

Kombinatorischer laserinduzierter Vorwärtstransfer zur Herstellung von biomolekularen Mikroarrays

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

der Fakultät für Maschinenbau
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

M.Sc. Tobias Christoph Förtsch

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Juni 2017

Hauptreferent:

apl. Prof. Dr. Alexander Nesterov-Müller

Korreferenten:

Prof. Dr. Jan G. Korvink

Prof. Dr.-Ing. Edgar Dörsam

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurde der laserinduzierte Vorwärtstransfer (LIFT) für die kombinatorische Herstellung von biomolekularen Arrays, insbesondere Peptidarrays, adaptiert. Die ablaufenden physikalischen Vorgänge wurden aufgeklärt, der Prozess systematisch untersucht und optimiert, ein Demonstrator für Kooperationspartner nutzbar gemacht und Anwendungsbeispiele für die besonderen Möglichkeiten des Verfahrens gezeigt.

Peptidarrays sind räumliche Anordnungen von Regionen (genannt Spots) auf einem Substrat. Innerhalb des selben Spots ist jeweils die gleiche Art Peptid lokalisiert. An jedem Spot liegt eine andere Art Peptid vor. Das Raster der Spots ist in der Größenordnung von Hunderten Mikrometern. Die Anordnung im Arrayformat ermöglicht den parallelen Test vieler verschiedener Peptide gleichzeitig auf gewisse Eigenschaften, etwa die Fähigkeit, Antikörper aus einer Blutserum-Probe zu binden. Anwendung finden Peptidarrays deshalb in der Immunologie-Forschung, beispielsweise in der Entwicklung neuer Impfstoffe. Die kombinatorische Synthese von Peptiden aus Aminosäurebausteinen erlaubt es, Arrays mit einer großen Vielfalt an beliebigen Peptiden herzustellen.

LIFT ist eine Klasse von Verfahren, bei denen mittels Laserstrahlung Material von einem Ausgangsträger (Donor) auf ein Zielsubstrat (Akzeptor) übertragen wird. Der Laser wirkt dabei nicht unmittelbar durch Strahlungskräfte, sondern wird als Mittel zum kontrollierten Energieeintrag genutzt und löst den Materialtransfer zumeist thermisch aus. Der genaue Wirkungsmechanismus unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen LIFT-Implementierungen. Die hier untersuchte Implementierung zeichnet sich im Vergleich zur restlichen Literatur dadurch aus, dass besonders wenig Material übertragen wird.

Hier wird LIFT kombinatorisch als *combinatorial LIFT* (cLIFT) genutzt, um spotweise verschiedene Aminosäure- und andere Bausteine zu übertragen, nötigenfalls *in situ* zu aktivieren, und aus diesen nach und nach Peptidarrays herzustellen.

Dabei besteht der Donor aus einem Glasobjektträger als Substrat, einer Polyimidfolie zur Absorption des Laserstrahls und einer dünnen Schicht des zu übertragenden Materials. Er kann am selben Ort mehr als 20 Mal wiederverwendet werden. Das Material wird bei der Bestrahlung als Aerosol in einem advektiv-diffusiven Transportprozess übertragen. Die zugänglichen Prozessparameter wirken sich in einer definierten Weise auf die Größe und Stärke der Spots aus. Substrate können in vertikaler Nanometerauflösung additiv strukturiert werden. Es können in 44 s Bestrahlungsdauer pro Lage 8750 Spots auf einen Akzeptor übertragen werden; die Spotdichte ist vergleichbar mit der von kommerziell erhältlichen Peptidarrays. Die Ablenkung des Laserstrahls erfolgt durch einen Scanhead mit hoher absoluter Ortsgenauigkeit. Wiederholgenauigkeit wird durch Markierungen erreicht, die bei geeigneter Gestaltung eine Genauigkeit von mehr als 2,5 µm ermöglichen, robust erkannt werden und eine Identifikationsnummer beinhalten können.

Abstract

In this thesis "Combinatorial laser-induced forward transfer for the fabrication of biomolecular microarrays", the laser-induced forward transfer (LIFT) was adapted for the combinatorial synthesis of biomolecular arrays, especially peptide arrays. The mechanism of the transfer was elucidated, the process was systematically investigated and optimized, a demonstrator was made available for cooperation partners and application examples of the specific capabilities of the process were shown.

Peptide arrays are spatial arrangements of regions (spots) on a substrate. Within one spot, the same type of peptide is localized. Each of these spots features a different type of peptide. The grid of the spots is in the order of magnitude of a few hundred micrometers. The arrangement in array shape allows for the parallel screening of many different peptides for certain properties such as the ability to bind antibodies from blood serum samples. Therefore, peptide arrays are being applied in immunology research, for instance in the development of new vaccines. The combinatorial synthesis of peptides from amino acid building blocks makes it possible to produce arrays with a very large variety of peptides.

LIFT denotes a class of procedures in which material is transferred from a donor substrate to an acceptor substrate by laser radiation. The laser does not act directly by light forces, but is used as a means for the controlled energy input and usually triggers the material transfer thermally. The exact mechanism of the transfer differs within the various LIFT implementations. In comparison to the rest of the literature, the implementation examined here is characterized by the fact that very little material is transferred.

Here, LIFT is used combinatorially as so-called cLIFT for transferring step by step spots of different amino acids and other building blocks, to activate them *in situ* if required, and to produce peptide arrays therefrom.

A donor slide comprises a glass substrate, a polyimide foil for the absorption of the laser beam, and a thin film of the material to be transferred. It can be reused more than 20 times. The material is transferred as aerosol in an advective-diffusive transport process during irradiation. The accessible process parameters have a defined effect on size and strength of the spots. It is possible to structure substrates in nanometer-scale vertical resolution. 8750 spots can be transferred to an acceptor slide in 44 s irradiation time per layer; the spot density is comparable to that of commercially available peptide arrays. The laser beam is deflected via a scan head with a high absolute spatial accuracy. Repeatability is achieved by means of position markers, which, if suitably designed, enable an accuracy of more than 2.5 μm , can be reliably detected, and may include an identification number.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Kombinatorik: Vielfalt aus wenigen Bausteinen	1
1.1.1 Peptidarrays	2
1.1.2 Synthese im Arrayformat	3
1.2 Der laserinduzierte Vorwärtstransfer	5
1.2.1 Stand der Technik	5
1.2.2 cLIFT	8
1.3 Zum Aufbau dieser Arbeit	9
2 Demonstrator	11
2.1 Allgemeiner Aufbau der Anlage	11
2.2 Bedienelemente zur Justierung	13
2.3 Werkstückhalterung und -zuführung	15
2.4 Nutzerfreundliche Steuerung	18
3 Methoden	22
3.1 Herstellung von Donorslides	22
3.1.1 Schleuderbelacken der Materialschicht	23
3.1.2 Tauchbeschichten zur sparsameren Beschichtung	24
3.2 Charakterisierungsverfahren	26
3.2.1 Indirekte Messung	27
3.2.2 Direkte Messung	27
3.2.3 Diskussion der Messmethoden	30
3.3 Chemische Prozessschritte	30

3.4	Digitale Bildverarbeitung.....	32
3.4.1	Eindimensionale Analyse	33
3.4.2	Zweidimensionale Analyse	34
4	Wirkungsmechanismus des Übertrags	36
4.1	Ausschluss eines Kontakt-Übertrags.....	36
4.2	Übertrag als Aerosol.....	39
4.3	Simulation.....	47
4.4	Sonstige Beobachtungen.....	52
4.4.1	Topographie des Donorslides nach dem Übertrag	52
4.4.2	Abschätzung der Temperatur während des Übertrags	53
4.5	Zusammenfassung.....	54
5	Prozessparameter.....	55
5.1	Ziel- und einstellbare Größen.....	55
5.2	Lasereinstellungen.....	56
5.3	Absorptionsschicht	65
5.4	Materialschicht	76
5.4.1	Schichtdicke	76
5.4.2	Verschiedene Bausteine.....	78
5.4.3	Andere Matrixpolymere.....	81
5.5	Sonstige Parameter.....	85
5.5.1	Strahldurchmesser und -profil.....	85
5.5.2	Ausblick.....	88
5.6	Diskussion.....	89
5.7	Zusammenfassung.....	93
6	Wiederholte Benutzung von Donorslides	95
6.1	Mehrere Spots vom selben Slide	95
6.2	Mehrere Spots von der selben Stelle	98
7	Transformation der Spotkoordinaten.....	103
7.1	Erläuterung des Problems	103

7.2	Experimentelles Vorgehen	105
7.3	Verschiedene Modelle der Abbildung.....	107
7.3.1	Projektive Abbildung	108
7.3.2	Keystone.....	116
7.3.3	Beschreibung der Verzeichnung	120
7.3.4	Nichtparametrische Modellierung	126
7.4	Vergleich der Modelle und Diskussion.....	130
7.5	Ähnlichkeitsabbildungen aus Testpunkten.....	132
7.6	Zusammenfassung	137
8	Erkennung der Werkstückposition.....	139
8.1	Motivation	139
8.2	Robuste Positionsmarkierungen	140
8.3	Ausblick.....	144
9	cLIFT zur verallgemeinerten kombinatorischen Synthese	149
9.1	In-situ-Aktivierung von Aminosäuren als Beispiel	149
9.2	Ortsaufgelöste vertikale Nanostrukturierung.....	150
10	Abschließende Diskussion	153
11	Literaturverzeichnis	I
12	Danksagung.....	XI

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich damit, wie mit Hilfe des laserinduzierten Vorwärtstransfers kombinatorische molekulare Arrays, insbesondere Peptidarrays, hergestellt werden können.

1.1 Kombinatorik: Vielfalt aus wenigen Bausteinen

Das Prinzip der Kombinatorik ist, dass aus der Kombination einiger weniger Grundbausteine eine Vielfalt an komplexeren Konstrukten entsteht. So wie sich beispielsweise der Text dieser Arbeit aus Buchstaben zusammenfügt, sind auch manche wichtige Biomoleküle eine Kette elementarer Bausteine; in dieser Arbeit sind besonders die Peptide – kurze Proteine – bedeutend, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind [1]. Die Aminosäuren werden dabei üblicherweise durch einen Einbuchstabencode bezeichnet (Abbildung 1.1).

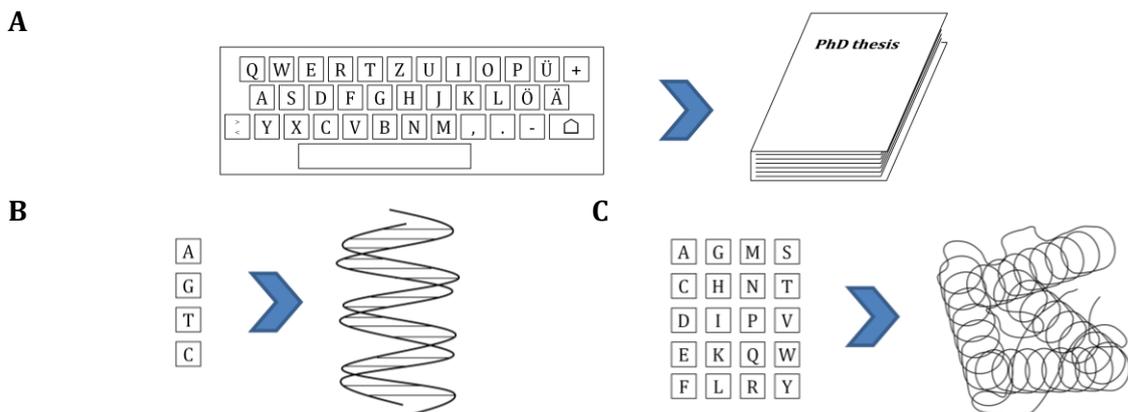


Abbildung 1.1: Komplexe Konstrukte aus Buchstaben-kodierten Grundbausteinen. (A) Wörter sind aus Buchstaben zusammengesetzt, die Desoxyribonukleinsäure aus Nucleotiden aufgebaut (B) und Peptide und Proteine sind Ketten aus Aminosäuren (C). Die gebräuchlichsten proteinogenen Aminosäuren – hier jeweils mit Ein- und Dreibuchstabenabkürzung aufgeführt – sind: A / Ala / Alanin, C / Cys / Cystein, D / Asp / Asparaginsäure, E / Glu / Glutaminsäure, F / Phe / Phenylalanin, G / Gly / Glycin, H / His / Histidin, I / Ile / Isoleucin, K / Lys / Lysin, L / Leu / Leucin, M / Met / Methionin, N / Asn / Asparagin, P / Pro / Prolin, Q / Gln / Glutamin, R / Arg / Arginin, S / Ser / Serin, T / Thr / Threonin, V / Val / Valin, W / Trp / Tryptophan und Y / Tyr / Tyrosin.

1.1.1 Peptidarrays

Peptidarrays sind räumliche Anordnungen von Regionen („Spots“) auf einem Substrat, innerhalb derer jeweils die gleiche Art Peptid lokalisiert ist – in jedem Spot aber eine andere (Abbildung 1.2). Das Raster der Spots („Pitch“) ist klein und typischerweise in der Größenordnung von Hunderten Mikrometern.

Die Anordnung im Arrayformat ermöglicht den parallelen Test vieler verschiedener Peptide gleichzeitig auf gewisse Eigenschaften, etwa die Fähigkeit, Antikörper (in der Abbildung als Y dargestellt) aus einer Blutserum-Probe zu binden.

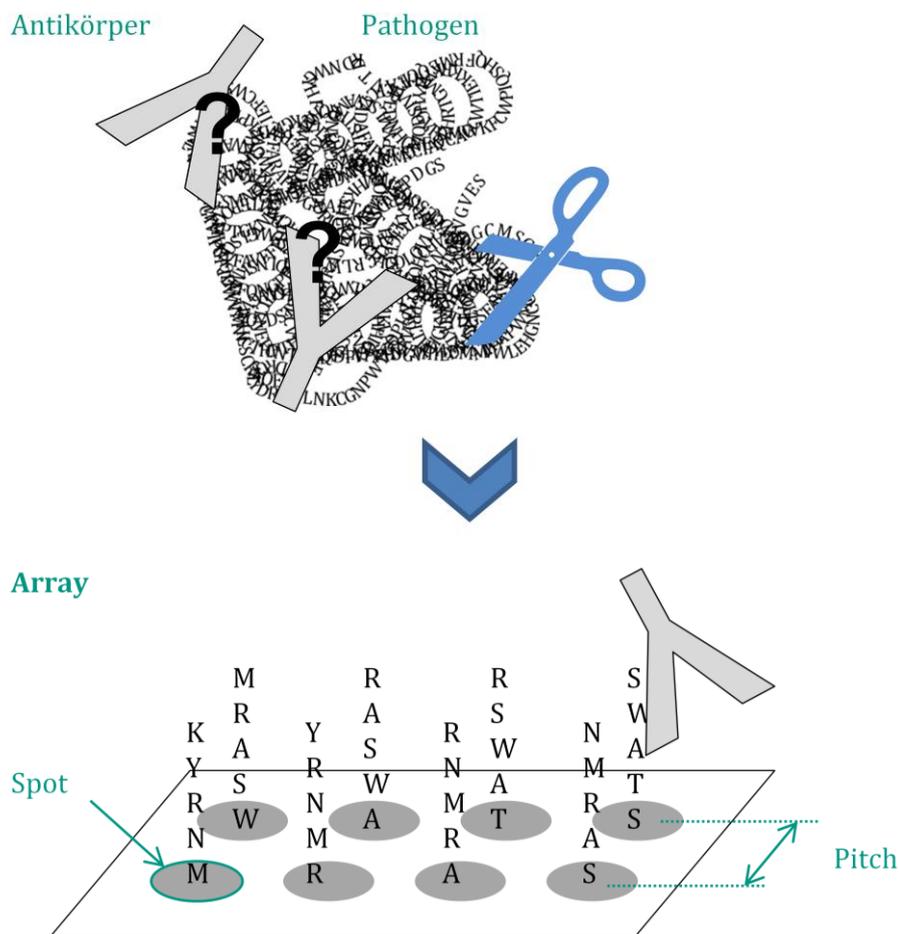


Abbildung 1.2: Schema eines Peptidarrays und seiner Anwendung in der Immunologie.

Anwendung finden Peptidarrays nämlich in der Immunologie-Forschung, beispielsweise in der Entwicklung neuer Impfstoffe. Dafür wird die Struktur potentieller Antigene des Erregers gedanklich in Abschnitte – Peptide – zerlegt, die dann als Peptidarray angeordnet werden (Abbildung 1.2). Über die Messung, an welchen Peptidspots Antikörper angreifen,

können Epitope, also die Molekularstrukturen des Erregers, die vom Körper erkannt werden und zu einer Immunreaktion führen, identifiziert werden [2]. Zu einer gezielteren Charakterisierung der Bindung von Antikörper und Peptid und der jeweils dafür essenziellen Aminosäurekombinationen können Arrays mit systematischen Variationen eines Peptids eingesetzt werden; siehe dazu, sowie für weiterführende Informationen zur Anwendung von Peptidarrays in der Immunologie Quelle [3].

1.1.2 Synthese im Arrayformat

Erforderlich für die oben geschilderten Anwendungen ist es, dass eine Vielfalt verschiedener Peptide gezielt synthetisiert werden kann. Da es bei einer Anzahl von mehreren Tausend verschiedenen Spots nicht praktikabel ist, die Peptide als Ganzes vorzubereiten und als Array anzuordnen, müssen sie auf dem Array aus ihren Grundbausteinen, den Aminosäuren, lagenweise aufgebracht werden.

Die Peptidsynthese wird kombinatorisch (nach [4]) in der festen Phase vorgenommen (nach [5]). Dabei sind die Aminosäurebausteine in einem Matrixpolymer eingebettet, was sie unter anderem vor äußeren Einflüssen schützt und sie lagerbar macht. Abbildung 1.3 skizziert den Prozess:

Für jede ‚Lage‘ / ‚Schicht‘ entlang der Aminosäurenkette wird, nacheinander für jeden Aminosäurebaustein, Material an den Orten abgelagert, wo es in der Planung des Arrays vorgesehen ist (‚Material‘ meint das Matrixpolymer mit eingebetteten Bausteinen). Dies ist der ‚Druck‘-Schritt des Prozesses (Abbildung 1.3A). In früheren Arbeiten der Gruppe erfolgte er beispielsweise durch Laserdruck [6], Aerosolablagerung auf einem elektronischen Chip [7], oder selektives Laseranschmelzen [8]; für eine Zusammenfassung anderer Technologien sei auf die Einleitung in Quelle [9] verwiesen. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, wie der laserinduzierte Vorwärtstransfer dafür verwendet werden kann.

Fertig strukturierte Lagen werden dann als Ganzes weiter prozessiert (Abbildung 1.3B). Bei erhöhter Temperatur wird das Matrixpolymer niedrigviskoser, und die eigentliche chemische Kupplung an bereits vorhandene Lagen bzw. das funktionalisierte Akzeptorsubstrat kann erfolgen. In nasschemischen Schritten wird dann die Matrix entfernt und das Array für das Aufbringen der nächsten Lage vorbereitet. Nach Wiederholung der physischen und chemischen Schritte erhält man schließlich ein kombinatorisch synthetisiertes Peptidarray (Abbildung 1.3C).

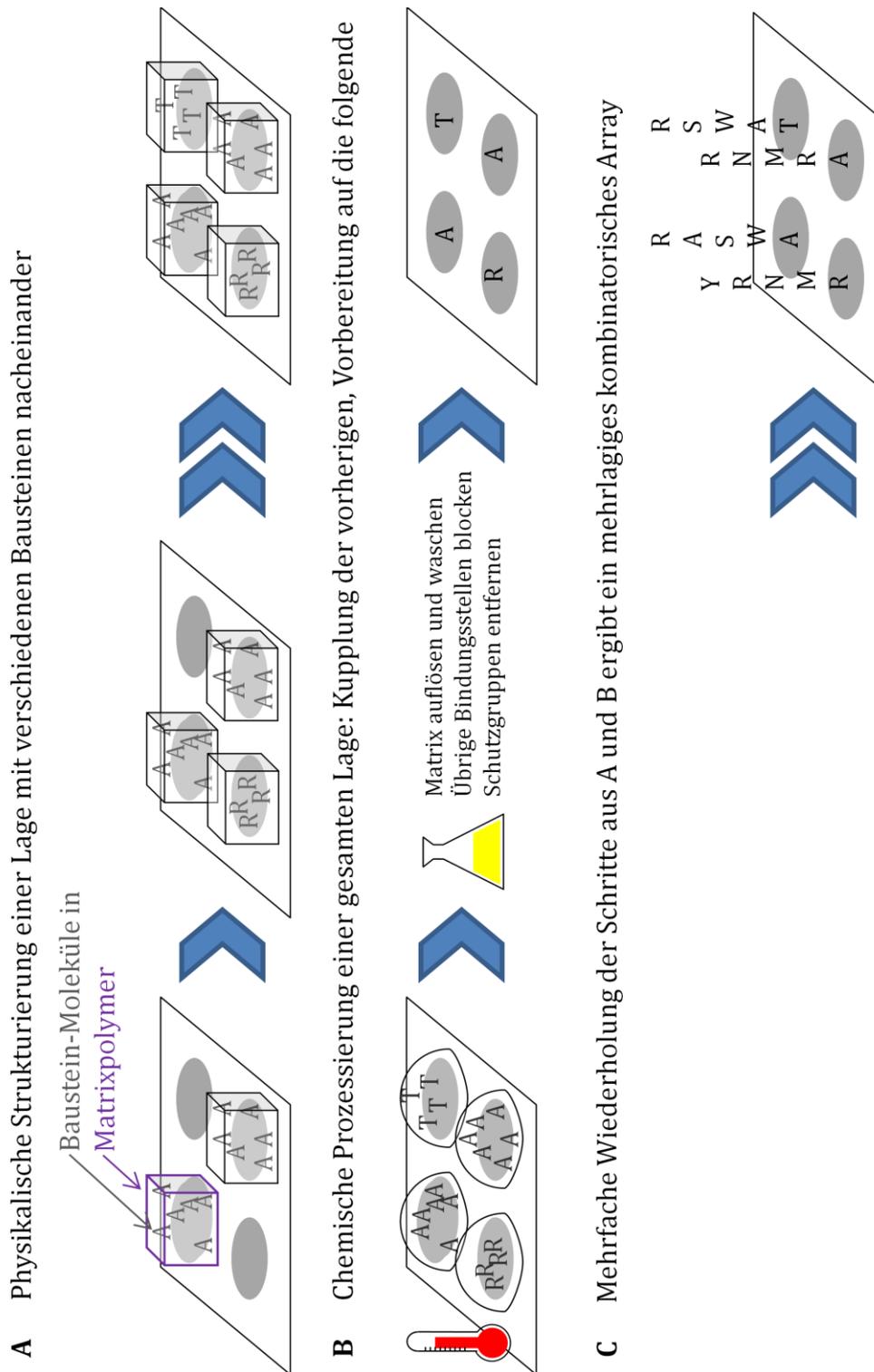


Abbildung 1.3: Prozessschritte der kombinatorischen Festphasen-Peptidsynthese im Arrayformat. Man beachte die Trennung physischer und chemischer Schritte.

1.2 Der laserinduzierte Vorwärtstransfer

LIFT – *laser-induced forward transfer* – ist eine Klasse von Methoden, bei denen mittels Laserstrahlung Material von einem Ausgangsträger, meist ‚*donor*‘ oder in Anlehnung an die Kathodenzerstäubung (*sputtering*) ‚*target*‘ genannt, auf einen Zielträger, ‚*acceptor*‘ oder ‚*receiver*‘ genannt, übertragen wird (Abbildung 1.4). Der Laser wirkt dabei nicht unmittelbar durch Strahlungskräfte wie etwa bei einer optischen Pinzette, sondern wird nur als Mittel zum kontrollierten Energieeintrag genutzt und löst den Materialtransfer zumeist thermisch aus. Die Richtungsangabe ‚vorwärts‘ meint, dass es sich um ein additives Verfahren handelt. Ist in der LIFT-Literatur von ‚*reverse transfer*‘ [10] die Rede, wird damit lediglich bezeichnet, dass der Laserstrahl nicht auf der Rückseite des Donors eintritt, sondern durch den Akzeptor hindurch auf der Donorvorderseite und damit die Richtung des Materialflusses entgegengesetzt der Richtung des Laserstrahls ist.

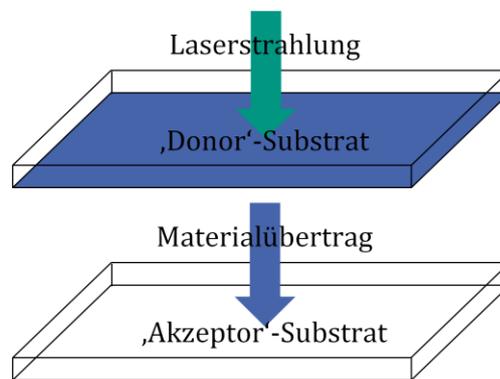


Abbildung 1.4: Schema der LIFT-Verfahren allgemein. Material wird mittels Laserstrahlung von einem Ausgangs- auf einen Zielsubstrat übertragen.

1.2.1 Stand der Technik

Seit der ersten Beschreibung der Methode vor etwa drei Jahrzehnten [11] wurde eine Vielzahl an Varianten entwickelt, die sich im Übertragungsmaterial, der geometrischen Ausgestaltung und dem Wirkungsmechanismus unterscheiden. Im September 2016 listete die Zitationsdatenbank *Web of Science* (webofknowledge.com, Thomson Reuters) 271 Publikationen, die auf die erste Veröffentlichung zumindest direkten Bezug nehmen. Die erste [12], aus der selben Arbeitsgruppe, wählte und prägte den Namen ‚LIFT‘.

Das zu übertragende Material waren zuerst Metalle und Halbmetalle wie Kupfer [11], Vanadium [13], Selen-Germanium-Doppelschichten [14], Aluminium [15], Titan und Chrom [16] und Oxide wie der Supraleiter YBaCuO [17]. Weitere feste Materialien sind Polymere (z.B. im ‚*laser-induced thermal imaging LITI*‘ [18]), oder beispielweise in Photolack eingebettete Diamantpartikel [19], die nach dem Übertrag als Nukleationspunkte in der Chemischen Gasphasenabscheidung dienen sollten, und Pilzsporen [20]. Unter dem Namen ‚*laser-driven micro transfer placement*‘ (*LMTP*) [21]

wurde ein komplexes Mikrobauteil – eine LED – übertragen. Auch flüssiges Material und Suspensionen werden transferiert, zum Beispiel *DNA* in Lösung [22] oder Stammzellen in einem Medium [23].

Dabei werden verschiedene Effekte ausgenutzt, um den Übertrag auszulösen. Das Übertragungsmaterial kann aufgeschmolzen und durch thermische Ausdehnung weggeschleudert oder durch verdampfte Anteile aus der Schicht herausgelöst werden [24][25]. Dabei entstehende Deformationen der Materialschicht [26], bzw. Sollbruchstellen in der Materialschicht [27] können diese Vorgänge begünstigen. Wiederholte Bestrahlung kann den Übertrag materialschonender machen (im ‚*ballistic laser-assisted solid transfer BLAST*‘ [28]). Das Übertragungsmaterial kann in eine photosensitive Matrix eingebettet werden („*matrix assisted pulsed laser evaporation direct-write MAPLE-DW*“), die bei Bestrahlung verdampft [29]. Eine Hilfsschicht, die bei Erwärmung explosionsartig Gas freisetzt, kann verwendet werden [30]. Ein absorbierendes Substrat kann in Folge der Bestrahlung von Schockwellen durchzogen werden, die beschichtetes Material abstoßen („*shock-wave-induced film delamination patterning SWIFD*“ [31]); thermische Spannungen wurden auch an anderer Stelle als Übertragungsmechanismus ausgenutzt [21]. Die Delamination einer absorbierenden Hilfsschicht kann den Übertrag aktivieren ([23]; ‚*blister-actuated LIFT*‘ [32]).

Die Materialschicht absorbiert die Laserstrahlung entweder selbst, oder ist auf eine absorbierende Hilfsschicht aufgetragen. Bei Flüssigkeiten als Übertragungsmaterial wird teils auf ein Substrat verzichtet, sondern die Flüssigkeit aus einem Reservoir heraus übertragen [33][34]. In der Literatur finden sich weitere Architekturen: Der Auftreffort der Laserstrahlung kann vorder- oder rückseitig sein [10], der Donor kann mit Mikropartikeln selbst-organisiert strukturiert sein, um bestimmte Muster zu übertragen [35] oder als Metamaterial gestaltet werden [36]. Als Akzeptoren wurden nicht nur ebene und starre Substrate, sondern auch beispielsweise mit *micro wells* strukturierte Substrate [37] oder optische Fasern [38] verwendet.

Biologische Anwendungen fand LIFT bisher beispielsweise im Übertrag von DNA [39][22], Enzymen [40][41], Proteinen für das *tissue engineering* [42] oder Antikörpern [43]. Peptidarrays wurden nach bestem Wissen noch nicht mit LIFT hergestellt; allerdings ließe sich zumindest der in der Arbeitsgruppe entwickelte *laser-assisted particle transfer* [44], der Potential dazu aufweist, auch als LIFT-Implementierung interpretieren.

Kombinierte Muster aus verschiedenen Materialien wurden gelegentlich – besonders im biologischen Kontext (beispielsweise vorgefertigte DNA [45] oder Zellen [46]) – übertragen oder aufeinandergestapelt [47]. Außerdem wurden von einem zweischichtig aufgebauten Donor zwei Metalle übertragen, die sich dabei zu einer Legierung mischen [48]. Es wurde jedoch nach bestem Wissen noch nie mit Hilfe von LIFT mit separat übertragenen Bausteinen kombinatorische Chemie im Arrayformat ausgeführt.

Die LIFT-Implementierung der vorliegenden Arbeit hebt sich in einem weiteren Punkt von der vorhandenen Literatur ab: Die Menge des übertragenen Materials, speziell die Höhe der Materialportionen, ist besonders klein. In Abbildung 1.5 ist für eine repräsentative

Auswahl von Veröffentlichungen, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, die laterale und vertikale Größe der übertragenen Spots eingetragen ([12][13][49][50][51][52][38][22][53][23][54][55][56][57][58]). Der Bereich des Parameterraums, den die vorliegende Arbeit einnimmt, ist bislang unerforscht; vermutlich deshalb, weil die hier auftretenden Anwendungen und damit Nachweismethoden besonders empfindlich sind.

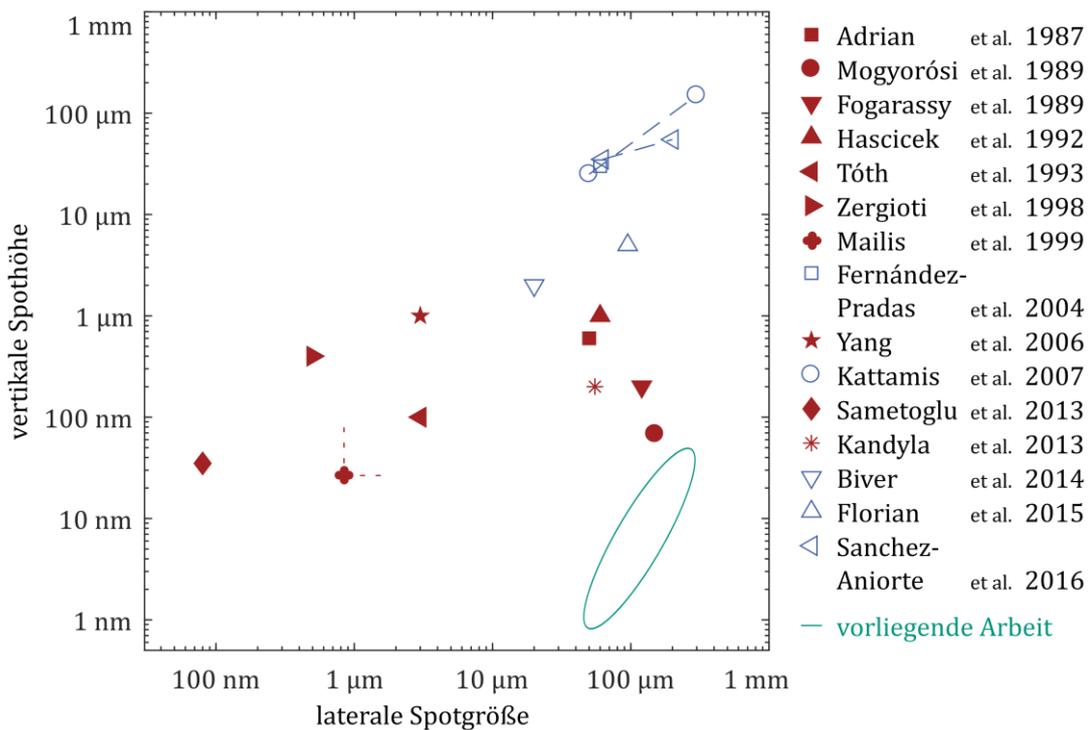


Abbildung 1.5: Kenngrößen ausgewählter LIFT-Implementierungen aus der Literatur. Gefüllte, rote Symbole bezeichnen Veröffentlichungen, in denen ursprünglich festes Material übertragen wurde; offene, blaue Symbole kennzeichnen flüssiges Übertragungsmaterial (sofern die Tropfenhöhe nicht angegeben worden ist, wurde der Tropfen als Halbkugelförmig angenommen). Linien im Diagramm geben einen Wertebereich an.

1.2.2 cLIFT

Die Verwendung von LIFT zur kombinatorischen Strukturierung werde als ‚combinatorial LIFT‘ (cLIFT) bezeichnet.

In Vorversuchen zu dieser Arbeit [59] war eine geeignete Substratarchitektur zum Übertrag von Matrixpolymer mit Aminosäurebausteinen gefunden und in einem Laser-Scanning-System [9] erprobt worden (Abbildung 1.6). In dieser Arbeit wurde dies weiter systematisch untersucht, der Wirkungsmechanismus des Übertrags geklärt und das Verfahren in seinen prozesstechnischen, Hardware- sowie Softwareaspekten im Hinblick auf praktikable Anwendbarkeit und regelmäßige Nutzbarkeit durch Kollegen und Kooperationspartner optimiert.

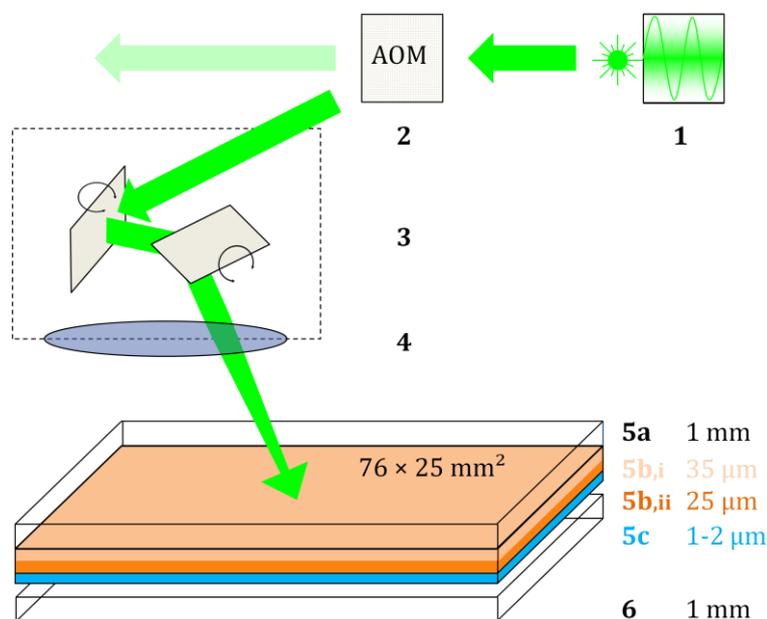


Abbildung 1.6: Schematische Skizze zur Substratarchitektur und Anlage von cLIFT. Der Strahl eines Dauerstrichlasers (1) wird von einem akusto-optischen Modulator (2) moduliert und in einem Scanhead (3) mit fθ-Linse (4) abgelenkt. Er trifft auf einen Glasobjekträger (5a) und wird von einer Absorptionsschicht (5b – 5b,i Klebeschicht und 5b,ii eigentliche Polyimid-Absorptionsschicht) absorbiert. Durch die entstehende Wärme wird Material von einer dünnen Materialschicht (5c) auf einen Akzeptorslide (6) mit funktionalisierter Oberfläche übertragen. Donorslide (5a-c) und Akzeptorslide (6) liegen dabei lose aufeinander. Für verschiedene Materialien können verschiedene Donorslides angefertigt werden und mit diesen dann sequenziell eine kombinatorische Strukturierung vorgenommen werden.

1.3 Zum Aufbau dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, LIFT für die Herstellung von biomolekularen Arrays, insbesondere Peptidarrays, zu adaptieren. Dazu waren die ‚cLIFT‘-Implementierung des laserinduzierten Vorwärtstransfers systematisch zu untersuchen (nach den im Kapitel 3 beschriebenen Methoden), die ablaufenden physikalischen Vorgänge zu verstehen (Kapitel 4), der Prozess zu optimieren (Kapitel 5) und für eine weitergehende Automatisierung vorzubereiten (Kapitel 2) und bereits währenddessen für Gruppeninterne und -externe Nutzer zugänglich zu machen.

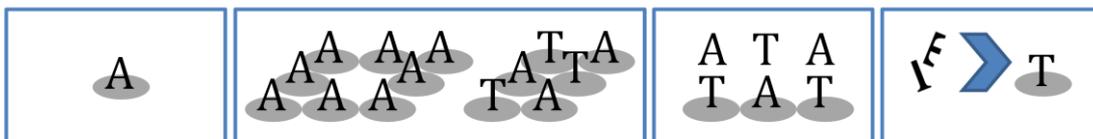


Abbildung 1.7: Komplexitätsstufen des kombinatorischen LIFT. V.l.n.r.: Einzelne Spots, Spots in einer Lage, mehrlagige Arrays mit einem oder mehreren Bausteinen, verallgemeinerte kombinatorische Synthese mit Bausteinen aus Bausteinen.

Der Aufbau dieser Arbeit orientiert sich an dem Übergang vom Einfachen zum Komplexen (Abbildung 1.7). Basis der Untersuchung ist die Beschäftigung mit dem Materialübertragsmechanismus als solchem (Kapitel 4) und der Auswirkung der verschiedenen Prozessparameter auf den Übertrag eines einzelnen Spots (Kapitel 5). Der nächste Schritt ist es, nicht nur einzelne Spots, sondern Muster von Spots zu übertragen. Dazu muss untersucht werden, wie flexibel cLIFT bezüglich der Materialwahl ist (Kapitel 5.4.2 und 5.4.3), aber auch, ob das sequenzielle Übertragen von benachbarten Spots besondere Auswirkungen hat und ob Donorslides in ökonomischer Weise mehrfach verwendet werden können (Kapitel 6). In der technischen Umsetzung ist absolute Ortsgenauigkeit zu gewährleisten (Kapitel 7). Der Aufbau mehrlagiger Arrays verlangt zusätzlich nach einer relativen Wiederholgenauigkeit und dazu nach einem System zur Erkennung von Positionsmarkierungen (Kapitel 8). Schließlich können nicht nur fertige Bausteine übertragen und miteinander verbunden werden, sondern Bausteine auch erst *in situ* aus Unter-Bausteinen synthetisiert werden; dies ermöglicht neue Möglichkeiten der Anwendung, aber stellt neue Anforderungen an den Prozess (Kapitel 9).

Die Arbeit ist ausführlich formuliert, um zukünftigen Mitarbeitergenerationen einen fundierten Einstieg in ihre eigenen Arbeiten zu ermöglichen. Damit die Detailfülle dennoch nicht zu Unübersichtlichkeit führt, wurde die Arbeit in modulare Kapitel aufgeteilt, die jeweils möglichst unabhängig gestaltet wurden und teilweise über eigene Zusammenfassungen verfügen. Somit können sich die verschiedenen Leserkreise auf die Themen ihres Interesses beschränken. Am Ende folgt eine Diskussion unter ausgewählten allgemeinen Gesichtspunkten (Kapitel 10).

2 Demonstrator

Für den Versuchsaufbau zur Untersuchung von cLIFT wurden bereits vorhandene Komponenten (aus den Arbeiten zu [9]) weiterverwendet, durch zusätzliche Bauteile ergänzt und in weiter verbesserter Form neu angeordnet. Es wurde darauf geachtet, dass die Steuerung auch von technischen Laien bedienbar ist. Mit fortschreitendem Projekt erschlossen sich chemische Anwendungsgebiete von cLIFT über die Herstellung von gewöhnlichen Peptidarrays hinaus, so dass diese in gesonderten Projekten von gruppeninternen Partnern erforscht werden konnten; Studierenden und Kollegen aus anderen Fachbereichen musste also ein geeigneter Zugang zur selbstständigen Benutzung der Anlage geschaffen werden. Grundlegende Schritte für den Übergang über einen *assisted workflow* hin zu einem automatisierten Demonstrator wurden unternommen.

2.1 Allgemeiner Aufbau der Anlage

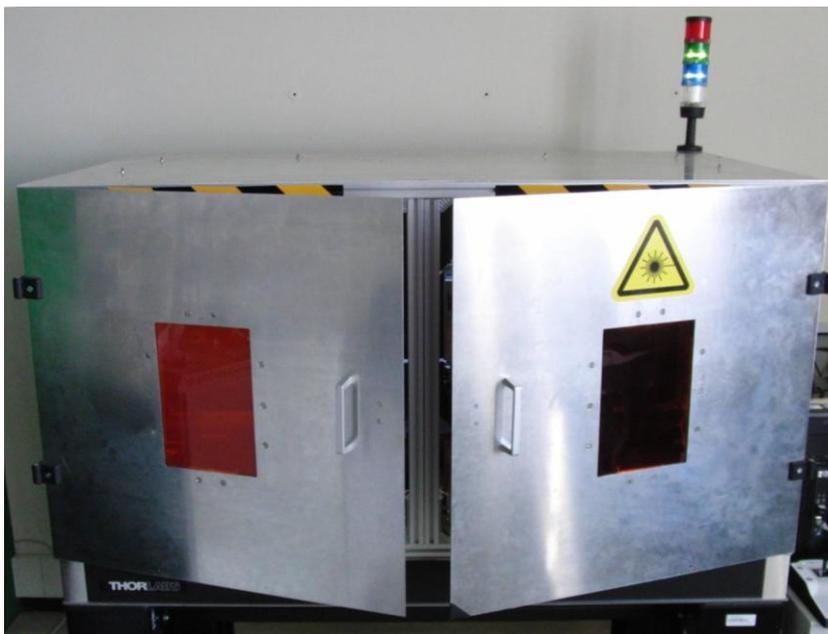


Abbildung 2.1: Die cLIFT-Anlage von außen. Rechts davon befindet sich ein Schreibtisch mit dem Steuerungscomputer und Netzteilen.

Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau des cLIFT-Systems von außen und Abbildung 2.2 beschreibt ihn von innen. Im Unterschied zu früheren Zusammenstellungen der Komponenten ([9], und eigene im Verlauf des Projekts) ist nun der Scanhead fest installiert und der Werkstückträger (die Slide-Ablagefläche) ihm gegenüber verfahrbar. Dies ist sinnvoll, da der Scanhead schwerer und mit strahlführenden Bauteilen fest verbunden ist. Außerdem ist nun die Kamera verfahrbar, was eine gleichbleibende Position des Werkstückträgers ermöglicht. Dies bietet gegenüber einer festen Kamera bei verfahrbarem Werkstückträger Vorteile:

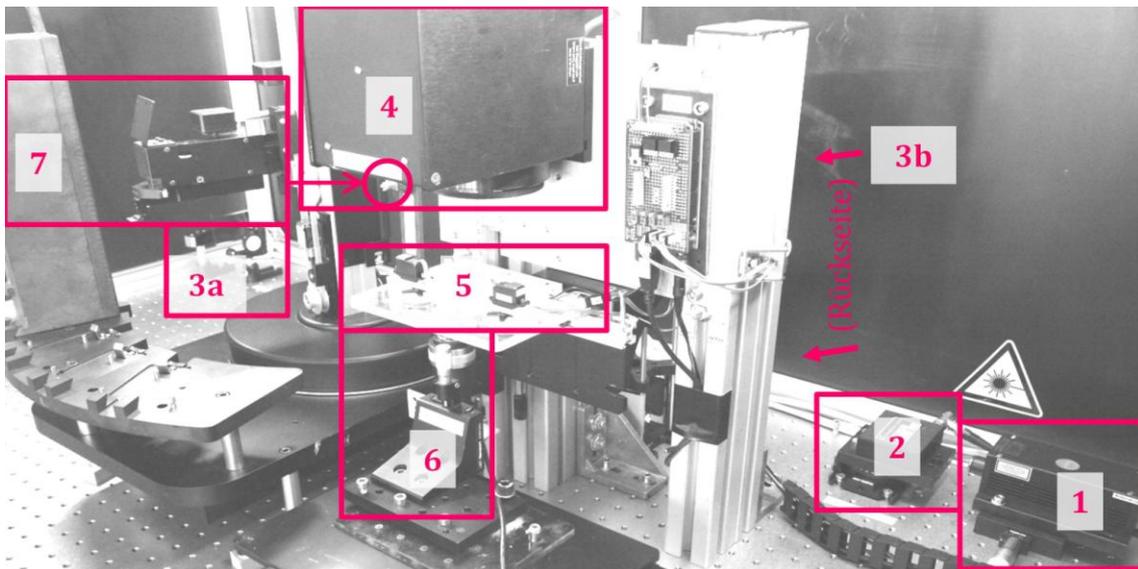
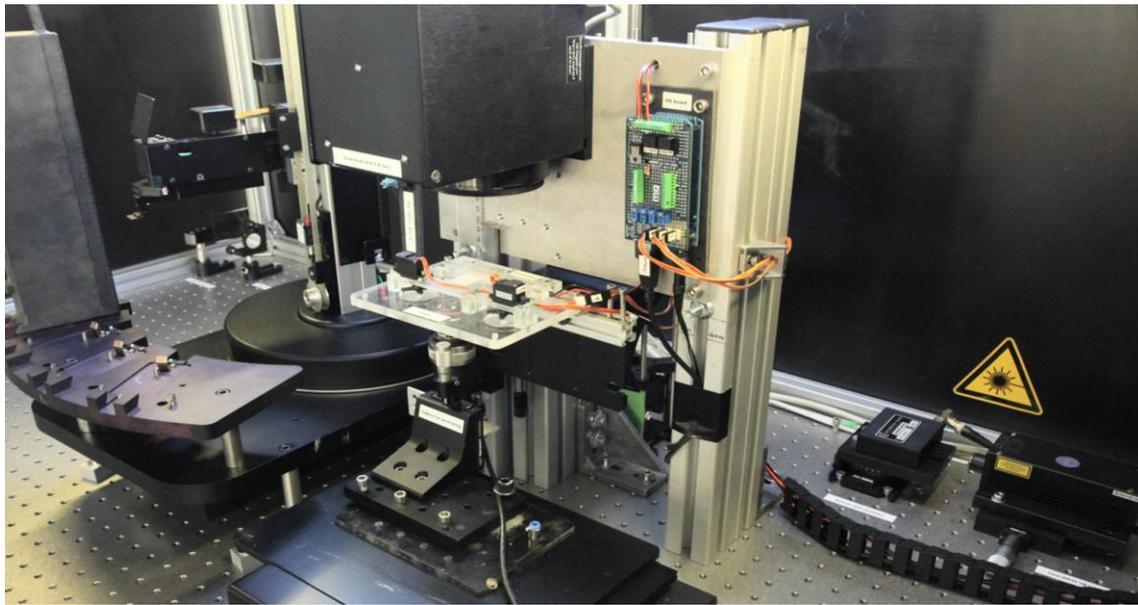


Abbildung 2.2: Innerer Aufbau der cLIFT-Anlage. Der Laserstrahl wird im Dauerstrich-Modus von einem diodengepumpten Festkörperlaser erzeugt (1 – FSDL-532-1000T, Frankfurt Laser Company) und mit einem akusto-optischen Modulator (2 – 002AF1, Polytec GmbH; mit einer 100 mm f- θ -Linse) in Millisekunden-Pulse moduliert. Dessen Teilstrahlen werden gespiegelt bzw. auf ein Leistungsmessgerät geleitet (3a – PM16-401, Thorlabs) und über weitere Spiegel auf der Rückseite (3b) in den Scanhead geführt (4 – hurrySCAN 10, Scanlab AG). Die Slides werden in einem eigens gefertigten Werkstückträger (5) fixiert bestrahlt. Eine verfahrbare Kamera (6 – CMOS-Kamera der DCC-Serie, Modell C0754G13C, Thorlabs; Objektiv: PLN 4XCX, Olympus GmbH; Tisch: SCANplus 100x100, Maerzhaeuser) dient zur Erkennung von Positionsmarkierungen und Testbestrahlungen. Ein sog. Slideloader (7 – PL200, Prior Scientific) wird als Werkstückzuführung erprobt; er benötigt einen Magneten als Höhenmarkierung (Kreis).

Zum einen lässt sich die Kamera komplett aus dem Bereich unterhalb des Slides herausfahren, was Platz für andere Messgeräte schafft. Zum anderen wird zur Bewegung ein Mikroskoptisch benutzt, der nur begrenzte Möglichkeiten zur Befestigung von Bauteilen auf oder an ihm bietet. Da der Werkstückträger nun unabhängig vom Mikroskoptisch besteht, konnte er komplexer gestaltet werden (Unterkapitel 2.3). Auf einen Kollimator im Strahlengang wurde verzichtet, da er keine merkliche Verbesserung des Prozesses brachte, dafür aber zusätzlicher Justage bedarf. Der freie Laserstrahl wurde so geführt, dass sich die vom zur Steuerung der Strahlleistung eingesetzten akusto-optischen Modulator ausgehenden Teilstrahlen möglichst weit voneinander entfernen, bevor der nicht benötigte Strahl 0. Ordnung ausgekoppelt wird (Abbildung 2.3). Somit wurde ein möglichst ungestörtes Strahlprofil des Teilstrahls 1. Ordnung erreicht. Als Strahlenke für den Strahl 0. Ordnung dient ein Leistungsmessgerät. Somit können unerwünschte Schwankungen der Laserleistung bemerkt und gegebenenfalls kompensiert werden. Zur schnellen Mitteilung des Anlagenstatus wurde eine Signalsäule angebracht und die Steuerungssoftware mit einer Sprachausgabe versehen. Die Türen des Gehäuses des Aufbaus sind nun horizontal statt vertikal zu öffnen; dies verbessert die Ergonomie.

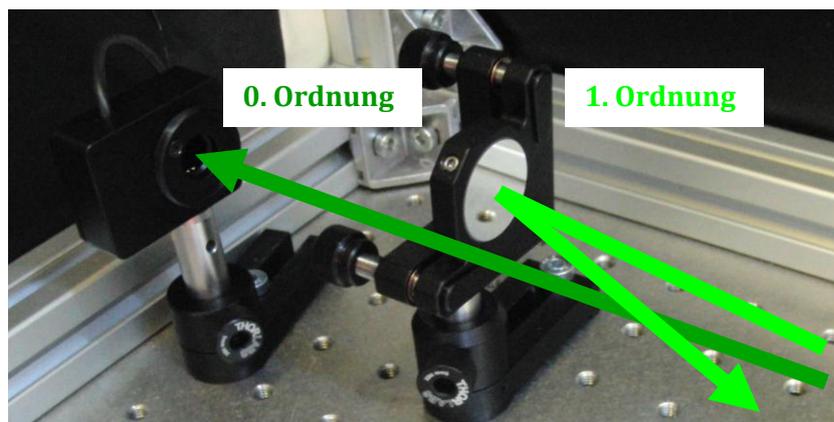


Abbildung 2.3: Überwachung der Laserleistung. Der nicht verwendete Teilstrahl 0. Ordnung des akusto-optischen Modulators wird auf ein Leistungsmessgerät geleitet.

2.2 Bedienelemente zur Justierung

Um die Justierung der Anlage zu erleichtern, wurden die wesentlichen Komponenten auf manuellen Koordinatentischen installiert (Abbildung 2.4; teils im Rahmen einer vom Verfasser betreuten studentischen Abschlussarbeit [60]). Zur Überprüfung der Korrektheit von deren Einstellungen wurden verschiedene Strategien entwickelt. Der richtige Abstand der Slide-Ebene vom Scanhead wird ermittelt, indem die Höhe eingestellt wird, während der Scanhead einen mit einem handelsüblichen wärmeempfindlichen Thermodrucker-Etikett (z.B. SLP-SRL, Zolemba GmbH) beklebten Slide bestrahlt und ein Raster aus gleichartigen Spots schreibt. Die Höhe muss so gewählt werden, dass die bestrahlten Punkte auf dem Etikett möglichst geschwärzt sind. Da das Thermopapier

relativ unempfindlich auf die Bestrahlung reagiert, ist dies nur im Bereich der Fokusebene der Fall. Der cLIFT-Materialübertrag hat einen größeren Tiefenschärfebereich (vgl. Kapitel 5.5.1). Somit kann der optimale Arbeitsabstand gut eingestellt werden. Die Kalibrierung des Slideloaders erfolgt am besten, wenn eine zusätzliche Mikroskopkamera so aufgebaut wird, dass in den einzelnen Schritten (im sog. *Debug-Modus* des Slideloaders) des Ablegens bzw. Aufnehmens der Slides die Position des Greifarms gut überprüft werden kann (Abbildung 2.5). Die Einstellung der Fixierungspositionen des Werkstückträgers erfolgt in dessen Kalibriermodus vor Ort (Abbildung 2.4/4).

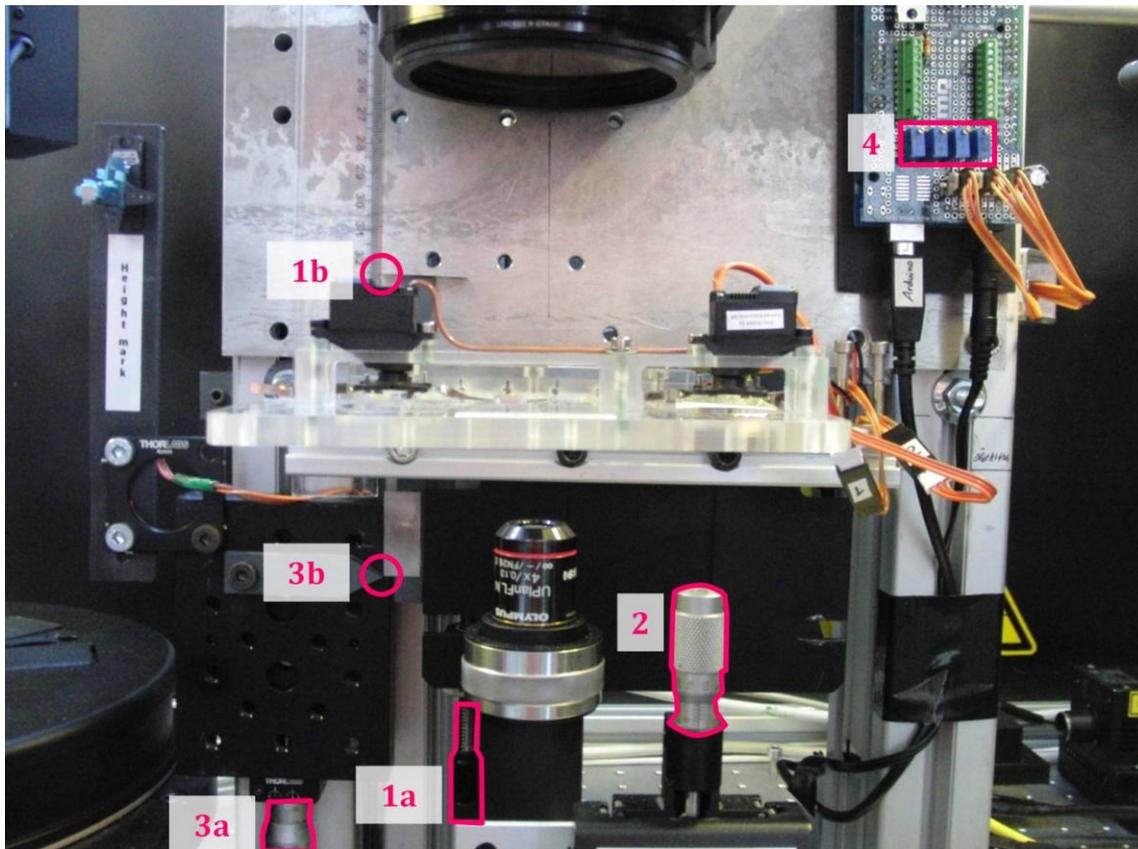


Abbildung 2.4: Bedienelemente zur Einstellung des Aufbaus. Der Abstand des Werkstückträgers zum Scanhead ist veränderlich (1a) und kann an einer Skala verfolgt werden (1b). Der Abstand der Kamera dazu kann entsprechend angepasst werden (2), so wie auch die Höhenmarkierung des Slideloaders (3a), die sich in gleichbleibendem Abstand zur beweglichen Slideebene befinden muss (3b). Die Positionen der Blattfedern des Werkstückhalters zur Slidfixierung können vor Ort eingestellt werden (4).

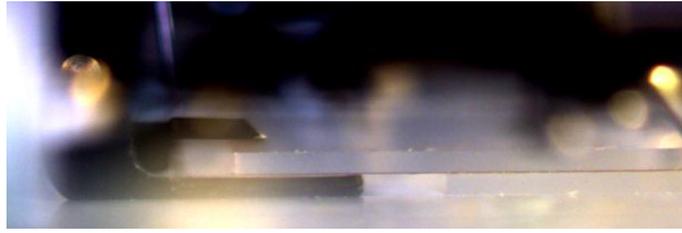


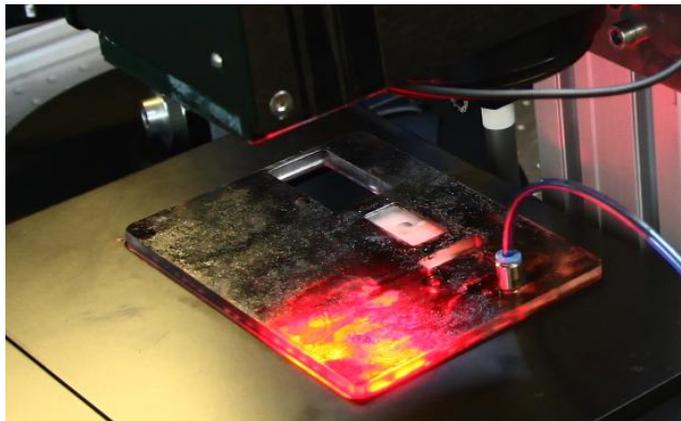
Abbildung 2.5: Bild einer zur Justierung eingesetzten Kamera. Hier wurde durch eine zusätzliche Mikroskopkamera die Höhe des Slideloaders überprüft, wenn dieser einen Donorslide auf dem Akzeptorslide ablegt. Die Dicke der Glassubstrate beträgt 1 mm.

2.3 Werkstückhalterung und -zuführung

Weil im Gegensatz zur früheren [9] Verwendung der verbauten Komponenten jetzt bei cLIFT nicht nur ein einzelner Objektträger prozessiert wird, sondern zwei Objektträger übereinander gelegt werden, musste insbesondere die Ablagefläche dieser Slides den neuen Anforderungen angepasst werden. Das normale Einsatzstück des Mikroskoptisches für Objektträger erwies sich als unzureichend.

Zunächst wurde ein neues Einsatzstück (Abbildung 2.6A) gestaltet, das den aufgelegten Akzeptorslide durch Unterdruck fixiert (im Rahmen einer vom Verfasser mitbetreuten studentischen Arbeit [61]) und das Aussparungen bietet, um die Positionsmarkierungen zu beobachten. Dabei war die Position des Slides aber nicht bestimmt, was ein Auffinden der Markierungen erschwerte. Zudem verrutschte der Donorslide beim Aufnehmen durch den Slideloader. Deshalb wurde im Rahmen einer vom Verfasser betreuten studentischen Abschlussarbeit [60] eine neue Werkstückhalterung (Abbildung 2.6B) konstruiert. Diese verfügt über eine möglichst große Aussparung zur Beobachtung des Slides, was aus experimentellen Gründen zu dieser Zeit notwendig war. Ein Anschlag definiert den Ort der Slides, Messungen zufolge auf $< 1,1 \mu\text{m}$ (gegenüber der langen Kante), bzw. $< 12 \mu\text{m}$ (gegenüber der kurzen Kante) genau. Er führt zudem den Donorslide beim Abnehmen. Die Fixierung des Akzeptorslides erfolgt durch vier Federbleche, die kostengünstig, durch eine überlegte Anordnung platzsparend von nur zwei Modellbau-Servomotoren verstellt werden. Die Fixierungsstellung der Motoren darf nicht zu weit bzw. kräftig gewählt werden, weil sich sonst Fluktuationen des internen Regelsignals als Vibrationen des Slides bemerkbar machen. Integriert sind in die Werkstückhalterung zudem Leuchtdioden zur Beleuchtung des Slides und seiner Positionsmarkierungen. Die Elektronik wird über ein *Arduino Mega*-Board mit dazu angefertigter Zusatzplatine bedient und wird vom Steuerungscomputer über eine virtuelle serielle Schnittstelle angesprochen.

A



B

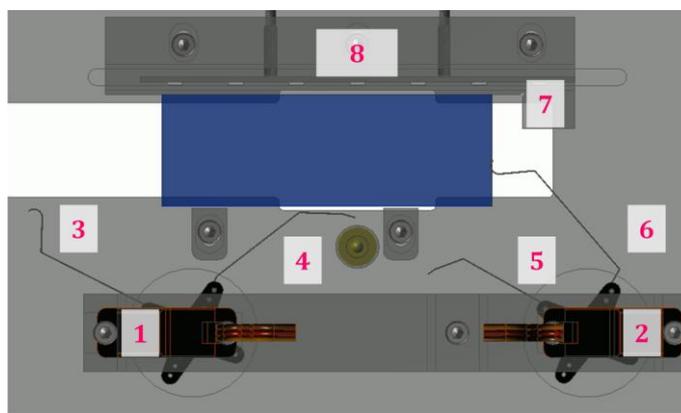


Abbildung 2.6: Werkstückhalterungen. (A) Ein erstes Modell zum Einlegen in den Mikroskopisch fixierte den Akzeptorslide durch Unterdruck. (B) Komplexeres Design [60]: Zwei Motoren (1 und 2) können den Slide durch Federbleche an einen Anschlag drücken (7). Dazu schiebt Feder (3) den Slide an die kurze Kante, Feder (4) an die lange Kante und Feder (5) fixiert ihn. Feder (6) kann den Slide wieder zurück nach links schieben und Feder (4) seine Position entlang der langen Kante des Anschlags ausrichten. In die Halterung ist auch eine seitliche Beleuchtung für Dunkelfeld-Aufnahmen der Positionsmarkierungen im Akzeptorslide integriert (8). Die Größe eines Slides (blau eingezeichnet) ist 76 mm × 26 mm.

In Vorbereitung auf eine zukünftige, noch weitergehende Automatisierung der cLIFT-Anlage wurde der Einsatz eines Werkstückwechslers erprobt. Dazu sollte ein sogenannter Slideloader (PL200, Prior Scientific) eingesetzt werden. Dieser besitzt einen um die Hochachse schwenkbaren Greifarm, der Slides aus fest platzierten Kassetten entnimmt, an beliebigem Ort ablegt, bzw. abnimmt und wieder zurücksteckt. Der Slideloader wird normalerweise mit einer in einen Mikroskopisch einsetzbaren Vorrichtung ausgeliefert, die die abgelegten Slides aufnimmt und fixiert. Dieser Mechanismus konnte aber in cLIFT nicht übernommen werden, da hier zwei Slides übereinander gelegt werden müssen, was nicht den eigentlichen Spezifikationen des Loaders entspricht. Die Anforderungen an eine Anlage für cLIFT – hier, dass ein Donor- auf einen Akzeptorslide gelegt werden muss – verlangen auch, dass die Slides in unterschiedlicher Höhe abgelegt werden. Die Höhe des Ablageorts ermittelt der Slideloader über einen Hall-Sensor aus einem in gewissem Höhenabstand zum Ablageort angebrachten Magneten. Hier musste ein Magnet also

höhenverstellbar montiert werden; dazu wurde er an einem Modellbau-Servo angebracht. In Versuchen mit der ersten Werkstückhalterung (Abbildung 2.6A) zeigte sich, dass die Slides beim Abnehmen dann nicht verrutschen, wenn sie einem mechanischen Widerstand ausgesetzt sind; in der neuen, dafür konstruierten Werkstückhalterung (Abbildung 2.6B) wird dieser durch einen Anschlag (Abbildung 2.6B/7) und eine Blattfeder (Abbildung 2.6B/6) dargestellt. Wenn Slides verrutscht aufgenommen werden, können sie nämlich unter Umständen nicht mehr in die Kassette zurückgesteckt werden. Zudem ermöglicht ein Anschlag eine definierte Endposition des Slides, wie sie für das schnelle Auffinden von Positionsmarkierungen oder gar den Verzicht auf Positionsmarkierungen nötig ist. Ein Anschlag birgt aber das Risiko, dass der Slide beim Ablegen dessen Kante berührt und dadurch beschädigt wird. Die Einstellung der Ablageposition ist, der Herstellerangabe zur Schrittweite des Drehgebers nach, bei ausgefahrenem Greifarm in Schritten von 1,9 mm am Ende des Slides möglich und deren Präzision dann womöglich in ähnlicher Größenordnung. Die Werkstückhalterung wurde deshalb an einem Koordinatentisch so befestigt, dass sie nach unten federnd nachgeben kann. Bei sorgfältiger Justierung der Anlage, die der Erfahrung nach, wohl durch thermische Ausdehnungen, nur etwa einen Tag Gültigkeit hat, ist es nichtsdestotrotz bereits möglich, automatisch Slides zu wechseln und einen Akzeptorslide mit verschiedenen Donorslides zu strukturieren; dabei sollte die Position des Akzeptorslides regelmäßig überprüft werden. Eine Lösung des geschilderten Problems (ein Anschlag ist nötig, aber ein Anschlag ist riskant) kann sein, den Slide zwar am Anschlag abzunehmen, aber in sicherem Abstand davon abzulegen. Dafür ist die Werkstückhalterung bezüglich des Akzeptorslides ausgelegt; allerdings müsste auch der Donorslide bewegt werden können. Zudem ist in der Steuerungsschnittstelle des Slideloader nicht vorgesehen, zwischen mehreren Ablage- bzw. Aufnahmeorten umzuschalten. Es wird dort von nur einem Ort ausgegangen. Eine andere Lösung des Problems kann eine andere Art eines Anschlags sein: Ein zentrierender Backengreifer könnte die Slides in eine definierte, zentriert liegende Position bringen und stellt beim Ablegen der Slides bei auseinandergefahrenen Backen kein Hindernis dar. Hierbei muss man allerdings in Kauf nehmen, dass Bauraum unter den Slides benötigt wird, der dann nicht mehr für Kamerasysteme zur Erfassung von Positionsmarkierungen zur Verfügung steht.

Ist der Zeitbedarf des Werkstückwechsels kritisch? Mit den in Kapitel 5.6 ermittelten Prozessparametern beträgt die reine Bestrahlungsdauer für ein komplettes Array mit 8750 Spots 44 s. Der Scanhead benötigt zusätzlich insgesamt etwa 491 s für die Sprünge zwischen den Spots, wenn 20 Donorslides abgefahren werden. Man beachte, dass die Schreibgeschwindigkeit mit den verwendeten Geräteeinstellungen etwa 100-fach langsamer wäre, den Laserstrahl statisch belassen und stattdessen der Slide mittels des Mikroskoptischs bewegt würde. Nach jeder Schicht müssen Kupplungsschritte (bei doppelter Kupplung zwei Ofenschritte von je 70 min inklusive Vor- und Nachbereitung) und nasschemische Prozessschritte (etwa 20 min und 75 min, jeweils inklusive manueller Handhabung) durchgeführt werden. Während dieser 235 min kann die cLIFT-Anlage also zur Strukturierung weiterer Slides genutzt werden, und zwar bei oben angegebener Dauer für 26 Slides, falls deren Platzierung, Positionserkennung und Wegnahme nicht

einberechnet würde. Derzeit können aber nur jeweils 7 Akzeptorslides gleichzeitig chemisch automatisch prozessiert werden. Bei 7 Akzeptorslides ist für jeden etwa eine halbe Stunde Zeit. Für jeden Slidebewegungsvorgang (Akzeptor- und Donorslides) während der Strukturierung eines Akzeptorslides mit 20 Bausteinen stehen also ungefähr 35 Sekunden zur Verfügung. Tatsächlich dauert es etwa 24 s, einen Slide mit dem Slideloader zu platzieren und 25 s, um ihn abzunehmen. Die Vorgänge sind also für die derzeitigen Gegebenheiten tolerabel schnell. Derzeit ist der Durchsatz durch das Fassungsvermögen der chemischen Anlage begrenzt. Deshalb wäre ein Werkstückwechselsystem mit einer Kapazität von 7+20 Slides ausreichend. Diese nehmen nebeneinandergelegt rechnerisch eine Fläche von weniger als einem A4-Blatt ein; daher sind auch andere Konzepte für ein Platziersystem denkbar. Andererseits ist die Kapazität des Slideloaders von 200 Slides genau ausreichend für den Grenzfall einer beliebig parallelisierten chemischen Anlage, für die in der gegebenen Zeit die oben genannten 26 Slides strukturiert werden müssten. Derzeit ist der Zeitbedarf des Werkstückwechsels allerdings nicht kritisch.

Sollte in Zukunft eine Erhöhung des Slidedurchsatzes gefordert werden, sind zwei Szenarien denkbar: Falls weiterhin die Werkstückwechselzeit länger ist als die Strukturierungszeit, könnten zwei – der symmetrisch aufgebauten – Slideloader den Scanhead von links und von rechts bedienen. Falls ein schnelleres Wechselsystem aufgebaut worden sein wird, ist die Zeit durch das Strukturieren begrenzt; da cLIFT ein schreibendes Verfahren ist, müssten dann mehrere Scanheads eingesetzt werden. Es könnte dabei ein Slide durch je zwei Scanheads, von oben und von unten, beschrieben werden.

2.4 Nutzerfreundliche Steuerung

Die eigentliche Steuerung der Anlage erfolgt mittels Software von einem Computer aus. Als Programmiersprache und -umgebung wurde MATLAB (The MathWorks Inc.) gewählt. Die dafür erhältlichen sog. Toolboxen – Funktionsbibliotheken, hier insbesondere für die Bildverarbeitung – und die direkte Erstellbarkeit von graphischen Benutzeroberflächen ermöglichten ein schnelleres Prototyping, als wenn die Steuerung in einer weniger abstrakten Sprache implementiert worden wäre. Für manche der Hardwarekomponenten (z.B. Relaiskarte für Signalleuchten) wurden dazu *wrapper*-Programme in C++ geschrieben. Über die Online-Plattform *File Exchange* (MathWorks) zum Austausch zwischen Nutzern wurden Zusatzfunktionen bezogen ([62][63][64][65][66][67][68]). LabVIEW (National Instruments) wurde nicht gewählt, weil sich bei der Verwendung von MATLAB im konkreten Fall die Steuerung direkter mit komplexer Auswertung und Visualisierung von experimentellen Messungen verbinden ließ. Allerdings erwies es sich als problematisch, dass die Möglichkeiten, parallele Abläufe zu programmieren, eingeschränkt sind; dies wäre aber nötig, um die verschiedenen Komponenten der Anlage unabhängig arbeiten zu lassen. Außerdem sind die Programme nicht ohne weiteres echtzeitfähig, und somit beispielsweise Vorhersagen über die verbleibende Prozessdauer einer Lasersitzung unzuverlässig. Da einige der Komponenten über Steckkarten

(Mikroskoptisch, Scanhead) für ,PC'-Computer (in Abgrenzung zu Plattformen der Speicherprogrammierbaren Steuerung) und softwareseitig von einem Microsoft-Windows-System angesteuert werden müssen (Slideloader), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht auf einem hardwarenäherem System aus der Automatisierungstechnik aufgebaut werden.

Neben automatisch ablaufenden Skripten wurde zur erleichterten Bedienung eine graphische Nutzerschnittstelle (*GUI*) erstellt, die Zugriff auf die wesentlichen Funktionen erlaubt (Abbildung 2.7A). Als wesentliches Designelement wurde ein Haupt-Display eingesetzt, auf dem sich je nach Bedarf eine Vorschau des Laserauftrags, das Bild einer Beobachtungskamera oder der Mikroskopkamera anzeigen lässt (Abbildung 2.7B). Der Ort etwaiger Positionsmarkierungen wird von Hand bestimmt, entweder durch Verfahren der Kamera mit einem Joystick oder durch Anklicken im Haupt-Display. Wird ein Kreis als Positionsmarkierung eingesetzt und sein Mittelpunkt aus mehreren angeklickten Punkten auf dem Kreis automatisch ermittelt, erreicht man dabei eine Genauigkeit von 25 μm (aus 4 Punkten, 25 Wiederholungen nach zufälliger Positionsänderung) bis hin zu 1,8 μm (selber Datensatz, ohne einen offensichtlichen Ausreißer). Dies ist ausreichend für cLIFT (vgl. Kapitel 7.4). Es ist auch möglich, durch Anklicken gezielt einzelne Punkte bestrahlen zu lassen, um damit beispielsweise Positionsmarkierungen auf einem Donorslide zu schaffen. Die Programmeinstellungen werden zur Ermöglichung späterer Fehlersuche automatisch in ein Logbuch gespeichert. Wenn ein Bestrahlungsauftrag gestartet wurde, wird ein Fortschrittsbalken angezeigt; der Laserauftrag kann abgebrochen werden. Der Status der Anlage wird auf dem Bildschirm farblich angezeigt, der Hardware-Signalsäule entsprechend, und als Sprachausgabe ausgegeben. Somit kann während der Prozessierung frei im Labor gearbeitet werden und dennoch Kenntnis über Statusänderungen erlangt werden.

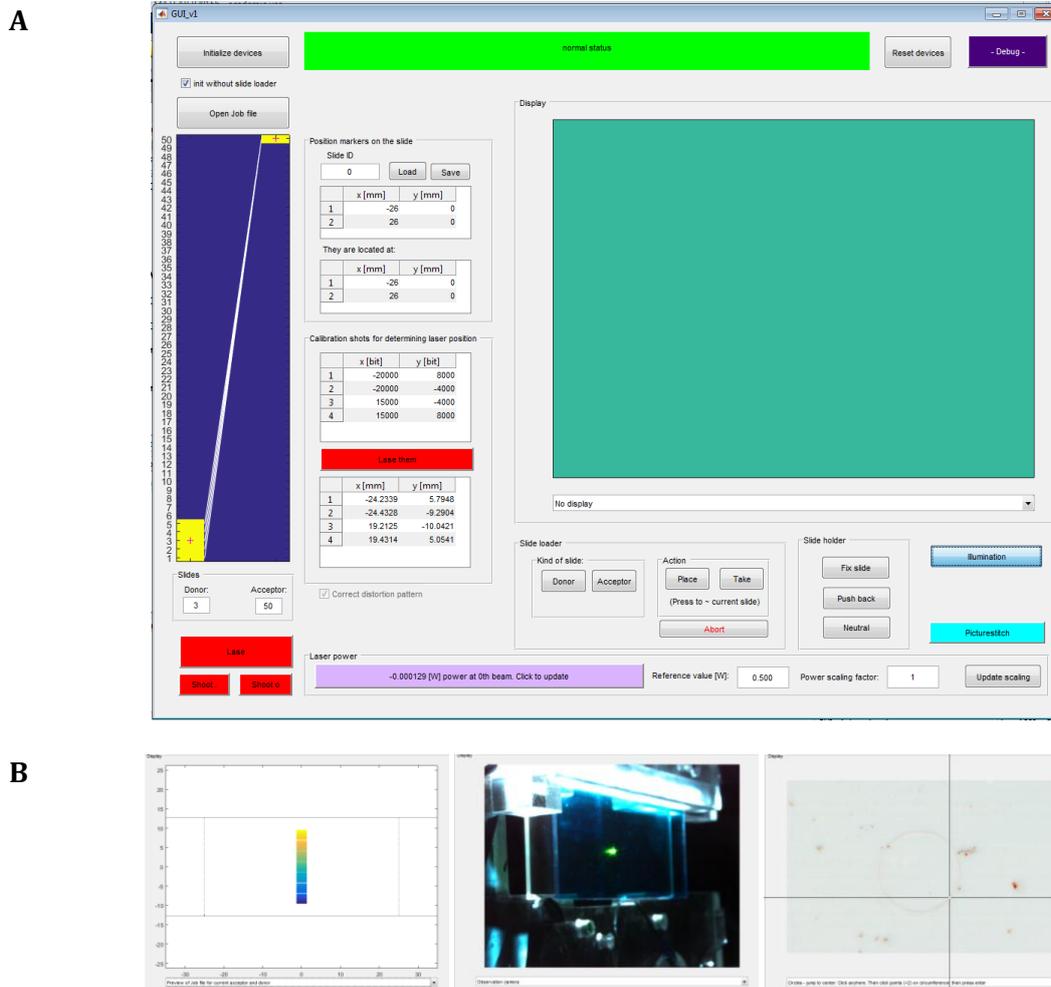


Abbildung 2.7: Bildschirmfoto der graphischen Benutzerschnittstelle der Steuerungssoftware. (A) Die wesentlichen Funktionen sind über Schaltflächen aufrufbar. Die Koordinaten von Ortsmarkierungen und Kalibrierpunkten werden in Tabellen eingetragen; die Umrechnung der Spotkoordinaten erfolgt automatisch. Das Grafikelement links visualisiert die Beziehung der in der ‚Job‘-Datei mit den Arraylayouts enthaltenen Donor- und Akzeptorslides und dient zu deren Auswahl. Der Farbbalken oben indiziert den Anlagenstatus. Das große, hier einfarbig ausgefüllte Element rechts ist das Haupt-Display (B). Es kann eine Vorschau des gewählten Jobs anzeigen (unten links), das Livebild einer Beobachtungskamera (unten Mitte) oder das Mikroskopbild zur Bestimmung der Markerpositionen (unten rechts).

Das Layout des zu strukturierenden Arrays wird der Software als Auflistung der Spotkoordinaten zusammen mit den jeweiligen Lasereinstellungen und Slidenummern übergeben. Zur Generierung dieser Koordinatenlisten wurden MATLAB-Skripte geschrieben, die beispielsweise Pixelgraphiken umwandeln oder gängige Parametervariationsmuster erzeugen. Im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [69] wurde ein Tool mit graphischer Nutzeroberfläche

(Abbildung 2.8) konzipiert, implementiert und von Kollegen benutzt. Es erwies sich als wichtig, dass bereits generierte Teilmuster per *copy-and-paste* vervielfältigt, aber dennoch abgeändert werden können müssen. Die Visualisierung der Spots erfolgte als Plot abgerundeter Rechtecke in ein axes-Objekt – durch `rectangle('Position', [x,y,D,D], 'Curvature', 1)` – dies ist bei großer Anzahl gerade auf älteren Computern zunehmend langsam. Es scheint vorteilhafter, die Vorschau als Pixelgraphik zu rendern, mit der Funktion `insertShape`. Darüber hinaus sollten in Zukunft Spots aufgefasst werden als hierarchisch gegliedert in einen ‚Spot‘ (begrenzter Ort auf dem Array), der aus einzelnen ‚Dots‘ (Materialportionen verschiedener Materialien) bestehen kann und diese gegebenenfalls aus einzelnen ‚Shots‘ (Bestrahlungen) zusammengesetzt werden; diese Struktur sollte im Programm objektorientiert abgebildet werden.

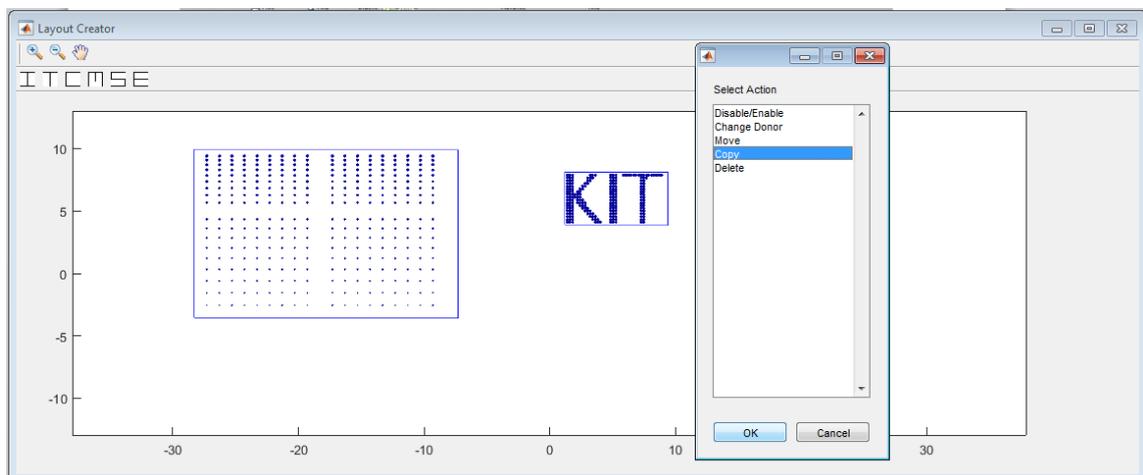


Abbildung 2.8: Bildschirmfoto eines Softwaretools zur Layouterstellung. Verschiedene grundlegende Muster können in interaktiven Nutzerdialogen erstellt und anschließend in der Vorschau verschoben, abgeändert, kopiert und gelöscht werden.

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und die Methoden zur Charakterisierung von cLIFT besprochen. Dies bezieht sich auf die Akzeptorslides, die Herstellung der Donorslides und die chemische Behandlung der Arrays mit dem Ziel der indirekten Sichtbarmachung der Spots mit bildgebenden Verfahren und dem Gewinnen von Kennzahlen daraus, und auf direkte geometrische Messungen der übertragenen Materialportionen.

Die Akzeptorslides sind kommerziell (PEPperPRINT GmbH) erhältliche Objektträger mit funktionalisierter Oberfläche (10:90 Poly(ethylenglycol)methacrylat und Methylmethacrylat). Die Fabrikation der Donorslides wird hier im entsprechenden Unterkapitel beschrieben.

Der Versuchsaufbau mit den Hardware- und Softwarekomponenten für den Materialübertrag ist im Kapitel 2 beschrieben. Er beinhaltet einen 1 W starken Dauerstrichlaser im sichtbaren Spektrum.

Die übertragenen Materialportionen können teilweise direkt gemessen werden (Unterkapitel 3.2), oder chemisch so prozessiert werden, wie es auch bei der Synthese eines Peptidarrays geschieht (Unterkapitel 3.2.3) und dann durch Fluoreszenzbildgebung sichtbar gemacht werden. Verschiedene Wege zur Extraktion von Kennzahlen aus den Fluoreszenzbildern werden aufgezeigt (Unterkapitel 3.4).

3.1 Herstellung von Donorslides

Für eine Skizze zum Aufbau der Donorslides sei auf Abbildung 1.6 im Einleitungskapitel verwiesen.

Als Substrate für die Donorslides dienen gewöhnliche Mikroskopie-Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) und in Spezialfällen Borosilikat-Waver (bei Durimide-Beschichtung).

Darauf wird als Absorptionsschicht von Hand oder unter Benutzung eines Laminiergerätes (Linea DH-360, Vivid Laminating Technologies) selbstklebendes ‚Kapton HN‘ (d.h. Polyimid; DuPont)-Klebeband (Artikelnummer 70110, CMC Klebetechnik GmbH) aufgebracht.

Alternative Absorptionsschichten bestanden aus schleuderbelacktem ‚Durimide 7505‘ (d.h. ein Polyimid-Präkursor; Fujifilm; 60 s mit 1500 rpm und 5000 rpm, 100 °C für 6 min, Belichtung, Postbake 330 °C für 1 h), mit doppelseitigem Klebeband aufgeklebter schwarzer Polyimidfolie (FI16035, Dr. Dietrich Müller GmbH), oder aus Graphit (GRAPHIT 33, CRC Kontakt Chemie), das als Sprühlack aufgebracht wurde.

Als Bausteine für die kombinatorische Peptidsynthese werden OPfp-aktivierte (Pentafluorophenyl) und Fmoc-geschützte (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) Aminosäure-derivate verwendet, die mit einem Matrixpolymer (SLEC PLT 7552, Sekisui Chemical GmbH) gemischt (15 mg/Slide in 135 mg/Slide; dies war von [70] optimiert worden) und durch Schleuderbelackung (SCC-200, Schaefer Technologie GmbH; Material gelöst in 1 ml Dichlormethan pro Slide; 80 rps, zügig auf das zu drehen beginnende Substrat aufpipettiert, ca. 30 s rotierend) als dünner Film aufgebracht werden. Ein für Testzwecke geeigneter, anderer Baustein – Biotin – weist eine schlechtere Löslichkeit, aber in der Bildgebung deutlichere Signale auf; deshalb wurden von diesem nur 8 mg/Slide eingesetzt. Andere Materialien und Bausteine, die in Spezialfällen übertragen wurden, sind an entsprechender Stelle im Fließtext erwähnt. Nach der Beschichtung kann die Rückseite der Slides beispielsweise mit Aceton gesäubert werden. Die Trocknung der Donorslides erfolgt einige Minuten lang durch Ausdampfen im Abzug, ihre Lagerung bei Raumluft in Aufbewahrungsboxen.

Die Schleuderbelackung (engl. *spin coating*) und insbesondere als materialsparendere potentielle Alternative das Tauchbeschichten (engl. *dip coating*) wurden im Rahmen einer vom Verfasser betreuten studentischen Abschlussarbeit [71] detaillierter untersucht. Als Tauchbeschichter wurde dabei ein RDC von Bungard Electronics eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den folgenden entsprechenden Abschnitten teilweise wiedergegeben.

3.1.1 Schleuderbelacken der Materialschicht

Beim Schleuderbelacken wird Material auf das Substrat aufgebracht und dieses in Rotation versetzt. Zentrifugalkräfte führen Material ab und dünnen die Schicht [72].

Es wurden verschiedene Spinkurven für die Beschichtung mit dem Matrixpolymer-Kunstharz, gelöst in Dichlormethan, aufgenommen und damit beschrieben, wie die Schichtdicke von Drehzahl und Materialkonzentration abhängt. Mit Drehzahlen von 70 rps bis 130 rps und Konzentrationen von 70 mg/ml bis 150 mg/ml erreicht man Schichtdicken von 0,5 μm bis etwa 2 μm . Die Zahlenwerte folgen dabei dem üblicherweise erwarteten Skalierungsverhalten als Potenzgesetz $h \sim \omega^p$ von Schichthöhe h und Drehrate ω , hier mit Exponenten p zwischen $-0,17$ und $-0,35$. Eine Reduktion der Konzentration der Lösung um die Hälfte führt zu einer etwa 60 % dünneren Schicht. Als Volumen zur Benetzung des Slides wird in allen Fällen etwa 1 ml benötigt. Eine Einsparung von Übertragungsmaterial lässt sich also bei gewünschter Schichtdicke in gewissem Rahmen über eine verringerte Konzentration und entsprechend angepasste Drehzahl erreichen.

Nachteile des Schleuderbelackens sind, dass es sich nicht für mehrere Substrate parallel durchführen lässt, und das abgeschleuderte, überschüssige Material sich nicht ohne Weiteres wiedergewinnen lässt. Beide Nachteile hat das Tauchbeschichten nicht.

3.1.2 Tauchbeschichten zur sparsameren Beschichtung

Beim Tauchbeschichten wird ein Substrat in das zu beschichtende Material eingetaucht und daraus herausgezogen. Je schneller mit Geschwindigkeit v gezogen wird, desto dicker (h) ist der zurückbleibende Film, für newtonsche Fluide nach dem Landau-Levich-Derjaguin-Gesetz der Beziehung $h \sim v^{2/3}$ folgend ([73], S. 123f.).

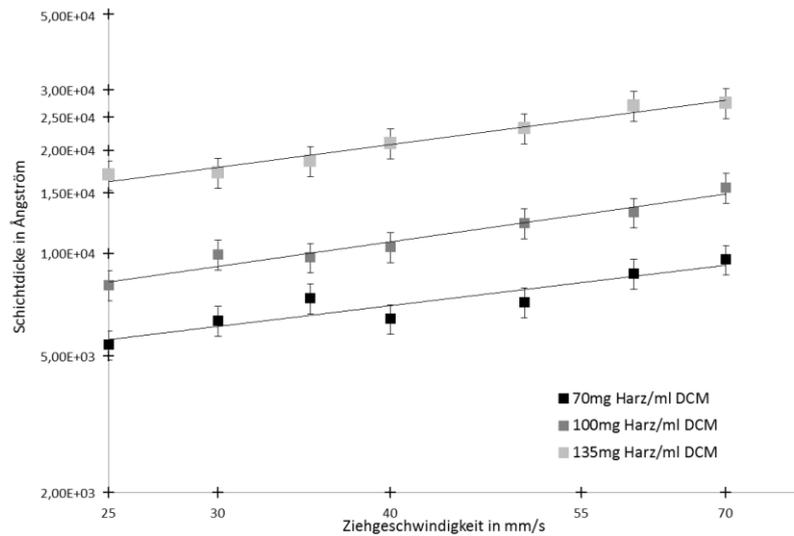


Abbildung 3.1: Kennlinien des Tauchbeschichtens. Aus [71]. Für verschiedene Materialkonzentrationen des „Harz“-Matrixpolymers in Dichlormethan (DCM) und Ziehgeschwindigkeiten wurde die resultierende Schichtdicke aus jeweils drei Messpunkten bestimmt. Je 10^4 Ångström – die Messeinheit des verwendeten Profilometers Dektak IIA (Bruker) – entsprechen einem Mikrometer. Die Daten sind in doppelt-logarithmische Achsen eingezeichnet.

Es wurde die Abhängigkeit der resultierenden Schichtdicke für verschiedene Konzentrationen des Matrixpolymer-Kunsthharzes in Dichlormethan und für verschiedene Ziehgeschwindigkeiten ermittelt (Abbildung 3.1). Erwartungsgemäß wurden dabei für die Beziehung $h \sim v^p$ Exponenten im Bereich von 0,65 bis 0,7 beobachtet. Es treten zwei unerwünschte Effekte auf, die den Prozess begrenzen (Abbildung 3.2): Bei langsamen Ziehen kann der Film instabil dünn werden, sodass am Rand des Substrats Filmabrisse entstehen und die Beschichtung dort entnetzt (engl. *dewetting*). Die nach Augenmaß gemittelte Tiefe des entnetzten Bereichs am Rand, also wie weit sich die Beschichtung zurückgezogen hat, wird in der Abbildung als „Filmabrissbreite“ bezeichnet. Der zweite Effekt ist, dass bei schnellem Ziehen und somit dicken Schichten sich an der Eintauchgrenze und am Substratende Überhöhungen bilden. Diese können zwar nachträglich entfernt werden, aber das stellt einen zusätzlichen Arbeitsschritt dar. Im Rahmen des Prozessfensters dazwischen lassen sich, ähnlich wie beim Tauchbeschichten, Schichtdicken von etwa $0,5 \mu\text{m}$ bis $2 \mu\text{m}$ erreichen.

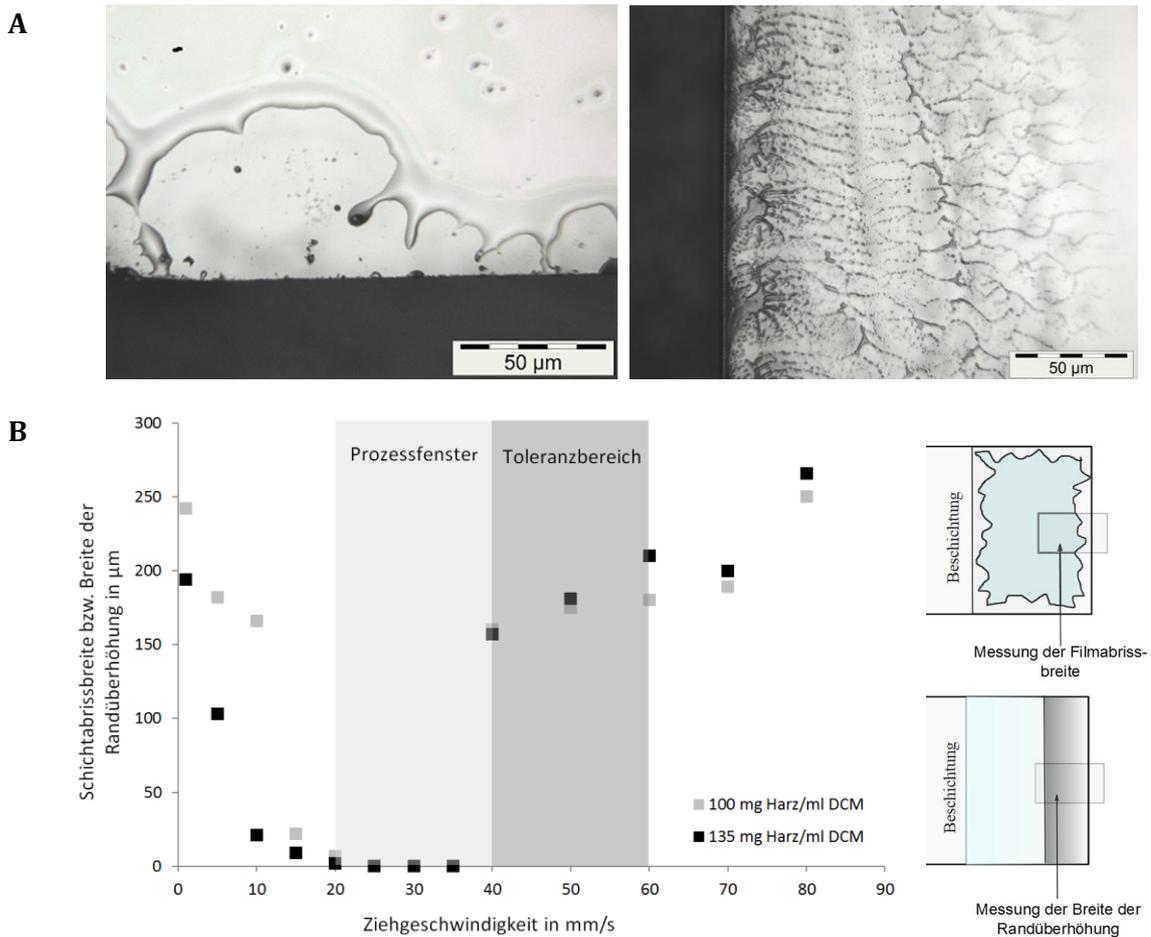


Abbildung 3.2: Grenzen des Tauchbeschichtens. Teilabbildungen aus [71]. (A) Unerwünschte Effekte: Randabriss bei kleinen Ziehgeschwindigkeiten (A links) und Randüberhöhungen bei großen Schichtdicken (A rechts). (B) Quantifiziert man diese Effekte (Skizze: B rechts), so bildet sich ein Prozessfenster für die Ziehgeschwindigkeit (B links). Bei Ziehgeschwindigkeiten < 40 mm/s ist der Randabriss aufgetragen, bei Ziehgeschwindigkeiten ≥ 40 mm/s die Breite der Randüberhöhung. Weil die Randüberhöhung zunächst nur an einem Ende auftritt, bei mit leichtem Versatz übereinander gelegten Donor- und Akzeptorslides also keine Rolle spielt, gibt es einen Toleranzbereich.

Es wurden zwei verschiedene Tauchbäder konstruiert, in die die Slides beim Tauchbeschichten eingetaucht werden. Es hatte sich gezeigt, dass eine Dichlormethan-Matrixpolymer-Lösung aus einem offenen Gefäß langsamer verdunstet als reines Dichlormethan. Wenn man zusätzlich die Diffusionsweglänge hin zur Raumluft auf 100 mm erhöht (Tauchbad 1, Abbildung 3.3 links), verdunsteten schon bei reinem Dichlormethan in 9 min nur 0,6 %. Verdunstungseffekte können dann also vernachlässigt werden. Ein zweites Tauchbad (Abbildung 3.3 Mitte) nutzt hingegen die Parallelisierbarkeit der Methode aus. Dort können in 5 Kammern jeweils zwei Slides (siehe Abbildung 3.3 rechts) eingetaucht werden. Die Slides werden mit Isopropanol benetzt und aufeinandergepresst; so haften sie durch Kapillarkräfte aneinander. Alternativ kann auch ein einzelner Slide rückseitig mit Adhäsionsfolie abgedeckt und alleine eingetaucht werden werden.

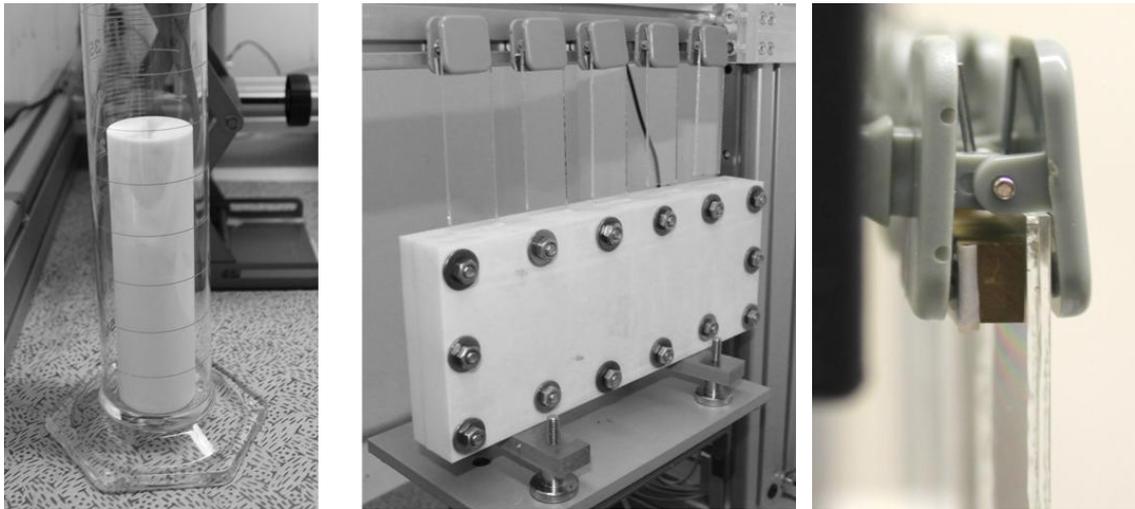


Abbildung 3.3: Tauchbäder. Aus [71]. Links: Das Tauchbad „1“ wurde aus einem PTFE-Zylinder gefertigt. Ein gläserner Messzylinder aus dem Laborbedarf minimiert die Verdunstung in die Umgebungsluft. Mitte: Ein anderes Tauchbad „2“ verfügt im Gegensatz dazu über fünf parallel zu benutzende Kammern. Jeweils zwei Slides können gleichzeitig eingetaucht werden (rechts).

Die Beschichtung auf einem Slide entspricht rechnerisch schätzungsweise 0,03 ml der ursprünglichen Lösung. Da beim Tauchbeschichten das überschüssige Material zurückfließt, entspricht das theoretisch einer 33-fachen Effizienzsteigerung gegenüber dem Rotationsbeschichten, bei dem überschüssiges Material abgeschleudert wird und verloren geht. Jedoch müssten zum Betrieb des Tauchbads zunächst 50 ml der Lösung bereitgestellt werden, um es zu füllen. Nicht alle der Bausteine sind in flüssiger Lösung lange genug stabil, bis alle mit der Lösung rechnerisch beschichtbaren Slides beschichtet wurden. Deshalb wird dann die große Menge an bereitgestelltem Material nicht ausgenutzt.

3.2 Charakterisierungsverfahren

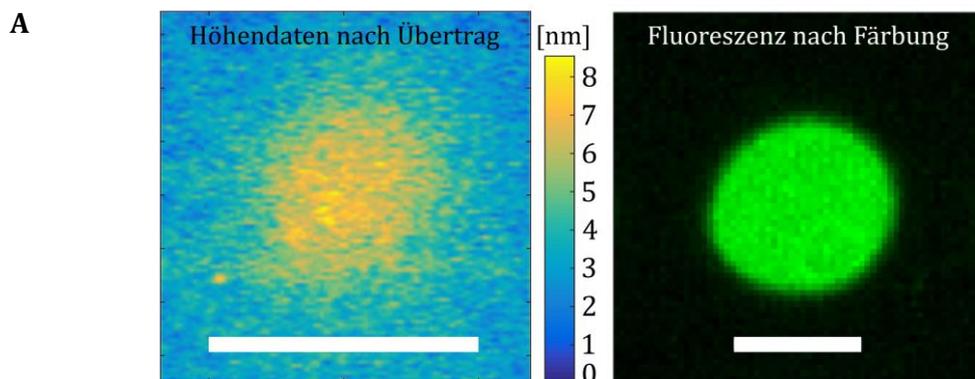
Der Materialübertrag durch cLIFT kann insbesondere an zwei Stellen im Peptidsyntheseprozess charakterisiert werden (für eine schematische Darstellung der Prozessschritte sei auf Abbildung 1.3 im Einleitungskapitel verwiesen). Zum einen kann das übertragene Materialpaket, bestehend aus Polymermatrix und ggf. eingebetteten Bausteinen, direkt nach dem Übertrag betrachtet werden – dies ist der allgemeine Fall, bei dem nicht zwingend von einer folgenden Peptidsynthese ausgegangen werden muss. Zum anderen kann die Charakterisierung nach den chemischen Schritten (Protokolle siehe Kapitel 3.2.3) erfolgen – das ist dann zwar nicht mehr die Auswirkung des Übertrags allein, aber das für die praktische Anwendung relevanteste Ergebnis.

3.2.1 Indirekte Messung

Die Charakterisierung nach den chemischen Schritten wird indirekt durch eine Färbung mit einem fluoreszenten Stoff und anschließender Bildgebung (zu deren Auswertung siehe Kapitel 3.4) vorgenommen. Dies ist ein hauptsächlich qualitatives Verfahren, bei der die Signalstärke als proportional zur Farbstoffmenge und diese wiederum als proportional zur nachzuweisenden Stoffmenge angesehen wird. Oft beeinflussen sich der Farbstoff und die Umgebung chemisch (beispielsweise in Abbildung 5.17; vgl. [74]). Die Intensität ist nach oben begrenzt, denn die Akzeptoroberfläche kann nur eine gewisse Stoffmenge an Baustein-Molekülen binden. Da eine eingehendere Analyse der chemischen Ausbeute und Reinheit nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist – dafür kämen photometrische Messungen abgespaltener Schutzgruppen, sowie Massenspektrometrie abgespaltener Syntheseprodukte eines kompletten Slides oder auch orts aufgelöst durch Sekundärionenmassenspektrometrie (*ToF-SIMS*) oder Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*MALDI*) in Frage – es sei dazu auf die Quellen [75] bzw. [76], [77] und das *supplemental material* von [78] verwiesen –, sondern die Größe der übertragenen Spots die wichtigste Kennzahl darstellt, ist der Fluoreszenznachweis ein ausreichendes Verfahren, sofern als ‚chemische‘ Randbedingung ‚gesättigte‘ und homogen erscheinende Spots angestrebt werden.

3.2.2 Direkte Messung

Die direkte Charakterisierung nach dem Übertrag ist mit Lichtmikroskopie im Normalfall nicht möglich, da die übertragenen Mengen zu gering sind. Über Weißlichtinterferometrie mit einem *vertical scanning interferometer (VSI)* bzw. *phase shift interferometry (PSI)* (ContourGT, Bruker) sind die Topographie messbar und übertragene Spots erkennbar. Üblicherweise wird hier der Welligkeitsanteil der Höhenprofile abgezogen. Allerdings ist die indirekte Messung nach Fluoreszenzfärbung empfindlicher (vgl. Abbildung 3.4A rechts und links), so dass über die direkte Höhenmessung vor den chemischen Schritten nur später längst ‚gesättigte‘ Spots gemessen werden können (Abbildung 3.4 unten).



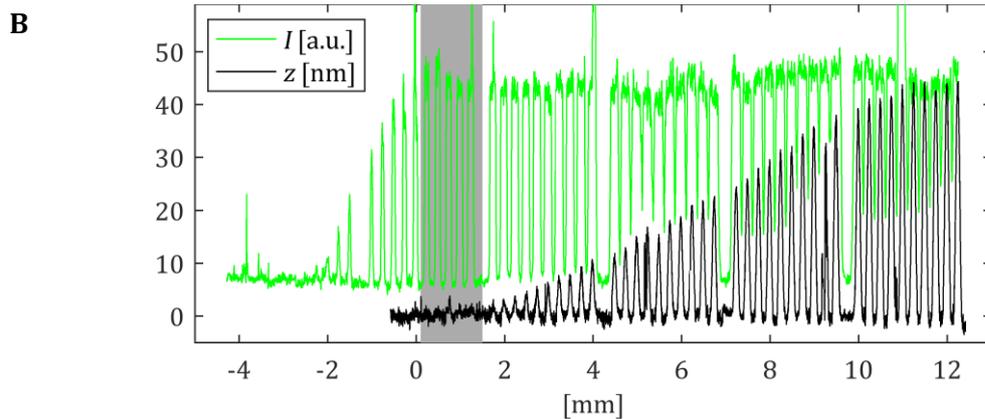


Abbildung 3.4: Direkte und indirekte Messung von übertragenen Materialportionen. (A) Aus bzw. (B) adaptiert von [78]. (A) Es werden sehr flache Materialportionen übertragen (links), deren Höhe teilweise unter der Messbarkeitsgrenze von Weißlichtinterferometrie liegt – bemerke, dass der im Fluoreszenzbild (rechts) sichtbare Bereich eines gleichartigen Spots größer ist. Die Länge des Maßbalkens beträgt in beiden Bildern 100 μm . (B) Vergleicht man einen Schnitt durch das Fluoreszenzbild eines Testmusters (Spots mit ansteigender ‚Stärke‘ des Übertrags) nach den chemischen Prozessschritten (grüne Linie) mit einem Schnitt durch die Höhendaten eines gleichen Testmusters direkt nach dem Übertrag (schwarze Linie), so stellt man fest, dass die Höhe erst messbar ist, wenn das Fluoreszenzsignal wegen der beschränkten Beladbarkeit des Akzeptorslides bereits in Sättigung ist. Die indirekte Messung über Fluoreszenz geht also Information verlustig, während die direkte Messung einen beschränkten Einsatzbereich hat; es entsteht eine ‚diagnostische Lücke‘ (grau eingezeichneter Bereich).

Das Aspektverhältnis der übertragenen Materialportionen ist sehr gering – etwa 1–10 nm Höhe auf 100 μm Durchmesser; das ist ein Verhältnis von 10^{-5} bis 10^{-4} , was etwa der Höhe einer oder einiger weniger Münzen auf der Fläche eines Fußballplatzes entspricht. Das übertragene Material ist außerdem nicht scharf begrenzt. Dementsprechend war es nicht möglich, Spots direkt mit einem Rasterelektronenmikroskop (Zeiss Supra 60VP) zu vermessen; lediglich bei Übertrag mit Einstellungen, die zu stark sind für die eigentliche Anwendung, entstanden sichtbare Strukturen. Jedoch konnten auch die ‚schwachen Spots‘ im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [79] sichtbar gemacht werden: Hierzu wurde der Akzeptorslide zunächst mit Gold beschichtet und dann der Materialübertrag vorgenommen. Da Gold leitfähig ist, das übertragene Material aber als Isolator wirkt, werden die Spots dann als ‚Schatten‘ abgebildet (Abbildung 3.5). Bei größeren Materialmengen sind Strukturierungen der übertragenen Schicht zu erkennen; diese können aber auch von der Goldoberfläche mitbestimmt worden sein und müssen nicht zwangsläufig auf einem normalen Akzeptorslide die selbe Gestalt haben.

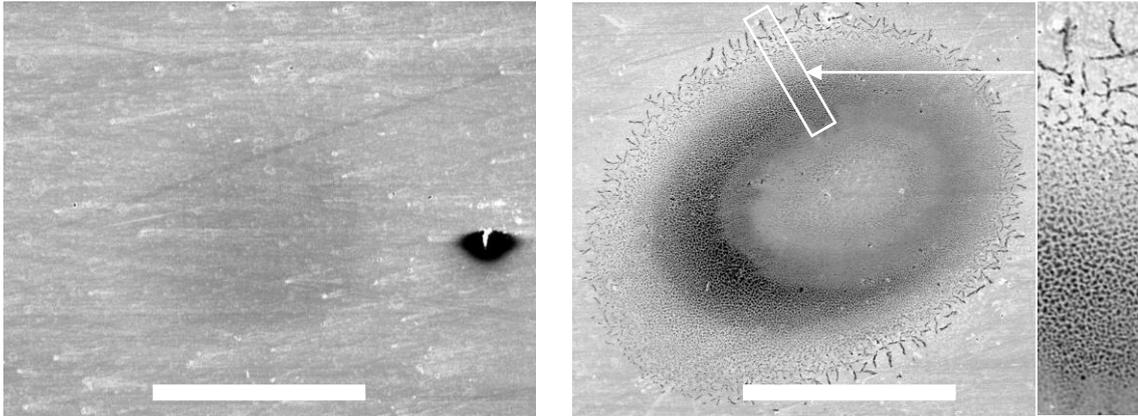


Abbildung 3.5: Direkter Nachweis von Spots mit einem Rasterelektronenmikroskop. Der Akzeptorslide war vor dem Übertrag mit Gold beschichtet worden. Das übertragene, nicht leitfähige Material erscheint auf den Aufnahmen schwarz (rechts: Übertragseinstellungen stärker als üblicherweise in dieser Arbeit gewählt) bzw. als ‚Schatten‘ (links: üblicherweise in diese Arbeit gewählte Übertragseinstellungen). Die Maßbalkenlänge beträgt 100 µm.

Bei der direkten Abtastung übertragener Materialportionen mit einem Rasterkraftmikroskop (DIMENSION icon, Bruker) im *tapping mode* ist der Spot im Phasensignal deutlich von freien Bereichen der Akzeptoroberfläche unterscheidbar (Abbildung 3.6). Dies ist aber ein, besonders im Vergleich zur Weißlichtinterferometrie, langsames Messverfahren, und seine hohe laterale Auflösung wird wegen des benötigten großen Bildfelds nicht ausgenutzt.

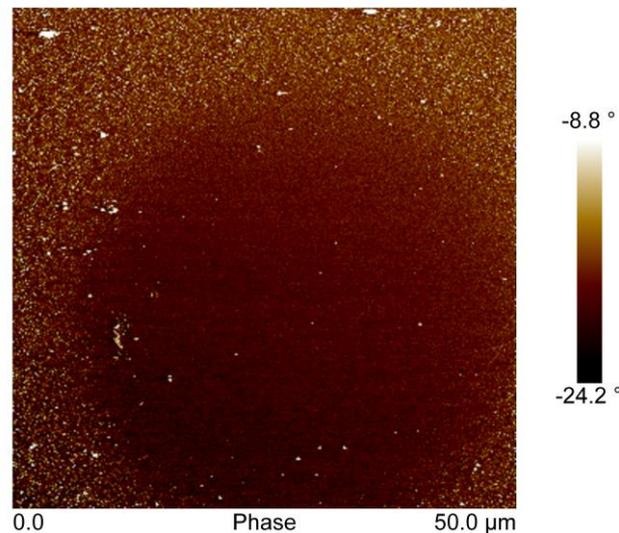


Abbildung 3.6: Direkter Nachweis eines Spots mit einem Rasterkraftmikroskop. Im Phasensignal des *tapping mode* hebt sich die übertragene, nicht weiter prozessierte Materialportion von der Akzeptoroberfläche deutlich ab.

3.2.3 Diskussion der Messmethoden

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass die direkte geometrische Messung der übertragenen Materialportionen nur in Spezialfällen möglich ist, bei denen mehr Material übertragen wird als für die Peptidsynthese benötigt, da die Materialhöhe sonst unter der Messbarkeitsgrenze liegt (bei VSI/PSI, REM mit Spots auf Goldsubstrat). Erschwerend kommt hinzu, dass das Aspektverhältnis gering ist und die Spots keine Kanten aufweisen (bei REM, AFM). Zumindest die Existenz von Spots kann nachgewiesen werden (Phasensignal im AFM). Aufgrund der nicht nötigen Vorbehandlung von Substraten und schnellen Messung ist hier das PSI das Messgerät der Wahl. Die indirekte Messung mittels Fluoreszenzanfärbung hat den Nachteil, dass durch Sättigung die geometrischen Informationen verloren gehen, aber den Vorteil einer Interpretierbarkeit als chemische Ausbeute, und ist bei der Übertragung von geringen Materialmengen unter den hier erprobten Messmethoden die einzig anwendbare.

Die ‚diagnostische Lücke‘ zwischen nur indirekt messbaren und direkt messbaren Spots (Abbildung 3.4 unten) könnte in Zukunft geschlossen werden, wenn das Matrixpolymer, das in den chemischen Schritten ja wieder entfernt wird, mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden werden könnte. Dies würde auch eine zerstörungsfreie Qualitätskontrolle direkt nach dem Übertrag ermöglichen. Wahrscheinlich muss die Verbindung von Farbstoff und Matrix chemischer Natur sein, da verschiedene Stoffe in cLIFT verschieden übertragen werden (vgl. Kapitel 5.4.2) und bei einer bloßen Mischung nicht garantiert werden kann, dass die eigentlichen Bausteine im selben Muster übertragen werden wie der Farbstoff.

3.3 Chemische Prozessschritte

Der Materialübertrag mittels cLIFT stellt nur ein physisches Übertragen dar; die eigentliche chemische Synthese wird danach in weiteren Prozessschritten durchgeführt (siehe Abbildung 1.3 im Einleitungskapitel): Die Kupplung der übertragenen Baustein-Moleküle an den funktionalisierten Akzeptorslide oder Bausteine vorheriger strukturierter Lagen erfolgte innerhalb einer mit Argon gefüllten Edelstahlkammer in einem temperaturgeregelten Laborofen. Die nasschemischen Schritte wurden von Hand in Petrischalen ausgeführt, oder automatisiert in einem speziellen Apparat [80]. Die jeweiligen Protokolle sind in Tabelle 1 aufgeführt; für die Zwecke der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine Unterschiede in den in der Arbeitsgruppe (vgl. auch [9][59][75][77][81]) gebräuchlichen Varianten.

Die Bildgebung erfolgte mittels Fluoreszenzscannern, insbesondere den Modellen Genepix 4000B (Molecular Devices) und InnoScan 1100 AL (Innopsys) bei normalerweise 532 nm Anregungswellenlänge mit 33 % bzw. ‚low‘ Laserleistung und einem *gain* [a.u.] der Photodetektoren von 600 bzw. 3. Die quantitative Auswertung der Scans wird im nächsten Unterkapitel beschrieben.

Tabelle 1: Protokolle der chemischen Prozessschritte

Abkürzungen			
DMF	Dimethylformamid		
ESA	Essigsäureanhydrid		
DIPEA	Diisopropylethylamin		
MEA	2-Methoxyethylamin		
MeOH	Methanol		
EE	Essigester		
DCM	Dichlormethan		
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,05 % Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)		
TAMRA NHS	(5/6-Carboxytetramethylrhodamin Succinimidyl) Ester		
US	Ultraschall; bei manuellen Varianten im Ultraschallbad / in Chemanlage [80] 20 W		
Kupplung	Variante A	Variante B	
	Slides in Behältnis geben, mit Argon fluten		
	- 90 °C in Ofen, für 60 min	- 90 °C in Ofen, für 90 min	
	Abkühlen lassen		
Waschen	Variante A	Variante B	Variante C (in Chemanlage [80])
	- 2 min Aceton, mit US - 2 × 2 min Aceton, ohne US	- 5 × 30 s Aceton, mit US	(falls danach zweiter Übertrag erfolgt; sonst direkt Blocken) - 1 min 5:95 MEA und Aceton, mit US - 1 min Aceton, mit US - 1 min MeOH, mit US
Blocken	- 30 min ESA und DIPEA in DMF 1:2:7 - 2 × 5 min DMF	- mind. 4 h ESA und DIPEA in DMF 1:2:7 - 3 × 5 min DMF - 1 × 2 min MeOH	- 3 min ESA und DIPEA in DMF 1:2:7, mit US - 15 min ESA und DIPEA in DMF 1:2:7, mit US - 1 min Aceton, ohne US und 1 min mit US - 1 min Aceton, mit US
Entschützen	- 20 min Piperidin in DMF 2:8		- 1 min Piperidin in DMF 2:8, mit US und 15 min ohne US - 1 min Aceton, ohne US und 1 min mit US - 1 min Aceton, mit US
	- 2 × 5 min DMF - 2 × 2 min Aceton	- 3 × 5 min DMF - 2 min MeOH	

(Trocknen mit ölfreier Druckluft)

Färben	Nachweis von Biotin	Nachweis von Aminosäuren	
		Variante A	Variante B
	- 15 min PBS-T - 30 min <i>blocking buffer</i> (Rockland) - 1 min PBS-T - 1 h DyLight (Thermo Fisher Scientific) konjugiertes Streptavidin und <i>blocking buffer</i> (Rockland) in PBS-T 1:500:5000 (Konzentration des Streptavidin in der Stammlösung: 1 mg/ml) - 3 × 3 min PBS-T - 2 min Wasser	- 10 min PBS-T - 45 min TAMRA NHS in PBS-T 1:20000 (Konzentration in der Stammlösung: 1 mg/ml) - 3 × 3 min PBS-T - Abspülen mit Wasser	- 2 h TAMRA NHS in PBS-T 1:10000 (Konzentration in der Stammlösung: 1 mg/ml) - 2 min Wasser - 5 min DMF - 2 × 5 min Essigester - 2 min MeOH - 1 min DCM

(Trocknen mit ölfreier Druckluft)

Alle Verhältnisangaben beziehen sich auf das Volumen.

3.4 Digitale Bildverarbeitung

Für die Analyse von Mikroarrays sind in den zu den Fluoreszenzscannern zugehörigen Softwarepaketen Werkzeuge enthalten. Auch das freie Programm ImageJ (imagej.nih.gov, National Institutes of Health, USA) bietet entsprechende Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurden MATLAB und seine *image processing toolbox* genutzt, um eigene Routinen zu implementieren, denn hierbei besteht große Flexibilität bezüglich der auszuwertenden Merkmale und der Methoden. Die meisten hier analysierten Spots haben keine ‚ideale‘ Form im Sinne von Symmetrie und scharfer Begrenztheit; es wäre dann nicht immer klar, was die Software eines Drittanbieters dann als Größe und Intensität des Spots interpretieren würde.

Bevor die absolute Ortsgenauigkeit der cLIFT-Anlage über komplette Slides hinweg gewährleistet werden konnte, und bei nachlässiger Kalibrierung auch danach, waren die Spotmuster über große Längenskalen hinweg verzerrt. Sie waren dann nicht über ein äquidistantes Raster auffindbar. Als Lösung wurde ein Skript programmiert, bei dem einzelne Ankerpunkte auf dem Fluoreszenzbild verschoben werden konnten und die Bildkoordinaten des übertragenen Spotmusters dann dieser Verzerrung entsprechend linear interpoliert wurden.

Die zu ermittelnden Kenngrößen sind letztlich Spotgröße- und Intensität; bei symmetrischen Spots sind sie ableitbar aus ihrem radialen Profil. Um einen Profilschnitt durch einen Spot legen zu können (Unterkapitel 3.4.1), muss sein Mittelpunkt bekannt sein. Ist er das nicht, oder hat der Spot beliebige Form, muss man das zweidimensionale Bild des Spots betrachten (Unterkapitel 3.4.2); dies ist aber bei überlappenden Spots nicht möglich.

Quantitative Fluoreszenzbildgebung ist stark anfällig für Ausreißer, die durch Kratzer (dunkle Stellen) oder Staubpartikel (helle Stellen) entstehen. Dies lässt sich nicht immer aus den abgeleiteten Zahlenwerten erkennen und ausschließen. Von den Färbeschritten können eingetrocknete Tropfenurrisse zurückbleiben. Die Statistik über die ermittelten Größen sollte deshalb am besten robust gestaltet werden, beispielsweise durch Verwendung des Medians statt des arithmetischen Mittels zur Bildung von Durchschnittswerten (vgl. Abbildung 4.1). Je nach Gleichmäßigkeit der Inkubation oder der Funktionalisierung des Substrates erkennt man in den Bildern außerdem globale Trends (Abbildung 3.7). Wenn Spots des Testmusters nicht ihrer Semantik nach, sondern zufällig über den Slide verteilt sind, lässt sich dieser systematische Fehler in eine Art Rauschen umwandeln (vgl. Abbildung 6.6).

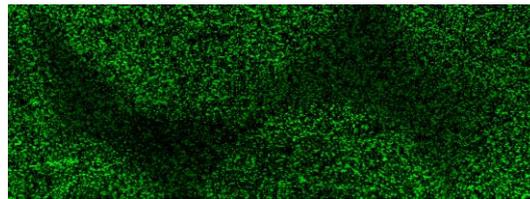


Abbildung 3.7: Inhomogen gefärbter Slide. Dargestellt ist ein Ausschnitt (ca. 18 mm \times 49 mm) aus dem Fluoreszenzbild eines Musters eigentlich gleichartiger Spots. Es wurde auf einem Orbitalschüttler gefärbt; möglicherweise stammt das Artefakt daher.

3.4.1 Eindimensionale Analyse

Um das radiale Intensitätsprofil eines Spots zu ermitteln (Abbildung 3.8; aus den Daten zu Abbildung 5.6), muss man zunächst seinen Mittelpunkt finden. Der Schwerpunkt aller Pixel über einer gewissen Schwellintensität kann diesen abschätzen, ist aber anfällig gegenüber hellen ‚Schmutz‘-Pixeln und ist nicht vorhanden, wenn der Spot als Ganzes weniger intensiv ist als der Schwellwert. Robuster ist es, die Symmetrie des Bildes auszunutzen. Das Zentrum von Punktsymmetrie lässt sich finden, indem für jeden Bildpunkt die Varianz von Pixelwerten entlang konzentrischer Kreise um den Punkt berechnet wird; diese muss minimal sein. Dieses Vorgehen wurde im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [69] erfolgreich erprobt. Es könnte auf ellipsoide Spots verallgemeinert werden. Bei kreisförmigen Spots ist es schneller, den Schnittpunkt der Symmetrieachsen des Bildes aufzufinden. Hierzu wird für jede Position u bzw. v auf den Bildachsen der Korrelationskoeffizient des Bildes links bzw. unterhalb der Position mit seinem ‚Spiegelbild‘ rechts bzw. oberhalb der Position berechnet. An der Position der wahren Symmetrieachse ist dieser Koeffizient maximal.

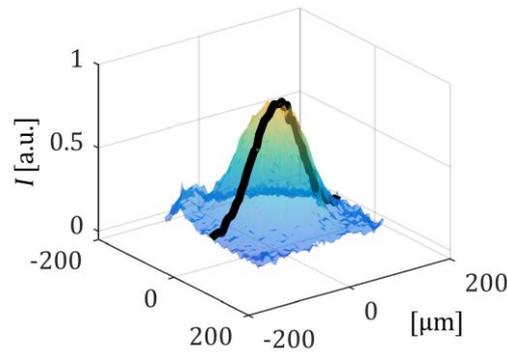


Abbildung 3.8: Plastische Darstellung des Fluoreszenzbildes eines typischen Spots. Über das Auffinden der Symmetrieachsen wurde sein Mittelpunkt ermittelt und eine Schnittlinie eingezeichnet. Bei elliptischen Spots wird die Breite unterschätzt.

Die Schnittlinie kann über die entsprechenden Spalten bzw. Zeilen in der Pixeldatenmatrix, oder über die Funktion `interp2` extrahiert werden. An eine so ermittelte Profillinie mit Pixelwerten $I(|r|)$ (man beachte, dass die Linie von ‚negativem‘ zu positivem Radius verläuft) kann bei Spots, deren Signal nicht in Sättigung geht, als gute Näherung die Summe von ein oder zwei Gauß-Funktionen angepasst werden (`fit`). Daraus lassen sich dann die (maximale) Intensität des Spots und sein ‚Durchmesser‘ ablesen. Als Durchmesser werde in dieser Arbeit die Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*) verwendet.

3.4.2 Zweidimensionale Analyse

An das Bild eines Spots, dessen Fluoreszenzsignal nicht in Sättigung geht, kann eine zweidimensionale Gaußfunktion angepasst werden und so maximale Intensität und Halbwertsbreite direkt ermittelt werden (Abbildung 3.9; aus den Daten zu Abbildung 4.1).

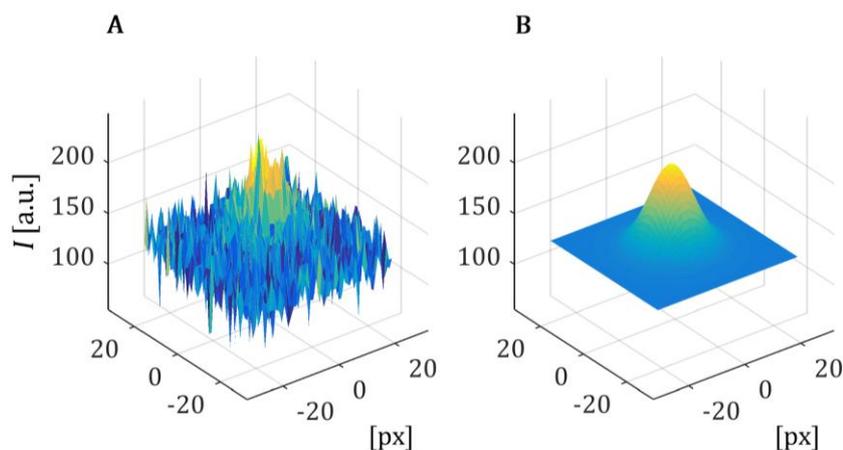


Abbildung 3.9: Modellierung eines Spots als zweidimensionale Gaußfunktion. (A) Darstellung der mittels Fluoreszenzbildgebung gewonnenen Messdaten und angepasstes Modell (B).

Bei gesättigten Spots kann man das Graustufenbild in Binärstufen umwandeln und den Spotdurchmesser als Äquivalenzdurchmesser der hellen Pixelfläche ansetzen. Der Schwellenwert für die Umwandlung ist dabei (z.B. MATLABS `im2bw`) aber nicht zwingend das halbe Spotmaximum, sondern, sofern nicht explizit angegeben, heuristisch zur Trennung von Bildvorder- und Hintergrund gewählt („*to minimize the intraclass variance of the black and white pixels*“; Dokumentation MATLAB, MathWorks,[82]). Dennoch können so Aussagen über die Form des Spots, beispielsweise die Exzentrizität, gewonnen werden (über `regionprops`; für Abbildung 5.28).

Das bevorzugte Vorgehen zeigt Abbildung 3.10. Hier wird als maximale Intensität des Spots der Median der $p = 5\%$ höchsten aller Pixelwerte des Bildausschnitts angenommen. Zuvor wurden der Bildhintergrund abgezogen und negative Pixelwerte auf Null gesetzt. Als Durchmesser wird der Äquivalenzradius der Fläche verwendet, die alle Pixel einnehmen, deren Wert mehr als die Hälfte dieser maximalen Intensität beträgt. Analog wird eine ‚Viertel-‘ und ‚Dreiviertelwertsbreite‘ bestimmt; deren Differenz voneinander kann als Maß dafür dienen, wie scharf der Spot begrenzt ist.

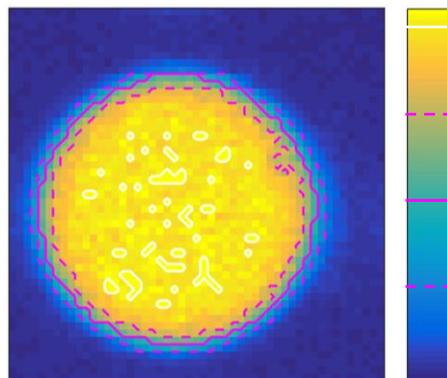


Abbildung 3.10: Ermittlung von charakteristischen Größen aus dem Fluoreszenzbild eines Spots. Der Median der 5 % hellsten Pixelwerte in beliebigen Einheiten (weiß eingegrenzt) ist die Intensität des Spots. Davon ausgehend bestimmt die Anzahl der Pixel, die heller als die Hälfte der maximalen Intensität sind, den (Halbwerts-)Durchmesser (magentafarbene durchgezogene Linie). Analog kann man die Breite des Spots auf 0,25 und 0,75-fachem Intensitätsniveau bestimmen (magentafarbene gestrichelte Linien) und damit eine Aussage über die Begrenztheit des Spots treffen. Die Auflösung des Bildes beträgt $5\ \mu\text{m}/\text{px}$.

4 Wirkungsmechanismus des Übertrags

Zu Beginn des Promotionsprojekts war unklar, wie der Materialübertrag bei der neuen LIFT-Implementierung ‚cLIFT‘ (siehe Abbildung 1.6 im Einleitungskapitel) vonstatten geht. Durch den schnellen Ablauf, die geschlossene Geometrie und die äußerst geringen Materialmengen entzieht sich dieser Vorgang einer direkten Beobachtung. Rückschlüsse können aus den indirekt durch Färbung sichtbar gemachten Fluoreszenzbildern der Spots und aus der Betrachtung der Donorslides nach deren Benutzung gezogen werden.

Eine später widerlegte Arbeitshypothese war zunächst, dass die Polyimidschicht des Donorslides durch Blasenbildung infolge der Bestrahlung delaminiert (wie bei [23]) und aufgeschmolzenes Material gegen den Akzeptorslide drückt. Dies hätte beispielsweise impliziert, dass eine besonders leicht delaminierbare Absorptionsschicht gefunden werden müsste.

In Experimenten zur gezielten Untersuchung des Wirkungsmechanismus konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Es stellte sich heraus, dass der Materialübertrag kontaktlos auch über Distanz hinweg (Unterkapitel 4.1) und nicht im Ganzen, sondern als Aerosol (Unterkapitel 4.2) erfolgt. Für die Praxis ist daraus ableitbar, dass es eher wichtig ist, dass Donor- und Akzeptorslide eine möglichst geringe Distanz zueinander haben. Da zudem die Wärmeleitung innerhalb des Slides ein dominierendes Phänomen ist (vgl. Kapitel 5), ist es beispielsweise nicht unbedingt ausschlaggebend, den Laserstrahl möglichst eng zu fokussieren.

Die erarbeiteten Modellannahmen zur Art des Materialübertrags wurden in einer numerischen Simulation überprüft (Unterkapitel 4.3). Dabei konnte die für die simulierten Bedingungen auftretende charakteristische konzentrische mehrteilige Spotmorphologie reproduziert werden.

4.1 Ausschluss eines Kontakt-Übertrags

Mit cLIFT kann Material über einen Abstand hinweg übertragen werden (Abbildung 4.1). Mit dem Abstand nehmen der Durchmesser der resultierenden Spots zu und ihre Intensität ab.

Postulierte man einen Kontaktübertrag durch eine drückende Blase oder sonstige Ausdehnung des Donors, erwartete man, dass die Kontaktfläche und damit die Spots mit zunehmendem Abstand kleiner würden. Wegen der Diskrepanz zwischen dieser Erwartung und den tatsächlichen Beobachtungen lässt sich diese Form des Übertrags ausschließen. Erst bei viel stärkerer Bestrahlungsstärke zeigten sich übertragene Materialportionen, die sich der intuitiven Vorstellung nach als per Kontakt übertragen deuten lassen (Abbildung 4.2); die Wärmewirkung der Bestrahlung ist dabei jenseits dessen, was sich im Experiment als für den Übertrag von Aminosäurebausteinen

verträglich erwiesen hat. Im Fluoreszenzbild wäre dann erkennbar, dass die Spots keine definierte Form mehr haben und die Intensität gering ist, was auf Beschädigung der Moleküle zurückzuführen ist. Im Parameterbereich ‚normaler‘ Bestrahlung beobachtet man solche delaminierten Materialportionen nicht.

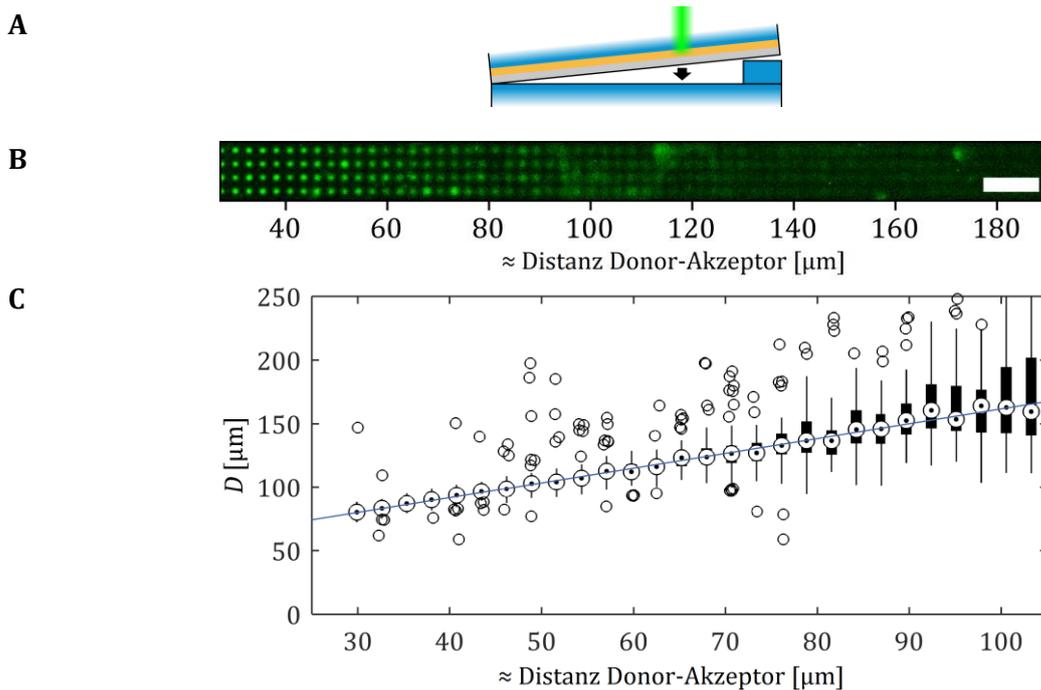


Abbildung 4.1: Materialübertrag über einen Abstand hinweg. (A) ([83], unveröffentlicht): Schema des Versuchs. Der Donorslide wird an einer Seite mit einem Abstandshalter auf den Akzeptorslide gelegt. Dadurch nimmt deren Distanz hin über den Slide hinweg zu. Die Steigerung der Distanz ist so gewählt, dass sie auf der Länge eines Spots vernachlässigbar ist. (B) (aus [78]): Ausschnitt eines Fluoreszenzbild von bei einem solchen Experiment übertragenen Spots aus Biotin. Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm. (C) (aus [78]): Darstellung des Spotdurchmessers D (Halbwertsbreite) in Abhängigkeit der beim Transfer überwundenen Distanz („Dist.“) als *box plot* (ermittelt aus jeweils 31 gleichartigen Spots), bestehend aus Median (Kreise mit Punkt), dem Bereich zwischen den umliegenden Quartilen (schwarze Balken) und dem Wertebereich der Spotgrößen (schwarze Linien; falls es Daten gibt, die weiter entfernt vom Balken liegen als der 1,5-fache Interquartilabstand, werden diese als Ausreißer aufgefasst und nicht in die Linie integriert, sondern separat als Kreissymbol eingetragen). Die durchgezogene blaue Linie ist eine Regressionsgerade durch die Medianwerte.

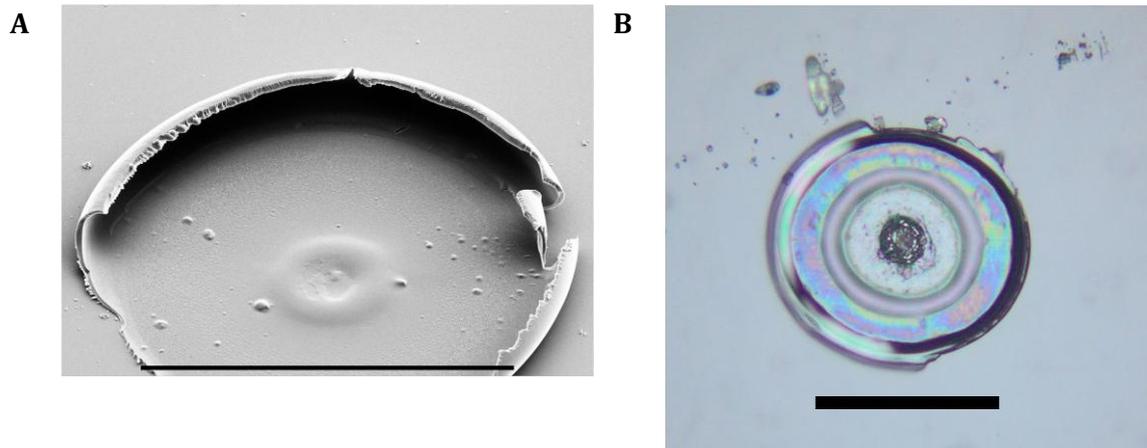


Abbildung 4.2: Kontaktübertrag bei sehr starker Bestrahlung. „Stark“ bedeutet hier, dass die übertragenen Moleküle durch die Hitzewirkung geschädigt würden, was sich im Fluoreszenzbild durch geringe Intensität zeigen würde. Außerdem hätten die Spots keine definierte Form mehr. Deshalb wird solch ‚starke‘ Bestrahlung nicht in der Herstellung von Peptidarrays mit cLIFT verwendet, sondern schwächere Lasereinstellungen; es soll an dieser Stelle allerdings verdeutlicht werden, dass Kontaktübertrag durch LIFT prinzipiell möglich ist und wie er aussehen würde. (A) Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der übertragenen Materialportion auf dem Akzeptorslide. Bei normaler Bestrahlungsstärke wäre wegen des kleinen Aspektverhältnisses und unscharfer Begrenzung im REM-Bild nichts erkennbar. (B) Die entsprechende Stelle auf Donorslide, mit einem Lichtmikroskop aufgenommen. Teilweise wurde die komplette Materialschicht übertragen. Bei dem üblichen Übertrag mit cLIFT bleibt jedoch ein Großteil des Übertragungsmaterial auf dem Donorslide zurück. Die Länge der Maßbalken beträgt jeweils 100 μm .

Wie kann der Übertrag bei cLIFT aktuiert worden sein? Bei manchen LIFT-Implementierungen (vgl. Kapitel 1.2.1) wird er durch eine Blase (engl. *blister*), die die Donorbeschichtung delaminiert, ausgelöst. Es stellte sich bei cLIFT allerdings heraus, dass im Donorslide gegebenenfalls auftretende Blasen *in* (Abbildung 4.3) und nicht *unter* der Absorptionsschicht liegen; erst bei Bestrahlung mit höherer Leistungsdichte durch eine stärker fokussierende Linse tritt Delamination auf (Abbildung 4.4). Der Materialübertrag konnte aber auch überhaupt ohne Blasen als Begleiterscheinung gelingen. Ferner ist nicht davon auszugehen, dass eine mechanische Ausdehnung der Absorptionsschicht das Übertragungsmaterial ‚weschleudert‘, denn nicht nur mit Polyimidfolie, sondern auch einer dünnen Graphitbeschichtung auf dem Glassubstrat war Übertrag möglich (vgl. Kapitel 5.3). Eine dadurch nicht auszuschließende andere These ist es jedoch, dass Reste des Lösungsmittels vom Aufbringen des Übertragungsmaterials (Kapitel 3.1.1) durch die Wärmewirkung des Laserstrahls verdampfen, ferner sich diese Gase zusätzlich ausdehnen, dabei Material mit sich reißen und somit das Material in einer Zweiphasenströmung vom Donorslide auf den Akzeptorslide übertragen. Die Beobachtungen im nächsten Unterkapitel stützen diese These.

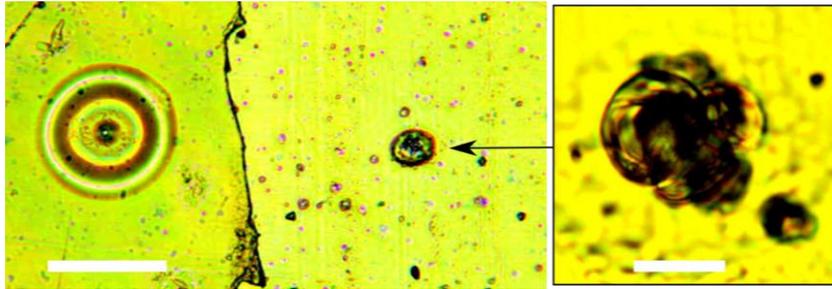


Abbildung 4.3: Lichtmikroskopbilder eines Donorslides nach dem Materialübertrag. Aus [78]. In der rechten Hälfte des Bildes, das zwei Bestrahlungsorte zeigt, wurde die Übertragungsmaterialschicht entfernt und somit die Absorptionsschicht freigelegt. In der Materialschicht bildet sich eine Ringwall-förmige Struktur, innerhalb der Absorptionsschicht eine Traube von Gaseinschlüssen. Die Länge des Maßbalkens im großen Bild (Auflicht) beträgt 100 μm , die dessen im Ausschnitt (Durchlicht) 10 μm .

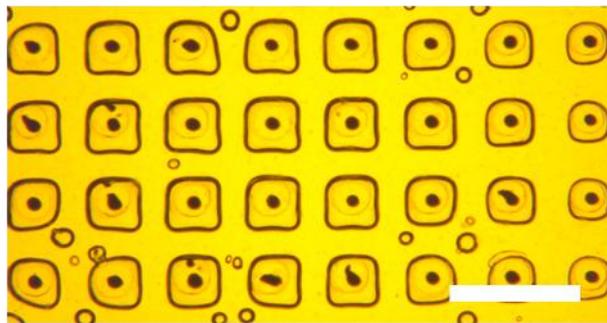


Abbildung 4.4: Delamination von Kapton-Klebeband. Bei höherer Leistungsdichte, erreicht durch eine stärkere Linse als die bei den restlichen Versuchen der Arbeit eingesetzte, delaminiert die Absorptionsschicht an den bestrahlten Orten. Man beachte, dass die sich bildenden Blasen dem Spotmuster folgend eine rechteckige Form einnehmen. Die Länge des Maßbalkens beträgt 500 μm .

4.2 Übertrag als Aerosol

Im letzten Abschnitt wurde postuliert, dass das Übertragungsmaterial in einer Zweiphasenströmung übertragen wird. Die Gasphase besteht dabei aus verdampften und expandierten Lösungsmittelresten des Beschichtungsvorgangs. In diesem Abschnitt wird nun überlegt, in welcher Form das Material dabei vorliegt. Es ist wenig wahrscheinlich, dass es ebenfalls gasförmig wird, weil unter normalem Raumdruck gearbeitet wird und dann eine Verdampfung von Polymeren nicht zu erwarten scheint. Es ist davon auszugehen, dass das Material in festen oder zumindest ‚flüssigen‘ (das Matrixpolymer hat keinen Schmelzpunkt, sondern einen Glasübergang [70]) Portionen übertragen wird. Die Frage ist, ob als Ganzes, oder in dispergierter Form – letzteren Fall kann man als Aerosolübertrag bezeichnen; dieser wird in diesem Kapitel nachgewiesen.

Oft zeigen die Spots im Fluoreszenzbild (Abbildung 4.5) einen ringförmigen Hof (‘Ring’). Dieser ist mehr oder weniger vom Inneren des Spots (‘Kern’) abgegrenzt. Deshalb kann das Material nicht als ein einzelnes Paket übertragen worden sein. Die Tatsache, dass sich die Ringe benachbarter Spots konstruktiv im Bereich des Zwischenraumes zwischen Kern und Ring überlagern können, zeigt, dass es bei diesem dunklen Zwischenraum nicht lediglich um ein Zerstörungs- oder Quenching-Artefakt handelt (durch zu hohe Temperaturen hätten die zu übertragenden Moleküle zerstört werden können; bzw. bei Fluoreszenzbildgebung kann aus verschiedenen Gründen Fluoreszenzauslöschung stattfinden und falsch-negative Ergebnisse liefern).

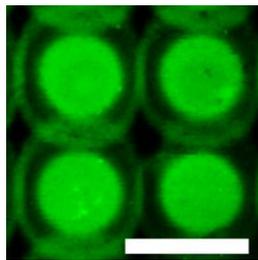


Abbildung 4.5: Ringe um Spots. [83], unveröffentlicht. Gezeigt ist ein Fluoreszenzbild. Man beachte, dass sich die ‚Ringe‘ um die ‚Kerne‘ der Spots konstruktiv überlagern können. Die Länge des Maßbalkens beträgt 250 μm .

Die Ausprägtheit des Rings hängt von der Distanz zwischen Donor- und Akzeptorslide ab (Abbildung 4.6; Skizze des Experiments wie Abbildung 4.1A). Mit zunehmender Distanz schwindet der Kern und der Ring wird dominanter, bevor er undefinierter wird und dann von der Achse des Übertrags seitlich wegzudriften erscheint.

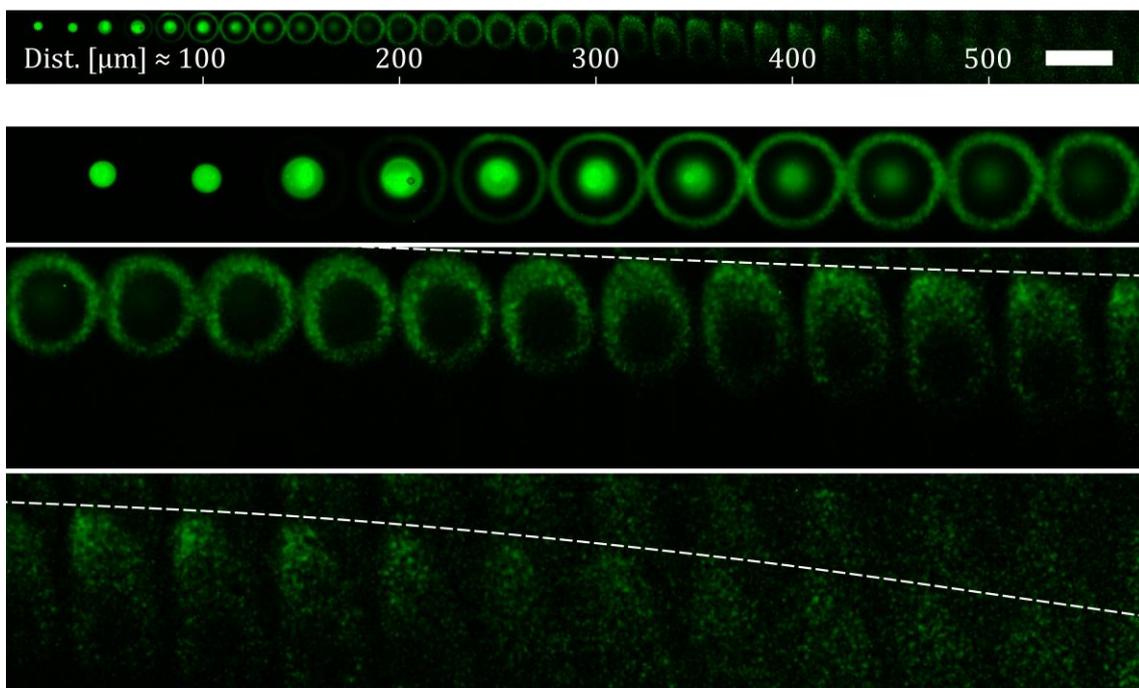


Abbildung 4.6: Veränderung der Spotmorphologie mit zunehmender Übertragsdistanz. [83], unveröffentlicht. Gezeigt ist oben ein Ausschnitt eines Fluoreszenzbilds von Spots, die mit zunehmendem Abstand zwischen Donor- und Akzeptorslide übertragen wurden. Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm. Unten ist das selbe Bild in Vergrößerung dargestellt. Der Kern schwindet, der Ring wird gleichzeitig prominenter und dann immer weniger definiert. Die gestrichelte Linie zeigt das ‚Wegdriften‘ der Spots bei großem Slideabstand an.

In einer der ersten Veröffentlichungen zu LIFT [12] wurde ein Laser mit einem Linienfokus eingesetzt und neben der übertragenen Hauptlinie zwei weitere Linien beobachtet – dies ist das eindimensionale Pendant zu einem Ring. In der weiteren Literatur wurden nach gewissenhafter Recherche zwar Hinweise auf weiteres Auftreten [84], aber keine detailliertere Untersuchung dieses Phänomens gefunden. Eine Absenkung der Höhe der übertragenen Mittellinie wurde so gedeutet, dass dort das Zielsubstrat zu heiß ist, als dass sich das Material dort gut absetzen kann. Diese Erklärung greift jedoch für cLIFT nicht, da hier gerade bei engerem Kontakt zwischen Akzeptor und Donor höhere Oberflächentemperaturen zu erwarten sind, dann aber die Kerne der Spots besonders stark sind. Die Ringbildung scheint ein dem cLIFT- und generell dem LIFT-Übertrag immanentes Phänomen zu sein. Dass es in die Literatur keinen verbreiteteren Eingang fand, liegt wohl daran, dass dort, wo es beobachtet wurde, nur vergleichsweise geringe Materialmengen übertragen und entsprechend präzise Untersuchungsmethoden eingesetzt wurden.

Besonders beeindruckend ist das Resultat eines Experiments, bei dem sich die übertragenen Spots jeweils in mehrere konzentrische Ringe selbst-organisiert haben (Abbildung 4.7). Hier kamen mit zunehmender Bestrahlungsdauer beim Übertrag zusätzliche Kreise aus dem Inneren hinzu, während sich die äußeren Kreise verbreiterten. Es ist unbekannt, was spezifisch in diesem Experiment zu diesem Phänomen geführt hat; die Materialschicht des Donorslides war vergleichsweise dünn ($< 1 \mu\text{m}$), aber das erwies sich nicht als hinreichende Bedingung. Es ist aber als verwandt zu den oben beschriebenen ‚einfachen‘ Ringen zu sehen. Auch in die Fluoreszenzprofile von solchen Spots lässt sich ein zusätzlicher Ring, dann vom Kern überlagert, interpretieren – vergleiche beispielhaft Abbildung 4.8; dies ist allerdings spekulativ und könnte auch lediglich demonstrieren, dass sich eine Summe von Gauß-Funktionen gut eignet, um beliebige geschwungene Kurven zu approximieren.

Die Gestalt der Multi-Ring-Spots erinnert an optische Beugungsmuster, wie sie etwa von Blenden verursacht werden. Man ist deshalb versucht, hier eine Strukturierung des Laserstrahls anzunehmen und das übertragene Muster dann als deren Abbild. Jedoch sind die Längenskala des Laserfokus und die Distanz zwischen Auftreffort des Strahls und Akzeptoroberfläche ungefähr zehn Mal kleiner als die Längenskala der Spots im Fluoreszenzbild. Zudem ist fraglich, wie angesichts der Dominanz der Wärmeleitung eine so fein gegliederte Struktur entgegen der diffusiven Verbreitung von Temperaturprofilen bestehen könnte. Deshalb ist es vernünftig, anzunehmen, dass die konzentrischen Ringe

ein Transportphänomen darstellen. Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Beobachtungen, Experimente und Simulationen sollen dies weiter beleuchten.

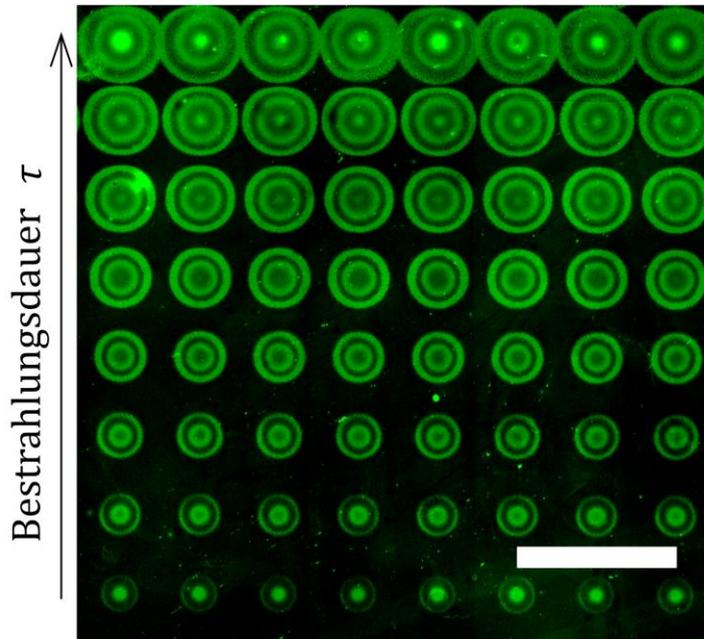


Abbildung 4.7: Komplexe Spots, bestehend aus selbst-organisierten konzentrischen Kreisen. [83], unveröffentlicht. Gezeigt ist das Fluoreszenzbild. Anzahl und Ausprägung der Kreise nehmen zu, je länger beim Übertrag bestrahlt worden war (vertikale Achse des Bildes; 1, 1,5, 2, 3, 5, 7,5, 10, und 20 ms). Das Phänomen ist innerhalb des Musters reproduzierbar (horizontale Achse des Bildes). Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm.

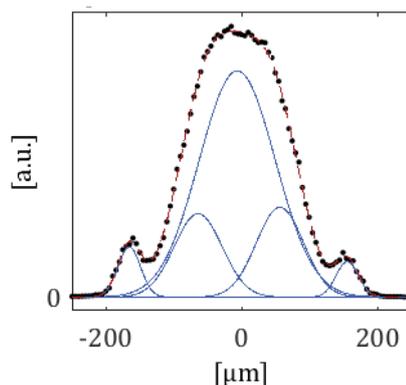


Abbildung 4.8: Typisches Intensitätsprofil eines Spots und mögliche Zusammensetzung. Gezeigt ist der Schnitt durch das Fluoreszenzbild eines typischen mit cLIFT übertragenen Spots, mit Kern und Ring. Es wurde eine Summe (rote gestrichelte Linie) von fünf Gaußfunktionen (blaue durchgezogene Linien) an die Daten (schwarze Punkte) angepasst. Die Spotgestalt lässt sich damit beschreiben als Summe aus Kern, einem inneren, vom Kern überlagerten und einem äußeren Ring. Es sei auf die spekulative Natur dieses Postulats hingewiesen.

Zu Beginn der Arbeit gab es die Überlegung, ob das Höhenprofil, das sich auf der Donoroberfläche während der Bestrahlung bildet, verantwortlich für die Ringstrukturen sein kann. Wenn man als Ansatz davon ausgeht, dass das Material senkrecht von der Oberfläche ausgehend übertragen wird und vollständig inertielle Partikel annimmt, die diese Richtung beibehalten, ist die Gestalt des so übertragenen Spots abhängig vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptorslide. Durch die Welligkeit der Glassubstrate beträgt der Abstand zwischen den Slides, also die Luftschicht, bei aufeinander gelegten Slides nach Messungen mit einem Messmikroskop im Mittel $(50 \pm 21) \mu\text{m}$. Falls beispielsweise die Polyimidfolie einseitig unsauber abgetrennt würde, könnte ein weiterer Spalt entstehen. Die plastische Deformation der Absorptionsschicht, die nach der Bestrahlung zurückbleibt, ist zwar gering im Vergleich zu ihrer lateralen Ausdehnung, so dass das Entstehen eines im Vergleich noch größeren Spots nach diesem Modell nicht plausibel erscheint; allerdings kommt im tatsächlichen Verlauf wohl noch eine zusätzliche reversible thermische Ausdehnung hinzu. Deshalb wurde das Modell senkrecht abgeschleuderter Partikel nicht verworfen, sondern seine Vorhersage der Spotmorphologie in einer Art *ray tracing* qualitativ ermittelt. Aus Messungen wurde ein typisches Donorprofil $z(r)$ gewonnen und über elementare geometrische Überlegungen (Abbildung 4.9) wie dem Höhensatz des Euklid (Formel (4.1a)) berechnet, wo jeweils vom Donorslide ausgehende Partikel-„Strahlen“ auf der Akzeptoroberfläche in Distanz D ankommen (Formel (4.2)). Von äquidistanten Punkten entlang der Oberflächenlinie (also als $z(s)$ und nicht $z(r)$ parametrisiert, wobei s die Bogenlänge ist) wurden Teststrahlen ausgesandt und die Menge der Auftrefforte r_{acc} gesammelt. Das entstehende Spot-Profil, also die Teilchendichte, auf dem Akzeptor wurde durch Kerndichteschätzung (*kernel density estimation*) aus diesen Auftrefforten geglättet dargestellt. Dabei muss eine Gewichtung mit $r_{\text{don}}(s)/|r_{\text{acc}}|$ vorgenommen werden, denn die Fläche von Ringelementen steigt mit zunehmendem Radius an. Man beachte als Randbemerkung, dass das Auftreffen an einem ‚negativen‘ Radius erfolgen kann (deshalb die Betragsfunktion), denn konkave Bereiche der Donoroberfläche können Teilchen in negative r -Richtung aussenden, die dann den Ursprung überqueren; trägheitslose Teilchen, die dem Fluss der Trägerphase folgen, könnten aus Symmetriegründen keine solchen Trajektorien besitzen. Abbildung 4.10 zeigt, welche Spotprofile sich mit diesem Modell ergeben würden; sie wären konzentrisch aufgebaut und vom Slideabstand abhängig, aber entsprechen nicht den tatsächlich beobachteten.

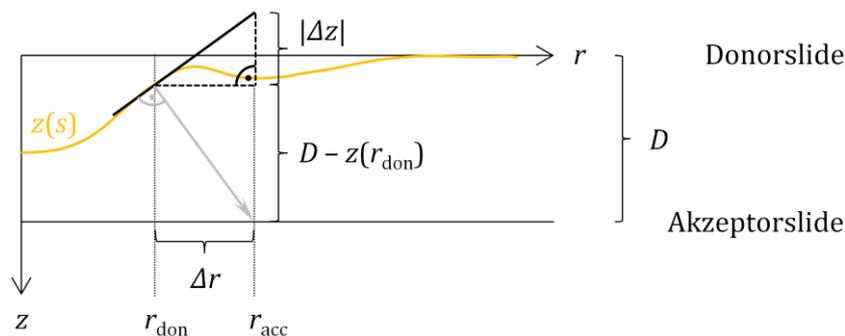


Abbildung 4.9: Skizze zum Modell der Aussendung inertialer Partikel. Material wird demnach senkrecht von der deformierten Donorslide-Oberfläche $z(s)$ am Ort r_{don} abgesondert und ändert seine Richtung bis zum Auftreffen auf dem Akzeptorslide im Abstand D bzw. Δr am Ort r_{acc} nicht (grauer Pfeil). Aus der Steigung der Donoroberfläche $\Delta z/\Delta r$ lässt sich beispielsweise über den Höhensatz des Euklid der Auftreffort berechnen.

$$(\Delta r)^2 = |\Delta z| \cdot (D - z(r_{\text{don}})) \tag{4.1a}$$

$$\Rightarrow \frac{|\Delta r|}{D - z(r_{\text{don}})} = \left| \frac{\Delta z}{\Delta r} \right| \tag{b}$$

$$\Rightarrow r_{\text{acc}} = r_{\text{don}} - (D - z(r_{\text{don}})) \cdot \left. \frac{dz}{dr} \right|_{r=r_{\text{don}}} \tag{4.2}$$

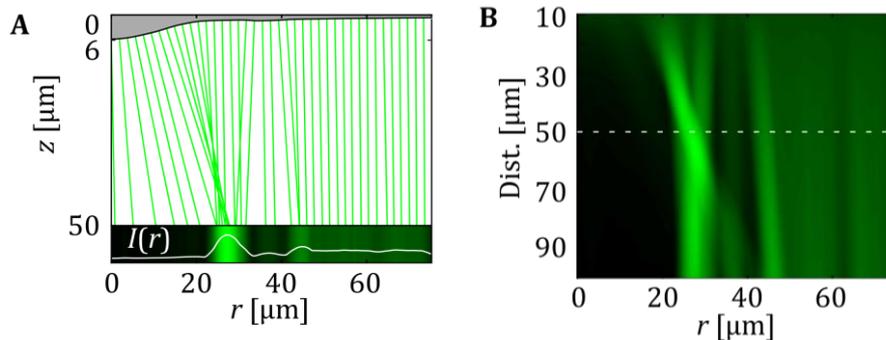


Abbildung 4.10: Vorhersage des Modells der Aussendung inertialer Partikel. (A) Das Modell wurde auf ein gemessenes Donorslide-Höhenprofil angewandt – hier akkurate Darstellung der ‚Teststrahlen‘; keine Skizze – und das zu erwartende Intensitätsprofil $I(r)$ des Fluoreszenzbildes berechnet. Es hat eine Ähnlichkeit zu manchen der Spots in Abbildung 4.7. (B) Weitere Profile wurden für einen großen Bereich der Distanz zwischen Donor- und Akzeptoroberfläche berechnet; die gestrichelte Linie zeigt die Lage dessen aus (A). Sie sind deutlich vom Abstand abhängig, aber weisen keinen Kern auf. Dies entspricht so nicht den Beobachtungen.

Der zweite Grenzfall, was die Trägheit der übertragenen Partikel angeht, ist es, sie als der Trägerströmung völlig passiv folgend anzusehen (der erste war die Annahme komplett träger Partikel, die keinen Strömungseinflüssen unterliegen). Dies ist plausibel, da der Drift und das zunehmende ‚Verschmieren‘ der Ringe in Abbildung 4.6 zusätzlich ein diffusives Verhalten nahelegt, was auf sehr kleine Partikel hindeutet. Angenommen wird hier deshalb der Übertrag als Aerosol, also von Schwebstoffen in einem bzw. mittels eines Fluids. Inspiration für den folgenden Versuch war die Verunreinigung eines Testmusters durch eine Staubfaser, die im Fluoreszenzbild einen ‚Schatten‘ geworfen, also während des Übertrags das Material übertragende Aerosol am Strömen gehindert hat (Abbildung 4.11). Um diesen Effekt kontrollierter studieren zu können, wurden sphärische Mikropartikel (10 μm Durchmesser; Spheromers CA-10, Microbeads) zufällig auf einem Akzeptorslide

verteilt (Abbildung 4.12A) und anschließend darauf von einem Donorslide ein Testmuster übertragen. Mit Hilfe der Mikroskopkamera des cLIFT-Aufbaus wurden Bilder von den Slides aufgenommen, so dass sich im Nachhinein bestimmen ließ, wo die Mikrokugeln während des Übertrags gelegen haben. Im Ergebnis zeigte sich, dass Kugeln, die im Kern des Spots liegen, keinen lateralen Schatten werfen (Abbildung 4.12B), und Kugeln, die außerhalb des Spotzentrums liegen, eine ‚Einschnürung‘ des Rings hervorrufen (Abbildung 4.12C). Daraus kann geschlossen werden, dass der Kern senkrecht vom Donorslide zum Akzeptorslide und der Ring durch eine laterale Strömung zwischen den Slides übertragen werden. Zusammen mit der Gestaltänderung bei zunehmender Slidedistanz (Abbildung 4.6) legt dieser Effekt nahe, dass Kern und Ring getrennt betrachtet werden können, entfernt ähnlich wie Moden in anderen physikalischen Bereichen bzw. erinnernd an Resonator-Moden.

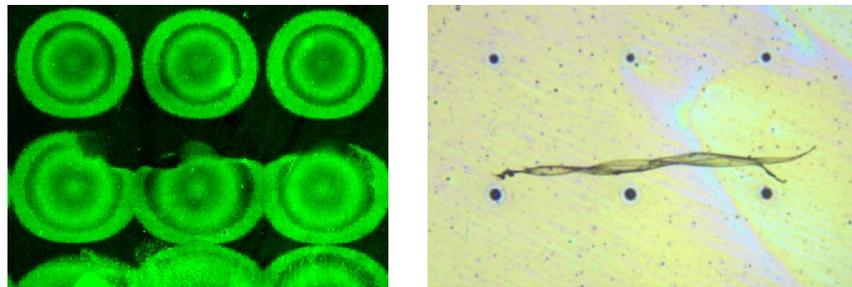


Abbildung 4.11: Verunreinigung der Slides durch eine Faser. Rechts: Lichtmikroskopbild des Donorslides, links: zugehöriges Fluoreszenzbild der übertragenen Spots. Die Faser hat einen ‚Schatten‘ geworfen. Das Spotraster ist 500 μm .

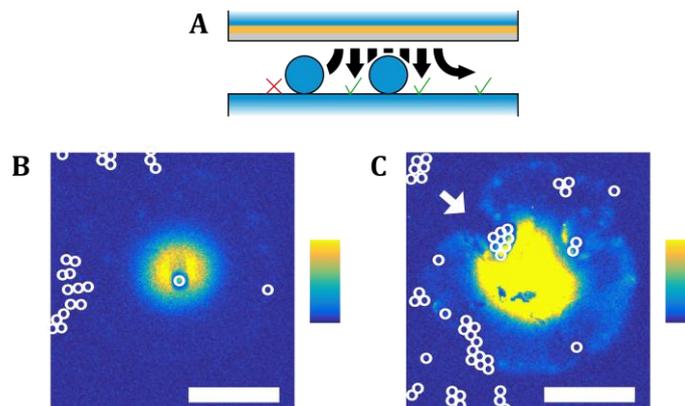


Abbildung 4.12: Gezielte Blockade des Übertrags. [83], unveröffentlicht. (A) Skizze des Experiments. Mikrokugeln blockieren die Strömung des Aerosols beim Übertrag und werfen je nach dessen Strömungsrichtung einen ‚Schatten‘. Offensichtlich wird der Kern der Spots senkrecht übertragen (B) und der Ring durch lateralen Stofftransport (mach beachte die durch den Pfeil angezeigte ‚Einschnürung‘) (C). Die Lage der Blockadekugeln wurde durch weiße Kreise in die Fluoreszenzbilder eingezeichnet. Die Länge der Maßbalken beträgt 100 μm ; der Kontrast für die Teilbilder wurde einzeln angepasst.

Um in einem zweiten Experiment zu verifizieren, dass der Kern senkrecht vom Donorslide zum Akzeptorslide und der Ring durch eine laterale Strömung zwischen den Slides übertragen werden, wurde als Akzeptorslide ein mit Mikrokavitäten versehenes Substrat verwendet (Abbildung 4.13A; Durchmesser der Kavitäten 23 μm , Tiefe 8,7 μm , Trennwände min. 9,5 μm ; Probe von [9]). Das vom Donorslide übertragene Material umfasste keinen Aminosäurebaustein, sondern ein fluorophores Molekül, das ohne weitere Prozessierung fluoreszent abgebildet werden konnte (Details hierzu in [85]). Die Erwartung war, dass nur der Kern des Spots in die Kavitäten eindringen kann, und die äußeren Bereiche des Spots, die lateral übertragen werden, nur auf der Oberfläche der Zwischenräume abgelagert werden. In der Tat bestätigt das Resultat (Abbildung 4.13B) diese Erwartung.

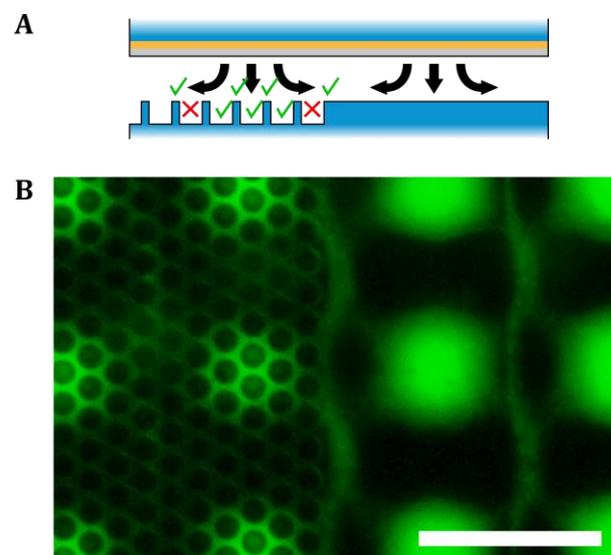


Abbildung 4.13: Übertrag in ein Substrat mit Mikrokavitäten. [83], unveröffentlicht. (A) Skizze des Experiments. (B) Fluoreszenzbild des Akzeptorslides nach dem Übertrag. Nur der innere Bereich der Kerne der Spots wurde auf die Böden der Kavitäten übertragen. Die Länge des Maßbalkens beträgt 250 μm .

Ferner hat sich in weiteren Beobachtungen abgezeichnet, dass die Ringe der Spots eine endliche Zeit im Spalt zwischen den Substraten verbleiben, wie es sich durch deren Abdriften in Abbildung 4.6 angedeutet hat: Die Ringe von Spots, die in engem Raster übertragen wurden, scheinen sich in ihrer Form gegenseitig zu beeinflussen, teilweise ‚abzudrängen‘ (Abbildung 4.14). Das erklärt auch, warum in Abbildung 4.13 die ‚Ringe‘ nicht kreisförmig, sondern als geschwungene Linien vorliegen. Im Rahmen der Modellannahme des Übertrags durch einen advektiv-diffusiven Zweiphasenfluss (sehr kleine Partikel in einem Trägerfluid) ist es plausibel, dass Ringe sich eher abdrängen (d.h. vom Aerosolfluss neuer, benachbarter Spots abgedrängt werden) als schneiden, weil sich die transportierten Partikel nur eingeschränkt unabhängig vom Trägerfluid bewegen können. Zudem sind kleinskalige Strömungen bekanntlich vorwiegend laminar und erschweren deshalb Vermischung.

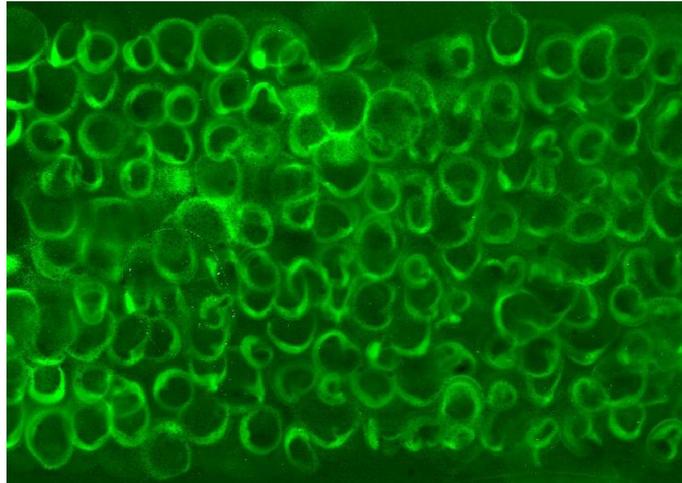


Abbildung 4.14: Gegenseitig deformierende Ringe. Fluoreszenzbild; aus den Arbeiten zu [75], freundlich zur Verfügung gestellt. Das Spotraster beträgt $200\ \mu\text{m}$, die Bestrahlungsstärke nahm von rechts nach links leicht zu. Als Absorptionsschicht des Donorslides wurde Durimide verwendet, was einen sehr intensiven Übertrag verursachte.

Die auf dieser und den vorherigen Seiten dargestellten Beobachtungen lassen sich durch die Annahme eines Aerosolübertrags motivieren bzw. widersprechen ihr nicht, festigen also diese Hypothese.

4.3 Simulation

In den vorherigen Unterkapiteln wurde aus experimentellen Beobachtungen abgeleitet, dass bei cLIFT der Übertrag des Materials als Aerosol mit kleinen, passiven Partikeln durch einen advektiv-diffusiven Transportprozess erfolgt. Nun wird mit diesen Modellannahmen eine numerische Simulation durchgeführt und gezeigt, dass dabei charakteristische Phänomene reproduzierbar sind, die in den Experimenten beobachtet worden waren ([83], noch unveröffentlicht).

In der Simulation werden die Strömung und die Materialkonzentration zwischen den Slides (vgl. Abbildung 4.15), sowie die Oberflächenkonzentration des auf dem Akzeptorslide adsorbierten Materials berechnet. Letztere ist letztlich die Größe, die im Experiment indirekt als Fluoreszenzsignal messbar ist. Eine wesentliche Annahme des simulierten Modells ist, dass das meiste Übertragungsmaterial zu Anfang in Bewegung gesetzt wird und im weiteren Verlauf neu gebildetes Aerosol viel weniger Material mit sich trägt. Es ist plausibel anzunehmen, dass leicht mitzureißendes Material schnell von den gebildeten Dämpfen aus der Materialschicht mitgenommen wird.

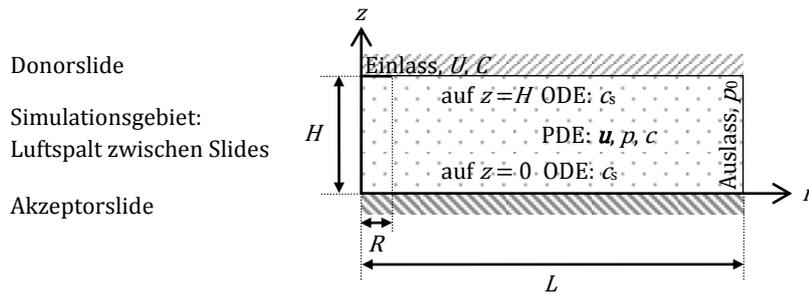


Abbildung 4.15: Skizze der Simulationsgeometrie in Zylinderkoordinaten. Die Aerosolströmung (Geschwindigkeit \mathbf{u} , Druck p und volumenbezogene Stoffkonzentration c) im Spalt der Höhe H zwischen Donor- und Akzeptorslide wird berechnet. Der Einlass des Aerosols mit vorgegebener Geschwindigkeit U und Konzentration C befindet sich am oberen Ende des Simulationsgebiets, also an der Donoroberfläche, von der Symmetrieachse bis zum Einlassradius R . Das rechte, äußere Ende des Gebiets bei $r = L$ ist offen mit verschwindendem Druck p_0 . Auf der weiteren oberen sowie der unteren Gebietsgrenze, also den Oberflächen der Slides, wird in einer gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichung die abgelagerte flächenbezogene Stoffkonzentration c_s berechnet. Diese Konzentration ist im Experiment als Fluoreszenzintensität sichtbar. In der Simulation sollen bei geeigneter Wahl von U, C, R die Auswirkung von Variationen des Slideabstands H auf die entstehenden Muster der Konzentration nachgestellt werden und dadurch die Hypothese des Aerosol-basierten Materialübertrags gefestigt werden.

Ein System aus partiellen und gewöhnlichen Differentialgleichungen wurde aufgestellt (für theoretische Grundlagen der Fluidmechanik siehe z.B. Quelle [86]) und mit COMSOL gelöst. Das Problem wurde wegen seiner radialsymmetrischen Natur in Zylinderkoordinaten behandelt. Das Strömungsfeld $\mathbf{u}(r, z, t)$ und der Druck $p(r, z, t)$ werden dabei durch die Navier-Stokes-Gleichungen für Newtonsche Fluide beschrieben (Formel (4.3)) und das Fluid dabei als inkompressibel angenommen (Formel (4.3b)). $\rho = 1.636 \text{ kg/m}^3$ ist dabei die Dichte und $\mu = 18 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ die Viskosität von Luft. Für die Reynoldszahl des Problems gilt $Re \approx 14$, wohingegen die kritische Reynoldszahl für Strömungen zwischen parallelen Platten größer als 2285 ist [87]; deshalb wurde kein dissipativer Modellterm für turbulente Strömung hinzugenommen.

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)] \quad (4.3a)$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0 \quad (b)$$

Gleichzeitig wird die Volumenkonzentration $c(r, z, t)$ des übertragen werdenden Materials durch eine Advektions-Diffusions-Gleichung beschrieben (Formel (4.4)). Der Diffusionskoeffizient $D = 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ wurde so hoch gewählt, wie es gerade noch vernünftig für Moleküle in Gas ist.

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (-D\nabla c) + \mathbf{u} \cdot \nabla c = 0 \quad (4.4)$$

Die Ablagerung von Material auf den Slideoberflächen wird durch eine auf den Gebietsgrenzen der obigen partiellen Differentialgleichungen definierte gewöhnliche Differentialgleichung für die Oberflächenkonzentration $c_s(r)$ beschrieben (Formel (4.5)). Als Massentransferkoeffizient $k = 20000$ m/s wurde ein sehr großer Wert angenommen, um eine komplette Ablagerung zu gewährleisten. Die Betragsfunktion erleichtert dabei numerische Stabilität.

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = |kc| \quad (4.5)$$

Oberflächen- und Volumenkonzentration sind über eine entsprechende Randbedingung auf der oberen und unteren Begrenzung, die jeweils einem Slide entspricht, nämlich über eine partielle Differentialgleichung (Formel (4.6a)) aneinander gekoppelt (\mathbf{n} bezeichnet den Normalenvektor). Für die Strömung gilt an diesen Grenzen die *no slip*-Bedingung (Formel (4.6b)).

$$-\mathbf{n} \cdot (-D\nabla c + \mathbf{u}c) = -kc \quad (4.6a)$$

$$\mathbf{u} = 0 \quad (b)$$

Randbedingung für den Einlass am ‚oberen‘ ($z = H$) Ende des Gebiets, bei $0 < r < R$, mit $R = 37.5 \mu\text{m}$, was in etwa der Größe der aufgeschmolzenen Bereiche auf dem Donorslide entspricht, ist ein senkrecht einströmendes Fluid mit $|\mathbf{u}| = U$. Die Konzentration C am Einlass von etwa 0.45 mol/m^3 wurde so gewählt, dass bei einer Einlassgeschwindigkeit von 1 m/s insgesamt 1 pmol an Material übertragen wird. Randbedingung für den Auslass am ‚rechten‘ ($r = L$) Ende des Gebiets ist ein verschwindender Druck mit unterdrücktem Rückfluss (Formel (4.7a)). Für die Volumenkonzentration gilt Formel (4.7b).

$$[-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)]\mathbf{n} = -\hat{p}_0\mathbf{n} \quad (4.7a)$$

wobei

$$\hat{p}_0 \leq 0$$

$$-\mathbf{n} \cdot D\nabla c = 0 \quad (b)$$

Die Einlassbedingung für \mathbf{u} gilt für $0 < t < \tau$ mit $\tau = 1 \text{ ms}$, danach ist $\mathbf{u} = 0$. Wie eingangs erwähnt, führt das einströmende Fluid nur anfangs, nämlich für $0 < t < \varepsilon\tau$ mit $\varepsilon = 1/2$ eine Konzentration ungleich Null mit sich. Der numerischen Stabilität wegen werden die Werte nicht instantan gesetzt, sondern einer logistischen Funktion mit einer kleinen Zeitskala $\chi = 0.01 \text{ ms} \ll \tau$ folgend erreicht, nämlich $\sim 1/(1 + \exp((t - t_{\text{start}})/\chi)) \cdot (1 - 1/(1 + \exp((t - t_{\text{end}})/\chi)))$. Dabei ist $t_{\text{start}} = 5\chi$, so dass der Ausdruck bei $t = 0$ nahezu verschwindet.

Anfangs ist das System in Ruhe und ohne Konzentration:

$$\mathbf{u}(r, z, t = 0) = 0 \quad (4.8a)$$

$$c(r, z, t = 0) = 0 \quad (b)$$

$$c_s(r, t = 0) = 0 \quad (c)$$

Die Geometrie dehnt sich in r -Richtung hinreichend weit aus, nämlich 500 μm . Die Höhe des Simulationsgebiets, also der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorslide, wird mit H bezeichnet. Das Gebiet wurde mit COMSOL im sog. *physics-controlled* Modus in ein *free triangular mesh*-Netz mit Elementen der Größenstufe ‚finer‘ zerlegt. Diese finiten Elemente haben dann eine durchschnittliche Fläche von $(7.4 \mu\text{m})^2$. Die Wahl der Elementgröße hatte keinen großen Einfluss auf das Ergebnis der Simulation.

Die Gleichungen wurden mit der finiten Elemente-Methode gelöst. Die Einstellungen des *Solvers* wurden in den vorgegebenen Einstellungen des Programms belassen (*BDF time stepping, constant Newton fully coupled solver with Jacobian update once per time step, PARDISO direct solver*). Die Endzeit der Simulation wurde so gewählt, dass sich die Oberflächenkonzentration nicht mehr ändert.

In der Simulation wurden der Slideabstand H und die Einlassgeschwindigkeit U variiert. Im Simulationsergebnis zeigt sich, dass das rekonstruierte Spotprofil einen Kern und einen Ring aufweist (Abbildung 4.16C) und wie im Experiment der Kern bei zunehmendem Slideabstand schneller abnimmt als der Ring (Abbildung 4.16D).

Diese Phänomene entsprechen grundsätzlich den experimentellen Beobachtungen (vgl. Abbildung 4.6). Multiple Ringe wurden in den Simulationen zwar nicht beobachtet, aber der Rückwirbel, hier im dritten Bild von Abbildung 4.16B zu sehen, könnte prinzipiell möglicherweise zu einem zweiten, engeren Ring führen. Andererseits ist bei der Erhöhung der Einlassgeschwindigkeit (Abbildung 4.16E) zu beobachten, dass nicht nur der Ring an Durchmesser gewinnt, sondern auch im Zentrum des Kerns ein Minimum entsteht, der Kern sich also in einen Ring wandelt. Eine andere Begrenzung der Simulation ist, dass bei kleinen Slideabständen der Trend in Abbildung 4.16D von den experimentellen Beobachtungen abweicht und der Ring wieder weiter wird (gelbe gestrichelte Linie); es könnte es zukünftig allerdings auch nötig sein, die hier konstant angenommenen Einlassbedingungen mit der Spaltgeometrie zu koppeln. Nichtsdestotrotz konnten hier mit stark vereinfachten Annahmen wesentliche experimentelle Beobachtungen nachgestellt werden. Diese Reproduktion grundlegender Phänomene validiert das Simulationsmodell.

In Zukunft wäre es wünschenswert, die fluiddynamische Simulation zu koppeln mit einer Simulation der thermischen Vorgänge bei der Laserbestrahlung. Möglicherweise ließe sich damit eine Strategie entwickeln, wie durch geeignete Mikrostrukturierung der Donor- und Akzeptorslides sich der Materialübertrag optimieren lässt. Hierbei wird die Geometrie allerdings komplexer und die Anzahl zu berücksichtigender Effekte größer und es müssten, gerade in Unkenntnis bestimmter Materialeigenschaften, weitere starke Annahmen getroffen werden, die die spezifische Aussagekraft der Simulation bzw. ihrer theoretischen Modelle einschränken. Im folgenden Kapitel über den Einfluss der verschiedenen Prozessparameter wird der Materialübertrag durch cLIFT deshalb eher phänomenologisch betrachtet. Die Erkenntnisse daraus können in eine zukünftige erweiterte Simulation einfließen.

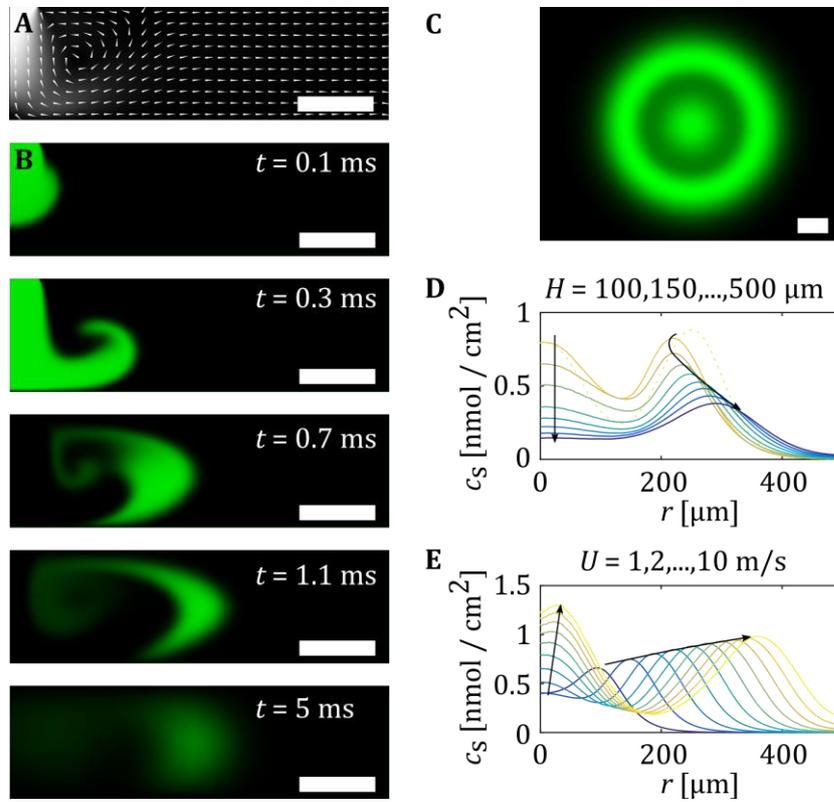


Abbildung 4.16: Ergebnisse der Simulation. [83], unveröffentlicht. (A) Quasistationäres Strömungsfeld (Grauwerte: Betrag, Pfeile: Richtung), das in der Mikropalte zwischen den Slides durch die Verdampfung von Lösungsmittelresten in der Materialschicht entsteht, und durch einen Einlass links oben modelliert wurde. Das rechte Ende des Gebiets ist offen, das obere durch den Donorslide und das untere durch den Akzeptorslide begrenzt. (B) Standbilder der Volumenkonzentration in verschiedenen Abschnitten des Vorgangs: Zunächst trifft der einströmende und Material tragende *Jet* die Akzeptoroberfläche senkrecht (erstes Bild) und wird dann radial nach außen abgelenkt (zweites Bild). Dann (hier zwischen 0,5 und 1 ms) strömt weiteres Fluid nach, aber bringt kein weiteres Material mit sich (drittes Bild), bis der Einfluss komplett versiegt. Das Material (Konzentration grün dargestellt) in der Spalte bildet dann eine ringförmige Wolke, die langsam diffundiert (viertes und fünftes Bild) und an die Slideoberflächen adsorbiert. (C) Rekonstruktion des Fluoreszenzbild des Spots aus dem Profil, das aus der in (A) und (B) dargestellten Simulation berechnet wurde. Der Spot weist einen Kern und einen Ring auf. (D) Radial aufgetragene Oberflächenkonzentrationen für verschiedene Abstände H zwischen Donor- und Akzeptorslide bei gleicher Einlassbedingung ($U = 5 \text{ m/s}$). Wie von den Pfeilen illustriert, verschwindet der Kern des Spots, während der Ring langsamer an Intensität abnimmt und sich leicht vergrößert. (E) Spotprofile für verschiedene Einlassgeschwindigkeiten bei gleichem Slideabstand $H = 150 \text{ }\mu\text{m}$. Die Pfeile illustrieren, dass der Kern bei schnelleren Jets stärker ausgeprägt gegenüber dem Ring ist und sich in der Mitte ein Konzentrationsminimum bildet. Erwartungsgemäß transportieren schnellere Strömungen den Ring weiter in laterale Richtung.

4.4 Sonstige Beobachtungen

Abschließend werden nun sonstige Beobachtungen beschrieben. Die erste ist ein ‚negatives Ergebnis‘ bzw. eine ‚Sackgasse‘ – vielleicht kann sie dennoch für zukünftige Forschung hilfreich sein. Die Zweite ist eine grobe experimentelle Abschätzung der Temperatur während Materialübertrag. Sie kann zur Überprüfung von zukünftigen Simulationen dienen.

4.4.1 Topographie des Donorslides nach dem Übertrag

Nach der Bestrahlung bleiben folgende Strukturen auf dem Donorslide zurück (Abbildung 4.17): Der bestrahlte Bereich als solcher ist leicht erhöht (Größenordnung Mikrometer), es hat sich ein ‚Ringwall‘ gebildet (Durchmesser $10^2 \text{ }\mu\text{m}$ und kleiner als der übertragene Spot, Breite $10^1 \text{ }\mu\text{m}$, Höhe $10^0 \text{ }\mu\text{m}$) und in größerem Abstand ist ein feiner ringförmiger ‚Graben‘ zu erkennen. Bei dem Wall handelt es sich nicht um einen Entnetzungsring, denn die darunter liegende Oberfläche wird nicht freigelegt. Ein ähnliches Phänomen war von [88] beobachtet und untersucht worden. Der Graben ist meist nicht im Lichtmikroskopbild, sondern nur in Messungen mit dem Weißlichtinterferometer zu erkennen. Mit einem Rasterkraftmikroskop wurde verifiziert, dass er eine Furche und keine Erhöhung ist. Er

tritt nur bei der in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Matrix in der Materialbeschichtung auf. Meistens hat er den selben Durchmesser wie der übertragene Spot im Fluoreszenzbild – deshalb bestand zunächst die Hoffnung, anhand des Grabens allein die Spotgröße vorhersagen zu können, ohne Messungen auf dem Akzeptorslide durchführen zu müssen. Allerdings zeigte sich (beobachtet im Experiment zu Abbildung 5.26), dass diese Größen nicht zwingend übereinstimmen. Ein weiteres Merkmal dieser Gräben ist, dass sie sich nicht zu schneiden scheinen. Benachbarte Spots bilden einen gemeinsamen Graben, der mehrere Spotzentren umgeben kann. Der unbekannte Mechanismus, der zur Entstehung der Gräben führt, hat also ein Gedächtnis. Dieses scheint aber keine irreversible Änderung bei Überschreitung einer Temperaturschwelle zu sein, denn auf Donorslides, die zuvor so weit erhitzt worden waren (bis 240 °C), dass die Materialbeschichtung dabei so gering viskos wurde, dass sie sich zu entnetzen begann, bildeten sich bei Bestrahlung noch Gräben (im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [69] untersucht).

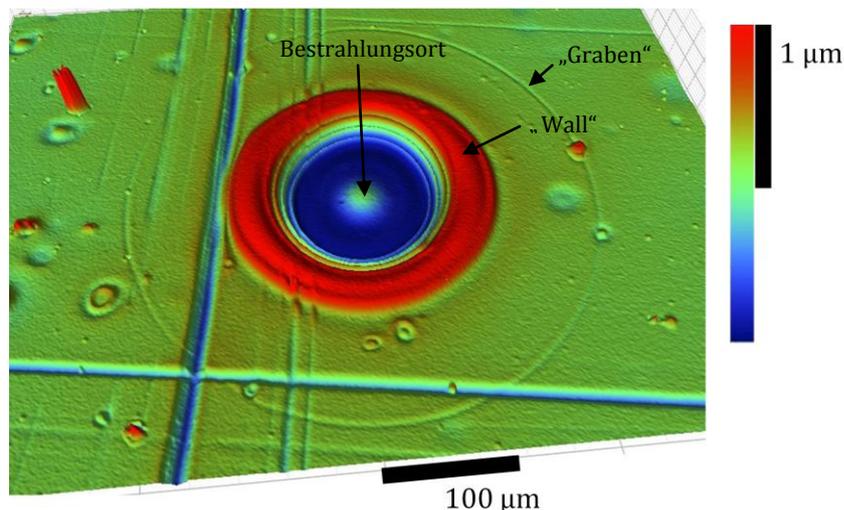


Abbildung 4.17: Topographie eines bestrahlten Donorslides. Am Bestrahlungsort hat sich die Beschichtung des Donorslides plastisch ausgedehnt. Ein Wall hat sich gebildet (in der Höhenskala rot), den ein Graben umgibt (Pfeil). Dargestellt sind als bearbeitetes Bildschirmfoto der Messsoftware die Daten einer Messung mit einem *scanning vertical interferometer*.

4.4.2 Abschätzung der Temperatur während des Übertrags

Im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [79] wurde abgeschätzt, wie warm das Übertragmaterial wird. Dazu wurde eine temperaturempfindliche Tinte („Kromagen“, Black 90-NH W/B flexo ink, Hallcrest) anstatt der Materialschicht auf die Absorptionsschicht der Donorslides aufgetragen. Die Tinte verändert graduell je nach erfahrener Temperatur irreversibel ihre Farbe vom Weißen ins Schwarze. Ein solcher Donorslide wurde wie üblich auf einem Akzeptorslide liegend mit einem Testmuster, das die gängigen Lasereinstellungen umfasste, bestrahlt. Ein anderer

solcher Donorslide wurde zerteilt und die Stücke auf einer Heizplatte unterschiedlich temperiert. Von den beiden Donorslides wurde hinterher mit einem Dokumentenscanner gleichzeitig ein Bild aufgenommen. Der Vergleich beider Färbungen (Abbildung 4.18) zeigt, dass etwa 130 °C erreicht wurden. Dies stellt natürlich nur eine Abschätzung dar, da die Thermotinte den Laser zusätzlich absorbiert bzw. in die Absorptionsschicht zurückstret, und andere thermische Materialparameter besitzt als die eigentliche Übertragungsschicht. Nichtsdestotrotz erlaubt dieses Experiment eine Einordnung der Übertragungstemperatur in eine Größenordnung.

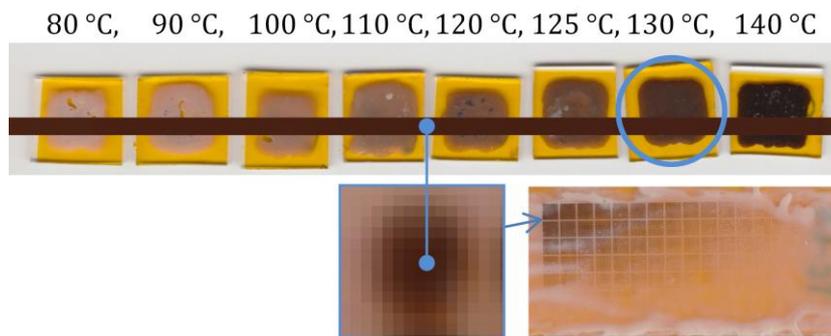


Abbildung 4.18: Abschätzung der Temperatur beim Übertrag. Anstatt der normalen Übertragungsschicht wurde eine Thermotinte auf den Donorslide aufgetragen und deren Schwärzung mit der Farbe von Donorslidesstücken verglichen, die verschiedenen Temperaturen ausgesetzt worden waren.

4.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde geklärt, wie der Materialübertrag bei cLIFT vonstatten geht. Das Material wird als Aerosol mit kleinen, passiven Partikeln durch einen advektiv-diffusiven Transportprozess übertragen. Die Gasphase stammt dabei vermutlich von bei der Laserbestrahlung verdampfenden Lösungsmittelresten innerhalb der Materialschicht.

Hinweis auf diesen Mechanismus, aber auch seine Konsequenz ist das Auftreten von konzentrischen Ringen um den Kern der Spots, das in der Literatur bisher kaum beschrieben wurde. Möglicherweise lässt sich eine Anwendung für das Phänomen der Ringbildung finden; wollte man ohne Vorwissen nämlich willentlich Mikroringe generieren, wäre dies sicherlich ein schwieriges Unterfangen. In der Anwendung zur Synthese von Molekulararrays sind Ringe jedoch hinderlich. Ein möglichst geringer Abstand zwischen Donor- und Akzeptorslide verhindert diese.

In Zukunft sollte die fluiddynamische Simulation des Übertrags um ein Modell für die thermischen Effekte im Donorslide erweitert werden.

5 Prozessparameter

In diesem Kapitel wird untersucht, wie die verschiedenen Parameter, die in der vorliegenden Implementierung „cLIFT“ des LIFT-Verfahrens Einfluss haben, sich auf die resultierenden Spots auswirken. Ziel dabei ist es, die Begrenzungen des Verfahrens zu ermitteln und ein optimales Prozessfenster aufzuzeigen.

5.1 Ziel- und einstellbare Größen

Optimale Spots sind möglichst klein, damit ein Array viele Spots erfassen kann. Die chemische Ausbeute ist wichtigste Nebenbedingung: Spots, die im Fluoreszenzbild keine maximale, gesättigte Intensität zeigen, sind für wiederholte kombinatorische Synthese unbrauchbar. Außerdem sollte die Prozesszeit möglichst kurz sein.

Die Zielgrößen Größe und Intensität (im Fluoreszenzbild, als Hinweis auf die chemische Ausbeute) der Spots sind nicht gänzlich unabhängig voneinander. Das Maximum der Intensität von übertragenen Spots ist – bis zur Sättigung beim Wert I_{\max} , die eintritt, wenn die Akzeptoroberfläche keine weiteren Moleküle mehr aufnehmen kann und die maximale Ausbeute erreicht ist – umso höher, je größer deren Durchmesser (Halbwertsbreite) ist. Die Spots weisen dabei ein universelles Intensitätsprofil auf: Normalisiert man dieses auf das Maximum und skaliert es mit dem Halbwertsradius, ergibt sich eine gaußkurvenartige Form (Abbildung 5.1).

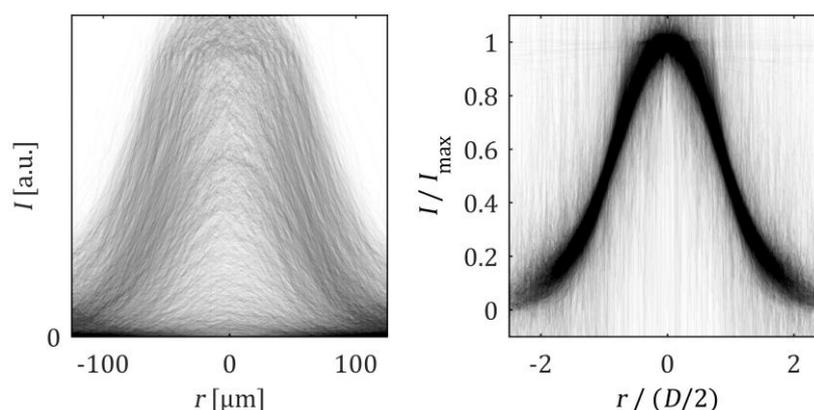


Abbildung 5.1: Universelles Intensitätsprofil ungesättigter Spots. Es wurden viele Spots mit verschiedenen Laserparametern von einem Donor mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen, nach der Kupplung mit einem fluoreszenten Stoff angefärbt und mit einem Fluoreszenzscanner sichtbar gemacht. Links: 3303 Fluoreszenz-Intensitätsprofile in ihrer ursprünglichen Skalierung. Rechts: Normalisiert man die Profile auf ihr Maximum und skaliert sie mit der halben Halbwertsbreite, ergibt sich eine gaußkurvenartige Form.

In speziellen Anwendungsfällen sind von der obigen Zielsetzung abweichend besonders große Spots gewünscht, beispielsweise wenn für chemische Charakterisierungsexperimente eine geschlossene Fläche an Material übertragen werden soll. Das Hauptaugenmerk der Untersuchung liegt aber dennoch auf der zuverlässigen Erzeugung möglichst kleiner Spots.

Es gibt bei cLIFT rein technische Parameter wie die Einstellungen des Lasers (Unterkapitel 5.2), wählbare Material- bzw. geometrische Eigenschaften wie die der Absorptionsschicht (Unterkapitel 5.3) und gegebene, aber variierende, teils der Messung unzugängliche Stoffeigenschaften, die ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Gestalt der Spots haben (Unterkapitel 5.4). In den Experimenten hat sich gezeigt, dass absolute Werte noch unvorhersagbar schwanken, das grundsätzliche qualitative Verhalten des cLIFT-Effekts jedoch typisch und gut reproduzierbar ist.

5.2 Lasereinstellungen

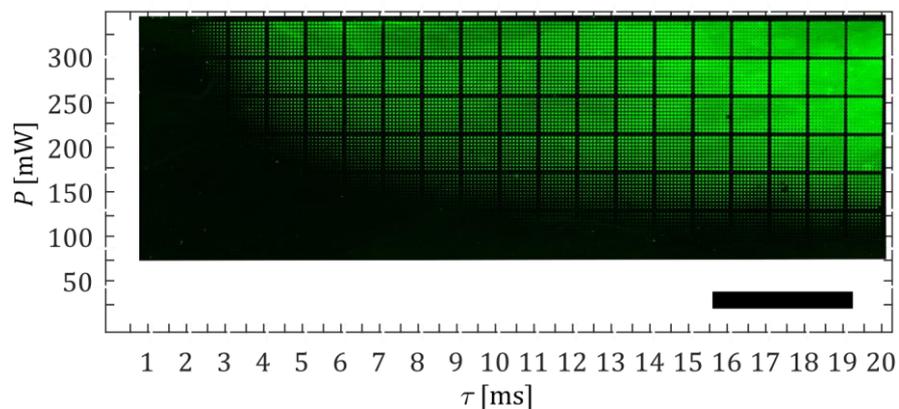


Abbildung 5.2: Typisches Fluoreszenzbild eines Testmusters zur Ermittlung des Einflusses der Lasereinstellungen. In ähnlicher Form in [78]. Es wurden unabhängig die Bestrahlungsdauer τ und die Leistung P des Strahls variiert. Es ist eine geschwungene Grenzkurve ausmachbar, jenseits derer bei schwächerer Bestrahlung keine Spots mehr übertragen wurden. Man beachte, dass in der abgedruckten Größe des Bildes der subjektiv wahrgenommene Eindruck der Helligkeit der Spots trügt: Kleine Spots sind von mehr Hintergrund umgeben als große Spots und erscheinen deshalb dunkler. Nichtsdestotrotz lassen sich auf großen Längenskalen Schwankungen der Intensität erkennen; diese können von einer inhomogenen Oberflächenfunktionalität stammen oder Färbeartefakte sein. Der Maßbalken entspricht 1 cm.

Der technisch am einfachsten steuerbare Prozessparameter ist die ‚Stärke‘ des Lasers. Dabei können die Leistung P des Laserstrahls und die Bestrahlungsdauer τ unabhängig voneinander eingestellt werden. Abbildung 5.3 zeigt ein typisches Konturdiagramm (Auswertung unter Verwendung von [89]) des Durchmessers D der resultierenden Spots in Abhängigkeit von der Leistung und Dauer der Bestrahlung. Datengrundlage ist das in Abbildung 5.2 gezeigte und beschriebene Testmuster. Ausgeschlossen wurden dabei überlappend große Spots, beschädigte Bereiche des Scans, offensichtliche Ausreißer, die

durch Artefakte der Bildverarbeitung entstehen sowie Spots im Randbereich, die im Vergleich zum Hintergrund so schwach sind, dass eine quantitative Vermessung ihres Durchmessers nicht möglich war. Man beachte, dass in der praktischen Anwendung sich das sporadisch auftretende Fehlen einzelner Spots verhindern lässt, indem das selbe Muster zwei Mal mit zwischenzeitlich bewegtem Donorslide übertragen wird, und somit Fehlstellen auf dem Donorslide umgangen werden.

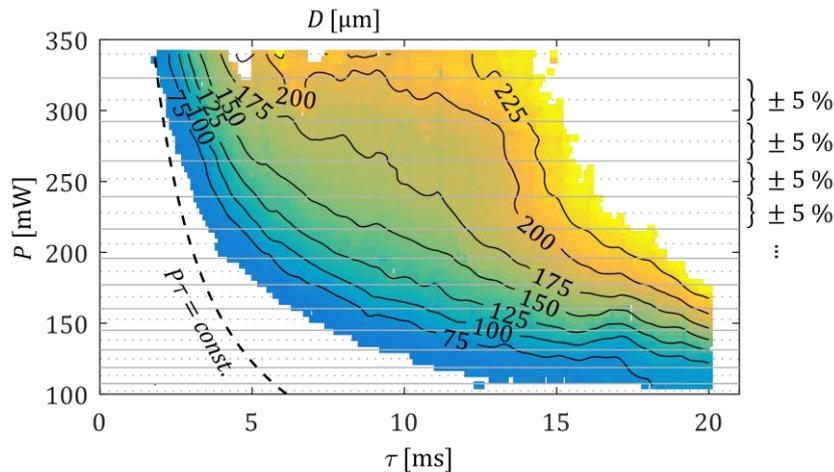


Abbildung 5.3: Einfluss von Bestrahlungsdauer und Leistung des Laserstrahls auf die Spotgröße. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Bei ‚schwachen‘ Lasereinstellungen (links unten) werden keine Spots übertragen. Spots bei ‚starker‘ Bestrahlung (rechts oben), die größer sind als das Spotraster und deshalb nicht getrennt betrachtet werden konnten, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Grenzkurve für den erfolgreichen Spotübertrag verläuft flacher als eine Linie konstanter Energie. Bei gegebener Bestrahlungsdauer variiert der Durchmesser bei einer Schwankung der Laserleistung von 5 % um etwa 25 μm .

Es gibt eine Grenze, jenseits derer bei schwächerer Bestrahlung keine Spots mehr übertragen werden. Dies deutet darauf hin, dass für den Materialübertrag eine Schwellbedingung überschritten werden muss, vermutlich eine gewisse Mindesttemperatur. Sowohl diese Grenzlinie, als auch die Konturlinien gleicher Spotgröße verlaufen geschwungen. Am Beispiel der Grenzkurve wird in der Abbildung illustriert, dass der Verlauf dieser Linien im Leistungs-Zeit-Raum weniger steil ist als der von Kurven konstanter Energie. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Verlust von Wärmeenergie durch Wärmeleitung innerhalb des Donorslides dem Energieeintrag des Lasers entgegenwirkt. In doppelt logarithmischer Achsenskalierung (in der Abbildung nicht gezeigt, aber vgl. Abbildung 5.14) lässt sich der Verlauf durch $P\sqrt{\tau} = const.$ annähern. Die Größe

$$\mathcal{P} := P\sqrt{\tau} \tag{5.1}$$

wird deshalb im Folgenden als empirischer kombinierter Prozessparameter verwendet und wortschöpferisch ‚Laserstärke‘ genannt.

Möchte man nur einen der Laserparametern zur Steuerung des Übertrags variieren, bieten sich zwei Möglichkeiten für die Wahl des Arbeitspunkts: Entweder man arbeitet bei voller Leistung und kurzen, veränderlichen Bestrahlungsdauern ($\approx 2-7$ ms), oder bei langen Bestrahlungsdauern (≈ 20 ms) und niedriger, veränderlicher Laserleistung ($\approx 25-50$ %) dann verlaufen die Konturlinien im Parameterraum möglichst senkrecht dazu. Eine geringe Leistung hat den Vorteil, dass mit einem schwächerem und womöglich günstigerem Laser gearbeitet werden kann. Eine geringe Bestrahlungsdauer dagegen beschleunigt den Gesamtprozess. Das Arbeiten bei konstanter Leistung hat einen weiteren Vorteil: Nicht alle Lasersysteme lassen eine direkte Beeinflussung der Leistung in kontinuierlichen Stufen zu.

Der hier verwendete Laser war bereits länger in Benutzung gewesen und deshalb nicht mehr so leistungsstabil wie zum Zeitpunkt des Erwerbs. Über längeren Zeitraum hinweg war, sofern nicht kompensiert, mit einer Schwankung in der Größenordnung von etwa 5 % zu rechnen. Vergleichbare Spezifikationen können neuwertige preisgünstigere Laser haben; macht man den Prozess robust dagegen, könnte man somit eine Einsparung vornehmen. Auf der Zeitskala des Übertrags eines Testmusters war die Leistung normalerweise konstant. Etwaige Oszillationen wären als Streifen auf dem Fluoreszenzscan wahrzunehmen. Wie in Abbildung 5.3 abzulesen ist, variiert der Spotdurchmesser bei einer Schwankung der Laserleistung von 5 % um etwa $25 \mu\text{m}$ – also 11 % bis 33 % des Spotdurchmessers – unabhängig davon, welcher der beiden oben vorgeschlagenen Arbeitspunkte gewählt wird. Für deren Auswahl macht dies deshalb keinen Unterschied. Allerdings empfiehlt es sich angesichts dieser starken Auswirkung, die Leistung des Lasers regelmäßig zu messen und Schwankungen entsprechend zu kompensieren.

Nur relativ große Spots weisen ein gesättigtes Fluoreszenzsignal auf. Kleinere Spots sind ungesättigt und mit abnehmender Größe immer weniger intensiv (Abbildung 5.4). Daraus lassen sich zwei Kenngrößen ableiten, zum einen der minimale Durchmesser

$$D_{\text{gesättigt}} := \min D|_{I=I_{\text{max}}} \quad (5.2)$$

ab dem die Spotintensität in Sättigung, also ihren maximalen Wert, geht – hier beträgt dieser Durchmesser etwa $100 \mu\text{m}$. Zum anderen kann man den Trend der proportional kleiner und schwächer werdenden Spots extrapolieren und am Schnittpunkt mit $I = 0$ eine theoretische minimale Spotgröße

$$D_{\text{Untergrenze}} := D|_{I=0} \quad (5.3)$$

ablesen – hier $25 \mu\text{m}$. Spots mit sehr kleinen Intensitätswerten waren durch die Bildverarbeitung nicht vom Hintergrund zu trennen und wurden deshalb nicht in das Diagramm eingezeichnet. Die größten Spots scheinen bezüglich ihres Intensitätswerts am wenigsten definiert. Diese Streuung der Datenpunkte könnte von Färbefaktoren verursacht sein; allerdings ist die entsprechende Tendenz auch aus anderen Experimenten (vgl. Abbildung 5.18) lesbar. Wie eingangs erwähnt, ist das in der Abbildung gezeigte

Verhalten reproduzierbar und in allen Experimenten (hier Übertrag eines Leucin-Bausteins) ähnlich. Die absoluten Werte für die Kenngrößen schwanken jedoch. Für den Übertrag von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) mit Glycin-Baustein sind im Mittel $D_{\text{gesättigt}} = 161 \pm 39 \mu\text{m}$ und $D_{\text{Untergrenze}} = 70 \pm 14 \mu\text{m}$, wobei die Messunsicherheit mit durchschnittlich $18 \mu\text{m}$ bzw. $6,3 \mu\text{m}$ kleiner als die statistische Streuung war (Zahlen im Vorgriff auf Abbildung 5.15).

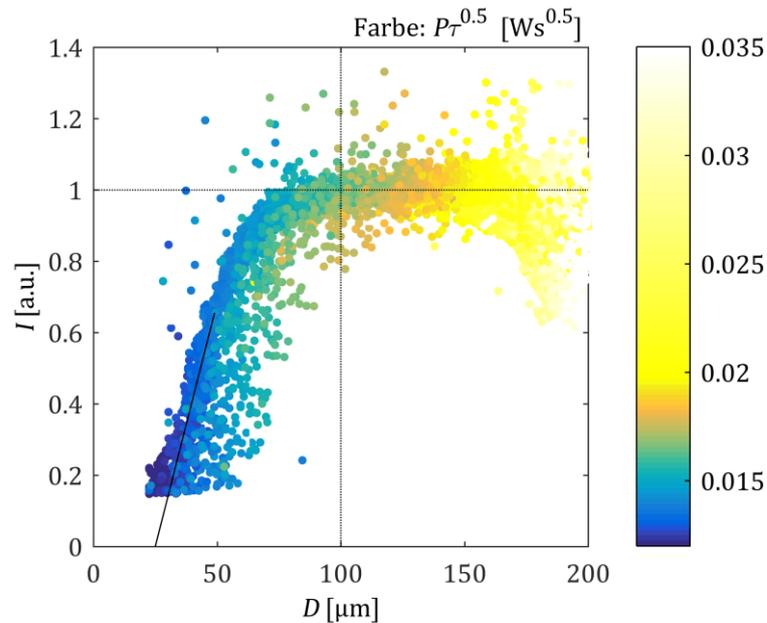


Abbildung 5.4: Einfluss der Laserparameter auf beide betrachteten Zielgrößen. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Spot. Die Diagrammachsen entsprechen den Zielgrößen Spotdurchmesser D und maximale Intensität I der Spots. Die Farbe codiert den empirischen kombinierten Laser-Prozessparameter \mathcal{P} . Die eingezeichnete schräge Linie soll den Verlauf der Datenwolke extrapolieren. Ihr Schnitt mit $I = 0$ ergibt die Kenngröße des minimalen Spotdurchmessers $D_{\text{Untergrenze}}$; der Durchmesserwert von Spots, die gerade so groß sind, dass ihre Intensitäten den gesättigten Wert annehmen, heiße $D_{\text{gesättigt}}$. Er ist durch die vertikale Schnittlinie angezeigt.

In Abbildung 5.4 ist der jeweilige Wert des empirischen kombinierten Laserparameters \mathcal{P} für die Datenpunkte über die Farbe angegeben. Eine andere Farbskala ermöglicht es, die Empfindlichkeit der $I(D)$ -Datenkurve für Änderungen der ‚Laserstärke‘ \mathcal{P} zu erfassen: Dazu wurden die Werteskala in Intervalle aufgeteilt, die jeweils einem Abschnitt eines Wertes $\pm 5\%$ entspricht, ähnlich der horizontalen Hilfslinien in Abbildung 5.3, und diesen Intervallen alternierende Farben zugewiesen (Abbildung 5.5). Man sieht, dass die Spots mit abnehmender Größe immer empfindlicher für Änderungen des Prozessparameters werden; im Extremfall kann ein $\pm 5\%$ -Intervall zu Intensitäten im gesamten Wertebereich führen (zweites magentafarbenes Intervall von links). Dies verdeutlicht die Schwierigkeit, besonders kleine Spots zu erzielen: Gerade am Rand des zulässigen Bereichs reagiert der Prozess besonders empfindlich.

Es sei darauf hingewiesen, dass der empirische Parameter \mathcal{P} nicht der Energie entspricht; gleiche Energiewerte führen nicht zum selben Wertepaar Spotgröße-Spotintensität, da bei längeren Bestrahlungsdauern Energieverlust durch Wärmetransport auftritt. Der umgangssprachlich anmutende Begriff ‚Laserstärke‘ wurde hier für $\mathcal{P} = P\tau^{0.5}$ gewählt bzw. definiert, um dem Parameter einen Namen zu geben, der nicht bereits besetzt ist.

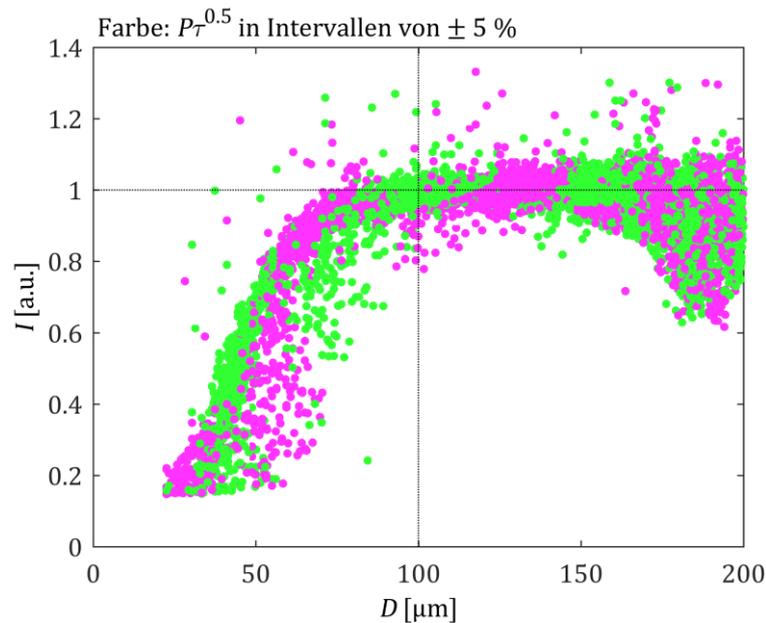


Abbildung 5.5: Empfindlichkeit der Zielgrößen bezüglich der Laserstärke. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Jeder Datenpunkt ist ein Spot. Die Diagrammachsen entsprechen den Zielgrößen Spotdurchmesser D und maximale Intensität I der Spots. Die Farbe codiert den empirischen kombinierten Laserparameter \mathcal{P} in $\pm 5\%$ -Intervallen, abwechselnd in Grün und Magenta. Zu größeren Spots hin wird die Position im Zielgrößenraum zunehmend unempfindlicher gegen relative Schwankungen der ‚Laserstärke‘.

Weil die Spotgröße und -intensität korreliert sind und gemeinsam vom empirischen kombinierten Laserparameter abhängen, lassen sich nicht unabhängig sehr kleine, aber trotzdem intensive Spots im selben Bestrahlungsvorgang übertragen. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Stoffmenge ist, können jedoch Spots ‚addiert‘ werden: Durch mehrfache Bestrahlung des selben Orts kann die Intensität ungesättigter Spots angehoben werden (Abbildung 5.6A), theoretisch ohne seine Größe zu verändern – im Experiment zeigte sich jedoch, dass sich dies unter praktischen Umständen nicht realisieren ließ, ohne doch den Durchmesser zu erhöhen (Abbildung 5.6B). Der Parameterbereich, in dem Spots existieren, aber ungesättigt sind, ist zu empfindlich gegenüber Störungen. Möglicherweise müssten zwischen den Bestrahlungen lange Pausen eingehalten werden (vgl. Kapitel 6.1) Man beachte, dass aussagekräftige Experimente im Regime ungesättigter Spots besonders schwierig durchzuführen sind, beispielsweise anderweitig begründete globale Trends auf dem Testarray dadurch aus den Daten ausgefiltert werden müssen, dass die Testspots zufällig auf dem Array verteilt werden.

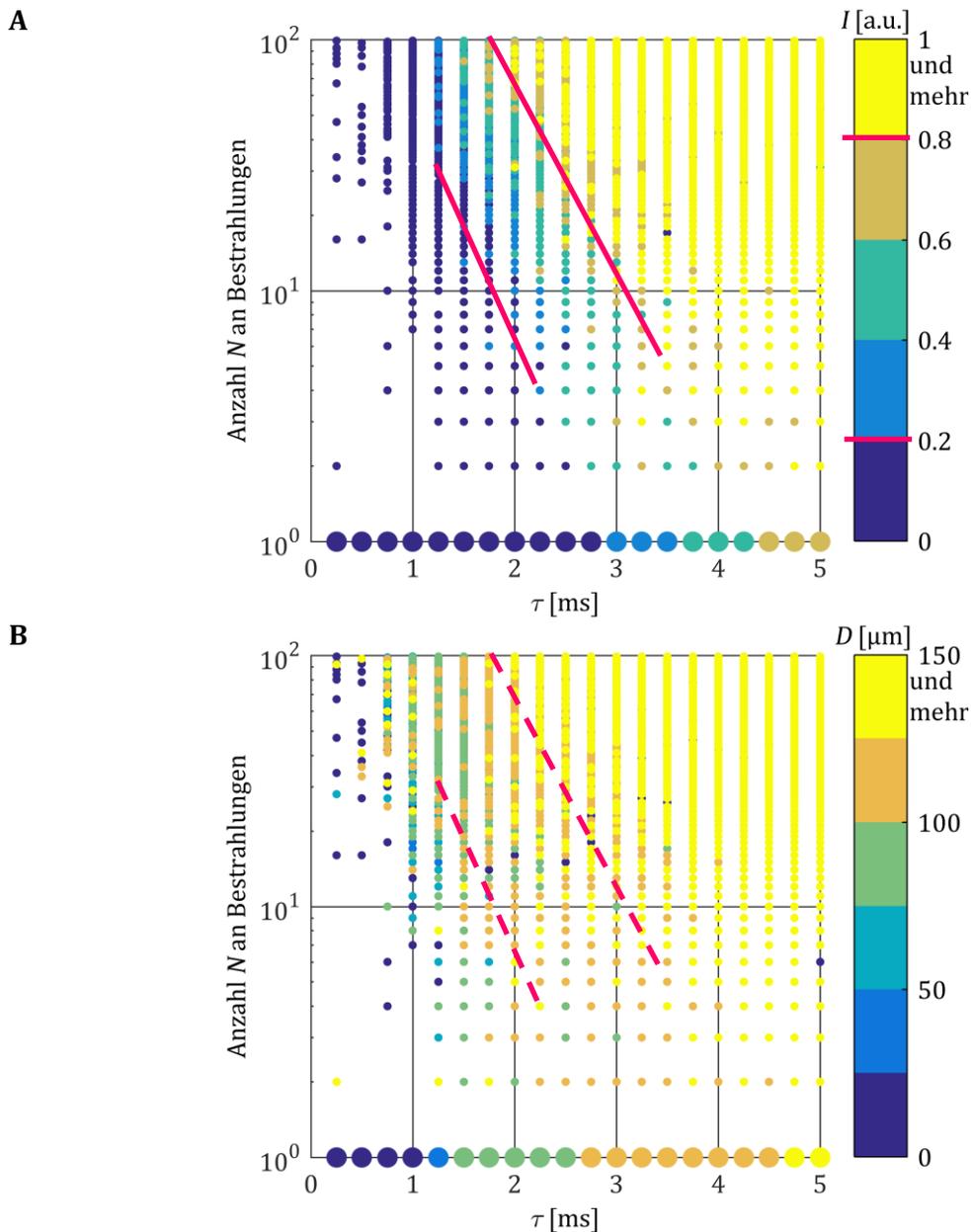


Abbildung 5.6: Erhöhung der Spotintensität durch Mehrfachbestrahlung. Bei gleicher Laserleistung wurde für zwanzig verschiedene Bestrahlungsdauern τ ermittelt, wie die Intensität (A) und die Halbwertsbreite (B) der übertragenen Spots im Fluoreszenzbild zunimmt, wenn der Spotort nacheinander mehrfach (2 bis 99 Mal) bestrahlt wird, und dies gemäß der nach oben offenen Farbskala eingezeichnet. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Die Datenpunkte für einfache Bestrahlung wurden als Median aus jeweils 100 Testspots ermittelt und sind in den Diagrammen zum besseren Vergleich dicker eingetragen. Die magentafarbenen Linien in (A) sollen verdeutlichen, wo durch die Mehrfachbestrahlung eine deutliche Erhöhung der Intensität erfolgt bzw. Sättigung erreicht wird. Die Linien sind am selben Ort auch in (B) gestrichelt eingetragen; hier kann man jedoch ablesen, dass im Experiment die Intensitätserhöhung mit einer Vergrößerung um $25\mu\text{m}$ bis $50\mu\text{m}$ einherging.

Es stellt sich deshalb die Frage, ob eine Zuverlässigkeit des cLIFT-Prozesses erreicht werden kann, indem man vergleichsweise große Spots und zu deren Erzeugung lange Bestrahlungsdauern in Kauf nimmt, aber dafür eine Art stationären Zustand erreicht, der ein definiertes Resultat garantieren könnte. Abbildung 5.7 zeigt jedoch, dass sich eine konstante Spotgröße erst bei einer Bestrahlung von über einer halben Sekunde einstellt. Dies ist zwei Größenordnungen höher als die eigentlich nötige Dauer und deshalb nicht akzeptabel. Andererseits geht diese Verlängerung der Bestrahlung mit einer Verringerung der einzustellenden Leistung einher (hier auf ≈ 79 mW), um keine Zerstörungseffekte zu bewirken (vgl. nächster Absatz). Möglicherweise könnte man dann auch mit einem aufgeweiteten Strahl arbeiten und die räumliche Strukturierung in Spots durch Masken oder ein Mikro-Spiegel-System (vgl. [90]) realisieren. Kann man damit ausreichend viele Spotpositionen gleichzeitig bedienen, wäre der Zeitverlust kompensiert.

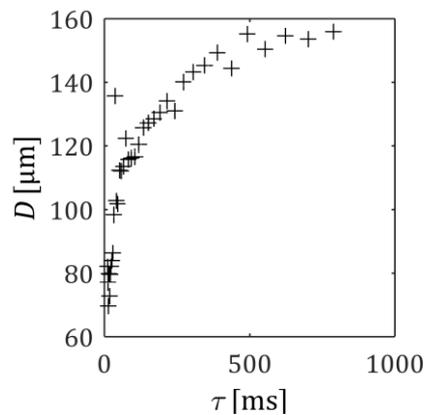


Abbildung 5.7: Asymptotischer Verlauf der Spotgröße bei langen Bestrahlungszeiten. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) mit reduzierter Laserleistung übertragen. Ab etwa einer halben Sekunde Bestrahlungsdauer führt eine längere Bestrahlung nicht mehr zu größeren Spots.

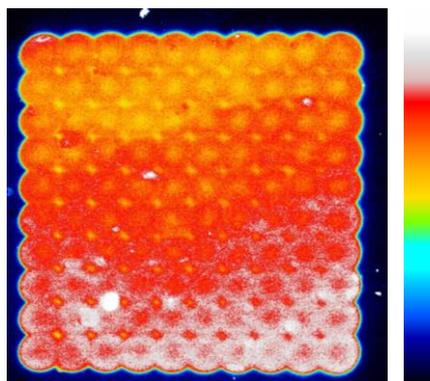


Abbildung 5.8: Fluoreszenzbild inhomogener, durch starke Bestrahlung übertragener Spots. Die Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen, mit relativ hoher Leistung und Bestrahlungsdauer. Die Mittelpunkte der Spots haben eine verringerte Intensität. Das Spotraster beträgt $250 \mu\text{m}$.

Die Wahl der Lasereinstellungen kann dadurch eingeschränkt sein, dass ‚zu starke‘ Bestrahlung zu unerwünschten Effekten führt. Abbildung 5.8 zeigt den Ausschnitt von Abbildung 5.2, wo die höchsten Leistungen und längsten Bestrahlungsdauern eingesetzt wurden. Man sieht, dass die Spots dann nicht mehr homogen sind, sondern in der Mitte keine maximale Intensität mehr haben. Es sei dahingestellt, ob das ein Phänomen der Ring-Bildung (siehe Kapitel 4), der Schädigung der Akzeptoroberfläche oder der Zerstörung von Bausteinen während des Transfers ist – es entspricht nicht den Optimierungsanforderungen. Der negative Effekt stärkerer Bestrahlung zeigt sich insbesondere, wenn über die Wahl der Absorptionsschicht mehr Laserleistung absorbiert wird: Abbildung 5.9 zeigt im Vorgriff auf das nächste Unterkapitel den Fluoreszenzscan eines Testmusters, das von einem mit schwarzem Polyimid beklebtem Donorslide bei Bestrahlung auf der Kontaktseite übertragen wurde. Der akzeptable Bereich innerhalb des Laser-Parameterraums ist der, innerhalb dessen die Spots gesättigt sind. Bei den höchsten Leistungswerten gibt es keinen akzeptablen Bereich; zunehmende Bestrahlungsdauer geht dann direkt von dem Bereich, in dem keine Spots erzeugt werden können, über zur Erzeugung von deformierten und ungesättigten Spots. Umgekehrt bedeutet dies, dass für kleinste Bestrahlungsdauern keine ‚guten‘ Spots übertragen werden, egal wie stark die Laserleistung ist. Dies beschränkt die Prozesszeit grundlegend nach unten.

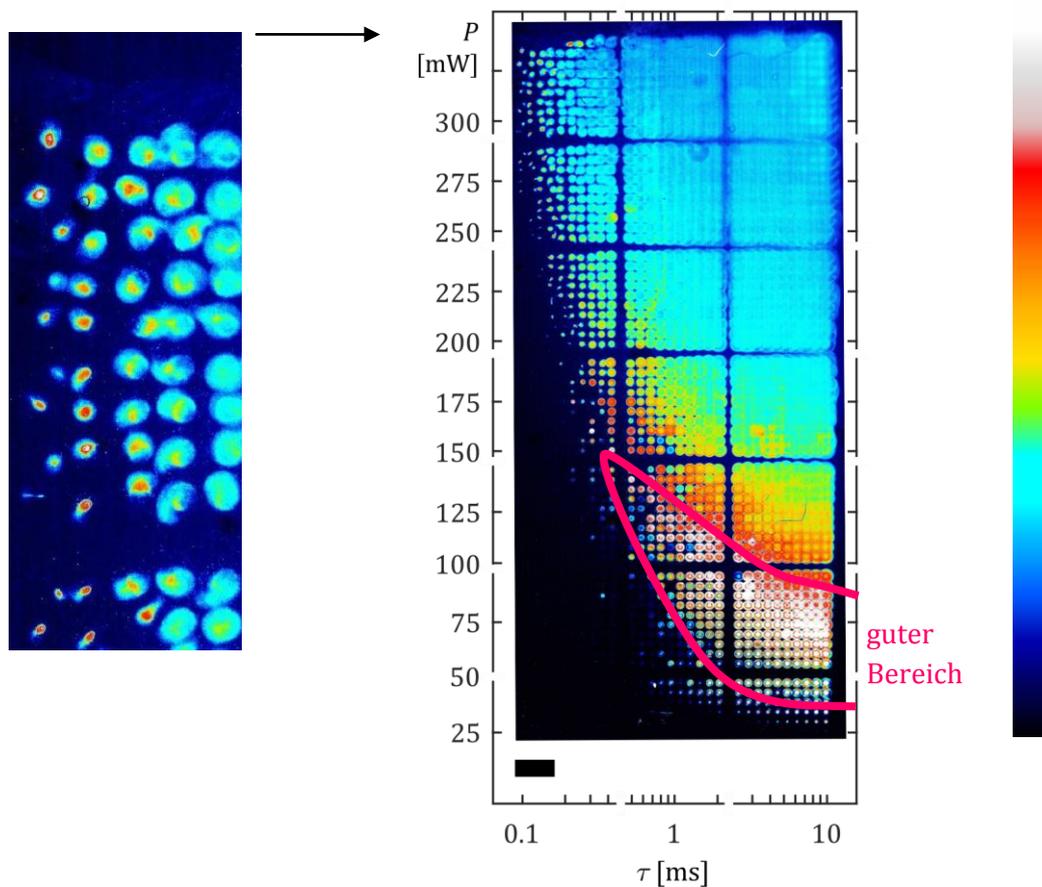


Abbildung 5.9: Fluoreszenzbild von Spots in einem Parameterraum mit beschränktem gutem Bereich. Die Spots wurden von einem Donorslide mit schwarzem Polyimid als Absorptionsschicht, auf der Kontaktseite bestrahlt, übertragen. Der Bereich, in dem die Spotintensitäten gesättigt sind, reicht nicht in den Bereich hoher Laserleistungswerte hinein. Man beachte, dass die kleinsten Spots bei Laserleistungen jenseits des guten Bereichs deformiert und nicht im regelmäßigen Raster angeordnet sind (Ausschnitt links, aus der oberen linken Ecke des Diagramms). Das Spotraster ist $250 \mu\text{m}$, die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm .

Die Tatsache, dass die meisten Spots im Durchmesser viel größer ($> 100 \mu\text{m}$) sind als der Laserstrahl ($15 \mu\text{m}$), ist wohl auf die Wärmeleitung innerhalb der Donorslide-Schichten und die damit verbundene Verbreiterung des erzeugten Temperaturprofils zurückzuführen. Die Temperatur $u(\mathbf{x}, t)$ lässt sich durch die sogenannte Wärmeleitungsgleichung ([91]) in Gestalt einer Diffusionsgleichung beschrieben:

$$\partial_t u(\mathbf{x}, t) - a \Delta u = f(\mathbf{x}, t) \quad (5.4)$$

wobei a die Temperaturleitfähigkeit mit Dimension Länge²/Zeit ist, resultierend als $a = \lambda/\rho c$ aus den Materialeigenschaften λ , der Wärmeleitfähigkeit mit Dimension Leistung/Länge·Temperatur(unterschied), der Dichte ρ und der spezifischen Wärmekapazität c , und f eine Quelle oder Senke der Dimension Temperatur/Zeit ist, beispielsweise eine auf die Wärmekapazität bezogene Wärmestromdichte. Für das homogene Anfangswertproblem $f = 0$ und $u(\|\mathbf{x}\|^2 > 0, t = 0) = 0$ existiert die sogenannte Fundamentallösung - hier mit Raumdimension $n = 2$ für eine radialsymmetrische, also zweidimensionale Geometrie normiert:

$$H(\mathbf{x}, t) = \frac{1}{(4\pi at)^{n/2}} \exp\left(-\frac{\|\mathbf{x}\|^2}{4at}\right) = \frac{1}{4\pi at} \exp\left(-\frac{r^2}{4at}\right) \quad (5.5)$$

Sie beschreibt die zeitliche Entwicklung eines Temperaturprofils, das anfänglich räumlich punktförmig ist; anschaulich verbreitert sich ein Dirac'scher δ -Peak zu einer immer flacher und breiter werdenden Gauß-Kurve. Man beachte hier die Skalierung $\sqrt{4at}$ für die Breite des Temperaturprofils. Mit einer Temperaturleitfähigkeit von $78 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ der Absorptionsschicht nach dem Datenblatt des Herstellers (Kapton ® HN, DuPont) ergeben sich also für die Bestrahlungsdauern $1 \dots 20 \text{ ms}$ als Zeitskala typische Breiten-, also radiale Längenskalen von $18 \dots 79 \mu\text{m}$. Diese sind mit der des Laserstrahls bzw. mit der der resultierenden Spots vergleichbar. Dies begründet die Bedeutung der Wärmeleitung für das betrachtete System und erklärt einerseits, warum in Abbildung 5.3 die Grenzkurve für die zum Spotübertrag nötige Leistung zunehmend nach oben verschoben ist im Vergleich zu einer hypothetischen Kurve ohne Verlust von Wärmeenergie - diese wird während langer Bestrahlung auf einen großen Bereich verteilt. Andererseits erklärt die bei kurzen Bestrahlungsdauern kleine Skala der Temperaturprofilverbreiterung, die einen raschen Temperaturanstieg begünstigt, warum dort bei hoher Leistung sofort Beschädigungseffekte auftreten (Abbildung 5.9).

Die ‚Laserleistung‘ lässt sich auch indirekt beeinflussen: Absorptionsschichten, die den Laserstrahl besser absorbieren, Lichtenergie also effizienter in Wärmeenergie umwandeln, ermöglichen eine schnellere bzw. raschere Temperaturerhöhung. Der Einfluss der Absorptionsschicht wird im folgenden Unterkapitel untersucht. Außerdem könnte die Form, insbesondere die Ausdehnung des Laserstrahls, einen Effekt haben, da dadurch zwar nicht die Gesamtleistung, jedoch aber die Leistungsdichte betroffen ist; dies wird im Kapitel 5.5 behandelt.

5.3 Absorptionsschicht

Aufgabe der Absorptionsschicht ist es, den Laserstrahl zu absorbieren und Lichtenergie in Wärmeenergie umzuwandeln. Je nach Absorptionsvermögen erfolgt dies mit unterschiedlicher Effizienz. Eine gut absorbierende Schicht hat den Vorteil, dass dann ein schwächerer, preisgünstigerer Laser eingesetzt werden könnte. Eine komplett absorbierende Schicht bietet den Vorteil, dass sie den Laserstrahl von der Akzeptoroberfläche und von der Materialschicht auf dem Donorslide selbst abhält, was bei sensiblen Materialien geboten sein kann. Für transparente Materialien ist allerdings kein Schaden durch den derzeit verwendeten Laser zu erwarten, da dieser im sichtbaren Licht arbeitet ($\lambda = 532 \text{ nm}$) und die entsprechende Photonenenergie von 2,3 eV in der Regel nicht ausreicht, Molekülbindungen aufzubrechen. Je nach Absorptionsgrad ist der Ort, an dem die Wärme deponiert wird, mehr definiert: Eine ‚gering‘ absorbierende Absorptionsschicht wird gleichmäßig entlang des passierenden Strahls erhitzt, eine ‚stark‘ absorbierende Schicht nur in der Nähe des Eintrittsortes. Bedenkt man die Wärmeleitung innerhalb der Schicht, kann es einen Unterschied machen, ob die Bestrahlung an der Kontaktseite des Donorslides mit dem Akzeptorslide, oder in der Kontaktebene zum Substrat erfolgt (Abbildung 5.10), und in letzterem Fall, wie dick die Absorptionsschicht ist.

Die Auswahl der Absorptionsschicht ist auch eine Frage der technischen Umsetzung ihres Aufbringens auf einen Mikroskop-Objekträger. Die in dieser Arbeit üblicherweise verwendete Absorptionsschicht besteht aus Polyimid und ist durch ein selbstklebendes Kaptonklebeband realisiert. Schwarze Polyimidfolie konnte durch doppelseitiges Klebeband aufgebracht werden. Eine feinere Kontrolle über seine Dicke bietet Polyimid, das auf Glaswafer schleuderbelackt werden kann (Handelsname ‚Durimide‘), die dann zerteilt werden. Ein der Praxis bequeme und leicht skalierbare Fabrikationsmethode wäre Sprühbelackung; diese ist für Graphitlack möglich.

Der Absorptionsgrad der Schichten wurde abgeschätzt, indem der Transmissionsgrad gemessen wurde und die Differenz zu 1 als Absorption angenommen wurde. Reflektivität und diffuse Streuung sind bei dieser Messweise nicht berücksichtigt; das Resultat ist also eher als obere Grenze zu sehen. Als Referenz für die Transmissionsmessung diente nicht nur die Lichtquelle, sondern die Transmission durch ein Glassubstrat. Das 50 μm dicke Kaptonklebeband hat sein Transmissionsminimum bei 475 nm (cyan), das 25 μm dicke bei 450 nm (blau) – die unterschiedliche Kleberschicht macht wohl den Unterschied aus – und

Durimide bei 413 nm (violett). Blaues Laserlicht würde in Kapton zu etwa 92 % absorbiert, also etwa drei Mal besser als das verwendete grüne Licht, auf das sich der Absorptionsgrad in Tabelle 2 bezieht.

Optische Graufilter aus Kunststoff in verschiedenen Stärken (21 %, 37 % und 99 % Absorption) wurden ebenfalls als Donorslides getestet; dazu wurden sie direkt mit dem Übertragungsmaterial beschichtet. Es wurde versucht, Testmuster von ihnen zu generieren, sowohl in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten rückwärtigen als auch vorderseitigen Bestrahlweise. Es konnten jedoch keine Spots übertragen werden. Möglicherweise wirkten die Donoren aufgrund ihrer Dicke (1,4 mm) als zu gute Wärmesenken, sodass die zum Übertrag nötigen Temperaturen nicht erreicht werden konnten.

Es wurden verschiedene Donorslides mit unterschiedlichen Absorptionsschichten auf Glasobjektträgern hergestellt und identische Testmuster übertragen. Vom Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) wurden dabei mehrere Testmuster übertragen, um die Schwankung des Ergebnisses einschätzen zu können. Im Vorgriff auf das nächste Unterkapitel wurden zudem Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendeter Absorptionsschicht, aber bewusst unterschiedlicher Materialschichtdicke verwendet. Dies soll im Vergleich eine Beurteilung ermöglichen, ob die Unterschiede der Testmuster wirklich auf die unterschiedlichen Absorptionsschichten zurückzuführen sind. Ein Donorslide wurde ohne Glassubstrat hergestellt. Tabelle 2 fasst die Eigenschaften der verwendeten Donorslides zusammen, Abbildung 5.11 zeigt die Fluoreszenzbilder der übertragenen Testmuster, Abbildung 5.12 typische Ausschnitte daraus.

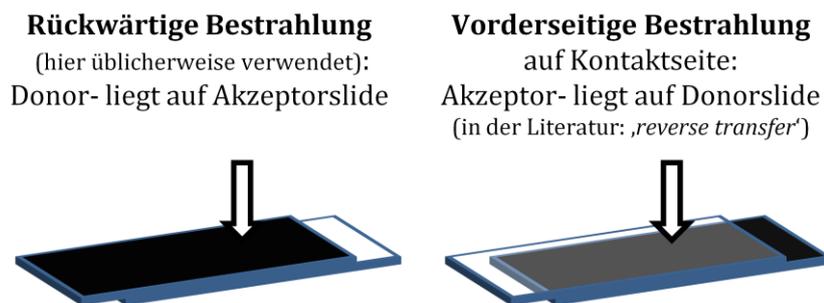


Abbildung 5.10: Bestrahlungsweisen in cLIFT. Bei der in dieser Arbeit üblicherweise durchgeführten rückwärtigen Bestrahlung liegt der Donorslide auf dem Akzeptorslide auf. In umgedrehter, vorderseitiger Weise tritt der Strahl durch den transparenten Akzeptorslide hindurch und trifft auf die Kontakt-Oberfläche des Donorslides auf.

Tabelle 2: Aufbau der verschiedenen getesteten Donorslides.

Testmuster	Donorslide	Absorptionsschicht	Dicke der Absorptionsschicht	Absorptionsgrad	Dicke der Materialschicht	Akzeptorslide
1	I	Kaptonklebeband	25 µm	31 %	≈ 2 µm	a
2						b
3						c
4						d
5	II	Kaptonklebeband	25 µm	31 %	(1,4 ± 0,1) µm	d
6	III					(0,7 ± 0,1) µm
7	IV	Kaptonklebeband	50 µm	53 %		c
8	V	Schwarzes Polyimid	30 µm	100 %		b
9		Schwarzes Polyimid, Kontaktseite bestrahlt	30 µm	100 %		a
10		VI	Graphit	1-3 µm		100 %
11	VII	Durimide	4 µm	44 %		c
12	VIII	Kaptonfolie, ohne Substrat	25 µm	31 %	d	

Dicke des Glassubstrates: 1 mm (Objektträger), außer bei Durimide – dort 500 µm (Borosilikat-Wafer)

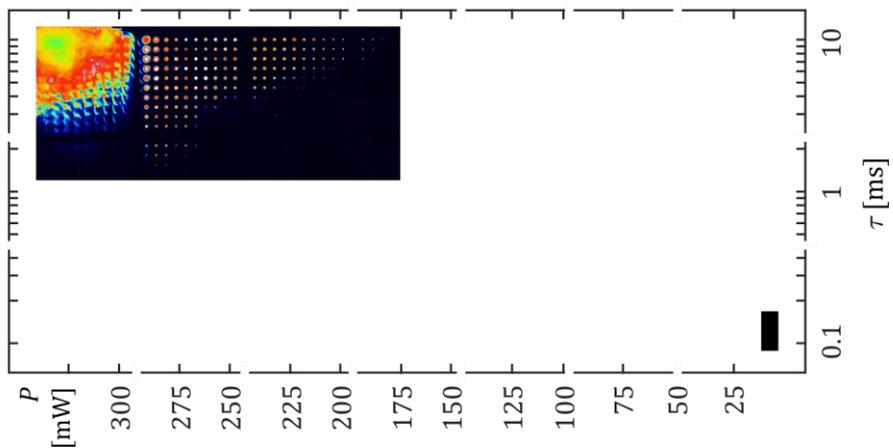
Dicke der Kleberschicht des Kaptonklebebands: 35 µm

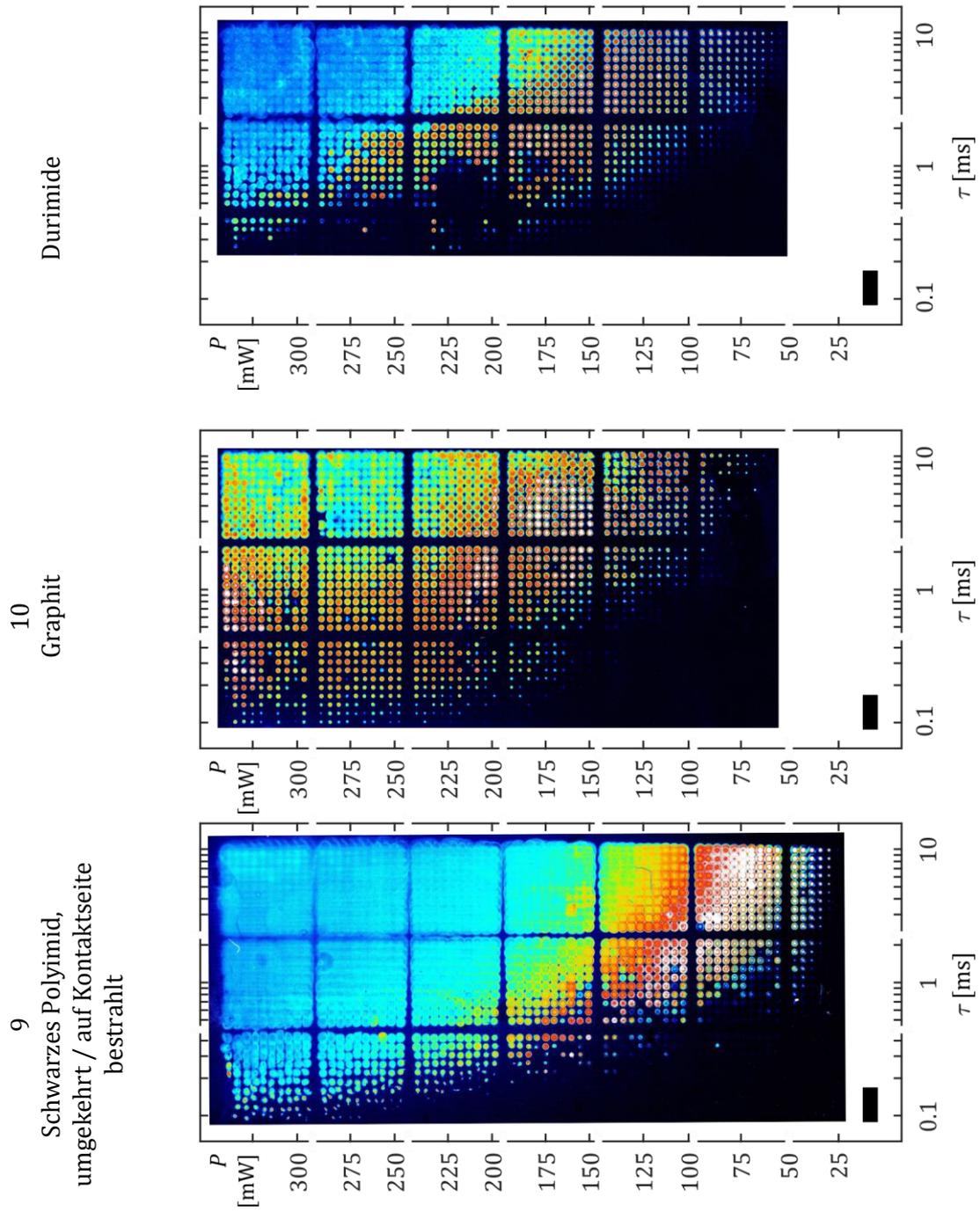
Dicke des doppelseitigen Klebebands zum Fixieren des schwarzen Polyimids: 10 µm

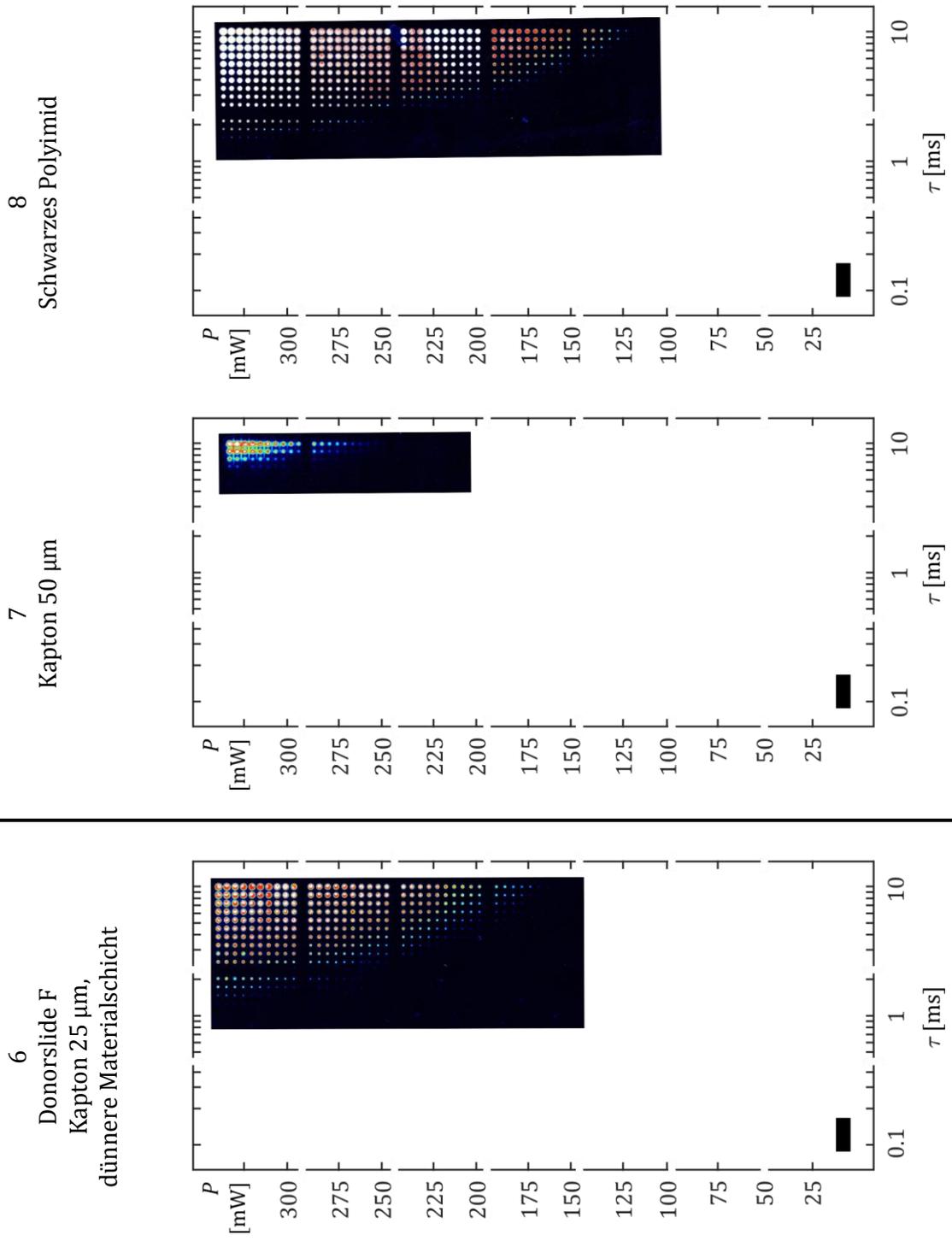
Farbskala

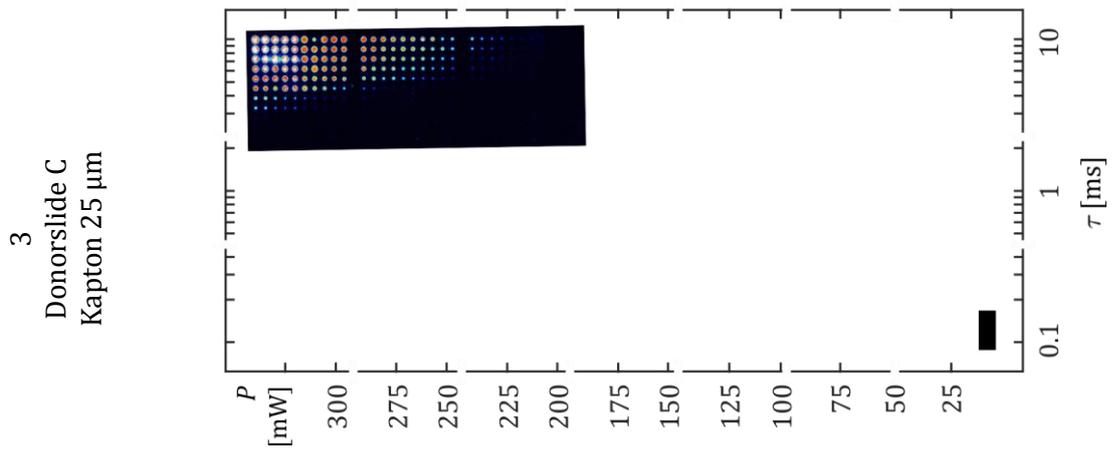
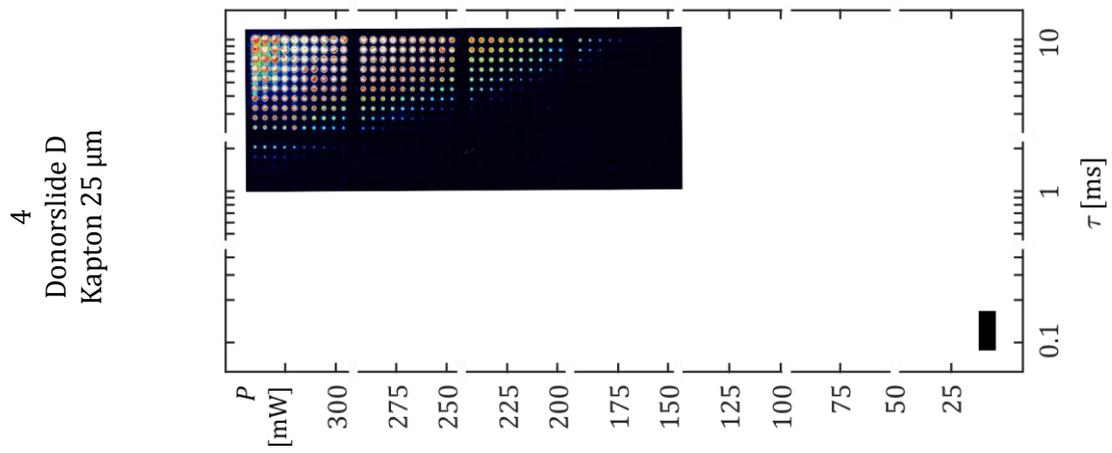
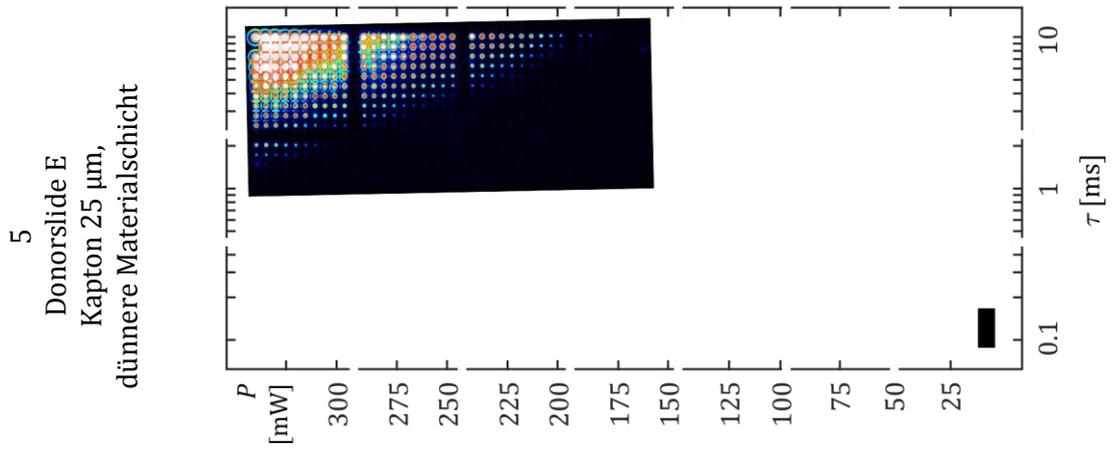


12
Kaptonfolie 25 µm,
ohne Substrat









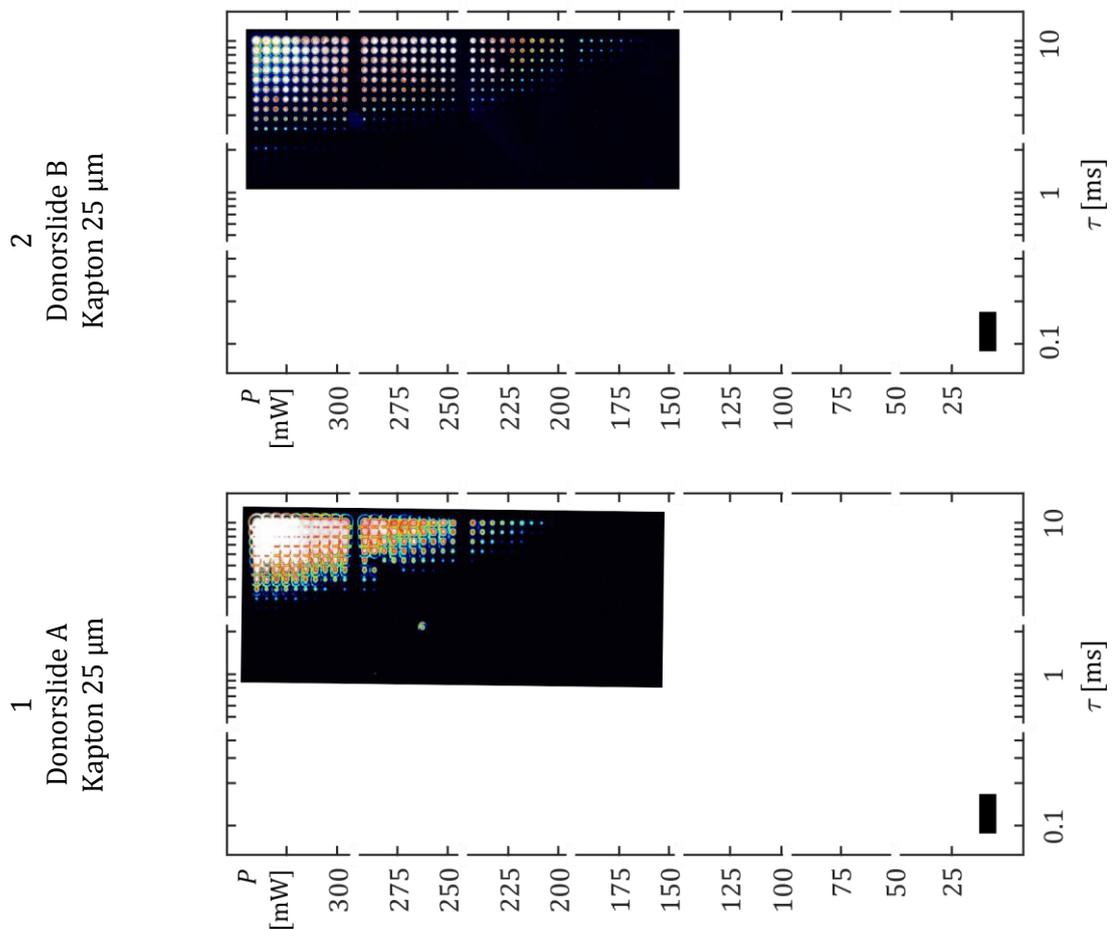


Abbildung 5.11: Fluoreszenzbilder von Testmustern, die von verschiedenen aufgebauten Donorslides übertragen wurden. P bezeichnet die Laserleistung, τ die Bestrahlungsdauer. Der Kontrast wurde für die einzelnen Bilder jeweils getrennt angepasst. Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm.

Betrachtet man die von den verschiedenen aufgebauten Donorslides übertragenen Testmuster und die Ausschnitte daraus, so kommt man zu folgenden Schlüssen: Wenn es das Ziel ist, durch Verbesserung der Absorptionsschicht Übertrag bei kleineren Leistungswerten zu ermöglichen, ist nicht der Absorptionsgrad allein ausschlaggebend. Der Bereich im Parameterraum, in dem mit schwarzem Polyimid Spots generiert werden können, erstreckt sich nicht um so viel mehr in die Richtung geringerer Leistung, als man wegen der nun kompletten Absorption erwartet hätte. Die Geometrie spielt offensichtlich eine größere Rolle, denn dünnere (Durimide), komplett absorbierende dünnere (Graphit) und komplett absorbierende, kontaktseitig bestrahlte (schwarzes Polyimid, umgekehrt) Absorptionsschichten zeigen Übertrag bei deutlich geringerer Bestrahlungsstärke. Wenn neben dem Ziel einer Leistungsreduktion auch die Qualität der Spots im Auge behalten werden soll, fällt auf, dass die Spots der letztgenannten, effektiver aufgebauten Donorslides besonders undefiniert sind. Auch der Parameterraum selbst, insbesondere

der von Graphit-Donorslides, ist nicht so klar strukturiert wie der der Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel). Zudem ist der akzeptable Bereich mit gesättigten Spots begrenzt. Diese akzeptablen Bereiche werden im Weiteren miteinander verglichen.

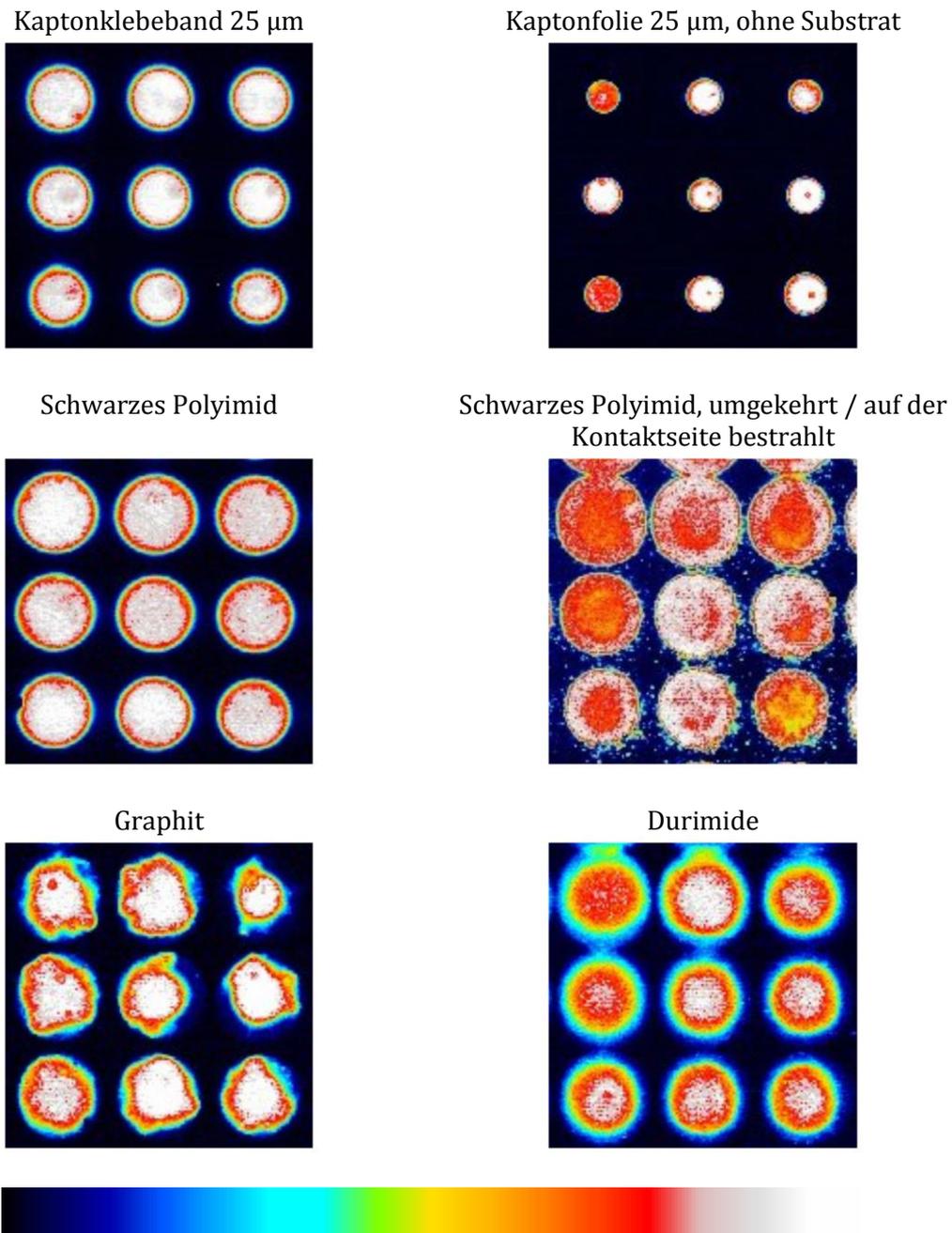


Abbildung 5.12: Typische Morphologien von von verschiedenen aufgebauten Donorslides übertragenen Spots. Es handelt sich um Ausschnitte aus den oben gezeigten Testmustern, die von verschiedenen Orten stammen. Man beachte die unterschiedlich homogene Struktur der Spots. Das Spotraster ist 250 μm .

Abbildung 5.13 zeigt die von Hand ermittelten guten Bereiche im Testmuster der verschiedenen Absorptionsschichten. Sie sind deutlich verschieden und überlappen teilweise nicht. Der Prozess muss also spezifisch auf die eingesetzte Donorart abgestimmt werden. Für die Donoren mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) sind nicht der gesamte Bereich, sondern jeweils dessen Grenzkurven in das Diagramm eingetragen; ihr Ort im Parameterraum variiert um fast 50 %. Die Prozessparameter sollten also spezifisch für jeden eingesetzten Donor ermittelt werden, sofern man nahe der Grenzkurve, also bei besonders kleinen Spots arbeiten möchte. Zu kleinen Bestrahlungsdauern im sub-Millisekundenregime erstreckt sich quasi keiner der Bereiche. Somit wurde eine anscheinend fundamentale Untergrenze der cLIFT-Technologie ermittelt.

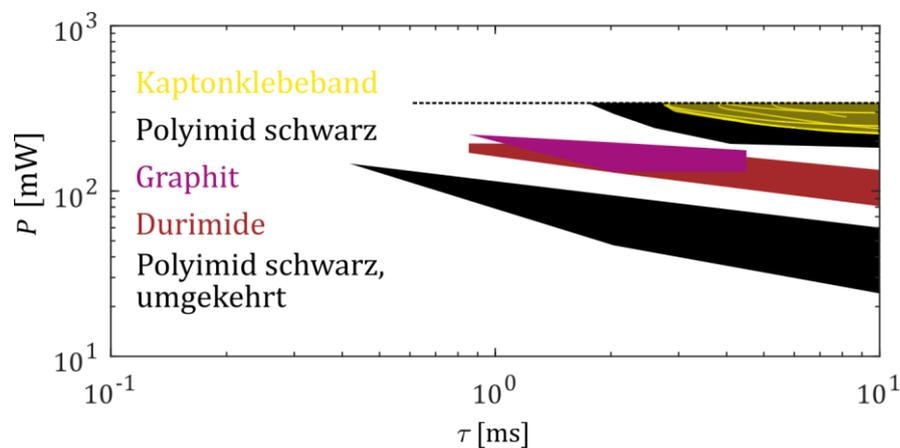


Abbildung 5.13: Akzeptable Bereiche im Parameterraum für verschiedene Absorptionsschichten. Das hier gelb eingezeichnete ‚Kaptonklebeband‘ kennzeichnet die Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel). Für diese wurden die Grenzkurven zu geringer Bestrahlungsstärke (kleine Laserstrahlleistung P , kurze Bestrahlungsdauer τ) hin eingezeichnet. Zu hoher Stärke hin waren sie innerhalb des betrachteten Raumes nicht begrenzt.

Dass der Absorptionsgrad nicht allein die Effizienz der Nutzung der Laserleistung entscheidet, zeigt sich auch, wenn man die von Hand ermittelten Grenzkurven zwischen dem Bereich im Parameterraum, wo Übertrag erfolgt bzw. nicht erfolgt, zusammen in ein Diagramm einträgt (Abbildung 5.14) und dabei nicht wie in den bisherigen Diagrammen die Leistung des Laserstrahls, sondern die gemäß des Absorptionsgrades tatsächlich deponierte betrachtet. Die Kurven fallen dann nicht überein. Die Kurven aus den Testmustern von dickeren Kapton-Schichten liegen zwar oberhalb der Kurven von dünneren Kapton-Schichten, aber auch die Dicke kann nicht der weitere, die Linien sortierende Parameter allein sein, denn die Durimide-Linie liegt unterhalb der Graphit-Linie. Alle nicht-kontaktseitig bestrahlte Grenzkurven gemeinsam zeigen jedoch ein $P\sqrt{\tau}$ ähnliches Skalierungsverhalten (eine ‚Steigung‘ von $-1/2$ im doppelt-logarithmischen Diagramm).

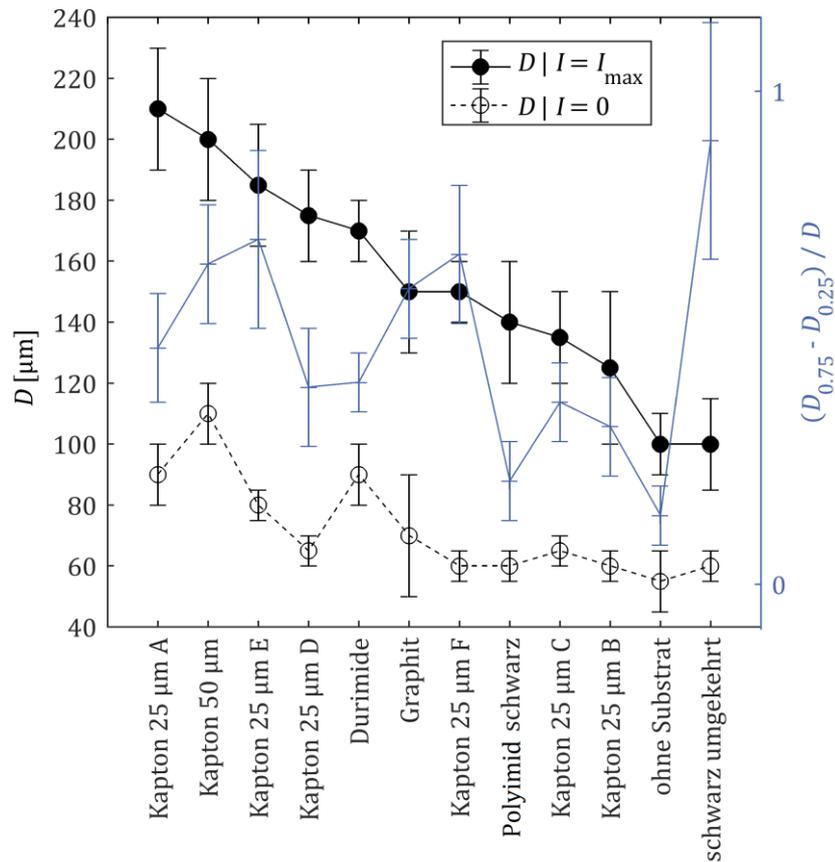


Abbildung 5.15: Kenngrößen von mit verschiedenen aufgebauten Donorslides übertragbaren Spots. Der besseren Übersichtlichkeit halber sind die Datensätze nach der Größe der kleinsten gesättigten Spots sortiert und durch Linien miteinander verbunden. ‚Kapton 25 µm‘ A-D sind gleichartige Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) und sollen hier als Referenz dienen. Es sind jeweils die minimale Spotgröße $D | I = I_{max}$, ab der die Spots gesättigt sind, und die nach unten extrapolierte Spotgröße $D | I = 0$, bei der die Intensität Null würde, eingetragen. Für die Beurteilung der Qualität im Sinne von Definiertheit der Spots wurde der Unterschied zwischen der ‚Viertelwertsbreite‘ $D_{0,25}$ und ‚Dreiviertelwertsbreite‘ $D_{0,75}$ herangezogen und dieser auf die gesättigte Spotgröße (Halbwertsbreite) normiert (rechte Hochachse und blaue Messkurve).

Die kleinsten und gleichzeitig am schärfsten begrenzten Spots stammen von dem Donorslide, der nur aus einer Kaptonfolie und dem Übertragsmaterial, aber keinem Glassubstrat bestand. Dies bestätigt den subjektiven Eindruck beim Betrachten der obigen Testmuster und Ausschnitte (Abbildung 5.12). Natürlich ist angesichts der starken Variation der Kenngrößen unter gleichartigen Donorslides eine gewisse Skepsis zu bewahren, aber die ausgezeichnete Position der Daten dieser Donorart in ihrer Kombination ist im Diagramm einzigartig. Der Grund könnten thermische Eigenschaften sein, aber auch, dass sich eine flexible Folie der Welligkeit des Akzeptorslides besser anpassen kann als ein auf einem starren Glassubstrat aufgebauter Donorslide. In der Tat

sieht man im entsprechenden Testmuster (Abbildung 5.11, Teilbild 12) in der Ecke links oben – dort hat sich die Folie durch die Hitze wohl verformt und weggebogen – dass ein zunehmender Abstand zum Akzeptorslide Größe und Qualität der Spots stark beeinflusst (vgl. auch Kapitel 4).

5.4 Materialschicht

Auch die Gestaltung Materialschicht auf dem Donorslide, die übertragen werden soll, unterliegt einiger Freiheit. So ist die Schichtdicke eine geometrische Größe, die durch geeignete Einstellung der Beschichtungsmethode gewählt werden kann. Außerdem sind die Stoffeigenschaften des Übertragungsmaterials nicht festgelegt; da cLIFT viele verschiedene unterschiedliche Bausteine übertragen können soll, muss untersucht werden, wie der Erfolg des Übertrags mit verschiedenen Bausteinen variiert. Kein Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist die chemische Frage der Konzentration der Bausteine im Matrixpolymer – dies wurde in [70] untersucht, und auch das in früheren Arbeiten [9] verwendete Polymer soll weiterhin benutzt werden. Deshalb wurde die Auswahl eines Matrixpolymers zwar nicht systematisch untersucht, allerdings wurden weitere Substanzen zumindest grundsätzlich erprobt: Eine gruppeninterne Kooperationspartnerin entwickelte ein neues Polymer für die Peptid-Festphasensynthese [75][76] und musste dabei untersuchen, wie sich dieses bei lateraler Strukturierung in Spots im Arrayformat verhält. Dazu wurden diverse Testmuster übertragen. Die Testmuster sahen qualitativ vergleichbar zu den für die in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Matrix auftretenden aus. Außerdem wurde auch Polycaprolacton auf seine Verwendbarkeit als Matrix in cLIFT überprüft. Wiederum war ein ähnliches Testmuster zu beobachten. Schließlich wurde auch der Transfer von anderen Materialien getestet, die nicht der Peptidsynthese dienen; beispielsweise wurde im Rahmen einer gruppeninternen Kooperation die für MALDI (Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisierung – ein ortsaufgelöst realisierbares Verfahren zur Massenspektrometrie) benötigte Beschichtung mit einem speziellen Polymer mittels cLIFT, flächig und spotweise, durchgeführt [77], um damit die hergestellten Arrays zu untersuchen. Konventionelle Beschichtungsmethoden würden dabei zu viel Material auftragen, in dem es zudem zu lateraler Diffusion kommt.

In den folgenden Abschnitten werden diese Aspekte, also der Einfluss der Schichtdicke, der Übertrag verschiedener Bausteine, sowie Phänomene bei der Verwendung anderer Übertragungsmaterialien, untersucht.

5.4.1 Schichtdicke

Bereits im Kapitel 5.3 waren Donorslides mit unterschiedlich dicken Materialschichten eingesetzt worden. Die erzeugten Testmuster waren augenscheinlich nicht signifikant verschieden. Dies soll nun anhand eines weiteren Datensatzes verifiziert werden.

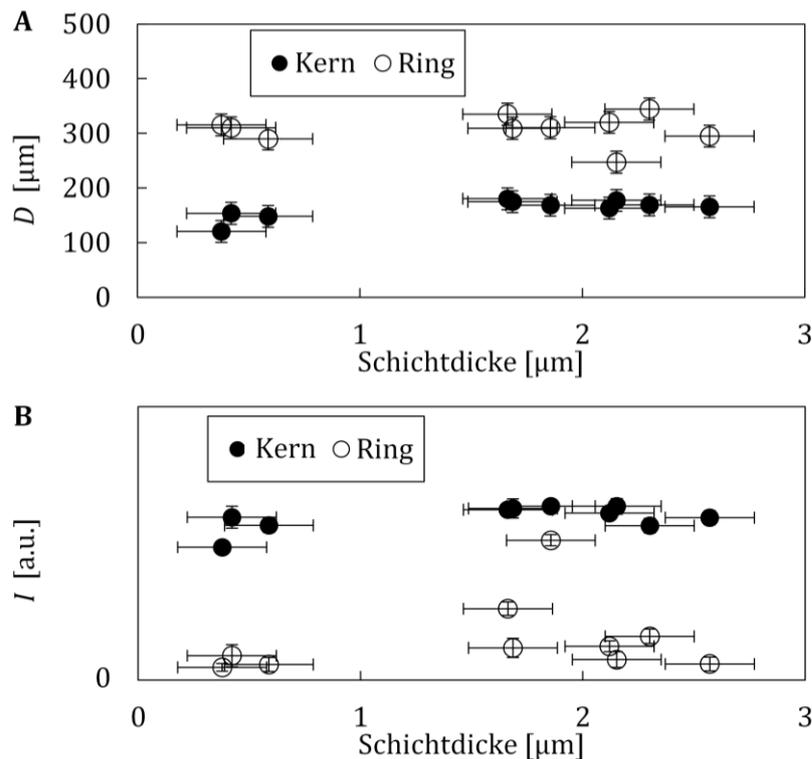


Abbildung 5.16: Einfluss der Dicke der Übertragungsmaterialschicht auf Größe und Intensität der Spots. Zehn verschiedene Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel), aber unterschiedlicher Materialschichtdicke waren hergestellt und jeweils 50 Testspots davon übertragen worden. Eingezeichnet ist jeweils der Median der Messgrößen Halbwertsbreite (A) und Intensität (B) der Spots. Die Spots waren inhomogen und wiesen in der Umgebung einen konzentrischen Ring auf. Für die Ringe bezeichnet D den Ringdurchmesser. Die Unsicherheit der Schichtdicke ergibt sich aus der Welligkeit und Rauheit der Donorslides; als Unsicherheiten der Zielgrößen wurde deren halber Interquartilbereich angenommen. Es ist in den Diagrammen kein Trend zu erkennen. Insbesondere ist danach die Ringbildung unabhängig von der Schichtdicke.

Im Rahmen einer vom Verfasser teilweise betreuten Praktikums-Lehrveranstaltung wurden durch Variation der Lösungsmittelmenge und Drehzahl bei der Spincoating-Beschichtung auf verschiedenen Donorslides verschieden dicke Materialschichten hergestellt. Von diesen wurden auf einen einzelnen Akzeptor je 50 Testspots mit gleichen Lasereinstellungen übertragen. Die Studierenden werteten eine zufällige Auswahl dieser Testpunkte von Hand aus; für die Diagramme hier wurden alle Testpunkte berücksichtigt und durch digitale Bildverarbeitung gestützt jeweils die Intensität und Halbwertsbreite der Spots ermittelt. Da die Spotprofile nicht ideal war, sondern sich eine ringförmige Ablagerung um die eigentlichen Spot-,Kerne' herum gebildet hatten (vgl. Kapitel 4), wurden diese Größen für Kern und Ring getrennt betrachtet.

Abbildung 5.16 zeigt, dass die Schichtdicke keinen deutlich zu erkennenden Einfluss auf die Zielgrößen hat. Insbesondere beeinflusst sie nicht die Ausprägtheit der Ringe.

5.4.2 Verschiedene Bausteine

Um einerseits zu sehen, wie sich die Spoteigenschaften mit verschiedenen Bausteinen im Übertragsmaterial ändern, aber auch um zu verifizieren, dass cLIFT mit allen für die Peptidsynthese nötigen Aminosäuren funktioniert, wurden entsprechende Donorslides hergestellt und getestet. Abbildung 5.17 zeigt, dass für alle Bausteine die Übertragung erfolgreich war.

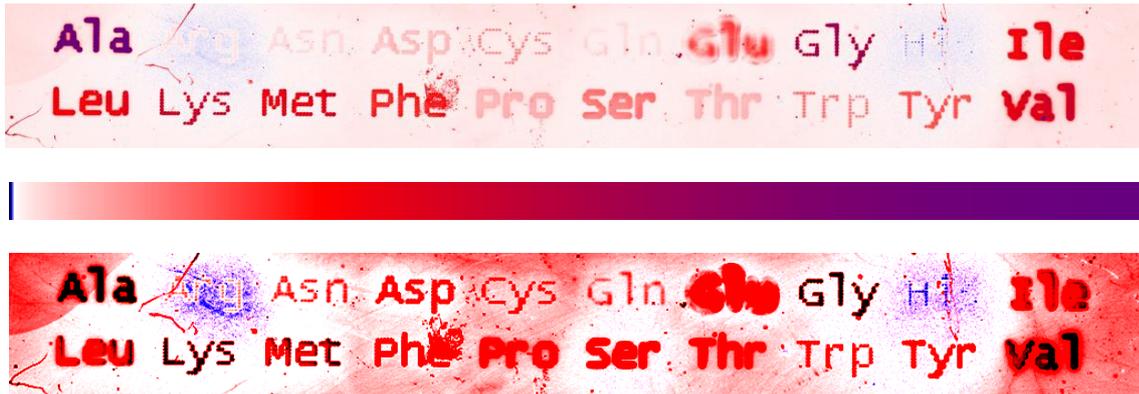


Abbildung 5.17: Fluoreszenzbild von Spots aus allen Aminosäuren. Die sichtbaren Buchstaben, die der Dreibuchstaben-Abkürzung entsprechen, bestehen aus der jeweiligen Aminosäure. Alle diese Aminosäuren-Moleküle (d.h. die kombinatorischen Bausteine bei der Peptidsynthese) wurden mit den gleichen Lasereinstellungen übertragen. Ein Buchstabe wird aus mehreren Spots der selben Aminosäure gebildet. Es wurde eine stark nichtlineare Farbskala verwendet, da der eingesetzte Farbstoff mit den übertragenen Bausteinen und der Oberfläche wechselwirkt, und daher beispielsweise das Signal bei Arginin in Bezug auf den Hintergrund invertiert ist. Zur besseren Sichtbarkeit im Druck wurde in der unteren Kopie des Bildes der Kontrast zusätzlich erhöht. Die Höhe der Buchstaben beträgt etwa 1,2 mm.

Es ist auffallend, dass die Spots aus den verschiedenen Bausteinen bei gleichen Lasereinstellungen deutlich unterschiedlich groß werden. Um dies qualitativ zu untersuchen, wurden aus einem anderen Fluoreszenzbild Daten zu Größe und Intensität der Spots extrahiert und in Abbildung 5.18 aufgetragen. Es entstand im Rahmen der Arbeiten einer gruppeninternen Kooperationspartnerin [77]. Es wurden dort auf den jeweils selben Akzeptorslide Teststreifen von Donorslides mit allen Aminosäuren außer Arginin übertragen. Für dieses war kein Donorslide angefertigt worden, da die Stabilität des Bausteins als gering angenommen wurde und das Experiment fünf Monate nach Herstellung der Donorslides durchgeführt wurde. In jedem Teststreifen wurden bei konstanter Bestrahlungsdauer die Laserleistung variiert und pro Einstellung zehn Spots generiert. Vor der Ankupplung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde ein weiteres Molekül als Abstandhalter angefügt, um die stoffspezifischen Wechselwirkungen des Farbstoffes mit den Aminosäurebausteinen gering zu halten. Die Beurteilung und Optimierung der Kupplungsausbeuten der einzelnen Bausteine ist wegen der chemischen Fragestellung und Komplexität nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit; das Hauptaugenmerk liegt auf

der Größe und Gestalt der Spots in Abhängigkeit von den Prozessparametern. Man sieht in der Abbildung, dass die erreichbaren Mindest- und Maximalgrößen von gesättigten Spots stark variieren. Ein einfacher Zusammenhang zu Stoffgrößen wie der Molekülgröße der Aminosäuren war nicht ableitbar. Interessanterweise sind die Ursprungspunkte der verschiedenen ‚Kurven‘ etwas konsistenter als ihre Endpunkte.

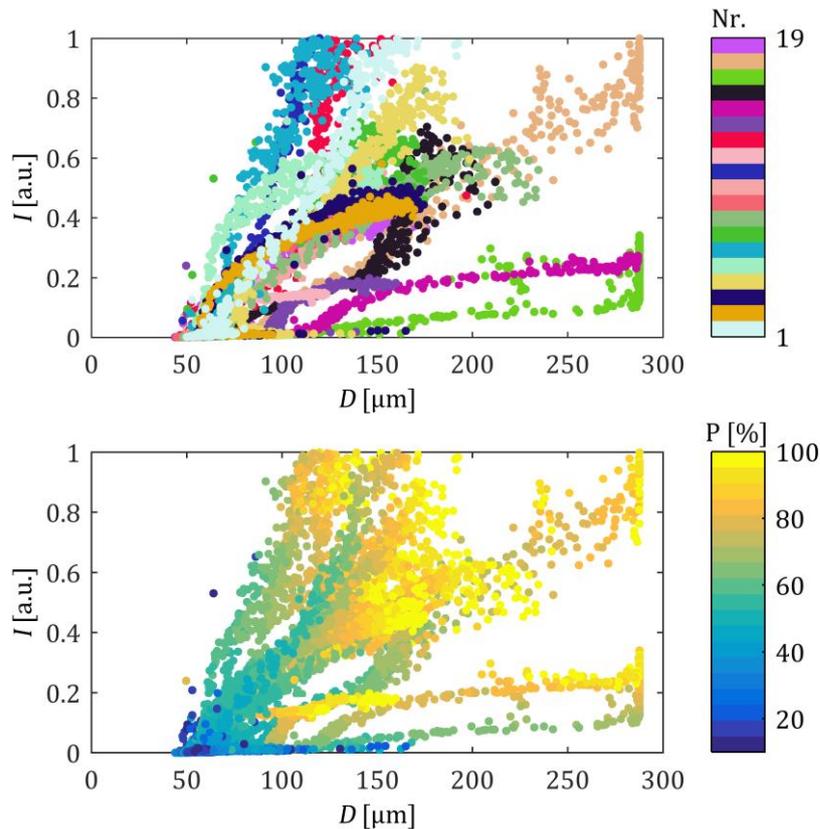


Abbildung 5.18: Zielgrößen von Spots aus verschiedenen Bausteinen. Die Bausteine wurden von Donorslides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Jeder Datenpunkt entspricht einem Spot. Eingezeichnet sind die Spotgröße und die Spotintensität. Im oberen Diagramm sind Spots der selben Bausteine in der selben zufälligen Farbe eingetragen, im unteren Diagramm kodiert die Farbe die Laserleistung beim Übertrag des Spots. Die Bestrahlungsdauer war für alle Spots gleich (15 ms). Es ist ein qualitativ ähnliches Verhalten für alle Bausteine zu beobachten.

Abbildung 5.19 zeigt die aus den $I(D)$ -Kurven entnommenen Kenngrößen der Mindest-Durchmesser und der durch die Bestrahlung maximal erreichbaren Spotgrößen. Der im gesamten Experiment minimal erreichbare Durchmesser ist durch die blaue durchgezogene Linie gekennzeichnet (etwa $80 \mu\text{m}$). Wenn man alle getesteten Bausteine kombinatorisch zusammen verwenden möchte, muss man beachten, dass es der darunter größte kleinste gesättigte Spot ist, der das Spotraster fordert, aber der kleinste größte gesättigte Spot die eigentliche Spotgröße bestimmt, die sich nach mehreren Lagen ergibt, weil ungesättigte Spotbereiche der geringen Ausbeute wegen zunehmend verschwinden. Optimalstenfalls kann man nach mehreren Lagen also Spots von der Größe der blauen

gestrichelten Linie (hier etwa $125 \mu\text{m}$) in einem Raster der Größe der magentafarbenen Strichpunkt-Linie erzeugen (hier etwa $250 \mu\text{m}$). Es empfiehlt sich wegen der Schwankungen im Prozess und möglicher Ringbildung um die Spots herum einen größeren Pitch einzuplanen, etwa dem Durchmesser der größten beobachteten Spots entsprechend (grüne gepunktete Linie, ungefähr $290 \mu\text{m}$). Will man das durch die größten Spots definierte Raster besser ausnutzen, kann man mehrere Spots der kleinsten Größe beieinander platzieren, die überlagert den vorhandenen Platz ausfüllen. Man könnte also einen einzelnen ‚Spot‘ aus mehreren Laser-, ‚Shots‘ generieren.

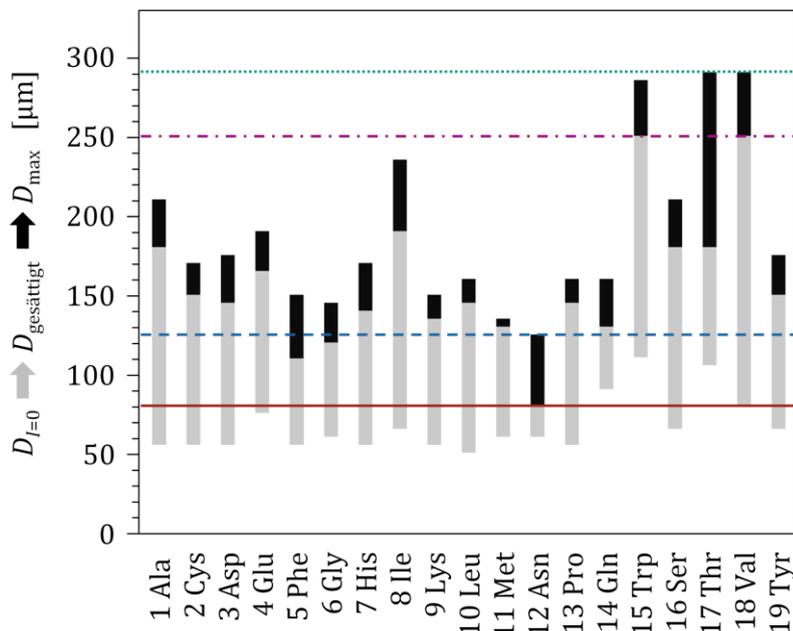


Abbildung 5.19: Kenngrößen von Spots aus verschiedenen Bausteinen. Für die getesteten Aminosäure-Bausteine sind die jeweils extrapolierte minimale Spotgröße $D|I = 0$, bei der die Spotintensität Null würde (Beginn des grauen Balkens), und die Spotgröße $D|I = I_{\text{max}}$, ab der die Spots gesättigt sind (Ende des grauen, bzw. Anfang des schwarzen Balkens) eingetragen, sowie der Durchmesser der bei der stärksten Bestrahlung aufgetretenen Spots (Ende des schwarzen Balkens). Die rote durchgezogene Linie kennzeichnet die kleinste Größe der im gesamten Experiment beobachteten gesättigten Spots. Die magentafarbene Strichpunkt-Linie kennzeichnet die größte beobachtete minimale Größe gesättigter Spots – dies ist die mindeste Platz, die für Spots eingeplant werden muss, wenn alle Bausteine zusammen kombinatorisch verwendet werden. Besser sollte das Spotraster so groß sein, dass auch die größten im gesamten Experiment beobachteten Spots nicht überlappen (grüne gepunktete Linie). Der Spotdurchmesser hingegen, der sich durch Kombination mehrerer Lagen ergeben wird, entspricht der maximal für den Baustein erreichbaren Spotgröße, der bei die kleinsten Spots generiert (blaue gestrichelte Linie).

Im Rahmen einer Kooperation wurde erfolgreich der nicht-Standardaminosäure-Baustein ‚Pra‘ (Propargyl-Glycin) übertragen (Abbildung 5.20). Da er durch den Übertrag nicht beschädigt wurde, konnte er anschließend von dem Kooperationspartner durch eine Click-Chemie-Reaktion mit einem Fluorophor angefärbt werden.



Abbildung 5.20: Fluoreszenzbild von Spots einer synthetischen Aminosäure. Aus [78] entnommen. Es wurde Propargyl-Glycin übertragen und mit einer Click-Chemie-Reaktion angefärbt. Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm.

5.4.3 Andere Matrixpolymere

cLIFT wurde erfolgreich nicht nur mit der in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten kommerziell erhältlichen Matrix, sondern auch mit einem eigens in der Arbeitsgruppe entwickelten [75] Matrixpolymer eingesetzt ([76], Abbildung 5.21). Bei diesem wäre für die eingesetzten Bausteine eine Spotdichte von bis zu 20000 Spots pro cm^2 möglich. Außerdem funktioniert der Übertrag, die Kupplung und Anfärbung von Bausteinen mit Polycaprolacton als Matrixpolymer, und weist dabei eine für die Praxis relevante Eigenschaft auf: Spots, die im Fluoreszenzbild gerade gesättigt sind, stammen von übertragenen Materialportionen, deren Höhenprofil bereits gerade direkt messbar ist (Abbildung 5.22A) – mit diesem Material gäbe es also keine Beobachtungslücke zwischen direktem und indirektem Nachweis (vgl. Abbildung 3.4). Allerdings gibt es – anders als bei der in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Matrix – eine Diskrepanz zwischen dem Höhenprofil vor und nach dem Kupplungsschritt im Ofen (Abbildung 5.22B bzw. C). Die Höhe der im Ofen zerlaufenen und möglicherweise in den Funktionalisierungsfilm des Akzeptors eingedrungenen Materialportionen ist dann wieder unterhalb der Messgrenze.



Abbildung 5.21: Fluoreszenzbild von Peptidspots, die in einem neuentwickelten Matrixpolymer synthetisiert wurden. Aus [76]; Abdruck mit freundlicher Genehmigung. cLIFT diente hier zur Verifikation, dass mit der neuen Matrix (für Details sei auf [75] verwiesen) eine orts aufgelöste Strukturierung möglich ist. Der Pitch beträgt $75 \mu\text{m}$.

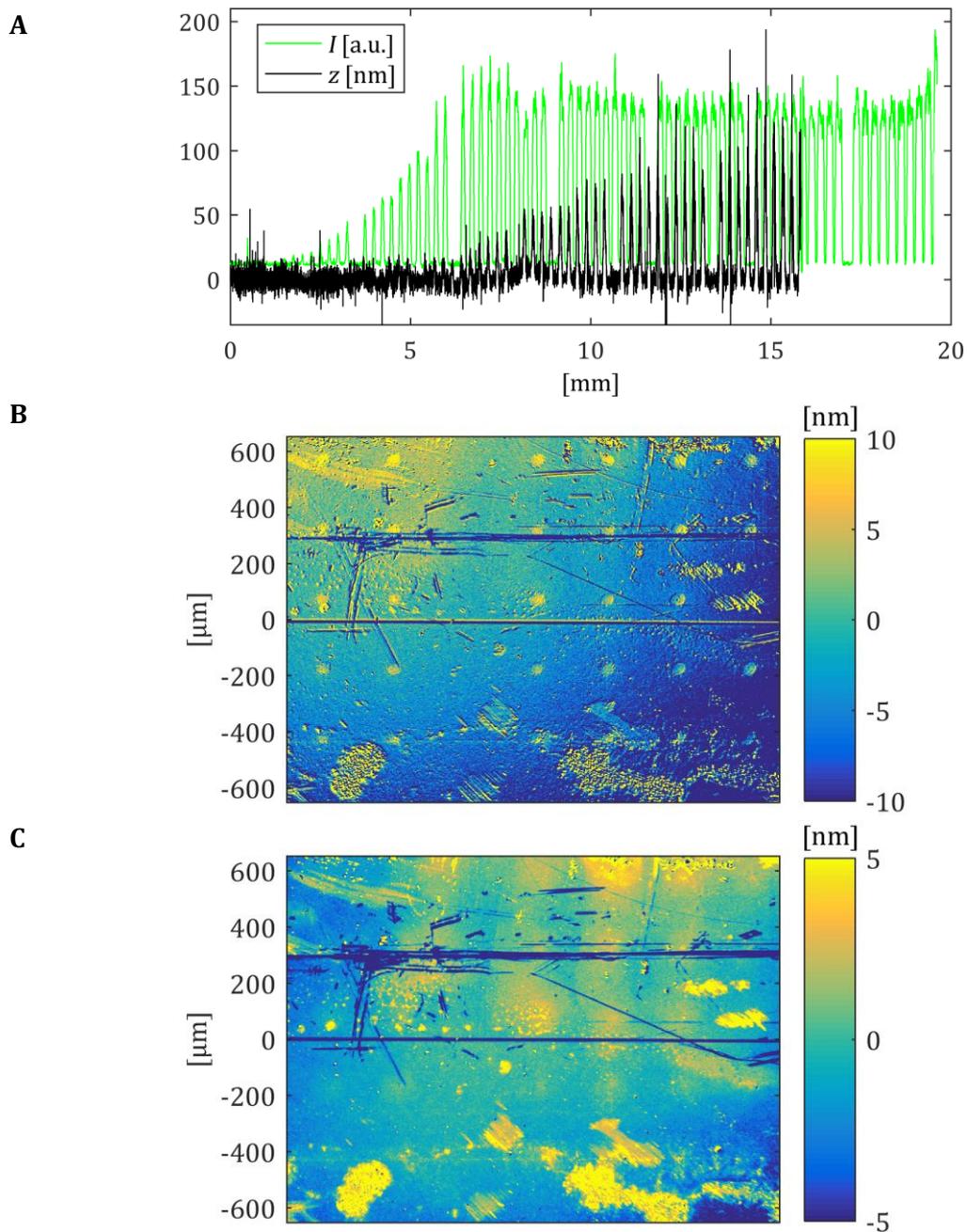


Abbildung 5.22: Höhenprofile von Spots mit Polycaprolacton als Matrix. (A) Schnitt durch ein Testmuster mit ansteigender Bestrahlungsstärke. Die schwarze Messkurve zeigt, abzüglich ihrer Welligkeit, das Höhenprofil der Materialportionen direkt nach dem Übertrag. Die grüne Messkurve zeigt einen Schnitt durch das Fluoreszenzbild nach chemischer Weiterbehandlung des Akzeptorslides. Spots, die im Fluoreszenzbild gerade gesättigt sind, stammen von übertragenen Materialportionen, deren Höhenprofil bereits gerade direkt messbar ist. (B) zeigt eine Höhenkarte direkt nach dem Übertrag der Spots, (C) den selben Ausschnitt des Slides nach dem Kupplungsschritt im Ofen. Die im Ofen zerlaufenen und möglicherweise in den Funktionalisierungsfilm des Akzeptors eingedrungenen Materialportionen sind danach nur andeutungsweise sichtbar (man beachte den Umfang Farbskala).

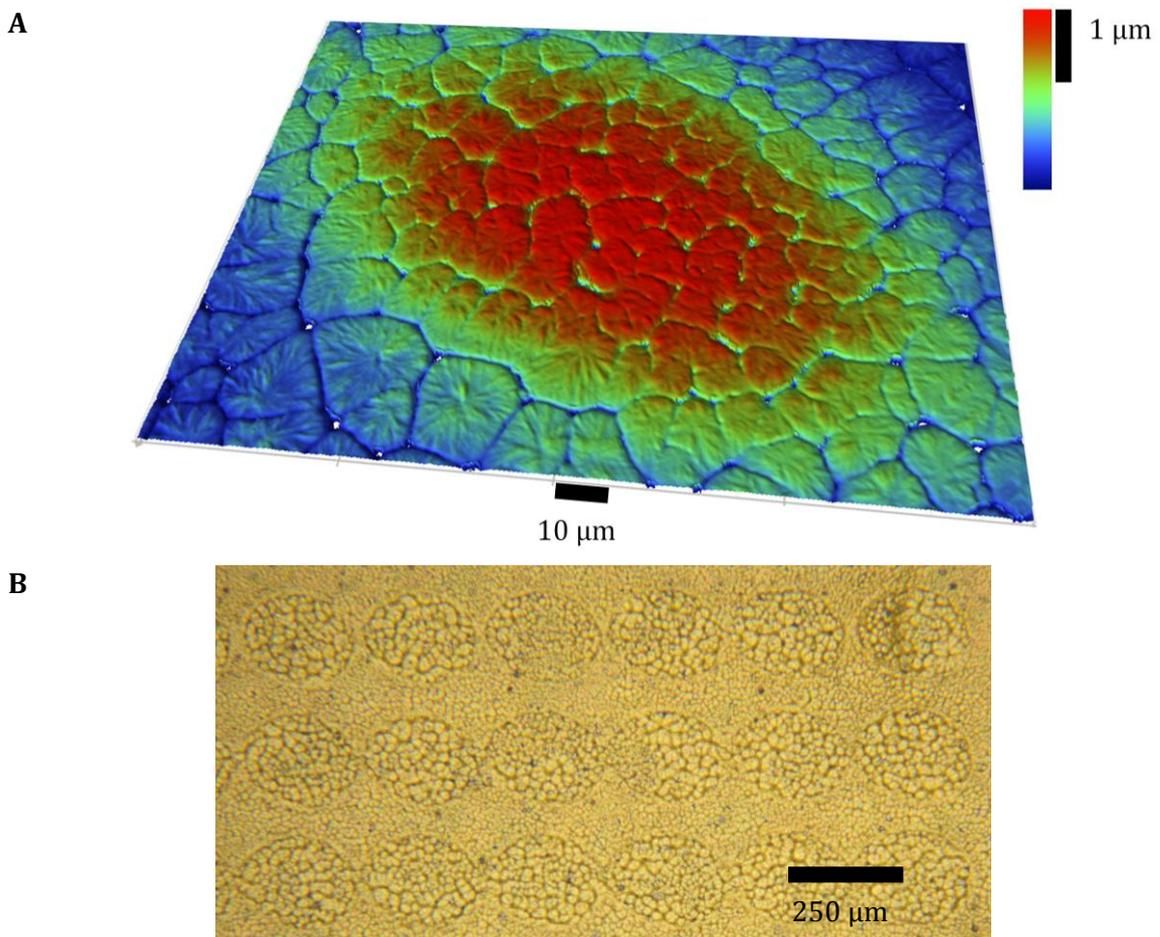


Abbildung 5.23: Oberflächenstruktur der Polycaprolacton-Schicht am Bestrahlungsort. (A) Die Oberfläche ist von Desikkationsrissen zerfurcht. (B) Die Längenskala der Zerklüftung ist an bestrahlten Orten größer (Lichtmikroskopbild).

Die Oberfläche der Polycaprolacton-Beschichtung ist nicht glatt (Abbildung 5.23A), sondern sie ist von Desikkationsrissen zerfurcht (im Englischen auch *mud cracks*, bekannt von ausgetrockneten Pfützen im Schlamm [92]). Interessanterweise ist deren Längenskala nach der Bestrahlung größer (Abbildung 5.23B) – somit ist deutlich der Bestrahlungsort auf dem Donor zu erkennen. Möglicherweise steht dessen dadurch leicht erkennbare Größe in einem festen Zusammenhang mit der Größe des übertragenen Spots, was eine Charakterisierung und Qualitätssicherung erleichtern würde.

Eine phantasievolle Nutzung der Zerklüftung der Oberfläche wäre es, die Risse bei einer ablasivere Variante von LIFT, bei der das Material brockenweise übertragen würde, als Sollbruchstellen zu benutzen – vgl. [27], wo entsprechend Materialpakete mit der Hilfe von Ionenstrahlen freigestellt wurden.

Man beachte, dass die meisten der bisher beobachteten Phänomene eher cLIFT- als materialspezifisch sind – so tritt beispielweise die Ringbildung auch bei der für MALDI verwendeten Universalmatrix (2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäure, Gentisinsäure; aus den Arbeiten zu [77]) auf. Dies ist insbesondere dann kritisch, wenn eine geschlossene Fläche übertragen werden soll. Abbildung 5.24 zeigt die Höhenkarte eines entsprechenden Musters auf einem Akzeptorslide. Die dort zu erkennenden, rot gefärbten vermeintlichen Spots sind aber nicht die eigentlich intendierten Spots, sondern Schnittpunkte der Ringe, die sich um die umliegenden Bestrahlungsorte gebildet haben.

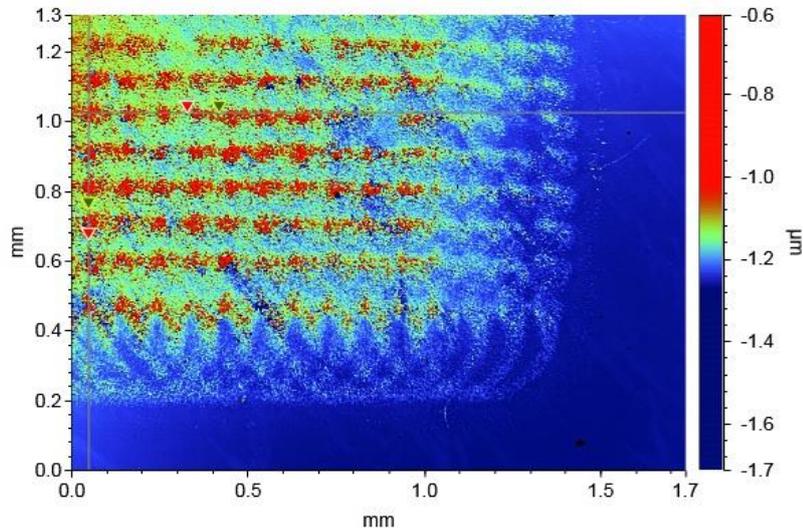


Abbildung 5.24: Höhenkarte eines übertragenen Musters bei ausgeprägter Ringbildung. (Bildschirmfoto, Ausschnitt der Messgerätesoftware). Die Ringe um die einzelnen Bestrahlungsorte überlagern sich additiv.

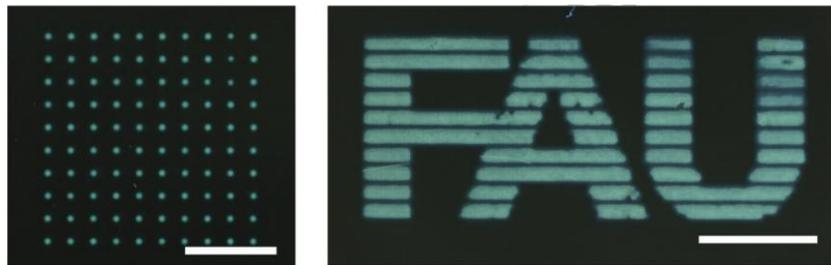


Abbildung 5.25: Fluoreszenzbilder von Spots eines Fluorophors. Entnommen aus [85]. Die Länge des Maßbalkens im linken Bild beträgt 1 mm, im rechten 2 mm.

Im Rahmen einer Kooperation wurde erfolgreich ein vom Kooperationspartner an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen (FAU) synthetisiertes Fluorophor übertragen (Abbildung 5.25). Dies ist ein weiteres Beispiel, wie cLIFT nicht nur zum Übertrag von Aminosäuren, sondern molekularen Bausteinen allgemein eingesetzt werden kann.

5.5 Sonstige Parameter

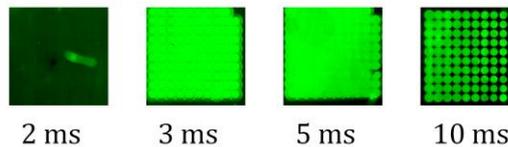
In diesem Unterkapitel wird auf weitere Prozessparameter hingewiesen, die nicht so ausführlich untersucht wurden wie die in den vorherigen Unterkapiteln, oder die Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein könnten.

5.5.1 Strahldurchmesser und -profil

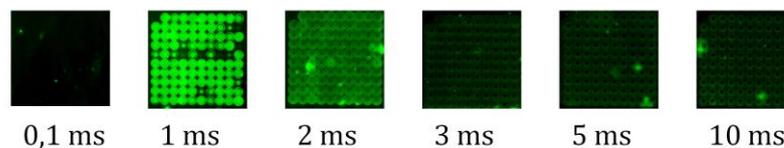
Der Laserstrahl hat eine endliche Ausdehnung. Er wird deshalb seitlich gesehen nicht punktförmig, sondern auf einer gewissen Fläche absorbiert. Bei gleicher Leistung kann je nach Strahltaile eine unterschiedliche Leistungsdichte in die Absorptionsschicht eingebracht werden.

A Mikrodissektionsgerät

Rückwärtige Bestrahlung



Vorder-/Kontaktseitige Bestrahlung



B cLIFT-Aufbau

Rückwärtige Bestrahlung *
Kontaktseitige Bestrahlung

(* in dieser Arbeit
üblicherweise verwendet)

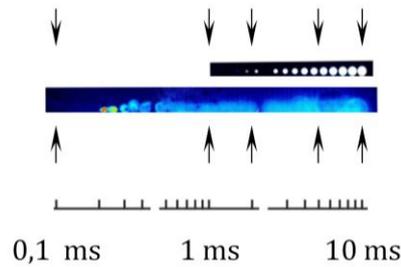


Abbildung 5.26: Übertrag mittels eines Mikrodisektionsgeräts und dem cLIFT-Aufbau im Vergleich. (A) Mit einem umgebauten Mikrodisektionsgerät aus früheren Arbeiten der Gruppe wurden testweise gleichartige Spots von einem Donorslide mit schwarzer Kaptonfolie als Absorptionsschicht übertragen und dabei bei konstanter Leistung und gleichem Strahldurchmesser die Bestrahlungsdauer variiert. Gezeigt werden hier Ausschnitte aus dem Fluoreszenzbild. (B) Ausschnitte aus dem Fluoreszenzbild eines Testmusters mit vergleichbaren Parametern (siehe die Pfeile für die Werte der Bestrahlungsdauer im Experiment mit dem Mikrodisektionsgerät), die mit dem cLIFT-Aufbau übertragen wurden (bei Bestrahlungen kürzer einer Millisekunde wurden bei rückseitiger Bestrahlung keine Spots übertragen; daher ist dieser Teil nicht abgebildet). Der Strahl dieses Aufbaus hat eine ähnliche Leistungsdichte, aber einen doppelt so großen Durchmesser. Das Spotraster in beiden Teilabbildungen beträgt 250 μm .

cLIFT wurde auch in einem umgebautem Mikrodisektionsgerät (Pixcell II Laser Capture Microdissection System, Arcturus) aus früheren Arbeiten der Gruppe [9] erprobt; das dort verbaute Lasersystem führt zu einem Strahldurchmesser von 7,5 μm , also etwa die Hälfte dessen des cLIFT-Aufbaus. Seine Leistung beträgt 100 mW, die Leistungsdichte etwa 1,2-Mal so hoch und damit mit dem cLIFT-Aufbau vergleichbar. Die Wellenlänge liegt im nahen Infrarotbereich; deshalb wurde ein Donorslide mit schwarzer Kaptonfolie als Absorptionsschicht verwendet. Abbildung 5.26 zeigt mit dem Mikrodisektionsgerät übertragene Testmuster im Vergleich mit Resultaten, die man mit dem cLIFT-Aufbau erhält. Es zeigt sich dabei, dass die kleinste Bestrahlungszeit, die zum Transfer von Spots nötig ist, ähnlich groß ist. Auch der Durchmesser der entstehenden Spots (bei Spots mit Ringbildung: der Durchmesser deren Kerne) ist vergleichbar und lässt sich somit nicht durch ein enger gefasstes Strahlprofil verkleinern. Lediglich der Schädigungseffekt bei kontaktseitiger Bestrahlung des Donorslides ist stärker.

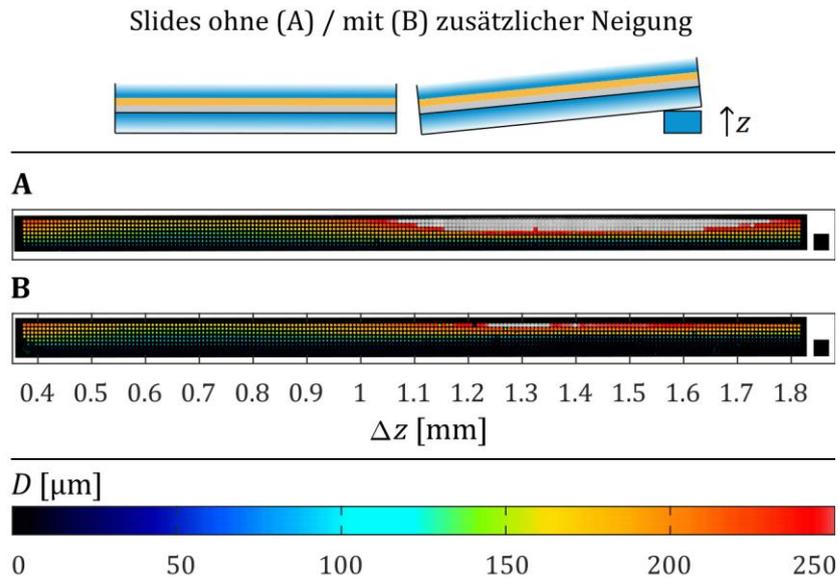


Abbildung 5.27: Auswirkung des Übertrags bei Verkippung der Slides gegenüber der Laborebene. Es wurde von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) ein Testmuster übertragen, das in der horizontalen Bildrichtung translationssymmetrisch ist und in der vertikalen Bildrichtung zunehmend große Spots aufweist. Dargestellt ist eine Visualisierung der Spotgrößen: Das originale Fluoreszenzbild wurde spotweise eingefärbt, wobei die Farbe die jeweilige Spotgröße kodiert. Spots, die größer sind als das Spotraster und deshalb nicht analysiert werden konnten, wurden in Graustufen belassen. Diese Darstellungsweise hat den Vorteil, dass der menschliche Betrachter leichter globale Trends auf dem Bild herausfiltern kann. Es zeigt sich, dass sich, sowohl wenn die Slides plan (A) als auch verkippt (B) eingelegt worden waren, kein wesentlich unterschiedliches Bild ergibt. Der sichtbare globale wellenartige Trend ist vermutlich ein Färbeartefakt, oder auf eine inhomogene Oberflächenfunktionalisierung zurückzuführen. Länge des Maßbalkens 1 mm.

Im cLIFT-Aufbau selbst wurde die Beobachtung, dass die resultierende Spotgröße kaum vom Strahldurchmesser abhängt, dadurch verifiziert, dass man keine starke Veränderung eines Testmusters beobachtet, wenn die Slides mit zusätzlicher Neigung in den Aufbau eingelegt worden waren (Abbildung 5.27). Nach der aus den Angaben in [9] ermittelten Strahldivergenz variierte im Experiment der Strahldurchmesser zwischen etwa 15 µm und 84 µm, die Leistungsdichte nahm also bis auf 3 % ab. Insbesondere wurde dadurch ermittelt, ob es bei der Justierung des Aufbaus nötig ist zu beachten, dass der Scanhead möglichst senkrecht auf die Slides zielt – bezüglich der Leistungsdichte ist es das folglich nicht; für die Auswirkung perspektivischer Effekte auf die Ortsgenauigkeit siehe Kapitel 7.

Die beiden oben beschriebenen Beobachtungen legen nahe, dass die Wärmeleitung im Donorslide das Temperaturprofil im Verlauf des Spotübertrags so weit verbreitert, dass seine ursprüngliche Breite keine nennenswerte Bedeutung mehr hat. Eine damit verwandte Fragestellung ist, ob das genaue Strahlprofil des Laserstrahls eine Auswirkung auf die Gestalt der Spots hat, ob man also etwa einen besonders modenreinen Laser

benötigt. Hierzu ist erwähnenswert, dass während einer Umbauzeit der Strahlengang im Versuchsaufbau offenbar nicht optimal eingestellt war, was sich in einem auf Justierungstestkarten und auch in der Form übertragener Spots durch eine Exzentrizität zeigte. Nach sorgfältiger Justage waren Strahl und Spots wieder kreisrund. Wenn man nun ein Testmuster (Abbildung 5.2) untersucht, das mit leicht elliptischem Strahlprofil übertragen wurde, und dabei die Exzentrizität der Spots abhängig von ihrer Lage im Laserparameterraum betrachtet (Abbildung 5.28), so stellt man fest, dass die geringste Exzentrizität bei großen Bestrahlungsdauern auftritt, also dort die ursprüngliche Form am wenigsten erhalten wurde. Dies ist plausibel, wenn man die Temperatursausbreitung als diffusives Phänomen begreift.

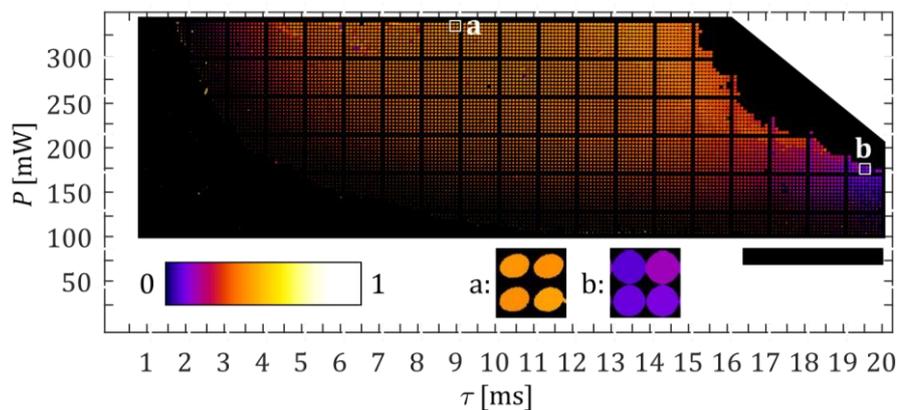


Abbildung 5.28: Abhängigkeit der Spotform von den Laserparametern. Es wurde ein Testmuster mit einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) generiert und das Fluoreszenzbild ausgewertet. Dargestellt ist eine Visualisierung der Exzentrizitäten der Spots: Das originale Fluoreszenzbild wurde spotweise eingefärbt, wobei die Farbe die jeweilige Exzentrizität kodiert (Hintergrundfarbe schwarz). Der Wert 0 entspräche einem Kreis, der Wert 1 einer Linie. Von zwei Stellen sind Vergrößerungen gezeigt. Für die größten Spots bei der stärksten Bestrahlung konnten keine Daten gewonnen werden, da sie überlappen; das Bild wurde an ihrer Stelle mit der Hintergrundfarbe eingefärbt, sie ‚fehlen‘ also in der Darstellung. Das Spotraster ist 250 μm ; die Länge des Maßbalkens beträgt 10 mm.

5.5.2 Ausblick

Es wäre interessant, genauer zu untersuchen, wie sich der Restlösungsmittelgehalt in den Donorslidebeschichtungen auf den Materialübertrag auswirkt. Ist dieser tatsächlich begünstigend, könnte man versuchen, gezielt zusätzliche hygroskopische Stoffe in die Materialschicht einzubringen. Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen Donorslides zerteilt wurden und die Teilstücke an Luft getrocknet, in Exsikkatoren getrocknet oder in mit Lösungsmitteldampf gesättigter Atmosphäre rehydriert wurden. Die Resultate ließen allerdings bisher keine eindeutige Interpretation zu. Um solche Experimente besser beurteilen zu können, muss zunächst eine Methode gefunden werden,

den Lösungsmittelgehalt quantifiziert zu messen, etwa durch Impedanz- oder spektroskopische Messungen.

Vor der Gestaltung einer neuen Werkstückhalterung für den Versuchsaufbau wurde ermittelt, ob es einen Unterschied macht, Donor- und Akzeptorslide nicht nur aufeinander zu legen, sondern aufeinander zu pressen. Dazu wurde ein Metallrahmen angefertigt, der über die Slides gelegt wurde und mit Schrauben an den Untergrund angezogen wurde. Mit in dieser Arbeit üblicherweise gewählten Einstellungen für die Übertragsparameter wurde keine Veränderung der Spotgröße oder -gestalt beobachtet; vermutlich sind die Glassubstrate zu starr, um ihre Form dabei einander anzupassen. Hier wurde nun aber im Fall des Donorslides, der die Kaptonfolie selbst als Substrat nutzt und keinen Glasträger, beobachtet, dass solch eine Anpassung von Vorteil sein könnte. Deshalb ist es vielversprechend, diese Donorarchitektur weiter zu untersuchen, sie etwa mit verschiedenen dicken Folien zu testen.

Auch der Schichtaufbau der Donorslides bietet Spielraum für künftige Untersuchungen. Ein Donorslide mit mehreren gestapelten Materialschichten, deren Materialien sich als Spots unabhängig voneinander nachweisen lassen und somit bezüglich ihres vertikalen Herkunftsortes auf dem Slide rückverfolgbar sind (analog zu [93]) könnte weiteren Aufschluss über den Übertragsmechanismus bringen. Und würde man eine nicht-transparente Materialschicht nutzen, könnte man auf die Absorptionsschicht des Donorslides verzichten. Graphitpulver dispergierte in einem ersten Versuch allerdings nicht gut genug im Matrixpolymer. Die Literatur zu vergleichbaren Schichtsystemen zeigt, dass es einen Unterschied macht, ob die Laserstrahlung in einer Hilfsschicht oder direkt absorbiert wird [94] [95]; dies müsste dann noch näher untersucht werden.

Es sind weitere, den Übertrag beeinflussende oder zu Gunsten seiner Verbesserung ausnutzbare Effekte denkbar, die bislang noch nicht untersucht wurden. Beispielsweise könnte man die Ausgangstemperatur des Donorslides knapp unter die für den Übertrag nötige Schwelltemperatur anheben, um mit weniger Laserstärke auszukommen. Dieses ‚Vorwärmen‘ könnte sogar lokal aufgelöst durch geeignete Bestrahlung mit dem Laser selbst vorgenommen werden (vgl. das folgende Kapitel 6.1).

5.6 Diskussion

Die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse (insbesondere die aus 5.3 und 5.4.2) können unter folgenden Fragestellungen diskutiert werden: Welche extremalen Spotgrößen sind mit cLIFT erreichbar? Welche Spotgrößen sind zuverlässig erreichbar, und wie können sie in der praktischen Anwendung ermittelt werden? Wie lässt sich die Prozesszeit verkürzen? Wie lassen sich cLIFT und der Versuchsaufbau ökonomischer gestalten? Und wie ist im Lichte der beobachteten Parametereinflüsse cLIFT von anderen LIFT-Implementierungen abgegrenzt?

Die größten hier berichteten Spots waren etwa 300 µm im Durchmesser groß. Um größere Spots zu drucken, muss man sie aus mehreren kleinen Teilen zusammensetzen. Die

kleinsten Spots, die den Qualitätsanforderungen genügen, waren etwa 80 μm groß. Die kleinsten schwachen un-gesättigten, also nicht den Qualitätsanforderungen genügenden Spots, waren nicht kleiner als 50 μm , recht unabhängig vom übertragenen Baustein. Theoretisch könnte man ihre Intensität durch mehrfachen Übertrag anheben, aber praktisch ist es wahrscheinlich, dabei auch ihren Durchmesser zu erhöhen. Die 50 μm stellen also eine eher hypothetische Untergrenze dar.

Die bei voller Leistung erreichbare maximale Spotgröße variierte für die verschiedenen Aminosäurebausteine von 125 μm bis 300 μm , die Größe der kleinsten gesättigten Spots von 80 μm bis 250 μm . Dies deutet auf eine starke Abhängigkeit von den Stoffeigenschaften hin. Andererseits schwankt diese Kennzahl auch für gleichartige Donorslides über einen Bereich von etwa 100 μm . Die Auswirkung der untersuchten Prozessparameter war aber innerhalb eines Experiments wohldefiniert und nicht-chaotisch. Die Schwankungen zwischen den Experimenten müssen also auf eine nicht genau zu bestimmende Einflussgröße zurückzuführen sein. Es ist denkbar, dass dies wieder die (thermischen) Stoffeigenschaften sind, die beispielsweise begrenzt durch die Genauigkeit beim Abwiegen der Bestandteile oder je nach Trocknungsgrad der Materialschicht variieren. Indirekt wirkt sich nämlich eine Änderung der effektiven Wärmekapazität ähnlich wie eine Änderung der eingebrachten Energie aus; dass cLIFT gerade bei kleinen Spotgrößen empfindlich ist für Veränderungen der Bestrahlungsstärke, wurde gezeigt. Welche Ursache es auch habe, es war bisher nicht möglich, cLIFT in absolutem Sinne reproduzierbar zu gestalten. Es muss also für den praktischen Einsatz eine Strategie gefunden werden, die die zu erwartenden Schwankungen berücksichtigt und die die im relativen Sinne sehr wohl gegebene Reproduzierbarkeit ausnutzt. In Tabelle 3 ist eine solche Strategie aufgeführt.

Tabelle 3: Vorgehen zum Ermitteln der Lasereinstellungen und erwartbaren Spotgrößen

Schritt	
1	Für die verwendete Donorslide-Architektur bzw. das Lasersystem einmal:
1.1	Übertrag eines Laserparameter-Variationsmusters für Leistung und Bestrahlungsdauer und Aufnahme eines Fluoreszenzbilds.
1.2	Gibt es beobachtbar eine Leistungsgrenze P_{Grenze} , ab der kein guter Übertrag mehr möglich? Dann wähle $P = (100 \% - 2 \cdot 5 \%)P_{\text{Grenze}}$. Sonst wähle $P = (100 \% - 1 \cdot 5 \%)P_{\text{max}}$ als Laserleistung.
1.3	Sind Ringe aufgetreten? Dann merke deren Größe D_{Ring} .
2	Für jeden Donorslide:
2.1	Übertrag eines Teststreifens mit verschiedenen Bestrahlungsdauern bei konstanter Leistung P und Aufnahme eines Fluoreszenzbilds davon.
2.2	Ermittle den kleinsten Durchmesser $D_{\text{gesättigt}}$ gerade gesättigter Spots und den maximal erreichten Durchmesser D_{max} aller Spots.
2.2	Sei $\tau_{\text{gesättigt}}$ die Bestrahlungsdauer, die zu den kleinsten gesättigten Spots führt. Wähle $\tau = (100 \% + 5^2 \%) \cdot \tau_{\text{gesättigt}}$ als Bestrahlungsdauer für diesen Donorslide.
3	Wahl des Spotrasters:
3.1	Wähle als Pitch $\max(D_{\text{max}})$ aller Donorslides.
3.2	Gegebenenfalls: Wähle stattdessen D_{Ring} , falls dieser Wert größer ist oder multipliziere mit 1,5 als Sicherheitsfaktor.
4	Erwartete Spotgröße:
	Nach Kombinatorik zu erwarten ist ein Spotdurchmesser von $\min(D_{\text{gesättigt}})$ aller Donorslides.
5	Fortgeschrittene Erweiterung (bei besonderem Bedarf):
	Plane für Spots, deren $D_{\text{gesättigt}}$ am Arbeitspunkt kleiner als $\max(D_{\text{gesättigt}})$ aller Donorslides ist, mehrere Duplikate in lateralem Versatz so, dass sie die zur Verfügung stehende Fläche ausfüllen.
zu allem	Kommentare: Ziel ist das Ermitteln zu erwartender Spotgrößen und geeigneter Lasereinstellungen. Zunächst muss untersucht werden, wie hoch die maximale zulässige Laserleistung ist (Schritt 1). Um kleine Prozesszeiten zu ermöglichen, wird bei möglichst hoher Leistung gearbeitet. Dann wird ermittelt, wie klein die kleinste geeignete Bestrahlungsdauer ist (Schritt 2). Aus diesen Tests ist sichtbar, wie groß die Spots werden werden und welcher Pitch deshalb nötig ist (Schritt 3). Überlagert man kombinatorisch mehrere Lagen, wird der effektive Spotdurchmesser kleiner (Schritt 4), was man eventuell kompensieren möchte (Schritt 5).

zu 1.1	Muster wie Abbildung 5.2 oder ähnlich.
zu 1.2	Die ersten 5 % stellen einen Spielraum dar, innerhalb dessen Schwankungen der Laserleistung kompensiert werden sollen; die weiteren 5 % einen Abstand zur Grenzleistung.
zu 2	Die Schwankungen der Übertragungsergebnisse zwischen verschiedenen DonorSlides legen nahe, die Parameterermittlung tatsächlich für jeden einzelnen DonorSlide erneut durchzuführen. Es kann aber auch auf den empirischen Erfahrungsschatz zurückgegriffen werden und dabei $\max(\tau_{\text{gesättigt}})$ der bisherigen Teststreifen gewählt werden und entsprechend in Schritt 3.1 dann das größte bisher beobachtete Maximum der Durchmesser als Pitch. Dennoch ist dabei aber zumindest zwischen den verschiedenen Bausteinen zu unterscheiden.
zu 2.1	Streng genommen müsste das Testmuster auf genau den für das Array vorgesehenen AkzeptorSlide übertragen werden; dies verbietet sich aber, wenn es nur indirekt durch Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Direkter Nachweis wäre deshalb erstrebenswert, aber auch weil für Sonderbausteine eventuell gar keine Fluoreszenzbildgebung möglich ist. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.
zu 2.2	Die 5 % stellen einen Sicherheitsabstand zum Parameterbereich ungesättigter Spots dar (vgl. Abbildung 5.5) und werden quadriert, weil die Bestrahlungsdauer als Wurzel in den kombinierten Laserparameter eingeht.

Wenn man ein einem Spot über mehrere Lagen hinweg verschiedene Bausteine kombiniert, bestimmt dabei der kleinste Durchmesser über die gesamte Größe des Spots, der größte Durchmesser hingegen über das Raster, in dem die Spots angeordnet werden können. Beachtet man hierbei auch einen für den Fall möglicher Ringbildung nötigen Sicherheitsabstand, ist ein Pitch von 400 μm empfehlenswert. Wenn sich die Ringe als nicht nutzbarer Teil der Spots überlagern dürfen, ist auch ein Pitch bis zu 300 μm denkbar. Die Spots darüber hinaus so dicht zu setzen, dass nur ihr innerster Teil, der dem kleinsten auftretendem Durchmesser entspricht, überlappungsfrei bleibt, ist nicht empfehlenswert, da man damit bewusst kontaminierte Regionen schaffen würde, die möglicherweise im Fluoreszenzbild nicht von den brauchbaren Spotzentren unterscheidbar wären. Außerdem sollte auch eine kleine Region um die Spots herum unbelegt bleiben, um das Fluoreszenz-Hintergrundsignal abschätzen zu können. Mit dem empfohlenen Pitch wird in quadratischer Anordnung der Spots eine Dichte von 625 Spots pro cm^2 erreicht (in hexagonaler Anordnung wären es 721 cm^{-2}); auf einem Objektträger passen somit 8750 Spots, wenn man zu seinen Rändern jeweils 3 mm Sicherheitsabstand hält.

Strebt man eine möglichst kurze Prozesszeit an, muss die Bestrahlungsdauer pro Spot minimiert werden. Dazu muss im Ausgleich die absorbierte Laserleistung erhöht werden, etwa durch eine geeignete Absorptionsschicht. Hierbei ist man durch eine Leistungsschwelle begrenzt, jenseits derer keine geeigneten Spots mehr auftreten. In den berichteten Experimenten ist die kleinste gängige Bestrahlungsdauer bei schwarzem Kapton als Absorptionsschicht und kontaktseitiger Bestrahlung beobachtet worden und betrug etwa 0,5 ms. Im Vergleich dazu ist eine typische Bestrahlungsdauer bei DonorSlides mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) etwa 5 ms. Für die Strukturierung eines gesamten Slides beträgt die Gesamtdauer dann 4,4 s bzw. 44 s. Die Differenz liegt in der Größenordnung der Dauer eines Substratwechsels (vgl. Kapitel 2.3), die auch zur Prozesszeit zählt; somit ist der

Bestrahlungsvorgang bei einer Zeitoptimierung von Belang, wenn auch nicht ausschlaggebend.

Unter ökonomischen Gesichtspunkten betrachtet ist wichtig zu wissen, wie sich die Stärke und Strahlqualität des verbauten Lasers auf die Spots auswirkt. Pauschal gesprochen sind schwächere Laser mit beliebigerem Strahlprofil kostengünstiger. Beide Zugeständnisse sind praktikabel: Die Experimente haben gezeigt, dass auch Laserleistungen mit < 100 mW noch hoch genug sind, um unerwünschte Zerstörungseffekte hervorzurufen, ohne dass die Bestrahlungsdauer merklich angehoben werden müsste, sofern entsprechend gute Absorption erfolgt (Abbildung 5.26). Bei langer (etwa 20 ms pro Spot bzw. 175 s pro Array), aber schwacher Bestrahlung verschwinden die Strukturen des Strahlprofils aus der Spotform (Abbildung 5.28).

Die Begrenztheit des akzeptablen Bereichs im Laserparameterraum hin zu hohen Leistungswerten legt nahe, dass es keinen fließenden Übergang von dem hier ausgenutzten Übertragsmechanismus hin zu LIFT-Varianten gibt, bei denen durch Verdampfung oder Plasmabildung an seiner Grenzschicht das Übertragsmaterial in Form von größeren Partikeln herausgelöst und übertragen wird. In der Tat zeigten erste Versuche mit einem ebenfalls im Labor vorhandenen Nanosekundenlaser-System (zu dessen Aufbau siehe [44]) kein positives Ergebnis, sondern vielmehr Beschädigungen der Glassubstrate. Mindestens die Architektur der Slides müsste angepasst werden. Womöglich ist ein Übergang ins Regime der Femtosekundenpulse nötig; dann aber werden umso mehr andere Phänomene für den Übertrag eine Rolle spielen und folglich die LIFT-Implementierung, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, verlassen. Eine Möglichkeit, andere LIFT-Mechanismen zu nutzen, aber zumindest den cLIFT-Aufbau zu behalten, könnte sein, im Donorslide eine Schicht zu verwenden, die durch Erwärmung bzw. Bestrahlung destabilisiert wird und in einer exothermen Reaktion Teile der Materialschicht wegschleudert (vgl. [30] oder [96]). Cellulosenitrat, in seiner Verwendung als Treibladung umgangssprachlich als ‚Schießbaumwolle‘ bekannt, wäre ein geeigneter Kandidat für eine solche Opferschicht, da sie rückstandslos umsetzen kann und dies thermisch auslösbar ist. Die Zündtemperatur eines dünnen Nitrocellulosefilms beträgt moderate 290 °C [97]. Allerdings ist anzunehmen, dass durch die Wärmeausbreitung bis zum Zeitpunkt der Zündung auch die Materialschicht so weit erwärmt sein wird, dass der gewöhnliche cLIFT-Übertragsmechanismus einsetzt.

5.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde untersucht, wie sich die unterschiedlichen Prozessparameter des cLIFT-Übertrags auswirken.

Es wurde dabei die Auswirkung auf die Spotgröße betrachtet, die zu minimieren ist, und die Nebenbedingungen der Aufrechterhaltung einer geeigneten Spotgestalt und der Verkürzung der Prozesszeiten berücksichtigt. Einsparmöglichkeiten gegenüber dem bestehenden Versuchsaufbau wurden aufgezeigt.

Spotgrößen- und Intensitäten sind Schwankungen unterworfen. Da sich die zugänglichen Parameter aber in einer vorhersagbaren definierten und steuerbaren Weise auswirken (vgl. Abbildung 5.29), lässt sich aus geeigneten Testmustern für die jeweiligen Slides bestimmen, wie sie gewählt werden müssen und welche Spotraster erreichbar sind. In Tabelle 3 sind praktische Folgerungen aus den Erkenntnissen aus den Experimenten komprimiert zusammengefasst, indem der nächste Benutzer der Anlage schrittweise zum Ermitteln der nötigen Laserparameter und der erwarteten Spotgrößen angeleitet wird.

Mit cLIFT können in insgesamt 44 s Bestrahlungsdauer pro Lage 8750 Spots auf einen Akzeptorslide ($625 \text{ Spots pro cm}^2$) übertragen werden. Diese Spotdichte ist vergleichbar mit der von kommerziell erhältlichen Peptidarrays (8600 Spots pro Slide; PEPperPRINT[98]).

Es wurde gezeigt, dass cLIFT eine Vielzahl von Bausteinen und Materialien übertragen kann, die über die in der Peptidarraysynthese routinemäßig verwendeten hinausgeht.

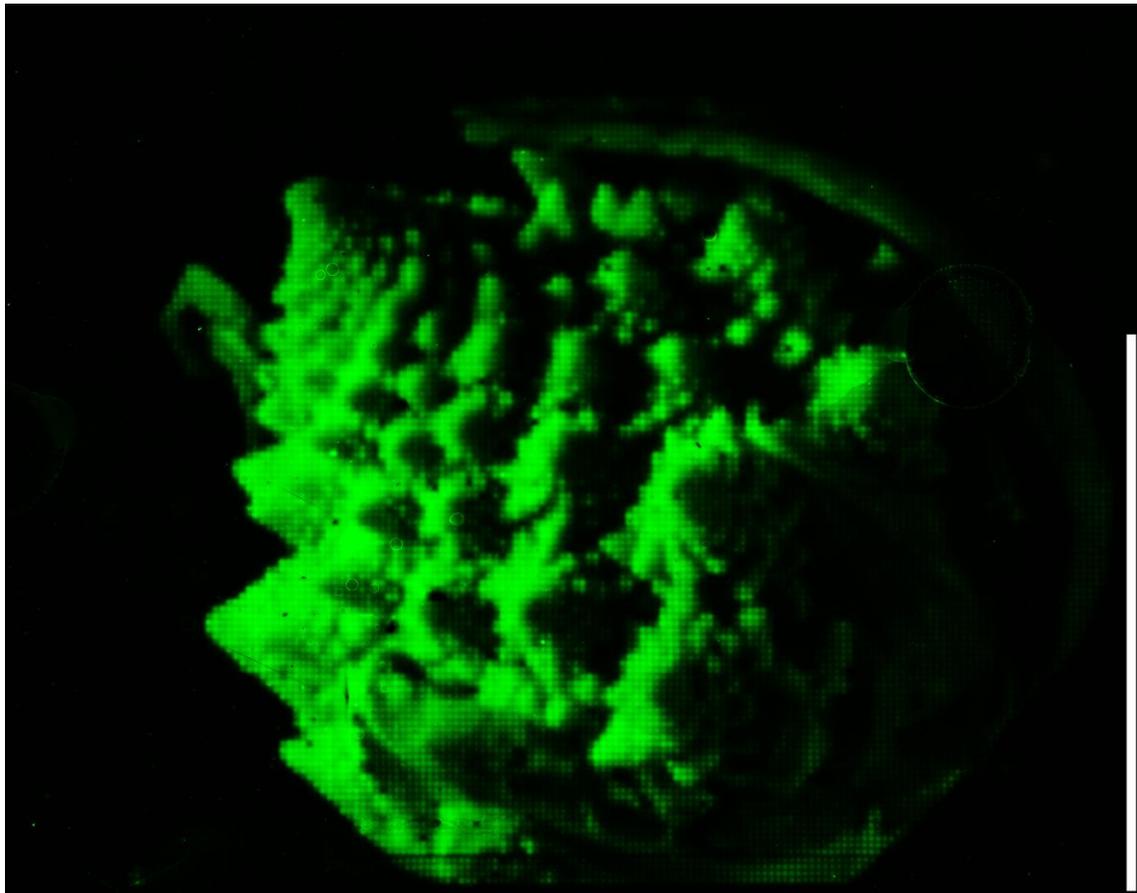


Abbildung 5.29: Beispiel für die Steuerbarkeit der relativen Spotgröße und -intensität. Ein Foto [99] eines Romanesco-Brokkolis wurde im Halbtonverfahren in ein cLIFT-Spotmuster umgewandelt und von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. Gezeigt ist das Fluoreszenzbild. Die Länge des Maßbalkens (weiß, am rechten Bildrand) beträgt 1 cm.

6 Wiederholte Benutzung von DonorSlides

„Wiederholte“ Benutzung von DonorSlides bedeutet zweierlei: In der strengeren Bedeutung meint es, dass vom selben Ort auf dem selben DonorSlide mehrere Spots auf verschiedene AkzeptorSlides übertragen werden. In einer schwächeren Bedeutung meint es, dass der selbe DonorSlide zum Übertrag auf den selben AkzeptorSlide an verschiedenen, gegebenenfalls dicht beisammen liegenden Orten genutzt wird. Letzteres tritt auf, wenn man nicht nur einzelne Spots, sondern ganze Muster eines Bausteines übertragen möchte. Ersteres tritt auf, wenn man ökonomisch arbeiten möchte und nicht für jedes Experiment neue DonorSlides anfertigen möchte. Beides wird in diesem Kapitel genauer untersucht.

6.1 Mehrere Spots vom selben Slide

Überträgt man ein Muster gleichartiger Spots mit den selben Prozessparametern, so erhält man im Fluoreszenzbild (Abbildung 6.1) unterschiedlich große Spots. Ein Spot ist größer, wenn in unmittelbarer Nachbarschaft bereits ein anderer Spot übertragen wurde. „Unmittelbar“ meint hierbei zum einen direkt nebeneinander liegende Spots und außerdem auch zusätzlich die zeitliche Nachbarschaft: In der Abbildung hat der Laserstrahl die Spots zeilenweise, von links nach rechts, geschrieben. Spots derselben Zeile, die einen linken Nachbarn haben, sind größer. Nachbarschaft über Zeilen hinweg spielt keine Rolle. Die Vergrößerung von Folgespots liegt daran, dass an ihrer Stelle der DonorSlide bereits von der Bestrahlung des Vorgängerspots „vorgewärmt“ ist. Dass dies den und nur den direkten Folgespot betrifft, liegt daran, dass die Längenskala der Temperaturdiffusion auf der Zeitskala eines Bestrahlungsvorgangs etwa der Längenskala eines Spots entspricht (vgl. Abschätzung in Kapitel 5.2). Dass dies insbesondere nicht die Nachbarspots aus anderen Zeilen betrifft, die viel später geschrieben werden, liegt daran, dass sich das Temperaturprofil mit der Zeit nicht nur verbreitert, sondern dabei auch abflacht und vernachlässigbar wird.

Dieser Effekt lässt sich vermeiden, wenn das Muster nicht als Ganzes geschrieben wird, sondern nach Art eines Schachbretts aufgeteilt wird und die Teile nacheinander geschrieben werden, so dass sich das System zwischen den Schreibrufen abkühlen kann. Für Abbildung 6.1B wurde das Muster in neun Schritten übertragen, so dass zwischen zwei Spots immer mindestens zwei Leerstellen lagen.

Wird ein Scanhead zur Ablenkung des Laserstrahls genutzt, ist es kein merklicher Nachteil, dass bei dieser Lösung der Slide mehrfach beschrieben wird. In einem vereinfachten Aufbau mit einem festen Strahl und einem beweglichen Slide ist die Schreibgeschwindigkeit aus mechanischen Gründen aber wesentlich langsamer. Dann könnte man den Schreibpfad entlang des ausgedünnten Musters optimieren (analog dem Problem des Handelsreisenden; [100]S. 143f., [101]).

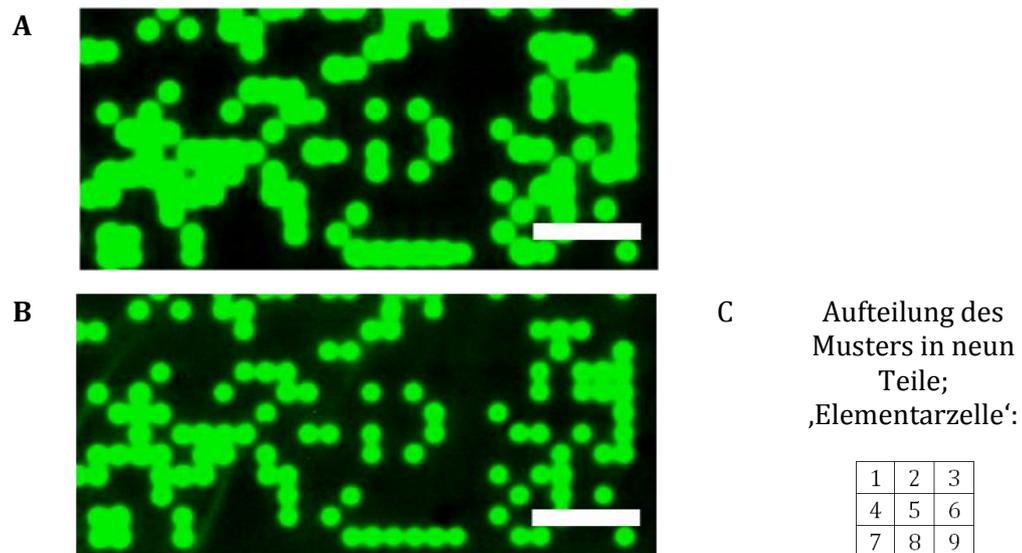


Abbildung 6.1: Beeinflussung der Spotgröße durch Nachbarspots. Gleichartige Spots wurden zeilenweise, von links nach rechts, geschrieben. (A) Spots derselben Zeile, die einen linken Nachbarn haben, sind im Fluoreszenzbild (gezeigt ist ein Ausschnitt) größer; Nachbarschaft über Zeilen hinweg spielt keine Rolle. Die Vergrößerung von Folgespots liegt daran, dass an ihrer Stelle der Donorslide bereits von der Bestrahlung des Vorgängerspots ‚vorgewärmt‘ ist. (B) Zur Vermeidung dieses Phänomens kann das zu übertragende Muster nach Art eines Schachbretts aufgeteilt werden; hier wurde es in neun Schritten – vgl. (C) – übertragen und zeigt dann keinen Nachbarschaftseffekt mehr. Die Länge der Maßbalken beträgt 500 μm .

Es wurde untersucht, ob es praktikabel ist, statt der Aufteilung des Musters zeitliche Pausen zwischen benachbarte Spots einzufügen. Dazu wurde ermittelt, wie lang die Pausen sein müssten. Es wurden Paare von Testspots geschrieben, jeweils in verschiedenen räumlichen und zeitlichen Abständen. Um verfälschte Interpretationen durch globale Trends aufgrund von Inhomogenitäten der Slides auszuschließen, wurden die Testpaare nicht nach ihren Parametern sortiert angeordnet, sondern zufällig auf dem Slide verteilt (Abbildung 6.2). Die aus dem Fluoreszenzbild extrahierten Daten sind in Abbildung 6.3 eingetragen. Man sieht, dass das Pausieren zwischen benachbarten Spots zu viel Zeit in Anspruch nähme.

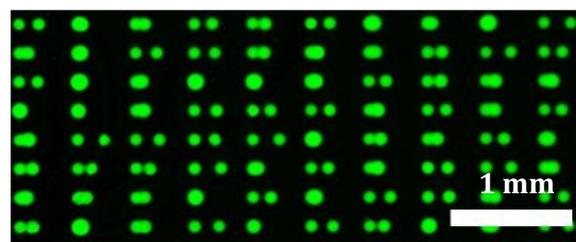


Abbildung 6.2: Testmuster zur quantitativen Untersuchung des Nachbarschaftseffekts. Paare von Spots in unterschiedlichem räumlichen und zeitlichen Abstand wurden in zufälliger Anordnung übertragen. Ausschnitt aus dem Fluoreszenzbild.

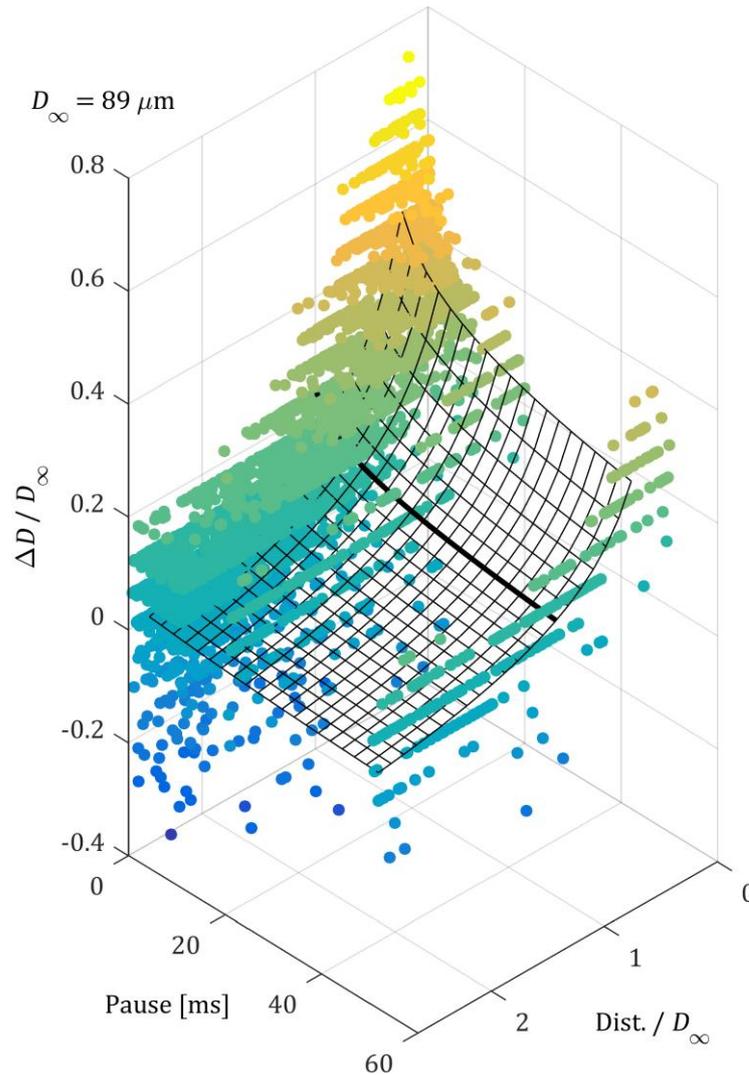


Abbildung 6.3: Quantitative Daten zum Nachbarschaftseffekt. Jeder Datenpunkt entspricht einem Spotpaar, das in unterschiedlicher räumlicher Distanz und mit einer zeitlichen Pause übertragen wurde. Farblich und auf der Hochachse aufgetragen ist die Vergrößerung des jeweiligen Spots gegenüber dem Durchmesser D_∞ , den er bei großem Abstand zu Nachbarpunkten einnimmt. Zur besseren Sichtbarkeit der Trends wurde ein zweidimensionales Polynom zweiten Grades an die logarithmierten Datenwerte angepasst und hier als Gitter (Abstand der Linien $10\ \mu\text{m}$ bzw. $2,5\ \text{ms}$; dicke Linie bei Distanz 1) eingezeichnet. Man sieht, dass bei Spots, die ohne nennenswerte Leerstelle zwischeneinander platziert werden, zur Vermeidung einer Vergrößerung eine Pause nötig wäre, die viel größer als die Bestrahlungsdauer eines Spots (hier: $3,5\ \text{ms}$) ist.

Dass die Nachbarschaft anderer Spots zusätzlich zu den gewählten Lasereinstellungen die Spotgröße beeinflusst, wird auch deutlich, wenn man versucht, durch dicht gesetzte Spots eine geschlossene Fläche an Material zu übertragen. Dies ist für manche chemische Charakterisierungsmethoden nötig, die von einer Kollegin in ihrer Arbeit [77] mit den Arrays verwendet wird; für diese wurde ein Testmuster entworfen, bei dem entlang der

Bildachsen der Spotabstand und die Bestrahlungsstärke variiert werden. Im resultierenden Fluoreszenzbild (Abbildung 6.4; aus Daten aus den Arbeiten zu [77]) erkennt man, dass die Grenzverläufe zwischen spotweiser und flächiger Beschichtung, sowie zwischen gesättigter Signalstärke und Beschädigung keine Funktionen der einzelnen Parameter allein sind.

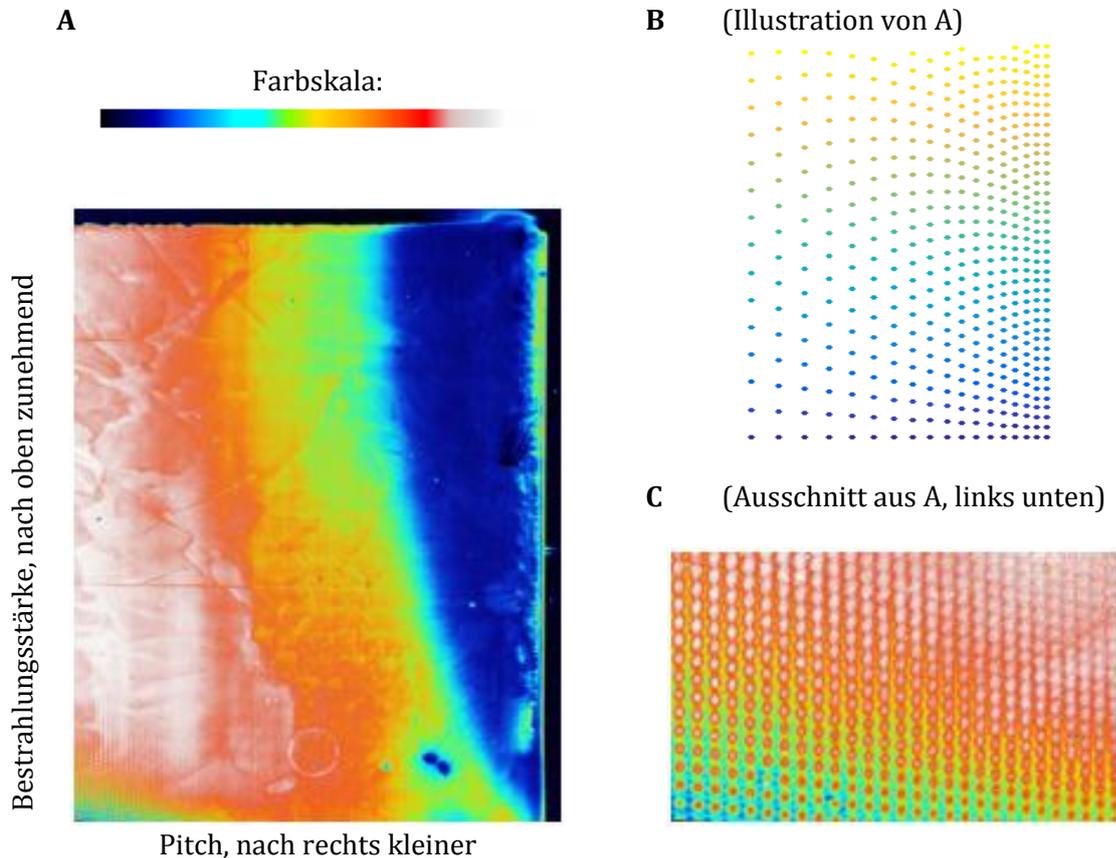


Abbildung 6.4: Testmuster zur gerasterten Übertragung geschlossener Flächen. Rohdaten aus der Kooperation zu [77]. (A) Fluoreszenzbild (Bildgröße 1,92 cm × 1,5 cm) in Falschfarbendarstellung und (C) ein Ausschnitt daraus, das entsteht, wenn entlang der vertikalen Bildachse die Bestrahlungsstärke erhöht (von 5 ms auf 15 ms bei voller Laserleistung) und auf der horizontalen Bildachse der Pitch des Rasters verkleinert wird (von 150 µm auf 50 µm; nicht-maßstabsgetreu in (B) skizziert).

6.2 Mehrere Spots von der selben Stelle

Eine für die Praxis sehr relevante Frage ist, ob ein Donorslide durch den cLIFT-Übertrag so verändert wird, dass man ihn an der selben Stelle nicht mehr verwenden kann. Auf den ersten Blick scheinen die Veränderungen gravierend (vgl. Abbildung 4.17). Andererseits wird nur wenig Material übertragen (vgl. Abbildung 9.3) und der Übertrag ist nur wenig abhängig von der Schichtdicke (vgl. Abbildung 5.16).

Unter anwendungsnahen Bedingungen sind Donorslides mindestens 20 Mal benutzbar. Um dies zu belegen, wurde ein wie üblich auf einem Akzeptorslide liegender Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) 1 bis 19 Mal wiederholt an den selben Orten bestrahlt, mit Lasereinstellungen, die im Fluoreszenzbild gesättigte Spots ergeben. Dann wurden von den selben Orte nochmals Spots auf einen anderen Akzeptorslide übertragen. Um zu gewährleisten, dass die selben Stellen vom Laserstrahl getroffen werden, war der Donorslide mit Ortsmarkierungen versehen worden, deren Position zur Korrektur der Spotkoordinaten herangezogen wurde. Um möglichst unverfälschte Größen zu erhalten, wurde in Nähe der Testspots ein Kontrollstreifen übertragen, bei dem der Donorslide nur einmal bestrahlt wurde. Die Intensitätswerte der Spots im Fluoreszenzbild wurden dann, abzüglich des lokalen Hintergrundsignals, auf die Werte der benachbarten Testspots normiert. Im Mittel ist auch bei häufiger vorheriger Bestrahlung kein abnehmender Trend der Spotintensität zu erkennen (Abbildung 6.5).

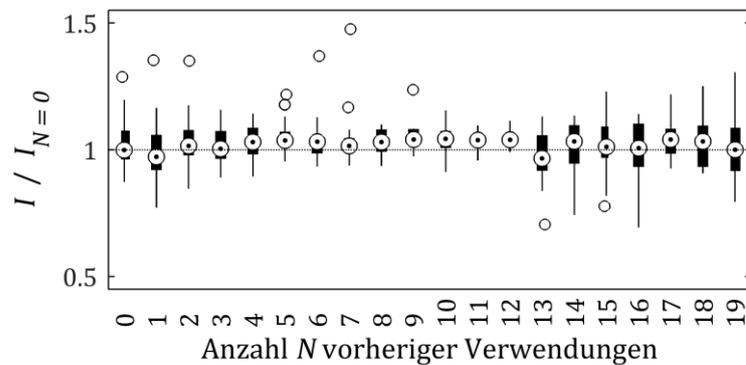


Abbildung 6.5: Wiederverwendbarkeit von Donorslides – gesättigte Spots. Nach [78]. Jeweils 25 gesättigte Spots wurden von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen von Orten, die zuvor über einem anderen Akzeptorslide bereits 0 bis 19 Mal bestrahlt worden waren. Eingezeichnet ist die Verteilung der Intensitäten der Spots als *box plot* bestehend aus Median (Kreise mit Punkt), dem Bereich zwischen den umliegenden Quartilen (schwarze Balken) und dem Wertebereich der Intensitäten (schwarze Linien; falls es Daten gibt, die weiter entfernt vom Balken liegen als der 1,5-fache Interquartilabstand, werden diese als Ausreißer aufgefasst und nicht in die Linie integriert, sondern separat als Kreissymbol eingetragen). Die Intensitätswerte sind auf den durchschnittlichen Intensitätswert eines Spots normiert, dessen Ort auf dem Donorslide zuvor noch nicht bestrahlt wurde. Man sieht, dass auch bei mehrfacher vorheriger Bestrahlung die Intensität nicht merklich von diesem Wert (horizontale Linie) abweicht.

Die obige Untersuchung der Wiederverwendbarkeit von Donorslides wurde an für die Anwendung relevanten, und deshalb im Fluoreszenzbild gesättigten Spots vorgenommen. Es könnte sein, dass die übertragene Stoffmenge doch nachlässt, aber erst später unter die Sättigungsschwelle fallen würde und erst dann im indirekten Nachweis sichtbar wäre. Direkte Höhenmessungen der übertragenen Materialportionen vor den chemischen Prozessschritten sind erst ab einer gewissen Materialhöhe möglich (siehe Abbildung

3.4B). Deshalb wurden weitere Untersuchungen für ‚schwache‘ Spots unterhalb der Sättigungsschwelle durchgeführt; in gewissem Rahmen kann deren Verhalten als Modell für gerade gesättigte Spots extrapoliert werden.

Als qualitativer Versuch wurde dazu ein ‚Schwebungsmuster‘ von zwei überlagerten gleichartigen Spotrastern mit unterschiedlichem Pitch übertragen. Dieses Design hat den Vorteil, dass der menschliche Betrachter Auswirkungen des Spotabstands – ein verschwindender Abstand entspricht dabei der doppelten Verwendung des Donorslides an der selben Stelle – auf die Spotintensität als globalen, sich wiederholenden Trend erfassen kann, während andere großskalige systematische Einflüsse davon unterscheidbar sind. Abbildung 6.6 zeigt, dass der zweite Transfer von dem selben Ort weniger Material überträgt als der erste.

Als quantitatives Experiment wurden – um systematische Einflüsse globaler Trends in einen statistischen Fehler umzuwandeln, wiederum zufällig verteilte – Orte des auf einem Akzeptorslide liegenden Donorslides mehrfach bestrahlt, und dann von den selben Orte nochmals Spots auf einen anderen Akzeptorslide übertragen. Um wieder zu gewährleisten, dass die selben Stellen vom Laserstrahl getroffen werden, war der Donorslide mit Ortsmarkierungen versehen worden, mit deren Positionen die Spotkoordinaten korrigiert wurden. Es wurden dabei Testpunkte für verschieden starke Bestrahlungen erzeugt. Wiederum sieht man eine Abnahme der Intensitäten im Fluoreszenzbild mit steigender Anzahl vorheriger Benutzungen des Donorslides (Abbildung 6.7). Bei der stärksten für die Abbildung verwendeten Bestrahlung sinkt die Intensität nach 100 Überträgen auf etwa ein Drittel, bei der schwächsten ist der Rückgang erst ab etwa 40 vorherigen Verwendungen merklich. Die Spotgröße wurde in allen Fällen nicht deutlich beeinflusst.

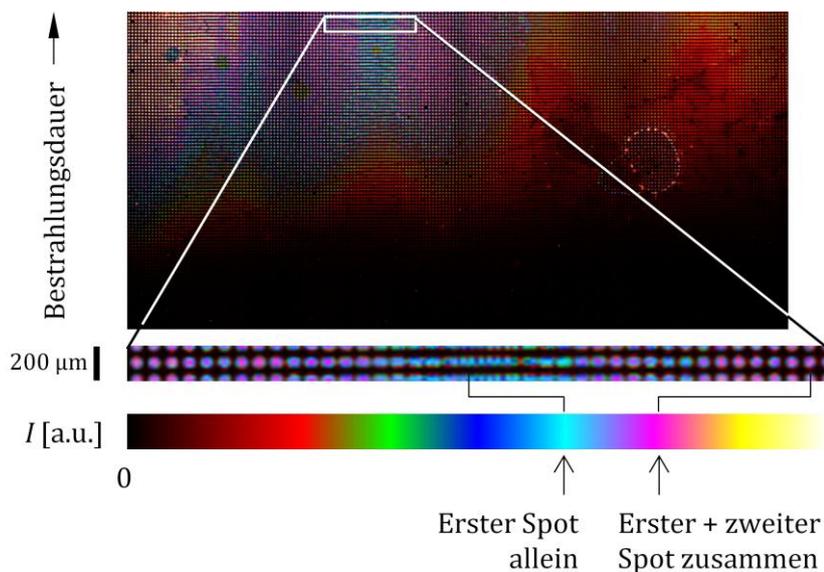


Abbildung 6.6: Wiederverwendbarkeit von Donorslides – schwache Spots, qualitativ. Von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) wurden Spots mit einer entlang der Hochachse der

Abbildung zunehmenden, so geringen Bestrahlungsstärke übertragen, dass ihre Intensitäten im hier dargestellten Fluoreszenzbild noch nicht gesättigt sind. Es wurden zwei Überträge hintereinander durchgeführt in der horizontalen Bildachse unterschiedlichen Spotrastern. Dadurch entsteht ein Schwebungsmuster, bei dem die lokalen Spotabstände kontinuierlich zwischen $0\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$ wechseln. In der gewählten Falschfarben-darstellung sieht man, wie dementsprechend die Spotintensitäten periodisch schwanken. Man beachte auch einen zusätzlichen globalen Trend, der wohl auf inhomogene Oberflächenfunktionalisierung oder Färbeartefakte zurückzuführen ist. Dass die Intensität zweier genau überlagerter Spots nicht doppelt so groß ist wie die Intensität eines alleine stehenden Spots, erlaubt den Schluss, dass mit der zweiten Bestrahlung nicht mehr so viel Material übertragen wurde wie bei der ersten.

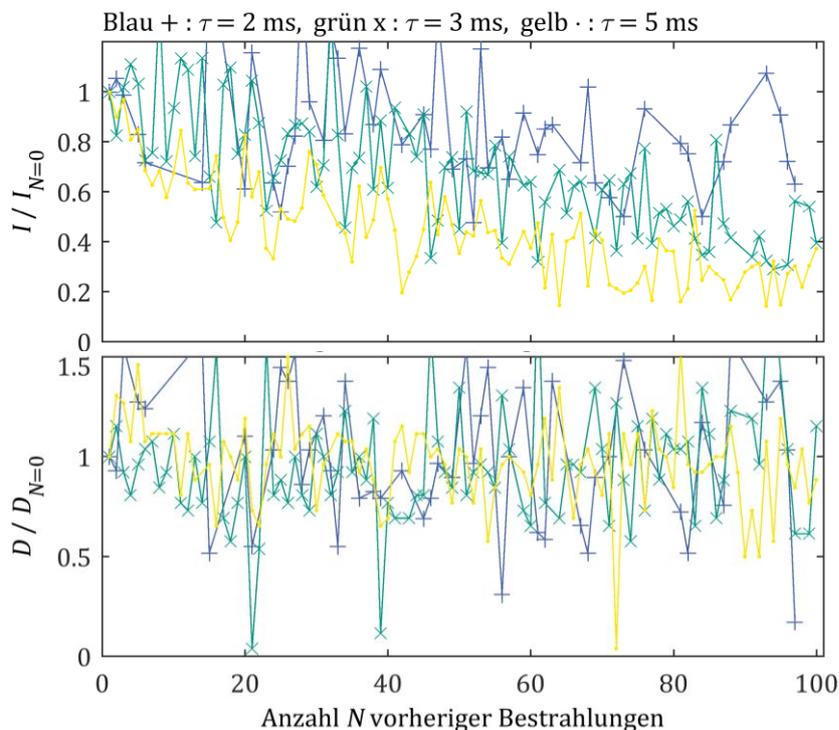


Abbildung 6.7: Wiederverwendbarkeit von Donorslides – schwache Spots, quantitativ. Von einem Donorlide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) wurden Spots mit verschiedenen Bestrahlungsdauern τ übertragen an Orten, an denen zuvor über einem anderen Akzeptorlide bereits 0 bis 99 Bestrahlungen vorgenommen worden waren. Um globale, anderweitig bedingte systematische Trends in einen statistischen Fehler umzuwandeln, waren die Testspots in einem zufälligen Raster angeordnet. Aus dem Fluoreszenzbild des Spotmusters wurden Durchmesser und Intensitäten ermittelt. Die Intensitäten der Fluoreszenz waren nicht gesättigt. Hier sind die ermittelten Größen als Funktion von der Anzahl vorheriger Bestrahlungen eingetragen (oben: Intensitäten, normiert auf die von Spots, an deren Ort der Donor noch nicht bestrahlt worden war, Wert dabei von 100 Spots gemittelt; unten: Durchmesser, entsprechend normiert). Man sieht, dass nach mehrfachem Übertrag die Intensität nachlässt, aber die Spotgröße gleich bleibt.

7 Transformation der Spotkoordinaten

Die technischste Beschreibung eines Arraylayouts ist die Aufzählung der Koordinaten $[x, y, z = 0]^T$ seiner einzelnen Spots. Diese Koordinaten sind in einem Bezugssystem – dem Slidesystem – gegeben, das seinen Ursprung in der Mitte des Slides habe und dessen Achsen mit denen des Objektträgers übereinstimme. Es werde in Millimeter-Einheiten gemessen. Diese Wahl des Ursprungs ermöglicht eine einfache Umstellung auf andere Substratgrößen. Zum Erreichen der gewünschten Spotkoordinaten sind dem Scanhead jedoch Tupel $[u, v]^T$ in gerätespezifischen Bit-Einheiten mitzuteilen. Eine elementare Aufgabe der Anlagensteuerung ist es daher, für alle Spots eine Transformation der Koordinaten aus dem Slidesystem in das System der Scanhead-Koordinaten durchzuführen. In diesem Kapitel werden verschiedene bekannte Modelle für solche Transformationen vorgestellt, miteinander verglichen und eine Verwendungsempfehlung abgegeben.

7.1 Erläuterung des Problems

Die zu bestimmende Transformation

$$t_{\text{Slide} \rightarrow \text{Scanhead}}: \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{Z}^2, [x, y]^T \mapsto [u, v]^T \quad (7.1)$$

ist im einfachsten Fall lediglich eine Skalierung ‚bit/mm‘ um den Faktor S_{Scanhead} . Durch die nur begrenzt genaue Installation des Scanheads kommen mindestens Versatz und eine Rotation um die Hochachse hinzu. Die Skalierung könnte je Achse unterschiedlich sein und die Achsen nicht senkrecht aufeinander stehen. Eine in der Praxis nicht auszuschließende Verkippung des Scanheads würde zu einer perspektivischen Verzerrung führen. Schließlich könnten durch die internen Eigenschaften des Scanheads (vgl. sein Handbuch; zu hurrySCAN 10, SCANLAB) und Linsenfehler Verzeichnungen entstehen, die Geraden als gekrümmte Linien darstellen.

Alle aufgezählten Effekte bis hin zur Verzerrung lassen sich durch idealisierte exakte oder sinnvoll genäherte mathematische Modelle beschreiben und für die Verzeichnung existieren approximative Modelle, wie in diesem Kapitel zitiert. Im allgemeinsten Fall könnte man die Transformation rein datenbasiert behandeln und aus einer genügend großen Anzahl Testpunkte eine interpolierende Modellierung konstruieren. In diesem Kapitel werden verschieden komplexe Modelle vorgestellt (Unterkapitel 7.3) und miteinander verglichen (Unterkapitel 7.4).

Das ideale Slidesystem ist in der Praxis ein rein virtuelles Laborsystem. Die Lage des realen Slides in diesem Laborsystems kann mittels Positionsmarkierungen bestimmt werden (vgl. Kapitel 8) und wird für die tatsächliche Umrechnung der Spotkoordinaten in das Scanheadsystem berücksichtigt. Das ideale und reale Slidesystem sind dabei durch eine starre Transformation, also lediglich Rotation und Translation ineinander überführbar (Abbildung 7.1). Deshalb ist es ausreichend, im jetzigen Kapitel nur den

Zusammenhang zwischen Scanhead- und Idealsystem genauer zu betrachten. Der Grund für die Aufteilung in ein reales und ein ideales Slidesystem liegt darin, dass die Position des realen Slides nur gemessen werden kann, wenn dieser selbst in der Anlage liegt, aber die Abbildungseigenschaften des Scanheads nur bestimmt werden können, wenn statt des realen Slides ein geeigneter Testslide eingelegt ist. Freilich wäre es vorteilhaft, beide Schritte zusammenzufassen; eine technische Lösung wird in Kapitel 8.3 thematisiert.

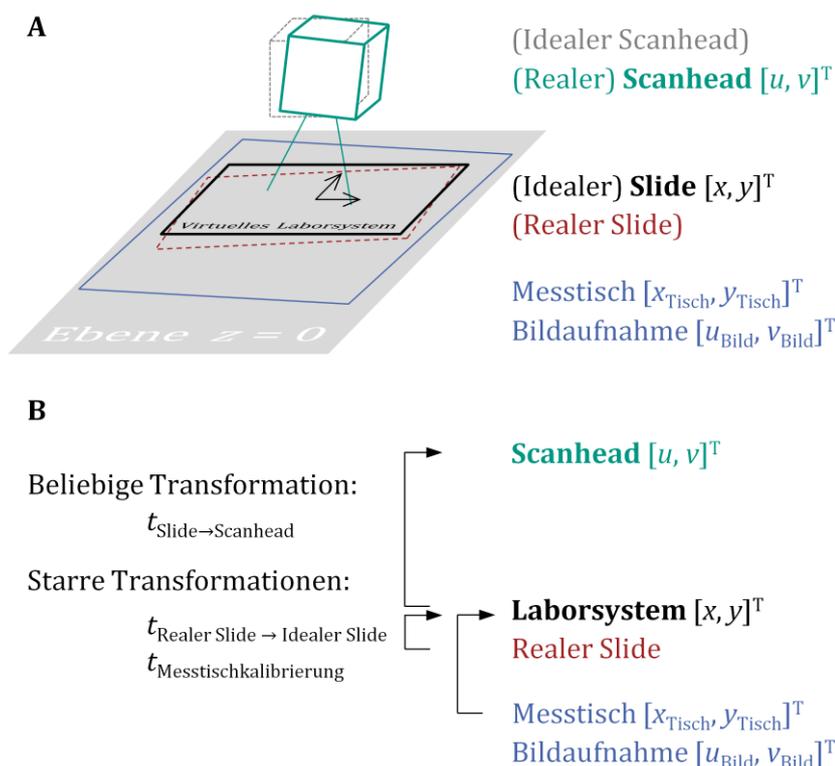


Abbildung 7.1: Veranschaulichung der Koordinatensysteme und benötigten Transformationen. A: Der Scanhead bestrahlt den in einer Ebene liegenden Slide. Das Laborsystem, der reale Slide, das Bezugssystem eines möglichen Koordinatenmesstisches oder einer Bildaufnahme des Slides liegen alle in dieser Ebene. Es ist zu bestimmen, mit welchen Scanhead-Koordinaten $[u, v]^T$ man Punkte $[x, y]^T$ erreichen kann. B: Die Transformation von Slidekoordinaten zu Scanheadkoordinaten kann eine beliebige Gestalt annehmen; nur bei einem idealen Scanhead könnte man sie durch eine Skalierung allein ausdrücken. Es sind perspektivische Effekte und nicht-lineare Verzerrungen zu erwarten. Die Transformationen innerhalb der Laborebene hingegen sind einfache starre Abbildungen und können durch einen Messtisch bestimmt werden, oder auf einer Bildaufnahme ohne zusätzliche Markierungspunkte unbestimmt bleiben.

Die Anforderung eines ‚ortsgenauen‘ Spotübertrages lässt sich zerlegen in ‚absolute Ortsgenauigkeit‘, also dass alle Spots in unverzerrtem Raster im gleichen Pitch übertragen werden, und in ‚relative Ortsgenauigkeit‘, dass gleiche Scanheadkoordinaten zu dem immer gleichen Slidekoordinaten führen. [9] zeigte bei seinem vergleichbaren Versuchsaufbau, dass für eine relative Genauigkeit regelmäßige Neukalibrierungen

erforderlich sind, da die Anlage sich temperaturbedingt verzieht. Hier in dieser Arbeit wurde nun untersucht, welche weitere Komplexität des Modells für die Koordinatentransformation (Formel (7.1)) nötig ist, um eine hinreichende absolute Ortsgenauigkeit zu erhalten und wie oft dieses Modell kalibriert werden sollte. Dazu wurde ermittelt, welche ‚Residuen‘ verbleiben, wenn verschieden einfache Modelle zur Beschreibung herangezogen werden.

Parametrische Modelle benötigen Testpunktpaare, um kalibriert werden zu können und letztlich (vgl. Abbildung 7.1) ist immer zumindest eine starre Transformation innerhalb der Laborebene aus Testpunkten zu bestimmen, wenn man sich auf ein ideales Slidesystem bezieht. Zusätzliche redundante Punkte können dabei die Qualität erhöhen (z.B. in [102]). Das Erfassen von Testpunkten ist allerdings in der Praxis mit Aufwand verbunden, so dass hier eine kleine Zahl angestrebt wird (Unterkapitel 7.5). Deshalb ist ein möglichst wenig komplexes Modell für die Koordinatentransformation wünschenswert.

7.2 Experimentelles Vorgehen

Um Testpunktpaare $([x, y]^T, [u, v]^T)$ für die Überlegungen zum Modell, aber auch für den späteren Einsatz in der routinemäßigen Kalibrierung zu erhalten, werden geeignete Testträger an ausgewählten Punkten bestrahlt und die Positionen der so erzeugten Kontrollpunkte bestimmt. [9] verwendete dazu mit Kohlenstoff bedampfte Mikroskopobjektträger. Durch Blasenbildung entstehen deutliche Kontrollpunkte aber auch auf Trägern, die mit dem für die Donorslides verwendeten Polyimid beklebt werden. Diese sind wesentlich schneller herzustellen und wurden deshalb in dieser Arbeit verwendet. Auch auf Glasträger aufgebrachte handelsübliche Etiketten für Thermodirektdrucker werden durch den Laserstrahl mit genügender Präzision geschwärzt, um Kalibrierungsaufgaben zu dienen.

Die Messung der Positionen der Testpunkte auf Trägern mit Polyimid erfolgt dadurch, dass sie durch eine auf einem verfahrbaren Koordinatentisch angebrachte Mikroskopkamera beobachtet und möglichst im Bild zentriert werden. Die Koordinaten der Testpunkte können dann im Tischsystem $[x_{\text{Tisch}}, y_{\text{Tisch}}]^T$ in mm direkt abgelesen und in $[x, y]^T$ übertragen werden. Durch die Zentrierung des Bildes ist eine genaue Kenntnis des Bezugs der Kamera-Bildkoordinaten $[u_{\text{Kamera}}, v_{\text{Kamera}}]^T$ zum Tischsystem oder der Abberationen der Kamera nicht erforderlich [9]. In einem früheren Versuchsstand [ebd.] war die Kamera befestigt und der Tisch verfuhr den Träger zwischen Bestrahlungsort und Kameraort; dies lag an ungünstigen geometrischen Gegebenheiten und konnte nun durch einen anderen räumlichen Aufbau verbessert werden, der allgemein mehr Platz für beliebige Messgeräte direkt unterhalb des Scanheads bietet. Wäre nun eine sehr kleine Zahl – zwei oder drei – Testpunkte ausreichend, könnte man auf die Verfahrbarkeit der Kamera verzichten und stattdessen feste Kameras installieren, wodurch zusätzlicher Bauraum freigegeben würde, und der im Vergleich kostspielige verfahrbare Mikroskoptisch eingespart werden könnte. Thermoetiketten-Testträger werden mit einem Dokumentenscanner abgebildet und die geschwärzten Punkte durch digitale

Bildverarbeitung aufgefunden (ähnlich zu Kapitel 3.4). Die so bestimmten Koordinaten sind dann nur bis auf eine starre Transformation (Rotation und Translation) mit den Koordinaten im Laborsystem identisch.

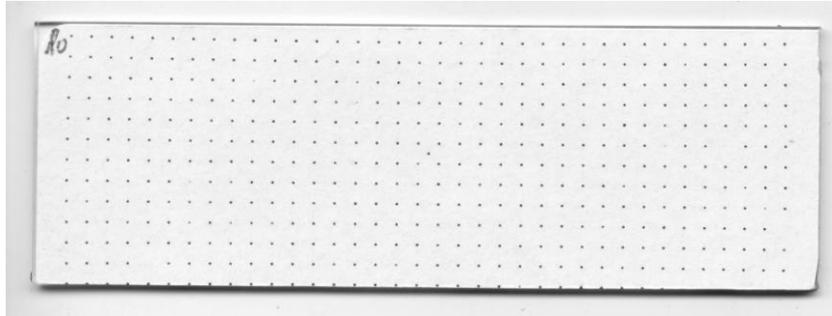


Abbildung 7.2: Testpunkte für die Bestimmung eines Modells der Koordinatentransformation. Als Testträger wurde ein mit einem Etikett für Thermodirektdrucker beklebter Mikroskopobjektträger eingesetzt. Das Bild wurde mit einem Dokumentenscanner aufgenommen.

Abbildung 7.2 zeigt ein Testmuster auf einem Thermoetikett. Auf der Grundlage von dessen Koordinatentupeln $([x, y]^T, [u, v]^T)$ können durch Regression mit der gemeinhin bekannten Methode der kleinsten Quadrate das entsprechende Modell für die gesuchte Abbildung $t_{\text{Slide} \rightarrow \text{Scanhead}}: [x, y]^T \mapsto [u, v]^T$ angepasst ('gefittet') werden und daraus die Vorhersagewerte $[\hat{u}, \hat{v}]^T$ des angepassten Modells berechnet werden. Es wird im Rahmen der Untersuchung nun betrachtet, welche Abweichungen $[\Delta u, \Delta v]^T$ – die Fit-Residuen – davon im Vergleich zu den ursprünglich vorgegebenen Scanhead-Koordinaten auftreten (Formel (7.2)). Die Vorhersagen des Modells sagen anschaulich gesprochen aus, welche Koordinatenvorgabe an den Scanhead zu der tatsächlichen Bestrahlung geführt hätte, wenn das angenommene Modell wahr wäre. Die Abweichung von den tatsächlich dem Scanhead vorgegebenen Koordinaten stellt also ein Gütemaß des Modells dar – wir betrachten hier für eine leichte Interpretierbarkeit die gemittelte euklidische Distanz ‚Mean Root Square‘ (Formel (7.3)).

$$[\Delta u, \Delta v]^T = [u, v]^T - [\hat{u}, \hat{v}]^T \quad (7.2)$$

wobei
$$[\hat{u}, \hat{v}]^T = t_{\text{Slide} \rightarrow \text{Scanhead}}([x, y]^T)$$

$$MRS := \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \sqrt{[\Delta u, \Delta v]_n \cdot [\Delta u, \Delta v]_n^T} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \sqrt{\Delta u_n^2 + \Delta v_n^2} \quad (7.3)$$

Aus den Scans der Testmuster lassen sich zwar nur relative Slide-Koordinaten ableiten, da diese nicht im Laborsystem selbst, sondern innerhalb der Bilddatei bestimmt werden. Die

absoluten Koordinaten im Laborsystem sind also zunächst unbekannt. Dennoch ist ihre Verwendung gerechtfertigt, da sich die zu testenden Modelle linear mit einer zusätzlichen Verschiebung/Drehung kombinieren lassen, die die Relativität der Koordinaten ausgleicht. Es ist also ausreichend, die Laborkoordinaten bis auf die Verschiebung/Drehung zu kennen – dies ist bei den relativen Koordinaten aus der Bilddatei gegeben. Für eine Charakterisierung der Angemessenheit der verschiedenen Modelle ist dies genügend. Für den Einsatz in der wirklichen Kalibrierung müssten auf dem dem Etikett als Substrat dienenden Glasslide zusätzliche Markerpunkte mit bekanntem Ort im Laborsystem eingesetzt werden.

7.3 Verschiedene Modelle der Abbildung

Die untersuchte Fragestellung der Transformation zwischen Slide und Scanhead ist einerseits verwandt – wenn man die Analogie zwischen einer Kamera und einem (Scanhead-)Projektor zieht – mit der Kamerakalibrierung im Maschinellen Sehen (für eine Einführung siehe die Quellen [103] oder [104] *lecture18* und *lecture19*). Andererseits ist sie auch von Belang bei schreibenden Verfahren in der Lithographie (vgl. [102]). Modell und Methoden aus erstgenanntem Gebiet und jenen Quellen werden in Unterkapitel 7.3.1 behandelt, aus letzterem in Unterkapitel 7.3.2.

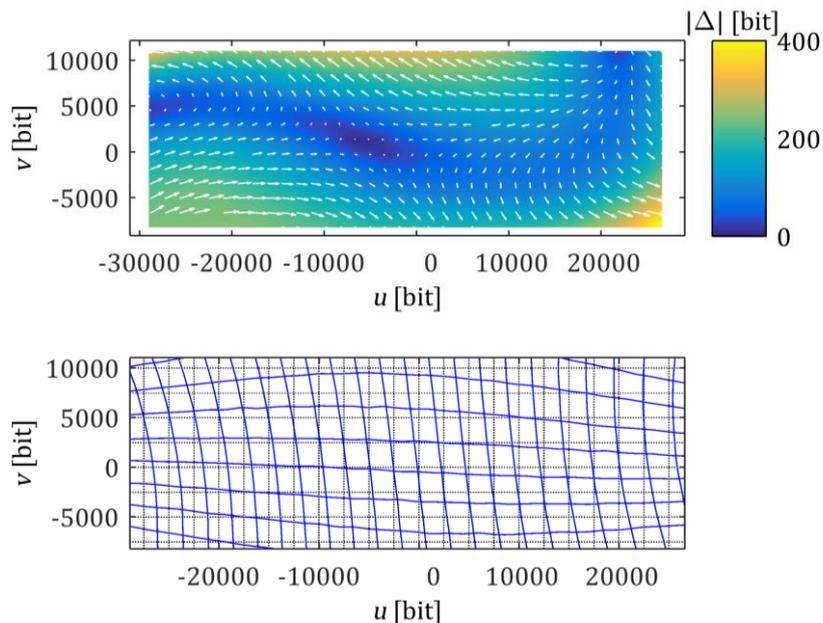


Abbildung 7.3: Residuum nach Fit einer Ähnlichkeitsabbildung. Datengrundlage waren die Testpunkte aus Abbildung 7.2. Die obere Graphik zeigt den Betrag $|\Delta| := \sqrt{(\Delta u)^2 + (\Delta v)^2}$ und die Richtung des Residuums; ungefähr 800 bit entsprechen dabei 1 mm auf der Slideebene. Die untere Graphik illustriert nicht-maßstabgetreu die Auswirkung des obigen Verschiebungsfeldes auf ein Gitterraster.

Geht man zunächst wie [9] von einem hinreichend senkrecht installiertem Scanhead aus, so muss man als Koordinatentransformation nur eine Skalierung, Rotation und Translation annehmen. Abbildung 7.3 zeigt, dass dabei ein deutliches Residuum zurückbleibt, das sich durch solch eine Transformation allein nicht erklären lässt. Nahe des Ursprungs ist die Abweichung nicht so groß wie an den Rändern; im Gegensatz zum Einsatz des Scanheads in früheren Projekten soll jedoch bei cLIFT der gesamte Bildbereich ausgereizt werden, möglichst über die für das verwendete Objektiv empfohlenen umgerechnet etwa ± 20000 bit hinaus. Für die chemische Charakterisierung der mit cLIFT synthetisierten Produkte ist es nämlich wünschenswert, eine möglichst große Fläche auf dem Substrat belegen zu können. Die weiteren Effekte einer allgemeineren Transformation müssen also berücksichtigt werden.

7.3.1 Projektive Abbildung

In der Computergraphik arbeitet man üblicherweise mit sogenannten homogenen Koordinaten ([105], S. 93ff.). Dabei wird eine zusätzliche Raumdimension eingeführt. Für die Interpretation als Ortsvektoren in der ursprünglichen Dimension werden diese höherdimensionalen Vektoren dann so normiert, dass der zusätzliche Eintrag durch eine 1 belegt ist, also die Koordinaten als $[x, y, z, 1]^T$ bzw. $[x, y, 1]^T$ vorliegen. Ein praktischer Vorteil von homogenen Koordinaten liegt darin, dass sich auch Translationen als Matrixmultiplikation ausdrücken lassen. Eine nicht-perspektivische Koordinatentransformation bestehend aus Skalierung mit S , Drehung um den Winkel φ und mit einem anschließenden Versatz $[u_0, v_0]^T$ (d.h. eine Ähnlichkeitsabbildung; dabei $S = 1$ wäre eine starre Abbildung) lässt sich also wie folgt ausdrücken:

$$\begin{bmatrix} u \\ v \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S \cdot \cos \varphi & -S \cdot \sin \varphi & u_0 \\ S \cdot \sin \varphi & S \cdot \cos \varphi & v_0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S(x \cdot \cos \varphi - y \cdot \sin \varphi) + u_0 \\ S(x \cdot \sin \varphi + y \cdot \cos \varphi) + v_0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (7.4)$$

Im Beispiel (Formel (7.4)) wird ersichtlich, dass sich die Koordinatentransformation als Matrixmultiplikation schreiben lässt und die Komponenten der Translation in der letzten Spalte in den obersten Zeilen stehen, beziehungsweise dass Rotation, Skalierung(en) und ggf. auch Scherung (bei allgemeinen affinen Abbildungen) in der 2x2-Untermatrix oben links ihre gewohnte Matrixform einnehmen. Durch das Normalisieren homogener Koordinaten in ihrer Interpretation als höherdimensionale Erweiterung niedrigdimensionalerer Ortsvektoren ist eine solche Abbildungsmatrix nur bis auf einen Faktor bestimmt. Konventionellerweise normiert man sie so, dass der Eintrag in der letzten Zeile und Spalte eine 1 ist. Die anderen Einträge der letzten Zeile – im Beispiel alle 0 – werden für projektive Transformationen benötigt, in denen perspektivische Verkürzungen auftreten. (Formel (7.5a)) verdeutlicht eine solche allgemeine projektive Abbildung $\mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^2$ und (Formel (7.6a)) den Spezialfall einer Homographie (engl. *homology*) $\mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}^2$, bei der eine Ebene auf eine Ebene abgebildet wird; dies ist der Fall, wenn ein Beamer ein flaches Bild auf eine flache Wand projiziert, oder der Scanhead zweidimensionale Koordinaten zur Bestrahlung eines flachen Substrates umsetzt. Die

Homographie-Matrix H ist dabei die Projektionsmatrix P ohne ihre dritte Spalte, die für die dritte Raumrichtung zuständig wäre (Formel (7.7)).

$$\begin{bmatrix} u \cdot w \\ v \cdot w \\ w \end{bmatrix} = P \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_1 & p_4 & p_7 & p_{10} \\ p_2 & p_5 & p_8 & p_{11} \\ p_3 & p_6 & p_9 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \\ 1 \end{bmatrix} \quad (7.5a)$$

$$\Rightarrow u = \frac{u \cdot w}{w} = \frac{(p_1 x + p_4 y + p_7 z + p_{10})}{(p_3 x + p_6 y + p_9 z + 1)} \quad (b)$$

$$\Rightarrow v = \frac{v \cdot w}{w} = \frac{(p_2 x + p_5 y + p_8 z + p_{11})}{(p_3 x + p_6 y + p_9 z + 1)} \quad (c)$$

$$\begin{bmatrix} u \cdot w \\ v \cdot w \\ w \end{bmatrix} = H \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} h_1 & h_4 & h_7 \\ h_2 & h_5 & h_8 \\ h_3 & h_6 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix} \quad (7.6a)$$

$$\Rightarrow u = \frac{u \cdot w}{w} = \frac{(h_1 x + h_4 y + h_7)}{(h_3 x + h_6 y + 1)} \quad (b)$$

$$\Rightarrow v = \frac{v \cdot w}{w} = \frac{(h_2 x + h_5 y + h_8)}{(h_3 x + h_6 y + 1)} \quad (c)$$

$$\begin{bmatrix} h_1 & h_4 & h_7 \\ h_2 & h_5 & h_8 \\ h_3 & h_6 & 1 \end{bmatrix} \equiv \begin{bmatrix} p_1 & p_4 & p_{10} \\ p_2 & p_5 & p_{11} \\ p_3 & p_6 & 1 \end{bmatrix} \quad (7.7)$$

Die Abbildungsparameter h_i (bzw. p_i analog) lassen sich aus N Testpunktpaaren $([x, y]^T, [u, v]^T)$ gewinnen durch die Kombination von (Formel (7.6b,c)) (verallgemeinert mit $1 = h_9$ im Nenner) in ein überbestimmtes lineares Gleichungssystem:

$$\begin{bmatrix} x_1 & 0 & -x_1 u_1 & y_1 & 0 & -y_1 u_1 & 0 & 1 & 0 & -u_1 \\ 0 & x_1 & -x_1 v_1 & 0 & y_1 & -y_1 v_1 & 0 & 0 & 1 & -v_1 \\ \vdots & \vdots \\ x_N & 0 & -x_N u_N & y_N & 0 & -y_N u_N & 1 & 0 & 0 & -u_N \\ 0 & x_N & -x_N v_N & 0 & y_N & -y_N v_N & 0 & 1 & 0 & -v_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} h_1 \\ h_2 \\ h_3 \\ h_4 \\ h_5 \\ h_6 \\ h_7 \\ h_8 \\ h_9 \end{bmatrix} = 0 \quad (7.8)$$

Das w wurde dabei nicht unterschlagen, sondern ist versteckt in der Tatsache, dass eine Gleichung wie Formel (7.8) in dieser Form $M\mathbf{h} = 0$ außer der trivialen Lösung nur bis auf einen Faktor bestimmt ist. Man wird hier dann wieder $h_9 = 1$ verlangen. Die beste nicht-triviale Lösung der Gleichung (7.8) im Sinne von $\hat{\mathbf{h}} = \arg \min_{\|\mathbf{h}\|=1} \|\mathbf{M}\mathbf{h}\|$ lässt sich

berechnen durch die Singulärwertzerlegung UDV^T von M (engl. *SVD*); \hat{h} ist dann der letzte Spaltenvektor von V . Für eine Betrachtung von Sonderfällen dabei sei auf Quelle [106] verwiesen.

In MATLAB ist dies in der in der *Image Processing Toolbox* enthaltenen Funktion `fitgeotrans` implementiert. Der Nutzer hat dabei die Wahl, eine volle projektive Matrix berechnen zu lassen, eine allgemeine affine Abbildung ohne perspektivische Verzerrung oder Ähnlichkeitsabbildungen.

Physikalisch gesehen beschreibt eine Projektionsmatrix P eine ideale Lochkamera (engl. *pinhole camera*; Abbildung 7.4).

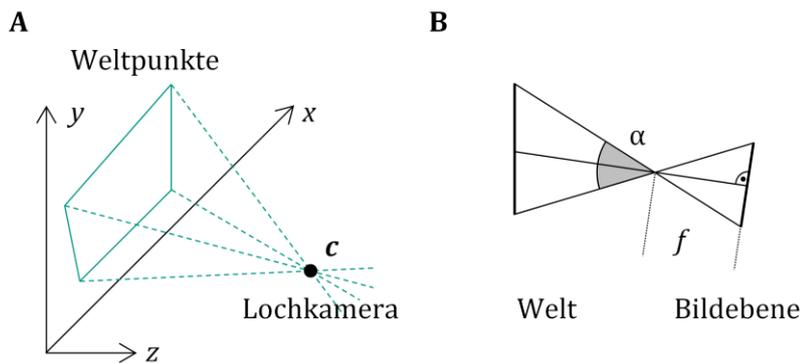


Abbildung 7.4: Skizze einer Lochkamera und deren charakteristischen Größen. A: Bei einer Lochkamera schneiden sich alle Strahlen am Kameraort c , dem Loch. Diese Skizze illustriert, dass das Kamera-Modell auch auf die Projektion eines Projektors an eine Wand, hier die xy -Ebene, angewandt werden kann. B: Die fokale Länge f ist der Abstand auf der optischen Achse zwischen Loch und Bildebene. Der Zahlenwert wird in der Längeneinheit angegeben, in der die Bildpunkte gemessen werden. Bei Kenntnis der Ausdehnung der Bildfläche kann man den Eingangswinkel α angeben, der eine intuitivere Deutung ermöglicht.

Die Abbildung durch eine Lochkamera, beschreibbar durch Formel (7.5) sowie (7.9), lässt sich auffassen als Hintereinanderausführung einer Drehung der Weltpunkte in das Achsensystem der Kamera, einer Verschiebung aller Punkte so, dass die Kameraposition auf den Ursprung des Bildsystems abgebildet würde, dann der Skalierung der Weltpunkte zu Pixel-Einheiten und (Parallel-)Projektion auf die uv -Ebene des Kamerasystems, gegebenenfalls mit zusätzlichem Versatz. Es gilt für die Projektionsmatrix:

$$P = A \cdot [R \quad -Rc] = \begin{bmatrix} f_u & \gamma & u_0 \\ 0 & f_v & v_0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} [R \quad -Rc] \tag{7.9}$$

Die Parameter einer Lochkamera, die zusammen die Matrix P bilden (Formel (7.9)), lassen sich aufteilen in extrinsische Parameter – Ort c und Ausrichtung der Kamera – und in die intrinsischen Parameter fokale Länge $f_{u,v}$, Schiefe γ (engl. *skew*) und die Bildkoordinaten u_0 bzw. v_0 , an denen die optische Achse der Kamera die zu ihr senkrechte Bildebene schneidet. Der Strahl auf der optischen Achse, der durch das Loch der Kamera auf diesem Schnittpunkt auftrifft, heißt Prinzipalstrahl. Aus γ kann man den anschaulicheren Winkel ε

zwischen den Bildachsen durch die Beziehung $\tan \varepsilon = \gamma/f_v$ ableiten. Die Ausrichtung der Kamera lässt sich durch eine Rotationsmatrix R beschreiben: Wie aus der linearen Algebra bekannt, lassen sich die Spalten einer Matrix interpretieren als die Bilder der Basis des Vektorraumes unter der Abbildung, die die Matrix beschreibt; hier sind es also die Basisvektoren des Welt-Koordinatensystems ‚aus Sicht der Kamera‘. Das Auffinden all dieser, speziell der intrinsischen Parameter aus gegebenen Testdaten nennt sich Kamerakalibrierung. Im Englischen scheint sich zudem das Schlagwort *camera resectioning* speziell auf das Ermitteln der extrinsischen Parameter zu beziehen.

Sind die Zahlenwerte einer vollen Matrix P bekannt, lässt sie sich durch sogenannte RQ-Zerlegung wieder in das Produkt einer Dreiecks- und orthogonalen Matrix in der Form von Formel (7.9) aufteilen. Ist jedoch – wie im Fall eines Scanheads, der eine ebene Fläche bestrahlt – nur eine Homographie H bekannt, ist diese Matrix nicht in jene Form zerlegbar. Anschaulich gesprochen fehlen zudem durch den Wegfall der dritten Dimension Informationen, die nötig wären, um auf alle elf Parameter zu schließen. Zhang ([107]) beschreibt ein Verfahren, wie zumindest aus drei verschiedenen Homographien alle Parameter rekonstruiert werden können, unter bestimmten Annahmen sogar aus weniger Homographien. Dies hat in der Praxis des Maschinellen Sehens den Vorteil, dass plane Muster zur Kalibrierung verwendet werden können anstatt komplexerer 3D-Gebilde. Zudem brauchen in diesem Verfahren die Weltkoordinaten der Testpunkte nicht absolut, sondern nur innerhalb ihres Musters relativ zueinander bekannt sein. Deshalb lässt es sich gut auf das Vorgehen mit den Thermoetiketten-Testträgern anwenden. Es können entweder Bilder von einer ruhenden Ebene aus verschiedenen Perspektiven verwendet werden, oder eine ruhende Kamera mit Bildern von verschiedenen ebenen Testmustern. In MATLAB ist in der *Computer Vision System Toolbox* die Funktion `estimateCameraParameters` enthalten, die diese Methode umsetzt; allerdings werden hier zu einem Satz Weltkoordinaten drei Sätze verschiedene Bildkoordinaten erwartet. Bei der Scanhead-Kalibrierung ermitteln wir zu einem Satz Scanheadkoordinaten – also im Zielraum der Abbildung – drei verschiedene Sätze Weltkoordinaten. Mit der vorgefertigten Funktion lässt sich also nur das inverse Problem lösen. Der Einfachheit halber wurden deshalb für die weiteren Berechnungen die Gleichungen aus [107] direkt verwendet. Dort wird durch geometrische Betrachtungen ein lineares Gleichungssystem (Formel (7.11)) für die Einträge einer Matrix $B := (A^{-1})^T A^{-1}$ mit Koeffizienten aufgestellt, die aus den Einträgen der mindestens drei Homographien H_j zusammengesetzt sind. B (Formel (7.10a)) ist symmetrisch und kann deshalb in einem kleineren Vektor angegeben werden (Formel (7.10b)). Somit kann man aus den Homographien allein die intrinsische Matrix A bzw. ihre Einträge (Formel (7.12)) bestimmen, zunächst ohne die extrinsischen Parameter R und \mathbf{c} zu wissen – also ohne die absoluten Weltkoordinaten der Testpunkte zu kennen. Aus den einzelnen Homographien und der dann bekannten intrinsischen Matrix lassen sich in einem zweiten Schritt dann jeweils die extrinsischen Parameter ausrechnen (Formel (7.13)). In [107] wird empfohlen, zusätzlich eine Singulärwertzerlegung an der Matrix $[\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3]$ durchzuführen und als eigentliche Rotationsmatrix dann $R = UV^T$ anzunehmen. So könne durch Messfehler verursachtes Rauschen der \mathbf{r}_i minimiert werden.

(Diese Fläche wurde aus formatierungstechnischen Gründen leer gelassen)

$$B = \begin{bmatrix} \frac{1}{f_u^2} & -\frac{\gamma}{f_u^2 f_v} & \frac{v_0 \gamma - u_0 f_v}{f_u^2 f_v} \\ -\frac{\gamma}{f_u^2 f_v} & \frac{\gamma^2}{f_u^2 f_v^2} + \frac{1}{f_v^2} & -\frac{\gamma(v_0 \gamma - u_0 f_v)}{f_u^2 f_v^2} - \frac{v_0}{f_v^2} \\ \frac{v_0 \gamma - u_0 f_v}{f_u^2 f_v} & -\frac{\gamma(v_0 \gamma - u_0 f_v)}{f_u^2 f_v^2} - \frac{v_0}{f_v^2} & \frac{(v_0 \gamma - u_0 f_v)^2}{f_u^2 f_v^2} + \frac{v_0^2}{f_v^2} + 1 \end{bmatrix} \quad (7.10a)$$

$$\tilde{\mathbf{b}} := \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_5 \\ b_3 \\ b_6 \\ b_9 \end{bmatrix} \quad (b)$$

$$(7.11) \quad \begin{bmatrix} j=1 & \{ \begin{matrix} h_1 h_4 \\ h_1 h_1 - h_4 h_4 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_1 h_5 + h_2 h_4 \\ h_1 h_2 + h_2 h_1 - h_4 h_5 - h_5 h_4 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_2 h_5 \\ h_2 h_2 - h_5 h_5 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_3 h_1 + h_1 h_6 \\ h_3 h_1 + h_1 h_3 - h_6 h_4 - h_4 h_6 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_3 h_4 + h_1 h_6 \\ h_3 h_4 + h_1 h_3 - h_6 h_4 - h_4 h_6 \end{matrix} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ j=m & \{ \begin{matrix} h_1 h_4 \\ h_1 h_1 - h_4 h_4 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_1 h_5 + h_2 h_4 \\ h_1 h_2 + h_2 h_1 - h_4 h_5 - h_5 h_4 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_2 h_5 \\ h_2 h_2 - h_5 h_5 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_3 h_1 + h_1 h_6 \\ h_3 h_1 + h_1 h_3 - h_6 h_4 - h_4 h_6 \end{matrix} & \{ \begin{matrix} h_3 h_4 + h_1 h_6 \\ h_3 h_4 + h_1 h_3 - h_6 h_4 - h_4 h_6 \end{matrix} \\ & & & & & \end{bmatrix} \tilde{\mathbf{b}} = 0$$

$$(7.12) \quad \begin{aligned} v_0 &= \frac{\tilde{b}_2 \tilde{b}_4 - \tilde{b}_1 \tilde{b}_5}{\tilde{b}_1 \tilde{b}_3 - \tilde{b}_2^2} \\ \lambda &= \tilde{b}_6 - \frac{\tilde{b}_4^2 + v_0(\tilde{b}_2 \tilde{b}_4 - \tilde{b}_1 \tilde{b}_5)}{\tilde{b}_1} \\ f_u &= \sqrt{\frac{\lambda}{\tilde{b}_1}} \\ f_v &= \sqrt{\frac{\lambda \tilde{b}_1}{\tilde{b}_1 \tilde{b}_3 - \tilde{b}_2^2}} \\ \gamma &= -\frac{\tilde{b}_2 f_u^2 f_v}{\lambda} \\ u_0 &= \frac{\lambda v_0}{f_v} - \frac{\tilde{b}_4 f_u^2}{\lambda} \end{aligned}$$

$$(7.13) \quad \begin{aligned} [\mathbf{h}_1, \mathbf{h}_2, \mathbf{h}_3] &:= \mathbf{H} \\ \mathbf{r}_1 &= \frac{A^{-1} \mathbf{h}_1}{\|A^{-1} \mathbf{h}_1\|} \\ \mathbf{r}_2 &= \frac{A^{-1} \mathbf{h}_2}{\|A^{-1} \mathbf{h}_2\|} \\ \mathbf{r}_3 &= \mathbf{r}_1 \times \mathbf{r}_2 \\ \mathbf{R} &= [\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3] \\ -R\mathbf{c} &= \frac{A^{-1} \mathbf{h}_3}{\|A^{-1} \mathbf{h}_1 \text{ oder } 2\|} \end{aligned}$$

Dieses Verfahren wurde auf die Bestimmung der intrinsischen und extrinsischen Parameter des Scanheads angewandt. Dazu wurden drei Thermoetiketten-Träger mit dem immer gleichen Testmuster bestrahlt. Die Ausrichtung des Scanheads konnte und sollte nicht verändert werden, aber durch Abstandsplättchen wurden der zweite und dritte Träger in jeweils verschieden verkippte Ausrichtungen gebracht. Sie wurden so weit wie möglich verkippt, um möglichst verschiedene Homographien erfassen zu können; die Begrenzung auf wenige Millimeter war hierbei der Tiefenschärfebereich des Laserfokus, innerhalb dessen noch Schwärzung des Thermopapiers erfolgt.

Die Ergebnisse der Charakterisierung des Scanheads sind in Tabelle 4 dargestellt (Auswertung unter Verwendung von [108]). Der Ausgangswinkel α des Scanheads wurde dabei mit $\tan(\alpha / 2) = ((Bildweite / 2)) / f$ (vgl. Abbildung 7.4) berechnet und dabei gemittelte fokale Länge angenommen. Die gesamte Bildweite des Scanheads beträgt 2^{16} bit. Der ‚Skalierungsfaktor‘ S ergibt sich näherungsweise aus dem Strahlensatz $Bildweite/Weltweite = f/c_z$. Der Winkel θ gibt an, wie ‚schräg‘ der Scanhead die Slides bestrahlt; es ist der Winkel, unter dem der Prinzipalstrahl auf die Weltebene auftrifft. Dazu wurde dessen Auftreffort berechnet als $\mathbf{p} = H^{-1}[u_0, v_0]^T$ und der Neigungswinkel des Vektors $[\mathbf{p}, 0]^T - \mathbf{c}$ angegeben.

Tabelle 4: Charakterisierung des Scanheads im Lochkamera-Modell

Intrinsische Parameter und abgeleitete Kenngrößen (eingerückt):

f_u	[bit]	153260
f_v	[bit]	153490
α	[°]	24,12
S	[bit/mm]	793
γ	[bit]	-519,64
ε	[°]	-0,19
u_0	[bit]	2184
v_0	[bit]	-520

Extrinsische Parameter und abgeleiteter Winkel:

	c_x [mm]	c_y [mm]	c_z [mm]	R	θ [°]
Erster Slide (unverkippt)	8,83	2,51	-193,30	$\begin{bmatrix} 0,999 & -0,013 & 0,030 \\ 0,012 & 0,999 & 0,047 \\ -0,030 & -0,047 & 0,998 \end{bmatrix}$	2,63
Zweiter Slide	1,89	2,67	-192,39	$\begin{bmatrix} 1 & 0,002 & -0,008 \\ -0,002 & 0,999 & 0,044 \\ 0,008 & -0,044 & 0,999 \end{bmatrix}$	
Dritter Slide	13,21	-3,65	-192,02	$\begin{bmatrix} 0,999 & 0,002 & 0,054 \\ -0,002 & 1 & 0,012 \\ -0,050 & -0,012 & 0,999 \end{bmatrix}$	

Zum Vergleich sind in Tabelle 5 die Abbildungsmatrix für eine an die Daten angepasste Ähnlichkeitsabbildung und die Homographie des unverkippten Slides von Tabelle 4 aufgeführt. Die Skalierungs- und Rotations-Untermatrix der dort angegebenen Ähnlichkeitsabbildung lässt sich zerlegen in einen Drehwinkel von $0,76^\circ$ und einen Skalierungsfaktor $792,3 \text{ bit/mm}$. Dieser Faktor stimmt gut mit den Diagonalelementen der Homographie $791,8$ bzw. $793,3 \text{ mm}^{-1}$ und auch dem Wert 793 bit/mm von S in den ermittelten intrinsischen Parametern des Scanheads überein. Näherungsweise gehen die verschiedenen Modelle also ineinander über. Am Rand des Bildfelds macht eine Schwankung der Skalierung zwischen 792 und 793 bit/mm einer Änderung von $52 \mu\text{m}$ auf der Slideebene aus.

Tabelle 5: Beispielhafte Transformationsmatrizen für den Scanhead

Ähnlichkeitsabbildung	Perspektivische Abbildung
$\begin{bmatrix} 792,2 & -10,54 & -280 \\ 10,54 & 792,2 & 2865 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 791,8 & -13,59 & -335,5 \\ 9,77 & 793,3 & 2856 \\ -0,00015 & -0,00024 & 1 \end{bmatrix}$

Die aus den intrinsischen Scanhead-Parametern abgeleiteten winkelwertigen Kenngrößen (Tabelle 4) Öffnungswinkel des Scanheads und Auftreffwinkel der optischen Achse erlauben in Zukunft quantitative Abschätzungen. Der Öffnungswinkel ist nicht gleichbedeutend mit der Divergenz des Laserstrahls ($2,18^\circ$, aus den Angaben in [9] berechnet) und deshalb eine interessante Größe, da er nicht nur durch die Fokussierlinse, sondern auch den geometrischen Aufbau des Scanheads beeinflusst wird. Auch die Kameraposition c im Modell ist nicht gleichzusetzen mit der Scanheadposition, da zum einen das modellierte Projektionszentrum nur ein virtueller Punkt ist und zum anderen die Laserstrahlen durch die Linse zusätzliche Brechung erfahren.

Wendet man nun das Lochkammermodell für die Koordinatentransformation für die oben gezeigten Beispieldaten (zu Abbildung 7.2) an, so erhält man ein quantitativ besseres Ergebnis als für eine reine Ähnlichkeitsabbildung (Abbildung 7.5, vgl. mit Abbildung 7.3). Das dennoch verbleibende Residuum ist in seiner Form auf den Spiegelaufbau des Scanheads und die eingesetzte $f\theta$ -Linse zurückzuführen – vgl. das Handbuch des Herstellers (zu hurrySCAN 10, SCANLAB). Der Auftreffort auf dem zweiten Spiegel nach der Ablenkung des ersten Spiegels ist von der Stellung des ersten Spiegels abhängig; dies verursacht eine Kissenverzerrung in x -Richtung. Tonnenverzerrung, hier in y -Richtung ausgeprägt, sei für die Linsenart typisch. Davon abgesehen ist die rechteckige Symmetrie des Verzeichnungsfelds auffallend (man denke sich ein um 45° gedrehtes, großes Quadrat über die Abbildung gelegt); diese könnte von der Wirkung der näherungsweise rechteckigen Spiegel als rechteckige Apertur mit entsprechenden Beugungseffekten stammen.

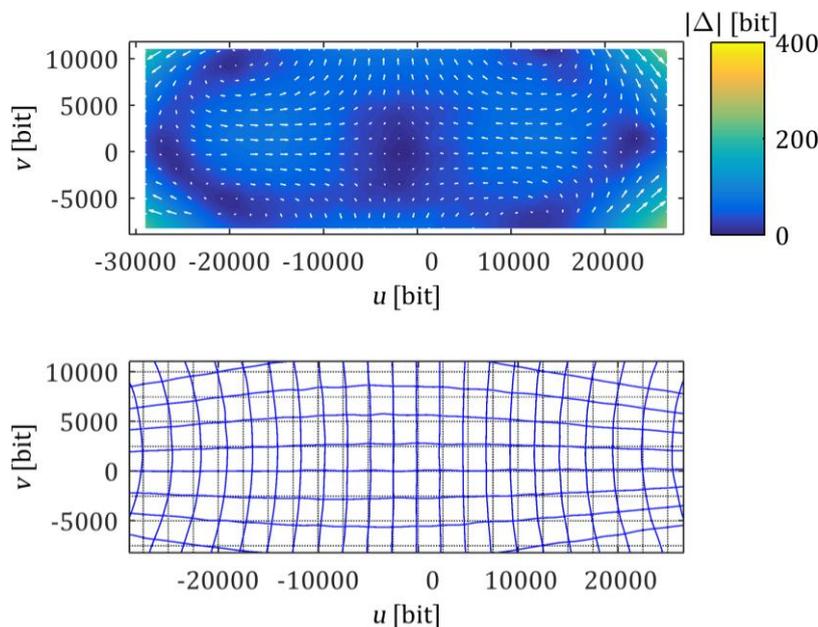


Abbildung 7.5: Residuum nach Fit einer perspektivischen Projektion. Datengrundlage waren die Testpunkte aus Abbildung 7.2. Die obere Graphik zeigt den Betrag und die Richtung des Residuums; ungefähr 800 bit entsprechen dabei 1 mm auf der Slideebene. Es ist zum besseren Vergleich die selbe Farbskala gewählt wie in Abbildung 7.3. Die untere Graphik illustriert nicht-maßstabsgetreu die Auswirkung des obigen Verschiebungsfeldes auf ein Gitterraster.

7.3.2 Keystone

Von Videobeamern bekannt, aber auch in der Elektronenstrahl-Lithographie [102] verwendet wird die sogenannte *keystone*-Korrektur. Die vereinfachte Version einer perspektivischen Abbildung $\mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}^2$ einer Ebene auf eine Ebene ist als Keystone-Modell ein Polynom mit linearen Termen und gemischtem Term (Formel (7.14)). Der Name rührt von der Trapezform des Schlusssteins in Brücken- und Torbögen her. Die Koeffizienten k in der Gleichung bewirken eine trapezförmige Verzerrung eines Gitters, das parallel zu den ursprünglichen Achsen ist. Nicht alle andere Geraden werden unter dieser Abbildung zu Geraden transformiert (Abbildung 7.6). Der Keystone kann daher eine ideale Projektion, bei der Geraden gerade blieben, nur annähern. Er ist allerdings linear in seinen Parametern und kann deshalb gut durch lineare Regression angepasst werden. Außerdem sind die Koeffizienten anschaulich interpretierbar.

$$\begin{aligned} u &= x + o_u + s_u x + r_u y + k_u xy \\ v &= y + o_v + s_v y + r_v x + k_v xy \end{aligned} \quad (7.14)$$

bzw.

$$\begin{aligned} u &= o_u + (1 + s_u)x + r_u y + k_u xy \\ v &= o_v + (1 + s_v)y + r_v x + k_v xy \end{aligned}$$

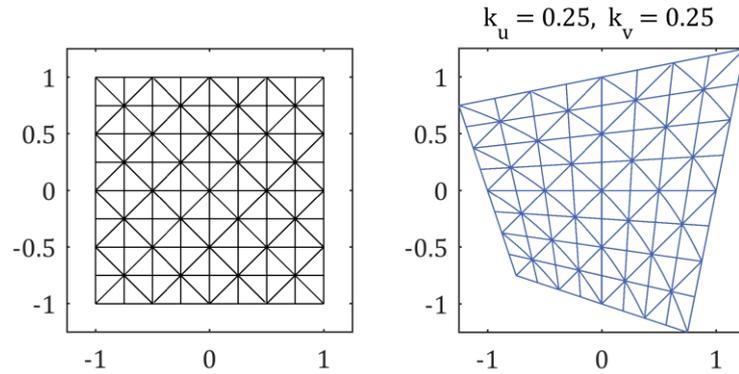


Abbildung 7.6: Illustration einer Trapezverzerrung im Keystone-Modell. Gitterlinien des ursprünglichen Musters (links), die parallel zu den Achsen liegen, bleiben nach der Transformation mit Keystone-Koeffizienten ungleich Null (rechts) gerade; andere Linien können gekrümmt abgebildet werden. Verlängert man die geraden Linien, schneiden sie sich außerdem nicht in einem Fluchtpunkt.

Es liegt nahe, die Keystone-Formeln als Taylorreihe zu deuten. Jedoch treten, wenn man die Abbildung mit einer Homographie $[uw, vw, w]^T = H[x, y, 1]^T$ multivariat Taylorentwickelt, auch reine Terme zweiter Ordnung auf (Formel (7.15)). Vergleicht man bei mehreren über einige Zeit hinweg gesammelten Datensätzen von Testpunkten die direkt angepassten Keystone-Koeffizienten und die, die nach dieser Formel durch Identifikation mit den Einträgen einer angepassten Homographie erhältlich sind, so fällt auf, dass die Zahlenwerte recht gut übereinstimmen, aber die Terme zweiter Ordnung nicht alle verschwinden bzw. ihre Koeffizienten sogar nicht viel kleiner sind als die des gemischte Terms (Abbildung 7.7). Vermutlich werden diese Terme bewusst fallen gelassen, damit das Keystone-Modell die oben genannten Eigenschaften erhält.

$$\begin{aligned} u &= \frac{uw}{w} = \frac{h_1 x + h_4 y + h_7}{h_3 x + h_6 y + 1} \approx \\ & (h_7) \cdot 1 \\ & +(h_1 - h_3 h_7) \cdot x \\ & +(h_4 - h_6 h_7) \cdot y \end{aligned} \quad (7.15)$$

$$\begin{aligned}
 &+(2h_3h_6h_7 - h_3h_4 - h_1h_6) \cdot xy \\
 &+(h_3^2h_7 - h_1h_3) \cdot x^2 \\
 &+(h_6^2h_7 - h_4h_6) \cdot y^2
 \end{aligned}$$

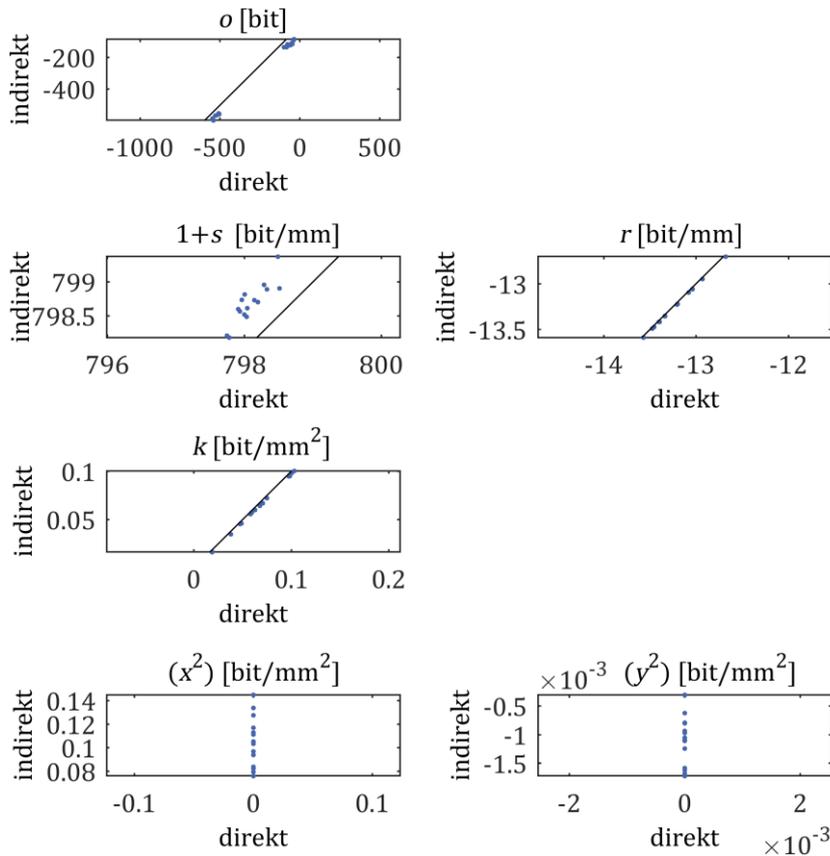


Abbildung 7.7: Vergleich direkt und indirekt erhaltener Keystone-Koeffizienten. Auf der Rechtsachse sind die direkt berechneten Koeffizienten aufgetragen, auf der Hochachse die, die durch Identifikation mit den Koeffizienten einer Taylorentwicklung der Homologie-Abbildung gewonnen wurden. Die Geraden symbolisieren Identität. Datengrundlage ist pro eingezeichnetem Symbol jeweils ein Satz experimentell ermittelter Testpunkte; es waren über einige Zeit mehrere solcher Sätze gesammelt worden. Die Koeffizienten stimmen, teils mit Versatz, gut überein. Die im Keystone nicht berücksichtigten Terme zweiter Ordnung sind nicht alle verschwindend.

Der Keystone beschreibt den Scanhead zwar nicht so gut wie eine vollständige projektive Abbildung, wie sich unten (Kapitel 7.4) zeigen wird, aber er kann dazu dienen, das Ausmaß der perspektivischen Verzerrung zu charakterisieren und die zeitliche Änderung der Projektionseigenschaften zu beschreiben. Dazu wurde der schon für Abbildung 7.7 benutzte Datensatz an über einen Monat hinweg bei der Benutzung des Versuchsstands

gesammelten, jeweils fünf, manuell detektierten Testpunktpaaren verwendet. In dieser Zeitspanne wurden der Strahlengang und das Kamerasystem neu justiert. Das Keystone-Modell wurde nun für die inverse Abbildung in das Slidesystem $[x, y]^T = t_{\text{inv., Scanhead} \rightarrow \text{Slide}}([u, v]^T)$ angenommen und an die Daten angepasst. Abbildung 7.8 zeigt den Versatz o und den Keystone-Verzerrungs-Koeffizient k für jeden Datensatz. Es ist am Versatz deutlich zu erkennen, dass Justagearbeiten vorgenommen wurden, denn die Werte vorher unterscheiden sich deutlich. Bei den Verzerrungs-Koeffizienten ist jedoch keine Aufteilung in zwei Cluster zu erkennen; ihre Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant. Zur Interpretation ist in der Abbildung als Konturfeld eingezeichnet, wie stark sich der jeweilige Koeffizientenwert am Eckpunkt eines normalen Slides ungefähr auswirkt, im Vergleich zu einer verzerrungsfreien Abbildung. Die so definierte Stärke der Verzerrung streut mit etwa $20 \mu\text{m}$ um den Mittelwert von $76 \mu\text{m}$. Eine Streuung der selben Größenordnung ist auch beim Versatz zu beobachten. Diese könnte der Genauigkeit der ermittelten Testpunkte entsprechen, oder durch thermische Schwankung der geometrischen Gegebenheiten der Anlage zustande kommen. In jedem Fall aber kann die wahre Schwankung nicht größer sein als die beobachtete. Außerdem lässt sich aus den Daten schließen, dass Änderungen am Gang des eingehenden Laserstrahls die Perspektive des Scanheads nicht stark beeinflussen.

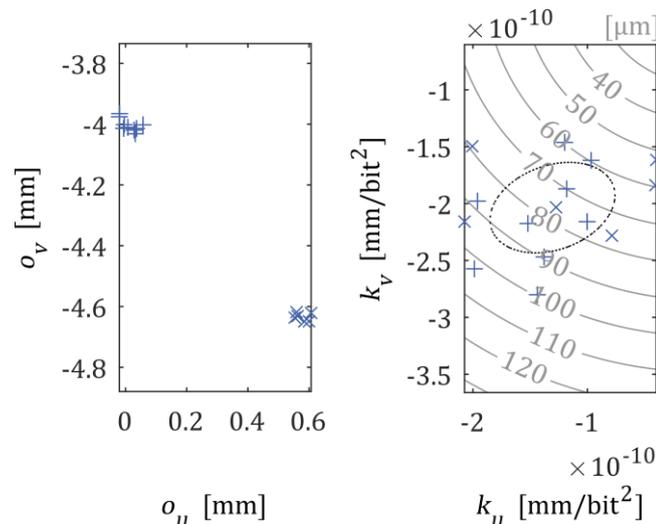


Abbildung 7.8: Versatz und Verzerrungskoeffizient des Keystone-Modells für einen gesammelten Datensatz. Es wurde die inverse Abbildung von Scanhead- zu Slidekoordinaten modelliert. Die Daten wurden innerhalb eines Monats gesammelt; währenddessen wurden Einstellarbeiten am Strahlengang und dem Kamerasystem des Versuchsstands vorgenommen. Der Bruch im Datensatz (Plus-Symbole für vorher, Kreuz-Symbole für nachher) ist im linken Diagramm für den Versatz deutlich zu erkennen. Das rechte Diagramm für den Verzerrungskoeffizient zeigt dagegen keine Aufteilung. Die Konturlinien geben an, welche Auswirkung der Verzerrung am Eckpunkt des Slides ungefähr zu erwarten sind. Diese Auswirkung streut um im Mittel $76 \mu\text{m}$; die 1σ -Streuung beträgt etwa $20 \mu\text{m}$ und ist hier als Ellipse eingetragen. Eine ähnlich große Streuung beobachtet man bei den Werten für den Versatz.

7.3.3 Beschreibung der Verzeichnung

In Abbildung 7.5 wurde beispielhaft gezeigt, welches Verzeichnungsfeld als Residuum einer projektiven Abbildung übrig bleibt. Verzeichnung zeichnet sich dadurch aus, dass gerade Linien gekrümmt wiedergegeben werden. Im strengen Sprachgebrauch stellt dies den Unterschied zwischen Verzeichnung und rein perspektivischer Verzerrung dar. Über einen großen Zeitraum hinweg (sechs Datensätze in 15 Monaten) wurden Testpunktmuster wie das in Abbildung 7.2 erfasst, die Verzerrung abgezogen und somit das Verzeichnungsfeld bestimmt. Abbildung 7.9 zeigt dessen Mittel und Schwankung. In der Schwankung sind räumliche Strukturen zu erkennen; sie kann also nicht als reines Messrauschen aufgefasst werden. Die Tatsache einer Schwankung weist darauf hin, dass die Verzeichnung nicht nur als im Scanhead konstanter Linsen- oder geometrischer Fehler gesehen werden kann, sondern dass sie zeitlich veränderlich ist, womöglich von der genauen Führung des Strahlengangs abhängt. Zur Wahrung der Ortsgenauigkeit muss also die Verzeichnung zu den kontinuierlich zu korrigierenden Effekten hinzugezählt werden.

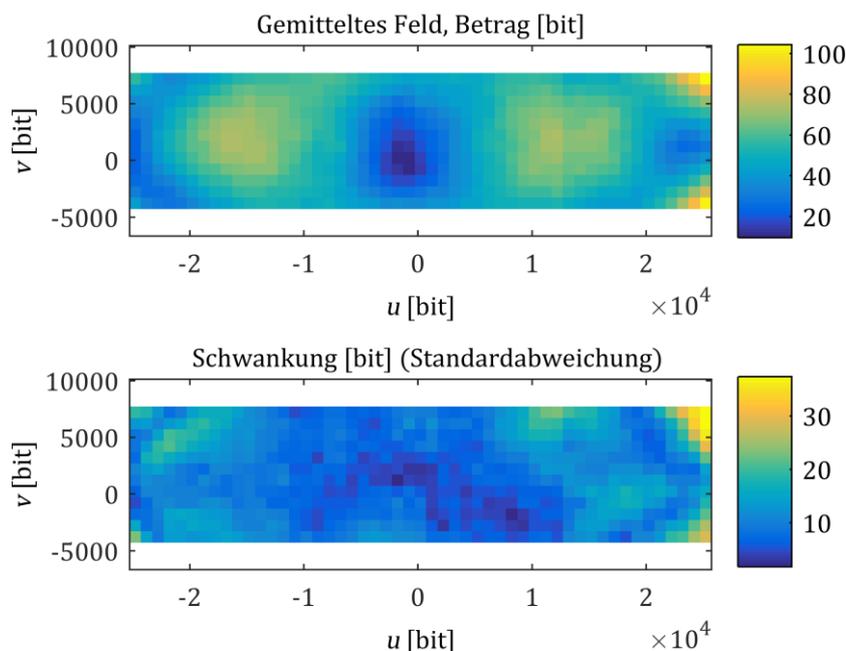


Abbildung 7.9: Mittel und Streuung des Verzeichnungsfeldes über ein Jahr hinweg. Als Verzeichnung wurde das Residuum einer projektiven Abbildung aufgefasst. Es ist jeweils der Betrag des Feldes angegeben; 800 bit entsprechen dabei etwa 1 mm auf der Slideebene.

Aus der Photographie, vom Einstellungsmenü von Röhrenmonitoren und aus dem Maschinellen Sehen (auch in [107]) kennt man die Kissen- und Tonnen- oder Fass-Verzerrung als grundsätzliche Verzeichnungsphänomene. Kissen und Tonne sind radiale Verzeichnungen und können durch einen empirischen Ansatz modelliert werden, etwa:

$$\begin{aligned} u' &= u \cdot (1 + k_{1,u}r^2 + k_{2,u}r^4) \\ v' &= v \cdot (1 + k_{1,v}r^2 + k_{2,v}r^4) \end{aligned} \quad (7.16)$$

wobei $r^2 = u^2 + v^2$

Die Koeffizienten in Formel (7.16) sind üblicherweise die selben für u - und v -Richtung. Ihr Vorzeichen bestimmt, ob sich ein Kissen (negativ) oder eine Tonne (Positiv) bildet. Im Fall des Scanheads werden für die unterschiedlichen Richtungen offensichtlich unterschiedliche Vorzeichen, also unterschiedliche Koeffizienten benötigt. Man kann auch eine weitere Ordnung hinzunehmen.

Dem gleichen Konzept folgt die tangentielle Verzeichnung (Formel (7.17), nach der MATLAB-Dokumentation, MathWorks, [82]). Diese zeigt aber augenscheinlich ein anderes qualitatives Verhalten (Abbildung 7.10) als die beim Scanhead beobachtete Verzeichnung (vgl. Abbildung 7.11).

$$\begin{aligned} u' &= u \cdot (2k_1uv + k_2(r^2 + u^2)) \\ v' &= v \cdot (k_1(r^2 + v^2) + 2k_2uv) \end{aligned} \quad (7.17)$$

wobei $r^2 = u^2 + v^2$

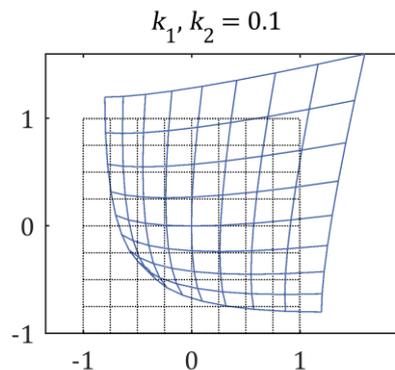
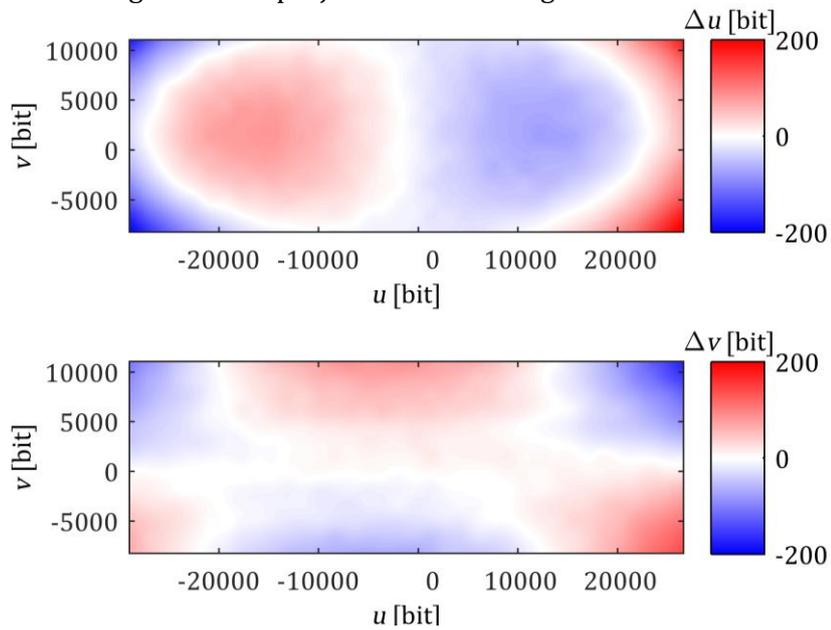


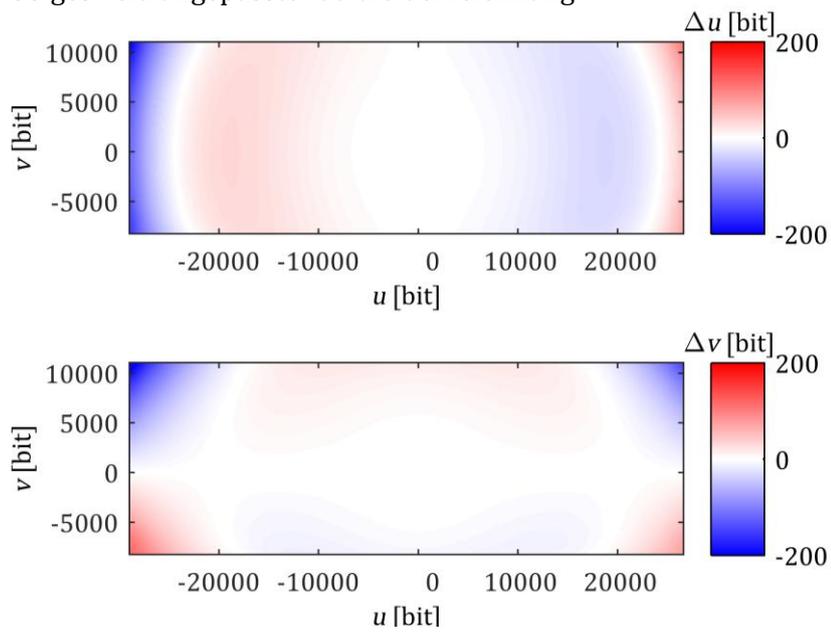
Abbildung 7.10: Demonstration der tangentialen Verzeichnung anhand der Wirkung auf ein Gitter. Sie wird im Weiteren nicht für die Modellierung des Scanheads herangezogen.

Genau genommen setzt man in Formel (7.16) und Formel (7.17) Koordinaten ein, die um den Prinzipalpunkt der Bildebene in einem ersten Schritt bereits zentriert und sinnvoll normalisiert worden waren. Im Folgenden werden der Versatz des Bildursprungs, weil gering, vernachlässigt und die Koordinaten auf die halbe Bildweite $\pm 2^{15}$ bit normalisiert.

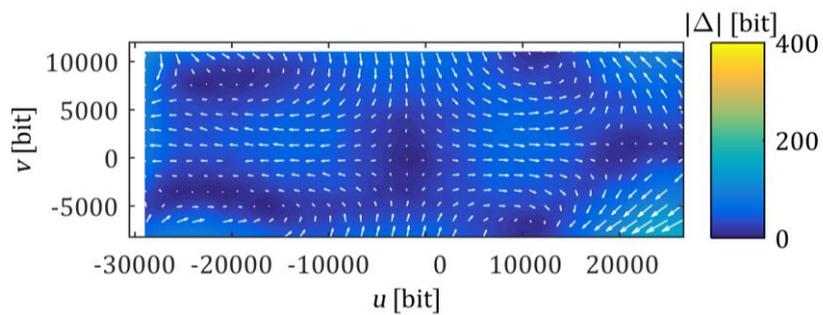
A Verzeichnungsfield nach projektiver Abbildung



B An obiges Feld angepasste radiale Verzeichnung



C Residuum der radialen Verzeichnung



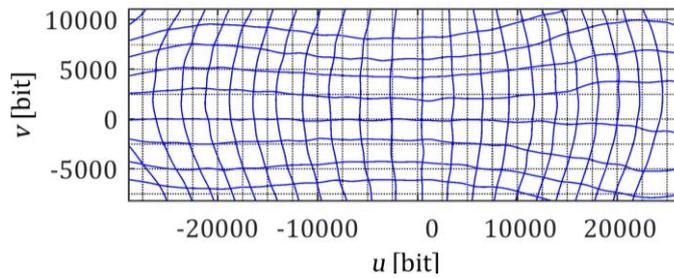


Abbildung 7.11: Radiale Verzerrung im Vergleich zur gemessenen Verzerrung. A: Komponenten des Verzerrungsfeldes (Abbildung 7.5) nach einer projektiven Abbildung. B: Komponenten der an A angepassten radialen Verzerrung. Es ist sichtbar, dass dieses Modell eine gute Näherung liefert. C: Die Differenz zwischen B und A als Residuum des Modells; Betrag (oben) und nichtmaßstabsgetreue Illustration der weiterhin vorhandenen Verzerrung (Farbskala wie in bisherigen Abbildungen).

Die bereits bekannten Testdaten (die zu Abbildung 7.2, Abbildung 7.3, Abbildung 7.5) wurden auch hier wieder zur qualitativen Beurteilung der Angemessenheit des Modells der radialen Verzerrung verwendet. Abbildung 7.11 zeigt die als Residuum nach einer projektiven Abbildung verbliebene experimentell bestimmte Verzerrung und im Vergleich eine daran angepasste ‚ideale‘ radiale Verzerrung. Man sieht, dass dieses Modell qualitativ zwar gut geeignet ist den Scanhead zu beschreiben, allerdings zu den Bildrändern hin zunehmend unzutreffend ist.

In der Optik (z.B. in [109]) arbeitet man mit Reihenentwicklungen, um Wellenfronten zu approximieren. Für Optiken mit runder Apertur verwendet man als Folgeglieder Zernike-Polynome, für rechteckige Aperturen Tschebyschow-Polynome [110]. Diese Polynome erlauben eine gewisse Interpretierbarkeit im Gegensatz zu einem eher empirischen Ansatz wie die oben beschriebene radiale und tangentialen Verzerrung. Eine Größe $f(u, v)$ wird dann aufgefasst als Reihe:

$$f(u, v) = \sum_i q_i \cdot c_i(u, v) \quad (7.18)$$

wobei

$$q_i = \iint_{-1}^1 \frac{f(u, v) c_i(u, v)}{K \sqrt{1-u^2} \sqrt{1-v^2}} du dv$$

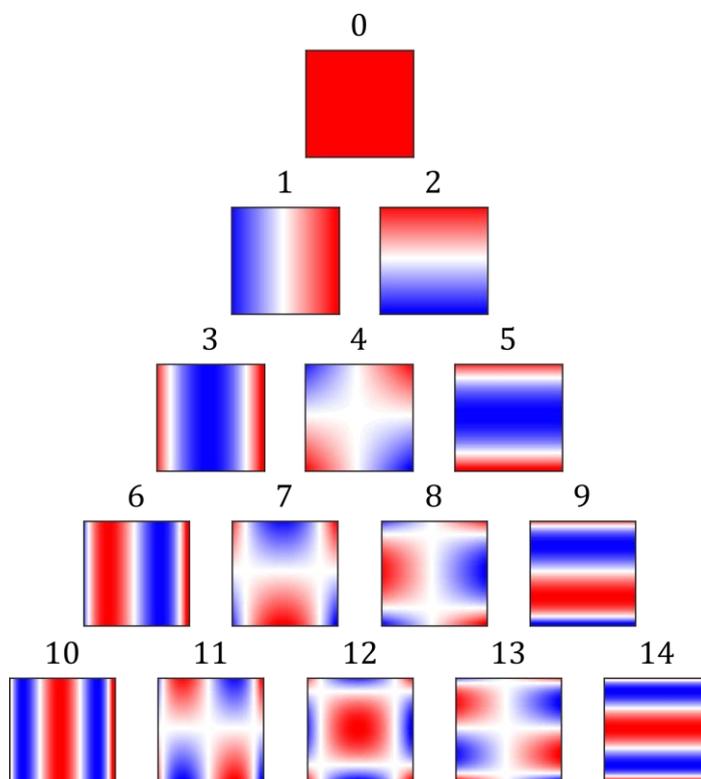
und $c_i(u, v)$ die in der Entwicklung verwendeten Polynomterme sind und K dabei jeweils ein Normalisierungsfaktor ist.

In der experimentellen Praxis hat eine solche Reihenentwicklung den Nachteil, dass die Polynome eine begrenzte Definitionsmenge über einer ausgezeichneten Längenskala haben und die Messdaten deshalb geeignet normalisiert werden müssen, und dass bei unvollständigen Daten die Integration über die gesamte Menge nicht möglich ist. In diesem Falle gewinnt man die Reihenkoeffizienten q_i nicht durch diese Integration, sondern unterzieht den mit allen Polynomtermen ausgeschriebenen Ausdruck für $f(u, v)$

einer Regressionsrechnung unter Verwendung der vorhandenen Daten. Andere Basispolynome könnten dabei besser approximieren als Tschebyschow-Polynome [111], im Folgenden werden diese dennoch verwendet, da sie eine recht anschauliche Bedeutung haben. Tabelle 6 führt diese Polynome (aus [110]) und ihre Normalisierungsfaktoren bis zur vierten Ordnung auf, Abbildung 7.12 illustriert sie.

Tabelle 6: Tschebyschow-Polynome für die Reihenentwicklung

Term	Ordnung	Faktor K	Polynom $c_i(u, v)$	Interpretation
0	0	π^2	1	
1	1	$\pi^2/2$	u	u -Tilt
2		$\pi^2/2$	v	v -Tilt
3	2	$\pi^2/2$	$2u^2 - 1$	u -Astigmatismus
4		$\pi^2/4$	uv	45°-Astigmatismus
5		$\pi^2/2$	$2v^2 - 1$	v -Astigmatismus
6	3	$\pi^2/2$	$4u^3 - 3u$	u -Koma
7		$\pi^2/4$	$(2u^2 - 1)v$	
8		$\pi^2/4$	$(2v^2 - 1)u$	
9		$\pi^2/2$	$4v^3 - 3v$	v -Koma
10	4	$\pi^2/2$	$8u^4 - 8u^2 + 1$	"spherical u "
11		$\pi^2/4$	$(4u^3 - 3u)v$	
12		$\pi^2/4$	$(2u^2 - 1)(2v^2 - 1)$	
13		$\pi^2/4$	$(4v^3 - 3v)u$	
14		$\pi^2/2$	$8v^4 - 8v^2 + 1$	"spherical v "



C Residuum nach der Reihenentwicklung in Tschebyschow-Polynome

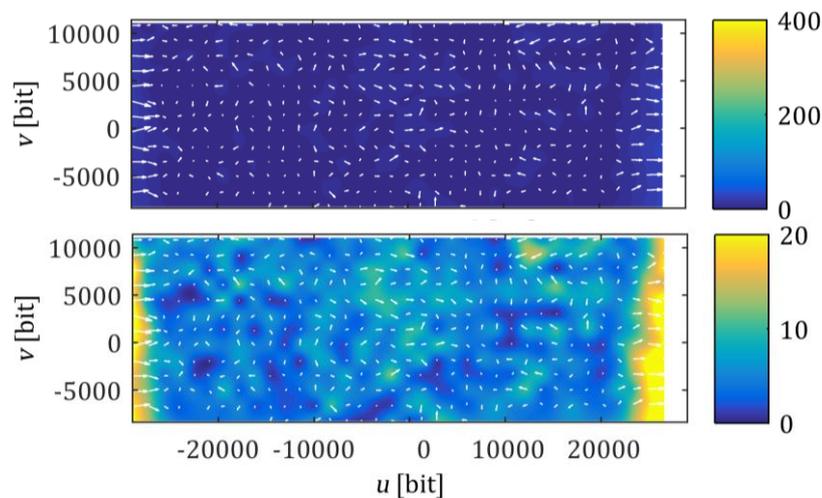


Abbildung 7.13: Ergebnis der Reihenentwicklung der Testdaten. (A): Komponenten des durch Tschebyschow-Polynome beschriebenen Verzeichnungsfeldes, oben horizontale und unten vertikale Komponente. (B): Die 15 Koeffizienten für die in (A) gezeichneten Reihen, links die für die horizontale, rechts die für die vertikale Komponente. Vergleiche hierbei Abbildung 7.12. (C): Betrag des Residuums, das verbleibt, wenn die Reihen-Approximation von dem gemessenen Verzeichnungsfeld abgezogen wird, in unterschiedlichen Farbskalen. 800 bit entsprechen dabei etwa 1 mm. Die Skala oben entspricht der von den bisherigen vergleichbaren Abbildungen.

7.3.4 Nichtparametrische Modellierung

Wie eingangs erwähnt, könnte es auch ein Ansatz sein, den Datensatz der Testpunktpaare direkt zu verwenden, um die Transformation zwischen diesen Stützpunkten einfach durch Interpolation zu bestimmen. Bei diesem rein datenbasierten Vorgehen ist die Kenntnis eines physikalischen Modells und die Optimierung von dessen Parametern nicht nötig. Da auf den Thermoetiketten-Testslides die Slidekoordinaten nur relativ bis auf eine starre Abbildung innerhalb der Laborebene bestimmbar sind, wird als zu interpolierende Größe das Residuumsfeld nach einer Ähnlichkeitsabbildung gewählt und erfasst. Diese Verzeichnung kann dann zur Korrektur von neuen Scanheadkoordinaten verwendet werden, so dass der Scanhead wie ein senkrecht installierter Scanhead ohne Verzeichnungen wirkt. Verzeichnung umfasst hierbei auch die perspektivische Verzerrung. Die Projektion dieses korrigierten Scanheads auf die Slideebene ist dann eine Ähnlichkeitsabbildung ohne perspektivische Effekte. Erzeugt man mit dieser Korrektur erneut ein Testmuster, ist das Residuum einer Ähnlichkeitsabbildung deshalb klein und ohne räumliche Strukturen.

Vermutlich beruht das beim Hersteller erhältliche Softwaretool (correXion pro, SCANLAB) zur Erzeugung einer Fehlerkorrektur-Datei in proprietärem Format für den Scanhead auf

dieser Strategie. Um ein möglichst offenes System zu erhalten, wurde die Verzeichnungskorrektur für diese Arbeit jedoch selbst implementiert; die dazu nötigen Datensätze müssen zur Charakterisierung und Qualitätskontrolle ohnehin wiederholt erfasst werden (vgl. die Schwankung in Abbildung 7.9). Das Tool des Herstellers wäre allerdings dann von Vorteil, wenn man den Scanhead keine einzelnen Punkte, sondern Linien schreiben ließe, von denen nur die Endpunkte vorgegeben werden, weil dann die Koordinatenkorrektur intern erfolgen müsste.

Streng genommen würde sich bei der Korrektur des Verzeichnungsfelds ein zyklisches Problem ergeben (Abbildung 7.14). Allerdings ist die Änderung der Verzeichnung auf der Längenskala der Verzeichnung klein, so dass zur Errechnung der korrigierten Koordinaten das Verzeichnungsfeld als lokal konstant angenommen werden kann und die neuen Koordinaten dann einfach die alten Koordinaten abzüglich der Verzeichnung an der alten Stelle sind.

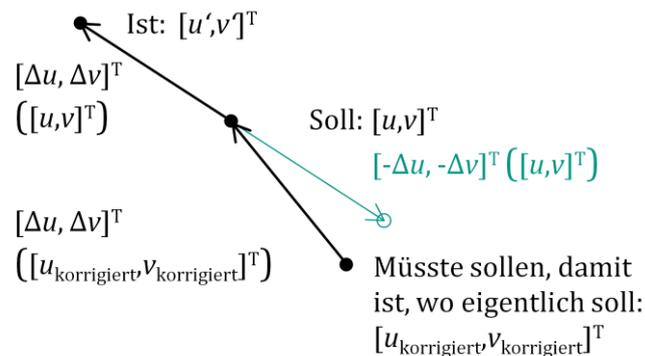


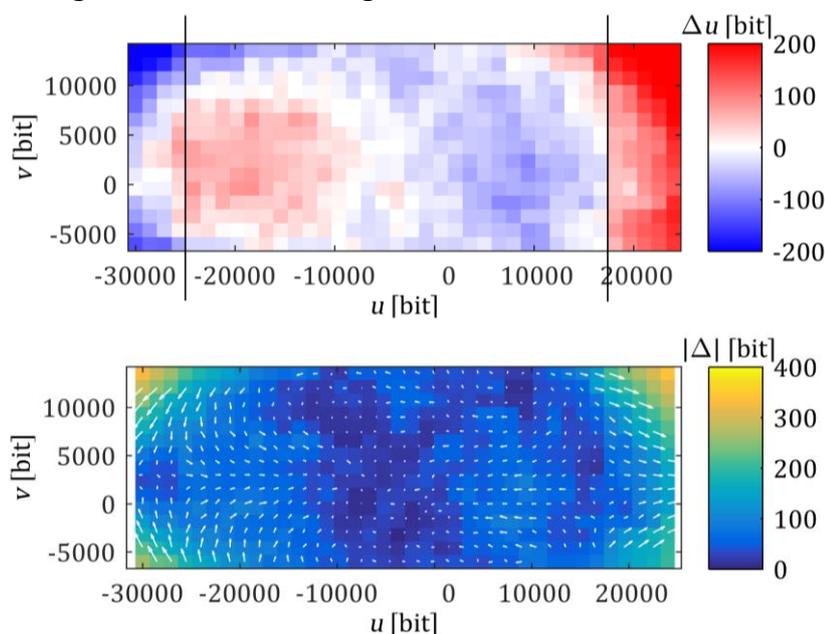
Abbildung 7.14: Illustration der Korrektur der Verzeichnung. Wenn sich das Verzeichnungsfeld so wie illustriert stark ändern würde, müsste zur Korrektur die Verzeichnung an den noch unbekanntenen neuen Koordinaten ausgewertet werden. Näherungsweise kann man aber auch mittels der Verzeichnung an den bekannten ursprünglichen Koordinaten zu den neuen Koordinaten gelangen.

In Abbildung 7.15 wurde die datenbasierte Verzeichnungskorrektur beispielhaft angewandt. Zunächst wurde erfasst, welches Residuum verbleibt, wenn man eine Ähnlichkeitsabbildung an die beobachteten Testpunkte anpasst. Dabei ist ein Messartefakt aufgetreten: Das Bild wurde vom Dokumentenscanner an zwei Stellen horizontal ‚verrutscht‘. Zur Demonstration hier ist die fehlerhafte Messung allerdings interessant, denn es wird deutlich, dass sich lokale Fehler nicht global auswirken, wie das bei einem parametrischen Modell, bei dem alle Punkte in die Optimierung des gesamten Modells einfließen, der Fall wäre. Mit dem so erfassten Verzeichnungsfeld wurde das Testmuster korrigiert und erneut auf einem Thermoetikettenslide erzeugt. Nunmehr ist nach einer Ähnlichkeitsabbildung ein kleineres Residuum, das – abgesehen vom fehlerbehafteten Randbereich – nur noch zufällige Strukturen zeigt, übrig.

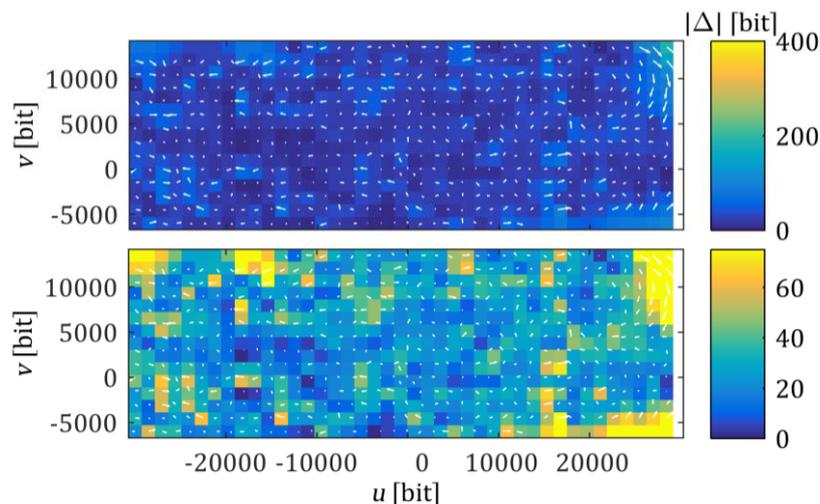
Ein engeres Testmuster würde dabei eine genauere Auflösung bieten; die korrekte Identifizierung der Testpunkte wird aber dann erschwert, wenn ihr Abstand den typischen Betrag der Verzeichnung unterschreitet. Dies könnte erleichtert werden, wenn

man bei dem Auffinden der Testpunkte in der Bilddatei bereits *a priori*-Wissen über die Verzeichnung einsetzt. Ein anderer Ansatzpunkt zur Verbesserung dieser Art der Modellierung wäre es, eine zusätzliche Glättung der Daten vorzunehmen. Wenn nur interpoliert wird, fließen die Ortsfehler der Testpunkte unmittelbar ein. Ein parametrisches Modell mit wenigen Parametern hätte den Vorteil, dass diese Fehler ‚weggemittelt‘ werden – ein systematischer Fehler aufgrund einer ungünstigen Modellwahl bleibt dort jedoch bestehen.

A Zu korrigierendes Verzeichnungsfeld



B Verzeichnungsfeld nach der Korrektur



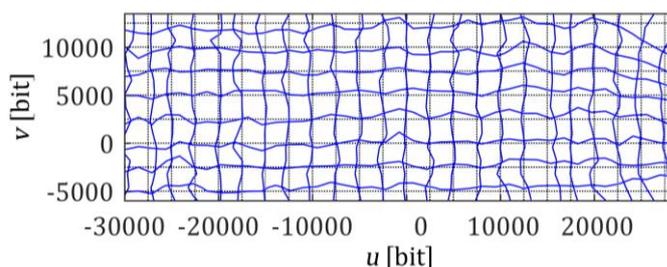


Abbildung 7.15: Erfassung und Korrektur der Verzeichnung durch Interpolation. A: Residuum nach Anpassung einer Ähnlichkeitsabbildung an Testdaten. Es stellt die zu korrigierende Verzeichnung dar. In der oberen Graphik ist seine Komponente in u -Richtung abgebildet, in der unteren Graphik der Betrag des Feldes. 800 bit entsprechen dabei etwa 1 mm. Bei der Aufnahme der Testdaten mit einem Dokumentenscanner ist ein Messartefakt entstanden: An den in der oberen Graphik mit vertikalen Schnittlinien gekennzeichneten Stellen hat dieser einen horizontalen Versatz im Bild bewirkt. Korrekte Korrektur ist deshalb nur in der inneren Region des Datengebiets möglich. B: Ergebnis der Auswertung eines zweiten Testmusters, dessen Scanheadkoordinaten mit dem Feld aus A korrigiert wurden. Nun ist nach Abzug einer Ähnlichkeitsabbildung von den relativen Weltkoordinaten keine systematische Verzeichnung mehr zu beobachten. Die oberen beiden Abbildungen zeigen den Betrag des Residuumfeldes mit unterschiedlicher Farbskala. Die untere Abbildung illustriert nichtmaßstabsgetreu die verbleibende Verzeichnung. Im nicht durch das Messartefakt versetzten Bereich (vgl. A oben) sind nur noch zufällige Deformationen der Gitterlinien zu beobachten.

Nützlich wäre es, wenn die Lage der Testpunkte nicht nur relativ als Koordinaten im Bild eines Dokumentenscanners, sondern absolut im idealen Laborsystem bekannt wäre. Dann könnte man bei der Koordinatentransformation von Slide- zu Scanheadkoordinaten sich den zusätzlichen Schritt einer aufzufindenden starren Abbildung innerhalb der Laborebene einsparen. Eine technische Lösung wird in Kapitel 8.3 besprochen. Eine andere Lösung, angelehnt an das in diesem Kapitel angewandte Verfahren mit den Thermoetiketten, wäre es, den Testträger zusätzlich mit Ortsmarkierungen auszustatten, die im Laborsystem gemessen werden und auch später zusammen mit den Testpunkten sichtbar sind und somit die Abbildung innerhalb der Laborebene schon während der Erfassung des Verzeichnungsfeldes ermöglichen. Die derzeit verwendeten Positionsmarkierungen für Akzeptorslides (siehe Kapitel 8.2) sind allerdings für die Dokumentenscanner zu filigran. Auf mit Fluoreszenzscannern aufgenommenen Bildern sind sie hingegen gut sichtbar. Man könnte also auf einen markierten Slide als Testspots Spots von einem fluoreszierenden Material übertragen (eine fluoreszent markierte Aminosäure wurde erfolgreich im Rahmen einer teils durch den Verfasser dieser Arbeit betreuten Praktikums-Lehrveranstaltung eingesetzt, um dort die chemischen Schritte der Sichtbarmachung einzusparen) und diesen Testslide mit Fluoreszenzbildgebung erfassen. Der Vorteil der Verwendung eines gewöhnlichen Dokumentenscanners ist es, dass man ihn aufgrund seiner geringen Kosten in eine automatisierte Anlage integrieren könnte; ein Fluoreszenzscanner stellt jedoch keine zusätzliche Anschaffung da, weil davon auszugehen ist, dass in einer Umgebung, in der molekulare Arrays gefertigt werden, auch entsprechende Gerätschaft zu ihrer Auslese vorhanden ist.

In jedem Fall verbleibt auch bei dieser nicht-parametrischen Modellierung die Aufgabe, aus Testpunkten parametrisch zumindest eine Ähnlichkeitsabbildung zu ermitteln; sei es während ihrer Erfassung, wie im letzten Absatz vorgeschlagen, oder sei es während der Korrektur zukünftiger Spotkoordinaten, wie in der beschriebenen Demonstration getan. Dazu sei auf Kapitel 7.5 verwiesen.

7.4 Vergleich der Modelle und Diskussion

In den vorherigen Abschnitten wurden verschiedene Modelle für die Transformation von Slide- zu Scanheadkoordinaten vorgestellt und mit experimentellen Beispieldaten illustriert. Hier sollen nun diese Modelle quantitativ miteinander verglichen werden.

Als Maß für die Fehlerhaftigkeit eines Modells dient der mittlere Betrag seines Residuums (MRS , siehe Formel (7.3)). Man beachte, dass hier der Betrag und nicht das Betragsquadrat gemittelt wird (RMS); dies ist zu Gunsten einer anschaulichen Interpretation. Das datenbasierte nichtparametrische Modell weist ohne Glättung kein Residuum auf, da es die Testpunkte interpoliert und auf den Testpunkten diese direkt als Wert übernimmt. Deshalb wurden hier als Kreuzvalidierung zum Aufstellen des Modells nur 90 % des Datensatzes als Trainingspunkte verwendet und das Residuum aus den verbleibenden 10 % des Datensatzes als Testpunkte berechnet; dies wurde 100 Mal wiederholt und das Ergebnis gemittelt.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener Modelle für die Abbildung von Slide- zu Scanheadkoordinaten

Residuum (gemittelter Betrag MRS [bit]) nach...	Ähnlichkeitsabbildung	Affiner Abbildung	Keystone	Perspektivischer Projektion	Perspektivische Projektion und radialer Verzeichnung	Perspektivischer Projektion und Reihenentwicklung	Ähnlichkeitsabbildung und nichtparametrischer Korrektur	Perspektivischer Projektion und nichtparametrischer Korrektur
A	55	55	55	45	32	16	8,2	8,2
B	239	76	75	63	38	19	20	21
C	71	63	63	60	39	21	5,3	5,7
D	140	71	68	54	41	6,3	5,1	4,5
E	104	83	77	63	45	13	10	9,9
F	84	84	80	68	40	15	2,6	2,9
Mittelwert von A-F, relativ bezogen auf ‚nach Ähnlichkeitsabbildung‘:								
	1,00	0,62	0,60	0,51	0,34	0,13	0,07	0,08
Mittelwert von A-F, relativ bezogen auf ‚nach perspektivischer Projektion‘:								
	1,96	1,22	1,18	1,00	0,67	0,26	0,15	0,15

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse für sechs innerhalb etwa 15 Monaten erfasste Testdatensätze. Zur erleichterten Deutung sind die darüber gemittelten Ergebnisse auch relativ angegeben, bezogen auf die Qualität, wenn eine Ähnlichkeitsabbildung oder eine perspektivische Projektion als Modell herangezogen werden. Man sieht, dass die Berücksichtigung der Perspektive eine Verbesserung um das Doppelte bewirkt, und die Verwendung des vollen Lochkammermodells gegenüber dem Keystone-Modell eine Verbesserung von 15 % bringt. Die Berücksichtigung der Verzeichnung führt nochmals zu einer deutlichen Reduktion des Residuums. Die besten Werte weist die nichtparametrische Beschreibung auf; hierbei macht es kaum Unterschied, ob das Residuum einer Ähnlichkeits- oder projektiven Abbildung als Basis dient.

Welche der Modellierungen ist für unsere Zwecke und Bedürfnisse also die beste, bzw. jeweils ausreichende?

Die Anforderung an die Genauigkeit ergibt sich aus der Längenskala der Spots. Die nötige relative Genauigkeit ist aus der minimal erreichbaren Spotgröße aller verwendeten Bausteine (vgl. Abbildung 5.19) bestimmbar. Fordert man etwa eine Ortsgenauigkeit von 25 % dieses Spotdurchmessers, muss sie 20 μm für eine kombinatorische Strukturierung mit allen Bausteinen, bzw. 63 μm , wenn man ein Muster mit dem zu den größten Spots führenden Baustein übertragen möchte, betragen. Das sind umgerechnet ungefähr 16 bit bis 50 bit.

Wenn man den Scanhead mit einer perspektivischen Projektion beschreibt, schwankt das dabei verbleibende Verzeichnungsfeld an einigen Stellen um über etwa 20 bit (Abbildung 7.9). Für die Strukturierung mit zu ‚großen‘ Spots (250 μm) führenden Bausteinen ist dies im Rahmen der geforderten Genauigkeit noch tolerabel. Für kombinatorische Strukturierungen hingegen ist es nötig, das Verzeichnungsfeld regelmäßig zu berücksichtigen, als Modell also eines zu wählen, das über eine ideale Projektion hinaus geht.

Die zeitlichen Änderungen der Perspektive selbst führt zu Ungenauigkeiten ebenfalls in der Größenordnung von 20 bit am Rand des Bildfelds (Abbildung 7.8). Es gilt also wiederum hier: Die optimierte Koordinatentransformation muss regelmäßig erneuert werden, wenn mit auch zu ‚kleinen‘ Spots (80 μm) führenden Bausteinen gearbeitet wird. [9] beobachtete einen zeitlichen, temperaturabhängigen Drift am Ursprung der Slidekoordinaten von ähnlicher Größe wie die Perspektivenänderung; er arbeitete zwar nicht mit Projektionsmodellen, aber die daraus ableitbare Zeitskala von 120 min bzw. die Skala der Temperaturänderung von 3 °C für eine Ortsänderung von umgerechnet 25 μm sollte allgemeine Gültigkeit haben. Demnach sind die erneuten Kalibrierungen etwa stündlich durchzuführen. Eine Klimatisierung der Anlage könnte zusätzliche Stabilität bringen.

Die absolute Genauigkeit muss dann hoch sein, wenn für die Weiterverarbeitung der gefertigten Arrays ein unverzerrtes, geradliniges Spotraster nötig ist, oder wenn Slides in verschiedenen Schritten der Fertigung in ganz unterschiedlichen Positionen, etwa um 180 ° um die Hochachse rotiert, eingelegt werden sollen. In zweitem Fall muss sie so hoch

wie die relative Genauigkeit sein, in erstem Fall muss sichergestellt werden, dass die ungenauigkeitsbedingte Verschiebung von Spots kleiner ist als der Pitch des Rasters. Der Pitch des Spotrasters ist gegeben durch die maximal zu erwartende Spotgröße aller verwendeten Bausteine (vgl. wiederum Abbildung 5.19). Zuzüglich eines Schwankungsspielraumes und Sicherheitsabstand für etwaige Ring-Höfe um die Spots beträgt dies etwa 400 µm. Sollte die absolute Ortsgenauigkeit 25 % des Pitches sein, sind 100 µm gefordert, was etwa 80 bit entspricht. Es sollte also die perspektivischer Verzerrung mindestens mit dem Keystone-Ansatz berücksichtigt werden. Den höchsten Ansprüchen einer der relativen Genauigkeit entsprechenden Präzision genügend sind hingegen nur die nicht-parametrische Modellierung oder die Beschreibung der Verzeichnung mit einer Reihenentwicklung; letztere ist zwar von analytischer Schönheit, aber zu Gunsten allgemeinerer Anwendbarkeit ist das rein daten-basierte Vorgehen zu bevorzugen.

Tabelle 8 fasst diese Diskussion zusammen und empfiehlt das geeignetste Modell je nach Anwendung. Der für die Herstellung von Peptidarrays übliche Anwendungsfall ist dabei hervorgehoben.

Tabelle 8: Auswahl des angemessenen Modells für die Koordinatentransformation

Relative Genauigkeit \ Absolute Genauigkeit	gering (63 µm) – nur Bausteine mit großen Spots (250 µm)	hoch (20 µm) – Kombinatorische Strukturierung mit allen Aminosäure-Bausteinen
keine – Spotraster darf verzerrt sein	Modell egal	Verzeichnung beachten, stündlich kalibrieren
normal – unverzerrtes Spotraster	Perspektive beachten, Keystone- oder Lochkamera-Modell	Verzeichnung beachten (Datenbasierte Interpolation), stündlich kalibrieren
hoch – so wie relative Ortsgenauigkeit	Lochkamera-Modell, oder Datenbasierte Interpolation	Datenbasierte Interpolation, stündlich kalibrieren

Die Erfassung von Testpunkten, aus denen Abbildungen abgeleitet werden, sollte mindestens so genau wie die in den letzten Absätzen größte geforderte Genauigkeit – 20 µm – sein, am besten in der nächsten Größenordnung liegen; vgl. dazu das nächste Unterkapitel.

7.5 Ähnlichkeitsabbildungen aus Testpunkten

Die im Kapitel 7.3 vorgestellten Modelle für die Transformation der Spotkoordinaten zwischen dem Slide- und Scanheadsystme beinhalten letztlich eine Rückführung auf eine starre Abbildung in der Laborebene (Rotation um die Hochachse und Translation) bzw.

verallgemeinert eine Ähnlichkeitsabbildung (zusätzliche Skalierung). Eine solche ist auch anzuwenden, wenn die reale Lage des Slides im Laborsystem ermittelt wird (vgl. Abbildung 7.1). Die Transformation soll aus Testpunkten, bzw. Positionsmarkierungen auf dem Slide, durch Regressionsrechnung – mit einem ‚Fit‘ – ermittelt werden. Der Rechenweg dazu war in Formel (7.8) beschrieben worden; der Eleganz wegen ist er elementaren geometrischen Überlegungen vorzuziehen, obgleich diese anschaulicher verständlich sein können. Hier soll nun untersucht werden, welchen Einfluss dabei Messfehler haben. Es ist ein linearer Zusammenhang zu erwarten – aber mit welchem Proportionalitätsfaktor?

Da die anzupassende Abbildung drei bzw. vier Freiheitsgrade besitzt, sind theoretisch zwei Testpunkte mit insgesamt vier Koordinaten ausreichend. Die Erfassung von Testpunkten bzw. Positionsmarkierungen direkt in der Laborebene ist mit praktischem Aufwand verbunden; eine bewegliche Kamera benötigt Bauraum und einen kostspieligen verfahrbaren Koordinatentisch. Zwei Testpunkte ließen sich auch mit zwei stationären Kameras abbilden. Eine Frage ist also, wie sich die Genauigkeit der Modellanpassung mit der Anzahl an Testpunkten verändert.

Bei der Abnahme des Gesamtfehlers mit der Anzahl an Testpunkten ist das aus der Fehlerrechnung bekannte \sqrt{N} -Gesetz zu erwarten. Es gibt in diesem Unterkapitel aber zwei präzisere Fragestellungen:

Im Fall der Modellierung des Scanheads mittels einer Ähnlichkeitsabbildung – Welchen zusätzlichen Einfluss hat der systematische Fehler, wenn die Abbildung in Wahrheit eine perspektivische sein müsste? Ist er durch eine hinreichende Zahl an Testpunkten kompensierbar?

Im Fall der Erkennung der Slidelage aus Positionsmarkierungen – Wie lässt sich abschätzen, wie gut die Markierungen erkannt wurden, ohne ihre wahre Position fehlerfrei zu kennen? Muss bei dieser Abschätzung die Anzahl an Testpunkten einberechnet werden?

Als Maß für den Fehler der optimierten Abbildung kann sein Fit-Residuum hier nicht dienen, da es im Fall der Anpassung von vier Freiheitsgraden aus den nur vier Koordinaten von zwei Testpunkten nahezu verschwindet. (Um eines mit den vergangenen Unterkapiteln konsistenten Sprachgebrauchs willen werden diese Trainingspunkte hier weiter als Testpunkte bezeichnet). Stattdessen wurden numerische Experimente durchgeführt, bei denen die wahren Abbildungen bekannt sind, und die Auswirkung der gefundenen Abbildung auf beim Fit unbeteiligte Dummy-Punkte studiert. Interessante Größen sind hierbei der gemittelte absolute Ortsfehler der Dummypunkte nach der Abbildung im Vergleich zu ihren wahren Orten, also wiederum der *MRS* (siehe Formel (7.3), aber auch der maximale absolute Ortsfehler, sozusagen der *worst case*. Diese Größen wurden aus 1000 Dummypunkten berechnet und zusätzlich über 1000 Realisierungen des Zufallsexperiments gemittelt.

Für den Vergleich der Ähnlichkeitsabbildung mit einer perspektivischen Projektion wurden Testpunkte im Scanhead-System auf einem Kreis angenommen, dessen Durchmesser 50000 bit entspricht. Mit einer experimentell bekannten Homographie typischer Größenordnung – also einer perspektivischen Projektion – wurden die Testpunkte virtuell auf die Laborebene projiziert und dort gegebenenfalls mit einer normalverteilten, isotropischen Störung ϵ versehen. Die Dummypunkte wurden innerhalb des selben Kreises mit der gebräuchlichen Inversionsmethode (für eine Illustration siehe [112]) gleichverteilt gezogen und ebenfalls auf die Laborebene projiziert; dies ergibt die wahren Orte. Aus den gestörten Testpunkten im Weltsystem und ihren Koordinaten im Scanheadsystm wurde die gesuchte Ähnlichkeitsabbildung ermittelt und mit dieser die Dummypunkte auf die Laborebene transformiert; dies ergibt die fehlerbehafteten Orte, deren Abweichung δ von den wahren Orten betrachtet wurde.

Abbildung 7.16A zeigt, dass auch ohne Störung ϵ der Testpunkte, allein durch den systematischen Fehler eines falschen Modells, ein erheblicher Fehler δ bei den Dummypunkten – also den übertragenen Spots – auftritt. Bei der Verwendung von drei statt zwei Testpunkten nimmt dieser um die Hälfte ab, bleibt aber dann nahezu konstant, egal wie viele weitere Punkte hinzugenommen werden. Eine zusätzliche Störung ϵ führt hingegen zu keiner übermäßigen weiteren Verschlechterung (Abbildung 7.16B).

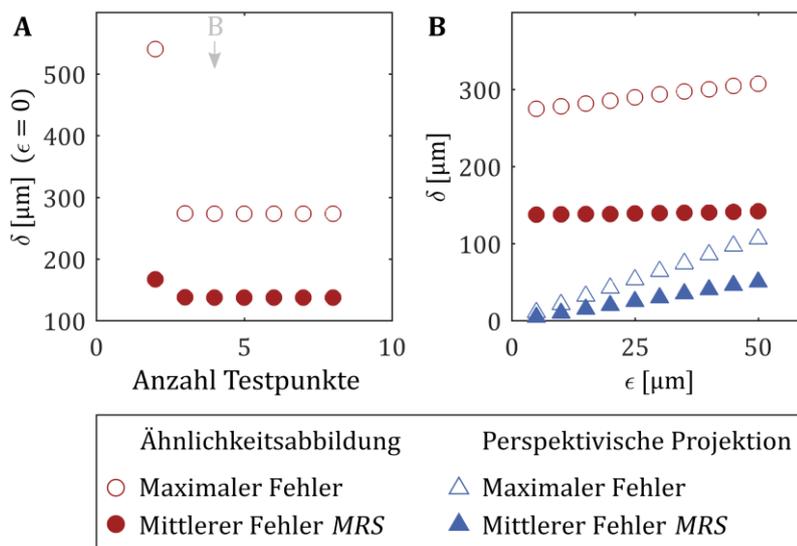


Abbildung 7.16: Auswirkung des Messfehlers, wenn ein falsches Abbildungsmodell gewählt wurde. In einem numerischen Zufallsexperiment wurden Punkte in Wahrheit perspektivisch projiziert, aus Testpunkten jedoch eine Ähnlichkeitsabbildung ermittelt. Der resultierende Ortsfehler δ von mit dieser systematisch falschen Abbildung transformierten Dummypunkten ist auch ohne Störung ϵ der Testpunkte erheblich und lässt sich durch zunehmende Anzahl Testpunkte nicht senken (A). Eine zusätzliche Störung (B) führt dann zu vergleichsweise kleinem Zuwachs des Fehlers (runde Symbole). Für den Fit einer tatsächlichen perspektivischen Projektion auf der Grundlage von vier Testpunkten pflanzt sich der Fehler linear fort (dreieckige Symbole), mit Faktor 1 für den mittleren, bzw. Faktor 2 für den Maximalfehler.

Für die Untersuchung der Fitgenauigkeit einer starren Abbildung wurde weiterhin mit einer Ähnlichkeitsabbildung gearbeitet – die Ergebnisse waren sehr ähnlich, aber sind so allgemeiner nutzbar. Hier liegen die Testpunkte zunächst auf einem Kreis mit Durchmesser D (dimensionslos) und die Dummpunkte gleichverteilt darin. Die Testpunkte wurden wiederum mit einer kleinen Störung ϵ versehen, die im Verhältnis zu D der Praxis angemessen groß ist. Als wahre Abbildung wurde die Identität gewählt und eine optimierte Abbildung auf Grundlage der gestörten und ungestörten Testpunkte gefunden. Die Abweichungen der damit transformierten Dummpunkte von ihren ursprünglichen Positionen wurde dann als Fehler δ im Mittel bzw. Maximum betrachtet. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass der Fehler sich linear fortpflanzt (Abbildung 7.17A) – mit annähernd dem Faktor 1 für sein Mittel bei zwei Testpunkten – und anschließend nach dem \sqrt{N} -Gesetz abnimmt (Abbildung 7.17B), also eine Verdoppelung auf vier Testpunkte nur einen Faktor von Wurzel zwei an Verbesserung liefert. Der größte jeweils beobachtete Fehler innerhalb der Dummpunkte ist knapp doppelt so groß.

Eine Erhaltungsgröße ist die relative Lage der Testpunkte – in der Praxis ja feste Positionsmarkierungen auf dem Slide – zueinander. Sie ist entweder aus deren Herstellungsprozess oder von ihrer ersten Messung bekannt, realistischerweise aber auch nur bis auf eine Störung ϵ . [9] verglich ihren paarweisen Abstand zueinander bei einer erneuten Messung jeweils mit dem entsprechenden Wert aus der ersten Messung; ist die Differenz zwischen diesen Werten zu groß, ist die gefundene Abbildung wahrscheinlich fehlerhaft. Hier wird nun eine Abwandlung davon verwendet: Es wird nicht die relative Lage der Testpunkte direkt betrachtet, sondern es werden zunächst die gemessenen Testpunkte mit der gefundenen Abbildung transformiert und erst dann die relative Lage betrachtet. Wenn eine starre Abbildung angepasst wurde, ändert dies nichts an den Abständen. Wenn jedoch eine zusätzlich auch skalierende Ähnlichkeitsabbildung angepasst wurde, kann man durch Transformation in dem Raum arbeiten, in dem die Abstände fest bleiben. Werden in Zukunft nämlich die Markierungen nicht im Laborsystem, sondern direkt in Scanhead-Einheiten erfasst (vgl. Kapitel 8.3), könnte eine veränderliche Skalierung hinzukommen. In jedem Fall ist das Zufallsexperiment nützlich, um zu sehen, wie sich die Störung bei der Testpunktmessung auf den abgeleitete Testpunkt-Distanzfehler (Formel (7.19)) auswirkt.

$$\Theta_{ij} := \|\mathbf{x}_{i, \text{vorher}} - \mathbf{x}_{j, \text{vorher}}\| - \|\mathbf{x}_{i, \text{nachher}} - \mathbf{x}_{j, \text{nachher}}\| \tag{7.19a}$$

Distanzfehler, gemittelt:
$$\frac{N^2 - N}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{i-1} \|\Theta_{ij}\| \tag{b}$$

Distanzfehler, maximaler:
$$\max(\|\Theta_{ij}\|) \tag{c}$$

Es zeigte sich dabei (Abbildung 7.17A), dass bei vier Testpunkten der gemittelte Distanzfehler mit Faktor 1,5 zur Störung der Testpunkte proportional ist und damit in etwa dem größten Fehler der Dummpunkte entspricht. Der maximale Distanzfehler überschätzt die Auswirkung auf die Dummpunkte. Der Distanzfehler ist abhängig von der

Anzahl der Testpunkte (Abbildung 7.17B) und nimmt mit deren Zahl zu. Dies ist nicht überraschend, denn dadurch werden zunehmend viele Punktabstände berücksichtigt, die sich wegen der Betrachtung des Betrags nicht aufheben können. Bei nur zwei Testpunkten ist der mittlere und maximale Distanzfehler einleuchtenderweise identisch; er entspricht dann ungefähr dem mittleren Fehler der Dummypunkte bzw. der Hälfte deren maximalen Fehlers.

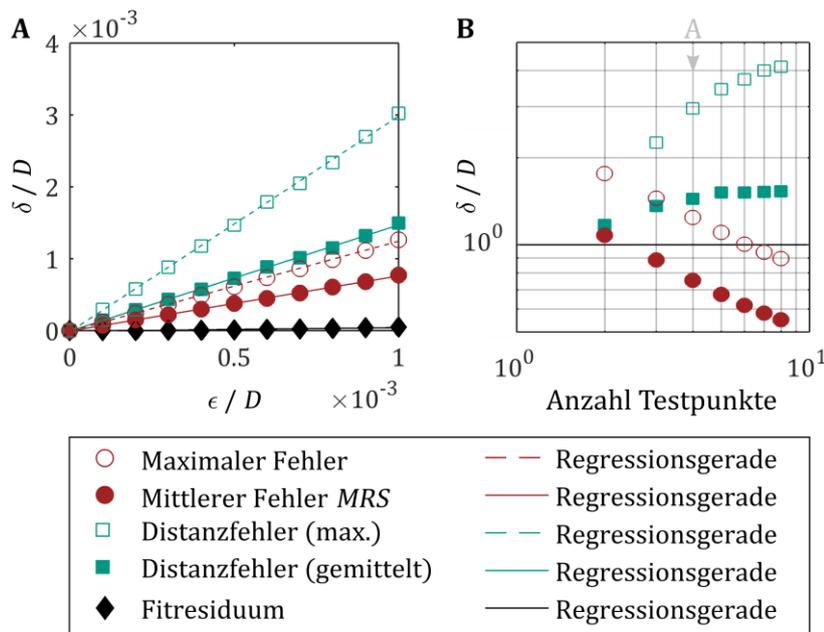


Abbildung 7.17: Skalierungsverhalten verschiedener Fehlermaße. (A) Eine Störung ϵ der Testpunkte führte im numerischen Zufallsexperiment der Anpassung einer Abbildung zu einem Ortsfehler δ von Dummypunkten (runde Symbole), einem kleinen, aber zunehmenden Fit-Residuum (Rauten) der Testpunkte und einem Distanzfehler (Quadrate) beim Vergleich der paarweisen Abstände der Testpunkte vor und nach der Abbildung. (B) Die Proportionalität des Distanzfehlers zur Störung ist davon abhängig, wie viele Testpunkte berücksichtigt werden. Die Ortsfehler der Dummypunkte nehmen mit der Wurzel der Anzahl an Testpunkten ab. In (A) wurden vier Testpunkte eingesetzt.

Die im Verlauf dieses Unterkapitels gestellten Fragen lassen sich also wie folgt quantitativ beantworten:

Bei zwei Testpunkten pflanzt sich bei der Anpassung einer starren oder Ähnlichkeitsabbildung der Fehler der Testpunkte linear mit Faktor 1,1 (gemittelter Fehler), bzw. Faktor 1,75 (größter Fehler) auf die Dummypunkte fort. Unter Berücksichtigung der um vorherigen Unterkapitel aufgestellten strengsten Genauigkeitsanforderung an die Spotpositionen von $20 \mu\text{m}$ müssen die Testpunkte also mit einer Genauigkeit von $11 \mu\text{m}$ oder besser gefunden werden können.

Eine Erhöhung der Zahl der Testpunkte bringt dabei keine wirkliche Erleichterung im Sinne einer neuen Größenordnung, verkompliziert aber den technischen Aufbau. Deshalb seien zwei Testpunkte ausreichend, bzw. die Reduktion auf zwei Testpunkte empfohlen.

Es ist sicherzustellen, dass wirklich keine perspektivische Verzerrung mehr vorliegt, denn sonst wird die Genauigkeitsanforderung zwölf Mal übertroffen, egal wie viele Testpunkte eingesetzt werden.

Die Betrachtung des Distanzfehlers von Positionsmarkierungen erlaubt eine Abschätzung der aufgetretenen Störung; bei zwei Markern skaliert jener mit dem Faktor 1,1 mit dieser. Der Distanzfehler soll also nicht größer sein als $11\ \mu\text{m}$.

7.6 Zusammenfassung

Die Koordinaten der zu übertragenden Spots sind in einem idealen Slidesystem gegeben, dem Scanhead sind aber Koordinaten in einem gerätespezifischen Einheiten- und Bezugssystem mitzuteilen. Scanhead- und Slidesystem sind also gegeneinander zu kalibrieren. Dies führt zu praktischen Fragestellungen:

Näherungsweise führt der Scanhead eine Projektion der Spotpunkte durch, bei genauer Betrachtung treten aber Verzeichnungen auf. Es ist zu ermitteln, wie komplex die Modellierung einer Koordinatentransformation zu wählen ist, um die für die Anwendung nötige Ortsgenauigkeit zu erreichen, aber dabei mit möglichst praktikablen Verfahren zur Anpassung der jeweiligen Transformationsmodelle auszukommen.

In diesem Kapitel wurden verschieden komplexe Modelle für die Abbildung eines Scanheads vorgestellt (Kapitel 7.3) und zur Illustration auf reale Daten angewandt. Die Leistungsfähigkeit der Modelle wurden durch geeignet gewählte Größen quantifiziert, diskutiert und unter Beachtung verschieden strenger Anforderungen jeweils die nötigen Komplexitätsstufen ausgewählt (Kapitel 7.4, insbesondere Tabelle 8). Die Umsetzung der Koordinatentransformation in der Praxis wurde beschrieben, im Vergleich zu Vorarbeiten neu konzipiert und im numerischen Experiment analysiert (Kapitel 7.2 und 7.5).

Mit dem daraus abgeleiteten und empfohlenen Vorgehen (Beschreibung der Transformation durch ein datenbasiertes nichtparametrisches Modell, Reduktion auf zwei Testpunkte) lässt sich durch die mögliche Einsparung des verfahrenbaren Mikroskoptischs im Demonstrator-Aufbau eine Kostenreduktion der Anlage erreichen, und es konnte eine Steigerung der absoluten Ortsgenauigkeit gegenüber früheren Versuchsaufbauten erzielt werden.

8 Erkennung der Werkstückposition

Im Kapitel 7 wurde behandelt, wie man absolute Ortsgenauigkeit erreicht. Die zu bestrahlenden Orte waren dabei in einem idealen Laborsystem gegeben. Die Lage des realen Akzeptorslides in diesem wird über Positionsmarkierungen bestimmt (zu Koordinatentransformationen siehe das vorherige Kapitel); im folgenden Kapitel wird vorgestellt, wie man diese Markierungen besonders zuverlässig gestaltet (Unterkapitel 8.2). In einem Ausblick wird die Machbarkeit einer technischen Lösung gezeigt, bei der die Trennung von realem und idealem Koordinatensystem wegfällt und die Bauraum freigibt (Unterkapitel 8.3).

Die durch die Genauigkeit der Erkennung der Positionsmarkierungen begrenzte relative Ortsgenauigkeit, bzw. Wiederholgenauigkeit des cLIFT-Prozesses ist bei kombinatorischer mehrlagiger Strukturierung von besonderer Bedeutung (Unterkapitel 8.1), da hier die selben Orte auf dem Akzeptorslide in verschiedenen Schritten des Gesamtprozesses mehrfach wieder getroffen werden müssen.

8.1 Motivation

In Vorversuchen zu dieser Arbeit [59] wurde ein mehrlagiges einfaches Peptidarray synthetisiert (Abbildung 8.1). Die Gestalt seiner Spots im Fluoreszenzbild erinnert vom Umriss her an den Mond, und eine begrenzte innere Region weist im Vergleich zum restlichen Spot besonders starke Signalwerte auf. Wie ist eine solche Morphologie zu erklären? Die in jedem Schritt gebundenen Moleküle liegen in einer Oberflächenkonzentration vor, die die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen nicht überschreiten kann, dimensionslos ausgedrückt ($\tilde{c} := c_{\text{gebunden}}/c_{\text{Bindungsstellen}}$) also in einem Intervall von 0 bis 1. Überschüssiges Material kann nicht verwertet werden und unbelegte Bindungsstellen werden in jedem Syntheseschritt gekappt. \tilde{c} kann als Ausbeute interpretiert werden und entspricht in etwa dem Fluoreszenzsignal nach Färbung. Beim Aufbringen einer neuen Lage multiplizieren sich die neuen Werte von \tilde{c} mit den alten. Somit reduzieren sich alle Bereiche des Spots, die nicht gesättigt sind, im Verlauf der Synthese zunehmend (Abbildung 8.2A-D). Tritt in jedem Schritt ein zufälliger Versatz der Spotposition auf, verkleinert sich der gesättigte Bereich des Spots in der Form der gemeinsamen Schnittfläche mehrerer Kreise (Abbildung 8.2E). So entsteht die Mondform. Da die in der Anwendung nutzbare Fläche des Spots sich dabei verkleinert, ist es das Bestreben, in jedem Schritt die selbe Stelle mit möglichst geringer räumlicher Abweichung zu bestrahlen und deshalb die Position des Akzeptorslides möglichst gut zu bestimmen.

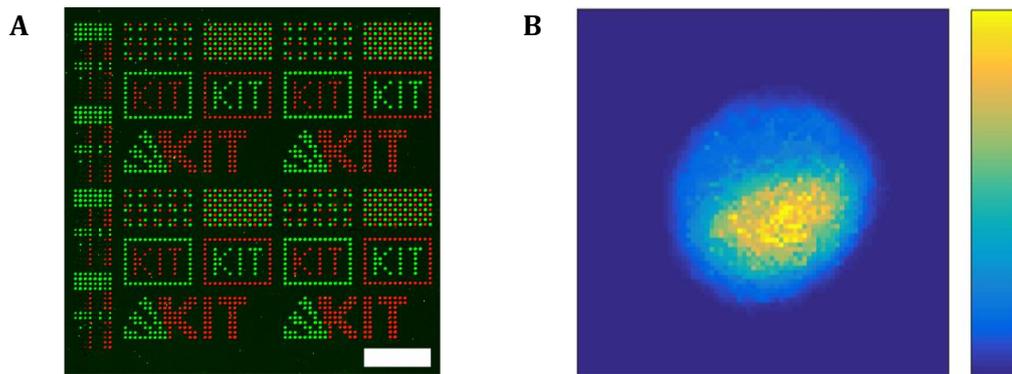


Abbildung 8.1: Mehrlagige Arrays und ihre Spotmorphologie. (A) Fluoreszenzbild eines Arrays von HA- und Flag-Peptiden (aus [78]). Die Länge des Maßbalkens beträgt 1 mm. (B) Ausschnitt aus dem als (A) abgebildeten Array, der einen typischen ‚roten‘ Spot in Falschfarbendarstellung zeigt.

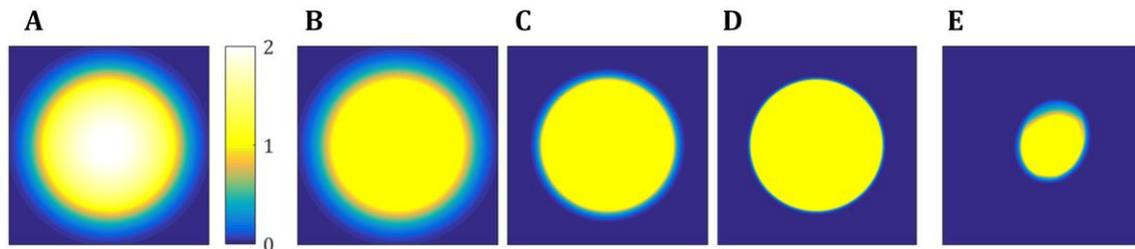


Abbildung 8.2: Simulation der Entstehung der Spotgestalt bei mehrlagiger Synthese. Geht man, auf realen Messungen basierend, von einem unsharp begrenzten Spot aus, der einen Akzeptorslide mehr als sättigen kann (dimensionslose Konzentration > 1) (A), so resultiert in der ersten Lage ein gesättigter, unsharp begrenzter Spot (B). Mit jeder zusätzlichen Anheftung eines solchen Spots multipliziert sich dieses Bild, so dass die ungesättigten Bereiche – (C) zeigt den Stand nach 5, (D) nach 20 Lagen – zunehmend verschwinden und der gesättigte Bereich gegenüber dem Hintergrund immer scharfer begrenzt ist. In (B)-(D) trat kein räumlicher Versatz der Spotposition auf. Schwankt in jeder Lage die Position des neu angehefteten Spots – für die Berechnung von (E) im Mittel mit 25 % des Spotdurchmessers – bleibt als gesättigter Bereich nur die Schnittfläche der gesättigten Bereiche aller Lagen. (E) zeigt einen solchen Spot nach 20 Lagen.

8.2 Robuste Positionsmarkierungen

Da einerseits das Aufbringen von Positionsmarkierungen auf die Akzeptorslides deren Oberflächenfunktionalisierung nicht beschädigen darf, andererseits die Slides im Laufe der Peptidsynthese mit korrosiven Chemikalien in Berührung kommen, ist ein Aufdampfen von metallischen Markern und ein Bedrucken oder Bekleben nicht möglich. Stattdessen werden topographische Marker durch Ablation mit einem Nanosekundenlaser (MATRIX 532-7-30, Coherent) in der Slideoberfläche erzeugt [9] (Abbildung 8.3A). Bei unerfahrenen Operateuren kann es dabei zu Abplatzungen des Glassubstrates kommen.

In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe [9] wurden als Positionsmarkierungen jeweils 5×5 Kreise eingesetzt. Die Einzelkreise wurden dabei von der Steuerungssoftware in einem binären Bild als zusammenhängende Pixelregionen erkannt und der eigentliche Marker als Schwerpunkt dieser Einzelkreise berechnet.

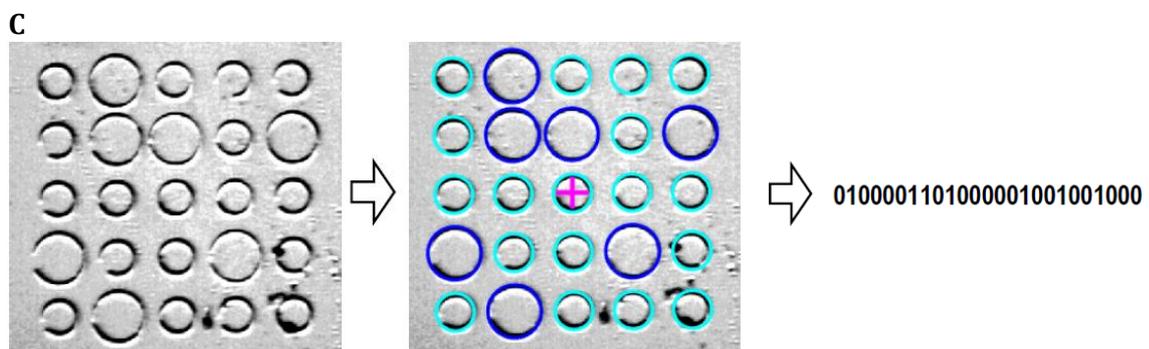
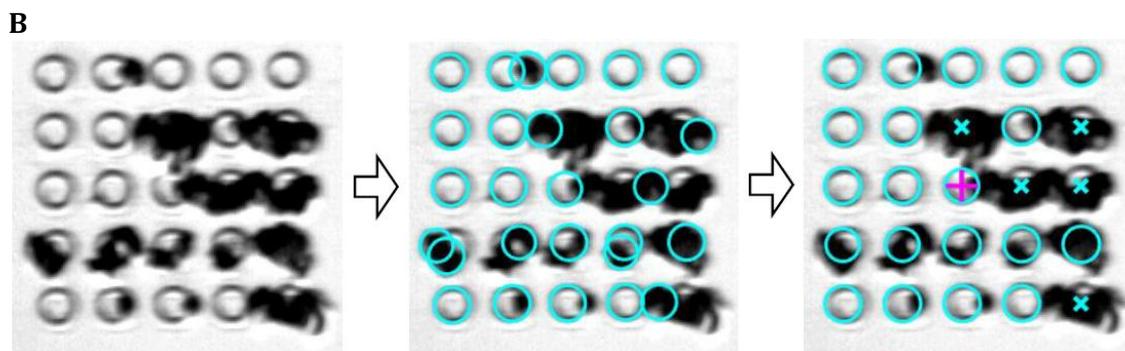
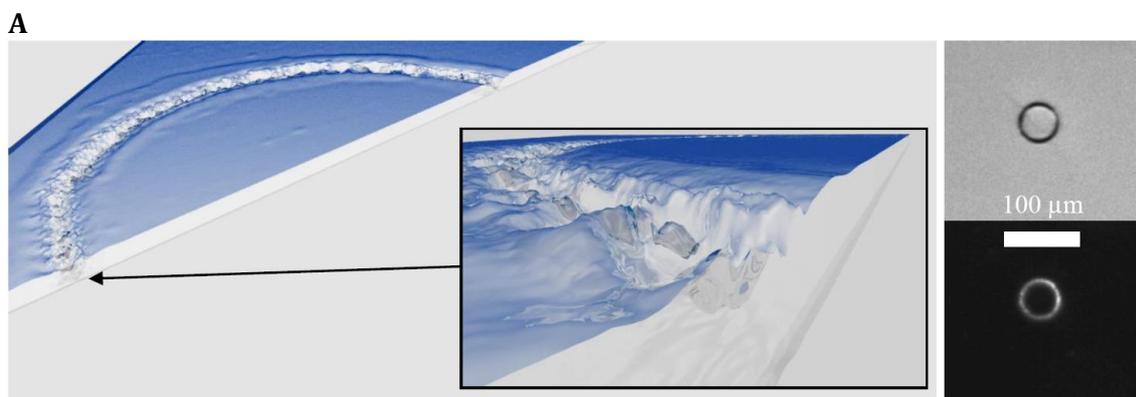
Es war bei jener Methode zwingend notwendig, dass genau die und nur die 25 Einzelkreise im Bild erkannt wurden. Bei verschmutzten oder beschädigten Slides oder unzureichender Beleuchtung war das nicht immer der Fall. Deshalb wurde nun in der Steuerungssoftware dieser Arbeit ein manueller Modus implementiert, bei dem der Benutzer direkt durch Anklicken im Mikroskopbild die Position des Markers eingeben kann. Bei Verwendung eines Kreises als Marker kann durch Anklicken mehrerer Punkte auf dessen Umfang und folgender automatischer Mittelpunktberechnung eine erhöhte Genauigkeit erreicht werden. Außerdem wurde aufbauend auf den Vorarbeiten, zunächst im Rahmen einer vom Verfasser betreuten studentischen Abschlussarbeit [113], ein robusterer Algorithmus für die automatische Erkennung der Positionsmarkierungen entwickelt und getestet [114].

Es wurden weiterhin Kreise als Markierung verwendet, da ihre Form sie von anderen Bildelementen gut unterscheidbar macht (vgl. z.B. [115]). Beispielsweise sieht der SMEMA 3-Standard („*Surface Mount Equipment Manufacturers Association*“, IPC SMEMA Council) vor, dass Leiterplatten bei der Herstellung und Bestückung mindestens 1 mm große Kreise als Passermarken beinhalten. Der Aufbau eines komplexeren Markierungsmusters aus den Einzelkreisen scheint weiterhin sinnvoll, sein Nutzen wird hier experimentell untersucht werden.

Die Einzelkreise können, auch wenn Teile beschädigt sind, mit der sog. *circular Hough transform* erkannt werden. Dabei wird für jeden Kantenpunkt im Bild berechnet, wo der Mittelpunkt eines Kreises läge, wenn der Kantenpunkt Teil dieses Kreises wäre (diese Mittelpunkte liegen auf einem Kreis um den Kantenpunkt). Die potentiellen Mittelpunkte, die sich für jeweils eine hinreichend hohe Zahl an Kantenpunkten ergäben, werden dann als tatsächliche Mittelpunkte angesehen (für eine weitergehende Erläuterung des Verfahrens siehe beispielsweise [116]). Die *circular Hough transform* ist in MATLAB in der *image processing toolbox* als Funktion `imfindcircles` enthalten. Man beachte, dass im Gegensatz zur Erkennung der Kreise über zusammenhängende Pixelregionen dabei zwei Kreise, die im Bild verbunden erscheinen, immer noch getrennt erkannt werden können.

Mit der verbesserten Form der Kreiserkennung werden nun auch beschädigte Kreise erkannt (Abbildung 8.3B). Natürlich können dabei dennoch Kreise ‚übersehen‘ werden und die Fähigkeit zur Rekonstruktion hat den Preis, dass auch vermeintliche Kreise fälschlich erkannt werden. Deshalb werden die erkannten Einzelkreise mit dem bekannten erwarteten Muster der Einzelkreise verglichen. Es wird dazu im *iterative closest point*-Vorgehen über *nearest neighbor matching* ermittelt, welche gefundene Punkten welchen erwarteten Kreismittelpunkten entsprechen: Den erwarteten Punkten wird jeweils der nächste Nachbar unter den gefundenen Punkten als Partner zugeordnet, sofern einer in der näheren Umgebung vorhanden ist. Aufgrund dieser Partnerschaft wird dann

berechnet, wie das erwartete Muster auf dem Bild bewegt werden muss, um möglichst mit dem gefundenen Muster übereinzustimmen. Nach dieser Bewegung werden erneut Punktpartner bestimmt. Die Bewegungen und Bestimmungen der Partner werden so lange wiederholt, bis Konvergenz eintritt. Dann ist anzunehmen, dass die korrekten Partner gefunden worden sind. Als Einzelkreise zur Berechnung der Gesamtposition werden dann zum einen die gefundenen Kreise herangezogen, die jeweils einem erwarteten Einzelkreis zugeordnet werden konnten, und zum anderen ersatzweise die erwarteten Einzelkreise, für die kein gefundener Kreis vorhanden war. Die Gesamtposition ist der Schwerpunkt der Einzelkreise des so rekonstruierten Musters.



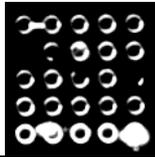
Quelle: MikroSystemTechnik Kongress 2015, 26.-28.10.2015 in Karlsruhe, VDE VERLAG, Berlin, Offenbach, 2015. Abdruck mit freundlicher Genehmigung

Abbildung 8.3: Robuste Erkennung von aus Einzelkreisen zusammengesetzten Positionsmarkierungen. Aus [114]. (A) Durch Laserablation wurden kreisförmige Markierungen in die Glassubstrate geschrieben; links: 3D-Visualisierung von Messdaten der Topographie, rechts: Lichtmikroskopbilder der Kreise in Hell- und Dunkelfeld-Beleuchtung. Der Durchmesser der Kreise beträgt $50\ \mu\text{m}$, die Breite der Kreislinie etwa $3\ \mu\text{m}$ und ihre Tiefe ungefähr $1\ \mu\text{m}$. (B) Einzelkreise können zu einem komplexeren Muster zusammengestellt werden (erstes Bild). Die Einzelkreise werden von der Erkennungssoftware mit der *circular Hough transform* gefunden. Dabei können auch beschädigte Kreise erkannt werden (zweites Bild), aber es werden auch Strukturen fälschlich als Kreis identifiziert. Durch einen Vergleich mit dem erwarteten Muster (drittes Bild, cyanfarbene Kreise) können nicht erkannte Einzelkreise rekonstruiert werden (cyanfarbene x-Symbole) und aus diesen und den zuordenbaren gefundenen Kreisen, oder dem gesamten rekonstruierten Muster die eigentliche Positionsmarkierung als der Schwerpunkt (magentafarbenes Plus) berechnet werden. (C) Wenn Einzelkreise verschiedener Größen zu einer komplexen Positionsmarkierung zusammengestellt werden (erstes Bild), und die jeweiligen Radien aus dem Bild ermittelt werden (zweites Bild, als blaue und cyanfarbene Kreise dargestellt; das magentafarbene Plus ist der Schwerpunkt der Kreismittelpunkte, der unabhängig von den Radien ist), dann kann man so zusätzlich und unabhängig eine Identifikationsnummer in die Positionsmarkierung kodieren (drittes Bild).

Über die Größe der Einzelkreise lässt sich in die Positionsmarkierung auch eine Identifikationsnummer kodieren (Abbildung 8.3C). Dies könnte der automatisierten Prozessdokumentation dienen, oder auch eine zusätzliche Überprüfung darstellen, ob das Markierungsmuster korrekt rekonstruiert worden ist (vergleiche [117]).

In einer experimentellen Messreihe wurden verschieden zusammengestellte Markierungsmuster eingesetzt und die Genauigkeit ihrer Positionsbestimmung ermittelt. Die markierten Slides wurden mit einem Mikroskoptisch über einer festen Kamera bewegt (siehe [9]). Die Markierungsposition wurde bestimmt und bis zur Konvergenz iterativ versucht, die Markierung im Kamerabild zu zentrieren. Dieses wurde für den selben Slide mehrfach wiederholt. Der Startpunkt wurde dabei jedes Mal zufällig versetzt. Der Endpunkt muss der selbe sein, da sich das Muster nicht verändert. Die Streuung des Endpunkts ($\sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}$, wobei σ die Standardabweichung ist) gibt also die Genauigkeit der Positionsbestimmung an. Das Ergebnis (Tabelle 9, nach dem Poster zu [114]) war, dass bereits ein einzelner Kreis als Markierungsmuster eine genügende Genauigkeit ermöglicht. Die Kombination mehrere Kreise erhöht die Genauigkeit weiter. Durch die robuste Gestaltung des Algorithmus wird selbst ein stark beschädigtes Muster noch genügend genau erkannt. In Zukunft könnte eine weniger regelmäßige Anordnung der Einzelkreise die Zuordnung zwischen gefundenem und erwartetem Muster erleichtern.

Tabelle 9: Quantitativer Vergleich der Genauigkeit verschiedener Positionsmarkierungen

Anforderung (aus Kapitel 7.5)	Pixel- Auflösung	Genauigkeit Mikroskop- tisch	1 kleiner Kreis (50 μm)	1 großer Kreis (500 μm)	5 \times 5 kleine Kreise	beschädigtes Muster 
11 μm	2,5 μm	<1 μm	1,6 μm	1,1 μm	0,7 μm	2,5 μm

Grundlage waren pro untersuchtem Muster 100 Datenpunkte.

8.3 Ausblick

Ein hardwareseitig ganz anderer Ansatz ist es, den Scanhead in die Bildgebung einzubeziehen. Dies hat den Vorteil, dass das Scanhead-Koordinatensystem selbst in Bezug zu den Markierungen und somit den Koordinaten auf dem realen Slide gesetzt wird, und damit der Zwischenschritt einer Kalibrierung des Scanheads bezüglich einer virtuellen, idealen Laborebene entfallen kann.

Der Hersteller des Scanheads (SCANLAB) bietet einen Adapter an, mit dem eine Kamera vor dem Eingang des Scanheads in den Strahlengang eingekoppelt werden kann [118]. Die Kamera blickt dann immer in die gleiche Richtung, in die die Spiegel des Scanheads den Laserstrahl ablenken. Hierbei müsste als Kalibrierung die Lage des Laserfokus im Kamerabild ermittelt werden.

Hier wurde aber ein anderer Weg gewählt: Nach dem Prinzip eines *laser scanning microscope*, oder auch des Rasterelektronenmikroskops, wurden der Scanhead und der Laserstrahl als steuerbare punktuelle Lichtquelle benutzt und das von Markierungen auf dem Slide gestreute Licht des ‚Abtaststrahls‘ von einem Sensor eingesammelt. Abbildung 8.4 zeigt die Werkstückhalterung aus Sicht des Scanheads; man beachte, dass der eigentliche Sensor im Bild wie die Lichtquelle erscheint und die Position der ‚Kamera‘, die das Bild aufgenommen hat, eigentlich der Ursprung der Beleuchtung ist.

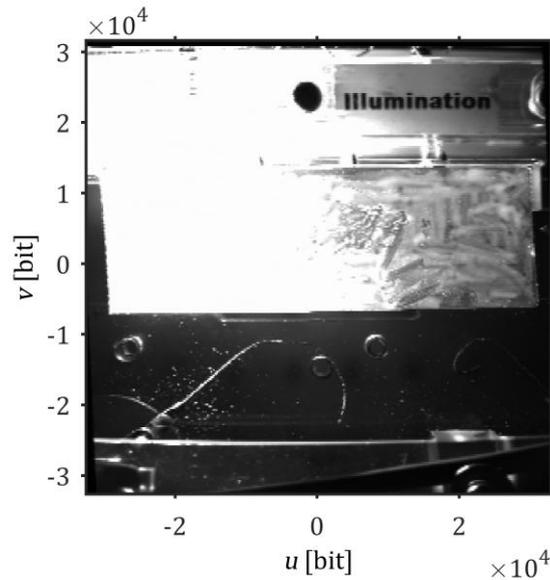


Abbildung 8.4: Das Lasersystem als Scanning-Laser-Mikroskop. Die Abbildung wurde rasternd aufgenommen, wobei der abgelenkte Laserstrahl die Beleuchtung darstellte und an der im Bild hellsten Stelle eine Photodiode als Sensor angebracht war. Sie zeigt die Werkstückhalterung des cLIFT-Aufbaus aus ‚Sicht‘ des Scanheads. (Die Beschriftung ‚Illumination‘ ist nicht auf diese Messung bezogen, sondern auf die Lage der Beleuchtung für die Betrachtung mit einer Mikroskopkamera)

Zur Erprobung dieses Wegs wurde im Rahmen einer vom Verfasser betreuten studentischen Arbeit [119] ein *low cost*-Messsystem aufgebaut. Es wurden gewöhnliche Photodioden (SFH 229, Osram Opto Semiconductors) in der Slideebene angebracht, deren Stromsignal mit einem als Transimpedanzverstärker geschaltetem Operationsverstärker in ein Spannungssignal gewandelt und von einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert. Für diese beiden Funktionen wurden diskrete elektronische Bauelemente benutzt (LM258NG, bzw. MCP4922-E/P). Zur Messwerterfassung wurde ein *Raspberry Pi 3 Model B*-Einplattencomputer verwendet. Dieser wurde per Ethernet mit dem Computer der Anlagensteuerung verbunden und über Python-Skripte über eine *Secure Shell (SSH)*-Verbindung von Matlab aus gesteuert. Da das verbaute Modell des Scanheads keine Auslese der Spiegelpositionen in Echtzeit erlaubt, wurde parallel zum Photodiodensignal das Modulationssignal des Lasers erfasst. Nach Erfassung der Messdaten wurden diese von dem Raspberry-Board auf den Computer übertragen. Das Bildfeld wurde während der Messungen linienweise vom Laserstrahl überstrichen und dieser zwischen den Linien dunkel geschaltet. Deshalb lässt sich das Modulationssignal verwenden, um auf die Spiegelposition zu schließen. Dazu wurden anhand der Lasersteuerungsbefehle und der Latenzeinstellungen des Spiegelsystems die theoretisch zu erwartenden zeitlichen Verläufe des Modulationssignals und der Spiegelpositionen konstruiert. Über die Maximierung der Kreuzkorrelation zwischen gemessenem und vorhergesagtem Modulationssignal erfolgte die zeitliche Zuordnung von gemessenem Modulationssignal und erwarteter Spiegelposition, und damit die von erwartete Spiegelposition und Photodiodensignal. Daraus kann das aufgenommene Bild rekonstruiert werden. Abbildung

8.5 zeigt die so abgebildete Seriennummer eines Akzeptorslides (auf dessen Rückseite) mit klar erkennbaren Ziffern. Man beachte, dass die Tiefenschärfe bei diesem Abbildungsverfahren hoch ist – das ist bei Slides mit Vorder- und Rückseite und Übereinanderlegen von Slides von Vorteil –, da der Laserstrahl eine nur geringe Divergenz hat.

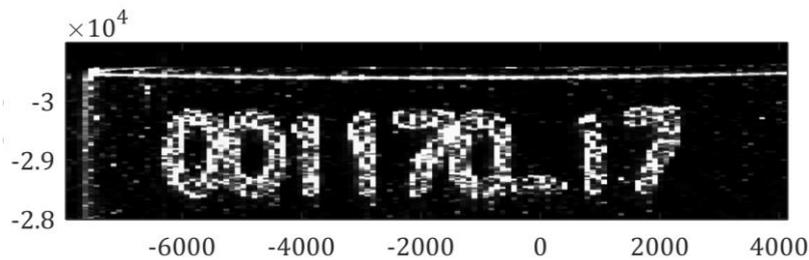


Abbildung 8.5: Seriennummer eines Slides, bildgebend abgetastet mit dem Lasersystem. Die Achsen sind in Scanhead-Längeneinheiten ‚bit‘ beschriftet; ungefähr 800 bit entsprechen 1 mm.

Die Auflösung entlang der Abtastlinien ist durch die Breite des Laserstrahls beschränkt, die Auflösung senkrecht dazu durch den verfügbaren Datenspeicher und die zur Verfügung stehende Zeit. Hohe Strahlgeschwindigkeiten führen an den Endpunkten zu Abweichungen vom als linear erwarteten Verlauf der Spiegelpositionen. Typisch für die aufgenommenen Bilder ist eine unterschiedliche Auflösung entlang der Bildachsen. Die Positionsmarkierungen sollten deshalb eher aus verschiedenen langgezogenen Linien als aus kompakten Kreisen wie im vorherigen Unterkapitel bestehen. Aus einem eindimensionalen Schnitt mit dem Abtaststrahl durch ein einzelnes Fächer-Muster (etwa die linke Hälfte des K im KIT-Logo) könnte bereits auf dessen Lage geschlossen werden; numerische Zufallsexperimente hierzu zeigten jedoch, dass dies für die Extrapolation auf die Lage des kompletten Slides zu anfällig gegenüber Störungen bzw. Messfehlern der Schnittpunkte von Strahl und Fächer ist. Deshalb wurden weiterhin doch mehrere Positionsmarkierungen verwendet, die in ihrer Gesamtheit die Lageerkennung gestatten und deshalb jeweils einfach gestaltet werden können: Mit einem Gravierstift wurde die Oberfläche des Glassubstrats angeritzt (Abbildung 8.6A). Aus den Bildern dieser Markierungen wurden keine *features*, also markante Punkte oder abstrakte Größen wie ein Kreismittelpunkt abgeleitet, sondern das Bild als Ganzes im Sinne einer Rastergraphik wurde als Marker benutzt: Bei der ersten Benutzung eines Slides werden die Rastergraphiken der Markierungen und ihre Ortsinformationen gespeichert. Man bemerke, dass die Ortsinformationen der Marker eines realen Slides im Scanhead-Koordinatensystem vorliegen, ohne dass ein virtuelles Laborsystem zwischengeschaltet werden musste. Bei der nächsten Benutzung werden erneut Bilder der Markierungen aufgenommen und der Versatz dieser neuen Rastergraphiken gegenüber den gespeicherten ursprünglichen Rastergraphiken bestimmt. So erhält man die Veränderung der Orte der Marker und kann die nötige Korrektur der Koordinaten berechnen. Die Bestimmung des Versatzes zwischen zwei Rastergraphiken nennt man ‚*image registration*‘ und ist ein Grundproblem des Maschinellen Sehens. In Matlab lässt sich die

Transformation zwischen zwei Bildern durch die in der *image processing toolbox* enthaltene Funktion `imregtform` bestimmen. Es zeigte sich allerdings, dass deren Güte bei Anwendung auf die hier gewonnenen Bilder nicht immer ausreichend ist. Vermutlich liegt das daran, dass diese Bilder eher binär sind als dass sie kontinuierliche Graustufen aufweisen. Das Auffinden oder Implementieren einer geeigneteren Funktion für die Bildregistrierung ist also eine wichtige Aufgabe für die Zukunft.

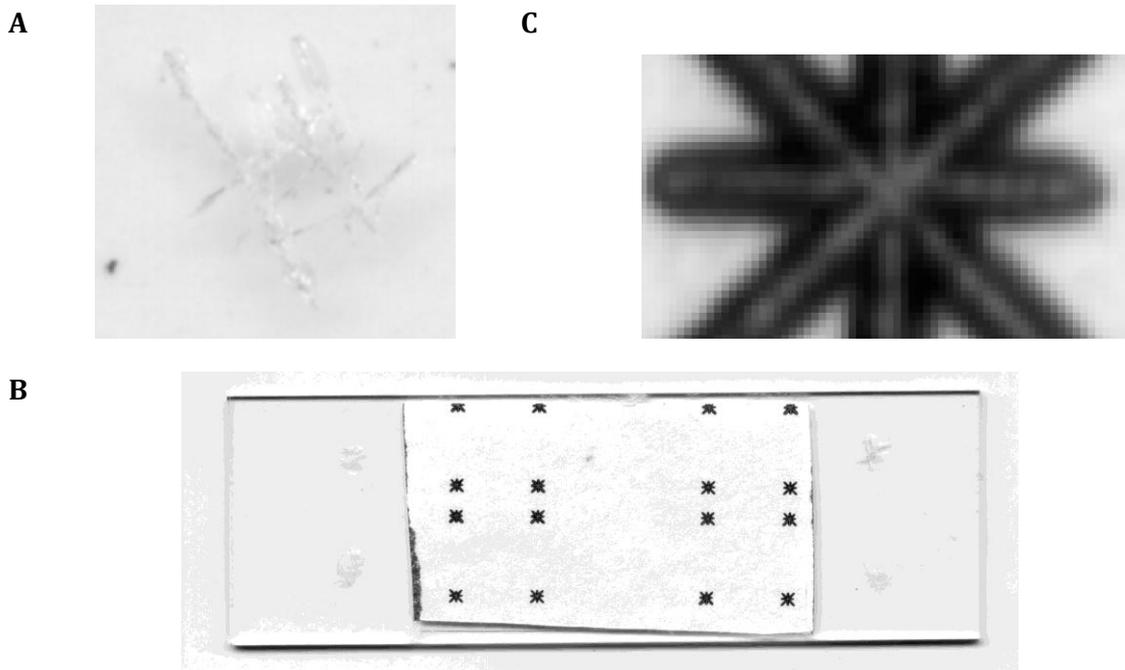


Abbildung 8.6: Test der Positionserkennung des bildgebenden Scanheadsystems. (A) Mit einem Gravurstift wurden beliebige Positionsmarkierungen in ein Glassubstrat eingeritzt. Die Größe des Glasslides (B) ist 76 mm × 26 mm. Die Ausschnitte (A) und (C) aus (B) sind jeweils von der Position unten rechts genommen. Die Positionsmarkierungen wurden zwei Mal erfasst und der Slide dazwischen nicht bewegt. Nach jeder Erfassung wurden Testsymbole in ein aufgeklebtes Thermoetikett gebrannt. Sie liegen gut übereinander (Plus- und x-Symbole). (C) zeigt einen Ausschnitt mit 1200 DPI Bildauflösung (aufgenommen mit dem Dokumentenscanner Perfection 1607, Epson).

Es wurde demonstriert, dass mit dem Scanheadsysteem Positionserkennung und Koordinatenkorrektur möglich ist: Vier in ein Glasslide eingeritzte Positionsmarkierungen (Abbildung 8.6A) wurden abgetastet und gespeichert und Testsymbole wurden in ein aufgeklebtes Thermoetikett gebrannt. Dann wurden der Slide *nicht* bewegt und die Markierungen erneut abgetastet und der Versatz ihrer Bilder zu den bereits gespeicherten Bildern ermittelt. Erneut wurden Testsymbole auf des Etikett übertragen, wobei deren Orte der ermittelten Koordinatenkorrektur entsprechend neu berechnet wurden. Da der Slide nicht bewegt worden war, sollte in Wahrheit keine Korrektur erfolgen. In der Tat liegen die Symbole (Plus- und x-Symbole) übereinander (Abbildung 8.6A und B) – mit einer Ungenauigkeit von <math>< 50 \mu\text{m}</math>.

Der Ansatz des ‚Abtaststrahls‘ bzw. *scanning microscope* hat sich damit als so vielversprechend erwiesen, dass dieser in Zukunft mit verbesserter Hardware und dem Problem angepassterer Bildverarbeitungssoftware weiter verfolgt werden sollte. Die Vorteile sind, dass Scanhead- und Slidesystem direkt miteinander in Beziehung gebracht werden, und dass keine weiteren Kameras benötigt werden, die Bauraum beanspruchen, der dann beispielsweise für Werkstückwechselsysteme genutzt werden kann. Mit geeigneten Filtern und einem empfindlichen Photodetektor könnten auch direkt Fluoreszenzsignale erfasst werden; in der ersten Lage eines zu strukturierenden Arrays würden dann mit dem cLIFT-Prozess Spots aus einem fluoreszenten Material übertragen und angekuppelt werden, die in den folgenden Lagen als fluoreszierende Positionsmarkierungen dienen.

9 cLIFT zur verallgemeinerten kombinatorischen Synthese

In der kombinatorischen Synthese von Peptidarrays werden jeweils zusätzliche Bausteine an einen bereits auf dem Substrat vorhandenen Bausteinverbund angekuppelt. Eine allgemeinere Kombinatorik wäre es, wenn der anzukuppelnde Baustein aus weiteren, unverbundenen und getrennt übertragenen Unter-Bausteinen bestünde, die sich erst nach dem Übertrag vereinen und an das Vorhandene ankuppeln. Diese weitere Dimension von Kombinationsmöglichkeiten stellt eine neuartige experimentelle Herangehensweise dar und ermöglicht die Parallelisierung einer Vielzahl chemischer Experimente im Arrayformat.

Im Folgenden werden beispielhaft ein solches Experiment demonstriert (Unterkapitel 9.1) und Topographiemessungen zu geschichteten Spots vorgestellt (Unterkapitel 9.2).

9.1 In-situ-Aktivierung von Aminosäuren als Beispiel

Als *proof-of-principle* (Abbildung 9.1) und Anwendungsbeispiel für dieses Konzept wurde ein unaktivierter Aminosäurebaustein (Fmoc-Gly-OH – in der Abbildung als „Unter-Baustein A“ blau dargestellt) getrennt von Aktivierungssubstanzen (DIC: N,N'-Diisopropylcarbodiimid und als Razemisierungsunterdrücker HOBt: Hydroxybenzotriazol – in der Abbildung zusammen als „Unter-Baustein B“ rot dargestellt) auf einen Akzeptorslide übertragen. Alleine zeigen sie kein Fluoreszenzsignal (erstes und zweites Fluoreszenzbild in der Abbildung), da sie nicht an die Akzeptoroberfläche kuppeln und deshalb im Färbungsschritt kaum mehr vorhanden waren. Zusammen jedoch reagieren sie (die beiden „Unter-Bausteine“) im Ofen-Schritt des cLIFT-Prozesses miteinander und mit der Oberfläche, so dass diese Spots ein deutliches Fluoreszenzsignal (drittes Bild in der Abbildung) ergeben.

Darauf aufbauend werden die chemischen Aspekte der verallgemeinerten Synthese und weitere Anwendungsdemonstrationen derzeit in der Arbeitsgruppe in einem anderen Promotionsprojekt behandelt [77]. Die technische Frage, die sich nun stellt, ist, wie das in der Abbildung skizzierte ‚Stapeln‘ von Materialportionen mit cLIFT in der Praxis möglich und kontrollierbar ist. Dies wird im nächsten Unterkapitel untersucht.

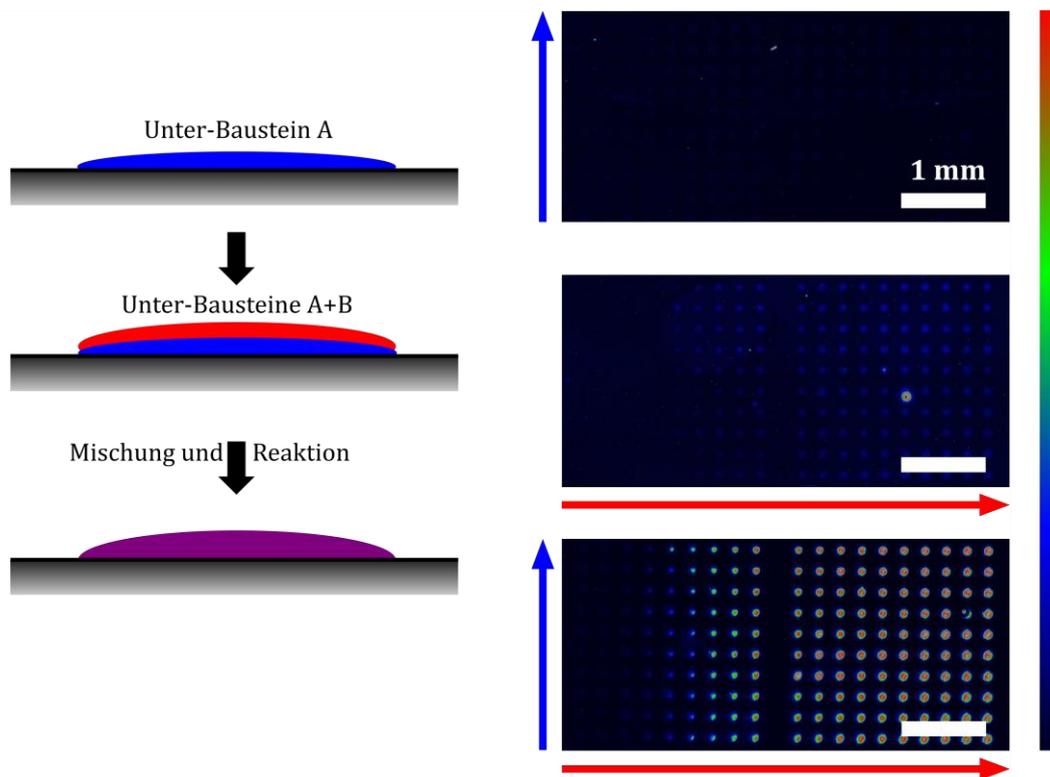


Abbildung 9.1: Machbarkeitsdemonstration verallgemeinerter kombinatorischer Synthese. Adaptiert aus [78]. Links: Schema. Rechts: Fluoreszenzbilder, Länge des Maßbalkens 1 mm. Unter-Baustein A alleine ergibt keine Fluoreszenzsignale (erstes Bild) und Unter-Baustein B alleine kaum ein Signal (zweites Bild). Erst wenn beide kombiniert werden, reagieren können und an den Akzeptorslide anheften, sind ihre Spots stark anfärbbar (drittes Bild). Es ist dann ein Gradient der Intensität entlang der zunehmenden Menge an übertragenem Material (vgl. Abbildung 9.3), gesteuert durch die Bestrahlungsdauer (Pfeile), zu erkennen.

9.2 Ortsaufgelöste vertikale Nanostrukturierung

Die verallgemeinerte kombinatorische Synthese verlangt es, dass mehrere Materialportionen mit cLIFT übereinander platziert werden. In der Tat ist dies möglich; Abbildung 9.2 zeigt, wie ein der Skizze in Abbildung 9.1 ähnlicher Schichtaufbau in der Realität aussieht. Zur Erzielung von so hohen Spots kann ein Donorslide allerdings (im Gegensatz zu Kapitel 6.2) nur einmal verwendet werden; danach kann von der selben Stelle nicht mehr ähnlich viel Material übertragen werden. Dies ist zu beachten, falls von in Zukunft verwendeten Bausteinen größere Stoffmengen übertragen werden sollen, als das bisher der Fall war.

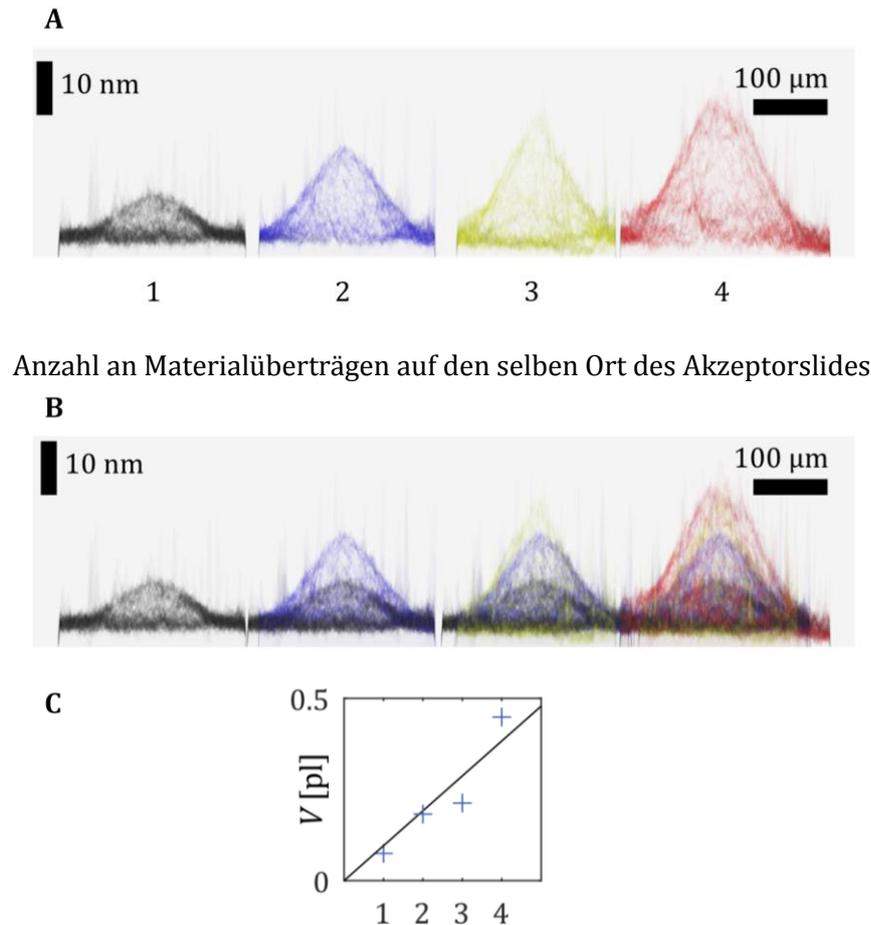


Abbildung 9.2: Höhenprofile nach mehrfachem Übertrag auf die selbe Stelle. Adaptiert von [120]. Gezeigt ist eine Visualisierung von Höhendaten, von der Seite gesehen. (A) Auf den selben Ort auf dem Akzeptorslide wurde ein bis vier Mal Material von einem Donorslide mit in dieser Arbeit üblicherweise verwendetem Aufbau (vgl. Einleitungskapitel) übertragen. (B) Überlagerung der gemessenen Höhenprofile. (C) Volumen der Materialportionen aus (A), durch Integration der Höhendaten bestimmt. Die durchgezogene Linie ist eine Regressionsgerade durch den Ursprung.

Über mehrfachen Übertrag lässt sich also das gesamte übertragene Materialvolumen einstellen. Im Sinne der verallgemeinerten Kombinatorik können die Bausteine also in jeweils wählbarer Menge zusammenfügen. Auch bei einfachem Übertrag kann man über die Laserstärke, beispielsweise die Bestrahlungsdauer, qualitativ steuern (die absoluten Werte variieren von Donorslide zu Donorslide), wie viel Material übertragen wird (Abbildung 9.3). Somit kann man eine vertikale Strukturierung – im Nano-Maßstab – von Oberflächen mit recht beliebigen Materialien vornehmen. Um dies zu demonstrieren, wurde im Rahmen eines vom Verfasser betreuten studentischen Praktikums [69] ein Graustufenbild als Höhenkarte benutzt und im Halbtonverfahren einem Spotraster passende Bestrahlungsstärken pro Spot zugewiesen. Das Oberflächenprofil des Resultats entspricht der Erwartung (Abbildung 9.4). Man beachte hierbei, dass sich die Oberflächen im Millimeter-Maßstab vertikal nanostrukturieren lassen, mit einer Ortsauflösung im

Bereich von Hunderten Mikrometern. Durch das Rasterverfahren weist die Oberfläche eine gewisse Rauigkeit auf, aber durch kontinuierliches, nicht-gerastertes Schreiben mit dem Laserstrahl könnte dies in Zukunft verbessert werden.

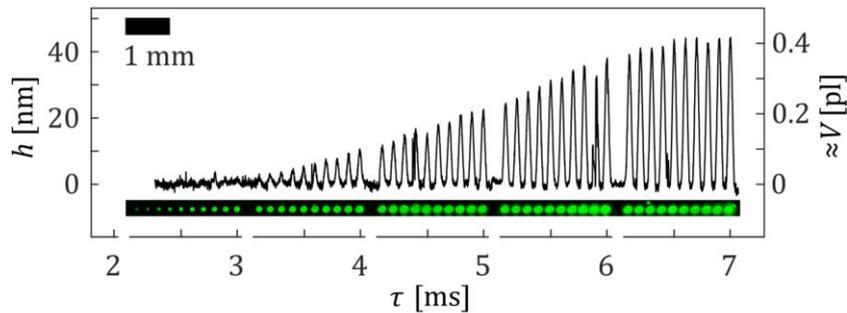


Abbildung 9.3: Steuerung des Höhenprofils eines Spots durch die Bestrahlungsstärke. Nach [78]. Aufgetragen ist die Höhe h bzw. das Volumen V der Materialportionen direkt nach dem Übertrag in Abhängigkeit von der Bestrahlungs-, 'Stärke' (hier variiert durch unterschiedliche Bestrahlungsdauern τ). Zum Vergleich ist ein Fluoreszenzbild gleicher Spots nach den chemischen Prozessschritten eingezeichnet.

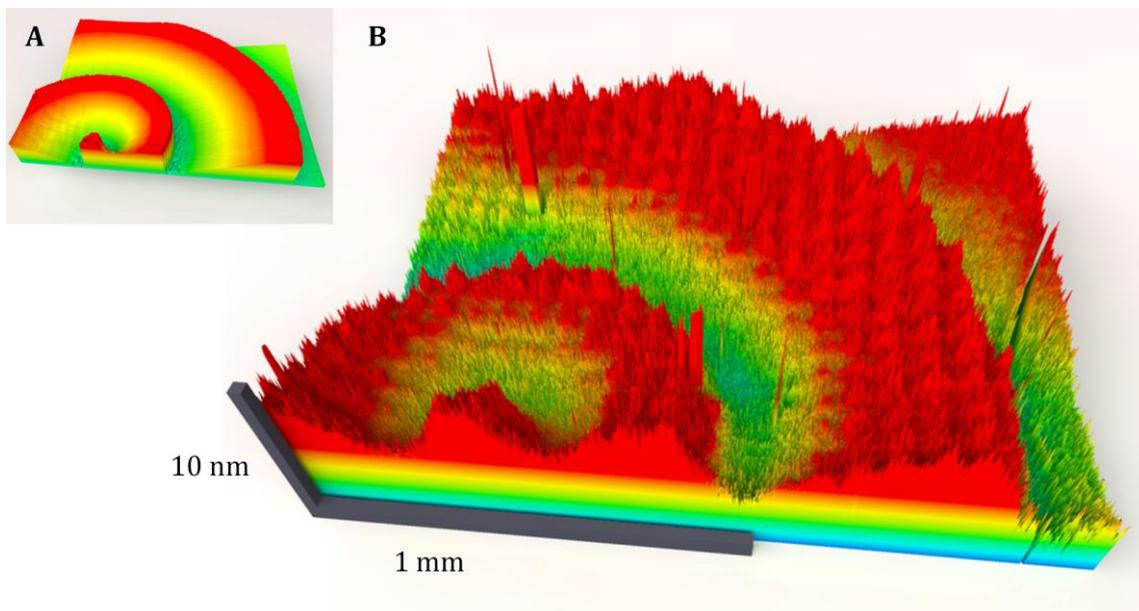


Abbildung 9.4: Vertikale Nanostrukturierung durch cLIFT. (A – Skizze, bzw. Vorgabe) 3D-Höhenkarte der zu erzeugenden Oberflächenstruktur. (B – tatsächliche Messung, bzw. Resultat) Visualisierung der Messdaten der Topographie eines Akzeptorslides nach Materialübertrag. Die Stärke der Bestrahlung war spotweise einer Höhenkarte entsprechend automatisch eingestellt worden. Man beachte das extrem flache Aspektverhältnis.

10 Abschließende Diskussion

Was sind im Lichte der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Stärken und Schwächen von cLIFT als Verfahren zur Herstellung von kombinatorischen Arrays?

Eine Stärke im Vergleich zu den bestehenden Verfahren, die in der Arbeitsgruppe, in der die Dissertation entstanden ist, entwickelt wurden und verwendet werden, ist, dass cLIFT nicht partikelbasiert ist, sondern die Substrate aus dünnen Filmen aufgebaut sind (Abbildung 1.6). Dies vereinfacht die Handhabung im Laboralltag. Zudem werden nur geringe Mengen des zu übertragenden Materials für die Herstellung der Donorslides benötigt, was einen kostengünstigen Einbau von Sonderbausteinen in das Array ermöglicht. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass mit cLIFT nicht nur die Standardaminosäuren der Peptidsynthese (Abbildung 5.17), sondern auch Sonderbausteine (Abbildung 5.20), andere Matrixmaterialien (Abbildung 5.22) und allgemein andere Polymere (Abbildung 5.24) übertragbar sind. Diese Flexibilität bezüglich des Übertragungsmaterials macht die Anwendung von cLIFT in der kombinatorischen Synthese und darüber hinaus möglich. Der Einsatz eines Scanning-Systems ermöglicht bei hinreichender genauer Ansteuerung (Tabelle 8) und Verwendung geeigneter Positionsmarkierungen (Tabelle 9) eine bezogen auf die Spotgröße gute absolute Ortsgenauigkeit. Ein weiterer Vorteil von cLIFT – vornehmlich gegenüber anderen Implementierungen von LIFT – ist, dass nur geringe Mengen an Material übertragen werden; die Höhe der abgelagerten Materialportionen reicht vom Nano- in den Sub-Nanometerbereich (Abbildung 3.4). Dadurch sind die Donorslides erwiesenermaßen (Abbildung 6.5) 20 Mal und mehr wiederverwendbar, was den Herstellungsaufwand in der Praxis erheblich einschränkt. Außerdem lassen sich so im gleichen Syntheseschritt Spots von mehreren Materialien in einstellbarer Menge (Abbildung 9.4) überlagern (Abbildung 9.2), die dann auf dem Array *in situ* reagieren können (Abbildung 9.1); dies eröffnet den Weg zu einer neuartigen Versuchsplattform für verallgemeinerte kombinatorische Experimente im Arrayformat.

Eine Herausforderung stellt dar, dass die Kenngrößen der übertragenen Spots auch bei festen einstellbaren Prozessparametern schwanken, obgleich sie innerhalb eines Experiments einer wohldefinierten Beziehung folgen und reproduzierbar sind (Abbildung 5.4 und Abbildung 5.29). Das wurde in dieser Arbeit systematisch charakterisiert (Abbildung 5.14 und Abbildung 5.19) und daraus eine Strategie zur Wahl des Arbeitspunkts erarbeitet (Abbildung 5.3, Abbildung 5.5 und Tabelle 3), die eine Verwendung von cLIFT in der Praxis gestattet. Die Qualität der Spotgestalt ist durch das Auftreten von ringförmigen Höfen (Abbildung 4.5) eingeschränkt; dies scheint ein grundsätzlich mit dem in dieser Arbeit aufgeklärten Wirkungsmechanismus des cLIFT-Materialübertrags (Abbildung 4.16) verbundenes Phänomen zu sein. Es kann verhindert werden, wenn die Distanz zwischen Donor- und Akzeptorslide möglichst klein ist (Abbildung 4.6); dies und damit auch eine minimierte Spotgröße (Abbildung 4.1) lassen

sich möglicherweise mit einem flexiblen Donor ohne starres Substrat erreichen (Abbildung 5.15). Ein weiterer grundsätzlicher physikalischer Effekt, der Untergrenzen für die Spotgröße sowie – über eine Obergrenze der Laserleistung (Abbildung 5.9) – für die Bestrahlungszeit und damit die Prozessdauer festlegt, ist die Wärmeleitung. Diese setzt dafür im Ausgleich die Anforderungen an das Strahlprofil herab (Abbildung 5.28). Die erreichbare Spotdichte entspricht dem kommerziellen Stand der Technik. Eine Optimierung des Prozesses erfolgt also bezüglich des Aufwands; für den Preis eines eingeschränkteren Prozessfensters kann mit schwächeren, aber potentiell preisgünstigeren Lasern gearbeitet werden (Abbildung 5.13). Zudem wurde gezeigt, dass die Dicke der Materialschicht des Donorslides unerheblich für die Spoteigenschaften ist (Abbildung 5.16); somit besteht auch hier Einsparpotential.

In Zukunft technisch verbessert werden kann cLIFT durch die Slidepositionserkennung mit Laser-Scanning-Bildgebung (aufbauend auf Kapitel 8.3). Die Automatisierung (Kapitel 2.3) sollte weitergeführt werden. Ein Simulationsmodell, das Thermodynamik und Transportphänomene koppelt, könnte ein tieferes Verständnis des Übertragsmechanismus von cLIFT ermöglichen. Ein weitreichender Verbesserungsansatz ist, durch flexible Substrate geringere Distanz zwischen Donor und Akzeptor zu schaffen und damit die Spotqualität zu erhöhen. Möglicherweise kann als Erweiterung dessen eine kontinuierliche Fertigung Rolle-zu-Rolle erfolgen; ein Vorteil wäre ein günstigeres Verhältnis von nutzbarer Oberfläche zum Volumen bei der Lagerung: Im Vergleich zu der Aufbewahrung von 25 Slides in einer Plastikbox ist dieses beispielweise in der Bauweise einer Musikkassette etwa 75 Mal größer; ein so gelagertes Band könnte linear mit Spots im Pitch von $> 4,4$ mm versehen werden und dabei die selbe Dichte an Spots pro Lagervolumen wie Glasslides erreichen. Natürlich treten dann technische Herausforderungen auf; es böte sich allerdings die Chance, die nasschemischen Prozessschritte zu integrieren und dabei das Know-How automatisierter Filmentwicklung aus der Ära der analogen Photographie zu nutzen.

Zusammengefasst beschrieben wurden in dieser Arbeit neuartige Phänomene beobachtet, untersucht und daraus Rückschlüsse für die Praxis gezogen (Kapitel 4), cLIFT und seine Randbedingungen systematisch charakterisiert (Kapitel 5) und in den wissenschaftlichen Kontext gesetzt (Kapitel 1), lösungsorientierte Strategien (Kapitel 5.6) unter Verwendung von Methoden aus verschiedenen Fachgebieten (Kapitel 7) erarbeitet und neue Anwendungsgebiete für cLIFT demonstriert (Kapitel 9) [78], sowie der Versuchsaufbau für Lehrveranstaltungen und gruppeninterne und -externe Kooperationspartner [76][77][81][85] nutzbar gemacht (Kapitel 2).

11 Literaturverzeichnis

- [1] G. C. Barrett und D. T. Elmore, *Amino Acids and Peptides*, Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [2] F. F. Loeffler, J. Pfeil und K. Heiss, „High-Density Peptide Arrays for Malaria Vaccine”, in *Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases*, T. Sunil, Hrsg., New York, Springer Science+Business Media, 2016, S. 569-582.
- [3] L. K. Weber, A. Palermo, J. Kügler, O. Armant, A. Isse, S. Rentschler, T. Jaenisch, J. Hubbuch, S. Dübel, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling und F. F. Loeffler, „Single amino acid fingerprinting of the human antibody repertoire with high density peptide arrays”, *Journal of Immunological Methods*, Bd. 443, S. 45-54, 2017.
- [4] R. Frank, „Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support”, *Tetrahedron*, Bd. 48, Nr. 42, S. 9217-9232, 1992.
- [5] R. B. Merrifield, „Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide”, *Journal of the American Chemical Society*, Bd. 85, Nr. 14, S. 2149-2154, 1963.
- [6] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff und F. Breitling, „Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays with a Laser Printer”, *Angewandte Chemie International Edition*, Bd. 47, S. 7132-7135, 2008.
- [7] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler und F. Breitling, „Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays onto a Microchip”, *Science*, Bd. 318, S. 1888, 2007.
- [8] F. Maerke, F. F. Loeffler, S. Schillo, T. Foertsch, B. Muenster, J. Striffler, C. Schirwitz, F. R. Bischoff, F. Breitling und A. Nesterov-Mueller, „High-Density Peptide Arrays with Combinatorial Laser Fusing”, *Advanced Materials*, Bd. 26, S. 3730-3734, 2014.
- [9] F. Märkle, Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter Peptidarrays, Dissertation, Schriften des Instituts für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Band 24, Karlsruhe: KIT Scientific Publishing, 2014.
- [10] G. Dhimi, B. Tan und K. Venketakrishnan, „Laser induced reverse transfer of gold thin film using femto second laser”, *Optics and Lasers in Engineering*, Bd. 49, S. 866-869, 2011.
- [11] J. Bohandy, B. F. Kim und F. J. Adrian, „Metal deposition from a supported metal

- film using an excimer laser", *Journal of Applied Physics*, Bd. 60, S. 1538-1539, 1986.
- [12] F. J. Adrian, J. Bohandy, B. F. Kim, A. N. Jette und Thompson, „A study of the mechanism of metal deposition by the laser-induced forward transfer process”, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, Bd. 5, S. 1490-1494, 1987.
- [13] Mogyorósi, T. Szörényi, K. Bali, Z. Tóth und I. Hevesi, „Pulsed laser ablative deposition of thin metal films”, *Applied Surface Science*, Bd. 36, S. 157-163, 1989.
- [14] Z. Tóth und T. Szörényi, „Pulsed Laser Processing of Ge/Se Thin Film Structures”, *Applied Physics A*, Bd. 52, S. 273-279, 1991.
- [15] V. Schultze und M. Wagner, „Laser-induced forward transfer of aluminium”, *Applied Surface Science*, Bd. 52, S. 303-309, 1991.
- [16] Z. Kántor, Z. Tóth und T. Szörényi, „Laser Induced Forward Transfer: The Effect of Support-Film Interface and Film-to-Substrate Distance on Transfer”, *Applied Physics A*, Bd. 54, S. 170-175, 1992.
- [17] J. Narayan, N. Biunno, R. Singh, O. W. Holland und O. Auciello, „Formation of thin superconducting films by the laser processing method”, *Applied Physics Letters*, Bd. 51, Nr. 22, S. 1845-1847, 1987.
- [18] M. C. Suh, B. D. Chin, M.-H. Kim, T. M. Kang und S. T. Lee, „Enhanced Luminance of Blue Light-Emitting Polymers by Blending with Hole-Transporting Materials”, *Advanced Materials*, Bd. 15, Nr. 15, S. 1254-1258, 2003.
- [19] S. M. Pimenov, G. A. Shafeev, A. A. Smolin, V. I. Konov und B. K. Vodolaga, „Laser-induced forward transfer of ultra-fine diamond particles for selective deposition of diamond films”, *Applied Surface Science*, Bd. 86, S. 208-121, 1995.
- [20] B. Hopp, T. Smausz, Z. Antal, N. Kresz, Z. Bor und D. Chrisey, „Absorbing film assisted laser induced forward transfer of fungi (*Trichoderma conidia*)”, *Journal of Applied Physics*, Bd. 96, S. 3478-3481, 2004.
- [21] R. Saeidpourazar, R. Li, Y. Li, M. D. Sangid, C. Lü, Y. Huang, J. A. Rogers und M. Ferreira, „Laser-Driven Micro Transfer Placement of Prefabricated Microstructures”, *Journal of Microelectromechanical Systems*, Bd. 21, Nr. 5, S. 1049-1058, 2012.
- [22] J. M. Fernández-Pradas, M. Colina, Serra, J. Domínguez und J. L. Morenza, „Laser-induced forward transfer of biomolecules”, *Thin Solid Films*, Bde. %1 von %2453-454, S. 27-30, 2004.
- [23] N. T. Kattamis, E. Purnick, R. Weiss und C. B. Arnold, „Thick film laser induced forward transfer for deposition of thermally and mechanically sensitive materials”, *Applied Physics Letters*, Bd. 91, 171120, 2007.

- [24] R. Pohl, C. W. Visser, G.-W. Römer, D. Lohse, C. Sun und B. Huis in 't Veld, „Ejection Regimes in Picosecond Laser-Induced Forward Transfer of Metals”, *Physical Review Applied*, Bd. 3, Nr. 2, 024001, 2015.
- [25] T. C. Röder und J. R. Köhler, „Physical model for the laser induced forward transfer process”, *Applied Physics Letters*, Bd. 100, 071603, 2012.
- [26] M. Zenou, A. Sa'ar und Z. Kotler, „Digital laser printing of aluminum micro-structure on thermally sensitive substrates”, *Journal of Physics D: Applied Physics*, Bd. 48, 205303, 2015.
- [27] K. S. Kaur, M. Feinaeugle, D. Banks, J. Y. Ou, F. Di Pietrantonio, E. Verona, C. L. Sones und R. W. Eason, „Laser-induced forward transfer of focussed ion beam pre-machined donors”, *Applied Surface Science*, Bd. 257, 6650–6653, 2011.
- [28] D. Banks, C. Grivas, I. Zergioti und R. W. Eason, „Ballistic laser-assisted solid transfer (BLAST) from a thin film precursor”, *Optics Express*, Bd. 16, Nr. 5, S. 3249-3254, 2008.
- [29] A. Piqué, D. B. Chrisey, R. C. Y. Auyeung, J. Fitz-Gerald, H. D. Wu, R. A. McGill, S. Lakeou, K. Wu, V. Nguyen und M. Duignan, „A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials”, *Applied Physics A*, Bd. 69 [Suppl.], S. 279-284, 1999.
- [30] D. Toet, M. O. Thompson, M. Smith und T. W. Sigmon, „Laser-assisted transfer of silicon by explosive hydrogen release”, *Applied Physics Letters*, Bd. 74, Nr. 15, S. 2170-2172, 1999.
- [31] M. Ehrhardt, A. Wehrmann, Lorenz und K. Zimmer, „Patterning of CIGS thin films induced by rear-side laser ablation of polyimide carrier foil”, *Applied Physics A*, Bd. 113, S. 309-313, 2013.
- [32] M. S. Brown, C. F. Brasz, Y. Ventikos und C. B. Arnold, „Impulsively actuated jets from thin liquid films for high-resolution printing applications”, *Journal of Fluid Mechanics*, Bd. 709, S. 341-370, 2012.
- [33] M. Duocastella, A. Patrascioiu, J. M. Fernández-Pradas, J. L. Morenza und Serra, „Film-free laser forward printing of transparent and weakly absorbing liquids”, *Optics Express*, Bd. 18, Nr. 21, 21815, 2010.
- [34] H. Desrus, B. Chassagne, F. Moizan, R. Devillard, S. Petit, R. Kling und S. Catros, „Effective parameters for film-free femtosecond laser assisted bioprinting”, *Applied Optics*, Bd. 55, Nr. 14, S. 3879-3886, 2016.
- [35] L. Landström, J. Klimstein, G. Schrems, K. Piglmayer und D. Bäuerle, „Single-step patterning and the fabrication of contact masks by laser-induced forward transfer”, *Applied Physics A*, Bd. 78, S. 537-538, 2004.

- [36] H. Gong, Y. Yang, X. Chen, D. Zhao, X. Chen, Y. Chen, M. Yan, Q. Li und M. Qiu, „Gold nanoparticle transfer through photothermal effects in a metamaterial absorber by nanosecond laser”, *Scientific Reports*, Bd. 4, 6080, 2014.
- [37] N. C. Dobes, R. Dhopeswarkar, W. H. Henley, J. M. Ramsey, C. E. Sims und N. L. Allbritton, „Laser-based directed release of array elements for efficient collection into targeted microwells”, *Analyst*, Bd. 138, S. 831-838, 2013.
- [38] S. Mailis, I. Zergioti, G. Koundourakis, A. Ikiades, A. Patentalaki, Papakonstantinou, N. A. Vainos und C. Fotakis, „Etching and printing of diffractive optical microstructures by a femtosecond excimer laser”, *Applied Optics*, Bd. 38, Nr. 11, S. 2301-2308, 1999.
- [39] A. Karaiskou, I. Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki und D. Kafetzopoulos, „Microfabrication of biomaterials by the sub-ps laser-induced forward transfer process”, *Applied Surface Science*, Bde. %1 von %2208-209, S. 245-249, 2009.
- [40] I. Zergioti, A. Karaiskou, D. G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki und D. Kafetzopoulos, „Time resolved schlieren study of sub-picosecond and nanosecond laser transfer of biomaterials”, *Applied Surface Science*, Bd. 247, S. 584-589, 2005.
- [41] Y. Tsuboi, Y. Furuhashi und N. Kitamura, „A sensor for adenosine triphosphate fabricated by laser-induced forward transfer of luciferase onto a poly(dimethylsiloxane) microchip”, *Applied Surface Science*, Bd. 253, S. 8422-8427, 2007.
- [42] S. Grigorescu, M. Hindié, E. Axente, F. Carreiras, K. Anselme, J. Werckmann, I. N. Mihailescu und O. Gallet, „Fabrication of functional fibronectin patterns by nanosecond excimer laser direct write for tissue engineering applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Bd. 24, S. 1809-1821, 2013.
- [43] I. N. Katis, J. A. Holloway, J. Madsen, S. N. Faust, S. D. Garbis, J. S. Smith, D. Voegeli, D. L. Bader, R. W. Eason und C. L. Sones, „Paper-based colorimetric enzyme linked immunosorbent assay fabricated by laser induced forward transfer”, *Biomicrofluidics*, Bd. 8, 036502, 2014.
- [44] C. von Bojnicic-Kninski, V. Bykovskaya, F. Maerke, R. Popov, A. Palermo, D. S. Mattes, L. K. Weber, B. Ridder, T. C. Foertsch, A. Welle, F. Loeffler, F. Breitling und A. Nesterov-Mueller, „Selective Functionalization of Microstructured Surfaces by Laser-Assisted Particle Transfer”, *Advanced Functional Materials*, Bd. 26, S. 7067-7073, 2016.
- [45] Serra, M. Colina, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla und J. L. Morenza, „Preparation of functional DNA microarrays through laser-induced forward transfer”, *Applied Physics Letters*, Bd. 85, Nr. 9, S. 1639-1641, 2004.
- [46] B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée und F. Guillemot, „Laser assisted

- bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization", *Biomaterials*, Bd. 31, S. 7250-7256, 2010.
- [47] W. T. Chen, M. L. Tseng, C. Y. Liao, C. Wu, S. Sun, Y.-W. Huang, C. M. Chang, C. H. Lu, L. Zhou, D.-W. Huang, A. Q. Liu und D. Tsai, „Fabrication of three-dimensional plasmonic cavity by femtosecond laser-induced forward transfer", *Optics Express*, Bd. 21, Nr. 1, S. 618-625, 2013.
- [48] Z. Tóth und T. Szörényi, „Laser-induced compound formation and transfer of stacked elemental layers", *Thin Solid Films*, Bd. 245, Nr. 1-2, S. 40-43, 1994.
- [49] E. Fogarassy, C. Fuchs, F. Kerherve, G. Hauchecorne und J. Perriere, „Laser-induced forward transfer of high-T_c YBaCuO and BiSrCaCuO superconducting thin films", *Journal of Applied Physics*, Bd. 66, Nr. 1, S. 457-459, 1989.
- [50] Y. S. Hascicek, A. Kleinhammes und L. R. Testardi, „Direct laser patterned deposition", *Journal of Materials Science Letters*, Bd. 11, S. 1681-1682, 1992.
- [51] Z. Tóth, T. Szörényi und A. L. Tóth, „Ar⁺ laser-induced forward transfer (LIFT): a novel method for micrometer-size surface patterning", *Applied Surface Science* 69, Bd. 69, S. 317-320, 1993.
- [52] I. Zergioti, S. Mailis, N. A. Vainos, Papakonstantinou, C. Kalpouzos, C. Grigoropoulos und C. Fotakis, „Microdeposition of metal and oxide structures using ultrashort laser pulses", *Applied Physics A*, Bd. 66, S. 579-582, 1998.
- [53] L. Yang, C.-y. Wang, X.-c. Ni, Z.-j. Wang, W. Jia und L. Chai, „Microdroplet deposition of copper film by femtosecond laser-induced forward transfer", *Applied Physics Letters*, Bd. 89, 161110, 2006.
- [54] V. Sametoglu, V. Sauer und Y. Y. Tsui, „Nanoscale laser-induced forward transfer through patterned Cr films", *Applied Physics A*, Bd. 110, S. 823-827, 2013.
- [55] M. Kandyla, C. Pandis, S. Chatzandroulis, Pissis und I. Zergioti, „Direct laser printing of thin-film polyaniline devices", *Applied Physics A*, Bd. 110, S. 623-628, 2013.
- [56] E. Biver, L. Rapp, A.- Alloncle und Delaporte, „Multi-jets formation using laser forward transfer", *Applied Surface Science*, Bd. 302, S. 153-158, 2014.
- [57] C. Florian, F. Caballero-Lucas, J. M. Fernández-Pradas, R. Artigas, S. Ogier, D. Karnakis und Serra, „Conductive silver ink printing through the laser-induced forward transfer technique", *Applied Surface Science*, Bd. 336, S. 304-308, 2015.
- [58] M. I. Sanchez-Aniorte, B. Mouhamadou, A. Alloncle, T. Sarnet und Delaporte, „Laser-induced forward transfer for improving fine-line metallization in photovoltaic applications", *Applied Physics A*, Bd. 122, 595, 2016.

- [59] R. Popov, *Praktikum und Arbeit als studentische Hilfskraft*, 2013-2014.
- [60] F. Krüger, *Masterarbeit „Konstruktion und Aufbau einer Maschine zur Herstellung von Peptidarrays“*, Universität Rostock, und *Arbeit als studentische Hilfskraft*, 2015.
- [61] M. Marinov, *Arbeit als studentische Hilfskraft*, 2014.
- [62] D.-J. Kroon, „Finite Iterative Closest Point“, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24301-finite-iterative-closest-point> [Zugriff am 12.02.2014].
- [63] J. Wilm, „Iterative Closest Point“, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27804-iterative-closest-point> [Zugriff am 12.02.2014].
- [64] User „Manu“, „Rigid ICP registration“, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/40888-rigid-icp-registration> [Zugriff am 07.01.2015].
- [65] R. Brown, „nearestneighbour.m“, MATLAB Central File Exchange, <http://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/12574-nearestneighbour-m> [Zugriff am 08.01.2015].
- [66] I. Bucher, „Circle fit“, MATLAB Central File Exchange, <http://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/5557-circle-fit> [Zugriff am 12.02.2014].
- [67] N. Chernov, „Circle Fit (Pratt method)“, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/22643-circle-fit--pratt-method-> [Zugriff am 14.07.2016].
- [68] D. Freedman, „SSH/SFTP/SCP For Matlab (v2)“, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/35409-ssh-sftp-scp-for-matlab--v2-> [Zugriff am 30.08.2016].
- [69] A. T. Davis, *Praktikum*, 2016.
- [70] B. Münster, *Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
- [71] A. Pfeffer, *Masterarbeit „Beschichtungsverfahren im Kontext der Herstellung von Peptidarrays“*, Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
- [72] A. G. Emslie, F. T. Bonner und L. G. Peck, „Flow of a Viscous Liquid on a Rotating Disk“, *Journal of Applied Physics*, Bd. 29, Nr. 5, S. 858-862, 1958.
- [73] G. de Gennes, F. Brochard-Wyart und D. Quéré, *Capillarity and Wetting Phenomena*, New York: Springer Science+Business Media, 2004.

- [74] J. R. Lakowicz, „Quenching of Fluorescence”, in *s Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York, Springer Science+Business Media, 2006, S. 277-330.
- [75] B. Ridder, Surface structuring in xy- and z-direction on the examples of peptide array synthesis and molecular layer deposition, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2016.
- [76] B. Ridder, T. C. Foertsch, A. Welle, D. S. Mattes, C. M. von Bojnicić-Kninski, F. F. Loeffler, A. Nesterov-Mueller, M. A. Meier und F. Breitling, „Development of a poly(dimethylacrylamide) based matrix material for solid phase high density peptide array synthesis employing a laser based material transfer”, *Applied Surface Science*, Bd. 389, S. 942-951, 2016.
- [77] D. S. Mattes, *noch nicht veröffentlichte Dissertation* „Synthese von Peptiden, Peptoiden und proteinähnlichen Strukturen im Arrayformat“, Karlsruher Institut für Technologie, 2017.
- [78] F. F. Loeffler, T. C. Foertsch, R. Popov, D. S. Mattes, M. Schlageter, M. Sedlmayr, B. Ridder, F.-X. Dang, C. von Bojnicić-Kninski, L. K. Weber, A. Fischer, J. Greifenstein, V. Bykovskaya, I. Buliev, F. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. Meier, S. Bräse, A. K. Powell, S. T. Balaban, F. Breitling und A. Nesterov-Mueller, „High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material”, *Nature Communications*, Bd. 7, 11844, 2016.
- [79] T. H. Nguyen, *Praktikum*, 2014.
- [80] M. Sedlmayr, *noch nicht veröffentlichte Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie.
- [81] A. Palermo, *noch nicht veröffentlichte Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie.
- [82] MathWorks, Dokumentation zu MATLAB, online:
<https://www.mathworks.com/help/matlab/> [Zugriff am 23.04.2017].
- [83] T. C. Foertsch, D. S. Mattes, A. T. Davis, R. Popov, C. von Bojnicić-Kninski, F. E. Held, S. B. Tsogoeva, F. F. Loeffler, F. Breitling und A. Nesterov-Mueller, „Spatial modes of laser-induced mass transfer in microgaps“ – *in Vorbereitung*.
- [84] Papakonstantinou, N. A. Vainos und C. Fotakis, „Microfabrication by UV femtosecond laser ablation of Pt, Cr and indium oxide thin films”, *Applied Surface Science*, Bd. 151, S. 159-170, 1999.
- [85] F. E. Held, A. A. Guryev, T. Fröhlich, F. Hampel, A. Kahnt, C. Hutterer, M. Steingruber, H. Bahsi, C. von Bojnicić-Kninski, D. S. Mattes, T. C. Foertsch, A. Nesterov-Mueller, M. Maschall und S. B. Tsogoeva, „Facile access to potent antiviral quinazoline heterocycles with fluorescence properties via merging metal-free domino reactions”, *Nature Communications (accepted)*, 2017.

- [86] K. Kundu und I. M. Cohen, *Fluid Mechanics*, Burlington: Academic Press, Elsevier, 2008.
- [87] I. Tosun, D. Uner und C. Ozgen, „Critical Reynolds number for Newtonian flow in rectangular ducts”, *Industrial & engineering chemistry research*, Bd. 27, Nr. 10, S. 1955-1957, 1988.
- [88] M. Kinoshita, K. Hoshino und T. Kitamura, „Time Resolved Microscopic Analysis of Ink Layer Surface in Laser Dye Thermal Transfer Printing”, *Journal of Imaging Science and Technology*, Bd. 44, Nr. 6, S. 484-490, 2000.
- [89] J. D'Errico, „Surface Fitting using gridfit”, MATLAB Central File Exchange, <https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8998-surface-fitting-using-gridfit> [Zugriff am 04.03.2016].
- [90] D. J. Heath, M. Feinaeugle, J. A. Grant-Jacob, B. Mills und R. W. Eason, „Dynamic spatial pulse shaping via a digital micromirror device for patterned laser-induced forward transfer of solid polymer films”, *Optical Materials Express*, Bd. 5, Nr. 5, S. 1129-1136, 2015.
- [91] U. Grigull und H. Sandner, *Wärmeleitung*, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1979.
- [92] L. Goehring, A. Nakahara, T. Dutta, S. Kitsunozaki und S. Tarafdar, *Desiccation Cracks and their Patterns*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [93] M. Kinoshita, K. Hoshino und T. Kitamura, „Mechanism of Dye Thermal Transfer from Ink Donor Layer to Receiving Sheet by Laser Heating”, *Journal of Imaging Science and Technology*, Bd. 44, Nr. 2, S. 105-110, 2000.
- [94] Y. Odai, T. Kitamura, H. Kokado und M. Katoh, „Resolution Performance of Images Printed by Laser Dye Thermal Transfer”, *Journal of Imaging Science and Technology*, Bd. 40, Nr. 3, S. 271-275, 1996.
- [95] N. Schneider, *Skalierbare Herstellung von dreidimensionalen photonischen Nanostrukturen mit Formgedächtnispolymeren*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2017.
- [96] R. Fardel, M. Nagel, F. Nüesch, T. Lippert und A. Wokaun, „Shadowgraphy investigation of laser-induced forward transfer: Front side and back side ablation of the triazene polymer sacrificial layer”, *Applied Surface Science*, Bd. 255, S. 5430-5433, 2008.
- [97] C. Lenchitz, E. Hayes, R. W. Velicky, L. Schlosberg und N. Suh, „The Ignition Characteristics of Nitrocellulose Films”, *Combustion Science and Technology*, Bd. 7, S. 1-11, 1973.
- [98] Produktseite der Firma PEPperPRINT,

- <http://www.pepperprint.com/products/pepperchipR-custom-microarrays/>
[Zugriff am 23.04.2017].
- [99] J. Sullivan, „Fractal Broccoli”, 2004,
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Fractal_Broccoli.jpg [Zugriff am 30.08.2016].
- [100] S. Nickel, O. Stein und K.-H. Waldmann, Operations Research, Berlin Heidelberg:
Springer-Verlag, 2014.
- [101] D. C. Tran, „TSzip”, MATLAB Central File Exchange,
<https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/46629-tsp-zi> [Zugriff am
08.09.2016].
- [102] S. Thoms, Y. Zhang und J. M. R. Weaver, „Improved alignment algorithm for
electron beam lithography”, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, Bd. 32,
06F509, 2014.
- [103] S. Rahmann und H. Burkhardt, „Anleitung zum Praktikumsversuch
Kamerakalibrierung”, [https://lmb.informatik.uni-
freiburg.de/lectures/praktika_brox/bvpraktikum/BVAnl_kam_kalib.pdf](https://lmb.informatik.uni-freiburg.de/lectures/praktika_brox/bvpraktikum/BVAnl_kam_kalib.pdf) [Zugriff
am 23.04.2017].
- [104] M. Langer, „COMP 558 lectures („Fundamentals of Computer Vision)”, 2009,
<http://www.cim.mcgill.ca/~langer/558/2009/> [Zugriff am 23.04.2017].
- [105] K. Zeppenfeld, Lehrbuch der Grafikprogrammierung: Grundlagen,
Programmierung, Anwendung, Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- [106] Q. Ji, „Lecture 5: Singular Value Decomposition SVD (1)”, 2002,
https://www.ecse.rpi.edu/~qji/CV/svd_review.pdf [Zugriff am 23.04.2017].
- [107] Z. Zhang, „A flexible new technique for camera calibration”, *IEEE Transactions on
Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Bd. 22, Nr. 11, S. 1330-1334, 2000.
- [108] J. Fuller, „Function to Convert between DCM, Euler angles, Quaternions, and Euler
vectors”, MATLAB Central File Exchange,
[https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/20696-function-to-
convert-between-dcm--euler-angles--quaternions--and-euler-vectors](https://de.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/20696-function-to-convert-between-dcm--euler-angles--quaternions--and-euler-vectors) [Zugriff am
01.09.2016].
- [109] F. J. Koch, C. Detlefs, T. J. Schröter, D. Kunka, A. Last und J. Mohr, „Quantitative
characterization of X-ray lenses from two fabrication techniques with grating
interferometry”, *Optics Express*, Bd. 24, Nr. 9, S. 9168-9177, 2016.
- [110] F. Liu, B. M. Robinson, J. Reardon und J. M. Geary, „Analyzing optics test data on
rectangular apertures using 2-D Chebyshev polynomials”, *Optical Engineering*, Bd.
50, Nr. 4, 043609, 2011.

- [111] J. Ye, Z. Gao, S. Wang, J. Cheng, W. Wang und W. Sun, „Comparative assessment of orthogonal polynomials for wavefront reconstruction over the square aperture”, *Journal of the Optical Society of America A*, Bd. 31, Nr. 10, S. 2304-2311, 2014.
- [112] A. Wallin, „Uniform random points in a circle using polar coordinates”, 2009, <http://www.anderswallin.net/2009/05/uniform-random-points-in-a-circle-using-polar-coordinates/> [Zugriff am 23.04.2017].
- [113] M. S. Khan, *Masterarbeit "Recognition of Micro Patterns using MATLAB in Peptide Array Production"*, Hochschule Karlsruhe, 2015.
- [114] T. C. Förtsch, C. von Bojničić-Kninski, M. S. Khan, F. Märkle, L. K. Weber, A. Fischer, B. Münster, B. Ridder, D. Althuon, J. Striffler, M. Sedlmayr, V. Bykovskaya, R. Popov, M. Soehndrijo, F. Breitling, F. F. Löffler und A. Nesterov-Müller, „Robuste Erkennung von kombinierten Positions- und Identifizierungs-Mikromarkierungen”, *MikroSystemTechnik Kongress Karlsruhe*, 26.-28.10., Tagungsband im VDE VERLAG Berlin, Offenbach, 2015.
- [115] V. A. Knyaz und A. V. Sibiryakov, „Non Contact 3D Model Reconstruction Using Coded Targets. International Conference Graphicon Moscow”, *ResearchGate*, 251871774, 1998.
- [116] J. Borovička, „Circle Detection Using Hough Transforms: Documentation”, 2003, <http://www.borovicka.org/files/research/bristol/hough-report.pdf> [Zugriff am 23.04.2017].
- [117] M. Fiala, „ARTag, a fiducial marker system using digital techniques”, *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, S. 590-596, 2005.
- [118] Produkt-Webseite „SCANLAB Kameraadapter”, <http://www.scanlab.de/de/produkte/scan-zubehoer/kameraadapter> [Zugriff am 23.04.2017].
- [119] P. Schuch, *Arbeit als studentische Hilfskraft*, 2016.
- [120] T.C. Foertsch, D. Althuon, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling, F.F. Loeffler (*presenting author*), „A novel laser-assisted microarray technology for antibody readout in infectious diseases”, *8th Indo-German Frontiers of Engineering Symposium 2016 by the Humboldt Foundation*, 19.-22.05.2016, Potsdam, 2016.

12 Danksagung

Mein Dank gilt dem wissenschaftlichen Betreuer der vorliegenden Arbeit, Prof. Dr. Nesterov-Müller. Ich danke auch Prof. Dr. Korvink und Prof. Dr.-Ing. Dörsam (TU Darmstadt), die sich freundlich bereit erklärt haben, die weitere Begutachtung der Arbeit zu übernehmen.

Ich danke Herrn Popov und Dr. Löffler für die Vorversuche zu dieser Arbeit und die weitere Begleitung.

Für die Einführung in die Thematik und Labore danke ich Dr. Ridder, Dr. Münster, Dr. Märkle, Dr. Schillo, Dr. Striffler und insbesondere Dr. Hahn. Frau Mattes, Frau Palermo, Frau Greifenstein und Frau Streit danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Experimenten, besonders den chemischen Schritten, Herrn von Bojničić-Kninski für die Unterstützung bei der Laserablation und Herrn Popov bei der Arbeit mit Mikropartikeln. Für inspirierende Gespräche und Hilfe bei Messungen oder praktischen Problemen danke ich Dr. Meier, Frau Köhnle, Frau Kohler, Herrn Wondimu, Herrn Lutz, Dr. Bog, Herrn Fechner, Herrn Vüllers, Dr. Feit, Dr. Bade, Herrn Nargang, Herrn Keller, Dr. Oßmer, Dr. Gültig, Herrn Brüderlin, Frau Hübner, Herrn Abaffy, Herrn Tone (IDD, TU DA), Herrn Besser (IAM) und besonders Herrn Thelen, die sich viel Zeit für mich genommen haben. Den weiteren Kollegen Frau Weber, Frau Sedlmayr, Frau Kaczynski, Dr. Bykovskaya, Frau Herbster, Frau Rentschler, Herrn Schlageter und Herrn Held (FAU Erlangen), die in Verbindung mit der Arbeit standen, und allen weiteren Kolleginnen und Kollegen darüber hinaus danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere meinen Freunden und meiner Familie bin ich für ihr Interesse an der Arbeit und ihre Unterstützung dankbar.

Besonders möchte ich mich bei den von mir betreuten Studierenden und Praktikantinnen und Praktikanten bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Frau Flothow, Herr Nguyen, Herr Marinov, Herr Khan, Herr Tazerooni, Herr Krüger, Herr Davis, Frau Klenke und Herr Schuch.

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Molekulare Suchmaschinen“ des Betreuers am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt. Dessen Verwaltung und allen, die zu seiner Infrastruktur beitragen, der IT und dem Wareneingang, gilt mein Dank; außerdem der *Karlsruhe Nano and Micro Facility* (KNMF). Schließlich danke ich dem Leiter unserer Abteilung „Peptidarrays“, Prof. Dr. Breitling.