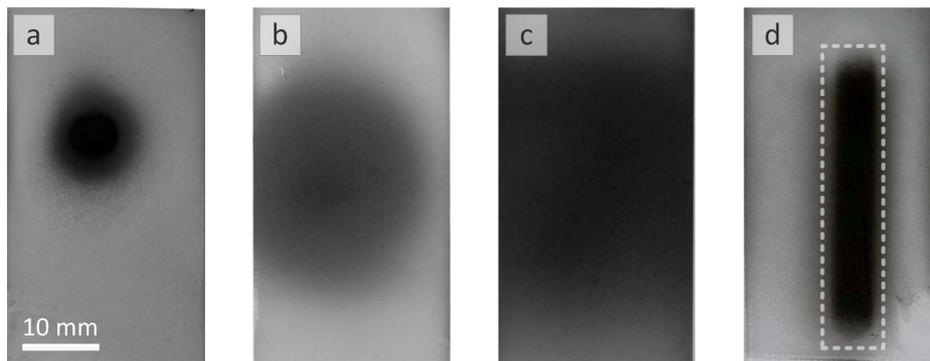


Abbildung 3.9 Vorversuche zur Beschichtung. a) Beschichtung aus dem Freistrahlsystem mit einer gaußförmigen Schichtdickenverteilung. b) Verbreiterung des Aerosolstromes mit einem Sieb mit einer Maschenweite von $35\ \mu\text{m}$. c) Verbreiterung des Aerosolstromes mit einer Kugel. d) Beschichtungsprozess mit einer x,y-Verfahreinheit, nur der weiß markierte Streifen wurde beschichtet. [39]

Im Gegensatz dazu ist der serielle Prozess zuverlässig über die Verfahrensparameter der Linearachsen einstellbar. Zudem ist es möglich, beliebig große Fläche zu beschichten. Nachteilig sind die hohen Kosten und die aufwendige Einrichtung der Komponenten. Ein weiteres Problem stellt die Homogenität des elektrischen Feldes zur Deposition der Partikel auf dem Substrat dar.

Wie in Abbildung 3.5 dargestellt wird dieses Feld zwischen einer Gegenelektrode und der Abscheideelektrode hinter dem Substrat erzeugt. Für eine gleichmäßige Beschichtung ist ein homogenes Feld notwendig [39]. Wird das Substrat bewegt, ist dieses sogenannte Abscheidefeld nicht mehr homogen.

Um die jeweiligen Vorteile zu erreichen, wurden die beiden Konzepte zu einem Gesamtsystem kombiniert. Die Gegenelektrode, als Netz ausgeführt, wird mit dem Substrat und der Abscheideelektrode über einen isolierenden Rahmen aus Polyurethan in einem definierten Abstand fest verbunden. Somit kann das Modul, bestehend aus Netz, Substrat und Abscheideelektrode, mit dem x,y-Linearsystem bewegt werden, das Abscheidefeld ist stets homogen. Ferner dient das Netz mit einer Maschenweite von $1\ \text{mm}$ gleichzeitig als Strömungshindernis. Eine Abschattung der vom Netz verdeckten Bereiche findet nicht statt.

3.7 Gestaltmodellierung der Beschichtungsanlage

Nach eingehender Untersuchung der Wirkmechanismen der grundlegenden Komponenten der Beschichtung werden diese nun zu einem Gesamtsystem zusammengesetzt. In Abbildung 3.10 ist das Prinzip skizziert.

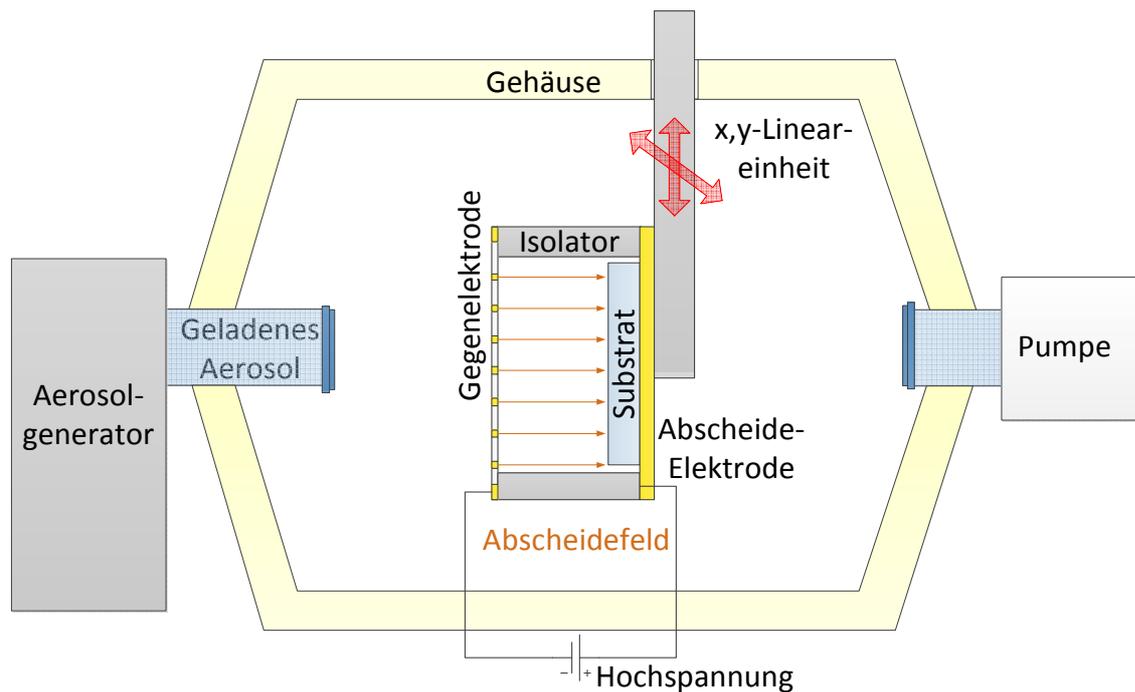


Abbildung 3.10 Skizze der entwickelten Beschichtungsanlage.

Das geladene Aerosol aus dem Aerosolgenerator wird durch die Gegenelektrode in Form eines Netzes in ein homogenes elektrisches Feld geleitet. Dort werden die Partikel auf dem Substrat abgeschieden. Das Abscheidemodul, bestehend aus den Elektroden, dem Substrat und dem Isolator, wird dabei bewegt, sodass die ganze Fläche beschichtet wird und geringe Schwankungen der Prozessparameter durch die Bewegung der Fläche ausgeglichen werden. Die Membranpumpe (SMC Pneumatik GmbH, Egelsbach) und das entsprechend konstruierte Gehäuse haben die Funktion, den Aerosolstrom in Richtung des Substrats zu leiten. Zudem dient das Gehäuse als Schutz vor Mikro- und Nanopartikeln, die nicht in die Produktionsumgebung gelangen dürfen. Aufgrund der Dichtheit des Gehäuses könnte die Beschichtung auch unter Schutzgas erfolgen.

3.7.1 Konzept der Automatisierung

Für die Synthese eines Peptidmicroarrays werden die Prozessschritte der Beschichtung und der Laserstrukturierung zyklisch durchlaufen. So müssen für die Synthese von dekamerischen Peptiden bis zu 200 Beschichtungen (Aminosäuresorten mal Länge des Peptides) hergestellt werden. Das ist nur mit einer automatisierten Beschichtungsanlage möglich. Dazu wurde ein Konzept entwickelt, das zusammen mit Rübel im Rahmen seiner Bachelorarbeit umgesetzt wurde [40]. Ausgehend von dem existierenden Prozess wurden die für die Automatisierung wichtigen Kernelemente analysiert, die in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

Handhabung der zu beschichtenden Träger mit einem Greifer

Ein kritischer Punkt während der Synthese ist die Handhabung des Syntheseträgers. Der funktionalisierte Glasobjektträger (76 mm × 26 mm) muss beschichtet, belichtet, gereinigt und chemisch weiterverarbeitet werden. Denkbar wäre eine Einspannung in einen Rahmen, in dem der Träger die komplette Synthese durchläuft. Dazu wurde ein erster Prototyp konstruiert und mittels selektiven Lasersintern gefertigt (Speedpart GmbH Hasloch/Main). Der Prototyp ermöglicht ein manuelles Einlegen des Syntheseträgers zwischen die Gegen- und Abscheideelektrode (siehe Abbildung 3.11). Die beiden Elektroden werden um 90° gebogen und decken jeweils eine Seite des Rahmens ab.

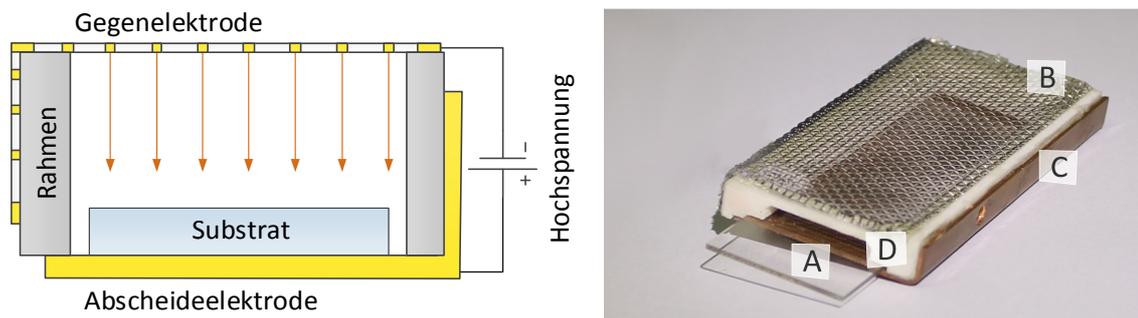


Abbildung 3.11 Prototyp des Rahmens. Das Substrat(A) kann zwischen die Gitterelektrode (B) und die Abscheideelektrode (C) in einen Rahmen aus Polyamid (D) eingespannt werden.

Für die Automatisierung sind ein Greifen dieses Moduls und eine gleichzeitig elektrische Kontaktierung der Elektroden notwendig. Nach eingehender Recherche wurde der pneumatische Zweifingergreifer DPG+40 (SCHUNK GmbH & Co. KG Lauffen/Neckar) ausgewählt, der in der staubigen Beschichtungsumgebung robust arbeitet. Die Finger des Greifers wurden in Kooperation mit der Firma Schunk entwickelt. Diese besitzen elektrisch leitende Federstifte (GKS-967, ingun Prüfmittelbau GmbH, Konstanz), die beim Schließen des Greifers jeweils eine Elektrode an der entsprechenden Seitenfläche des Rahmens kontaktieren. Der Greifer wurde über eine entsprechende Konstruktion an dem x,y-Linearsystem befestigt.

Zuführung der Substrate

Die automatisierte Zuführung der Träger erfolgt durch die Linearachse EGC-TB-KF (Festo AG & Co. KG, Esslingen), auf der ein Halter für die Rahmen montiert ist. Bis zu sieben Rahmen mit den Syntheseträgern werden vorgehalten, sodass der Greifer einen unbeschichteten Träger aufnimmt und nach dem Prozess im selben Kompartiment abstellt. Danach verfährt die Linearachse und der nächste Träger kann entnommen werden (vergleiche Abbildung 3.13).

Abdichtung während des Beschichtungsprozesses

Da aufgrund einer möglichen Toxizität für den menschlichen Organismus die Mikro- und Nanopartikel während der Beschichtung nicht in die Umgebung austreten dürfen, muss die Beschichtungskammer abgedichtet sein.

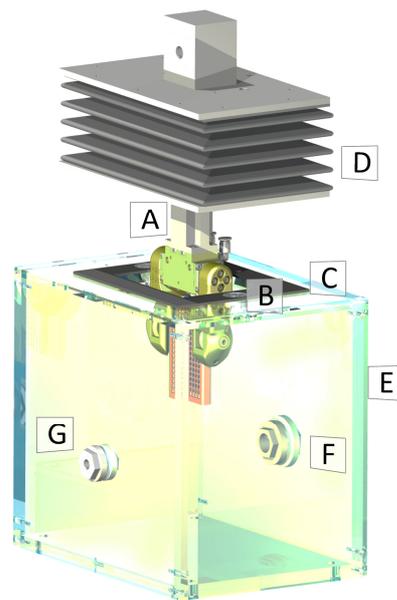


Abbildung 3.12 CAD-Studie zum Dichtungskonzept [40]. Der Greifer mit dem Substrat (A) wird in einem Faltenbalg (D) geführt, der die Bewegung abdichtet. Für die Beschichtung wird dieses Modul auf einer Dichtung (C) mit Elektromagneten (B) fixiert, sodass keine Partikel aus der Beschichtungskammer (E) mit dem Aerosoleinlass (G) und -auslass (F) austreten können.

Es müssen zwei Problemstellungen gelöst werden: die Gewährleistung der Dichtigkeit der Beschichtungskammer nach der Zuführung der Träger und die Abdichtung der Bewegung des Portalsystems während der Beschichtung. Letzteres wird über einen Kastenbalg realisiert, der die Dichtung des Trägers während des Verfahrens bei geschlossener Kammer ermöglicht. Die Zuführung des Trägers in die Kammer erfolgt durch einen abnehmbaren Deckel, der zusammen mit dem Kastenbalg am Portal befestigt ist (siehe Abbildung 3.12). Nach dem Absetzen des Deckels auf der Kammer wird dieser durch Elektromagnete auf einer Dichtungsfläche fixiert, sodass während der Beschichtung keine Partikel austreten können.

Ansteuerung der Komponenten

Für einen automatisierten Ablauf des Beschichtungsprozesses müssen die Komponenten der Anlage gesteuert werden. In diesem Fall wurde die Umsetzung mittels LabVIEW (National Instruments) programmiert. LabVIEW ist intuitiver als eine SPS-Programmierung und für das Labor mit vielen Anpassungen der Anlage gut geeignet. Neben der Ansteuerung der drei Linearachsen und des Aerosolgenerators wurden die pneumatischen Komponenten (Membranpumpe, Greifer, Aerosolgenerator) und die Elektromagnete mittels einer 8-fach-Relaiskarte gesteuert. Dabei wurde sowohl die Programmierung der Relaiskarte und die Ansteuerung des Aerosolgenerators als auch die elektrische Kontaktierung umgesetzt. Über die graphische Benutzeroberfläche können einzelne Teilprozesse gesteuert oder mehrere Träger vollautomatisiert beschichtet werden (siehe Abbildung 3.13).

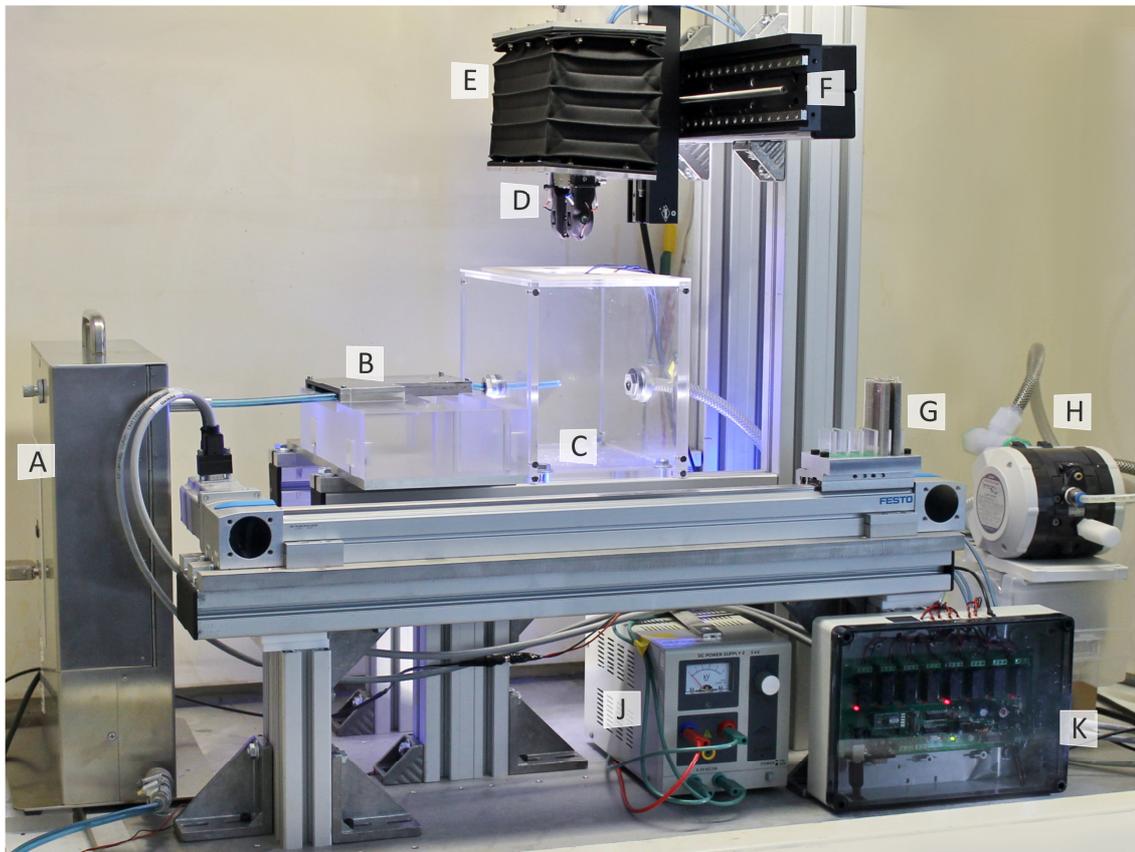


Abbildung 3.13: Aufnahme der kompletten und automatisierten Beschichtungsanlage. Das Aerosol aus dem Aerosolgenerator (A) wird im Modul (B) aufgeladen und in der Beschichtungskammer (C) auf das Substrat (D) abgeschieden. Das Substrat und der Faltenbalg (E) werden zyklisch mittels x,y-Linearachse (F) durch den Aerosolstrom geführt. Die Zuführung der Substrate erfolgt über eine weitere Linearachse (G). Über eine Prozesspumpe (H), die die Abluft aus der Beschichtungskammer abpumpt, ist ein Partikelrecycling möglich. Der Hochspannungsgenerator ist an die Elektroden angeschlossen. Die Ansteuerung wird durch eine Relaiskarte (K) umgesetzt.

3.8 Methoden zur Charakterisierung der Schicht

Wie in der Profildefinition beschrieben soll ein technischer Prozess entwickelt werden, der Aminosäurepartikel auf ein Substrat mit einer homogenen Schichtdicke ablagert. Für die Beurteilung der Güte der Schicht wurden folgende Zielgrößen definiert:

- Homogenität der Schichtdicke
- Reproduzierbarkeit
- Große Fläche der Beschichtung (mindestens die eines Glasobjektträgers)
- Einstellbarkeit der Schichtdicke
- Automatisierbarkeit
- Kompatibilität mit den Folgeprozessen der Peptidarrayherstellung

Die definierten Zielgrößen können nicht direkt messtechnisch erfasst werden, sondern müssen aus Messgrößen bestimmt werden. Diese Messgrößen umfassen sowohl die Schichtdicke, die Rauigkeit und die Porosität als auch den Äquivalenzradius der Partikelspots. Neben den Messmethoden wird im Folgenden auch die Herstellung der Schicht und eines Peptidarrays diskutiert.

3.8.1 Herstellung der Partikelschichten

Für die Bewertung des Beschichtungsprozesses wurden mit der beschriebenen Beschichtungsanlage Partikelschichten erzeugt. Dabei wurden in der Arbeit zwei Partikelsorten verwendet, die sich bei gleichen chemischen Ausgangsstoffen nur in ihrer Herstellung unterscheiden: die Sprühtrocknerpartikel und die Luftstrahlmühlenpartikel. Der Median der Größenverteilung der Partikel liegt im Bereich von $3,5\ \mu\text{m}$ und wird in Münster [23] diskutiert. Die Größenverteilung variierte leicht, bedingt durch die unterschiedliche Herstellung für beide Partikelsorten. Neben dem Einfluss der Partikelgeometrie wurden auch verschiedene Aufladungsmechanismen untersucht: Die Aufladung der Partikel erfolgte entweder triboelektrisch oder mittels Koronaaufladung. Dazu sind in Anhang B die Daten der wichtigen Prozessparameter (Abstände der Module und Polarität der Elektroden) des Aufbaus und die experimentellen Details der Beschichtungsmethode aufgelistet.

3.8.2 Messung von Rauigkeit und Schichtdicke

Die Schichtdicke und die Oberflächenrauigkeit werden mithilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops VK 9700 (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) gemessen. Dieses erstellt ein dreidimensionales Oberflächenprofil. Aufgrund der Beschaffenheit der Schicht mit einer hohen Rauigkeit wurde die Schichtdicke über eine Messfläche von $1\ \text{mm}^2$ gemittelt. Für die durchgeführten Messungen liegt die Messabweichung des konfokalen Mikroskops zwischen $0,5\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$.

3.8.3 Messung der Porosität

Aufgrund der geringen Haftfestigkeit der Aminosäurepartikelschichten auf der funktionalisierten Glasoberfläche lässt sich die Porosität nicht direkt mit etablierten Methoden wie beispielsweise Schliff- und Schnittprüfung messen. Kommerziell verfügbare Messmethoden wie Computertomographie oder Röntgenstrahlung eignen sich grundsätzlich, jedoch sind die Messungen aufwendig und die Anschaffung teuer. Daher wurde eine einfache Methode entwickelt, um die Porosität der Aminosäurepartikelschichten zu messen. Das Volumen der Partikelschicht wird zweimal mit dem Laserscanning-Mikroskop vermessen, im Ausgangszustand und nach einem vollständigen Schmelzen im Ofen. Aus der Volumenänderung lässt sich die Porosität bestimmen. Die Porosität ψ ist definiert als:

$$\psi = \frac{V_H}{V_{ges}} = 1 - \frac{V_p}{V_{ges}} \quad 3.1$$

wobei V_H das Volumen zwischen den Partikeln, genannt Hohlraumvolumen [26], bezeichnet, V_p das Volumen der Partikel und V_{ges} das Gesamtvolumen der Schicht. Die Vorgehensweise zur Bestimmung der Porosität ist in Abbildung 3.14 näher beschrieben.

In den Versuchen zur Bestimmung der Porosität wurden die unregelmäßig geformten Luftstrahlmühlenteilchen mit einem mittleren Durchmesser von $3,5 \mu\text{m}$ eingesetzt. Damit wurde ein Objektträger beschichtet und einzelne Teile der Schicht wurden vermessen. Nach dem Vermessen des Volumens V_{ges} der Partikelschicht wurde durch einen anschließenden Schmelzvorgang ($90 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 min) eine durchgehende Partikelschicht mit Volumen V'_p erzeugt. Aufgrund der Volumenkonstanz des Partikelmaterials kann dieser mit V_p gleichgesetzt werden.

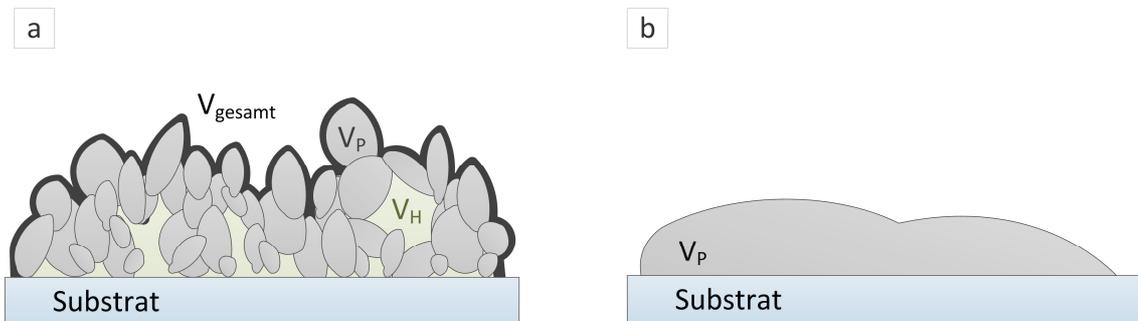


Abbildung 3.14 Vorgehensweise zur Bestimmung der Porosität. a) Das Gesamtvolumen der Partikelschicht besteht aus dem Volumen der Partikel und dem Hohlraumvolumen. b) Nach dem Schmelzvorgang entspricht das Gesamtvolumen dem des Partikelvolumens.

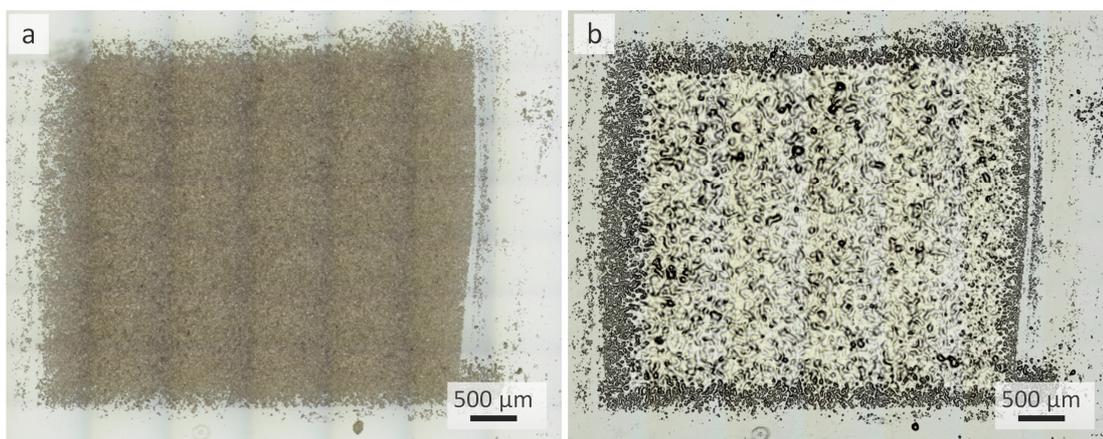


Abbildung 3.15 Bestimmung der Porosität. a) Mit der Anlage aufgetragene Partikelschicht. b) Partikelschicht nach dem Schmelzvorgang.

Abbildung 3.15 zeigt Mikroskopaufnahmen vor und nach dem Schmelzen der Partikelschicht. Die in Abbildung 3.15b sichtbaren Unregelmäßigkeiten der Oberfläche sind keine eingeschlossenen Gasblasen, sondern Unebenheiten der Oberfläche. Die Ergebnisse der Messung sind in Kapitel 3.9.5 dargestellt.

3.8.4 Messung der Partikelladung

Die Messung der Partikelladung gestaltet sich schwierig. Aufgrund der geringen Partikeldichte im Bereich 0,5 - 1 mg Partikel pro dm^3 Luft sind die Ladungen der Partikel während des Prozesses nicht messbar. Versuche mit dem in Nesterov [41] beschriebenen Tribometer waren nicht möglich. Für die quantitative Bestimmung der Partikelladung wurden zwei Substrate auf je eine wechselseitig geladene Elektrode parallel zur Strömungsrichtung des Aerosols montiert. Entsprechend ihrer Ladung werden die Partikel auf einem der beiden Substrate abgelagert. Damit lässt sich eine qualitative Aussage über die Polarität der Partikelladung treffen, nicht jedoch über die Quantität der Ladung. [31]

Eine indirekte Bestimmung der Ladung der Partikel nach Größe und Polarität kann über die Messung der Oberflächenladungen nach der Beschichtung erfolgen. Aufgrund der isolierenden Eigenschaften der in der Arbeit verwendeten Glassubstrate können Oberflächenladungen nicht abfließen und sind direkt nach der Beschichtung messbar. Für das berührungslose Messen der elektrostatischen Felder der Partikelschicht wurde das Influenz-Elektrofeldmeter EM02 (Eltex-Elektrostatik-GmbH, Weil am Rhein) verwendet. Die Ergebnisse sind stark von den experimentellen Bedingungen abhängig (Luftfeuchte und Temperatur) und liefern keine ausreichend genaue Aussage.

Statt einer Messung der Partikelladung wurde daher die Abscheiderate auf dem Substrat bestimmt. Diese ist sowohl von der Partikelladung als auch von der Feldrichtung der elektrostatisch unterstützten Abscheidung der Partikel abhängig. Für diesen Versuch wurden Luftstrahlmühlenpartikel mit einer Größenverteilung mit einem mittleren Durchmesser von $3,5 \mu\text{m}$ triboelektrisch geladen und unter Verwendung verschiedener Feldrichtungen abgeschieden. Die Ergebnisse der Messung sind in Kapitel 3.9.4 dargestellt.

3.8.5 Einfluss der Schichtdicke auf das Laserergebnis

Neben der Oberflächenrauigkeit und der Porosität hat vor allem die Schichtdicke einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse des Laserprozesses. Für den Versuch wurden triboelektrisch geladene Luftstrahlmühlenpartikel verwendet; die Partikelschicht wurde dann mit unterschiedlichen Laserleistungen bestrahlt und der Durchmesser der Spots gemessen (vergleiche Abbildung 3.16). Dabei wurde der Äquivalenzdurchmesser der Spots (der Durchmesser eines Kreises identisch mit der gemessenen Fläche der Spots) einzeln mit der Analysis-Software von Olympus bestimmt. Die Schichtdickenmessung erfolgte wie oben beschrieben.

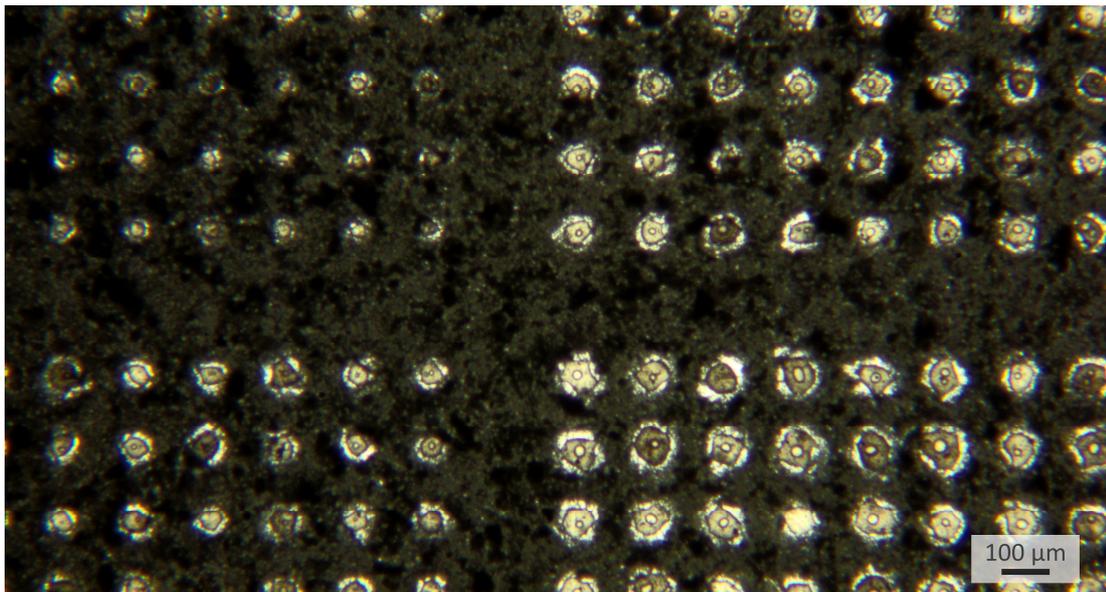


Abbildung 3.16 Mikroskopaufnahme einer Partikelschicht für die Messung des Äquivalenzdurchmessers der Spots in Abhängigkeit von der Laserleistung.

3.8.6 Durchführung einer Dipeptidsynthese

Die Aminosäurepartikelschichten sind Teil eines übergeordneten Fertigungsprozesses. Daher wurde ein Peptidmicroarray entsprechend dem Schema in Abbildung 3.17 synthetisiert. Die verwendeten Partikel wurden mit der Luftstrahlmühle hergestellt, der Laserschnitt und die Positionierung der Substrate erfolgten mit dem in Märkle [42] beschriebenen Laserscanning-Mikroskop. Auf einem Glasobjektträger mit 10:90 PEGMA-co-MMA-Oberfläche (PEPperPRINT GmbH, Heidelberg) wurde als erste Aminosäure Glycin gekuppelt. Die zweite Lage bestand aus Biotin und Alanin. Der Nachweis der Synthese erfolgte über zwei Fluoreszenzfarbstoffe: an das Biotin wurde ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidinkonjugat (DyLight 550 Streptavidin, Emissionsmaximum bei 576 nm) gebunden, an den entschützten N-Terminus des Alanins ein N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester (DyLight 650 NHS-Ester, Emissionsmaximum bei 672 nm).

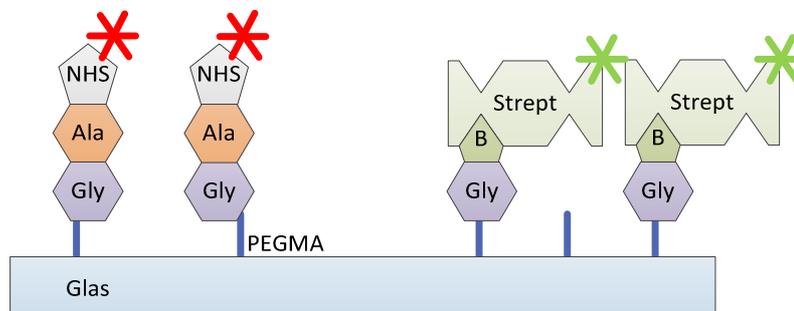


Abbildung 3.17 Schemata der Peptidsynthese Das Glycin (Gly) wird nach der Strukturierung der Glycinpartikelschicht an die amino-funktionalisierte Oberfläche (PEGMA) gekuppelt. In weiteren Kupplungsschritten werden dann Alanin (Ala) und Biotin (B) gekuppelt. Der Erfolg der Synthese wird durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Molekülen (NHS Ester und Streptavidin) nachgewiesen.

Für eine erhöhte Ausbeute der Synthese wurde der Beschichtungs- und Laserschritt zweimal pro Syntheszyklus ausgeführt. Eine genaue Beschreibung des Syntheseprotokolls ist in Anhang A gegeben. Anschließend wurde das Array gescannt (Axon Instruments, GenePix 4000B, Anregungswellenlängen 532 nm und 635 nm, Auflösung 5 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$).

3.9 Ergebnisse

3.9.1 Homogenität der Schicht

Für die Bestimmung der Messabweichung des konfokalen Lasermikroskops wurde die Schichtdicke an derselben Stelle mehrfach vermessen. Aufgrund der geringen Messabweichung ist die Methode gut für die Bestimmung der Schichtdicke geeignet.

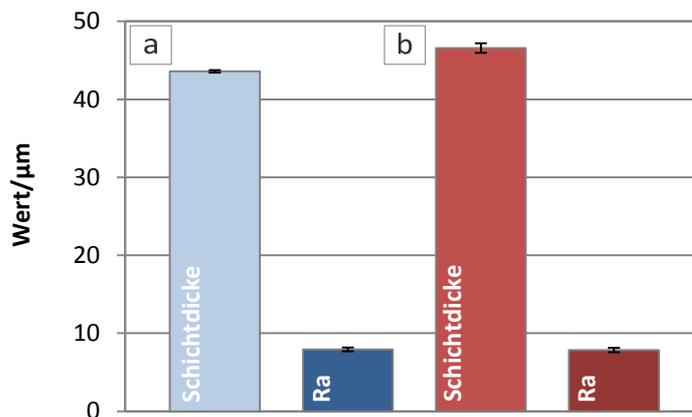


Abbildung 3.18 Mehrfaches Vermessen der Schicht zur Bestimmung der Homogenität. a) Mehrfaches Vermessen an der gleichen Stelle. b) Mehrfaches Messen unterschiedliche Stellen der gleichen Schicht.

Für die Validierung der Homogenität des Prozesses wurde die Schichtdicke der gleichen Schicht an mehreren Stellen vermessen. Aus den in Abbildung 3.18 gezeigten Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Beschichtungsprozess die Erzeugung von Schichten mit ausreichend guter Homogenität (im Speziellen: Abweichung der Schichtdicke $\pm 0,6 \mu\text{m}$ bei einem Schichtdickenmittelwert von $44 \mu\text{m}$) ermöglicht. Dabei liegt der Mittenrauwert Ra bei $7,8 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ und ist im Verhältnis zur Schichtdicke groß. Dies ist durch die poröse Partikelschicht bedingt, die eine große Oberflächenrauigkeit aufweist. Lasergesinterten Materialien, die aus gesinterten Partikelschichten bestehen, liegen in einem ähnlichen Rauigkeitsbereich [43].

3.9.2 Einfluss der Felder auf die Abscheidung

Ein wichtiger Aspekt für die Abscheidung der Aminosäurepartikel ist die Abhängigkeit der Abscheiderate von der Kombination der Partikelladung und der Richtung des elektrischen Feldes.

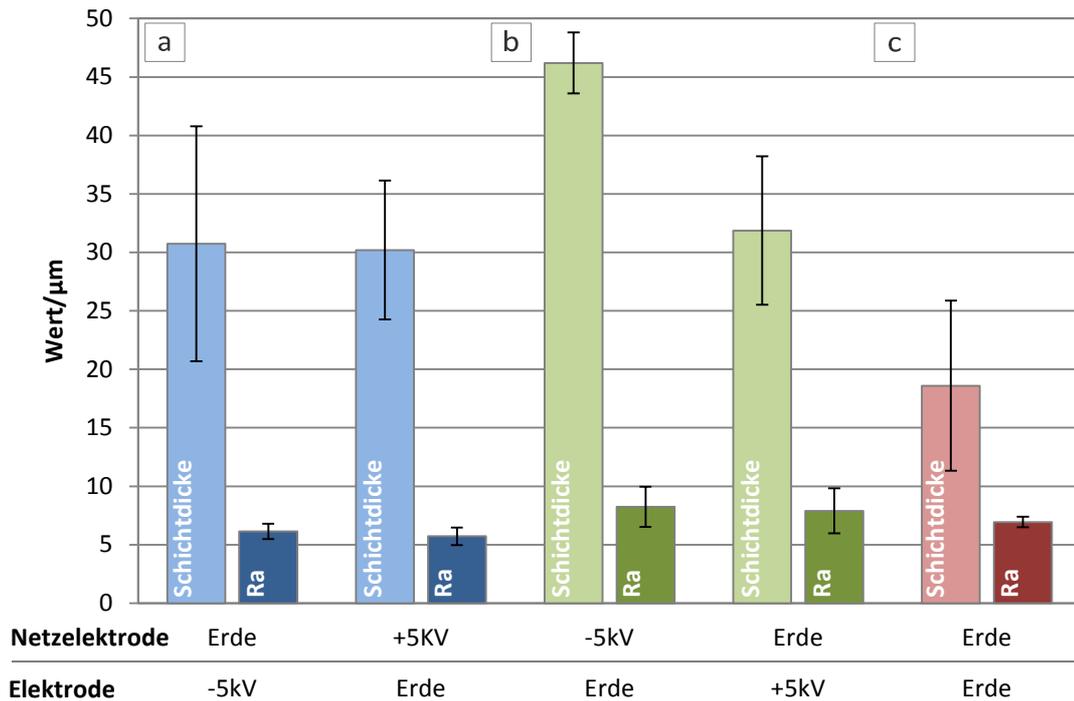


Abbildung 3.19 Einfluss der Feldrichtung auf die Schichtdicke und den Mittenrauwert Ra. Die Richtung des elektrischen Feldes zwischen Netz- und Abscheideelektrode wurde variiert. a) positive Feldrichtung b) negative Feldrichtung, c) zeigt die Werte ohne Feld. Beschichtungsparameter entsprechend B.2 (nach [31]).

Abbildung 3.19 zeigt die Schichtdicke und Oberflächenrauheit bei Variation der Feldrichtung für die Luftstrahlmühlenpartikel bei konstanten Beschichtungsparametern (Kolbenvorschub, Aerosolvolumenstrom (vergleiche Abbildung 3.7)). Die Ergebnisse wurden jeweils über drei Messungen gemittelt. Entgegen der in Kapitel 3.6.2 diskutierten Theorie werden die Luftstrahlmühlenpartikel sowohl positiv als auch negativ geladen. Dies spiegelt sich auch bei der Variation der Feldrichtung wider. Sowohl in positiver (das Netz ist gegenüber der Abscheideelektrode positiv geladen (vergleiche Abbildung 3.19a, b)) als auch in negativer Feldrichtung werden mehr Partikel abgelagert als im Referenzfall (vergleiche Abbildung 3.19c), beim dem kein elektrisches Feld anliegt. Jedoch ist die Abscheiderate bei negativem Feld höher. Da der PTFE-Schlauch die Partikel mehrheitlich positiv aufladen sollte, führt ein negatives Feld zu der größten Schichtdicke. Insgesamt wird die Beschichtung durch das Anlegen eines elektrischen Feldes verbessert und die Oberflächenrauigkeit sinkt.

Eine mögliche Abschattung des Substrates und eine damit einhergehende Verminderung der Schichtdicke durch das geerdete Netz konnte nicht beobachtet werden. Ein Großteil der Partikel kann aufgrund ihrer hohen kinetischen Energie das Netz passieren und auf der geerdeten Elektrode werden nur geringfügig Partikel abgeschieden.

3.9.3 Reproduzierbarkeit des Prozesses

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Prozesses wurden sechs Schichten mit denselben Beschichtungsparametern hergestellt und vermessen. Zur Herstellung der Schichten wurden triboelektrisch geladene Luftstrahlmühlenpartikel (Median $3,5 \mu\text{m}$) mit negativer Feldrichtung (Netz: -5kV und Abscheideelektrode: Erde) auf Glas abgeschieden. Abbildung 3.20 zeigt die Schichtdicken und Rauheitswerte der entsprechenden Schichten.

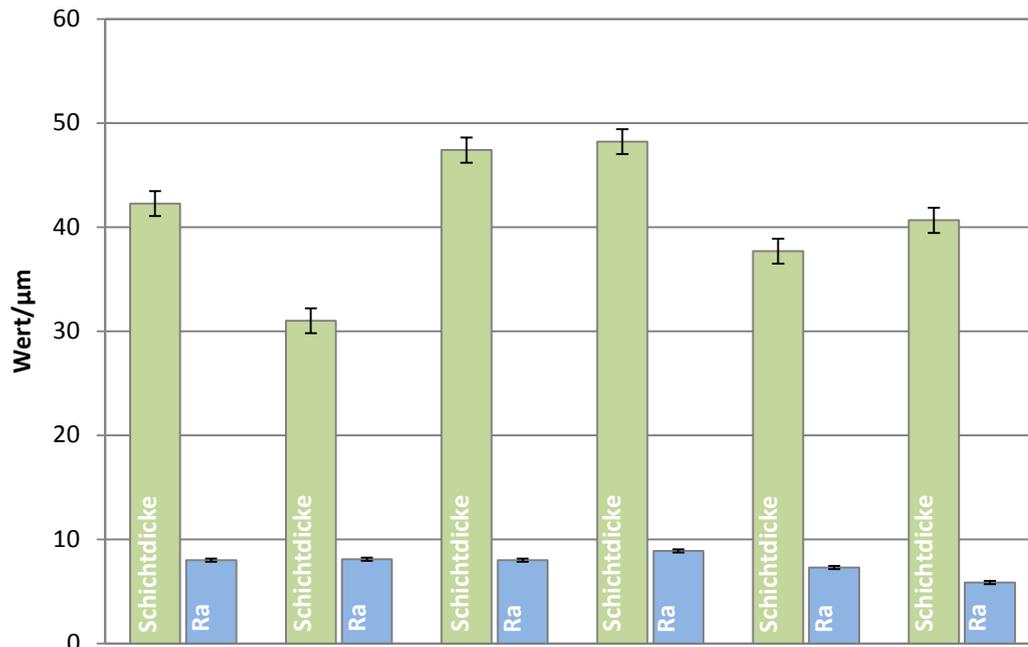


Abbildung 3.20 Reproduzierbarkeit der Schichtenbeschichtungsparameter entsprechend B.2 (nach [31]).

Die Schichtdicke betrug $41,2 \mu\text{m} \pm 6,4 \mu\text{m}$ und die Rauigkeit $7,7 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$. Weitergehende Versuche haben gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit bei stark unterschiedlichen Umgebungsparametern (Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit) sinkt. Dies ist vermutlich auf die Aufladung der Partikel zurückzuführen.

3.9.4 Vergleich der Abscheiderate unterschiedlicher Partikeln

In Abbildung 3.21 wird die Abscheiderate von Spühtrockner- und Luftstrahlmühlenpartikeln für die beiden Aufladungsmechanismen der Hochspannungskorona und der triboelektrische Aufladung verglichen. Bei den Versuchen zeigte sich, dass sich Partikel, die mit der Hochspannungskorona geladen wurden, nicht auf Glassubstraten abscheiden lassen. Vermutlich lagern sich die während der Ladung der Partikel entstehenden positiven Stickstoff- und Sauerstoffionen auf dem Glassubstrat ab und erzeugen ein Gegenfeld. Aufgrund dieses Gegenfeldes sinkt die Abscheiderate der Partikel stark und es kommt zu einer Vielzahl von Fehlstellen in der Partikelschicht. Aus diesem Grund wurde ein leitfähiges Goldsubstrat verwendet. In diesem Fall können die Ionen abfließen und ermöglichen somit eine gute Beschichtung des Substrates. [31]

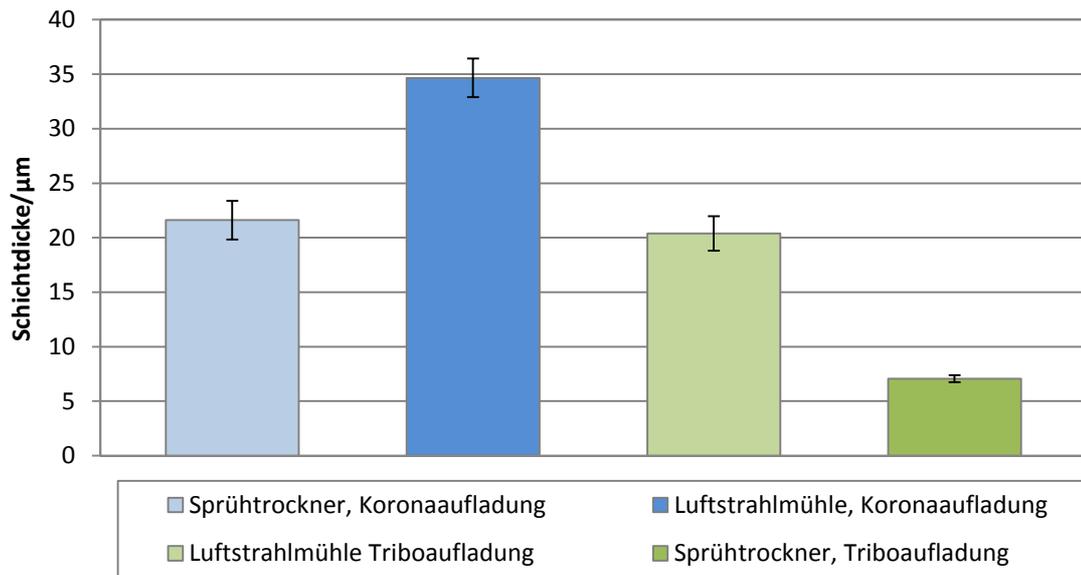


Abbildung 3.21 Vergleich der Abscheideraten für unterschiedliche Kombinationen von Partikeln und Aufladungsmechanismen. Beschichtungsparameter entsprechend B.2 (nach [31]).

Die in Abbildung 3.21 dargestellten Ergebnisse sind nicht direkt vergleichbar: Die Abscheidung der mittels Korona geladenen Partikel erfolgte auf leitenden Oberflächen, die triboelektrisch geladenen auf Glas. Zudem waren die Abstände der Schlauchenden (vergleiche Anhang B) zum Substrat unterschiedlich, bedingt durch den Bauraum in der Abscheidekammer. Deutlich wird jedoch, dass sich die Luftstrahlmühlenpartikel für die Abscheidung besser eignen. Sowohl für die Aufladung mit der Korona als auch mit der triboelektrischen Aufladung sind höhere Abscheideraten möglich.

3.9.5 Porosität

Neben der Schichtdicke hat die Porosität einen Einfluss auf den der Beschichtung nachfolgenden Laserschritt. Für eine geringe Porosität wird mehr Partikelmaterial der Schicht zu einem Spot geschmolzen. Eine Abschätzung dieser Abhängigkeit ist in Förtsch [44] beschrieben. Für die Bestimmung der Porosität wurden mehrere Quadrate mit einer Kantenlänge von ca. 3 mm aus derselben Schicht untersucht. Aufgrund der Dauer der Messmethode (bis zu 70 Bilder mussten mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen und zusammengefügt werden) konnte keine komplette Schicht untersucht werden. Die Porosität wurde dabei über verschiedene Bereiche des Trägers und mit entsprechender Variation in der Schichtdicke entsprechend Gleichung 3.1 bestimmt. Die mittlere Porosität der Probe ergibt einen Wert von $51\% \pm 3\%$. Diese ist vergleichbar niedrig, bedingt durch die Komprimierung der Partikelschicht aufgrund der elektrischen Anziehungskräfte. Zufällige Kugelpackungen haben eine maximale Porosität zwischen 48 % und 26 %, je nach Packungsart [45]. Aufgrund des verwendeten polydispersen Partikelkollektivs liegt die Porosität in einem validen Bereich für die dichten Partikelschichten.

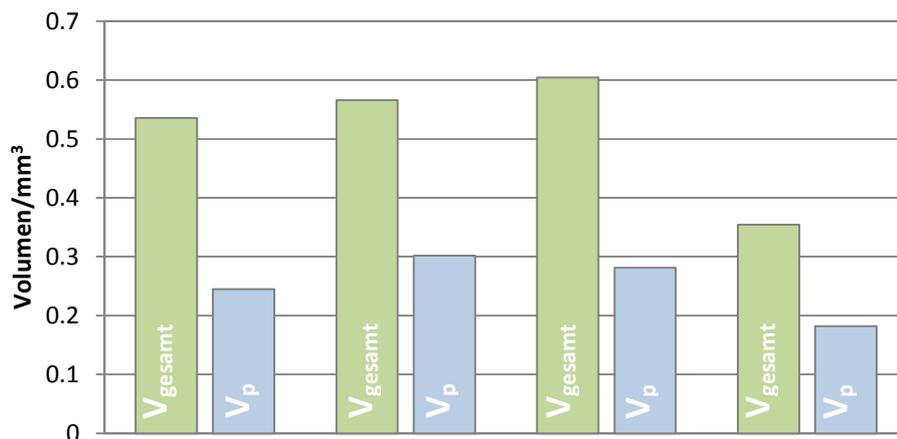


Abbildung 3.22 Vermessung von Partikelschichtvolumina mit unterschiedlicher Ausgangsschichtdicken vor (V_{gesamt}) und nach dem Schmelzvorgang (V_p) zur Bestimmung der Porosität von Partikelschichten mit Luftstrahlmühlenpartikeln.

3.9.6 Einfluss der Schichtdicke auf das Laserergebnis

Eine weitere Zielgröße des Prozesses ist die Optimierung der Beschichtung für die weiteren Prozessschritte der Peptidmicroarraysynthese. Insbesondere die Kompatibilität mit dem anschließenden Laserprozess wurde in der Arbeit betrachtet. Neben der Oberflächenrauigkeit und der Porosität hat vor allem die Schichtdicke einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse des Laserprozesses. Abbildung 3.23 zeigt den Zusammenhang der Größe der mit dem Laser belichteten Spots in Abhängigkeit von der Schichtdicke.

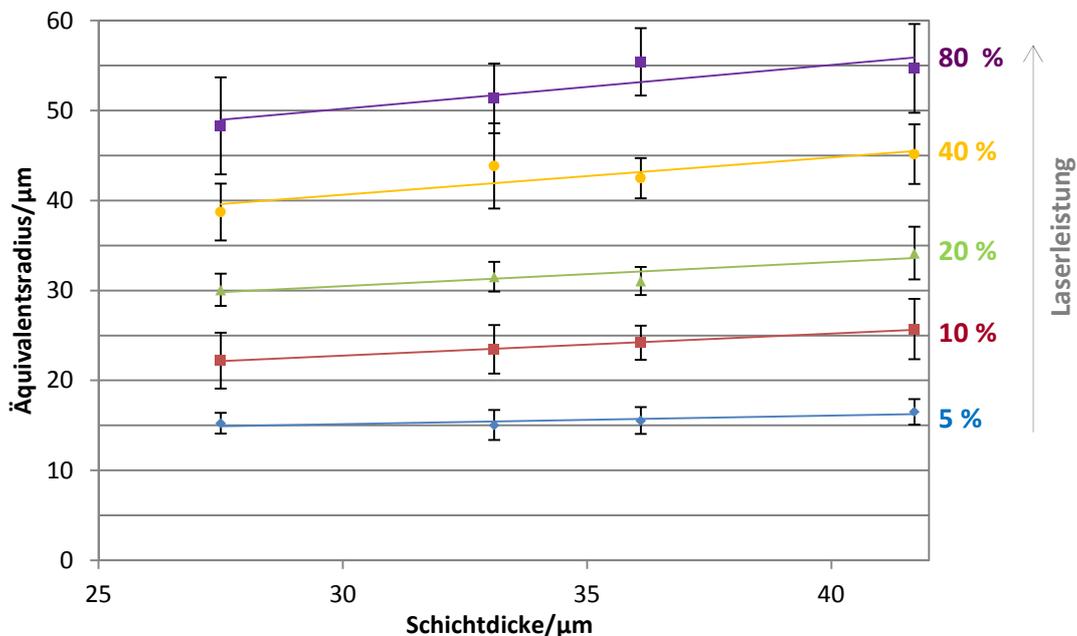


Abbildung 3.23 Einfluss der Laserleistung auf den Äquivalentsradius der Spots in Abhängigkeit zur Höhe der Schicht. Die Laserleistung wurde in Schritten von 5 % bis 80 % variiert.

Wie in Abbildung 3.23 gezeigt ist neben der Schichtdicke die Energie des Laserpulses von entscheidender Bedeutung für die Größe der Spots. Daher müssen die Schichtdicke und die Laserleistung zusammen optimiert werden. Bei geringen Leistungen des Lasers ist der Anstieg der Spotgröße mit zunehmender Schichtdicke gering. Dies ermöglicht einen in diesem Bereich robusten Prozess, der geringe fertigungsbedingte Schwankungen der Schichtdicke toleriert. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Definition des tolerierbaren Schichtdickenbereiches, der vor dem Laserprozess überprüft wird. Aus weiteren Messungen lässt sich die Grenzen der Partikelschichtdicke für das zuverlässige Belichten mit dem Laser von Partikelspots definieren: Ab einer Schichtdicke größer als 17 μm lassen sich Partikelspots durch Lasereinstrahlung fixieren. Da die Spezifikationen für die Herstellung der Peptidmicroarrays einen Pitch kleiner 50 μm fordern, muss der Spotdurchmesser kleiner als 40 μm sein. Anhand der in Abbildung 3.23 dargestellten Verhältnisse lassen sich entsprechende Belichtungsparameter auf die Dicke der Schicht anpassen.

3.9.7 Peptidsynthese als Machbarkeitsstudie

Nach der Optimierung der Aminosäurepartikelschicht soll eine Machbarkeitsstudie die Eignung der Beschichtung für den Herstellungsprozess von Peptidmicroarrays bestätigen. Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Prozessschritte des Verfahrens. In Vorexperimenten konnten bereits Muster mit einem Pitch von 33 μm erzeugt werden [39], daher wurde dieser im Experiment zwischen 33 μm bis 100 μm variiert (siehe Abbildung 3.24b, d, f).

Abbildung 3.24a, b zeigt die auf dem Glasobjektträger aufgebrachte homogene Partikelschicht, die mit dem Laser durch ein selektives Schmelzen der Schicht zu definierten Partikelspots entsprechend strukturiert wurde. In Abbildung 3.24c, d werden die angeschmolzenen Partikelspots nach der Reinigung gezeigt. Diese Reinigung erfolgt dabei selektiv, nicht geschmolzene Partikel müssen möglichst vollständig entfernt werden, um die Hintergrundsignale zu reduzieren. Nach der in Kapitel 3.8.6 dargestellten Dipeptidsynthese zeigt Abbildung 3.24e, f den Fluoreszenznachweis der Kupplungsreaktion (vergleiche Anhang A). Die Kratzer auf dem Fluoreszenzbild sind nicht durch die Synthese bedingt, sondern auf die verwendeten Oberflächen zurückzuführen. Das Array in Abbildung 3.24e hatte in diesem Fall 80.000 Spots auf einer beschichteten Fläche von 16 mm \times 32 mm (Pitch 80 μm , Spotdichte 15.625 Spots/cm²).

Eine Steigerung der Spotdichte wurde ergänzend untersucht. Der in Abbildung 3.24f gezeigte Arrays enthält Muster mit einem unterschiedlichen Pitch, der zwischen 33 und 100 μm variiert wurde. Aufgrund der Eigenschaften der Schicht war bei diesem Array ein Pitch von 50 μm grundsätzlich herstellbar, die qualitativ hochwertigsten Ergebnisse wurden jedoch bei einem Pitch von 80 μm erzeugt. Negative Auswirkung hat die Anzahl an Agglomeraten. Diese wurden bereits reduziert, lassen sich aber aufgrund des Partikelmaterials nicht komplett vermeiden. Somit konnte die Kompatibilität der Beschichtung mit den Folgeprozessen der Peptidsynthese gezeigt werden.

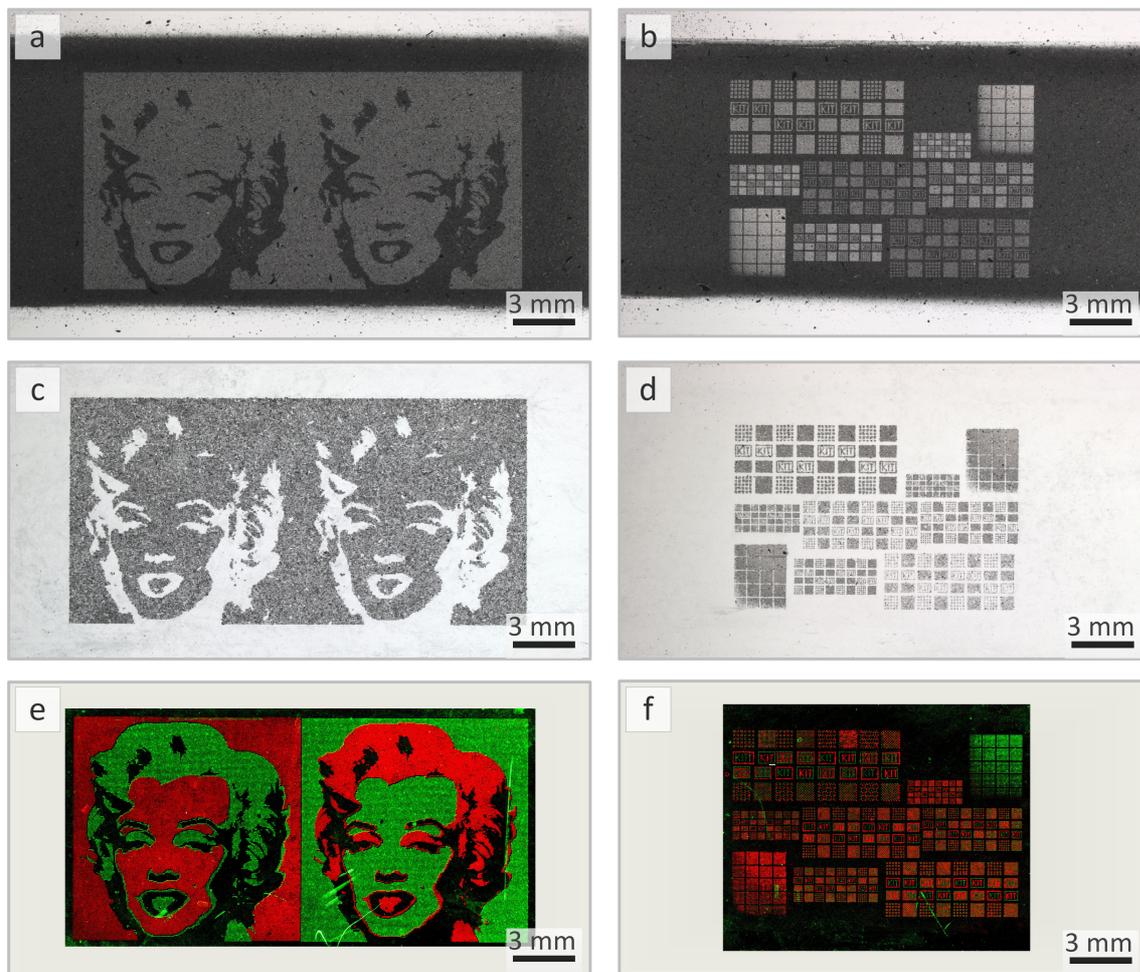


Abbildung 3.24 Dipeptidsynthese für zwei Arrays a), c), e) zeigen das Werk „Marilyn Monroe“ (1967) von Andy Warhol mit 80.000 Spots auf einer Fläche von 16 mm × 32 mm. b), d), f) zeigen die Auflösung der Methode durch eine Variation des Pitches von 100 µm bis 33 µm. Dabei zeigen a), b) die mit dem Laser strukturierte Partikelschicht, c), d) die angeschmolzenen Partikel nach der Reinigung und e), f) den Fluoreszenznachweis der Kupplungsreaktion.

3.10 Diskussion der Ergebnisse

Für den Einsatz des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens zur Herstellung von Peptidarrays wurde ein Aminosäurepartikel-Beschichtungsprozess entwickelt. Dieser kann in drei Subprozesse unterteilt werden: die Aerosolerzeugung, die Partikelaufladung und die Partikelabscheidung auf dem Substrat.

Die Aerosolerzeugung ist mit dem verwendeten Aerosolgenerator reproduzierbar durchführbar. Durch eine Optimierung der Prozessparameter konnte eine stationäre Partikeldichte im Aerosol eingestellt werden, die die Basis für stark homogene Schichten darstellt.

Bei der Aufladung der Partikel konnten einige grundlegende Einfluss- und Störgrößen ermittelt werden. Während der Arbeit hat sich gezeigt, dass die statische Aufladung der Partikel stark von den Materialei-

genschaften der Partikel und der Luftfeuchtigkeit abhängt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Aminosäurepartikel in Abhängigkeit von der Herstellungsmethode unterschiedlich stark elektrostatisch aufladen lassen. Vermutlich ist dafür die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit durch die unterschiedlichen Herstellungsverfahren verantwortlich: Die Geometrie der Partikel unterscheidet sich zwischen den statistisch geformten Luftstrahlmühlenpartikeln mit einer hohen Oberflächenrauigkeit und den runden, glatteren Sprühtrocknerpartikeln. Des Weiteren zeigen die Versuche zur Variation der Abscheidefelder, dass sich die Partikel im Falle der triboelektrischen Aufladung zu gleichen Teilen jeweils positiv und negativ beim Kontakt mit dem gebogenen PTFE-Schlauch aufladen. Für ein homogenes Material entspricht dieses Verhalten nicht der Theorie der elektrostatischen Aufladung. Dafür ist vermutlich die Inhomogenität der Partikelzusammensetzung verantwortlich. Während des Herstellungsprozesses sind Materialbestandteile (Graphit) im Lösungsmittel nicht löslich, sodass sich die Kompositpartikel bezüglich ihrer Bestandteile unterscheiden.

Die großflächige Abscheidung der Partikel geschieht durch die Kombination eines homogenen elektrischen Felds mit einem durch den Aerosolstrahl bewegten Substrat. Dies ermöglicht eine Beschichtung einer beliebig großen Fläche und die Einstellbarkeit der Schichtdicke über die Verfahrensgeschwindigkeit des Substrates.

Nach der Kombination der Teilmodule zu einer automatisierten Anlage wurde die Kompatibilität mit dem Folgeprozess der Peptidarrayherstellung, dem Laserprozess, untersucht. Durch eine Dipeptidsynthese konnte die Machbarkeit des Konzeptes bewiesen werden. Das Verfahren wurde zum Patent angemeldet [46].

3.11 Einsatz der Beschichtung für andere Anwendungen

Im Laufe der Arbeit hat sich gezeigt, dass sich die Anlage neben der Beschichtung mit Aminosäurepartikeln auch für andere Einsatzbereiche eignet. Dies ist bedingt durch die große Vielfalt von Partikeln unterschiedlicher Materialien und Substrate, die mit der Methode kompatibel sind. Dabei sind Partikelgrößen im Mikro- und Nanobereich möglich (im Speziellen wurden Partikel von 20 nm bis 200 μm erfolgreich getestet). Auch die Größe und Geometrie der Substrate ist durch den Einsatz der Verfahrenseinheit flexibel wählbar. Es können neben Glasträgern auch Papier und Gold- oder Siliziumwafer beschichtet werden (siehe Abbildung 3.25). Des Weiteren lassen sich die erzeugten Schichten durch eine entsprechende Nachbehandlung (z.B. Tempern, Lasersintern) gezielt in ihren Eigenschaften verändern.

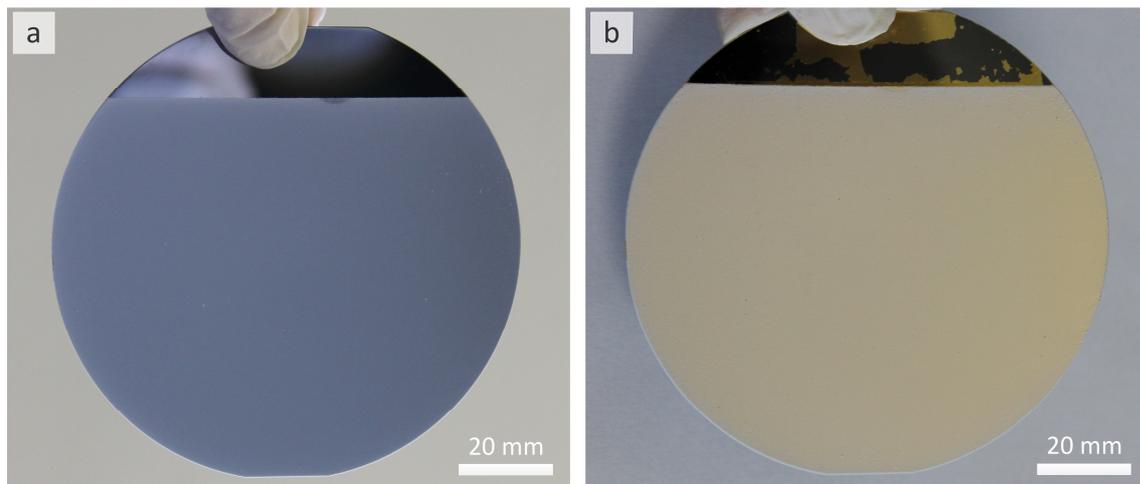


Abbildung 3.25 Beschichtung eines 4-Zoll (a) Si-Wafers und (b) Gold beschichteter Si-Wafer mit TiO_2 -Partikeln [31].

Der Beschichtungsprozess eignet sich besonders für empfindliche oder funktionalisierte Partikel. Der Prozess geht schonend mit den Partikeln um und findet bei Raumtemperatur statt. Zudem ist die Verwendung von Schutzgas für reaktive Partikelsorten möglich, da das Beschichtungsgehäuse abgeschlossen ist. Daher konnte die Verwendung von amino-funktionalisierten Beads für biochemische Anwendungen gezeigt werden [31]. Aufgrund dieser großen Vielfalt ist das Verfahren breit einsetzbar und wurde zum Patent angemeldet [47].

4 Entwurf eines automatisierten Herstellungsprozesses

Für die Herstellung eines Peptidmicroarrays mit dem Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahren werden die drei Prozessschritte der Beschichtung, der Laserstrukturierung und des selektiven Reinigungsschritts zyklisch durchlaufen. Zudem sind nach der Strukturierung jeder Aminosäurelage mehrere chemische Schritte für die Verlängerung des Peptides um eine Aminosäure notwendig (siehe Anhang A). Die Herstellung eines ultra-hochdichten Peptidarrays ist aufwendig. So müssen für die Synthese von dekamerischen Oligopeptiden bis zu 200 Prozesszyklen durchlaufen werden. Das ist routinemäßig nur mit einer automatisierten Anlage möglich. Das Konzept für eine solche automatisierte Anlage ist im Folgenden dargestellt.

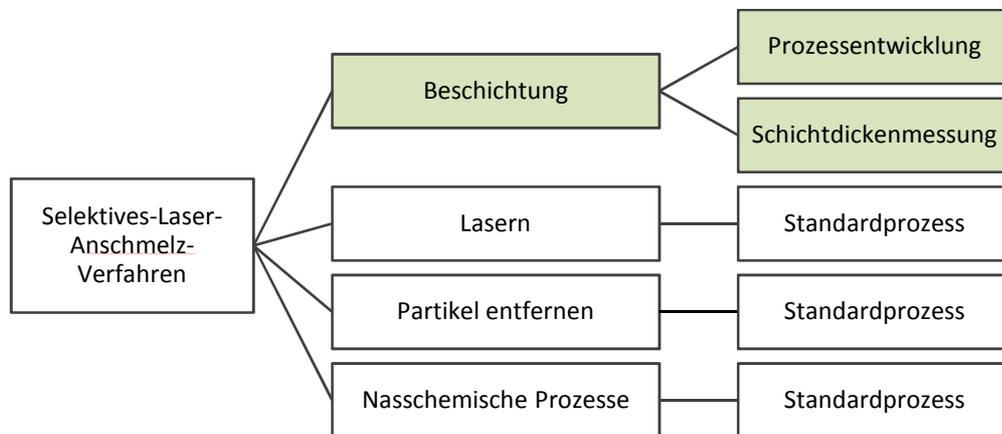


Abbildung 4.1 Einteilung des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens in Einzelprozesse.

Abbildung 4.1 zeigt die Funktionalitäten, die eine solche automatisierte Anlage besitzen muss. Der Laserschritt und die anschließende Partikelentfernung wurden bereits eingehend untersucht [42], während die chemischen Prozessschritte ein Standardprozess der partikelbasierten Peptidsynthese sind [13]. Neben dem in Kapitel 3 entwickelten automatisierten Beschichtungsprozess ist eine In-Prozess-Schichtdickenmessung für den Herstellungsprozess notwendig. Deren Entwicklung ist im nächsten Abschnitt dargestellt.

4.1 In-Prozess-Schichtdickenmessung

Für die automatisierte Herstellung von ultra-hochdichten Peptidmicroarrays ist es wichtig, zu Qualitätszwecken ein geeignetes Messverfahren für die Aminosäurepartikelschicht einzusetzen, da diese in Abhängigkeit von den Umwelteinflüssen variieren kann. Wie in Kapitel 3 beschrieben, wurde die Schichtdicke mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop bestimmt. Dieses ist jedoch für die In-Prozess-Messung nicht geeignet. Zudem sollte die Schicht sowohl auf Partikelagglomerate als auch auf eine

gleichmäßige Schichtdicke hin überprüft werden. Literaturrecherche und Machbarkeitsstudien mit kommerziell verfügbaren In-Prozess-Schichtdickenmessgeräten ergaben kein zufriedenstellendes Ergebnis. Aufgrund der Porosität und der geringen Festigkeit der Partikelschichten lassen sich Standardmethoden zur In-Prozess-Schichtdickenmessung (kapazitive Messung etc.) nicht übertragen. Daher musste ein Prozess für die hergestellten Partikelschichten entwickelt werden, mit dem sich im Fertigungsprozess die Schicht charakterisieren lässt.

Die Anforderungen lassen sich folgendermaßen beschreiben:

- Abschätzung der Schichtdicke
- Charakterisierung der Homogenität der Schicht
- Detektion von Fehlstellen (Partikelagglomerate oder Fehlstellen in der Schicht)

Aufgrund der geringen Haftfestigkeit der Schicht wird ein optisches Messverfahren eingesetzt. Dieses nutzt die Transmissionseigenschaften der Partikelschicht: Die Partikelschicht wird im Durchlicht von einer Kamera aufgenommen.

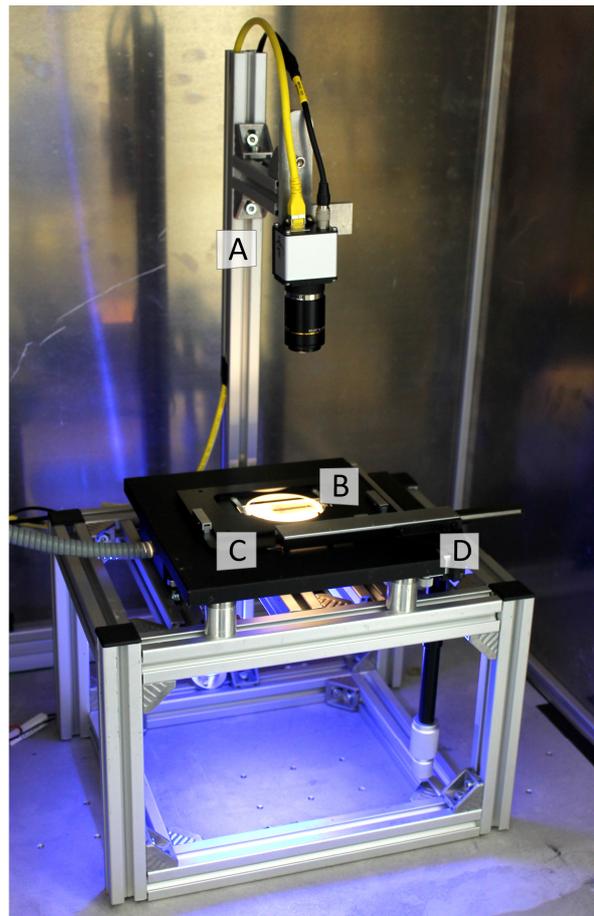


Abbildung 4.2 Prüfstand zur Klassifizierung der hergestellten Partikelschichten Die Kamera (A) nimmt die Partikelschicht (B) auf, die auf einer homogenen Beleuchtung (C) mit einem x,y-Tisch (D) positioniert wird.

Aufgrund der Intensitätsverteilung der Kameraaufnahme wird auf die Schichtdicke geschlossen. Der experimentelle Aufbau (siehe Abbildung 4.2) besteht aus einer Kamera GigE SE UI-5490SE (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm) mit dem Objektiv LM25JC10M (Kowa Optimed Europe Ltd., Berkshire, UK), einer Halterung für den mit Aminosäurepartikeln beschichteten Objektträger (Beschichtungsparameter und Partikelgrößenverteilung sind in Anhang B dargestellt) und einer homogene LED-Lichtquelle (isys vision, Freiburg). Für die Messung wird zuerst ein Referenzbild ohne Aminosäurepartikelschicht aufgenommen. Über eine Subtraktion des Referenzbildes von der Messung kann die systematische Messabweichung verringert werden. Für den in Abbildung 4.4 beschriebenen Versuch wurden auf den Trägern Aminosäurepartikelschichten mit einem Schichtdickegradienten hergestellt. Dadurch konnten mehrere Versuchspunkte auf dem gleichen Träger aufgenommen werden. Die Partikelschicht wurde dann in Abschnitte unterteilt, von denen die Lichtintensität und die Schichtdicke mit dem Laserscanning-Mikroskop gemessen wurden. Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, ergibt sich aus der Messung ein nichtlineares Verhalten, das sich durch die Absorptionseigenschaften der Partikel erklären lässt. Diese Absorptionseigenschaften lassen sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz approximieren. Aufbauend auf dieser Messung lässt sich, basierend auf der Intensität, die Schichtdicke abschätzen.

Die Bestimmung der Schichtdicke mithilfe eines intelligenten Algorithmus wurde von Metzger während seiner Bachelorarbeit implementiert [48]. Der Prozess umfasst mehrere Schritte. Zuerst muss die produzierte Schicht mit einer Kamera aufgenommen werden. Die Bilder werden dann in Matlab eingelesen und vorverarbeitet (in Grauwerte konvertiert und zugeschnitten). Die bearbeiteten Informationen können dann von der intelligenten Software, basierend auf maschinellem Lernen, klassifiziert werden. Diese Klassifizierung der Partikelschicht erfolgt in fünf Klassen: Schicht ist zu dünn, gut, oder zu dick, Schicht enthält Agglomerate oder Inhomogenität. Der Algorithmus besteht aus einer Kombination aus Support-Vector-Machine (SVM), Neuronalem Netz und Fuzzy-Logik.

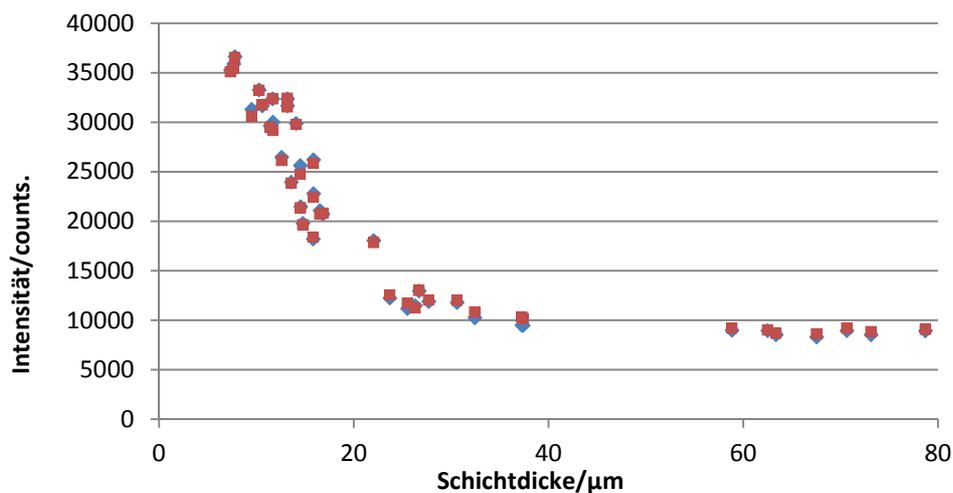


Abbildung 4.3 Verhältnis der Schicht und der Intensität.

Statt alle Funktionen in einem Algorithmus zu vereinen, hat man hier mit einem eigens abgestimmten Training spezialisierte Teilsysteme zu einem Gesamtsystem kombiniert.

Das Klassifizierung wurde nach dem Training der einzelnen Systeme validiert. Dazu wurde eine Gesamtanzahl von 100 Proben, bestehend aus jeweils 20 Proben der entsprechenden Klasse, vom System in fünf Prozessschritten getestet. Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse. In Schritt „Start“ wurde mit dem Fuzzy-System eine vorläufige Klassifizierung durchgeführt. Dabei werden bereits über 40 Proben als nicht fertigungsgeeignet klassifiziert (siehe Abbildung 4.4a). Die nachfolgenden Schritte sortieren dann die inhomogenen Schichten (Abbildung 4.4b), die geringe Schichtdicke (Abbildung 4.4c) und die zu große Schichtdicke (Abbildung 4.4d) mittels SVM aus. Die agglomeratbehafteten Proben werden mittels Neuronalem Netz herausgefiltert. Abbildung 4.4e zeigt die Menge nach dem gesamten Klassifizierungsprozess. Diese Anordnung der Lernmechanismen wurde in entsprechenden Vorversuchen ermittelt.

Aus der Anfangsmenge (jeweils 20 % für jede Klasse) klassifizierte das System 99% aller Proben richtig. Die Falsch-Klassifizierung (Anteil der ungeeigneten Proben, die fälschlicherweise als gut klassifiziert werden) lag bei 0 %, lediglich eine gute Probe wurde als ungeeignet klassifiziert und damit aussortiert.

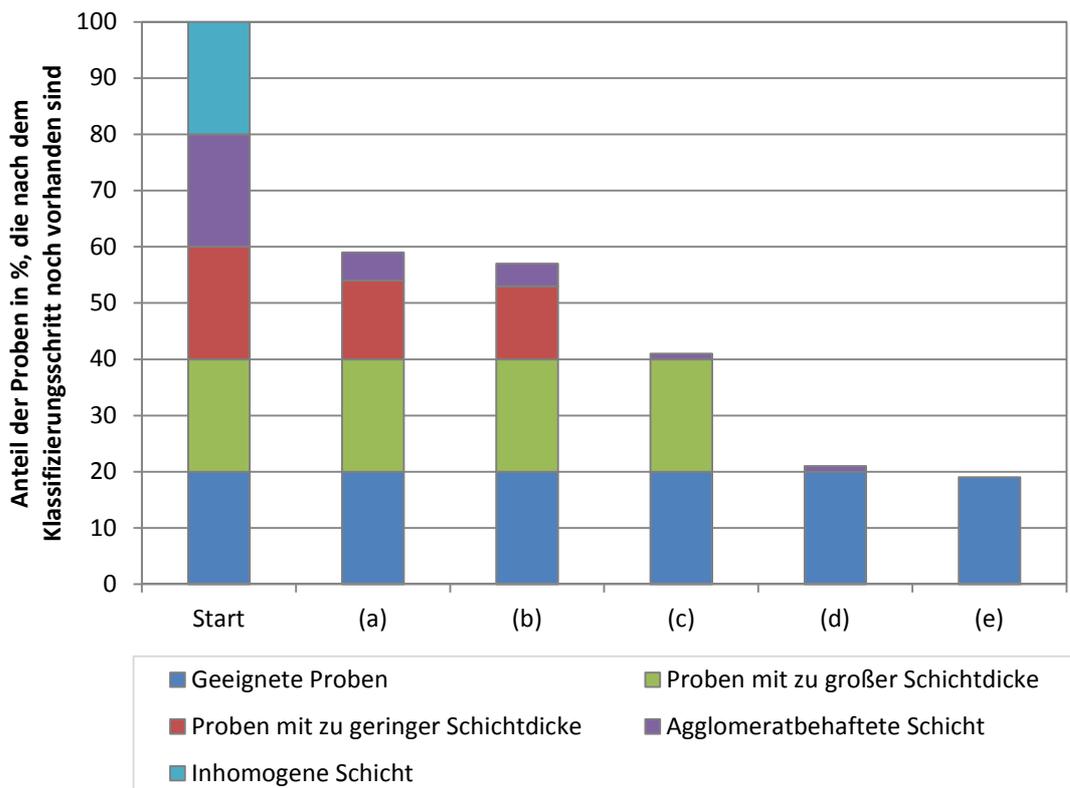


Abbildung 4.4 Anteil der Proben, die nach den Klassifizierungsschritten a-e noch vorhanden sind. Die unbrauchbaren Proben werden nach mehreren Klassifizierungszyklen aussortiert, ausschließlich gute Proben bleiben in der Produktion.

Das System, bestehend aus einem Kameraaufbau und einer intelligenten Software, kann nun für die Qualitätsprüfung der Schichtdicke eingesetzt werden. Der Vorteil gegenüber klassischen Verfahren besteht in der Möglichkeit, die In-Prozess-Messung während des automatisierten Fertigungsprozesses von Peptidmicroarrays einzusetzen. Durch leichte Modifikation der Lernparameter kann mit der Methode auch die Strukturierung nach dem Laserprozess auf ihre Qualität überprüft werden.

4.2 Konzept der automatisierten Peptidarrayherstellung

Hierfür wurde mit der Firma GAS Automation GmbH ein erstes Konzept zur Fertigung und zum Aufbau einer Produktionsanlage von Peptidarrays (vergleiche Abbildung 5) erarbeitet. Dieses besteht aus drei Stationen (Station 1 für die Beschichtung der Substrate mit Aminosäurepartikel und das Entfernen der Partikel, Station 2 für den darauf folgenden Laserschnitt, Station 3 als Lagerplatz für beschichtete oder strukturierte Träger), die über eine Linearachse verbunden werden. Da der Strukturierungsprozess den höchsten Aufwand bei der Herstellung der ultra-hochdichten Peptidarrays darstellt, soll dieser automatisiert werden. Für die chemischen Prozessschritte wird der Glasobjektträger manuell entnommen und später entsprechend wieder eingelegt.

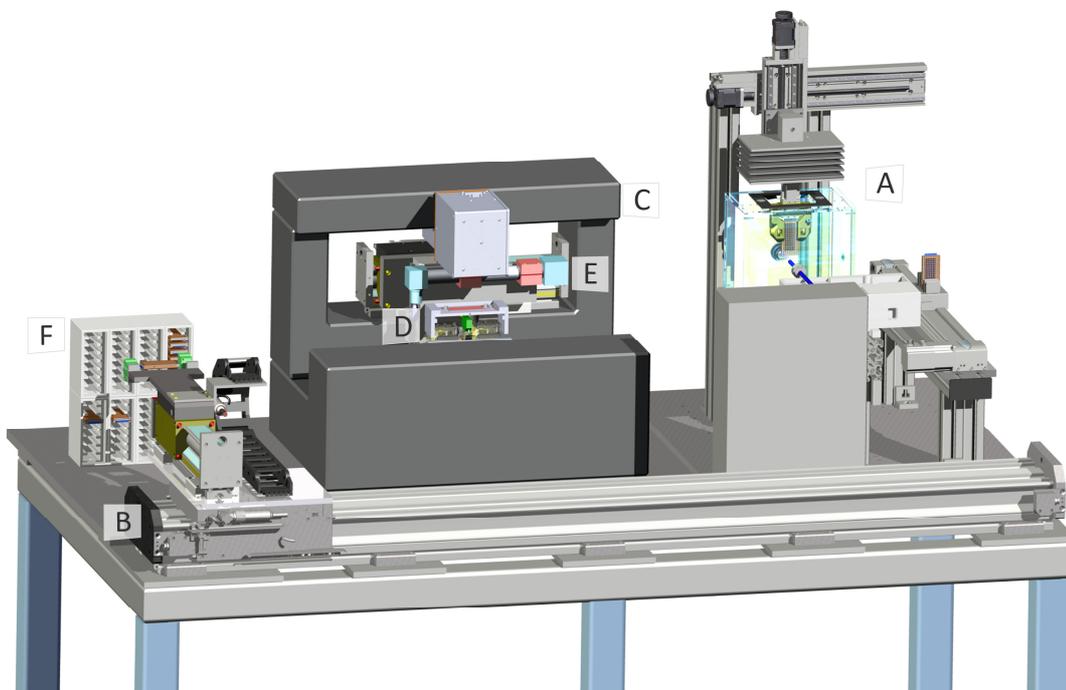


Abbildung 4.5 Konzept der Automatisierung. Nach der Beschichtung der Glassubstrate (A), die in einen Träger eingelegt sind, wird dieser mit der Linearachse (B) und einem Greifer zur Lasereinheit (C) gefahren und dort in eine Ablage (D) positioniert. Mit der Kamera (E) lässt sich die Position anhand von Markierungen bestimmen. Die Träger können in einem Depot (F) zwischengelagert werden.

Der funktionalisierte Glasobjektträger wird in einem Rahmen montiert er durchläuft so alle Prozessschritte der Beschichtung, des Belichtens mit dem Laser und der Reinigung. Dieser Rahmen ermöglicht durch die verwendeten Greifer eine sichere Handhabung und zudem eine höhere Positioniergenauigkeit im Vergleich zu den empfindlichen, funktionalisierten Glasträgern.

Ablauf der Automatisierung

Für den Beschichtungsprozess wird der Rahmen mit dem Glasobjektträger der in Kapitel 3 beschriebenen Beschichtungsanlage zugeführt. Nach der Beschichtung wird er mittels einer Linearachse zur Qualitätskontrolle bewegt, danach zur Lasereinheit gefahren und in einer Ablage positioniert. Diese mechanische Vorpositionierung erfolgt über eine formschlüssige Verbindung (konische Aufnahmestifte an der Objektträgerhalterung und entsprechende Bohrungen in der Ablage). Die Erkennung der Lage des Objektträgers wird durch ein in der Lasereinheit integriertes Bildverarbeitungssystem umgesetzt. Nach dem Laserprozess wird das Substrat an die Reinigungsstation bewegt und dort gereinigt. Nach der Strukturierung einer Aminosäuresorte kann das Substrat dann in einem Depot gelagert oder weiterverarbeitet werden. Dieses Depot ermöglicht die parallele Herstellung mehrerer Arrays. Dafür ist jedoch eine Nachverfolgbarkeit der Substrate wichtig: Diese werden mit einem in Glas eingeschweißten RFID (radio-frequency identification)-Chip versehen. Dieser hält die chemischen Prozesse aus und ermöglicht die Nachverfolgung des Trägers und die bereits durchlaufenen Prozessschritte, die in einer Datenbank hinterlegt sind.

Zusammen mit GAS Automation GmbH wurde dann eine Anlage geplant. Neben der Definition der Spezifikationen (Positioniergenauigkeit, Geschwindigkeit, Handhabung der Träger) wurden technische Aspekte erarbeitet. Das System wird auf einem Gestell und Granit aufgebaut und die gesamte Programmierung der Prozesse (die Positionserkennung, die Datenbank für die RFID-Daten und die Steuerung der Beschichtung und Reinigung) auf Basis einer SPS programmiert. Zudem erfolgt für die Produktion eine Programmierung der Benutzeroberfläche mit kompletter Parametrisierung und Optimierung. Die veranschlagten Kosten betragen 180.000 €. Vor dem Projektstart muss jedoch der selektive Reinigungsschritt noch in die Beschichtungsstation integriert und anschließend validiert werden. Dies wird im Ausblick der Arbeit näher beschrieben.

5 Transfer von Peptidmicroarrays

Der Transfer von Peptidmicroarrays von einem funktionalisierten Glasobjektträger, dem sogenannten Syntheseträger, auf eine Zieloberfläche hat mehrere Vorteile. Ein wichtiger Aspekt ist die Aufreinigung des Peptidmicroarrays. In Schirwitz und Löffler [18] konnte eine Aufreinigung im Arrayformat gezeigt werden, bei der ausschließlich die vollständig synthetisierten Peptide auf einen Zielträger transferiert wurden, während die Abbruchprodukte der Synthese gewaschen wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass bis zu 20 Replikate eines Peptidmicroarrays hergestellt werden können. Dies ist vor allem von großer industrieller Bedeutung, da die Produktionskosten so stark gesenkt werden können. Ein weiterer Vorteil des Transfers ist die Möglichkeit, Substrate wie beispielsweise Folien, auf Mikrochips basierende Sensoren oder Tropfenarrays mit der Peptidmicroarraytechnologie zu kombinieren.

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines Prozesses für den Transfer von Peptidmicroarrays beschrieben, aufbauend auf der Machbarkeitsstudie von Schirwitz und Löffler [18] und einer auf Ueda [49] basierenden Neuentwicklung.

5.1 Theorie des Transfers von Molekülbibliotheken

5.1.1 Transfer im Allgemeinen

Die Aufreinigung von Peptiden wird vielfach mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration durchgeführt [50]. Da die Peptide von der Oberfläche abgespalten werden müssten, sind diese Verfahren für Peptidmicroarrays nicht zielführend, da die Ortsinformation des Arrays während des Prozesses verloren geht. Eine Möglichkeit, die räumliche Information des Arrays zu erhalten, besteht im selektiven Übertrag der vollständig synthetisierten Peptide ohne laterale Diffusion, sodass die Größe der Spots und ihr Pitch ohne Querkontamination erhalten bleiben.

Der Übertrag von Peptiden oder Proteinen im Arrayformat ist durch softlithografische Methoden möglich, insbesondere durch das sogenannte Micro-Contact-Printing [51]. Dabei wird ein mikrostrukturierter Polydimethylsiloxane (PDMS)-Stempel mit einer Peptidlösung benetzt und diese auf ein Substrat transferiert. Allerdings ist die Herstellung eines Arrays mit vielen verschiedenen Peptiden aufwendig, da man mehrstufige Druckprozesse mit mehreren Stempeln (jeweils einen pro Peptidsorte) benötigt. Eine ausgiebige Diskussion ist in Ruiz [52] dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit des Übertrags von Peptiden im Arrayformat ist in [53] beschrieben. Hier wird ein gespotteter Peptidmicroarray auf ein Hydrogel im Arrayformat übertragen, indem das Hydrogel auf dem

Peptidarray auspolymerisiert wird und die Peptide beim Ablösen des Hydrogels von der Glasoberfläche an diesem immobilisiert werden. Schirwitz und Löffler [18] verfolgen ein ähnliches Prinzip, das im Folgenden näher dargestellt wird.

5.1.2 Transfer von ultra-hochdichten Peptidmicroarrays

In diesem Abschnitt wird der Transfer eines Peptidmicroarrays beschrieben, da er die Basis für den zu entwickelnden Prozess darstellt. Ein Peptidmicroarray wird dabei auf eine goldbeschichtete Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen.

Das Wirkprinzip ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Unvollständige Peptide werden geblockt und nicht weiter synthetisiert. Als letzten Syntheseschritt wird Cystein verwendet. Nach der Entschützung der Seitenketten mit gleichzeitiger Abspaltung der Peptide (ein für die Peptidsynthese optimierter Linker (RINK-Amid-Linker) erlaubt eine Abspaltung der Peptide vom Syntheseträger) können die vollständig synthetisierten Peptide durch die Bildung von Thiol-Gold-Bindungen auf der PVDF-Membran immobilisiert werden, indem die beiden Oberflächen aufeinander gepresst werden. Unvollständige Peptide können nicht binden und werden gewaschen.

Ein spezifischer Transfer von 10.000 Peptidspots pro cm^2 konnte mit diesem Verfahren nachgewiesen werden. Die Machbarkeitsstudie weist jedoch einige Nachteile auf. Das Thiol-Gold-System kann einen unspezifischen Übertrag zur Folge haben, falls in der Peptidsequenz ein weiteres Cystein vorhanden ist. Zudem ist das Gold für einen Fluoreszenznachweis ungeeignet, aufgrund des Fluoreszenzlöschungseffekts. Eine weitere Limitation der Methode besteht in der gleichzeitigen Abspaltung und im Übertrag bei harschen Abspaltbedingungen. Dies schränkt die Anwendung von sensiblen Systemen (z. B. zellbasierte Anwendungen) ein. Zudem sind für die eigentliche Anwendung in Screenings Membranen oftmals ungeeignet, da sie in den typischen Wellenlängen eine hohe Autofluoreszenz aufweisen, wohingegen Glas nahezu keine Autofluoreszenz zeigt.

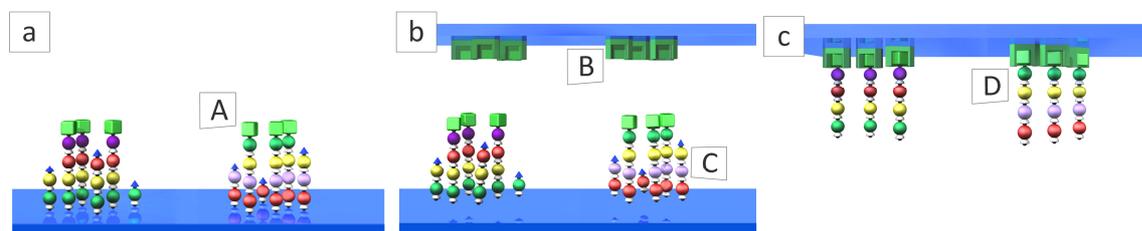


Abbildung 5.1 Wirkprinzip des In-situ-Transfers. a) Vollständig synthetisierte Peptide werden mit einer Thiolgruppe funktionalisiert (A). b) Alle Peptide werden vom Träger (C) abgespalten und diffundieren zum funktionalisierten Zielträger (B). c) Ausschließlich vollständige Peptide (D) werden auf dem Zielträger immobilisiert.

5.1.3 Transfer auf sensible Oberflächen

Da bei dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen Transfer die Oberflächen mit definierter Kraft aneinander gepresst werden, eignet sich der Übertrag nicht für sensible Oberflächen (z.B. mit einer Oberflächenfunktionalisierung oder einer Strukturierung der Oberfläche), da diese bei einem kraftgesteuerten Übertrag beschädigt werden können. Als exemplarisches Beispiele wurden die sogenannten „DropletMicroarrays“ ausgewählt [54]. Diese bestehen aus superhydrophilen Spots, die voneinander durch superhydrophobe Bereiche auf einem Glassubstrat abgegrenzt werden. Infolge dieser Strukturierung der Oberfläche lassen sich einzelne Tropfen generieren [49]. Aufgrund der einfachen Herstellung und der breiten Anwendungsmöglichkeiten wurden unter anderem die DropletMicroarrays für den Transfer genutzt.

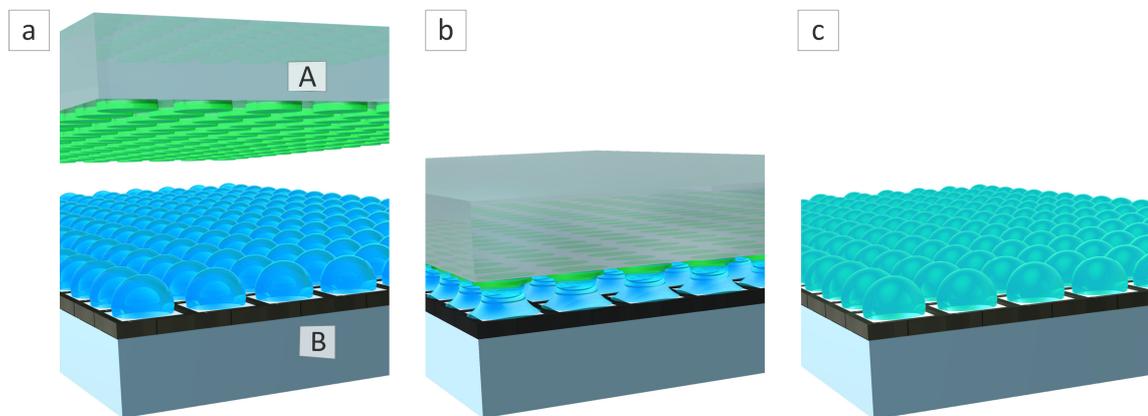


Abbildung 5.2 Positionsgesteuerter Übertrag auf einen Tropfenarray. a) Der Molekülarray (A) wird über dem Dropletmicroarray (B) lateral positioniert. b) Der Array wird vertikal verfahren, bis ein Transfer der Moleküle in die Tropfen stattfindet. c) Der Molekülarray wird planparallel entfernt.

Der Transfer des Molekül- oder Peptidmicroarrays (siehe Abbildung 5.2) von einem Träger in die Tropfen des Analyten erfolgt derart, dass pro Tropfen eine Molekülsorte übertragen wird und keine Vermischung/Kreuzkontamination zwischen den Tropfen stattfindet.

5.2 Profilverfindung

Entsprechend der in Kapitel 5.1 beschriebenen Machbarkeitsstudien sollte eine Weiterentwicklung zu einem robusten Prozess erfolgen, der eine einfache Bedienung und einen Übertrag ohne Störfaktoren, wie beispielweise das Verrutschen der Träger beim Trennen, gewährleistet. Dabei sind vor allem die Einstellbarkeit von Prozessparametern und eine hohe Reproduzierbarkeit wichtig. Die Definition des Profils erfolgte entsprechend:

Es soll ein technischer Prozess entwickelt werden, der mit einer geeigneten Immobilisierungsstrategie Peptide im Arrayformat auf funktionalisierte, starre Träger überträgt.

5.3 Ideenfindung

Die Generierung der Ideen erfolgte zusammen mit Striffler [55] als interdisziplinäres Projekt. In der vorliegenden Arbeit sind die technischen Aspekte dargestellt, während die chemischen Details des Übertrags in Striffler [55] beschrieben sind. Für den Übertrag sind ein Abspalten und eine Immobilisierung auf der Zieloberfläche notwendig: Für die Immobilisierung der Peptide stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, z. B.: Click-Chemie oder eine Immobilisierung durch Biotin-Streptavidin. Ein entscheidender Parameter für einen gleichmäßigen Übertrag ist der Abstand der Flächen. Daher sind zwei Strategien denkbar: die Einstellung eines Abstandes zwischen den Trägern mit einem Übertrag durch Diffusion der Peptide oder ein Übertrag durch eine Flächenpressung. Zudem ist das Entformen/Trennen der Oberflächen nach dem Übertrag für die Qualität der Replika wichtig. Um ein „Verschmieren“ der Peptidspots zu verhindern, müssen die Träger möglichst planparallel mit definierter Geschwindigkeit getrennt werden.

5.3.1 Ideenfindung zum kraftgesteuerten Übertrag

Für den kraftgesteuerten Übertrag müssen die Oberflächen planparallel ausgerichtet werden und nach dem Übertrag ohne Scherkräfte wieder getrennt werden. Dazu wurde eine Sammlung an verschiedenen Ideen für die technische Umsetzung angelegt, die in Abbildung 5.3 dargestellt sind.

Das Ausrichten der Oberflächen kann aktiv oder passiv erfolgen. Bei der aktiven Methode werden die Oberflächen mithilfe eines Goniometers ausgerichtet. Eine passive Ausrichtung erfolgt über flexible oder passiv bewegliche Elemente, die günstiger und robuster sind.

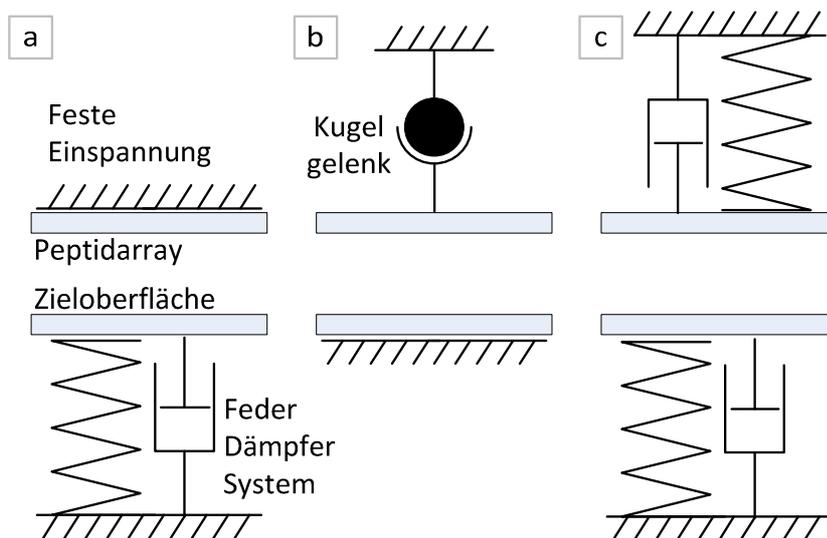


Abbildung 5.3 Ideensammlung zum passiven planparallelen Ausrichten und Entformen: (a) Array fest eingespannt, Zieloberfläche mit parallelem Feder-, Dämpfersystem. (b) Kugelgelenk in Kombination mit fester Einspannung. (c) Kombination aus zwei Feder-, Dämpfersystemen.

5.3.2 Vorversuche zum kraftgesteuerten Übertrag

Für die Auslegung der Komponenten müssen verschiedene Randbedingungen untersucht werden. Dazu gehören die Transferumgebung, die Anpresskraft und die Trennkraft. Diese wurde in Zusammenarbeit mit J. Weisbrodt im Zuge ihrer Bachelorarbeit untersucht [56].

Transferumgebung: Der Übertrag kann in trockener oder flüssiger Transferumgebung stattfinden. In [18] wird ein dünner Flüssigkeitsfilm aus Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, um einen Übertrag mit dem Gold-Cystein-System zu ermöglichen. Nach dem Verdunsten der Flüssigkeit konnten die Träger getrennt werden. Der Übertrag mit dem Streptavidin-Biotin-System zeigt jedoch in einer Wanne mit wässriger Lösung bessere Ergebnisse [56].

Anpresskraft: Nach einem sorgfältigen Ausrichten der Oberflächen wurde durch einen Stempelversuch mit Tinte auf Glasoberflächen bei Kräften von 5 - 6 N bereits gute Ergebnisse erzielt. Die Kraft wurde mit einer Kraftmessdose gemessen [56].

Trennkraft: Die Trennkraft konnte durch einen Übertrag in wässriger Umgebung gesenkt werden. Diese variiert mit der zu trennenden Fläche aufgrund von Kapillarwirkungen im Spalt zwischen den Trägern und beträgt für die Fläche eines Glasobjektträgers 25 N.

Mit den ermittelten Randbedingungen wurde dann eine Machbarkeitsstudie zum Übertrag eines Peptidarrays durchgeführt. Abbildung 5.4 zeigt den Aufbau eines ersten Prototyps für die Vorversuche.

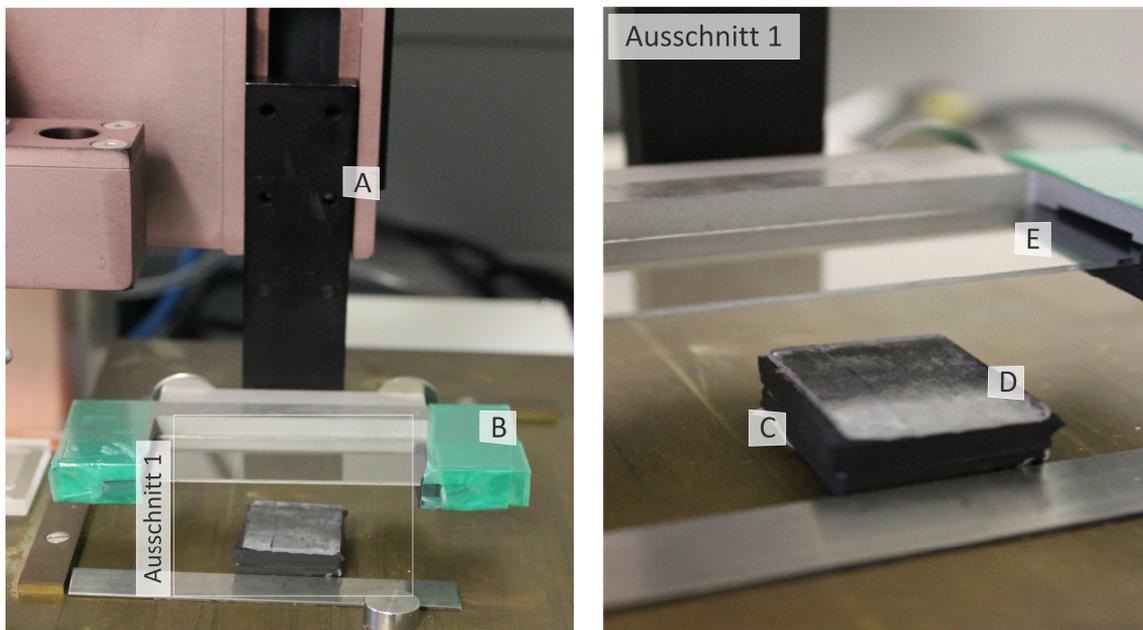


Abbildung 5.4 Vorversuche zum Übertrag mit dem Tischroboter Janome 2200 mini. Die Linearachse (A) des Tischroboters fährt die Halterung (B) und den darin eingespannten Peptidmicroarray (E) auf die Zieloberfläche (D), die auf einer viskoelastischen Unterlage (C) fixiert ist.

Dieser Prototyp besteht aus einer Linearachse des Tischroboters Janome 2200 mini (Janome Industrial Equipment Europe GmbH, Mörfelden-Walldorf), an der der Glasobjektträger befestigt ist, und einer flexiblen Polymerunterlage, auf die der Zielträger geklebt wurde. Die flexible Polymerunterlage hat viskoelastische Eigenschaften und kann in erster Näherung als Feder-Dämpfer-System interpretiert werden. Die Ergebnisse der Vorversuche mit diesem Prototyp (vergleiche Abbildung 5.4) demonstrieren die Machbarkeit des Ansatzes. Daher wurde auf Basis dieses Prototyps eine Anlage entwickelt.

Ein Nachteil bei dem in Abbildung 5.4 gezeigten Prototyp besteht in der hohen Flexibilität der Lagerung der Zieloberfläche. Beim Trennen der Slides kann es zu einem Verkippen kommen, wodurch die Qualität des Übertrags verringert wird. Zudem muss eine Einspannung der Träger erfolgen, da das Kleben ein zerstörungsfreies Ablösen für die Weiterverarbeitung nicht zulässt.

5.3.3 Ideenfindung zum positionsgesteuerten Übertrag

Für den positionsgesteuerten Übertrag müssen die Oberflächen ebenfalls planparallel ausgerichtet werden. Wenn ein Abstandshalter zwischen Oberflächen verwendet wird, kann diese Ausrichtung über ein passives Element, beispielsweise ein Kugelgelenk, erfolgen. Soll der Abstand der Oberflächen zueinander gezielt eingestellt werden, muss die Ausrichtung aktiv über ein Goniometer erfolgen. Die Einstellung des Abstandes kann über eine geregelte oder auch manuelle Linearachse realisiert werden.

5.4 Prinzipmodellierung der Ideen

Nach entsprechender Konzeptionierung und der Durchführung gezielter Vorversuche wird in diesem Kapitel der Prozess des Übertrags konkretisiert.

5.4.1 Unterteilung des Prozesses

In Abbildung 5.5 ist eine Unterteilung des Prozesses in einzelne Schritte dargestellt.

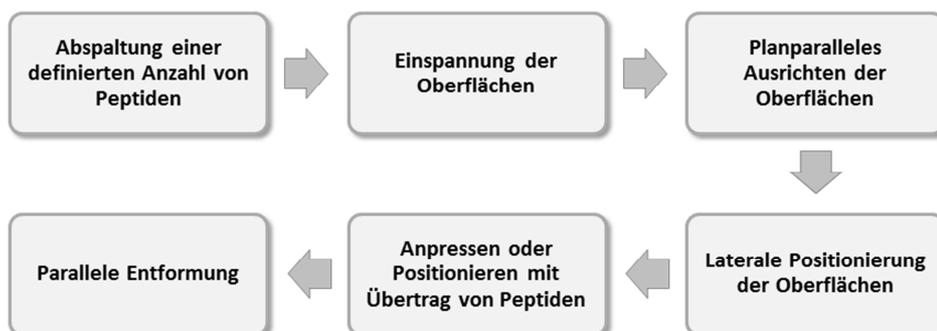


Abbildung 5.5 Ablauf des neu entwickelten Prozesses.

Abspaltung von Peptiden: Der erste Schritt ist die Abspaltung von Peptiden von der Syntheseoberfläche durch eine gasförmige Verbindung. Im Gegensatz zu Flüssigkeiten diffundieren die Peptide nicht lateral in einem gasförmigen Medium und die Ortsinformation des Arrays bleibt erhalten. Da die Konzentration der abgespaltenen Peptide hoch ist, kann es beim Übertrag zu einem Verschmieren der Peptidspots kommen. Daher werden die oberflächlich adsorbierten Peptide vor der Positionierung der Syntheseträger 10 Minuten mit Dimethylformamid gewaschen, kurz mit Methanol gespült und im Luftstrom getrocknet.

Einspannung der Oberflächen: Das Einspannen der beiden Oberflächen erfolgt über einen eigens entwickelten Greifer, der die starren Oberflächen in einer Pufferlösung halten kann. Insbesondere muss die ganze Glasobjektträgerfläche übertragbar sein. Eine Vorpositionierung der Träger ist erstrebenswert.

Laterale Positionierung der Oberflächen: Nach dem manuellen Einspannen werden die Oberflächen zueinander positioniert, sodass die Zieloberfläche und der Peptidmicroarray in lateraler Dimension genau entsprechen.

Planparalleles Ausrichten der Oberflächen: Damit ein Übertrag zwischen zwei starren Oberflächen möglich ist, müssen diese planparallel ausgerichtet werden. Dies geschieht entweder durch passive, elastisch verformbare Kunststoff-Elemente der Konstruktion oder kann aktiv durch den Einsatz von Goniometern geregelt werden. Bei flexiblen Oberflächen (Membranen, Hydrogele) entfällt ein planparalleles Ausrichten. Diese haben jedoch Nachteile, die in Abschnitt 5.1 näher erläutert werden.

Anpressen oder Ausrichten für den Übertrag von Peptiden: Der Übertrag erfolgt durch ein Positionieren oder ein Anpressen mit definierter Kraft zweier funktionalisierter Oberflächen und ermöglicht somit den Transfer von Peptiden von der Synthese- auf die Zieloberfläche. Die Position oder der Druck wird aufrechterhalten, bis genügend Peptide aus den tieferen Schichten des Polymerfilms diffundiert sind, um einen guten Nachweis zu ermöglichen.

Parallele Entformung: Nach dem Übertrag müssen die starren Oberflächen voneinander getrennt werden. Eine Verkipfung oder eine laterale Bewegung hat ein Verrutschen des Arrays und somit einen unbrauchbaren Übertrag zur Folge. Die parallele Entformung mit einer definiert einstellbaren Entformungsgeschwindigkeit ist daher wichtig, um reproduzierbare Übertrage zu ermöglichen.

5.4.2 Anforderungen

Entsprechend der Teilprozessschritte können an die Entwicklung der Anlage folgende Anforderungen gestellt werden:

- Einstellbarkeit wichtiger Prozessparameter (Anpresskraft oder Abstand, Entformgeschwindigkeit)
- Hohe örtliche Auflösung des übertragenen Arrays ohne laterale Diffusion

- Übertrag eines kompletten Glasobjekträgers
- Positionierung der Oberflächen in lateraler Dimension für den Übertrag auf beliebige Oberflächen

Zusätzlich gelten für den positionsgesteuerten Übertrag Anforderungen für eine Positionierung in vertikaler Richtung, da der Abstand und die Ausrichtung der Oberflächen für die Qualität des Übertrags von entscheidender Bedeutung sind. Der Abstand sollte für die verwendeten Oberflächen auf $\pm 5 \mu\text{m}$ eingestellt werden, mit einer Planparallelität von $130 \mu\text{rad}$, damit alle Peptidspots mit den Tropfen des Microdropletarrays in Berührung kommen und der Übertrag durch Diffusion stattfindet.

5.4.3 Gestaltmodellierung der Anlage für den kraftgesteuerten Übertrag

Entsprechend den Teilprozessen und den davon abgeleiteten Anforderungen wurde ein Konzept erstellt, das in Abbildung 5.6 dargestellt ist. Ein Peptidmicroarray wird mittels eines Greifers und einer Lineareinheit mit definierter Kraft auf einen in einer Wanne fixierten Zielträger gepresst.

Die Linearbewegung wurde über eine pneumatische Achse realisiert. Da ausschließlich Endpositionen angefahren werden, eignet sich diese Lösung. Im Gegensatz zu einer elektrisch aktuierten Achse kann eine pneumatische Achse ohne erheblichen Aufwand kraftgesteuert positioniert werden. Elektrische Antriebe lassen sich über den Motorstrom kraftgesteuert verfahren, dies ist aber mit großem Aufwand und Kosten bei der Umsetzung der Steuerung verbunden. Die Auswahl der Materialien für die Konstruktion ist für den Übertrag wichtig. Vorversuche zur Materialauswahl haben ergeben, dass Aluminium in der wässrigen Lösung der verwendeten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) korrodiert. Daher wurden bei der Umsetzung vor allem chemisch resistente Materialien verbaut, nämlich PTFE und Stahl (X5CrNiMo17-12-2) für belastete Teile. Die Auswahl der Komponenten und Materialien im Detail ist in Weisbrodt [56] geschildert.

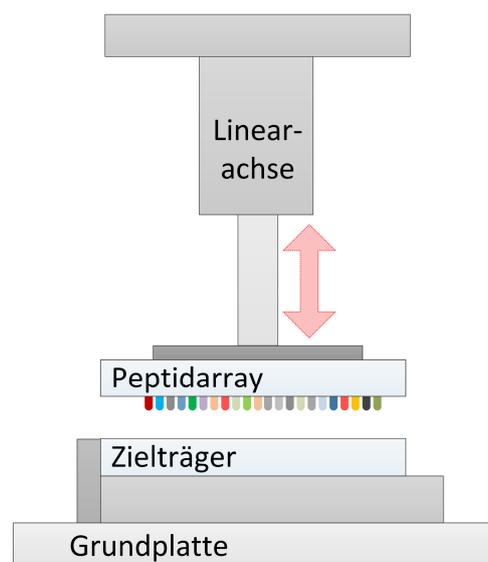


Abbildung 5.6 Skizze der entwickelten Anlage

5.4.4 Positionierung der Oberflächen beim kraftgesteuerten Übertrag

Szenarien, die eine Positionierung erfordern

Ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung des Prozesses ist die Positionierung des Peptidmicroarrays und der Zieloberfläche. Dabei sind verschiedene Szenarien möglich, die unterschiedliche Konzepte für die Positionierung erfordern. Diese sind im Folgenden kurz dargestellt.

1. Übertrag eines ganzen Peptidmicroarrays: In diesem Fall muss der Peptidmicroarray relativ zum Zielträger positioniert werden. Die Genauigkeitsanforderungen an den Offset und die Verdrehung der beiden Träger sind gering.
2. Übertrag zweier Peptidmicroarrays auf denselben Zielträger für Experimente zu Biokatalysatoren auf Peptidbasis: Hierbei wird der Peptidmicroarray nach dem Übertrag mehrmals gewechselt, um verschiedene Peptide in denselben Spot zu übertragen. Die Genauigkeitsanforderungen sind abhängig von der Spotgröße und werden als $0,2 \times \text{Spotgröße}$ definiert. Im Fall der genutzten Arrays entspricht das 40 - 80 μm .
3. Übertrag eines Peptidmicroarrays auf einen Screening Chip für zykovoltametrische Messungen: Da die Pixel des Goldchips $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ betragen, liegt die Genauigkeit für das Ausrichten der beiden Oberflächen zueinander bei 20 μm (mit $0,2 \times \text{Spotgröße}$). Zudem ist die Oberfläche nicht durchsichtig, was das Ausrichten über eine Kamera verhindert.

Konzepte der Positionierung

Die Konzepte für die Positionierung sind im Folgenden beschrieben.

- Mechanische Anschläge eignen sich für die manuelle Positionierung, falls die Geometrie der auszurichtenden Oberflächen identisch ist. Dies ermöglicht eine einfache Positionierung ohne Markierungen.
- Kamerasysteme mit geeigneter Auflösung können genutzt werden, um Markierungen auf dem Ausgangs- und Zielträger zu erkennen. Über die inverse Kinematik können dann die entsprechenden Koordinaten eines Positioniersystems berechnet werden, sodass die beiden Oberflächen zueinander ausgerichtet werden.
- Mittels eines Prismas können Markierungen auf den beiden Oberflächen gleichzeitig betrachtet werden. Eine Oberfläche wird dann entsprechend bewegt, bis sich die Markierungen überlappen und die Oberflächen ausgerichtet sind.
- Neben den oben genannten Konzepten sind auch kapazitive oder induktive Sensoren denkbar. Für eine Positionsmessung müssten die Sensoren auf dem Peptidarray und der Zielfläche aufgebracht werden. Dies ist sehr aufwendig und die Materialien der Sensoren sind nicht mit den harschen Synthesebedingungen kompatibel.

Die Positioniergenauigkeit wird von verschiedenen Komponenten des Aufbaus beeinflusst. Sowohl die Wiederholgenauigkeit der Lineartische und die des Pneumatikzylinders als auch die Montagegenauigkeit des Trägers in der Halterung haben einen Einfluss. Des Weiteren ist die Handhabung der Objektträger nur

mit einem Vakuumschisch praktikabel. Beim Einschalten des Vakuums kann es jedoch zu Verschiebungen im Mikrometerbereich kommen. Zudem haben Erschütterungen während des Prozesses einen Einfluss auf die Positionierung. Die entsprechenden Methoden zur Untersuchung des jeweiligen Anteils dieser Komponenten an der Gesamtpositioniergenauigkeit werden im Abschnitt 5.5.3 genauer beschrieben.

Die Positionierung über mechanische Anschläge ist gut geeignet, falls der Ausgangs- und Zielträger die gleiche Geometrie haben. Die Präzision dieser Methode ist in Kapitel 5.7.2 diskutiert. Ein gängiges Verfahren bei der Positionierung zweier Substrate ist der Vergleich von sich überlappenden Markierungen im Durchlichtverfahren mittels einer Kamera. Dies ist im vorliegenden Fall nicht möglich, da aufgrund der großen Kräfte die Träger mit der ganzen Fläche in die Vakuumhalterungen eingespannt werden und ein optischer Zugang von oben oder unten aufgrund des Bauraums nicht möglich ist. Daher wurde die Positionierung mit mehreren Kameras ausgearbeitet (siehe Abbildung 5.7). Bei diesem Konzept wird der untere Träger in das Sichtfeld einer fest angebrachten Kamera gefahren, die Position der Markierungen wird aufgenommen. Dann wird eine relativ zum unteren Substrat montierte zweite Kamera zum oberen Träger verfahren und nimmt die Markierungen auf. Über den Verfahrensweg und die Position der Markierungen lässt sich die Sollposition des unteren Trägers berechnen. Dieses Konzept ist voll automatisiert möglich (Erkennung der Markierung und Berechnung der Position mit Steuerung der Achsen). Nachteilig sind jedoch Erschütterungen, die während des Prozesses zu einer Verschiebung der Kamera und somit zu einer falschen Erkennung der Position führen. Des Weiteren ist die Berechnung der Koordinaten aufgrund der kinematischen Verhältnisse aufwendig, da der Drehpunkt experimentell ermittelt werden muss.

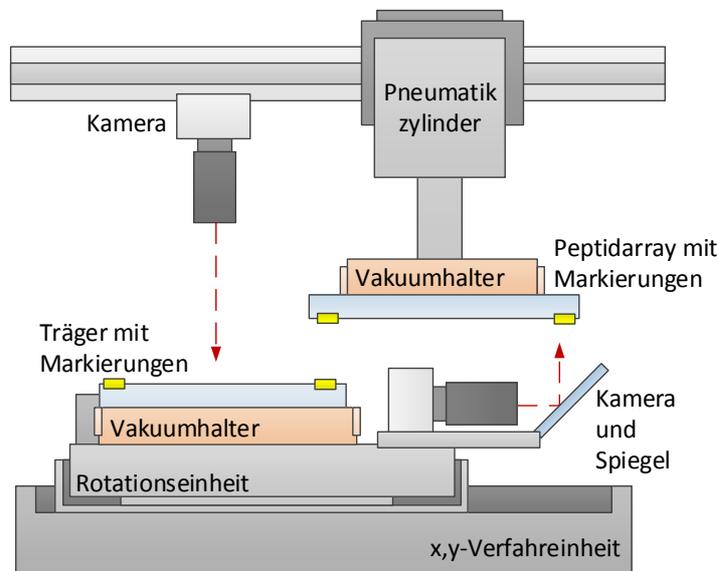


Abbildung 5.7 Konzept der Positionierung mittels zweier Kameras. Mit der stationären Kamera und einer mit dem unteren Substrat mitbewegten Kamera werden die Markierungen des Zielträgers und des Peptidarrays aufgenommen. Aus den Positionsdaten lassen sich die notwendigen Koordinaten des Zielträgers berechnen und dieser wird dann mit der Verfahrenseinheit entsprechend positioniert.

Aufgrund der oben beschriebenen Bauraumbegrenzung durch die Vakuumhalter ist eine weitere Möglichkeit denkbar. Eine Optik, bestehend aus einer Kamera und einem Prisma, wird seitlich zwischen die Träger verfahren. Mit der Kamera lassen sich über das Prisma Markierungen auf dem oberen und unteren Träger gleichzeitig betrachten. Der untere Träger wird dann so lange verfahren, bis die Marken den gleichen Abstand zur Prismenkante aufweisen. Zudem kann durch geeignete Wahl der Optik die gesamte Breite des Trägers eingesehen werden, sodass jeweils zwei Markierungen verglichen werden können. Ein aufwendiges Verfahren der Substrate in das Sichtfeld der beiden Kameras entfällt. Dies macht die Methode robuster und zuverlässiger.

5.4.5 Gestaltmodellierung der Anlage für den positionsgesteuerten Übertrag

Im Gegensatz zu dem bereits geschilderten kraftgesteuerten Übertrag, bei dem die Oberflächen über mehrere elastische Komponenten und einer Anpresskraft planparallel ausgerichtet werden, werden die Oberflächen beim positionsgesteuerten Übertrag in einem Abstand planparallel gegeneinander positioniert. Der Übertrag findet dann in dem sich ergebenden Spalt (mit einer geringen Höhe von mehreren Mikrometern) statt, der mit Flüssigkeit gefüllt wird. Die Ebenheit der Substratoberflächen ist von entscheidender Bedeutung. Variiert beispielsweise die Rauigkeit und Welligkeit der Oberfläche im Größenbereich des Abstandes der Oberflächen, ist ein homogener Übertrag nicht möglich. Für Glas liegt R_a bei 2,1 nm [57]. Ein weiterer Parameter für die Qualität des Übertrags ist das Vermeiden von Verkipnungen der Oberflächen bei der Entformung. Dies führt zu einem „Verschmieren“ der Spots aufgrund von Scherkräften, die auf die Peptide wirken und zu einer Verbreiterung der Spots führen. Über die Wahl einer geeigneten Kinematik kann zum einen dieser Effekt verhindert werden, zum anderen kann ein Ausgleich der Planparallelität erfolgen. Entsprechend der in Kapitel 5.3.1 dargestellten Konzepte bieten sich für den positionsgesteuerten Übertrag die Verwendung eines Kugelgelenks oder eines Goniometers an. Ein elastisches Element ist in diesem Fall nicht geeignet, da der Übertrag ohne Anpresskraft erfolgt. Die vertikale Positionierung kann entweder über einen Abstandshalter zwischen den beiden Oberflächen realisiert werden oder über eine Messung des Abstandes durch Sensoren und eine entsprechende Berechnung der Planparallelität.

In einem ersten Prototyp wurde die laterale Positionierung über drei Positionierstifte realisiert, die vertikale Positionierung erfolgte über Abstandshalter (Polymidfolie). Über eine Linearachse wurde dann der Peptidmicroarray verfahren. Mit diesem Aufbau war ein Übertrag möglich, jedoch war die Handhabung schwierig und die laterale Positionierung nicht präzise.

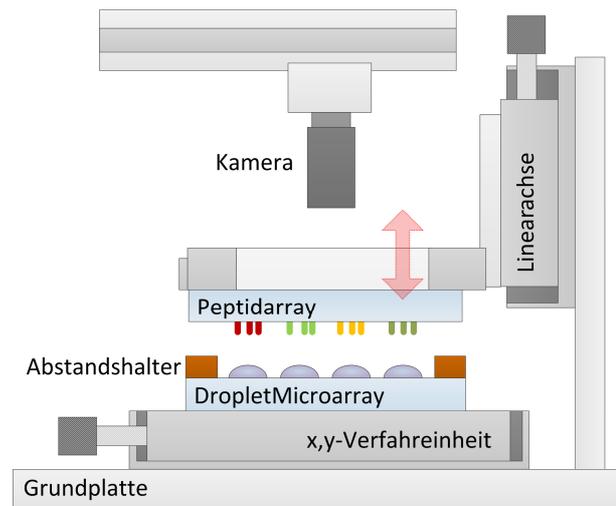


Abbildung 5.8 Skizze des Funktionsprinzips des positionsgesteuerten Übertrags.

Daher wurde ein zweiter Prototyp entworfen, der in Abbildung 5.8 schematisch gezeigt ist. Der Peptidmicroarray ist in einer Vakuumhalterung eingespannt, die mittig eine Aussparung besitzt. Dieser Aufbau ermöglicht im Gegensatz zum kraftgesteuerten Übertrag eine einfachere Positionierung. Durch die mittige Aussparung des Vakuumhalters kann mithilfe eines Kamerasystems und entsprechender Bildverarbeitung eine laterale Positionierung durch die x,y-Verfahreinheit vorgenommen werden. Dabei werden im Durchlicht Markierungen auf den beiden Oberflächen zum Überlappen gebracht. Die vertikale Positionierung erfolgt über eine manuelle Linearachse. Über Abstandshalter lässt sich der Abstand der Oberflächen zueinander einstellen.

5.5 Gestaltmodellierung

In diesem Abschnitt werden die Prototypen näher diskutiert. In Kapitel 5.5.1 und 5.5.2 werden die Prototypen zum kraftgesteuerten Übertrag beschrieben, in Kapitel 5.5.3 die Anlage zum positionsgesteuerten Übertrag.

5.5.1 Maschine 1: Einsatz im Labormaßstab

Die durch die Vorversuche gesammelten Erfahrungen wurden in dem in Abbildung 5.9 gezeigten Aufbau umgesetzt. Die Oberfläche des Peptidmicroarrays und die Zieloberfläche werden mit einer definierten Kraft durch den Leichtlaufpneumatik-Zylinder MQQT B25-35D (SMC Pneumatik GmbH, Egelsbach) in Kontakt gebracht. Die Steuerung der Anpresskraft und die Entformungsgeschwindigkeit lassen sich mithilfe eines Manometers K8-10-50 und eines 3/2-Wege-Handabsperrentils manuell einstellen.

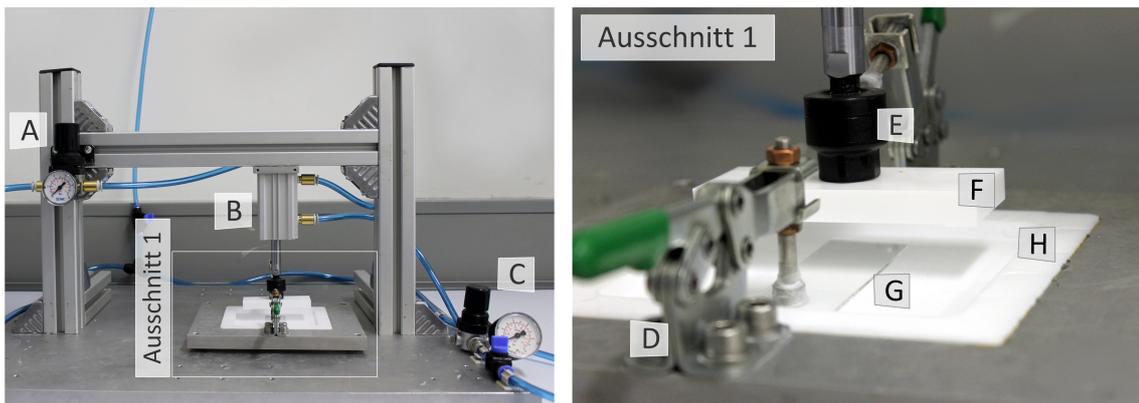


Abbildung 5.9 Peptidarrayabformanlage Maschine 1 Mittels Manometer (A) und 3/2-Wege-Handventil (C) lässt sich der Druck für den Pneumatik-Zylinder (B), der den Peptidmicroarray (F) und die Zieloberfläche (G) über ein Kugelgelenk (E) zusammenpresst und entformt, regeln. Die Waagrechtspanner (D) halten die Zieloberfläche beim Entformen. Der Übertrag findet in PBS-Puffer in einer Wanne (H) statt.

Der Verzicht auf elektronische Bauteile ermöglicht einen flexiblen Einsatz der Maschine im Laboralltag, da das manuelle System bedienerfreundlich ist, ohne PC, elektrische Ansteuerung und Software zuverlässig arbeitet und leicht zu reparieren ist. Da durch Verwendung eines flexiblen Mediums aus Polymer keine ausreichende Planparallelität erreicht werden konnte, wurde das Konzept „Kugelgelenk und feste Einspannung“ (siehe Abbildung 5.3 b) umgesetzt. Der Zielträger kann über zwei Waagrechtspanner in einer Wanne aus PTFE festgeklemmt werden. Dies ermöglicht ein schnelles Entnehmen des Trägers für den Waschprozess nach dem Übertrag.

Die Anlage ermöglicht Überträge von Peptidarrays, die den Anforderungen entsprechen. Zudem ist sie robust gegenüber Störungen und im Laboralltag gut bedienbar. Die Nachteile sind eine mangelnde Positionierbarkeit der Oberflächen aufgrund der Beweglichkeit der Peptidmicroarrayoberfläche, bedingt durch das Kugelgelenk. Zudem sind Überträge eines ganzen Objektträgers wegen der Einspannung des Zielträgers nicht möglich.

5.5.2 Maschine 2: laterale Positionierung

Entwicklung eines Sauggreifers für die Handhabung der Oberflächen

Die bisherigen Konzepte zum Ausgleich von Unebenheiten ermöglichen aufgrund der Freiheitsgrade keine zuverlässige laterale Positionierung der beiden Träger zueinander. Wie in Abbildung 5.3d gezeigt besteht eine weitere Möglichkeit in der Lagerung beider Träger mittels eines Feder-Dämpfer-Systems. Dieses Konzept, in Kombination mit einer Kalibrierung der Planparallelität über zwei Kalibrierträger, führt zu einer ausreichenden Planparallelität der Oberflächen beim Anpressen. Das Feder-Dämpfer-System wird mit der Handhabungseinheit der Objektträger zu einem kompakten Modul kombiniert. Ausgehend von einer Recherche des Standes der Technik wurde in der Arbeit ein Sauggreifer entwickelt.

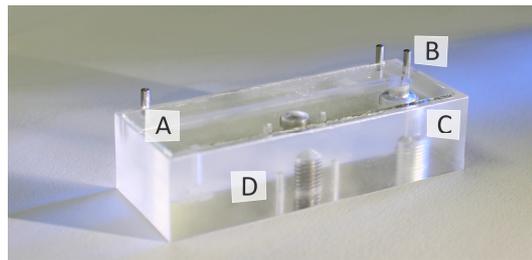


Abbildung 5.10 Eigenentwicklung des Sauggreifers. Der Glasobjektträger (A) liegt auf einer PDMS-Dichtung auf und kann über drei Positionsstifte (B) mechanisch vorpositioniert werden. Das Vakuum wird über eine Bohrung (C) angelegt. Über Passstifte und eine Bohrung (D) wird der Halter an der Maschine fixiert.

Dieser besteht aus einem Grundkörper, wahlweise aus Polymethylmetacrylat (PMMA) oder aus PTFE (bei Anforderungen an chemische Resistenz), mit gefrästen Nuten und einem Anschluss für die Vakuumpumpe (siehe Abbildung 5.10). Über Positionierstifte kann der Träger mechanisch vorpositioniert werden. Die Dichtung, auf der der Träger liegt, ist aus PDMS gegossen und ermöglicht es durch ihre optimierte Geometrie, den Sauggreifer in Puffer einzusetzen, ohne Verlust der Saugkraft oder das Absaugen des Puffers.

Aufgrund der optimierten Dicke und den elastischen Materialeigenschaften der PDMS-Dichtung konnte eine Planparallelität über die Anpresskraft erreicht werden.

Positioniermodul für das Ausrichten der Oberflächen

Aufgrund der in Kapitel 5.4.4 dargestellten Möglichkeiten wurde in der Arbeit eine Optik entwickelt, die seitlich zwischen die Träger verfahren wird und über die beide Träger gleichzeitig betrachtet und ausgerichtet werden können.

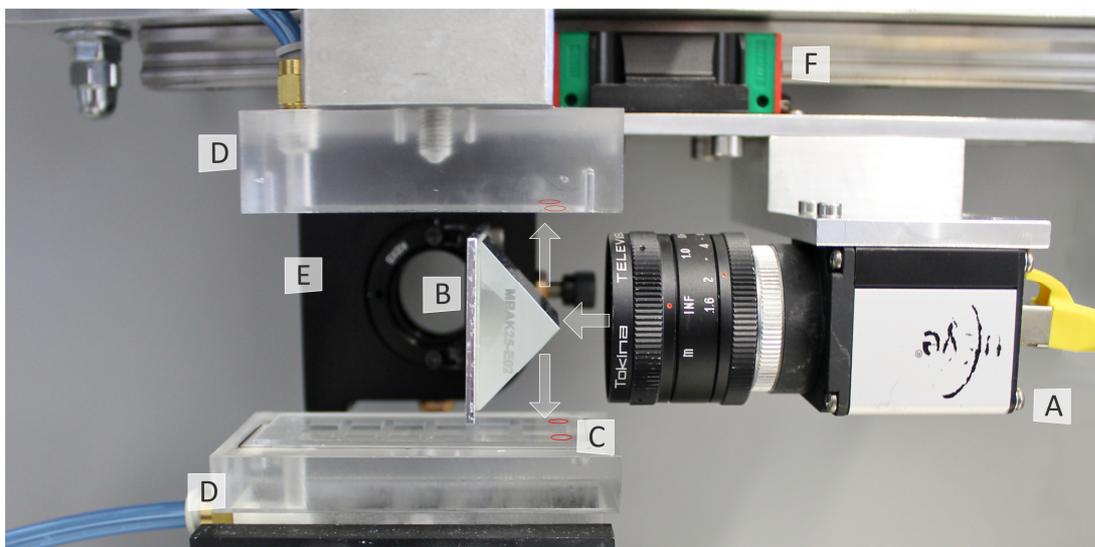


Abbildung 5.11 Positionierung mit einem Knife-Edge-Prisma der Maschine 2. Mit der Kamera (A) lassen sich über das Prisma (B) Markierungen (C) auf den beiden Oberflächen aufnehmen, die im Vakuumhalter montiert sind. Das Prisma ist über einen Prismenstisch (E) justierbar. Das Positioniermodul wird zum Positionieren manuell zwischen die beiden eingespannten Träger über einer Linearführung (F) bewegt.

Das Knife-Edge-Right-Angle-Prisma MRAK25-E02 (Thorlabs GmbH, Dachau) wird auf dem Prismentisch K6XS (Thorlabs GmbH, Dachau) montiert, der in 6 Achsen justierbar ist. Wie in Abbildung 5.11 gezeigt lassen sich mit der 10 MP-Kamera UI-5490-SE (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm) über das Prisma Markierungen auf dem oberen und unteren Träger gleichzeitig betrachten. Der untere Träger wird dann so lange verfahren, bis die Marken den gleichen Abstand zur Prismenkante aufweisen. Zudem ist die ganze Breite des Trägers sichtbar, sodass jeweils zwei Markierungen verglichen werden können. Ein aufwendiges Verfahren der Substrate in das Sichtfeld der beiden Kameras entfällt. Dies macht die Methode robuster und zuverlässiger.

Integration der Module zu einer Anlage

Nach der eingehenden Untersuchung der Wirkmechanismen der grundlegenden Komponenten des Übertrags werden diese nun zu einem Gesamtsystem zusammengesetzt. Die Maschine besteht aus der 4-dimensionalen Verfahreinheit, einem integrierten Mikroskop, den Vakuumgreifern und der pneumatischen Achse. Diese Komponenten werden im Folgenden genauer beschrieben.

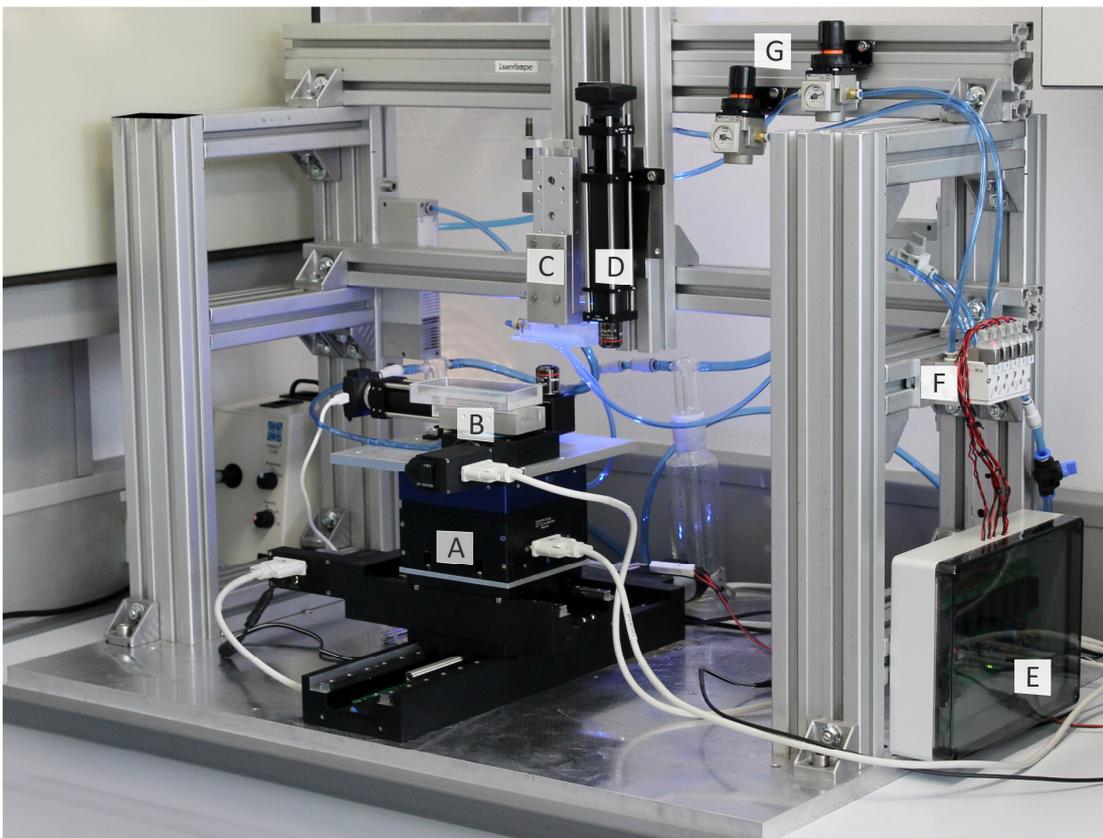


Abbildung 5.12 Maschine 2 zur Positionierung und Abformung von Peptidarrays. Mit der 4-Achs-Verfahreinheit (A) wird der Zielträger, eingespannt in den Vakuumhalter mit Wanne (B), gegenüber dem Peptidarray ausgerichtet, der auf der pneumatischen Lineareinheit (C) montiert ist. Mit dem eingebauten Mikroskop (D) können die Proben begutachtet werden. Die Automatisierung erfolgt mit LabVIEW über eine Motor- und Relaiskarte (E), die einen Ventilblock (F) ansteuert.

Die 4-dimensionale Verfahreinheit (vergleiche Punkt A in Abbildung 5.12) besteht aus den zwei Lineartischen M-414, dem Hubtisch M-501 und dem Rotationstisch M-060 (Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG., Karlsruhe). Die pneumatische Linearachse MXQ-12 (SMC Pneumatik GmbH, Egelsbach) besteht aus einem Zylinder mit integrierter Linear-Kugelumlauführung und Schlitten und ermöglicht aufgrund der hohen Führungsgenauigkeit eine präzise Handhabung des eingespannten Peptidmicroarrays.

Für die direkte Inspektion der Versuchsergebnisse wurde ein selbst entwickeltes Mikroskop in die Anlage integriert. Dieses besteht aus der 2-MP-Kamera UI-1250LE-C-HQ (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm), einem Strahlteiler, mit dem das Licht einer Weißlicht-LED in den Strahlengang eingekoppelt wird, einer asphärischen Linse und dem Olympus-„Plan Fluorite“-Mikroskop-Objektiv. Die Kalibrierung des Systems ergibt ein Verhältnis von Pixel zu Mikrometer von 1,04 mit einem Blickfeld von ca. $1,6 \times 1,2$ mm. Somit lassen sich alle fertigungsrelevanten Strukturen untersuchen.

Für die Prozessdurchführung wurde eine LabVIEW-Ansteuerung geschrieben. Diese steuert über eine Relaiskarte die pneumatischen Achsen und die beiden Vakuumgreifer und beinhaltet zudem die beiden Videobilder des Positioniermoduls und des Mikroskops. Die Motoransteuerung wurde ebenfalls über LabVIEW mit entsprechenden PCI-Treiberkarten realisiert. Damit ist eine vollständige Automatisierung des Prozesses möglich.

Prozessbeschreibung der Positionierung

Positionierung durch Positionsstifte: In einigen Fällen besitzen die Oberflächen für den Übertrag die gleiche Geometrie. Dann ist eine Positionierung der Kanten der Träger über drei Positionsstifte möglich. Bei der Aufreinigung eines Peptidmicroarrays ist die Zieloberfläche beispielsweise ein funktionalisierter Glasobjektträger gleicher Geometrie. Wichtig bei dieser Art der Positionierung ist die Kenntnis der Position der Spots des Peptidarrays relativ zu den Kanten des Glasobjektträgers. Mit diesem Wissen kann dann ein präziser Übertrag erfolgen. Dabei erfolgt die Positionierung über drei Teilschritte. Der Array wird mit der funktionalisierten Oberfläche auf einen Rahmen gelegt, damit die abgespaltenen Peptide nicht direkt auf der PDMS-Dichtung des Vakuumhalters liegen. Der Rahmen liegt auf dem unteren Vakuumhalter auf und der Array lässt sich über die Stifte lateral positionieren. Dann wird er mit dem 4-Achs-System zum oberen Vakuumhalter gefahren und darin eingespannt. Danach wird der Rahmen entnommen und der Zielträger über die Anschläge positioniert. Der Träger wird zur Abformposition verfahren und die Oberflächen werden aufeinandergepresst, sodass ein Übertrag des Peptidmicroarrays stattfindet. Mit diesem Vorgehen lassen sich nacheinander sowohl die Zieloberfläche als auch der Glasträger mit dem Peptidarray mit den gleichen Positionsstiften ausrichten. Das erhöht die Positioniergenauigkeit des Prozesses. Die entscheidenden Einflussgrößen sind dann das manuelle Einlegen und Positionieren der Träger und die Wiederholgenauigkeit der Linearachsen.

Positionierung mit dem Prismen-Ansatz: Besitzen die Komponenten eine unterschiedliche Geometrie, beispielsweise beim Übertrag eines Peptidmicroarrays auf einen CMOS-Screening-Chip, dann erweist sich die Positionierung über die Kanten der Oberflächen als schwierig. Daher wird für diesen Fall das auf einem Knife-Edge-Prisma basierende Modul genutzt. Das Prisma wird zwischen die beiden eingespannten Träger gefahren, sodass Markierungen, die auf den beiden Oberflächen aufgebracht sind, mit der Kamera detektiert werden können. Die Zieloberfläche wird dann so lange verfahren, bis die Markierungen bezüglich der Prismenkante gleich ausgerichtet sind. Dann wird das Prisma aus dem Aufbau gefahren und der Transfer findet statt.

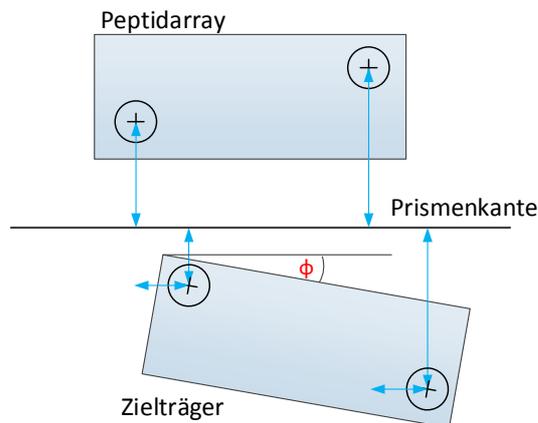


Abbildung 5.13 Positionierung zweier Oberflächen mit dem Prismen-Ansatz. Über das Knife-Edge-Prisma lassen sich mit der Kamera beide Oberflächen gleichzeitig betrachten. Für die Positionierung wird der Zielträger verfahren, bis der vertikale und horizontale Abstand der Markierungen und der Winkel zur Prismenkante mit denen des Peptidarrays übereinstimmen.

Da das Kamerabild über das Prisma abgelenkt wird, ist die Entfernung der Markierung zum Prisma entscheidend. Die Größe der Markierung verändert sich mit dem Abstand zum Prisma. Daher wurde über eine Kalibrierung der Abstand des Peptidmicroarrays und der Zieloberfläche zum Prisma justiert.

5.5.3 Maschine 3: positionsgesteuerter Übertrag

In Abbildung 5.14 ist die Maschine für den positionsgesteuerten Übertrag dargestellt. Diese wurde in Zusammenarbeit mit Levkin entwickelt. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Maschine 2 wird diese Anlage manuell betrieben. Eine vollautomatisierte Version ist zurzeit nicht zweckmäßig, da die in dieser Anlage verwendeten DropletMicroarrays aus Tropfen mit 1 mm Durchmesser geringe Anforderungen hinsichtlich der Positioniergenauigkeit stellen.

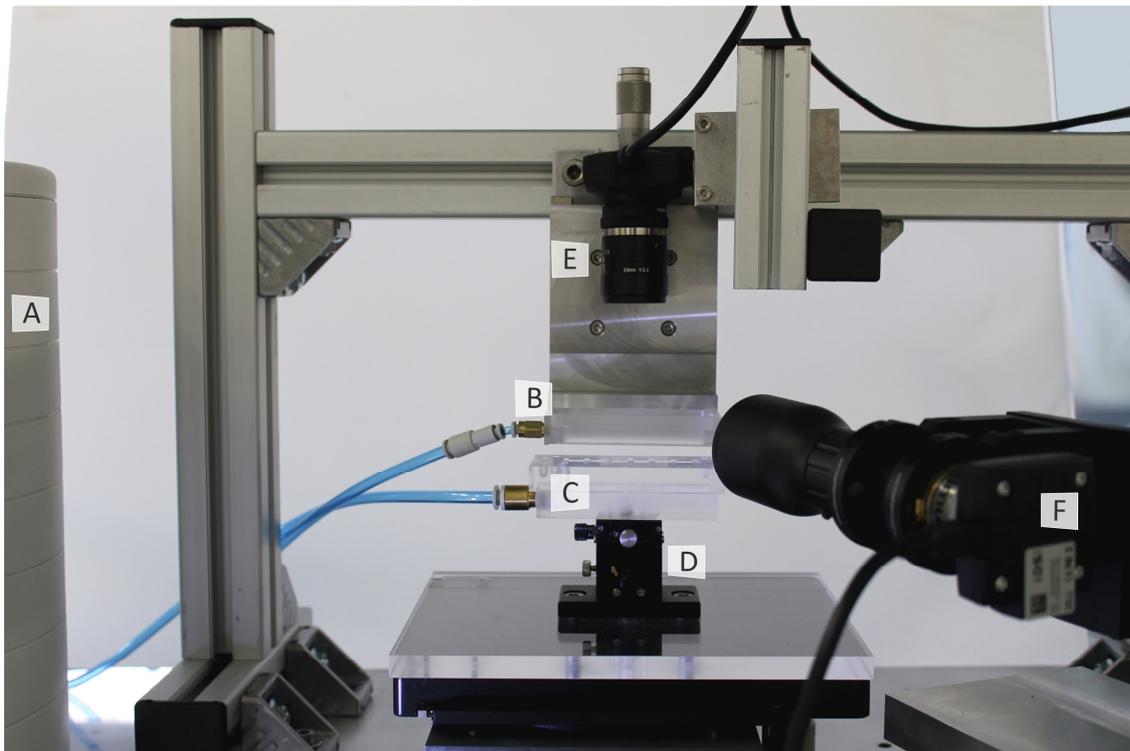


Abbildung 5.14 Maschine 3 für den positionsgesteuerten Übertrag. Der Luftbefeuchter (A) sorgt für eine geeignete Transferumgebung. Der Array wird in den Vakuumhalter (B) eingespannt, der Zielträger wird in den unteren Halter (C) eingespannt und mit Goniometer (D) planparallel ausgerichtet. Die Positionierung für den Übertrag erfolgt über einen Lineartisch (E) und wird mit einer Kamera (F) überwacht.

Der Übertrag findet in einer feuchten Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchte von 90 % statt. Diese wird durch einen Luftbefeuchter (vergleiche Punkt A in Abbildung 5.14) erzeugt. Dieser steht zusammen mit der Anlage in einer dichten Box aus PMMA. Der zu übertragende Peptidmicroarray wird in den oberen Vakuumhalter (B) eingespannt. Dieser lässt sich vertikal über einen Lineartisch verstellen. Die Zieloberfläche wird in den unteren Vakuumhalterung (C) eingespannt und lässt sich mithilfe eines manuellen x,y-Lineartischs und des verbauten Theta-Phi-Goniometers TP 65-W30-W40 (Owis GmbH, Staufen) gegenüber dem Peptidmicroarray ausrichten. Vor dem Übertrag werden die Oberflächen planparallel ausgerichtet, damit ein Übertrag in alle Tropfen ermöglicht wird. Dies wird durch das Goniometer ermöglicht, das manuell eingestellt wird.

Mit einem Kamerasystem, bestehend aus der Kamera UI-1250LE-C-HQ (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm) und einem Objektiv, werden die beiden Oberflächen so zueinander positioniert, dass sich die Arrays überlappen. Für die laterale Positionierung ist eine mittige Aussparung in den Vakuumhalter eingebracht, sodass die Markierungen auf dem Peptidmicroarray und der Zieloberfläche durch den Peptidmicroarray hindurch erkennbar sind. Über eine zweite Kamera mit einem telezentrischen Objektiv lässt sich der Abstand der Oberflächen zueinander präzise einstellen.

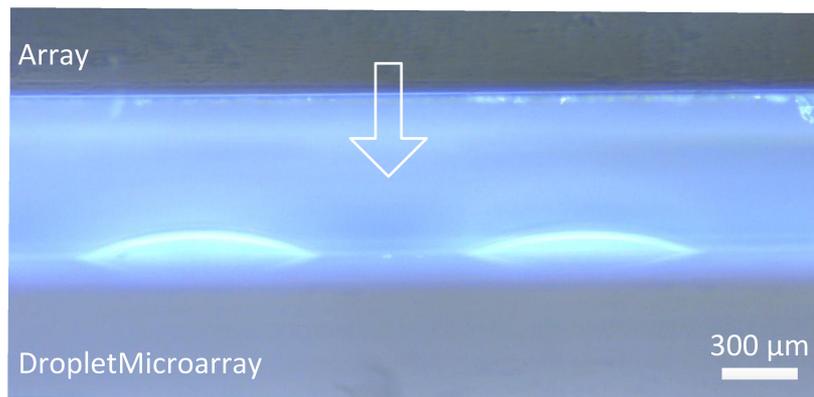


Abbildung 5.15 Frontansicht für die vertikale Positionierung des Peptidarrays und des DropletMicroarrays. Der Peptidarray wird so positioniert, dass die Oberfläche die Tropfen berührt und der Übertrag durch Diffusion stattfindet.

Der Übertrag erfolgt über eine vertikale Positionierung der beiden Oberflächen (Abbildung 5.15), bis sich Tropfen und Oberfläche des Peptidmicroarrays berühren und eine Diffusion der Peptide in die Flüssigkeit stattfinden kann. Der Abstand ist dabei von der Höhe der Tropfen abhängig: Ist er zu groß, berühren die Tropfen die Molekülarrayoberfläche nicht; ist er zu klein, werden die Tropfen gepresst und es kann zur Kontamination zwischen den Tropfen kommen.

5.6 Methoden

Die für die Charakterisierung wichtigen Parameter der Prozesse sind in diesem Kapitel genauer beschrieben.

5.6.1 Druckmessfolie

Für die Bestimmung des Anpressdrucks der beiden Oberflächen wird die Prescale-Druckmessfolie LLLW (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf) verwendet. Diese besteht aus einem Färbematerial und einem Farbwentwickler, die abhängig von der Belastung zu einem unterschiedlich starken Einfärben der Folie führen. Über eine Referenzmessung kann die Größe der Belastung abgeschätzt werden. Die laterale Auflösung der Folie beträgt 0,1 mm, die herstellungsbedingten Schwankungen der Schichtdicke liegen bei $\pm 5 \mu\text{m}$. Die Ergebnisse der Messung wurden dann in einem Scanner digitalisiert.

5.6.2 Laterale Positioniergenauigkeit der kraftgesteuerten Anlage

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die Experimente zur Bestimmung der lateralen Positioniergenauigkeit für Maschine 2 (siehe Abbildung 5.12) validiert wurden.

Eine intuitive Methode bestand in der Verwendung von Micro-Contact-Printing. Dabei wurde ausgehend von einem mikrostrukturierten Nickelformeinsatz ein Stempel aus PDMS gegossen. Dieser wurde in die obere Halterung der Peptidarrayabformanlage eingespannt und mit farbiger Tinte benetzt. Dann wurde entsprechend dem nachzubildenden Prozess ein Muster auf den Zielträger abgestempelt. Durch die Verwendung unterschiedlich gefärbter Tinten konnte so die Positioniergenauigkeit für einen zweimaligen Übertrag auf denselben Zielträger ermittelt werden. Vorteile bei dieser Methode bestehen in der realistischen Nachbildung des zu untersuchenden Prozesses. Nachteilig ist die geringe Reproduzierbarkeit, da sich der flexible PDMS-Stempel unter Belastung verformen kann und zu unterschiedlichen Ergebnissen bei gleichem Versuchsaufbau führt.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Positioniergenauigkeit ist die Verwendung des eingebauten Mikroskops, mit der man Markierungen auf dem Substrat aufnimmt. Über eine Verschiebung des Musters lässt sich dann die Messabweichung der Positionierung bestimmen. Bei den Markierungen handelt es sich um direkt im Glas eingebrachte Muster, die sich durch eine exakte Geometrie und die Chemikalienresistenz auszeichnen. Die Markierungen werden entweder über einen Laserablationsprozess oder über einen Trockenätzschritt hergestellt und umfassen mehrere Muster in unterschiedlicher Größe.

5.6.3 Genauigkeit der positionsgesteuerten Anlage

Für die Bestimmung der vertikalen Position bei der Maschine 3 (siehe Abbildung 5.14) muss die Höhe der Tropfen gemessen werden, um den Spalt genau einzustellen. Diese Messung des Abstandes der beiden Oberflächen erfolgt mit einer Kamera und einem 0,28-fach hochauflösenden telezentrischen Objektiv. Die Messung erfolgt nach einer Kalibrierung der Kamera durch ein fotolithografisches Kalibrierset, dabei entspricht 1 Pixel des Bildes $2,6 \mu\text{m}$. Die Auswertung der Kamerabilder geschieht über einen Kantendetektionsalgorithmus und eine Bestimmung der Höhe im Bildverarbeitungsprogramm ImageJ [58].

Für die Validierung des Konzeptes des positionsgesteuerten Transfers wurde anstatt eines Peptidmicroarrays ein Referenzsystem verwendet, mit dem die Machbarkeitsstudie durchgeführt werden konnte. Dieses bestand aus einem Array mit dem Farbstoff Rhodamin, der mit dem sciFLEXARRAYER-Ultra-Low-Volume-Dispenser (Scienon AG, Dortmund) auf ein Substrat gespottet wurde.

Als Oberflächen für das Substrat wurden dabei zwei unterschiedliche Materialien verwendet: Glas und ein DropletMicroarray. Von diesen beiden Oberflächen wurde dann der Rhodamin-Farbstoff in die Tropfen (aus destilliertem Wasser) eines Ziel-DropletMicroarray übertragen.

5.7 Ergebnisse

5.7.1 Homogenität der Anpresskraft

Für die Messung der Druckverteilung der Oberfläche wurde die Homogenität mittels Fujifilm-PreScale-Druckmessfolie abgeschätzt. Dabei wurden Maschine 1 (vergleiche Kapitel 5.5.1) und Maschine 2 (Kapitel 5.5.2) validiert. Neben der Methode zum planparallelen Ausrichten der Oberflächen ist der Kraftfluss von entscheidender Bedeutung. Daher wurden zwei Vakuumhalter miteinander verglichen, bei denen die Auflagefläche des Glasobjektträgers im Vakuumsauger variiert. Der Vorteil bei einer kleinen Auflagefläche besteht in der Sichtbarkeit der für die Positionierung benötigten Markierungen auf dem Glasobjektträger von oben im Durchlicht.

Bei Maschine 1 wird die Planparallelität durch das Kugelgelenk passiv eingestellt. Daher erwartet man eine gleichmäßige Verteilung der Anpresskraft (220 N). Diese Verteilung ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Dabei wurde der Anpressversuch dreifach wiederholt. Bei Abbildung 5.17a - c wurde ein 50 mm langer Halter verwendet (die Fläche des Halters ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet), in Abbildung 5.17d - e wurde der Glasobjektträger komplett eingespannt.

Bei dem Versuch mit der kleineren Auflagefläche ist die Homogenität über die ganze Fläche des Glasobjektträgers nicht gegeben. Der Anpressdruck ist nur im Bereich der eingespannten Fläche sichtbar. Dies ist dadurch bedingt, dass sich das Glas beim Anpressen verformt und die nicht eingespannten Teile der Oberfläche nicht in Kontakt kommen. Daher betrug der Anpressdruck für die Fläche von 50 mm × 26 mm einen Wert von $0,17 \text{ N/mm}^2$. Damit lässt sich auch das höhere Farbsignal erklären.

Abbildung 5.17d - e zeigt, dass die Oberfläche im Gegensatz zum kleineren Vakuumhalter homogen angepresst wird. Da die Kanten der Oberflächen in Abbildung 5.17f nicht parallel ausgerichtet werden konnten, ist die Form der Farbmarkierung nicht rechteckig. Für die Fläche eines Glasobjektträgers beträgt der Anpressdruck $0,11 \text{ N/mm}^2$.

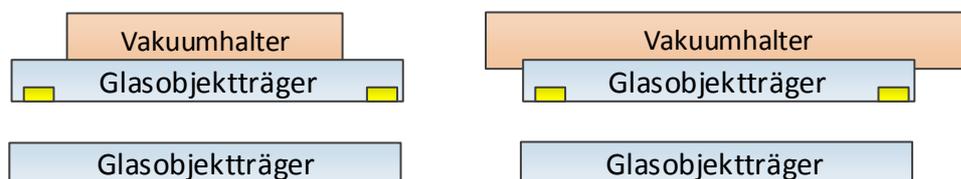


Abbildung 5.16 Vergleich der Auflagefläche der Halterung des Objektträgers.

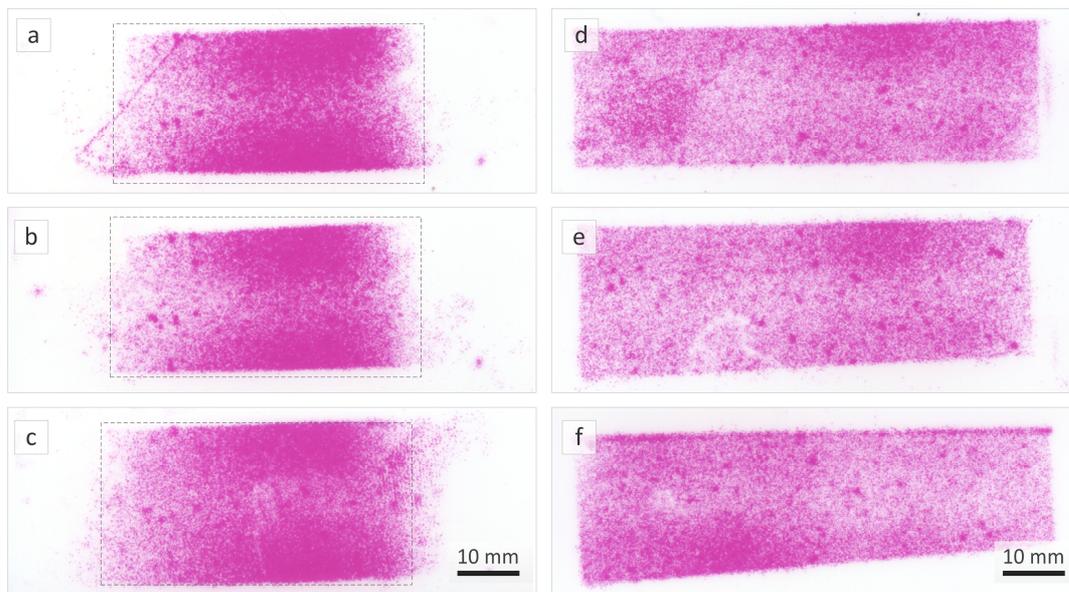


Abbildung 5.17 Verteilung des Anpressdrucks bei Maschine 1. a) - c) zeigen die Druckverteilung bei dem Vakuumhalter mit einer Fläche von 50 mm × 26 mm. Ein vollflächiger Kontakt der Glasträger konnte nicht erreicht werden. In d) - f) wurde ein Vakuumhalter mit einer Fläche von 80 mm × 26 mm verwendet. Beide Träger kommen mit ihrer gesamten Fläche in Kontakt.

Bei Maschine 2 wird die Planparallelität durch das elastische Polymer der Vakuumhalterungen passiv eingestellt. Dies ermöglicht eine Positionierung der Oberflächen, jedoch erwartet man eine geringere Planparallelität im Vergleich zu Maschine 1. Die in Maschine 2 verwendete pneumatische Achse liefert eine Anpresskraft von 136 N. Unter Berücksichtigung der Fläche eines Glasobjektträgers entspricht das einem Druck von $0,07 \text{ N/mm}^2$.

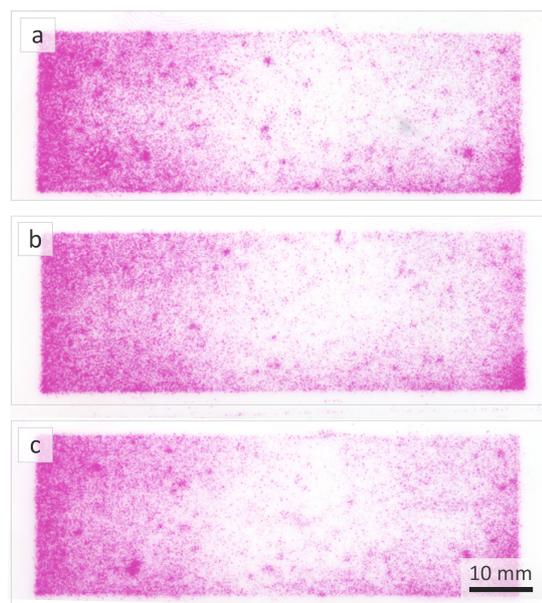


Abbildung 5.18 Verteilung der Anpresskraft für Maschine 2. Ein vollflächiger Kontakt mit ausreichend homogener Druckverteilung wurde erreicht.

Der Versuch wurde erneut dreimal wiederholt. Wie in Abbildung 5.18a - c dargestellt ist die Homogenität der Anpresskraft im Gegensatz zu der von Maschine 1 geringer. Weitergehende Versuche haben jedoch gezeigt, dass die Homogenität der Maschine 2 in einem tolerierbaren Bereich liegen, sodass vollflächige Überträge von Peptidarrays möglich sind (siehe Kapitel 5.7.4).

5.7.2 Genauigkeit bei der Verwendung von Positionierstiften

Die Positioniergenauigkeit (diese ist in der vorliegenden Arbeit definiert als der Mittelwert der Messungen) wurde bei der Verwendung von Substraten gleicher Geometrie mit zwei Verfahren bestimmt (vergleiche Kapitel 5.6.3). Zuerst wurden die Markierungen auf dem Träger vor und nach dem Prozess durch das eingebaute Mikroskop miteinander verglichen und die relative Verschiebung bestimmt. Alternativ wurde durch einen zweimaligen Übertrag unterschiedlicher Tinten die Positioniergenauigkeit auf denselben Zielträger ermittelt (siehe Abbildung 5.19). Die Positioniergenauigkeit beim Prozess setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: der Messabweichung beim manuellen Einlegen der Träger, der Messabweichung der Linearachsen und der Messabweichung des Messverfahrens. Diese Komponenten wurden dann über das in Abbildung 5.19a gezeigte Verfahren ermittelt. Die Messabweichung beim Einlegen eines Trägers per Hand mittels Positionierstiften ergab eine Messabweichung von $19 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$. Die Messabweichung beim Verfahren der Achsen lag unterhalb von $1 \mu\text{m}$ und war mit dem in den Aufbau integrierten Mikroskop nicht mehr messbar. Laut Datenblatt liegt die unidirektionale Wiederholgenauigkeit der geregelten Achsen bei $0,5 \mu\text{m}$. Eine Ermittlung einer Messabweichung bei Erschütterungen der Maschine war nicht möglich, da die Kamera nicht vollständig von der Störung entkoppelt werden konnte. Die gemessene Messabweichung, bestehend aus Verschiebung der Markierung und Änderung der Kameraposition, wird auf ca. $32 \mu\text{m}$ abgeschätzt.

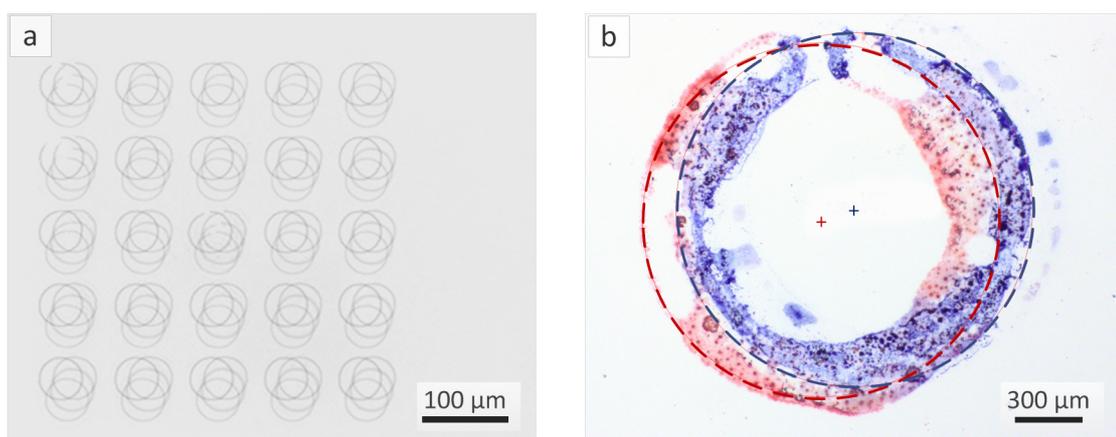


Abbildung 5.19 Bestimmung der Positioniergenauigkeit. a) Mit dem eingebauten Mikroskop wurde die Verschiebung von Markierungen vor und nach dem Prozess überlagert. Die Positioniergenauigkeit wurde über die Verschiebung der Mittelpunkte bestimmt. b) Mit einem Stempel wurden zwei Tinten auf den gleichen Träger übertragen und die gedruckten Muster mit einem Mikroskop vermessen.

Mit der Methode der verschiedenen Farbstempel (siehe Abbildung 5.19b) konnte nur die Positioniergenauigkeit des kompletten Übertragprozesses auf bis zu 50 μm bestimmt werden. Obwohl dieses Experiment den Prozess gut abbildet und realistisch ist, war die Abweichung der Messungen mit bis zu 200 μm relativ groß, bedingt durch die Verformung des Stempels und die unregelmäßige Benetzung mit Farbstoff. Durch weitergehende Experimente und Optimierungen könnte die Messmethode robuster werden. Dies stand jedoch nicht im Fokus der Arbeit. Daher wurde die Messabweichung unter Verwendung von Markierungen auf dem Glas (siehe Abbildung 5.19a) zu $37 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$ bestimmt.

5.7.3 Positioniergenauigkeit beim Prismenansatz

Für die Positionierung von Substraten mit unterschiedlicher Geometrie wurde der Prismenansatz gewählt. Muster werden dabei zur Prismenkante ausgerichtet. Nach dem Übereinanderlegen der beiden Substrate wird die Verschiebung der Muster gemessen.

Abbildung 5.20 zeigt eine Mikroskop-Aufnahme von zwei Objektträgern mit denselben Strukturen, die übereinander positioniert wurden. Dabei wurde die Positionierung mit dem Prisma durchgeführt. Der Abstand der Markierungen gibt daher Aufschluss über die Positioniergenauigkeit. Bezüglich der lateralen Genauigkeit konnten ein Versatz der Muster von 30 μm und ein vertikaler Versatz von 24 μm erzielt werden. Die Reproduzierbarkeit der Methode muss noch weiter verbessert werden, die Standardabweichung des Versatzes in horizontaler Richtung liegt bei 48 μm und in vertikaler Richtung bei 18 μm . Über eine präzisere Justage des Prismas zu den beiden Oberflächen oder eine höhere Vergrößerung des Objektivs könnte eine genauere Positionierung erreicht werden. Für die in der Arbeit verwendeten Peptidmicroarrays mit einer Spotgröße von $400 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ liegt die erzielte Genauigkeit von 30 $\mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$ in einem Bereich, der den Anforderungen sehr nahekommt.

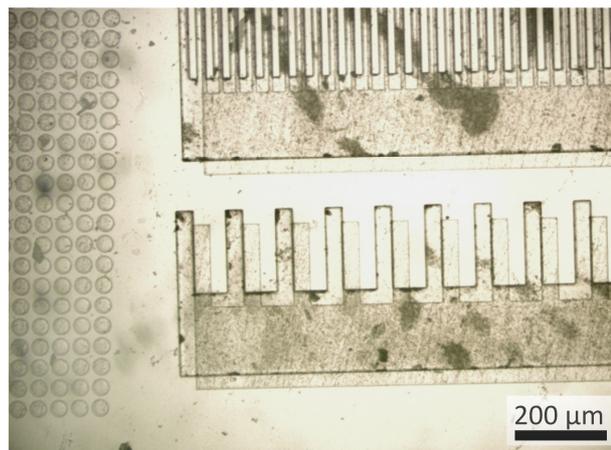


Abbildung 5.20 Mikroskopaufnahme von Mustern zweier übereinander positionierter Objektträger zur Bestimmung des Positionier-Messabweichung.

5.7.4 Vollflächiger Übertrag eines Peptidmicroarrays

Der Übertrag eines Peptidmicroarrays mit Maschine 2 (vergleiche 5.5.2) ist in Abbildung 5.21 gezeigt. In dem Versuch wurden die Peptide des Arrays biotinyliert und mit Ammoniak abgespalten. Der Übertrag mit der entwickelten Anlage auf den angepressten Glasobjektträger, der mit Streptavidin funktionalisiert wurde, findet in PBS-Puffer statt. Da der Übertrag als interdisziplinäres Projekt stattfand, sind die chemischen Details in Striffler [55] näher erläutert.

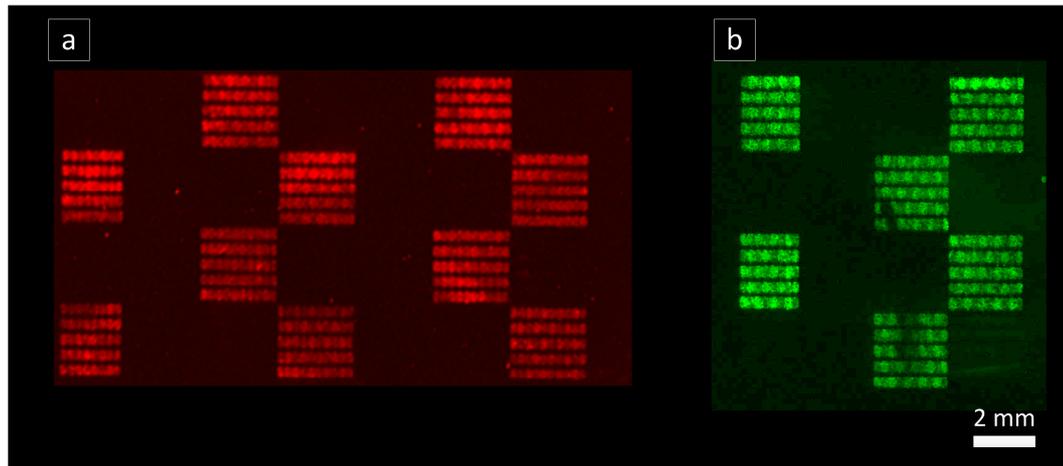


Abbildung 5.21 Übertrag eines kompletten Peptidarrays: a) auf einen starren Träger, b) auf eine COP Folie [55].

Die Zieloberflächen wurden nach dem Übertrag mit konjugierten Antikörpern nach einem Standardprotokoll gefärbt (Anti-HA DyLight 800, Anti-FLAG Dylight 680) und anschließend mit einem Odyssey-Scanner der Firma Li-Cor ausgelesen. Die Unterschiede des Fluoreszenzsignals in Abbildung 5.21a, b sind bedingt durch eine ungleichmäßige Funktionalisierung der kommerziell erhältlichen Streptavidinträger (PolyAn GmbH, Berlin) und der COP-Folien, nicht durch den Übertrag. Der Übertrag war selektiv (ausschließlich biotinylierte Peptide werden übertragen) und die Peptiddichte konnte normiert werden, sodass die Spots gleich viele Peptide enthalten. Dadurch ist ein Vergleich einzelner Spots möglich, da fertigungsbedingte Schwankungen der Peptidkonzentrationen ausgeglichen wurden. [55]

5.7.5 Positionsgesteuerter Übertrag auf einen DropletMicroarray

Aufgrund der geringen Volumina der Tropfen verdunsten diese innerhalb weniger Minuten bei Umgebungsbedingungen. Daher ist ein Transfer nur bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit (80 % – 100 % relative Luftfeuchtigkeit) möglich. Abhängig von der Höhe der Tropfen h_{tr} wird der Peptidmicroarray vertikal positioniert. Der Abstand entspricht dann abhängig von den Oberflächeneigenschaften etwa $2/3 h_{tr}$.

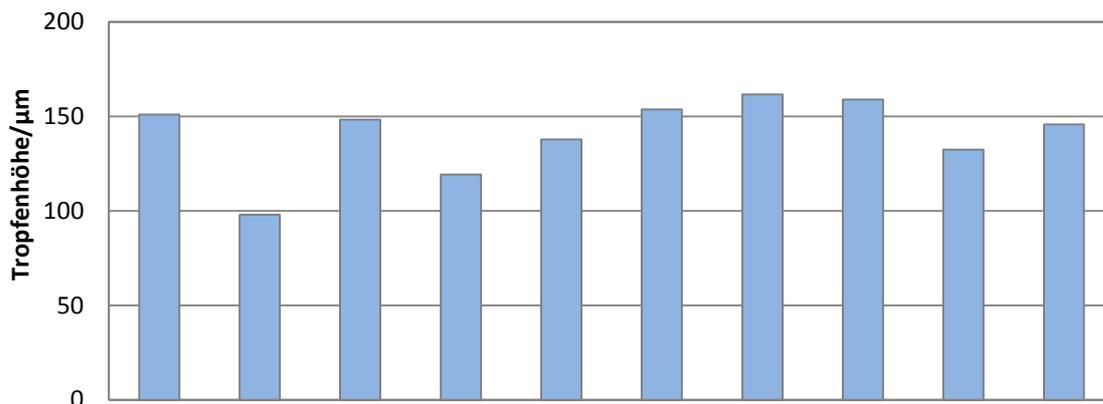


Abbildung 5.22 Tropfenhöhe von 10 Tropfen des Arrays.

Die Variation der Höhe der Tropfen (wie in Abbildung 5.22 gezeigt) war $141 \mu\text{m} \pm 19 \mu\text{m}$. Dies ist bedingt durch zwei Komponenten: Neben fertigungsbedingte Unterschieden durch die Polymerisation der superhydrophilen Oberflächen führt auch die Tropfengenerierungsmethode zu unterschiedlichen Tropfenvolumina. Aufgrund der Unterschiede ist vor jedem Übertrag die Messung der Tropfenhöhe h_{tr} erforderlich.

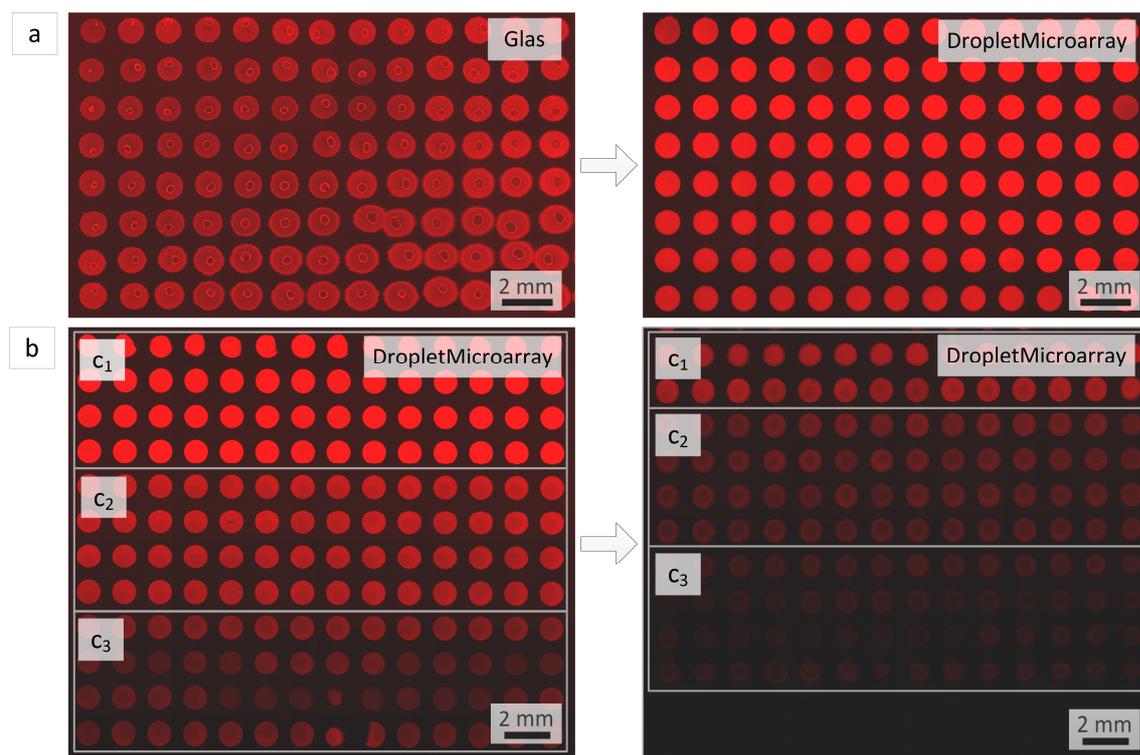


Abbildung 5.23 Mikroskopaufnahmen der Ausgangsoberfläche (links) und der Zieloberfläche (rechts dargestellt). a) Auf einen DropletMicroarray wurden drei Farbstoffkonzentrationen gedruckt und auf einen DropletMicroarray übertragen. b) Der Rhodaminfarbstoff wurde auf eine Glasoberfläche gedruckt und auf die DropletMicroarray-Zieloberfläche übertragen. Beim Trocknen der Tropfen wandern diese aufgrund von geringen Unterschieden der Hydrophobizität von der Glasoberfläche und formen einen Array mit ungleichmäßiger lateraler Verteilung der Spots. Trotzdem ist ein gleichmäßiger Übertrag möglich.

Für die Validierung der Methode wurde statt eines Peptidmicroarrays ein Referenzsystem genutzt, das aus Arrays mit Rhodaminspots besteht. Diese sind schneller herzustellen, günstiger und besser nachweisbar. Zudem ist die Transferrate der Moleküle auf die Zieloberfläche von Interesse.

Für den Versuch wurden zwei Ausgangsoberflächen benutzt: ein gereinigter Standardglasobjektträger und die Glasoberfläche eines DropletMicroarrays. Beim Trocknen wandern die Farbstoffspots aus dem gedruckten Raster des Arrays und formen ringartige Muster (Abbildung 5.23a). Diese Ringe sind als der sogenannte Coffee-Ring-Effekt bekannt. Das Wandern ist durch geringe lokale Unterschiede in der Hydrophobizität der Glasoberfläche zu erklären. Im Fall der DropletMicroarray-Oberfläche findet aufgrund der hydrophoben Begrenzung der Spots (Abbildung 5.23b) keine Verschiebung statt. Daher konnte in diesem Fall die Bestimmung einer Transferrate erfolgen: Die Konzentration des Farbstoffes wurde in drei Stufen variiert gedruckt. Vor dem Übertrag wurden die Farbstoffspots hinsichtlich ihrer Intensität vermessen und die Tropfen des Ziel-DropletMicroarrays mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Transferrate wurde dann über das Fluoreszenzsignal ermittelt. Abbildung 5.24 zeigt das Fluoreszenzsignal des Rhodamin-Farbstoffes vor und nach dem Übertrag auf den Ziel-DropletMicroarray. Aus dem Unterschied der Intensitäten lässt sich die Transferrate bestimmen. Diese hängt linear mit der Farbstoffkonzentration zusammen und liegt bei bis zu 50 %. Der Übertrag von der Glasoberfläche auf den Ziel-DropletMicroarray erfolgte mit einer höheren Transferrate von $95 \% \pm 14 \%$. Die Homogenität des Übertrags mit einer Standardabweichung von 10 % ist hoch.

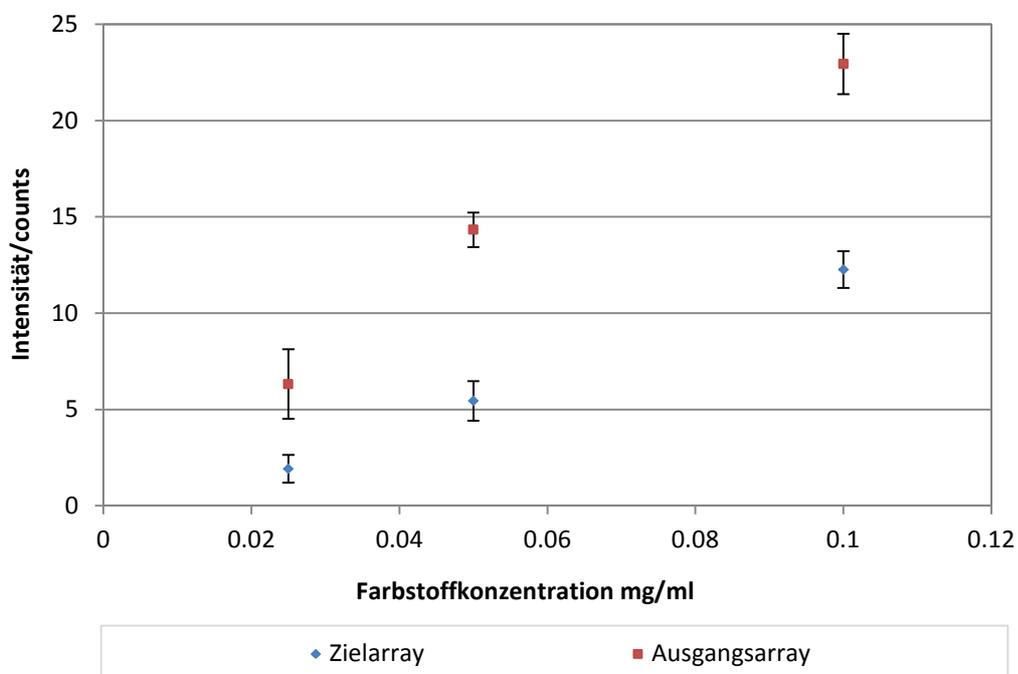


Abbildung 5.24 Intensität des Fluoreszenzsignals zur Bestimmung der Transferrate für den Übertrag Droplet-Microarray auf DropletMicroarray.

5.8 Diskussion

Ziel der Entwicklung war ein Transferprozess, bei dem Peptide im Arrayformat auf funktionalisierte, starre Träger übertragen werden können. Basierend auf dieser Aufgabenstellung wurden zwei Konzepte erarbeitet, nämlich der kraftgesteuerte und der positionsgesteuerte Übertrag.

Der kraftgesteuerte Übertrag ermöglicht den Transfer über ein Anpressen des Peptidarrays auf die Zieloberfläche. Dabei ist die Homogenität des Übertrags sowohl von der Kraft als auch von der Einspannung der Oberfläche in dem Vakuumhalter abhängig. Über eine Kalibrierung der Maschinen konnte eine gute Homogenität erreicht werden. Ein weiteres Merkmal ist die Möglichkeit der Positionierung der beiden Oberflächen für einen punktgenauen Übertrag der Peptidspots. Dieser erfolgt entweder über Positionierstifte oder mit einem Positioniermodul, mit dem Positioniergenauigkeiten von bis zu 25 μm erreicht wurden.

Daneben wurde eine Machbarkeitsstudie zum positionsgesteuerten Übertrag durch einen Transfer von einem Molekülarray auf die sensible Oberfläche eines sogenannten Dropletmicroarrays durchgeführt. Im Gegensatz zum kraftgesteuerten Übertrag spielt die laterale Positionierung keine entscheidende Rolle, da die Tropfen einen Durchmesser von 1 mm haben. Wichtig ist die vertikale Positionierung, damit die Peptide in die Tropfen diffundieren können. Obwohl die Höhe der Tropfen stark variierte, konnte ein Übertrag gezeigt werden, der mit der hohen Transferrate von bis zu 95 % und der guten Homogenität von $\pm 10\%$ des Übertrags erfolgte.

Ausgehend von den Versuchen konnten für die beiden Verfahren die prozessrelevanten Einflussgrößen identifiziert werden. Mit den entwickelten Prototypen war es möglich, einen reproduzierbaren Transferprozess der Peptidarrays zu erreichen. Vor allem die mit der Maschine in [55] durchgeführte Herstellung von bis zu 20 gleichwertigen Replikaten mit identischer Spotdichte eröffnet neue Möglichkeiten. Die Versuche sind nun direkt miteinander vergleichbar, da herstellungsspezifische Eigenschaften wegfallen. Des Weiteren können die Kosten dramatisch gesenkt werden. Dies ebnet den Weg für einen standardmäßigen Einsatz der Arrays in verschiedenen Screenings, beispielsweise bei der Suche nach Malaria-Therapeutika oder dem Verständnis von Alzheimer. Aufgrund dieser Vorteile wurde die Maschine und das Verfahren zum Patent angemeldet [59].

6 Mikrofluidische Inkubationskammer

Nach der Entwicklung von Prozessen zur Herstellung und Aufreinigung der ultra-hochdichten Peptidarrays können auf dieser Grundlage Assays entwickelt werden. In diesem Abschnitt ist die Entwicklung einer mikrofluidischen Inkubationskammer beschrieben, mit der die Inkubation der Arrays mit Antikörpern oder Seren eines Patienten und eine gleichzeitige Auswertung der Bindung geschieht. Dies ist ein typisches Anwendungsbeispiel im Bereich der Immunassays. Unter diesem Begriff wird eine Reihe von experimentellen Methoden zusammengefasst, die auf der spezifischen Reaktion eines Antigens mit mindestens einem Antikörper beruhen. Die in dieser Arbeit genutzten Peptidmicroarrays gehören zu den Festphasen-Immunassays, bei denen das Antigen auf einem festen Träger immobilisiert ist. Dies ermöglicht eine bessere Abtrennung nichtgebundener Antikörper [60] durch den Waschschrift, hat aber zum Nachteil, dass die Zugänglichkeit des Antigens für den Antikörper eingeschränkt sein kann [61]: Aufgrund der Immobilisierung des Antigens/Peptids auf der Oberfläche kann dadurch die Antikörperbindung beeinträchtigt werden. Die Nachweismethoden für die verwendete Art von Immunassays sind vielfältig. Für den Einsatz können fluoreszenzbasierte Verfahren genutzt werden, dabei ist der Antikörper direkt mit einem Farbstoff markiert oder der gebundene Antikörper kann über einen markierten Zweitantikörper nachgewiesen werden [62]. Neben fluoreszenzmarkierten Antikörpern können auch markierungsfreie Detektionsverfahren eingesetzt werden [63], beispielsweise die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie [64] oder die reflektrometrische Interferenzspektroskopie [65].

6.1 Theorie

6.1.1 Reaktionskinetik

Für die Bindung von Antikörpern sind verschiedene Parameter entscheidend: die Reaktionskinetik, das Reaktionsvolumen bzw. die Reaktionsoberfläche des Peptidspots auf dem Mikroarray (je kleiner, desto kürzer die Inkubationszeit) und die Konzentration der Antikörper an der Oberfläche [66]. Der Bindungsmechanismus des Analyten lässt sich in drei Teile gliedern: der Massentransport des Antikörpers zur Oberfläche über Konvektion, dann die Diffusion des Antikörpers (siehe Abbildung 6.1) und der darauf folgende Bindungsprozess an das Antigen (Peptid), der sich im Bereich mehrerer Angström abspielt [67].

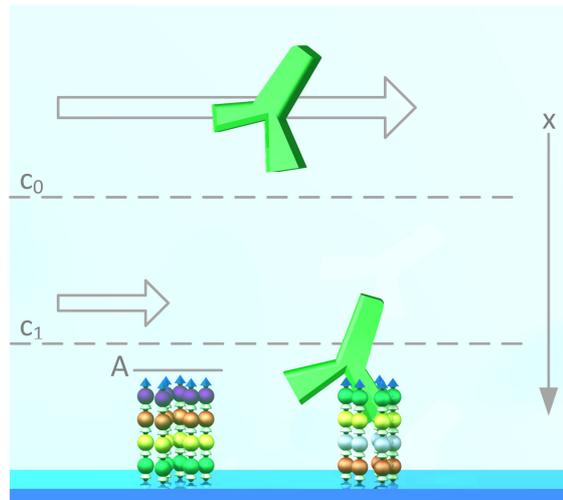


Abbildung 6.1 Bindung von Antikörpern an ein Peptidmicroarray. Der Prozess lässt sich in die Diffusion zur Oberfläche und einen anschließenden Bindungsmechanismus unterteilen. c_0 kennzeichnet die Konzentration des Antikörpers in der Lösung, c_1 die Konzentration an der Oberfläche und A die Fläche des Spots des Peptidmicroarrays.

Die Diffusion der Antikörper lässt sich in erster Näherung mit Formel 6.1 darstellen [60].

$$\frac{dn}{dt} = -DA \frac{dc}{dx} \quad 6.1$$

Dabei bezeichnet n die Anzahl der Moleküle, D die Diffusionskonstante des Mediums, c die Konzentration des Antikörpers und A die Fläche des Spots des Mikroarrays. Nach dem Transport in die Reaktionsumgebung (Abstand zum Peptid von $10 - 100 \text{ \AA}$ [66]) kann eine Bindung des Antikörpers mit dem Antigen stattfinden. Diese beruht auf Van-der-Waals-Kräften, elektrostatischen Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen [60]. Die Bindung lässt sich als Gleichgewichtsreaktion zwischen Antikörper $[A_K]$ und Antigen $[A_G]$ durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben, und zwar mit den in Wild [68] beschriebenen Annahmen:



Dabei bezeichnet $[A_G - A_K]$ den Komplex aus Antigen und Antikörper, k_+ den Assoziationskoeffizienten und k_- den Dissoziationskoeffizienten. Aus diesem Zusammenhang lässt sich die sogenannte Affinitätskonstante K_{eq} bestimmen [68]:

$$K_{eq} = \frac{k_+}{k_-} = \frac{[A_G - A_K]}{[A_G][A_K]} \quad 6.3$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} steht dabei in direkter Beziehung zu der freien Energie ΔG , der Enthalpie ΔH , der Temperatur T und der Entropie ΔS des Bindungsereignisses [69]:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} = \Delta H - T\Delta S \quad 6.4$$

Eine Modellierung des Bindungsprozesses erfolgt in [67], dabei lässt sich die Bindung über das Signal der entsprechenden Nachweismethode quantifizieren:

$$\frac{dI(t)}{dt} = \frac{k_+ c_0 (I_{max} - I(t)) - k_- I(t)}{1 + \frac{k_+ (I_{max} - I(t))}{k_m}} \quad 6.5$$

wobei $I(t)$ die Signalintensität darstellt, k_m die Stofftransportkonstante des Antikörpers und c_0 die Ausgangskonzentration des Analyten. Dieser Bindungsprozess kann durch eine dynamische Inkubation, bei der die flüssige Phase in Bewegung ist und somit mittels Vermischung die Konzentration des Antikörpers homogenisiert wird, stark erhöht werden. Für die Durchmischung werden verschiedene Konzepte vorgeschlagen: Neben dem Rühren der Lösung können auch Mikropartikel oder Cellulose eingesetzt werden [66]. Eine weitere in der Proteomik weit verbreitete Möglichkeit liegt im Einsatz von mikrofluidischen Systemen [70]. In diesem Fall lässt sich die Massetransportkonstante berechnen [71].

$$k_m = 1,86 \left(\frac{D^2 v}{h L} \right)^{1/3} \quad 6.6$$

Dabei ist D die Diffusionskonstante, v die Geschwindigkeit des Fluids, h die Höhe der Kammer und L die Position der Fläche vom Einlass. Für das bessere Verständnis werden im nächsten Kapitel die theoretischen Grundlagen dieser mikrofluidischen Systeme erläutert.

6.1.2 Mikrofluidik

Eine Definition des Begriffes Mikrofluidik wird in [72] gegeben:

„Der Bereich der Mikrofluidik beschäftigt sich mit Transportphänomenen in mikroskopischem Maßstab (typischerweise 1 - 500 μm), sowie den Komponenten und Techniken, die eingesetzt werden um ein Fluid in Bewegung zu setzen und zu kontrollieren.“

Kumar, 2010

Die Verwendung mikrofluidischer Systeme hat mehrere grundsätzliche Vorteile. Das für einen Nachweis benötigte Volumen des Analyten ist geringer als bei herkömmlichen Methoden, beispielsweise Experimenten im Petri-Schalen-Format. Ein weiterer Vorteil basiert auf dem erhöhten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis mikrofluidischer Systeme, das eine schnellere Reaktionen mit besseren Reaktionsraten ermöglicht und das somit leistungsfähiger ist [73]. Zudem lassen sich mikrofluidische Systeme leicht automatisieren. Diese Aspekte sind für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen von Bedeutung. Die Bandbreite reicht von Enzym- und Immunassays bis zur DNA-Sequenzierung [74].

6.1.3 Mikrofluidische Grundlagen

Aufgrund der mikroskopischen Größenverhältnisse unterscheidet sich das Verhalten der Strömung von dem im Makroskopischen hinsichtlich der dominierenden Kräfte: Trägheitskräfte spielen wegen der

geringen Masse der Flüssigkeit eine untergeordnete Rolle, dafür werden andere Effekte wichtig, beispielsweise die Kapillarkräfte- oder elektrokinetische Kräfte. In Squires ist eine ausführliche Beschreibung wichtiger Kenngrößen von mikrofluidischen Systemen dargestellt [75]. Neben den Grundgleichungen zu Kräften, Energie- und Masseerhaltung kann für eine weitere Charakterisierung der Strömung die Reynoldszahl genutzt werden.

$$\text{Re} = \frac{\rho v D_h}{\eta} \equiv \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{Reibungskraft}} \quad 6.7$$

wobei ρ die Dichte, v die Geschwindigkeit und η die dynamische Viskosität des Fluids darstellt. D_h ist die charakteristische Länge in der Strömung, beispielsweise der Durchmesser des Kanals. Aufgrund der mikroskopischen Größenverhältnisse der Kanäle dominiert die Reibungskraft und führt zu einer laminaren Strömung, die eine Durchmischung von mehreren Flüssigkeiten erschwert. Für die vollständige Beschreibung der Strömungsverhältnisse ist die Charakterisierung des Fluides wichtig: Das in der Arbeit genutzte biologische System besteht aus Antikörpern in wässriger Lösung und kann in erster Näherung als inkompressible Flüssigkeit modelliert werden. Die Lösung hat zudem die Eigenschaften eines Newtonschen Mediums. Die Eigenschaften (Viskosität, Dichte) können in erster Näherung mit denen von Wasser approximiert werden. Für Kanäle, deren Höhe viel kleiner als die Breite ist, kann die Strömung als Spaltströmung zwischen zwei unendlich ausgedehnten Platten beschrieben werden. Mit den dargestellten Informationen kann nun ein Profil für die Entwicklung der Inkubationskammer erfolgen.

6.2 Profilfindung

Das Profil wurde wie folgt definiert:

Es soll ein technischer Prozess entwickelt werden, der die Inkubation von Peptidmicroarrays erlaubt. Für eine gleichmäßige Inkubation soll die Lösung mit dem Reaktanten dynamisch über den Array bewegt werden. Die Lösung soll auf einer mikrofluidischen Kammer basieren, die Bindung soll optisch und zeit aufgelöst detektiert werden.

6.3 Stand der Technik

Für die Entwicklung der mikrofluidischen Inkubationskammer wurde zuerst der Stand der Technik im Bereich der Inkubation für Immunassays untersucht.

Ein gängiges Werkzeug bei der Verwendung von Immunassays sind Mikrotiterplatten, die in unterschiedlichen Ausführungen (Größe und Form der Töpfchen, wahlweise mit verschiedener Funktionalisierung)

kommerziell erhältlich sind. Zurzeit stellen Mikrotiterplatten die am meisten genutzte industrielle Plattform dar (mit kompatiblen Geräten und Software).

Ein ähnliches Konzept verfolgt der PEPPERCHIP-Inkubation-Tray der Firma Pepperprint GmbH. Dieser besteht aus Polymerkompartimenten, die auf dem Array fixiert werden. Nach dem Pipettieren der Reagenzien in die Kompartimente findet die Inkubation der Mikroarrays auf einem Schüttler statt.

Die Mikroarray-Hybridisierungsstation der Firma Tecan basiert auf einer mikrofluidischen Kammer, die die Inkubation von Mikroarray-Trägern vollautomatisch durchführt. Diese besteht aus einer Kammer, in die der Objektträger eingelegt wird. Die Dichtung erfolgt mit einem umlaufenden Dichtungsring. Eine gleichzeitige Detektion der Bindungsergebnisse ist nicht möglich.

Wie im Profil definiert ist neben der Inkubation auch die Messung der Bindung des Analyten an die Peptide des Mikroarrays notwendig. Dafür existiert eine große Anzahl an Herstellern, die eine markierungsfreie Detektion von Immunassays anbieten. Diese kann beispielsweise auf Basis von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie geschehen: Die kommerziellen Systeme umfassen unter anderem das Biacore-System (GE Healthcare) und die „SPR Navi“-Serie der Firma Bionavis. Die reflektrometrische Interferenzspektroskopie als Detektionsprinzip wird unter anderem von Jenoptik (BIAffinity) und Biometrics verfolgt.

6.4 Ideenfindung

Aus der Definition des Profils und dem Stand der Technik lassen sich verschiedene Lösungsmöglichkeiten ableiten. Bezüglich des Materials und des entsprechenden Herstellungsprozesses der Mikrofluidikkammer bestehen mehrere Möglichkeiten:

Glas, Silizium: Über fotolithografische Herstellung einer Maske und einen Ätzprozess lassen sich Mikrokanäle herstellen [76].

PDMS: PDMS-Kanäle lassen sich über ein entsprechendes Gussverfahren herstellen [77].

Stahl, Polymer: Diese Materialien lassen sich mikromechanisch verarbeiten [78, 79].

Neben der Herstellung ist das Dichtungskonzept für die verlustfreie Inkubation wichtig. Die Dichtigkeit kann über ein Bonden oder das Kleben des Arrays auf den Kanal erfolgen [79]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung einer Dichtung in Form des Glasobjektträgers.

Bei der optischen In-Prozess-Detektion des Immunassays können neben der Verwendung von Fluoreszenz auch markierungsfreie Verfahren genutzt werden. Ein optischer Zugang zum Mikrosystem ist daher notwendig, um entsprechende Methoden integrieren zu können.

6.5 Prinzipmodellierung

6.5.1 Anforderungen

Entsprechend der Definition des Profils werden an die Entwicklung der Anlage folgende Anforderungen gestellt. Diese Anforderungen lassen sich unterteilen in die beiden Komponenten der Anlage: die mikrofluidische Komponente für die Inkubation und den optischen Aufbau zur zeitaufgelösten Detektion der Bindung.

- Der Fluss des Analyten soll für eine homogene Inkubation möglichst konstant (sowohl örtlich als auch zeitlich konstant) erfolgen, mit minimalem Verbrauch von Analyten.
- Eine Entnahme des Arrays muss möglich sein, um die Kompatibilität mit einem Fluoreszenz-Scanner zu gewährleisten.
- Die Anlage soll vollautomatisiert betrieben werden. Die Komponenten (Pumpe, Ventile, Kamera etc.) sollten über eine Schnittstelle vom PC ansteuerbar sein.
- Die Pumpe soll zum einen kontinuierlich arbeiten und der Fluss soll umkehrbar sein (für ein alternierendes Pumpen des Analyten über den Träger), zum anderen soll sie pulsationsfrei sein und der Volumenstrom soll präzise einstellbar sein.
- Für die Aufnahme einer Kinetik ist es notwendig, dass die Optik einen Peptidspot mit Durchmesser 100 μm auflöst, bei möglichst großem Sichtfeld.
- Für die Detektion der Bindung mittels Fluoreszenz soll der Aufbau zudem kompatibel zu den Standard-Fluoreszenzlichtwellenlängen der Chromophoren (Dylight, Cy3, Cy5) sein.

6.5.2 Technische Umsetzung

In diesem Abschnitt wird die technische Umsetzung der oben beschriebenen Anforderungen erläutert. Aufgrund der Anforderungen wurde das in Abbildung 6.2 dargestellte Konzept gewählt. Dieses basiert auf der MicCell-Plattform (GeSiM - Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Grosserkmannsdorf), wobei die funktionsbestimmende Komponente, der Kanal, in der Arbeit selbst entwickelt wurde. Die Herstellung des Kanals geschieht über einen Abguss eines Masters mit PDMS, der die Geometrie des Kanals vorgibt. Während des Gussverfahrens werden die Ein- und Auslässe des Kanals durch Blindstopfen freigehalten und können nach dem Auspolymerisieren des PDMS entfernt werden. Nach dem Entformen kann der Peptidmicroarray mit dem Kanal montiert werden. Aufgrund der elastischen Eigenschaften dient der

Kanal gleichzeitig als Dichtung, sodass der Kanal nicht gebondet werden muss. Dies erleichtert die Entnahme des Arrays nach der Inkubation, beispielsweise für eine Auswertung mit einem Fluoreszenzscanner.

Für die Detektion der Bindungsereignisse und das Erreichen eines möglichst rauschfreien Signals ist eine Messung durch eine sich bewegende Flüssigkeit keine gute Voraussetzung. Daher wird ein entsprechender Detektor auf der Unterseite der Fluidkammer angebracht, der die Bindung an der Grenzfläche von Peptidmicroarray und Flüssigkeit detektiert.

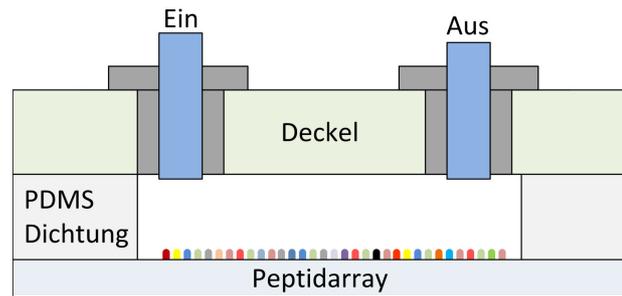


Abbildung 6.2 Schematische Darstellung der Flusszelle für Peptidmicroarrays

Die Form des Kanals entspricht der Geometrie des Masters, der abhängig von der Fertigung fast beliebig konstruiert werden kann. Somit besteht in der Entwicklung des Kanals eine hohe Flexibilität. Für eine homogene Inkubation sollte die Strömung des Analyten über den Array möglichst gleichmäßig sein, die inkubierte Fläche maximiert und das Volumen des Analyten minimiert werden. Mit dem oben beschriebenen Konzept sind daher verschiedene Optimierungsparameter zu untersuchen. Die Geometrie des Kanals hat einen großen Einfluss auf das Strömungsprofil und damit auf das Ergebnis der Inkubation. Ein weiterer Parameter ist die Dichtung: Für die Maximierung der Fläche ist eine Minimierung der Dichtfläche notwendig, dies kann jedoch zu Leckagen führen. Zudem hat die Höhe des Kanals einen direkten Einfluss auf das Volumen, eine zu geringe Höhe hat jedoch ein Durchbiegen des Kanaldeckels zur Folge. Zudem steigt der Reibungsbeiwert des Kanals und eine Erhöhung des Eingangsdruckes kann zu Undichtigkeiten führen.

Aufgrund der geschilderten Randbedingungen ist von einer Hagen-Poiseuille-Strömung für nicht kreisförmige Kanalquerschnitte auszugehen. Die hyperbolische Geschwindigkeitsverteilung ermöglicht daher keine gleichmäßige Inkubation. Daher wurden in Zusammenarbeit mit Huang [80] drei Möglichkeiten zur Strömungsmodifikation untersucht. Eine Geometrieänderung des Kanals führt zu einer Veränderung der Strömung, dabei ist jedoch die Berücksichtigung der oben beschriebenen Optimierungsparameter wichtig. Eine zweite Möglichkeit bietet das Einbringen von Strömungshindernissen am Ein- und Ausgang des Strömungskanals. Als dritte Möglichkeit können zudem die Wände oder der Deckel des Kanals mikro- oder nanostrukturiert werden. Diese Strukturierung der Oberfläche bewirkt eine Durchmischung des Fluids durch Sekundärströmungen senkrecht zur Flussrichtung [81]. Diese Ideen sind in Abschnitt 6.7 genauer diskutiert.

6.6 Gestaltmodellierung

Nach der Definition der Anforderungen und der Prinzipmodellierung wurde die in Abbildung 6.3 gezeigte Anlage konstruiert und aufgebaut. Der Aufbau der beschriebenen Komponenten (siehe Abbildung 6.3) und die Programmierung per LabVIEW geschah in Zusammenarbeit mit Fischer im Zuge einer Diplomarbeit [82].

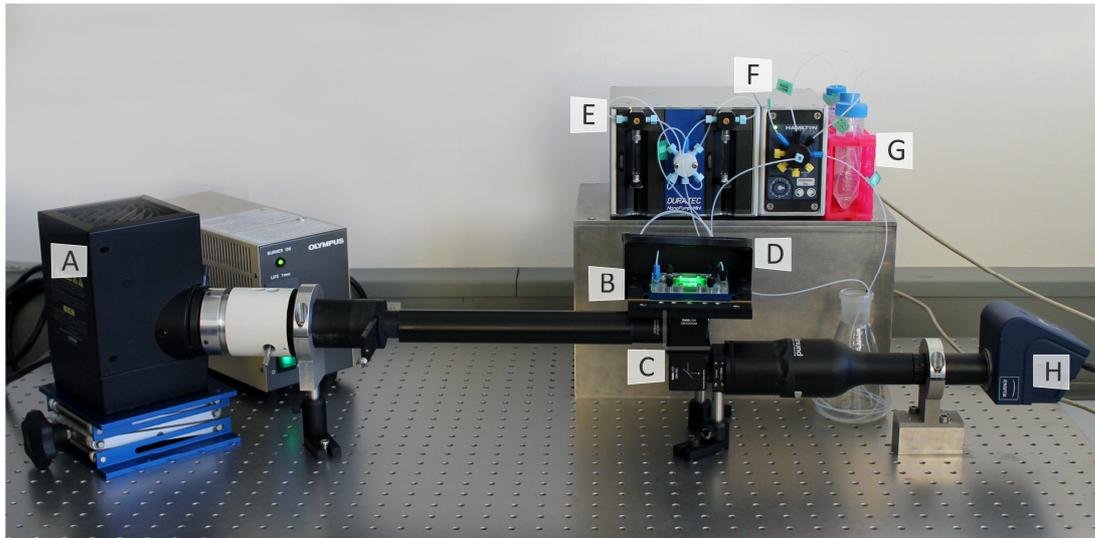


Abbildung 6.3 Komponenten der mikrofluidischen Inkubationskammer. Eine Weißlicht-Quecksilberdampfampe (A) beleuchtet den Mikrokanal (B). Das Licht wird über ein Fluoreszenzfilterset (C) gefiltert. Das Eintreten von Streulicht wird durch eine Abdeckung (D) verhindert. Über eine Spritzenpumpe (E) und ein Verteilventil (F) wird der Array mit verschiedenen Medien (G) inkubiert. Das reflektierte Signal wird von einer Kamera mit Objektiv (H) detektiert.

Im Folgenden werden die für das Gesamtsystem verwendeten Komponenten beschrieben.

Mikrofluidik: Das Kernelement des Systems besteht, wie in Abbildung 6.4 dargestellt, aus einem gegossenen PDMS-Mikrofluidikkanal, dem Peptidmicroarray sowie einer Deck- und Bodenplatte. Die Deckplatte und der PDMS-Kanal sind über eine starke Adhäsionskraft miteinander verbunden und werden über vier Schrauben auf den Peptidmicroarray fixiert, der in der entsprechenden Aussparung der Basis positioniert ist. Über Federn, die zwischen Deckplatte und Bodenplatte gelagert sind, wird die Anpresskraft aufgebracht, sodass der Kanal dicht ist und gleichzeitig die Kraft bei der Montage vergleichbar ist. Bei inhomogener Anpresskraft kann es zu einer Biegung des Kanaldeckels kommen. Die mikrofluidische Kontaktierung erfolgt über Einlässe in der Deckplatte.

Fluidischer Aufbau

Spritzenpumpe: Die in der Arbeit verwendete Spritzenpumpe „NanoPump-mini“ (Duratec Analysentechnik GmbH, Hockenheim) besitzt zwei austauschbare Spritzen, die für einen kontinuierlichen und pulsationsfreien Fluss aktuiert werden. Sie zeichnet sich durch eine hohe Präzision beim Dosieren aus. Dies ist vor allem bei der Verwendung von Antikörpern, die in geringer Menge vorliegen, wichtig. Für diese Arbeit

wurden 250 μL -Spritzen der Firma Hamilton verwendet. Die damit realisierbaren Flussraten betragen 4200 nl/min – 1,5 ml/min bei einer Genauigkeit von 1,2 %. Die NanoPump-mini ist für einen Systemdruck bis 6 bar ausgelegt.

Verteiler-Ventil: Bei Immunassays kommen verschiedene Puffer und Waschlösungen zum Einsatz. Für eine automatisierte Inkubation wurde das 8/7-Wege-Ventil MVP (Duratec Analysetechnik GmbH, Hockenheim) beschafft, das über eine RS-232-Schnittstelle verfügt.

Optischer Aufbau

Kamera und Objektiv: Bei der Kamera handelt es sich um eine ProgRes-C5-Kamera (Jenoptik AG, Jena) und das telezentrische Objektiv 62-933 (Edmund Optics GmbH, Karlsruhe). Die Kamera besitzt einen $2/3$ "-CCD-Sensor mit einer Pixelgröße von $3,4 \mu\text{m}^2$, einer Auflösung von 5 MP und einer Farbtiefe von 12 Bit. Das Objektiv ist für die Auflösung der Kamera optimiert und hat eine 0,28-ache Vergrößerung. Die Auswahl der Komponenten ermöglicht eine Detektion von Bindungsereignissen bei einer Größe der Peptidspots von 120 μm Durchmesser.

Anregungslichtquelle: Für den Aufbau wurde die 100-Watt-Weißlicht-Quecksilberdampf Lampe BH2-RFL (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) mit Kondensator und UV-Filter verwendet. Dies ist eine typische Beleuchtung für Mikroskopie.

Emissionsfilter, dichroitischer Spiegelteiler, Extinktionsfilter: Je nach Anwendung ist der Aufbau mit Filtersets (bestehend aus einem Extinktions- und Emissionsfilter und einem dichroitischen Strahlteiler) für Fluorophoren verschiedener Wellenlängen kompatibel (Filter C3 und Dylight 680: AHF Analysetechnik AG, Tübingen; Filter Cy5.5: Edmund Optics GmbH, Karlsruhe).

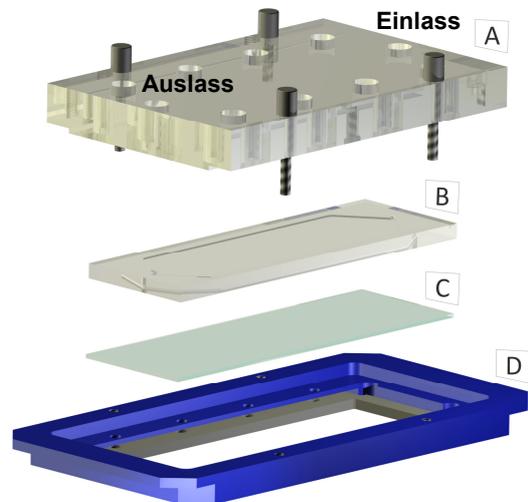


Abbildung 6.4 MicCell-System, bestehend aus einem Deckel (A) aus Polycarbonat, dem Fluidikkanal aus PDMS (B), auf dem der Peptidmicroarray (C) über Schrauben und einen Gegenhalter (D) anpresst und somit abdichtet wird. (nach [78])

6.7 Methoden für die Charakterisierung der Mikrofluidik und der Optik

6.7.1 Simulation mit ANSYS-FLUENT

In der Arbeit wurde *ANSYS-FLUENT 14*, ein „Computational Fluid Dynamics“(CFD)-Programm für die Modellierung im Bereich der numerischen Strömungsmechanik, verwendet, um die Strömung in den verwendeten Kanälen zu simulieren. Vor der Durchführung der Simulation wurde eine Parameterstudie

zur Netzgenerierung durchgeführt, mit der die Anzahl an Netzelementen, deren Geometrie und die Anzahl an Iterationen ermittelt wurden. Diese bestimmen sowohl den Rechenaufwand der Simulation als auch deren Genauigkeit. In der ANSYS-Hilfe gibt es Vorschläge zur Evaluierung der Simulation: Das ANSYS-Gütekriterium, die minimale orthogonale Qualität, die die Ausrichtung einer Zelle zu ihrer Nachbarzelle beschreibt, sollte über dem Wert 0,01 liegen. Das Längenverhältnis von Breite zu Höhe der Zelle sollte nicht größer als 20 werden. Aufgrund der Dimensionen der Spaltströmung wurden die Zellenhöhe mit $10\ \mu\text{m}$ und die Breite mit $200\ \mu\text{m}$ gewählt. Entsprechend der Parameterstudie wurde die Anzahl der Iterationen zu $1 \cdot 10^4$, die Residuen zu $1 \cdot 10^{-8}$ und das Konvergenzkriterium für alle Netze zu $1 \cdot 10^{-6}$ m gesetzt. Die Simulation wurde als laminare stationäre Strömung mit Gravitation ausgeführt. Dabei wurden die Materialdaten von Wasser als Medium genutzt, dies ist in erster Näherung für die Mischung von Antikörperlösung in PBS-Puffer möglich.

6.7.2 Messung der Strömung im Kanal

Für die Visualisierung von Strömungen in Mikrokanälen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden verwendet. Die sogenannte Micro-Particle-Image-Velocimetry (μPIV) und die Micro-Astigmatismus-Partikel-Tracking-Velocimetry (μPTV). Beide Methoden nutzen in die Strömung eingebrachte Mikropartikel; diese haben eine Größe von $0,5 - 5\ \mu\text{m}$ und fluoreszieren. Die Partikel werden in einem kurzen zeitlichen Abstand mit einem Laserpuls beleuchtet und ihre Position wird optisch detektiert. Während μPIV die Verschiebung der Partikel zwischen den aufgenommenen Bildern zueinander berechnet, wird bei μPTV die Partikelspur aufgezeichnet. Aus der Verschiebung der Partikel lässt sich dann die Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit des Fluids ermitteln. Aufgrund des großen Messaufwandes werden beide Kanäle nur an ausgewählten Stellen vermessen.

6.7.3 μPIV

Über die Kreuzkorrelation zweier Bilder, in definiertem Zeitraum aufgenommen, kann man die Verschiebung der Partikel in diesem Zeitraum ermitteln. Mithilfe einer Kalibrierung der Kamera lässt sich dann die lokale Geschwindigkeit der Partikel berechnen. Unter der Annahme, dass der Strömungswiderstand der Partikel vernachlässigt werden kann (dies gilt für Partikel im einstelligen Mikro- und Nanometerbereich), entspricht die Geschwindigkeit der Partikel der des umgebenden Fluids. Die Messungen wurden zusammen mit Huang im Zuge einer Masterarbeit durchgeführt [80]. Der Prozess ist im Folgenden beschrieben. Für die Messung werden zwei Bilder (Doppelframe) der Strömung mit den dispergierten Partikeln in einem definierten zeitlichen Abstand mit einem inversen Mikroskop (IX50, Firma Olympus) aufgenommen. Die verwendeten Partikel sind fluoreszierende, monodisperse, carboxyl-funktionalisierte Polystyrol-Latex-Partikel mit einem Durchmesser von $0,5\ \mu\text{m}$ (Sigma Aldrich, Taufkirchen). Der aufgenommene Doppelframe wurde wie folgt vorverarbeitet: Nach einer Konvertierung in ein Grauwertbild wurde der

statische Hintergrund (z. B. an der Wand-Partikel) subtrahiert und eine Filterung durch einen Wavelet- oder Bandpassfilter durchgeführt. Anschließend konnten die Partikel mittels Kantendetektion identifiziert werden. Die Verschiebung wurde dann über eine sogenannte time-average cross-correlation [83] kalkuliert. Während der Arbeit wurde die Seedingdichte (Partikeldichte im Fluid) optimiert und der Größenbereich des Messfensters angepasst. Aufgrund des Aufbaus (Beleuchtung und Bildrate der Kamera) lag der messbare Volumenstrombereich des Fluids zwischen $2,1 \mu\text{l}/\text{min}$ und $3,6 \mu\text{l}/\text{min}$.

6.7.4 μAPT

Für die 3-dimensionale Vermessung von Strömungen mit nur einer Kamera kann das sogenannte Micro-Astigmatismus-Partikel-Tracking-Velocimetry-Verfahren verwendet werden. Dabei werden fluoreszierende monodisperse Polystyrol-Partikel (Mikropartikel GmbH, Berlin) mit einem Durchmesser von $5 \mu\text{m}$ in die Strömung dispergiert. Die Partikel im Kanal werden durch Laserlicht von einem Nd:YAG-Litron-Laser (Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$) im Doppelpuls-Modus beleuchtet. Dabei werden in einem Abstand von 300 ms zwei Laserpulse abgegeben. Das Fluoreszenzsignal lässt sich dann mit einer speziellen Optik und der pco.edge-sCMOS-Kamera (PCO AG, Kelheim) aufnehmen. Die Optik beinhaltet unter anderem eine asphärische zylindrische Linse, die zwei getrennte Brennebenen erzeugt, wodurch die Partikelbilder elliptisch verzerrt erscheinen.

Die Verzerrung ist abhängig von der z-Position der Partikel im Kanal (siehe Abbildung 6.5). Nach einer Kalibrierung des Messsystems mit den Partikeln kann über die Verzerrung der Partikelbilder auf deren z-Position geschlossen werden.

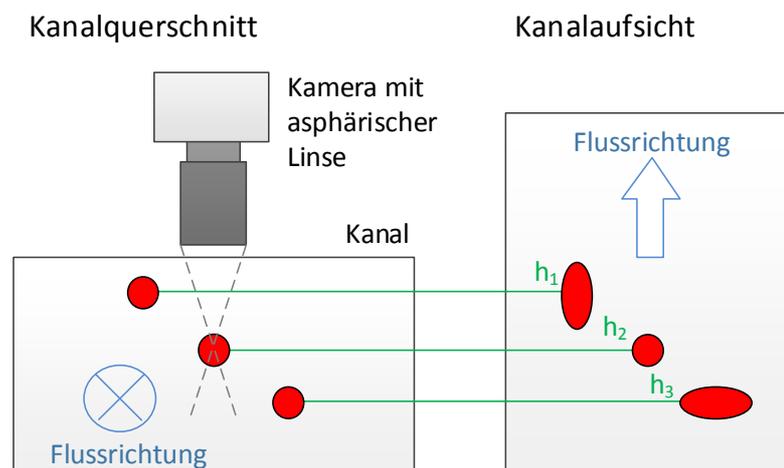


Abbildung 6.5 Messprinzip von μAPT . Die Partikelgeometrie ändert sich mit der z-Position der Partikel im Kanal. Dadurch kann mit einer 2-dimensionalen Aufnahme in der Kanalaufsicht die Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Höhenposition der Partikel berechnet werden.

Sobald die Partikelpositionen in physikalischen Koordinaten bekannt sind, kann ihre Geschwindigkeit berechnet werden. Statt der Kreuzkorrelation kommt dabei ein Tracking-Algorithmus zum Einsatz.

Die Ergebnisse der Messungen zu den in diesem Kapitel vorgestellten Methoden sind im nächsten Abschnitt dargestellt.

6.8 Ergebnisse

6.8.1 Simulation der Strömung im Kanal

In der Definition der Anforderungen ist neben der Maximierung der inkubierten Fläche eine möglichst gleichmäßige Strömung für die Inkubation aufgeführt. Diese beiden Anforderungen sind entgegengesetzt und können nur als Kompromiss realisiert werden. Für die Auswahl eines geeigneten Kanals wurden daher verschiedene Konzepte erarbeitet: Die Geometrie des Kanals hat einen entscheidenden Einfluss auf die Strömung. In Bakker [84] variieren die Geometrie und die Höhe des Kanals für die Untersuchung der mikrofluidischen Spaltströmung. Des Weiteren kann sowohl durch das Einbringen von Säulen oder Mischerstrukturen in den Fluss als auch durch eine Nanostrukturierung der Decke oder der Wände die Verteilung des Analyten in der Strömung verbessert werden. Für die Auswahl eines geeigneten Layouts wurden daher verschiedene Varianten simuliert, unter anderem ein ovaler Kanal und ein sich stetig aufweitender Kanal. Die Simulation der Kanäle, die mit den definierten Anforderungen konform sind, werden in Abbildung 6.6 dargestellt: Dabei handelt es sich um einen Kanal mit trapezförmigem Einlaufbereich (Abbildung 6.6a), einen Kanal mit rechteckiger Geometrie (Abbildung 6.6b), der die inkubierte Fläche maximiert, und einen Kanal mit einer Säulenstruktur (Abbildung 6.6c). Diese Säulen sollen die hohe Einlaufgeschwindigkeit für eine homogene Inkubation verringern, nach der Struktur. Die Geschwindigkeitsverteilung am Einlass der Kanäle ist in Abbildung 6.6 dargestellt.

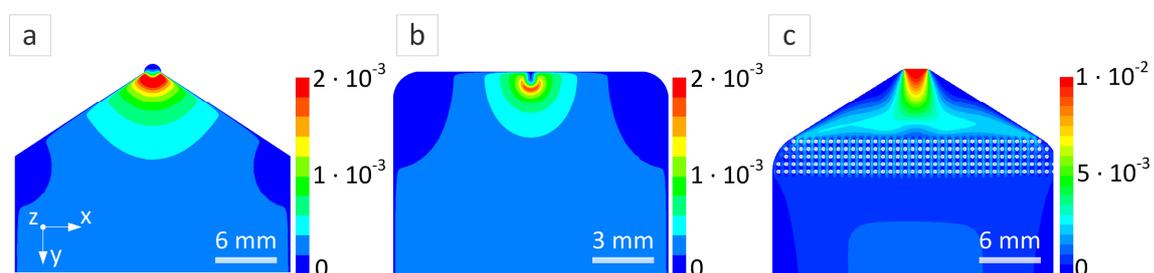


Abbildung 6.6 Simulation der Geschwindigkeitsverteilung am Einlass in der Mitte der Kanäle. Die Geschwindigkeit ist dabei in m/s angegeben. a) zeigt einen Kanal mit dreieckigem Geometrie-Einlaufprofil. b) stellt den flächenmaximierten Kanal dar. In den abgerundeten Ecken sind die Geschwindigkeiten gering, sodass die Inkubation in diesen Bereichen langsamer abläuft. c) zeigt einen Kanal mit Säulenstrukturen. Der Geschwindigkeitsgradient am Einlauf wird durch die Säulenstruktur stark verringert. Nach den Strukturen stellen sich ähnliche Geschwindigkeitsprofile ein.

Aus der Simulation geht hervor, dass sich in allen Kanälen ein parabolisches Strömungsprofil entlang der Strömungsachse ausbildet. Aufgrund der Spaltströmung flacht jedoch das parabolische Profil innerhalb weniger Millimeter von der Wand stark ab. Dies führt zu geringen Geschwindigkeitsgradienten in diesem Bereich und entspricht somit den Anforderungen an die Homogenität der Inkubation. Im Bereich des Einlasses und Auslasses kommt es jedoch zu einem großen Geschwindigkeitsgradienten, daher sind diese Bereiche für die Inkubation nicht geeignet. Eine Verbesserung der Homogenität der Geschwindigkeitsverteilung durch das Einbringen von „Wellenbrechern“ bestehend aus Säulenstrukturen (Abbildung 6.6c) konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch können Antikörper während der Inkubation an den Säulenstrukturen adhären und den Prozess negativ beeinflussen. Aufgrund der Ergebnisse der Simulation wurden Kanal a und Kanal b für die Messung der Geschwindigkeit ausgewählt.

6.8.2 Charakterisierung der Geschwindigkeitsprofile

Ausgehend von der Simulation der Strömung wurden zwei mikrofluidische Kanäle mit unterschiedlicher Geometrie und Fläche ausgesucht und hergestellt (Abbildung 6.7). Diese werden im Folgenden miteinander verglichen.

Die Messung der Geschwindigkeit in den Kanälen mit μ PIV ist aufwendig, für einen Messpunkt mit einer Fläche $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ werden circa 500 Bilder aufgenommen. Anstatt den kompletten Kanal zu vermessen, wurden daher mehrere signifikante Punkte A – F in Abbildung 6.7 im Kanal ausgewählt und über die halbe Kanalbreite vermessen.

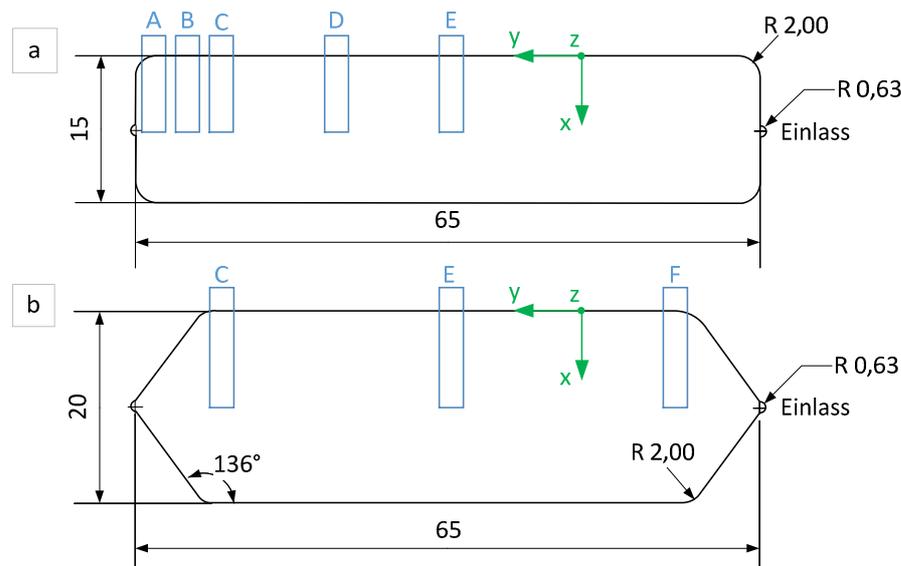


Abbildung 6.7 Draufsicht der verwendeten Kanäle. a) Flächenoptimierter Kanal, bei dem die rechteckige Geometrie möglichst viel Peptidarrayoberfläche abdeckt. b) Strömungsoptimierter Kanal. Die Geschwindigkeitsverteilung wurde an den Positionen A – F und C – F entlang der Koordinate x gemessen. Die Maße sind in mm angegeben.

Diese Stellen A – F bzw. C – F eignen sich gut für die Charakterisierung, da man signifikante Unterschiede im Geschwindigkeitsprofil erwartet.

Flächenoptimierter Kanal

Für den Flächenoptimierter Kanal wurden an den Positionen A – E Geschwindigkeitsprofile (vergleiche Abbildung 6.7) gemessen. Dabei wurde das Geschwindigkeitsprofil senkrecht zur Strömungsrichtung entlang der x-Koordinate aus Abbildung 6.7, in einer Höhe von 30 μm zum Boden des Kanals aufgenommen.

Während an den Positionen C – F für eine Spaltströmung typische ‚Geschwindigkeitsverläufe‘ gemessen wurden, weicht das Ergebnis in der Nähe des Auslasses an den Positionen A, B jedoch stark ab. Im Bereich bis 3,5 mm wurden geringe Geschwindigkeiten gemessen, jedoch erhöht sich die Geschwindigkeit in der Mitte des Kanals signifikant. Dies lässt sich durch die Geometrie des Kanals erklären. Anhang D zeigt das Geschwindigkeitsfeld für den Flächenoptimierter Kanal. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden die Geschwindigkeiten normiert und zeigen die Richtung des Flusses auf. In den Ecken des Kanals treten geometriebedingte Wirbel auf. Diese haben Einfluss auf das Geschwindigkeitsprofil. Die hohen Geschwindigkeiten an Position A in Abbildung 6.8 sind durch eine Strömungsquerschnittsreduzierung von der vollen Kanalbreite auf 0,25 mm am Auslass bedingt.

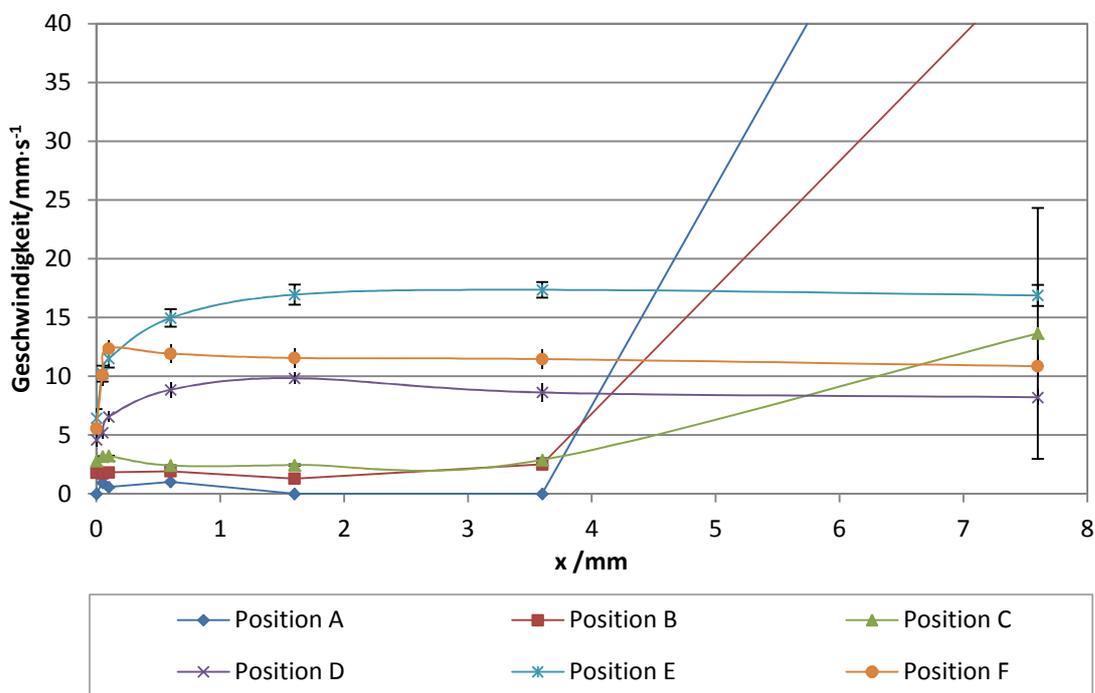


Abbildung 6.8 Geschwindigkeitsverteilung über die halbe Kanalbreite an den Stellen A – F entsprechend Abbildung 6.7a Die hohen Geschwindigkeiten an der Position A, B sind durch die Reduzierung des Strömungsquerschnitts am Auslass bedingt.

Strömungsoptimierter Kanal

Der Geschwindigkeitsverlauf im strömungsoptimierten Kanal ist in Abbildung 6.9 gezeigt. Die Ergebnisse sind im Bereich 0–1 mm mit der Theorie und der entsprechenden Simulation im Einklang. Deutlich ist das parabolische Profil der Strömung in der fluiddynamischen Grenzschicht an der Wand zu erkennen. Das Geschwindigkeitsprofil zwischen 0–2 mm Abstand von der Wand lässt sich mit der Verformung des Deckels und dem dadurch ungleichmäßigen Strömungsquerschnitt erklären. In Fischer [82] wurden zu diesem Phänomen weitere Versuche durchgeführt: Eine Visualisierung mittels Farbstoff bestätigte die gemessenen Geschwindigkeitsprofile.

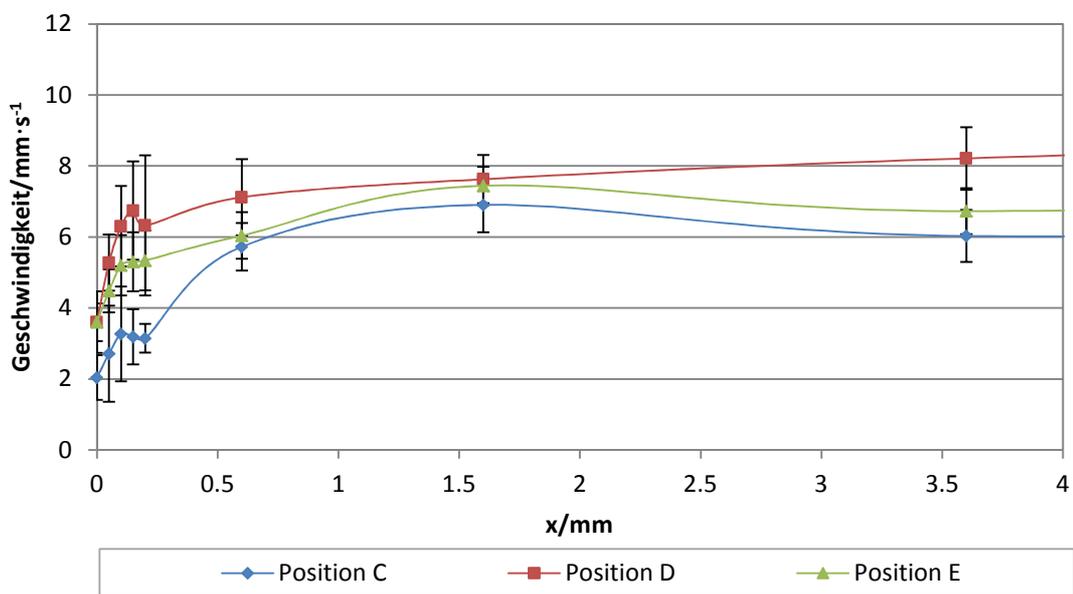


Abbildung 6.9 Geschwindigkeitsdarstellung quer zur Flussrichtung

Aus den Messungen folgt: Der strömungsoptimierten Kanal weist eine größere Homogenität der Geschwindigkeitsverteilung auf und ist für eine homogene Inkubation besser geeignet. Aufgrund der Strömungsverteilung im flächenoptimierten Kanal ist eine Inkubation mit Antikörpern bei geringer Konzentration nicht erfolversprechend.

Messungen mit μ APTV

Um die Ergebnisse für den strömungsoptimierten Kanal zu validieren, wurden 3-dimensionale Messungen mit dem μ APTV-Verfahren durchgeführt. Diese wurden in Kooperation mit dem Institut für Strömungsmechanik und Aerodynamik an der Universität der Bundeswehr München aufgenommen (vergleiche Abbildung 6.10). Dabei konnte die Strömungsverteilung im Kanalquerschnitt bestätigt werden. Der Verlauf der Geschwindigkeit lässt sich mit den μ PIV Messung korrelieren.

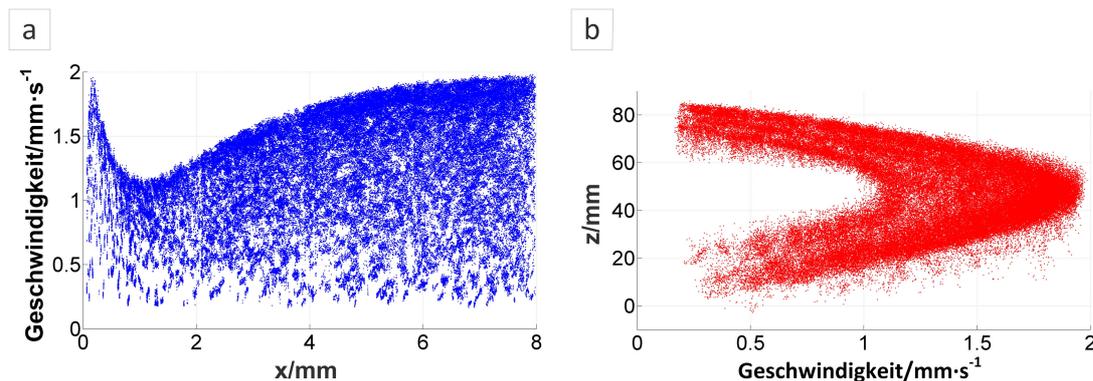


Abbildung 6.10 Messung der Geschwindigkeitsprofile im Kanal an der Stelle E. a) zeigt die Verteilung quer zur Strömungsrichtung entlang des halben Kanalquerschnittes. b) stellt die Verteilung der Geschwindigkeit in der Höhe entlang der Strömungsrichtung dar.

Während im Bereich ab 2 mm sich die Messung gut mit der Theorie deckt, sind signifikante Unterschiede im Bereich 0 – 2 mm erkennbar. Wie bereits in den μPIV Messungen erkennbar, hat auch die mit μAPT gemessene Geschwindigkeitsverteilung an dieser Stelle ein lokales Minimum und steigt dann wieder an. Die hohe Geschwindigkeit in der Nähe der Wand (vergleiche Abbildung 6.10a) ist auf Höhenunterschiede des Deckels im Randbereich zurückzuführen. Aufgrund der Messmethode, die ein 3-dimensionales Strömungsfeld liefert, konnte zudem das Geschwindigkeitsfeld entlang der z-Achse (vergleiche Abbildung 6.7) bestimmt werden. Dieses zeigt in der Mitte des Kanals eine typische parabolische Verteilung (Abbildung 6.10b).

Um die Verformung des Deckels im Bereich 0 – 2 mm Abstand von der Wand zu quantifizieren wurde der Strömungsquerschnitt und Volumen des strömungsoptimierten Kanals nach der Montage des Kanals bestimmt.

Strömungsquerschnitt und Volumen des strömungsoptimierten Kanals

Für die Inkubation ist das Volumen des Kanals wichtig. Je nach Inkubationsstrategie (alternierende Flussrichtung oder gleichförmiger Fluss des Analyten über die Oberfläche) muss die Menge an Analyt angepasst werden. Die Höhe des Kanals beträgt im nicht montierten Zustand $250\ \mu\text{m}$. Durch die Montage wird der PDMS Kanal auf eine durchschnittliche Höhe von $120\ \mu\text{m}$ komprimiert, um die Dichtigkeit des Systems zu gewährleisten. Dabei wurde der Kanal dreimal montiert und die Abweichung berechnet (siehe Abbildung 6.11), um die Verformung des Deckels im Bereich 0 – 2 mm Abstand von der Wand zu quantifizieren. Bei der Messung der Kanalhöhe über die Kanalbreite fiel eine Veränderung des Querschnitts von bis zu $50\ \mu\text{m}$ auf. Dies ist durch den Austausch einer Feder und somit durch eine ungleichmäßige Verteilung der Anpresskräfte im mikrofluidischen Aufbau zu erklären. Der Anstieg der Kanalhöhe im Bereich 18 – 20 mm ist für die bereits erwähnte Veränderung des Geschwindigkeitsprofils verantwortlich: Aufgrund des größeren Fließquerschnittes kommt es zu höheren Geschwindigkeiten des Fluids.

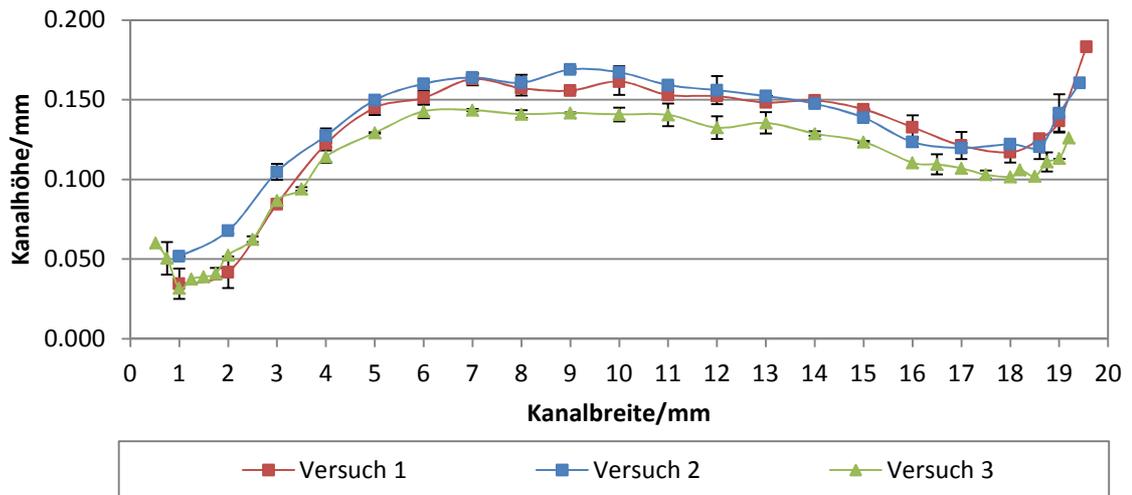


Abbildung 6.11 Höhe des Kanals. Der Kanal wurde in drei Versuchen neu montiert und die Höhe wurde mit dem Mikroskop über die Fokusslage vermessen.

Für die weiteren Versuche zur Inkubation ist die lokale Änderung des Geschwindigkeitsprofils interessant, da man einen möglichen Einfluss des Massetransports der Antikörper auf das Inkubationsergebnis erkennen kann. Unter Berücksichtigung dieses Effektes können aus den Messungen daher zusätzliche Erkenntnisse gezogen werden. Des Weiteren ist neben der Höhe für die Inkubation auch das Volumen des Kanals im montierten Zustand wichtig: Das Volumen beträgt $180 \mu\text{l} \pm 16 \mu\text{l}$.

6.8.3 Vergleich der Flussrichtungen mit dem Biotin/Streptavidin System

Für die Untersuchung des Einflusses der Strömungsverhältnisse im strömungsoptimierten Kanal auf die Inkubation wurden Biotin-Oberflächen mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubiert, da sich dieses Modellsystem im Vergleich zu Peptidarrays besser für die Charakterisierung eignet.

Tabelle 6-1 Parameter der Inkubationsexperimente.

	Art der Inkubation	Parameter der Inkubation	Inkubationszeit
a)	kontinuierlich	$\dot{V} = 150 \mu\text{l}/\text{min}$,	20 min
b)	kontinuierlich	$\dot{V} = 400 \mu\text{l}/\text{min}$,	20 min
c)	symmetrisch alternierend	$V_{\text{Ansaug}} = 400 \mu\text{l}$, $\dot{V} = 600 \mu\text{l}/\text{min}$, $V_{\text{Alternierend}} = 200 \mu\text{l}$	25 min
d)	asymmetrisch alternierend	$V_{\text{Ansaug}} = 500 \mu\text{l}$, $\dot{V} = 800 \mu\text{l}/\text{min}$ $V_{\text{Ein}} = 400 \mu\text{l}$ $V_{\text{Aus}} = 200 \mu\text{l}$	25 min

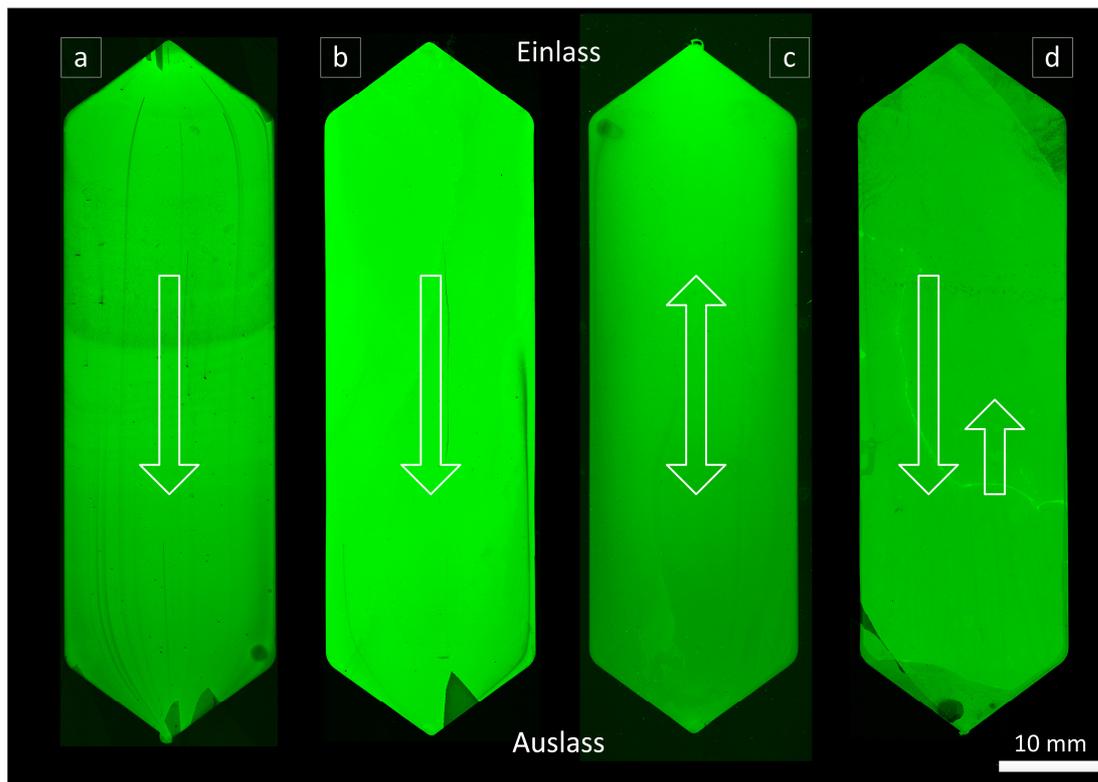


Abbildung 6.12: Mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubierte flächige Biotin-Oberflächen a) und b) wurden symmetrisch inkubiert mit unterschiedlicher Flussrate. c) wurde symmetrisch inkubiert. d) wurde asymmetrisch alternierend inkubiert bei gleicher Inkubationszeit (nach [82]).

Dabei wurden drei Inkubationsszenarien verglichen: Bei der symmetrischen Inkubation wurde der Analyt auf dem Träger vor- und zurückgepumpt, während bei der asymmetrischen Inkubation durch eine geringere Menge an zurückgepumpten Analyten eine Vorzugsrichtung über den Träger entstand. Bei der kontinuierlichen Inkubation wurden die Träger immer aus derselben Richtung überströmt. Die Parameter sind in Tabelle 6-1 dargestellt. Nach der Inkubation der großflächigen Biotinoberflächen mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin wurden die Oberflächen mit dem Genepix-4000B-Fluoreszenzscanner (Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riss) gescannt. Die resultierenden Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 6.12 gezeigt. Die dunkelgrünen Bereiche des Arrays beruhen auf im Kanal eingeschlossenen Luftblasen, die die Inkubation der Biotin-Oberfläche mit der Lösung verhinderten. Scharfe Kanten in der Intensität sind durch Unregelmäßigkeiten bei der Herstellung der Oberflächen bedingt. Die Spuren in Abbildung 6.12a sind vermutlich auf Partikel zurückzuführen, die in der Inkubationslösung dispergiert wurden.

Anhand der Intensitätsverteilung in den Fluoreszenzbildern in Abbildung 6.12 lässt sich eine Aussage über die drei Inkubationsstrategien treffen: Auffällig ist der stark ausgeprägte Intensitätsgradient der symmetrisch alternierenden Inkubation zwischen Ein- und Auslass (Abbildung 6.12c). Dies ist bedingt durch eine

Vermischung der Inkubationslösung mit der Systemflüssigkeit hinter dem Auslass und führt zu einer geringeren Bindung. Dieser Effekt ließe sich durch die Verwendung eines größeren Probenvolumens verringern. Der asymmetrisch alternierende Fluss weist im Vergleich zum kontinuierlichen Fluss, bei einem deutlich kleineren Probenvolumen, ein qualitativ gleichwertiges Ergebnis auf. Jedoch ist für eine analytische Beschreibung des Bindungsprozesses der kontinuierliche Fluss besser geeignet.

Eine Bewertung der Ergebnisse basierend auf den Fluoreszenzintensitäten zwischen „asymmetrisch alternierend“ und „kontinuierlich“ ist anhand der Fluoreszenzbilder schwer möglich. Daher wurde eine Bindungskurve (Menge, des an der Oberfläche gebundenem Streptavidin pro Zeit) aufgenommen (siehe Abbildung 6.13).

Die Streptavidinkonzentration betrug jeweils $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der kontinuierliche Fluss betrug $400 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Inkubationsparameter des asymmetrisch alternierenden Flusses betragen $V_{\text{Ansaug}} = 500 \mu\text{l}$, $\dot{V} = 800 \mu\text{l}/\text{min}$, $V_{\text{Ein}} = 400 \mu\text{l}$, $V_{\text{Aus}} = 200 \mu\text{l}$. Der in Abbildung 6.13 gezeigte Verlauf der mittleren Grauwerte kann als Messung des Bindungsprozesses der fluoreszenzmarkierten Streptavidinmoleküle interpretiert werden. Die Bindung der Moleküle geht nach 22 min bei der Inkubation mit kontinuierlichem Fluss in Sättigung, während bei der Inkubation mit dem asymmetrisch alternierenden Fluss die Bindung langsamer abläuft (mit einer geringeren Steigung der Messkurve). Daher wurde für die nachfolgenden Experimente die Inkubation mit kontinuierlichem Fluss ausgewählt.

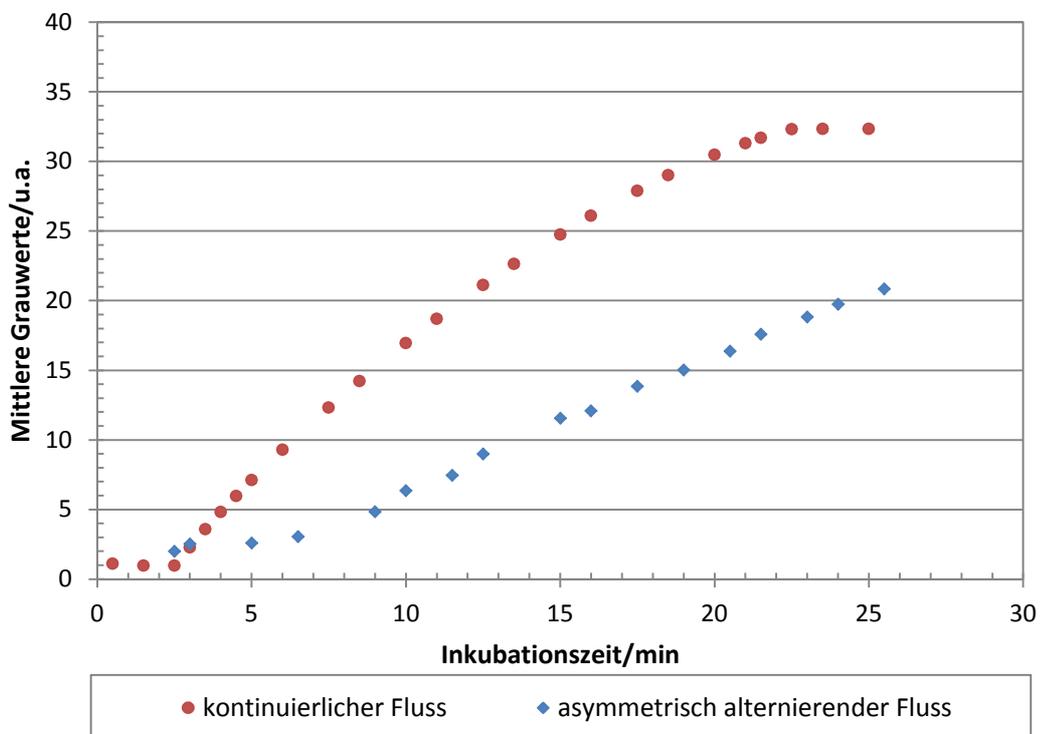


Abbildung 6.13: Mittlere Grauwerte über die Inkubationszeit zweier mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin-inkubierten Biotin-Oberflächen. [82]

6.8.4 Vergleich der Mikrofluidischen Inkubation mit dem Stand der Technik

Die Standardmethode für die Inkubation von hochdichten Peptidmicroarrays ist die Verwendung des PEPperCHIP-Inkubation-Tray. Dabei wird auf dem Peptidmicroarray eine Kavität montiert, in die die Inkubationslösung pipettiert wird. Die Kavität wird anschließend auf dem Schüttler bewegt. Neben dem hohen Verbrauch an Analyt und der möglichen Verdunstung von Lösung während des Prozesses erfordert diese Methode eine große Anzahl an manuellen Pipettierschritten (mehr als 20 Vorgänge), bei einer Zeitdauer des Experiments von bis zu 8 Stunden. In diesem Abschnitt soll die in der Arbeit entwickelte vollautomatisierte Inkubationskammer mit der Standardmethode verglichen werden. Neben den deutlichen Vorteilen bei dem experimentellen Arbeitsaufwand sind der Verbrauch an Analyt, die Inkubationsdauer und die Ergebnisse der Inkubation interessant. Dabei sind die Parameter der Herstellung und Inkubation in Anhang A beschrieben. Bei den verwendeten Arrays in Abbildung 6.14b und Abbildung 6.14d handelt es sich um Peptidarrays mit dem sogenannten FLAG-Peptid, einem der Standardpeptide zur Klassifizierung der Peptidarrays.

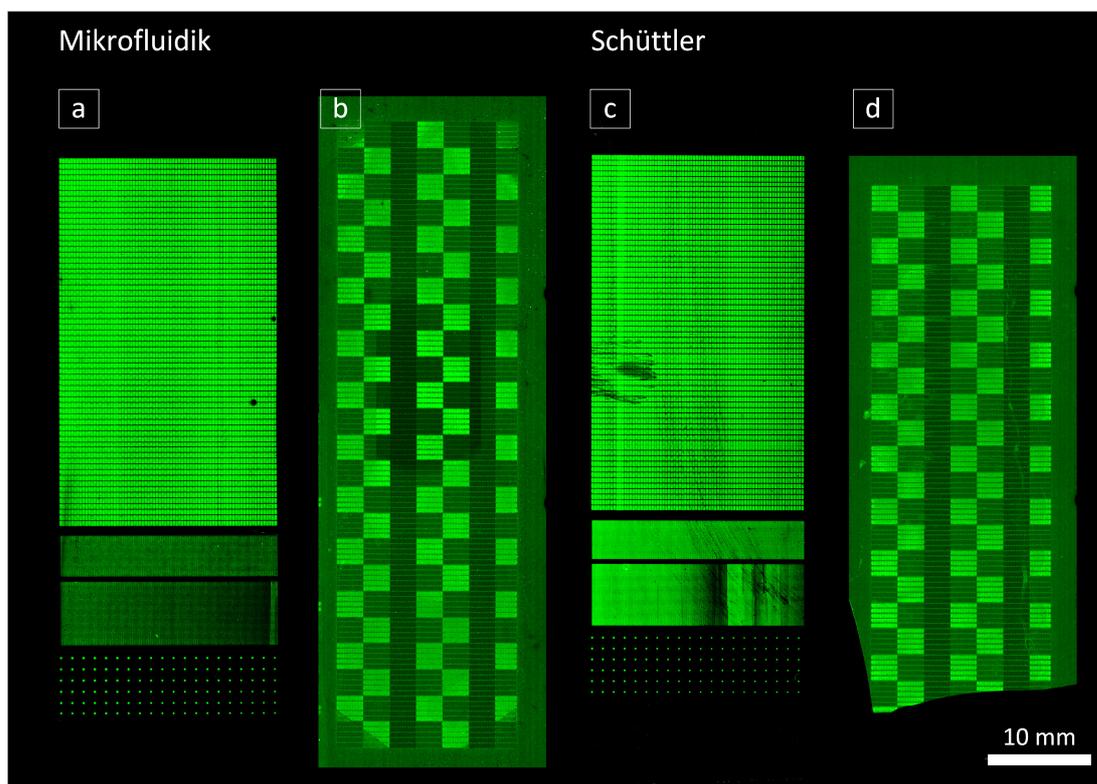


Abbildung 6.14 Fluoreszenzbild der inkubierten Arrays. Dabei wurde in der mikrofluidischen Kammer a) ein Biotin-Array und in b) ein FLAG-Peptidarray inkubiert. Die Inkubation eines c) Biotin-Arrays und d) eines Peptidarrays erfolgte mit der Standardmethode auf dem Schüttler. b) – d) wurden mit der gleichen Intensität gescannt, bei a) wurde die Intensität verringert, um den Kontrast zu erhöhen.

Tabelle 6-2 Parameter der Inkubationsexperimente.

	Art der Inkubation	Probenvolumen	Inkubationszeit
Biotin-Array	kontinuierlicher Fluss $\dot{V} = 600 \mu\text{l}/\text{min}$	12 mL Puffer 2,4 μl Streptavidin	35 min
FLAG-Peptidarray	kontinuierlicher Fluss $\dot{V} = 600 \mu\text{l}/\text{min}$	40,5 mL Puffer 9 μL anti FLAG	65 min
Biotin-Array	Schüttler	15 ml Puffer 3 μl Streptavidin	60 min
FLAG-Peptidarray	Schüttler	15 mL Puffer 3 μL anti FLAG	60 min

Der Kratzer bei Abbildung 6.14c am Rand ist bedingt durch das Handling des Arrays. Es hat sich gezeigt, dass die Experimente bezüglich der gescannten Ergebnisse vergleichbar sind. Sowohl bei der Homogenität als auch bei der Intensität der gescannten Arrays erzielt die mikrofluidische Inkubationskammer im Vergleich zur Standardmethode vergleichbare Ergebnisse. Bei den Biotinarrays ist die Homogenität bei vergleichbarem Fluoreszenzsignal besser. Abbildung 6.14a wurde mit einer geringeren Intensität gescannt, um einen höheren Kontrast zu erzielen. Wie in Abbildung 6.15 gezeigt ging die Intensität des Fluoreszenzsignals in Sättigung und ist daher mit Abbildung 6.14c vergleichbar. Tabelle 6-2 zeigt die Inkubationsparameter.

Neben der Signalintensität sind die Inkubationszeit und der Verbrauch von Analyt ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung der mikrofluidischen Inkubationskammer. Wie in Tabelle 6-2 dargestellt ist der Verbrauch und die Inkubationszeit beim Versuch mit dem FLAG-Peptidarray höher. Das ist daher bedingt, da die Vorversuche und die Optimierung der Inkubation mit dem Biotin-Streptavidin-System geschahen. Durch weitere Optimierungsschritte können diese Werte deutlich verbessert werden. Bei dem Biotin-Streptavidin-System konnten die Menge an Analyt bei der mikrofluidischen Inkubationskammer im Vergleich zur Standardmethode um 20 % und die Inkubationszeit um 42 % gesenkt werden. Des Weiteren lässt sich durch die Wahl der Inkubationsstrategie, beispielsweise asymmetrisch alternierend, der Verbrauch an Analyt deutlich senken, wodurch jedoch die Inkubationszeit steigt.

6.8.5 Aufnahmen einer Bindungskonstante

Neben den Ergebnissen der Inkubation kann mit der entwickelten Anlage eine In-Prozess-Messung der Bindung erfolgen. Dafür wurde die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin an die Spots des Biotinarrays aus Abbildung 6.14a und von fluoreszenzmarkierten Anti-FLAG-Antikörpern an die Spots des Peptidarrays aus Abbildung 6.14b aufgenommen.

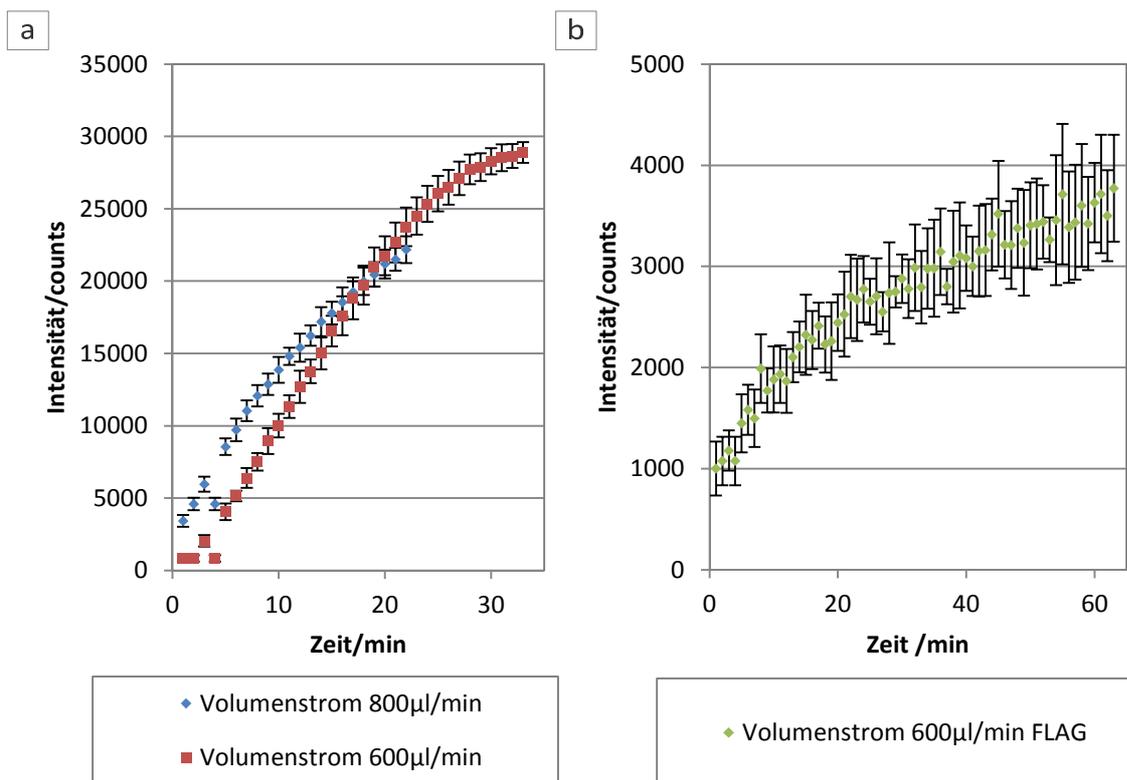


Abbildung 6.15 Aufnahme eines Bindungsprozesses a) von Streptavidin auf einer Biotin-Oberfläche. b) der fluoreszenzmarkierte Antikörper bindet an das FLAG-Peptid des Peptidarrays.

Der in Abbildung 6.15a gezeigte Verlauf der Streptavidin-Bindung läuft im Vergleich mit dem in Abbildung 6.15b gezeigten Bindungssignal des Anti-FLAG-Antikörpers schneller ab und besitzt eine höhere Signalintensität. Das lässt sich durch eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen des Biotin-Streptavidin-Systems mit einer Bindungskonstante von $K_d = 10^{-15}$ M erklären [85].

6.8.6 Einfluss der Geschwindigkeit auf das Färberegebnis

Aufgrund der stark unterschiedlichen Geschwindigkeiten an einer der Wände ist es von Interesse, den Effekt auf das Inkubationsergebnis zu betrachten.

Wie bereits in Kapitel 6.2 beschrieben, ist die Bindung abhängig von der Diffusion des Analyten an die Oberfläche und die eigentliche Bindungskinetik. Die Bindungskinetik des Biotin-Streptavidin-Systems ist auf der gesamten Oberfläche identisch, es unterscheidet sich jedoch die Massentransportkonstante, die in Formel 6.6 definiert ist. Sowohl durch eine starke Verringerung der Geschwindigkeit und der Höhe der Kammer als auch durch die lange Einlauflänge nimmt die Massentransportkonstante entlang der Strömungsrichtung ab, sodass im roten Bereich die Reaktion diffusionsbeschränkt ist (siehe Abbildung 6.17). Dies lässt sich in Zukunft nutzen, um die Bindung von unbekanntem Analyten besser zu verstehen.

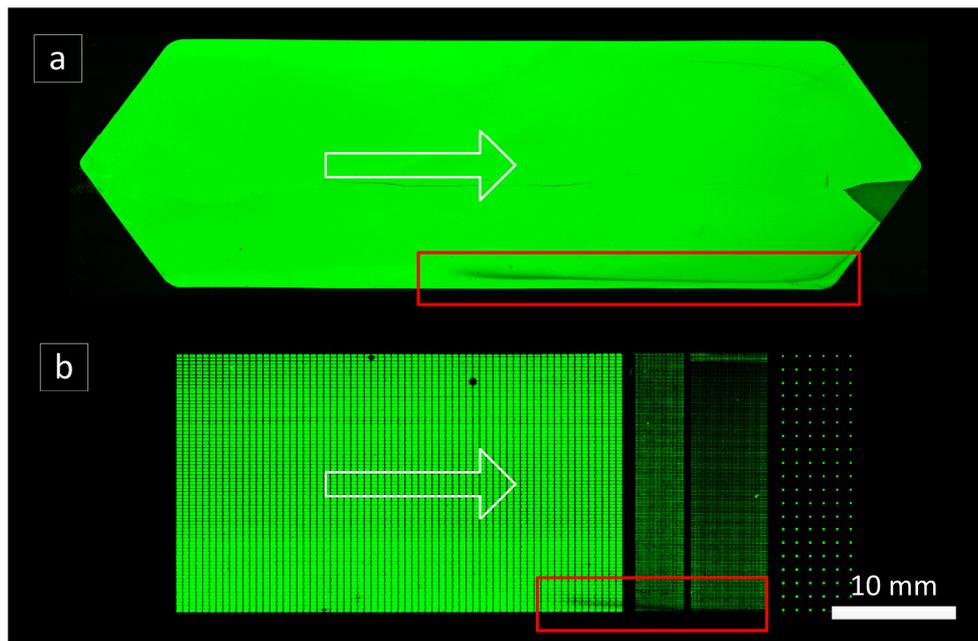


Abbildung 6.16 Auswirkung der Strömungsunterschiede auf das Inkubationsergebnis. a) bei einem Biotinarray, b) bei einer Biotin-Oberfläche. Aufgrund der Strömungsgeschwindigkeitsverteilung sind die rot markierten Abschnitte diffusionsbeschränkt.

6.9 Diskussion

Für die Inkubation von Peptidmicroarrays wurde in diesem Kapitel ein Prozess entwickelt, der basierend auf einer mikrofluidischen Kammer eine gleichmäßige Inkubation über die komplette Fläche des Peptidarrays ermöglicht.

Es existieren bereits Lösungen, mit denen man entweder einen kompletten Glasobjektträger inkubieren kann oder eine In-Prozess-Messung der Bindung auf kleiner Fläche möglich ist. Die Kombination der beiden Aspekte ist eine Neuentwicklung. Daher wurde vor der Fertigung für unterschiedliche Geometrien der mikrofluidischen Kammern die Geschwindigkeitsverteilung simuliert.

Für zwei ausgewählte Kammern wurde dann das Strömungsfeld gemessen: Mit dem System konnte eine weitgehend homogene Strömung über die ganze Fläche erreicht werden. Ausgehend von einer ungleichmäßig verteilten Anpresskraft ergab sich eine ungleiche Strömungsverteilung an der Wand der Kammer. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Strömungsgradient einen Einfluss auf die Inkubation hat. Dieser kann nun genutzt werden, um den Charakter von neuartigen Peptid-Antikörper-Bindungen über das bisher bekannte Maß zu ermitteln.

Im Vergleich zur Standardmethode der Inkubation auf einem Schüttler hat sich gezeigt, dass die Routinearbeit von bis zu 8 Stunden mit einer Vielzahl von manuellen Pipettierschritten eingespart werden kann. Bei dem Biotin-Streptavidin-System konnten die Menge an Analyt bei der mikrofluidischen Inkubationskammer im Vergleich zur Standardmethode um 20 % und die Inkubationszeit mit dem Erstantikörper um 42 % gesenkt werden. Dies ist ein Optimierungsprozess, bei dem durch die Wahl der Inkubationsstrategie, beispielsweise „asymmetrisch alternierend“, der Verbrauch an Analyt oder die Inkubationszeit gesenkt werden können.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von reproduzierbaren Prozessen dargestellt, die eine automatisierte Herstellung und eine standardisierte Nutzung von ultra-hochdichten Peptidmicroarrays in Assays ermöglichen. Die Möglichkeiten, die sich aus einer gemeinsamen Technologie von Herstellung, Aufreinigung und standardisierter Inkubation von Peptidmicroarrays ergeben, sind vielfältig. Eine solche Plattform ermöglicht die Erforschung der Wirkprinzipien von Krankheiten, beispielsweise Malaria oder Hepatitis, und ermöglicht die Entwicklung neuartiger Therapien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beschichtung von Glasobjektträgern mit Aminosäurepartikeln entwickelt, um die Herstellung von ultra-hochdichten Peptidmicroarrays mit dem Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahren zu ermöglichen. Der Prozess ist eine Neuentwicklung: Nach der Erforschung des Wirkprinzips und dem Bau mehrerer Prototypen konnte eine vollständig automatisierte Anlage entwickelt werden. Die hergestellten Schichten wurden dann hinsichtlich der definierten Zielgrößen charakterisiert. Die Homogenität der Schicht ist hoch, während die Reproduzierbarkeit der Schichten noch verbessert werden kann. Diese ist durch die Aufladung der Partikel bedingt, die von der Temperatur und der relativen Luftfeuchte abhängt. Trotzdem konnten Schichten in einem Bereich von 15 μm bis 70 μm definiert aufgebracht werden. Diese hatten eine hohe Homogenität mit einer geringen Anzahl von Agglomeraten. Durch die Herstellung eines ultrahochdichten Peptidmicroarrays mit einer Dichte von 320.000 Peptidspots pro Objektträger konnte die Beschichtungsmethode erfolgreich validiert werden. Zudem stellte sich heraus, dass die Beschichtung sehr flexibel einsetzbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine große Bandbreite von Partikeln und Substraten verwendet werden kann. Dazu zählen Gold- oder Silizium-Wafer, aber auch PDMS oder Papier. Die möglichen Partikel reichen von Titandioxid für die Herstellung von organischen Solarzellen bis zu amino-funktionalisierten Polystyrol-Beads für die Oberflächenfunktionalisierung.

Es wurde ein Prozess entwickelt, um die Peptidmicroarrays nach der Syntheseoberfläche auf eine Zieloberfläche zu transferieren. Neben der dadurch erzielten Aufreinigung im Arrayformat ermöglicht der Transfer auf Sensoroberflächen neue Assays, beispielsweise Screenings nach dem Übertrag des Peptidmicroarrays auf einen CMOS-Chips oder die Untersuchung von katalytischen Aktivitäten auf Polymermembranen. Da für einen gleichmäßigen Übertrag die Planparallelität und der Abstand der Flächen zueinander von entscheidender Bedeutung sind, sind zwei Strategien denkbar: die Einstellung eines Abstandes zwischen den Trägern mit einem Übertrag durch Diffusion der Peptide (der sogenannte positionsgesteuerte Übertrag) oder ein Transfer durch das Anpressen beider Oberflächen (kraftgesteuerter Übertrag).

Der positionsgesteuerte Übertrag ist vor allem für sensible Zieloberflächen geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Machbarkeit des Ansatzes durch den Übertrag eines Arrays mit Rhodaminfarbstoff auf einen Array mit Flüssigkeitstropfen erfolgreich demonstriert. Im nächsten Schritt sollen nun Peptidarrays übertragen werden. Neben der Messung des Abstandes zwischen den Oberflächen wurde auch die Transferrate des Übertrags bestimmt. Bei einer Verringerung der Spotgröße ergibt sich aufgrund des manuellen Betriebs der Anlage ein Optimierungsbedarf hinsichtlich der planparallelen Ausrichtung und der lateralen Positionierung, sodass zurzeit ein zweiter automatisierter Prototyp entwickelt wird. Der kraftgesteuerte Übertrag ist vollautomatisiert. Das zusätzliche Positioniermodul aus Kamera und Prisma erlaubt eine Positionierung für den punktgenauen Transfer, beispielsweise auf die Pixel eines CMOS-Screening-Chips. Zudem ist, bedingt durch die Eigenschaften des Übertrags, die standardisierte Herstellung von bis zu 20 Replika mit der automatisierten Anlage möglich.

Nach der Herstellung und der Aufreinigung werden die Peptidmicroarrays je nach Anwendungen mit unterschiedlichen Analyten inkubiert. In der Dissertation wurde daher eine mikrofluidische Inkubationskammer entwickelt, die vollautomatisiert eine Inkubation über die Steuerung der fluidischen Komponenten (Pumpe, Ventile) durchführt. Das Herzstück der Anlage stellt dabei ein mikrofluidischer Kanal dar. Der Fluss des Analyten durch den Kanal soll für eine homogene Inkubation möglichst gleichmäßig (sowohl örtlich als auch zeitlich) erfolgen. In der Arbeit wurden daher verschiedene Geometrien über ANSYS-Simulationen und anschließende Messungen der Geschwindigkeit miteinander verglichen: Große Teile des Kanals entsprechen den Anforderungen und ermöglichen eine homogene Inkubation. Über einen Vergleich mit einer etablierten Methode zur Inkubation auf einem Schüttler konnte zudem gezeigt werden, dass die Inkubation in der Mikrofluidik sowohl schneller als auch mit einem geringeren Verbrauch an Analyt durchgeführt werden kann. Parallel zur Inkubation wurde über das integrierte optische System eine Bindungskinetik aufgenommen. Neben der Prozesskontrolle kann das Signal auch für eine Berechnung der Affinität genutzt werden. Für das Biotin-Streptavidin-System und den FLAG-Antikörper konnten in einer Machbarkeitsstudie derartige Bindungskinetiken aufgenommen werden. Zukünftig soll statt der verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper Blutserum von Patienten genutzt werden, die dann markierungsfrei ausgelesen werden sollen.

Diese drei in der Arbeit entwickelten Technologien ermöglichen es, völlig neue Forschungsgebiete zu erschließen: Für die Erforschung von Krankheiten, beispielsweise Malaria, könnte das gesamte menschliche Proteom aus überlappenden Peptiden synthetisiert werden. Dazu sind ca. 4 Millionen Peptide notwendig. Sowohl durch die Vergrößerung der Spotdichte von 800 auf 40.000 Peptide pro cm^2 mit dem Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahren als auch durch die Möglichkeit, mit der automatisierten Anlage bis zu 20 Replika eines Arrays herzustellen, wird ein wichtiger Schritt in diese Richtung geleistet. Des Weiteren ermöglicht die automatisierte Inkubationskammer die schnelle und effiziente Auswertung der Ergebnisse, sodass eine hohe Anzahl an Experimenten standardisiert erfolgen kann.

Literaturverzeichnis

1. Collins, F.S., M. Morgan, and A. Patrinos, *The Human Genome Project: lessons from large-scale biology*. Science, 2003. **300**(5617): p. 286-290.
2. Weston, A.D. and L. Hood, *Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine*. Journal of proteome research, 2004. **3**(2): p. 179-196.
3. European Commission. 2014 [cited 2013 19.04.]; Available from: <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020>.
4. Wang, X., J. Yu, A. Sreekumar, S. Varambally, R. Shen, D. Giacherio, R. Mehra, J.E. Montie, K.J. Pienta, and M.G. Sanda, *Autoantibody signatures in prostate cancer*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(12): p. 1224-1235.
5. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.
6. Baumann, P., *Optimierung der partikelbasierten Festphasensynthese von hochdichten Peptidarrays durch Laser-Fusing Verfahren*, in *Institut für Mikrostrukturtechnik*. Diplomarbeit, 2011, Karlsruhe Institut für Technologie: Karlsruhe.
7. Frank, R., *Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support*. Tetrahedron, 1992. **48**(42): p. 9217-9232.
8. Fodor, S.P., J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, and D. Solas, *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis*. Science, 1991. **251**.
9. Cargill, J.F. and M. Lebl, *New methods in combinatorial chemistry—robotics and parallel synthesis*. Current opinion in chemical biology, 1997. **1**(1): p. 67-71.
10. Nishioka, G.M., *Generation of combinatorial libraries*, Patent, 1995: USA.
11. Buus, S., J. Rockberg, B. Forsström, P. Nilsson, M. Uhlen, and C. Schafer-Nielsen, *High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1790-1800.
12. Märkle, F., F.F. Loeffler, S.M. Schillo, T. Foertsch, B. Muenster, J. Striffler, C. Schirwitz, F.R. Bischoff, F. Breitling, and A. Nesterov-Mueller, *High-Density Peptide Arrays with Combinatorial Laser Fusing*. Advanced Materials, in press.
13. Stadler, V., T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, and M. Hausmann, *Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(37): p. 7132-7135.
14. Beyer, M., A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, and U. Trunk, *Combinatorial synthesis of peptide arrays onto a microchip*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1888-1888.
15. Loeffler, F.F., Y.-C. Cheng, B. Muenster, J. Striffler, F.C. Liu, F.R. Bischoff, E. Doersam, F. Breitling, and A. Nesterov-Mueller, *Printing Peptide Arrays with a Complementary Metal Oxide Semiconductor Chip*, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2013, Springer-Verlag. p. 1-23.
16. Märkle, F., *Kombinatorische Ablagerung von Biopartikeln mit Hilfe von Laserstrahlung*, in *Fakultät für Physik und Astronomie*. Diplomarbeit, 2010, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg.
17. Beyer, M., *Entwicklung und Anwendung neuartiger Trägeroberflächen zur kombinatorischen Peptidsynthese mit Aminosäure-Tonerpartikeln*, Dissertation, 2005, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg.
18. Schirwitz, C., F.F. Loeffler, T. Felgenhauer, V. Stadler, A. Nesterov-Mueller, R. Dahint, F. Breitling, and F.R. Bischoff, *Purification of High-Complexity Peptide Microarrays by Spatially Resolved Array Transfer to Gold-Coated Membranes*. Advanced Materials, 2013.
19. Pahl, G., W. Beitz, J. Feldhusen, and K.-H. Grote, *Pahl/Beitz Konstruktionslehre: Grundlagen erfolgreicher Produktentwicklung. Methoden und Anwendung*. Vol. 10. 2006: Springer DE.

20. VDI-Fachbereich Produktentwicklung und Mechatronik, *VDI 2221—Methodik zum Entwickeln und Konstruieren technischer Systeme und Produkte.* 1993, Düsseldorf: VDI-GPP.
21. Roozenburg, N.F. and J. Eekels, *Product design: fundamentals and methods*. Vol. 2. 1995: Wiley Chichester.
22. Otto, K.N. and K.L. Wood, *Product design: techniques in reverse engineering and new product development*. 2003: Prentice Hall.
23. Muenster, B., *unveröffentlichte Dissertation*, 2014, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
24. Löffler, F., *Staubabscheiden*. 1988: Thieme Stuttgart, Germany.
25. Kruse, R., *Mechanische Verfahrenstechnik: Grundlagen der Flüssigkeitsförderung und der Partikeltechnologie*. 1999: Wiley VCH Verlag GmbH.
26. Stieß, M., *Mechanische Verfahrenstechnik-Partikeltechnologie*. 2009: Springer.
27. Kulkarni, P., P.A. Baron, and K. Willeke, *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. 2011: John Wiley & Sons.
28. Hulteen, J.C. and R.P. Van Duyne, *Nanosphere lithography: A materials general fabrication process for periodic particle array surfaces*. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1995. **13**(3): p. 1553-1558.
29. Hinds, W.C., *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. 2012: John Wiley & Sons.
30. Löffler, F., J. Wagner, K. König, F. Märkle, S. Fernandez, C. Schirwitz, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, and F. Bischoff, *High-precision combinatorial deposition of micro particle patterns on a microelectronic chip*. *Aerosol Science and Technology*, 2011. **45**(1): p. 65-74.
31. Freudigmann, H.A., *Optimierung des Beschichtungsverfahrens zur Herstellung von hochdichten Peptidarrays mittels selektiven Laseranschmelzen*, Diplomarbeit, 2013, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
32. Pietschmann, J., *Industrielle Pulverbeschichtung*. 2009, Wiesbaden: Springer.
33. Mette, A., P. Richter, M. Hörteis, and S. Glunz, *Metal aerosol jet printing for solar cell metallization*. *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, 2007. **15**(7): p. 621-627.
34. Stoltenhoff, T., H. Kreye, and H. Richter, *An analysis of the cold spray process and its coatings*. *Journal of Thermal Spray Technology*, 2002. **11**(4): p. 542-550.
35. Ryu, J., J.J. Choi, B.D. Hahn, D.S. Park, W.H. Yoon, and K.H. Kim, *Fabrication and ferroelectric properties of highly dense lead-free piezoelectric (KNa) NbO thick films by aerosol deposition*. *Applied physics letters*, 2007. **90**: p. 152901.
36. Loeffler, F., C. Schirwitz, J. Wagner, K. Koenig, F. Maerke, G. Torralba, M. Hausmann, F.R. Bischoff, A. Nesterov-Mueller, and F. Breitling, *Biomolecule arrays using functional combinatorial particle patterning on microchips*. *Advanced Functional Materials*, 2012. **22**(12): p. 2503-2508.
37. König, K., I. Block, A. Nesterov, G. Torralba, S. Fernandez, T. Felgenhauer, K. Leibe, C. Schirwitz, F. Löffler, and F. Painke, *Programmable high voltage CMOS chips for particle-based high-density combinatorial peptide synthesis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **147**(2): p. 418-427.
38. Mechatronik, V.-F.P.u., *VDI 2225: Technisch-wirtschaftliches Konstruieren*. Düsseldorf: VDI, 1964.
39. Rupp, P.F., *Entwicklung eines Beschichtungsprozesses für die Strukturierung von Aminosäurepartikeln*, Studienarbeit, 2012, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
40. Ruebel, C., *Automatisierung des Beschichtungsverfahrens zur Herstellung von hochdichten Peptidarrays*, Bachelorarbeit, 2013, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
41. Nesterov, A., F. Löffler, Y.-C. Cheng, G. Torralba, K. König, M. Hausmann, V. Lindenstruth, V. Stadler, F. Bischoff, and F. Breitling, *Characterization of triboelectrically charged particles deposited on dielectric surfaces*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2010. **43**(16): p. 165301.
42. Maerke, F., *Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter Peptidarrays*, Dissertation, 2014, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
43. Bacchewar, P., S. Singhal, and P. Pandey, *Statistical modelling and optimization of surface roughness in the selective laser sintering process*. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture*, 2007. **221**(1): p. 35-52.

44. Foertsch, T., *Simulationen zur ortsgenauen Partikeldeposition mit dem CMOS-Peptid Chip und durch Selective Laser Fusing*, Bachelorarbeit, 2011, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg.
45. Jiao, Y., F.H. Stillinger, and S. Torquato, *Nonuniversality of density and disorder in jammed sphere packings*. Journal of applied physics, 2011. **109**(1): p. 013508.
46. Märkle, F., A. Nesterov-Müller, F.F. Löffler, S. Schillo, K. Leibe, V. Bykovskaya, and C.v. Bojnicic-Kninski, *Verfahren zur kombinatorischen Partikelablagerung zur Herstellung von hochdichten Molekülararrays, insbesondere von Peptidarrays*. Patentanmeldung, 2013.
47. Schillo, S., K.L. Hahn, H.-A. Freudigmann, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling, F. Maerkle, F.F. Loeffler, J. Striffler, B. Muenster, and T. Rupp, *Vorrichtung und Verfahren zur Herstellung von Partikelschichten und deren Verwendung*. Patentanmeldung, 2013.
48. Metzger, S., *Entwicklung einer Bildanalysesoftware zur Qualitätskontrolle von Peptidarrays, unter Verwendung von Neuronalen Netzen und Supportvektormaschinen*, Bachelorarbeit, 2012, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
49. Ueda, E. and P.A. Levkin, *Emerging Applications of Superhydrophilic-Superhydrophobic Micropatterns*. Advanced Materials, 2013.
50. Chen, H. and C. Horváth, *High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins*. Journal of Chromatography A, 1995. **705**(1): p. 3-20.
51. Xia, Y. and G.M. Whitesides, *Soft lithography*. Annual review of materials science, 1998. **28**(1): p. 153-184.
52. Ruiz, S.A. and C.S. Chen, *Microcontact printing: A tool to pattern*. Soft Matter, 2007. **3**(2): p. 168-177.
53. Gupta, N., B.F. Lin, L.M. Campos, M.D. Dimitriou, S.T. Hikita, N.D. Treat, M.V. Tirrell, D.O. Clegg, E.J. Kramer, and C.J. Hawker, *A versatile approach to high-throughput microarrays using thiol-ene chemistry*. Nature Chemistry, 2009. **2**(2): p. 138-145.
54. Geyer, F.L., E. Ueda, U. Liebel, N. Grau, and P.A. Levkin, *Superhydrophobic-Superhydrophilic Micropatterning: Towards Genome-on-a-Chip Cell Microarrays*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(36): p. 8424-8427.
55. Striffler, J., *unveröffentlichte Dissertation*, 2014, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
56. Weisbrodt, J.U., *Entwicklung einer automatisierten Peptidstempelanlage*, Bachelorarbeit, 2012, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
57. Mitik-Dineva, N., J. Wang, V.K. Truong, P. Stoddart, F. Malherbe, R.J. Crawford, and E.P. Ivanova, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness*. Current microbiology, 2009. **58**(3): p. 268-273.
58. Rasband, W. 2004 [cited 2014 02.02]; Available from: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
59. Striffler, J., S. Schillo, C. Schirwitz, L. Hahn, A. Golla, F. Märkle, F. Breitling, and A. Nesterov-Müller, *Verfahren, Vorrichtung und Verwendung zum Übertragen von Molekülararrays*. Patentanmeldung, 2013
60. Coico, R. and G. Sunshine, *Immunology: A Short Course*. 2009: Wiley.
61. Shchepinov, M., S. Case-Green, and E. Southern, *Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(6): p. 1155-1161.
62. Mulisch, M. and U. Welsch, *Romeis Mikroskopische Technik*. 2010: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
63. Liu, A., H. Huang, L. Chin, Y. Yu, and X. Li, *Label-free detection with micro optical fluidic systems (MOFS): a review*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **391**(7): p. 2443-2452.
64. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007. **58**: p. 267-297.
65. Barzen, C., A. Brecht, and G. Gauglitz, *Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control*. Biosensors and Bioelectronics, 2002. **17**(4): p. 289-295.
66. Butler, J.E., *Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays*. Methods, 2000. **22**(1): p. 4-23.

67. Kusnezow, W., Y.V. Syagailo, I. Goychuk, J.D. Hoheisel, and D.G. Wild, *Antibody microarrays: the crucial impact of mass transport on assay kinetics and sensitivity*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2006. **1**(6): p. 111-24.
68. Wild, D.G., *The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*. 2013, Oxford: Elsevier.
69. Tetin, S.Y., Q. Ruan, and J.P. Skinner, *Studying antibody-antigen interactions with fluorescence fluctuation spectroscopy*. Methods in enzymology, 2013. **519**: p. 139-166.
70. Lion, N., T.C. Rohner, L. Dayon, I.L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z.Y. Wu, C. Roussel, J. Josserand, and H. Jensen, *Microfluidic systems in proteomics*. Electrophoresis, 2003. **24**(21): p. 3533-3562.
71. Green, R.J., R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, and S.J. Tendler, *Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(18): p. 1823-1835.
72. Kumar, C.S.S.R., *Microfluidic Devices in Nanotechnology: Applications*. 2010: Wiley.
73. Lion, N., F. Reymond, H.H. Girault, and J.S. Rossier, *Why the move to microfluidics for protein analysis?* Current opinion in biotechnology, 2004. **15**(1): p. 31-37.
74. Vilkner, T., D. Janasek, and A. Manz, *Micro total analysis systems. Recent developments*. Analytical chemistry, 2004. **76**(12): p. 3373-3386.
75. Squires, T.M. and S.R. Quake, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of modern physics, 2005. **77**(3): p. 977.
76. Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 267-287.
77. Anderson, J.R., D.T. Chiu, H. Wu, O.J. Schueller, and G.M. Whitesides, *Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)*. Electrophoresis, 2000. **21**: p. 27-40.
78. Perry, J.L. and S.G. Kandlikar, *Review of fabrication of nanochannels for single phase liquid flow*. Microfluidics and Nanofluidics, 2006. **2**(3): p. 185-193.
79. Abgrall, P. and A. Gue, *Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007. **17**(5): p. R15.
80. Huang, S., *Using Micro Particle Image Velocimetry to Access the Flow Properties in a Microfluidic Device used for the Incubation of ultra-high Density Peptide Microarrays*, Masterarbeit, 2014, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
81. Stroock, A.D., S.K. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezić, H.A. Stone, and G.M. Whitesides, *Chaotic mixer for microchannels*. Science, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
82. Fischer, A., *Entwicklung eines Mikrofluidiksystems zur Inkubation von Peptidarrays mit Antikörpern*, Diplomarbeit, 2014, Karlsruher Institut für Technologie: Karlsruhe.
83. Meinhart, C.D., S.T. Wereley, and J.G. Santiago, *A PIV algorithm for estimating time-averaged velocity fields*. Journal of Fluids Engineering, 2000. **122**(2): p. 285-289.
84. Bakker, D., A. Van der Plaats, G. Verkerke, H. Busscher, and H. Van der Mei, *Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(10): p. 6280-6287.
85. Weber, P.C., D. Ohlendorf, J. Wendoloski, and F. Salemme, *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science, 1989. **243**(4887): p. 85-88.
86. Schirwitz, C., *Purification of Peptides in High-Complexity Arrays*. Dissertation, 2012, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Aufbau einer α -Aminosäure	3
Abbildung 2.2 Prinzip der partikelbasierten Peptidsynthese.	5
Abbildung 2.3 Verfahrensschritte des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahren.	7
Abbildung 3.1 Geometrie der Aminosäurepartikel.	11
Abbildung 3.2 Einteilung von möglichen Verfahren zur Partikelbeschichtung	15
Abbildung 3.3 Mikrofluidik für die Handhabung von Partikeln.	15
Abbildung 3.4 Pneumatik-Zylinder und Variation der Langmuir-Blodgett-Methode.	17
Abbildung 3.5 Konzept der elektrostatischen Aerosolabscheidung.	19
Abbildung 3.6 Elemente der elektrostatischen Aerosolbeschichtung.	19
Abbildung 3.7 Schematischer Aufbau und Funktionsweise des Bürstendispergierers.	20
Abbildung 3.8 Konzept der Abscheidung der Partikel auf großer Fläche.	21
Abbildung 3.9 Vorversuche zur Beschichtung.	23
Abbildung 3.10 Skizze der entwickelten Beschichtungsanlage.	24
Abbildung 3.11 Prototyp des Rahmens.	25
Abbildung 3.12 CAD-Studie zum Dichtungskonzept.	26
Abbildung 3.13: Aufnahme der kompletten und automatisierten Beschichtungsanlage.	27
Abbildung 3.14 Vorgehensweise zur Bestimmung der Porosität.	29
Abbildung 3.15 Bestimmung der Porosität.	29
Abbildung 3.16 Mikroskopaufnahme einer Partikelschicht.	31
Abbildung 3.17 Schemata der Peptidsynthese.	31
Abbildung 3.19 Einfluss der Feldrichtung auf die Schichtdicke und den Mittenrauwert Ra.	33
Abbildung 3.20 Reproduzierbarkeit der Schichten.	34
Abbildung 3.21 Vergleich der Abscheideraten.	35
Abbildung 3.22 Vermessung von Partikelschichtvolumina unterschiedlicher Ausgangsschichtdicken.	36
Abbildung 3.23 Einfluss der Laserleistung auf den Äquivalentsradius.	36
Abbildung 3.24 Dipeptidsynthese für zwei Arrays.	38
Abbildung 4.1 Einteilung des Selektiven Laser-Anschmelz-Verfahrens in Einzelprozesse.	41
Abbildung 4.2 Prüfstand zur Klassifizierung der hergestellten Partikelschichten.	42
Abbildung 4.3 Verhältnis der Schicht und der Intensität.	43
Abbildung 4.4 Anteil der Proben, die nach den Klassifizierungsschritten a-e noch vorhanden sind.	44
Abbildung 4.5 Konzept der Automatisierung.	45
Abbildung 5.1 Wirkprinzip des In-situ-Transfers.	48
Abbildung 5.2 Positionsgesteuerter Übertrag auf einen Tropfenarray.	49

Abbildung 5.3 Ideensammlung zum passiven planparallelen Ausrichten und Entformen:.....	50
Abbildung 5.4 Vorversuche zum Übertrag mit dem Tischroboter Janome 2200 mini.	51
Abbildung 5.5 Ablauf des neu entwickelten Prozesses.	52
Abbildung 5.6 Skizze der entwickelten Anlage	54
Abbildung 5.7 Konzept der Positionierung mittels zweier Kameras.....	56
Abbildung 5.8 Skizze des Funktionsprinzips des positionsgesteuerten Übertrags.	58
Abbildung 5.9 Peptidarrayabformanlage Maschine 1	59
Abbildung 5.10 Eigenentwicklung des Sauggreifens.	60
Abbildung 5.11 Positionierung mit einem Knife-Edge-Prisma der Maschine 2	60
Abbildung 5.12 Maschine 2 zur Positionierung und Abformung von Peptidarrays.....	61
Abbildung 5.13 Positionierung zweier Oberflächen mit dem Prismen-Ansatz.	63
Abbildung 5.14 Maschine 3 für den positionsgesteuerten Übertrag.	64
Abbildung 5.15 Frontansicht für die vertikale Positionierung	65
Abbildung 5.16 Vergleich der Auflagefläche der Halterung des Objektträgers.	67
Abbildung 5.17 Verteilung des Anpressdrucks bei Maschine 1.	68
Abbildung 5.18 Verteilung der Anpresskraft für Maschine 2.....	68
Abbildung 5.20 Mikroskopaufnahme von Mustern zweier übereinander positionierter Objektträger	70
Abbildung 5.21 Übertrag eines kompletten Peptidarrays:.....	71
Abbildung 5.22 Tropfenhöhe von 10 Tropfen des Arrays.	72
Abbildung 5.23 Mikroskopaufnahmen der Ausgangsoberfläche.....	72
Abbildung 5.24 Intensität des Fluoreszenzsignals zur Bestimmung der Transferrate.....	73
Abbildung 6.1 Bindung von Antikörpern an einen Peptidmicroarray.....	76
Abbildung 6.2 Schematische Darstellung der Flusszelle für Peptidmicroarrays.....	81
Abbildung 6.3 Komponenten der mikrofluidischen Inkubationskammer.	82
Abbildung 6.4 MicCell-System	83
Abbildung 6.5 Messprinzip von μ APT.....	85
Abbildung 6.6 Simulation der Geschwindigkeitsverteilung am Einlass in der Mitte der Kanäle.....	86
Abbildung 6.7 Draufsicht der verwendeten Kanäle.....	87
Abbildung 6.8 Geschwindigkeitsverteilung über die halbe Kanalbreite an den Stellen A – F.....	88
Abbildung 6.9 Geschwindigkeitsdarstellung quer zur Flussrichtung	89
Abbildung 6.10 Messung der Geschwindigkeitsprofile im Kanal an der Stelle E.	90
Abbildung 6.11 Höhe des Kanals.	91
Tabelle 6-1 Parameter der Inkubationsexperimente.	91
Abbildung 6.12: Mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin inkubierte flächige Biotin-Oberflächen	92
Abbildung 6.13: Mittlere Grauwerte über die Inkubationszeit.....	93
Abbildung 6.14 Fluoreszenzbild der inkubierten Arrays.	94

Tabelle 6-2 Parameter der Inkubationsexperimente.....	95
Abbildung 6.15 Aufnahme eines Bindungsprozesses	96
Abbildung 6.16 Auswirkung der Strömungsunterschiede auf das Inkubationsergebnis.	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 6-1 Parameter der Inkubationsexperimente.....	91
Tabelle 6-2 Parameter der Inkubationsexperimente.....	95

Abkürzungsverzeichnis

NH ₂	Aminogruppe
COOH	Carboxylgruppe
PTFE	Polytetrafluorethylen
PEGMA	Polyethylenglycolmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
MMA	Methylmethacrylat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Gly	Glycin
Ala	Alanin
SVM	Support Vector Machine
NN	Neuronales Netz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
PDMS	Polydimethylsiloxane
PVDF	Polyvinylidenfluorid
COP	Cyclo-Olefin-Polymer
TFA	Trifluoressigsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösungs
CFD	Computational Fluid Dynamics
μPIC	Micro Particle Image Velocimetry
μAPT	Micro Astigmatismus Partikel Tracking Velocimetry
HA	Hämagglutinin
ESA	Essigsäureanhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Trtyl	Triphenylmethyl
OPfp	Pentafluorophenyl
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösungs mit Tween 90

Anhang A *Chemische Prozesse*

Funktionalisierung der Glasobjektträger

In dieser Arbeit werden Glassubstrate mit Polyethylenglycolmethacrylat/Methylmethacrylat (PEG-MA/MMA) im Verhältnis 9:1 funktionalisiert und mit Aminogruppen derivatisiert. Dabei dienen 3 β -Alanin als Abstandshalter, um die Zugänglichkeit für die Aminosäuren zu erhöhen. Die hier genutzte Aminosäuren besitzen eine 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe, eine Triphenylmethyl(Trityl)-Schutzgruppe für die Seitengruppe und eine Pentafluorophenyl(OPfp)-Ester-Aktivierung, näher beschrieben in [86].

Kupplungsreaktion

Nach der Strukturierung der Aminosäurepartikel werden die Aminosäuren im Ofen unter Schutzgas bei 90° C für 90 min gekuppelt. Nach einem Waschschrift werden die nicht gekuppelten Aminogruppen geblockt, mittels verschiedener Waschschrift mit den Lösungsmitteln Essigsäureanhydrid (ESA), Diisopropylethylamin (DIPEA), Dimethylformamid (DMF) und Aceton. Anschließend folgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch ein Waschen mit einem Piperidin-DMF-Gemisch und somit die Entschützung der Aminogruppe für den nächsten Kupplungsschritt.

Herstellung nicht strukturierter Biotin-Oberflächen

Es wurden 0,075 g Biotin und 0,675 g Harz in 5 ml Dichlormethan unter stetigem Rühren gelöst. Diese Lösung wurde auf funktionalisierte 10:90 PEGMA-co-MMA (PEPperPRINT GmbH) durch Spincoaten aufgebracht: In 5 s wird die Drehzahl auf 50 rps erhöht und dann für 10 s gehalten. Anschließend wird innerhalb von 10 s die Drehzahl auf 100 rps erhöht und diese über 30 s beibehalten. Nach dem Spincoaten wurden die Biotin-Oberflächen in eine Synthese-Kammer gelegt, aus der mit einem Argon-Gasstrom der Sauerstoff verdrängt wurde. Zur Kupplung wurde die Synthesekammer 90 Minuten bei 90°C in den vorgeheizten Ofen gestellt. Anschließend wurden die Biotin-Oberflächen dreimal mit Aceton gewaschen: 2 Minuten auf dem Kreisschüttler, 3 Minuten im Ultraschallbad und erneut 2 Minuten auf dem Kreisschüttler. Das Trocknen der Substrate erfolgte mit gasförmigem Stickstoff. Zur Lagerung wurde die Luft im Lagerbehältnis mit Argon verdrängt und das Behältnis mit Parafilm luftdicht verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4 - 7°C im Kühlschrank.

Anhang B Beschichtungsparameter

Triboaufladung

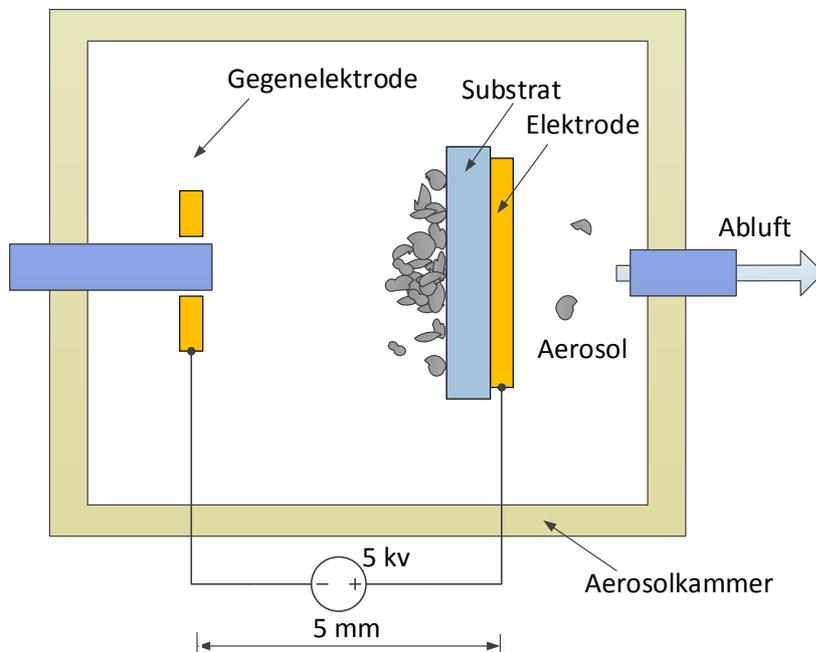


Abbildung B.1 Aufbau zur triboelektrischen Aufladung der Partikel

Die Betriebsparameter des Aerosolgenerators (Vorschubgeschwindigkeit des Kolbens und Bürstendrehzahl), als auch die Parameter der x,y-Lineareinheit (Verfahrgeschwindigkeit in x und y Richtung), sowohl die Parameter des in Abbildung B.1 dargestellten Aufbaus sind in Tabelle B.1 zusammengefasst.

Tabelle B.1 Eigenschaften der triboelektrischen Abscheidung

Partikel	Sprühtrockner LK958-014 $d(0,5) = 3,5 \mu\text{m}$	Vorschubgeschwindigkeit des Kolbens	60 mm/h
Druck	1 bar	Fläche	$20 \times 30 \text{ mm}^2$
Aufladung	PTFE Schlauch, gekrümmt; 30 cm	Verfahrgeschwindigkeit in y Richtung	0,2 mm/s
Elektrode	Sieb (1x1 mm)	Verfahrgeschwindigkeit in x Richtung	10 mm/s
Substrat	Glas	Bürstendrehzahl	800 min^{-1}
Abstand Schlauch/Elektrode	5 mm	Abstand Elektrode/Substrat	5 mm

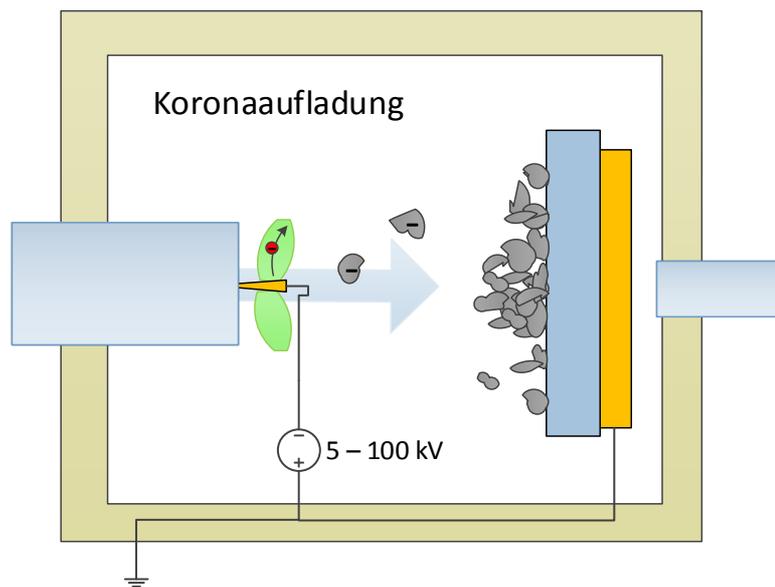


Abbildung B.2 Aufbau zur Korona-Aufladung der Partikel

Die Betriebsparameter des Aerosolgenerators, der x,y-Lineareinheit, als auch sowohl die Parameter des in Abbildung B.2 dargestellten Aufbaus sind in Tabelle B.2 zusammengefasst.

Tabelle B.2 Eigenschaften der Abscheidung bei der Korona-Aufladung

Partikel	Sprühtrockner LK958-014, $d(0,5) = 3,3 \mu\text{m}$	Vorschubgeschwindigkeit des Kolbens	60 mm/h
Druck	1,2 bar	Fläche	$20 \times 30 \text{ mm}^2$
Aufladung	Korona 100 kV	Verfahrgeschwindigkeit in y Richtung	0,2 mm/s
Elektrode	Sieb mit Maschenweite $1 \times 1 \text{ mm}$	Verfahrgeschwindigkeit in x Richtung	10 mm/s
Substrat	Glas mit leitfähiger Oberfläche	Bürstendrehzahl	800 min^{-1}
Abstand Schlauch/Substrat	30 mm		

Anhang C Dipeptidsynthese

Kuppeln von Monomeren aus Monomerpartikeln

- Kupplungsreaktion: unter Argonatmosphäre 90 min auf 90 °C erhitzen
- Waschschrift: 3 × 5 min DMF, 2 × 3 min Methanol
- Blockieren freier Aminogruppen: 2 h ESA-DIPEA-DMF im Volumenverhältnis 1:2:7
- Waschschrift: 3 × 5 min DMF, 2 × 3 min Methanol
- Fmoc-Schutzgruppen abspalten: 20 min 20 % (v/v) Piperidin in DMF
- Waschschrift: 3 × 5 min DMF, 2 × 3 min Methanol

Fluoreszenzfärbung NHS-Ester

- Waschschrift: 1 × 15 min PBS-T pH 7,4
- Fluoreszenzfärbung: 2 h, Stammlösung (1 mg DyLight 650 NHS-Ester in 1 ml DMF) verdünnt mit PBS-T pH 7,4 im Volumenverhältnis 1:100
- Waschschrift: 3 × 5 min PBS-T pH 7,4

Fluoreszenzfärbung Streptavidin

- Waschschrift: 1 × 15 min PBS-T pH 7,4
- Unspezifische Proteinbindungen blockieren: 30 min Rockland Blocking Buffer
- Waschschrift: 1 × 1 min PBS-T pH 7,4
- Fluoreszenzfärbung: 1 h Streptavidin DyLight 550 - Rockland Blockig Buffer - PBS-T Volumenverhältnis 1:1.000:9.000
- Waschschrift: 1 × 30 s PBS-T pH 7,4, 1 × 1 min PBS-T pH 7,4, 1 × 2 min PBS-T pH 7,4, 2 × abspülen mit H₂O

Inkubation mit Anti-HA

- Waschschrift: 1 × 15 min PBS-T
- Unspezifische Proteinbindungen blockieren: 30 min Rockland Blocking Buffer
- Fluoreszenzfärbung: 1 h Anti-HA DyLight 550 - Rockland Blockig Buffer - PBS-T Volumenverhältnis 1:1.000:9.000
- Waschschrift: 1 × 30 s PBS-T pH 7,4, 1 × 1 min PBS-T pH 7,4, 1 × 2 min PBS-T pH 7,4, 2 × abspülen mit H₂O

Anhang D Geschwindigkeitsverteilung mit μ PIV

Abbildung D.1 zeigt das mit μ PIV gemessene Geschwindigkeitsfeld. Während an den Positionen C – F typische Geschwindigkeitsvektoren gemessen wurden, weicht das Ergebnis in der Nähe des Auslasses an den Positionen A, B jedoch stark ab. Dies lässt sich durch die Geometrie des Kanals erklären. In den Ecken des Kanals treten geometriebedingte Wirbel auf. In der Nähe des Auslasses steigt die Geschwindigkeit stark an, aufgrund der Strömungsquerschnittsreduzierung von der vollen Kanalbreite auf 0,25.

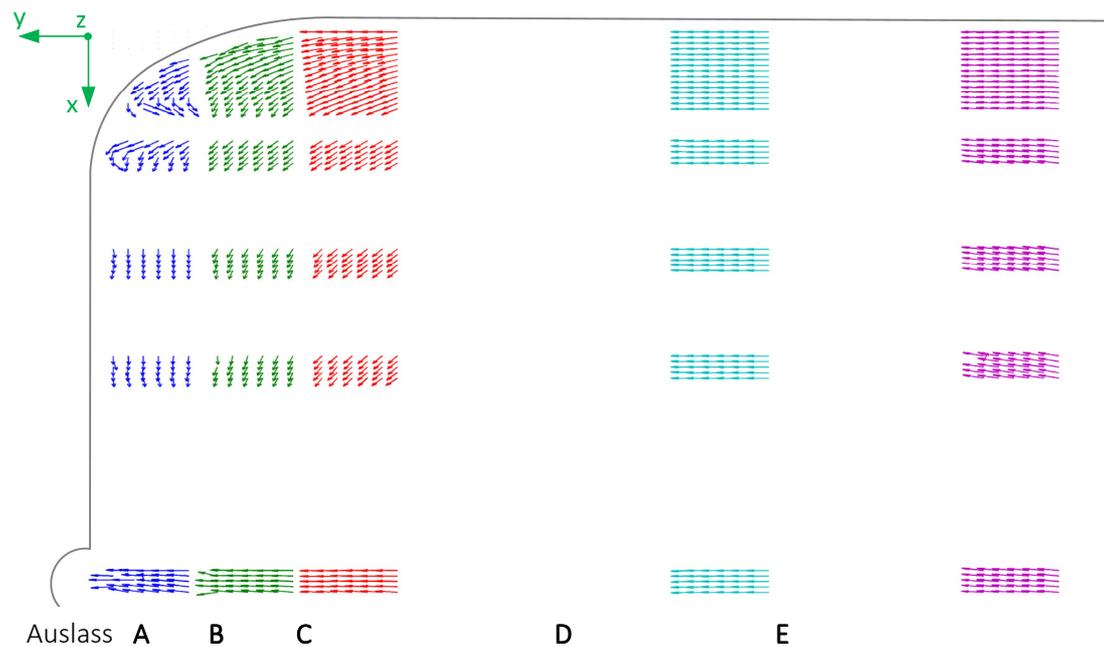


Abbildung D.1 Geschwindigkeitsverteilung im flächenoptimierten Kanal.