

**μ -Heizplatten zur lichtinduzierten Erwärmung
für die Manipulation von
lebenden Zellen und Lipid-Strukturen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr.rer.nat

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Helke Reinhardt

aus

Weimar

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Schmid

2. Gutachter: PD Dr. J. Franzke

Dortmund 2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am ISAS - Institute for Analytical Sciences Dortmund in der Abteilung Miniaturisierung unter der Betreuung von PD Dr. J. Franzke sowie von Prof. Dr. A. Manz und Dr. P. S. Dittrich im Zeitraum von September 2004 bis August 2008. Prof. Dr. A. Schmid war der Betreuer dieser Arbeit für die Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund. Allen Betreuern, Freunden und Kollegen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. J. Franzke für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am ISAS anzufertigen. Neben vielen hilfreichen Anregungen und gelegentlicher Nachhilfe in Physik erhielt ich den Freiraum, um auch meinen eigenen Forschungsideen nachzugehen. Ich danke Ihm für seinen Humor, seine Geduld, die fruchtbaren Diskussionen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. A. Schmid für die Bereitschaft, kurzfristig als Betreuer und Gutachter bereit zu stehen sowie für seine vielen wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. A. Manz, der meine Faszination für die Miniaturisierung weckte und mich mit seinen frischen Ideen und seinem unerschöpflichen Enthusiasmus oft inspiriert und angetrieben hat. Dass er das ISAS verlassen hat ist ein großer Verlust.

Frau Dr. P. S. Dittrich möchte ich für ihre Motivation und Unterstützung danken. Durch ihre Betreuung lernte ich viel über die Fluoreszenzmikroskopie, die Mikrostrukturierung und das Schreiben von wissenschaftlichen Texten.

Weiterhin gilt mein Dank der Europäischen Union und dem CellPROm Projekt (Vertragsnummer NMP4-CT-2004-500039 im 6. Rahmenprogramm für Wissenschaft und technische Entwicklung), sowie dem Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Bundesministerium für Bildung und Technologie für die finanzielle Unterstützung. Dem Projektpartner GeSiM danke ich für die Organisation und Bereitstellung von

platinieren Mikrostrukturen aus Gold. Weiterhin danke ich P. Renaud von der EPFL (*Ecole Polytechnique Federale de Lausanne*, Schweiz) für die Bereitstellung der Silizium-Strukturen zur Herstellung der Lipid-Schläuche.

Herrn U. Marggraf danke ich für die Herstellung der SU-8 Strukturen und der μ -Strukturen aus Gold, die große Teile dieser Arbeit erst ermöglichten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. A. Neyer (Technische Universität Dortmund) für die Bereitstellung der Reinraumanlagen danken. Ich danke N. Ahlmann für den Aufbau des Diodenlasers und die Messungen am Weißlicht-Refraktometer. D. Zimmermann danke ich für die Einführung und Betreuung bei der Zellkultivierung. Stellvertretend für die gesamte Werkstatt und die Elektronik am ISAS möchte ich Herrn Krebs und Herrn Lonzynski für ihre zuverlässige Arbeit danken.

Herrn S. Lohse gilt mein Dank dafür, dass er die Simulation der lichtinduzierten Erwärmung durch seine Erfahrung und seinen Zugang zu dem entsprechenden Programm ermöglichte. Dr. H. Lindner danke ich besonders für die vielen langen, oft kontroversen, aber immer aufschlussreichen Diskussionen. Weiterhin möchte ich meinen Freunden und Bürokollegen C. Schumann, Y. Cai, K. Tachikawa und A.-K. Stark für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre danken.

Meinem Freund Matthias Grzib danke ich dafür, dass es immer auch ein Leben neben der Arbeit gab sowie für seine großartige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern Helgard und Herbert Reinhardt sowie meinem Bruder Hannes Reinhardt danken, weil sie immer für mich da waren. Sie haben mir immer den Rücken gestärkt und an mich geglaubt.

Abstract

This work describes a new approach for fast and localised heating that relies on the strong absorbance of infrared light by microparticles and micro-sized patterned surfaces (“ μ -hotplates”). In contrast to common heating systems this method of optical induced heating does not need direct contact to a temperature control device, making it a flexible method that can easily be implemented within any microchip.

Three different materials, graphite microparticles as well as microstructures made of carbon and gold, were tested for their suitability. All tested materials could be used for localised heating. Microstructured carbon and gold μ -hotplates were used for reproducible optically induced heating by more than 10 °C within less than a second. The increase in temperature was quantified using the temperature dependent fluorescent dye Rhodamine B as well as by double-stranded DNA denaturation experiments. A model was developed to simulate the heating on microstructured gold and compared with the experimental data.

Localised heating of microscopic areas can be used for many biological applications. In this study two examples of possible applications were demonstrated. In the first, the effect of optical induced heating on living cells of the colon cancer cell line SW 480 was examined. Elevated temperatures produced by localised heating were used to control cell growth. In the second, the possibility of manipulating artificial cells and tubes made of lipids with a focused laser beam was evaluated. Here, optically induced heating was used for the formation of lipid microtube networks. In addition to these applications, localised optical heating opens up the possibility for the initiation and modulation of biochemical or cellular reactions, in solution, on surfaces as well as within membranes or cells.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zum schnellen und lokalen Erwärmen mittels Absorption von infrarotem Licht an Partikeln bzw. mikrostrukturierten Oberflächen (μ -Heizplatten) entwickelt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Heizsystemen werden keine direkten Kontakte zur Steuerung benötigt. Deshalb ist es eine sehr flexible Methode, die leicht innerhalb von Mikrochips verwendet werden kann.

Drei verschiedene Materialien, Graphitpartikel, Mikrostrukturen aus Kohlenstoff und mikrostrukturierte Goldschichten, wurden bezüglich ihrer Effizienz und Anwendbarkeit geprüft. Alle drei Materialien waren für die Erwärmung kleiner Bereiche geeignet. Die Mikrostrukturen aus Kohlenstoff und Gold führten zu reproduzierbaren Ergebnissen und erlauben eine kontrollierte Temperaturerhöhung um mehr als 10 °C innerhalb einer Sekunde. Die Erhöhung der Temperatur wurde sowohl mit Hilfe des temperaturabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B als auch durch das Schmelzen doppelsträngiger DNA verfolgt und quantifiziert. Es wurde ein Modell entwickelt, welches es erlaubte, die lichtinduzierte Erwärmung an Mikrostrukturen aus Gold zu simulieren und mit den experimentellen Daten zu vergleichen.

Eine lokale Erwärmung mikroskopisch kleiner Volumina kann in vielen Bereichen der Biologie eingesetzt werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei mögliche Anwendungen aufgezeigt. In der ersten wurde die Wirkung der lichtinduzierten Erwärmung auf lebende Zellen der Dickdarm-Krebszelllinie SW 480 untersucht. Die durch lokale Erwärmung erhöhten Temperaturen wurden genutzt, um das Zellwachstum zu kontrollieren. Innerhalb der zweiten Anwendung wurde die Möglichkeit der Manipulation von künstlichen Zellen und Zellschläuchen aus Lipidmembranen durch den fokussierten Laserstrahl aufgezeigt. In diesem Fall wurde die lichtinduzierte Erwärmung zur Bildung von Netzwerken aus Lipid-Mikroschläuchen genutzt. Zusätzlich zu den aufgezeigten Anwendungen eröffnet die entwickelte Methode vielfältige neue Möglichkeiten für die Initialisierung und Steuerung von biochemischen oder zellulären Reaktionen, in Lösung oder an Oberflächen ebenso wie innerhalb von Zellmembranen oder Zellen.

Inhalt

Danksagung	1
Abstract	3
Zusammenfassung	4
Inhalt	5
1 Motivation und Zielsetzung	8
2 Grundlagen und Theorie	12
2.1 Miniaturisierung	12
2.2 Zellmanipulation in Mikrostrukturen	16
2.2.1 Wechselwirkungen von Licht und Materie - Optische Kräfte	21
2.2.2 Optische Manipulation von Zellen und die Folgen von Erwärmung	27
2.3 Erwärmen innerhalb von miniaturisierten Systemen	34
2.4 Herstellungsmethoden für Mikrostrukturen	38
2.4.1 Photolithographie	38
2.4.2 Herstellung von Metall-Mikrostrukturen	41
2.4.3 Mikrostrukturen aus Kohlenstoff	42
2.4.4 Mikrostrukturen aus Silizium	44
3 Lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln	47
3.1 Das Prinzip der lichtinduzierten Erwärmung	48
3.2 Material und Methoden	50
3.2.1 Fixierung der Graphit-Mikropartikel und Herstellung der Mikrochips	50
3.2.2 Optischer Aufbau	52
3.2.3 Bestimmung des Laserfokus und dessen Form	55
3.3 Ergebnisse des lichtinduzierten Erwärmens an Graphitpartikeln	58
3.3.1 Lichtinduziertes Erwärmen von fixierten Graphitpartikeln	58
3.3.2 Lichtinduziertes Erwärmen von Wasser an fixierten Graphitpartikeln	61
3.4 Zusammenfassung	63
4 Lichtinduzierte Erwärmung an μ-Heizplatten	65

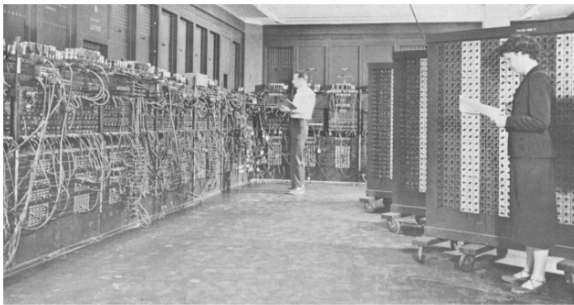
4.1	Möglichkeiten der Temperaturmessung kleiner Volumina	65
4.1.1	Fluoreszenz-Thermometrie	66
4.1.2	Nachweis der Erwärmung durch Schmelzen doppelsträngiger DNA	72
4.2	Herstellung der μ -Heizplatten	75
4.3	Fluoreszenzthermometrie mittels Rhodamin B	77
4.3.1	Kalibrierungsmessung zur Bestimmung der Temperaturänderung	77
4.3.2	Maximale Temperaturänderung durch lichtinduziertes Erwärmen	79
4.3.3	Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Erwärmung	85
4.3.4	Reproduzierbarkeit des lichtinduzierten Erwärmens	90
4.3.5	Untersuchung der Stabilität der Temperaturerhöhung	93
4.4	Nachweis der Erwärmung durch Schmelzen doppelsträngiger DNA	94
4.4.1	Durchführung	95
4.4.2	Ergebnisse	95
4.5	Zusammenfassung	98
5	Simulation der lichtinduzierten Erwärmung	101
5.1	Theoretische Grundlagen zur Wärmeleitung	101
5.2	Verwendete Modelle zur Simulation des lichtinduzierten Erwärmens	104
5.2.1	Erstes Modell zur Simulation - Stationäres System	104
5.2.2	Zweites Modell zur Simulation - Grenzfall für extreme Konvektion	105
5.3	Ergebnisse der Simulationen	106
5.3.1	Ergebnisse des ersten Modells - Stationäres System	107
5.3.2	Ergebnisse des zweiten Modells - Grenzfall für extreme Konvektion	108
5.4	Vergleich der Simulationen mit den Messergebnissen	110
5.5	Zusammenfassung	115
6	Reaktion lebender Zellen auf lichtinduziertes Erwärmen	117
6.1	Kultivierung der Zellen und Herstellung der Zell-Mikrochips	117
6.2	Ergebnisse der lichtinduzierten Erwärmung lebender Zellen	120
6.2.1	Lichtinduziertes Erwärmen von Zellen an Graphitpartikeln	121
6.2.2	Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff	123

6.2.3	Erwärmen an μ -Heizplatten aus Gold	125
6.2.4	Kontrolle des Zellwachstums	128
6.3	Zusammenfassung	130
7	Manipulation von Lipid-Schläuchen	131
7.1	Künstliche Zellen und Mikrostrukturen aus Lipiden	132
7.1.1	Stabilisierung von Lipid-Strukturen	134
7.1.2	Herstellung von Lipid-Vesikeln	134
7.1.3	Herstellung von Lipid-Schläuchen	136
7.1.4	Herstellung komplexer Mikrostrukturen aus Lipiden	137
7.2	Material und Methoden	140
7.2.1	Herstellung der Mikrochips	140
7.2.2	Durchführung der Mikroextrusion	142
7.3	Ergebnisse	144
7.3.1	Optische Manipulation von Lipid-Schläuchen	144
7.3.2	Lichtinduziertes Erwärmen von Lipid-Schläuchen	146
7.3.3	Herstellung komplexer Strukturen aus Lipid-Schläuchen	151
7.4	Zusammenfassung	153
8	Zusammenfassung und Ausblick	154
	Literaturverzeichnis	158
	Abkürzungsverzeichnis	170
	Eigenständigkeitserklärung	171
	Lebenslauf	172
	Anhang	174
A.	Theorie der Modelle zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung	174
A.1.	Theorie zum ersten Modell der Simulation - Stationäres System	175
A.2.	Zweites Modell zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung	182

1 Motivation und Zielsetzung

Unser tägliches Leben ist geprägt von einer unglaublich schnellen Entwicklung der Technik in den letzten Jahren und Jahrzehnten. Insbesondere die Mikroelektronik hat einen zunehmenden Einfluss auf unseren Alltag. Durch die Herstellung kleinerer und leistungsfähigerer elektronischer Komponenten findet sie ihren Weg in immer mehr Bereiche unseres Lebens. Sehr rasant hat sich zum Beispiel die Rechentechnik entwickelt, wie in Abb. 1-1 anhand von ENIAC (*Electronic Numerical Integrator And Computer*), einem der ersten rein elektronischen digitalen Universalrechner von 1944, im Vergleich mit dem Testchip seines 1996 hergestellten Nachbaus aus Silizium dargestellt. Der ENIAC benötigte eine Grundfläche von 10 m x 17 m bei einem Gewicht von 27 t und war ein Einzelstück [1]. Sein Nachbau mit den gleichen Funktionen benötigte gerade einmal 8 mm x 8 mm Grundfläche [2]. Mittlerweile sind Rechner Massenware. Die mobilen Rechner, die Notebooks, wiegen weniger als 2 kg und ihre Größe wird vorrangig durch die Größe ihres LCD-Bildschirms bestimmt. Die Entwicklung dieser Bildschirme ist ein weiteres Beispiel für den raschen Fortschritt in der Mikroelektronik, ebenso wie die Telefone oder die Elektronik in Fahrzeugen.

ENIAC, 1944: 10 m x 17 m



**ENIAC-Chip, 1996: 8 mm x 8 mm
(Test-Chip der Speichereinheit)**

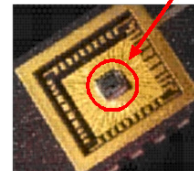


Abb. 1-1: Links: Einer der ersten rein elektronischen digitalen Universalrechner ENIAC von 1944 benötigte 10 m x 17 m Grundfläche [1]. Ein Nachbau von 1996 auf einem Silizium-Chip war 8 mm x 8 mm groß. Rechts: Testchip der Speichereinheit des ENIAC-Chips [2].

Dieser technische Fortschritt hat auch einen wachsenden Einfluss auf die Biochemie, die Biotechnologie, die Medizin, die Pharmazie, die Chemie und insbesondere auf moderne Methoden in der Analytik. Aufbauend auf den Kenntnissen aus der Mikroelektronik entstanden neuartige, miniaturisierte Systeme mit vielen Vorteilen, welche ebenfalls bereits den Weg in den Alltag einiger Menschen gefunden haben. Ein bekanntes Beispiel für derartige Systeme sind die immer kleineren und

unkomplizierteren Blutzucker-Messgeräte, die mittlerweile von vielen Firmen angeboten werden [3]. Sie ermöglichen eine regelmäßige und genaue Blutzuckermessung und erleichtern somit den Alltag von Diabetikern. Weitere Beispiele sind moderne Inhalatoren [4] oder Schwangerschaftstests [5].



Abb. 1-2: Miniaturisierung in der Analytik: Links: Übliches chemisches Labor. Rechts: Mobiles Blutzuckermessgerät [6].

Durch die Verkleinerung eines Systems verändern sich die chemischen Reaktionen oder das Verhalten von Atomen und Molekülen nicht. Es ergeben sich jedoch viele Vorteile, wie die Verringerung des benötigten Volumens der Probe für Analysen oder der Reagenzien für chemische Reaktionen, eine leichte Transportierbarkeit sowie einen schnellen Wärmeausgleich innerhalb des Systems. Dieser schnelle Wärmeausgleich innerhalb von miniaturisierten Systemen ermöglicht eine schnelle und exakte Kontrolle der Temperatur und ihrer Verteilung. Innerhalb von makroskopischen Reaktoren ist dies oft schwierig, da nur lokal erwärmt und eine Temperaturverteilung hauptsächlich durch aktives Mischen erreicht werden kann. Für die Durchführung vieler biologischer und biochemischer Reaktionen ist jedoch eine genaue Temperaturkontrolle eine wichtige Voraussetzung. Eine schnelle und effektive Temperaturerhöhung führt zwar in vielen Systemen zu erhöhten Reaktionsgeschwindigkeiten und erhöhten Ausbeuten, aber bei einigen Reaktionen, besonders bei enzymatisch katalysierten, muss ein optimaler Temperaturbereich eingehalten werden, um maximale Ausbeuten zu erhalten. Insbesondere die Denaturierung der Proteine, wozu auch die Enzyme gehören, führt zu einer starken Abnahme der Ausbeute bei Erhöhung der Temperatur über das Optimum hinaus.

Lebende Systeme wie einzelne Zellen, mit ihren komplexen biochemischen Reaktionen, reagieren sehr sensibel auf Temperaturänderungen. Die optimale

Temperatur vieler lebender Organismen liegt bei 37 °C. Schon relativ kleine Veränderungen von wenigen Grad Celsius beeinflussen Vorgänge innerhalb der Zellen, wie die Funktion der Ionenkanäle, die Übertragungsleistung der Synapsen oder die Absonderung von Zellsekreten [7]. Die Möglichkeiten von lebenden Zellen, größere Temperaturerhöhungen zu kompensieren, sind sehr begrenzt. Eine Zelle, die über einen längeren Zeitraum erhöhten Temperaturen ausgesetzt wird, stirbt. Durch eine starke Temperaturerhöhung könnte daher das Zellwachstum im Bereich der Erwärmung gehemmt werden. Eine derartige Kontrolle des Zellwachstums wäre sehr hilfreich und leicht innerhalb von Mikrostrukturen einsetzbar, wie sie bereits für die Kultivierung und Analyse von Einzelzellen, kleinen Zellkulturen und Zellgeweben genutzt werden [8-10].

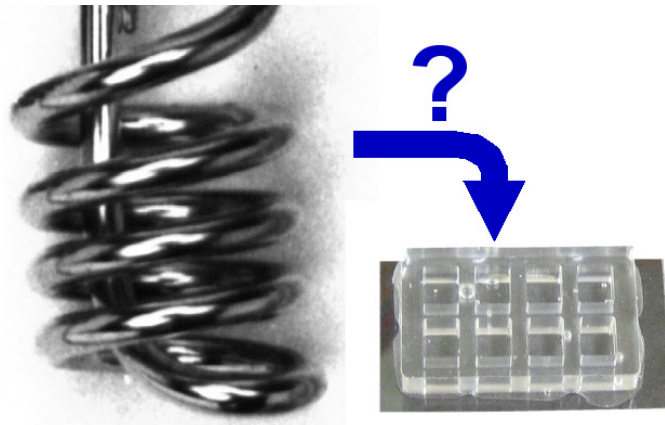


Abb. 1-3: Makroskopische Heizmethoden, wie zum Beispiel ein Tauchsieder, eignen sich offensichtlich nicht zum lokalen Erwärmen innerhalb von Mikrostrukturen. Andere Methoden werden notwendig.

Für das Erwärmen begrenzter Bereiche innerhalb von Mikrosystemen werden zumeist Peltier Elemente [11,12] oder dünne ohmsche Widerstände [13,14] eingesetzt. Diese sind unflexibel, besonders im Hinblick auf den zu erwärmenden Bereich, und sie benötigen direkte Anschlüsse zu einem Steuerungsgerät, was in komplexen Mikrostrukturen schwer umzusetzen ist. Deshalb wurden bereits verschiedene neue Methoden für ein kontaktloses Erwärmen kleiner Volumina entwickelt. Am bedeutendsten ist die Verwendung von Licht, dessen Energie entweder direkt absorbiert [15-17] oder durch Partikel aus absorbierenden Materialien in Wärme umgewandelt wird [18-21]. Der Vorteil des Erwärmens über absorbierende Partikel besteht darin, dass relativ hohe Temperaturerhöhungen von mehr als 10 °C innerhalb von Millisekunden und schneller erreicht werden können, wobei die räumliche Auflösung

von der Partikelgröße, weniger vom mit Licht bestrahlten Bereich, abhängt. Werden Mikropartikel zum Erwärmen verwendet, so sind sie nach ihrer Anwendung oft schwer zu entfernen.

Ziel dieser Arbeit war ein kontrolliertes Erwärmen kleiner Volumina von wenigen Femtolitern. Es sollte eine Methode entwickelt werden, mit der eine solche Temperaturerhöhung innerhalb von Mikrochips erreicht und nachgewiesen werden kann. Weiterhin sollte die Anwendbarkeit der Methode für Zellkulturen und zellähnliche Systeme aufgezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit behandelt im Kapitel 2 zunächst die theoretischen Grundlagen zur Mikrostrukturierung, zur Manipulation von lebenden Zellen, zu herkömmlichen Methoden der Erwärmung innerhalb von Mikrostrukturen und zur Herstellung dieser Mikrostrukturen. Anschließend werden im Kapitel 3 das Prinzip der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten lichtinduzierten Erwärmung, die Herstellung der verwendeten Mikrochips sowie die ersten Ergebnisse des lichtinduzierten Erwärmens an Graphitpartikeln vorgestellt. Die Möglichkeiten zur Temperaturmessung kleiner Volumina, die Herstellung der als μ -Heizplatten verwendeten Mikrostrukturen und die Ergebnisse von zwei verschiedenen Methoden der Temperaturmessung werden im Kapitel 4 beschrieben. Im Kapitel 5 erfolgt ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen von theoretischen Betrachtungen des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten aus Gold, anhand zweier theoretischer Modelle und deren Simulation. Die Kultivierung lebender Zellen in Mikrochips mit μ -Heizplatten, die Reaktionen dieser Zellen auf das lichtinduzierte Erwärmen sowie die Kontrolle des Zellwachstums, als ein erstes Anwendungsbeispiel der lichtinduzierten Erwärmung, werden im Kapitel 6 vorgestellt. Methoden zur Herstellung von Lipidstrukturen sowie die Ergebnisse der Versuche zur optischen Manipulation und zur lichtinduzierten Erwärmung an Lipid-Schläuchen werden im Kapitel 7 beschrieben. Weiterhin wird, als zweite mögliche Anwendung des lichtinduzierten Erwärmens, eine neue Methode der Herstellung komplexer Strukturen aus Lipiden vorgestellt. Die Zusammenfassung sowie ein Ausblick auf weitere Anwendungsmöglichkeiten der μ -Heizplatten erfolgt im abschließenden Kapitel 8.

2 Grundlagen und Theorie

Dieses Kapitel soll vermitteln, weshalb eine neue Methode zum lokalen Erwärmen innerhalb von Mikrostrukturen entwickelt wurde und worauf bei der Entwicklung einer möglichen Methode geachtet werden musste. Deshalb wird zuerst ein Einblick über den Zweck der Miniaturisierung und die vielfältigen Möglichkeiten, welche sie für die Manipulation von einzelnen Partikeln und Zellen bietet, gegeben. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur lokalen Erwärmung ist eine optische Methode, mit der künstliche Zellen aus Lipiden und sogar lebende Zellen manipuliert werden sollten. Deshalb werden insbesondere die optische Manipulation und die Folgen von Licht für lebende Zellen näher betrachtet. Weiterhin werden herkömmliche Methoden zur Erwärmung innerhalb von Mikrostrukturen sowie deren Vor- und Nachteile beschrieben. Methoden zur Mikrostrukturierung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien werden abschließend vorgestellt.

2.1 Miniaturisierung

Die aus der Miniaturisierung resultierenden Mikrostrukturen zeichnen sich durch ihre geringen Ausmaße aus, die im Bereich zwischen einem und mehreren hundert μm liegen. Eine Verkleinerung makroskopischer Systeme in diesem Größenbereich durch Verringerung der Kantenlänge d beeinflusst verschiedene Parameter des Systems, wie Tabelle 2-1 verdeutlicht.

Obwohl innerhalb derartig kleiner Systeme die physikalischen und chemischen Grundgesetze unverändert gültig sind, ergeben sich veränderte Bedingungen mit einigen Vorteilen:

- Eine Verringerung der Abmessung d eines Systems führt zu einer sehr starken Verringerung des Volumens V , da das Volumen kubisch von der Kantenlänge abhängt. Ein möglichst geringer Verbrauch von Probenlösungen oder Reagenzien ist besonders für die Bioanalytik und die Pharmaindustrie von Interesse. In diesen Bereichen ist oft wenig Material vorhanden, mit dem möglichst viele Analysen oder Reaktionen durchgeführt werden sollen.

Tabelle 2-1: Veränderung von Systemparametern durch Verringerung der Kantenlänge d .

Parameter	Makroskopisches System	Maßstabsfaktor der Einflussgröße Kantenlänge d	Miniaturisiertes System
Kantenlänge d	1 mm	d	$1 \mu\text{m} = 10^{-3} \text{ mm}$
Oberfläche A	1 mm^2	d^2	$1 \mu\text{m}^2 = 10^{-6} \text{ mm}^2$
Volumen V	1 mm^3 $1 \mu\text{L}$	d^3	$1 \mu\text{m}^3 = 10^{-9} \text{ mm}^3$ $1 \text{ fL} = 10^{-9} \mu\text{L}$
Anzahl der Moleküle n	10^9	d^3	1
Diffusionszeit t für die Strecke d eines Moleküls in Wasser (Diffusionskoeffizient $D = 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$\sim 16 \text{ min}$	d^2	1 ms
Elektrische Feldstärke E	$1 \text{ kV} \cdot \text{m}^{-1}$	d	$1000 \text{ kV} \cdot \text{m}^{-1}$

- Der Wärmetransport erfolgt unabhängig von der Größe des Systems mit der gleichen Geschwindigkeit. Somit ist eine Erwärmung oder auch eine Abkühlung innerhalb von Mikrosystemen durch die verringerten Abstände wesentlich schneller. Durch die Verkleinerung eines Systems ergibt sich zudem ein größeres Verhältnis von Oberfläche zum Volumen, da die Oberfläche nur quadratisch, das Volumen aber kubisch abnimmt. Dies führt zusätzlich zu einer schnelleren Erwärmung bzw. Abkühlung bei einer entsprechend warmen oder kalten Umgebung.
- Mit immer kleineren Abmessungen wird der Massentransport zunehmend durch Diffusion bestimmt. Als Diffusion wird der thermisch bedingte Transport eines Stoffes bezeichnet, welcher aus der zufälligen Bewegung der einzelnen Teilchen (Brownsche Molekularbewegung) resultiert und letztendlich zu einem Konzentrationsausgleich des Stoffes führt. Die Diffusion erfolgt unabhängig von der Dimension des Systems zusätzlich zum erzwungenen Stofftransport, zum Beispiel durch Druck. In einer Dimension kann die Diffusion durch die Einstein-Smoluchowski-Gleichung beschrieben werden:

$$s^2 = 2 \cdot D \cdot t$$

Gl. 2-1

s : Strecke, welche sich ein Teilchen in der Zeit t bewegt [m];
 D : Diffusionskoeffizient des Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]; t : Zeit [s].

Innerhalb von Mikrostrukturen ist durch die Verkleinerung der Kantenlänge d der Diffusionsweg s ebenfalls kleiner, wodurch die Diffusionszeit t im Vergleich zu makroskopischen Systemen kürzer ist. Diese kürzere Diffusionszeit führt zu kürzeren Reaktionszeiten, aber auch zur teilweisen Vermischung unterschiedlicher Substanzen. Für Analysen kann diese Durchmischung nachteilig sein, wenn sich die Analyten im Lösungsmittel durch Diffusion verdünnen oder mit anderen vermischen. Die Diffusion wird aber auch gezielt zur Trennung von Substanzen ausgenutzt, beispielsweise bei chromatographischen Methoden [22,23].

- Eine Besonderheit von fluidischen Mikrosystemen besteht in den zumeist laminaren Strömungsverhältnissen. In laminaren Strömungen werden die Fluidmoleküle oder Teilchen in der Flüssigkeit parallel zueinander bewegt. Im Gegensatz dazu sind die Bewegungen innerhalb von turbulenten Strömungen chaotisch. Um die Strömungsverhältnisse von unterschiedlichen Systemen beschreiben und vergleichen zu können, wurde die dimensionslose Reynoldszahl eingeführt:

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\eta}$$

Gl. 2-2

Re : Reynoldszahl; ρ : Dichte der Flüssigkeit [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]; v : Charakteristische Geschwindigkeit der Flüssigkeit [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]; D_h : Hydraulischer Durchmesser [m];
 η : Viskosität der Flüssigkeit [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$].

Dabei ist der hydraulische Durchmesser eine berechnete Größe, welcher von der Querschnittsfläche und der Querschnittsgeometrie eines Kanals abhängt. Für einen rechteckigen Kanal mit $50 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ Querschnitt beträgt D_h $16,7 \mu\text{m}$. Experimentell wurde festgestellt, dass in Röhren oder Kanälen für Reynoldszahlen unter 2.000 laminare Strömungsverhältnisse vorliegen [24]. Bei höheren Werten liegen zunehmend turbulente Strömungsverhältnisse vor. Innerhalb von Mikrostrukturen sind die resultierenden Reynoldszahlen durch die geringen hydraulischen Durchmesser sehr gering, so dass ausschließlich laminare

Strömungen vorherrschen. Zum Beispiel ist bei einem hydraulischen Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$ und einer Fließgeschwindigkeit von $1\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ von Wasser die Reynoldszahl 1. Es treten keine Verwirbelungen auf, und somit erfolgt keine Vermischung von verschiedenen parallelen Strömungen, abgesehen von der Diffusion an der Grenzschicht. Dadurch ist der Stofftransport, im Gegensatz zu makroskopischen turbulenten Systemen, berechenbar.

- Durch die geringeren Abmessungen reichen kleinere Spannungen aus, um hohe elektrische Feldstärken zu erzeugen. Dies wird zum Beispiel zum Flüssigkeitstransport und für analytische Trennmethode wie die Elektrophorese ausgenutzt [25].
- Analysen und chemische Reaktionen können in mikrofluidischen Systemen ebenso wie in makroskopischen Systemen kontinuierlich und automatisiert durchgeführt werden. Dies ermöglicht zum Beispiel eine Produktionskontrolle im laufenden Betrieb. Der Vorteil der Mikrostrukturen liegt in diesem Fall in der besseren Kontrollierbarkeit und im geringeren Probenvolumen im Vergleich zu makroskopischen Systemen. Weiterhin ist wegen der geringen Größe die Möglichkeit der Parallelisierung gegeben. Das heißt, es können auf engstem Raum viele Reaktionen oder Analysen gleichzeitig nebeneinander durchgeführt werden.
- Kleine Systeme sind transportabel und ermöglichen Analysen direkt vor Ort. Dies ist besonders für alltägliche Anwendungen oder in der Notfall-Medizin von Bedeutung.
- Eine Herausforderung bei der Verwendung von Mikrostrukturen für Analysen ist die Detektion. Aus der starken Verringerung des Probenvolumens resultiert eine sehr geringe Anzahl der nachzuweisenden Moleküle. Sind zum Beispiel in einem Volumen von $1\ \mu\text{L}$ 10^9 Moleküle vorhanden, befindet sich in $1\ \text{fL}$ nur noch eines. Deshalb werden sehr empfindliche Detektionsmethoden benötigt. Gleichzeitig wird aber die Identifikation und Analyse einzelner Komponenten aus einer komplexen Probe ermöglicht. Mit elektrochemischen Methoden, Massenspektrometrie oder optischen Methoden stehen solch empfindliche

Detektionsmethoden zur Verfügung. Durch Fluoreszenzmethoden ist sogar die Detektion einzelner Moleküle möglich [26].

Durch ihre geringe Größe können alle für eine Analyse notwendigen Arbeitsgänge innerhalb einer einzigen Mikrostruktur gekoppelt werden. Dieses Konzept der miniaturisierten Totalanalysesysteme, auch als μ TAS bezeichnet, wurde erstmals 1990 vorgestellt [27]. Dabei handelt es sich um komplette Analysesysteme, mit Probenvorbereitung, Reaktion, Trennung und Detektion, auf nur wenigen Quadratzentimeter großen Quarzträgern, den Mikrochips. Die ersten Mikrochips wurden bereits 1979 für die Gaschromatographie [22] und 1992 für die Elektrophorese [25] vorgestellt und seitdem stetig weiterentwickelt. Komplettierte Analysesysteme sind mittlerweile von einigen Firmen, wie zum Beispiel Agilent Technologies, Evotec Technologies, Caliper Life Science oder Hitachi, kommerziell erhältlich.

Neben der Trennung und Analyse von Probengemischen wurden schon früh während der Entwicklung der μ TAS auch zunehmend Anwendungen im Bereich der Reaktionen und Handhabung von Biomolekülen und Zellen verwirklicht. So entstanden bereits 1990 ein pH-sensitiver Siliziumchip für die Messung des Zellstoffwechsels mit lebenden Zellen als Biosensoren [28], 1993 Siliziumchips für die Durchflusszytometrie [29] sowie 1995 mikrostrukturierte Kammern für die DNA Vervielfältigung mittels PCR [30]. Neben den vielen Vorteilen der Mikrostrukturen sind sie insbesondere auch wegen ihrer Dimensionen für die Zellbiologie interessant. Die meisten menschlichen Zellen haben einen Durchmesser von 10 μ m bis 30 μ m. Mikrosysteme mit entsprechenden Dimensionen eröffnen vielfältige Möglichkeiten zur Manipulation, Untersuchung und Analyse von einzelnen Zellen. Im folgenden Kapitel 2.2 werden einige Möglichkeiten der Miniaturisierung für die Zellbiologie vorgestellt.

2.2 Zellmanipulation in Mikrostrukturen

Lebende Zellen gelten mittlerweile als unverzichtbare Biosensoren für die Charakterisierung und Detektion von Wirkstoffen, Krankheitserregern, Drogen und Giften [8,9]. Weiterhin werden sie für die Herstellung und Regenerierung von

Gewebe und für die Untersuchung von Zellmechanismen, wie zum Beispiel Differenzierung, Adhäsion und Zellvermehrung, eingesetzt [31].

Sowohl Signalstoffe in der umgebenden Flüssigkeit, als auch Zell-Zell-Kontakte und mechanische Wechselwirkungen mit ihrer direkten Umgebung beeinflussen lebende Zellen [32]. Alle diese Faktoren können in Mikrosystemen lokal, also für einzelne Zellen, variiert und somit für die Zellmanipulation ausgenutzt werden. Damit eröffnen Mikrostrukturen die Möglichkeit zur Kultivierung, gezielten Beeinflussung und Analyse von einzelnen lebenden Zellen. In Mikrochips können zudem unterschiedlichste Bauteile miteinander kombiniert und somit komplexe Arbeitsgänge auf kleinstem Raum durchgeführt werden. Dadurch haben Mikrosysteme ein großes Potential für die Zellbiologie, Pharmazie, Neurobiologie, Genforschung und die Herstellung von Gewebe [33].

Die Kultivierung von einzelnen Zellen [33] bis hin zu komplexen Strukturen wie Embryos [34] oder neuronalen Netzen [35] wurde mittlerweile innerhalb von Mikrostrukturen realisiert. Oft ist eine zerstörungsfreie Manipulation dieser Zellen notwendig. Die herkömmliche Methode unter Verwendung einer Mikropipette ist sehr kompliziert und zeitaufwendig. Zudem ist sie nicht automatisierbar oder parallelisierbar. Deshalb wurden mittlerweile verschiedene andere Methoden für die Manipulation lebender Zellen innerhalb von Mikrostrukturen entwickelt. Diese können nach den aufgewendeten Kräften unterschieden werden. So erfolgt beispielsweise die Zellmanipulation unter Verwendung von Mikropipetten durch mechanische Kräfte.

- Die mechanische Manipulation wird hauptsächlich zur Trennung und zum Festhalten einzelner Zellen verwendet. Verschiedene Mikrostrukturen ermöglichen das Festhalten und Anreichern von Zellen an zuvor festgelegten Stellen im Mikrochip, ohne die Zellen durch hydrodynamische Kräfte oder Scherspannungen zu beeinträchtigen. Dazu gehören Mikrolöcher [36,37], Damm-Strukturen [38,39] (Abb. 2-1-A), Sandsack-Strukturen [40] (Abb. 2-1-B) sowie Mikrogreifer (Abb. 2-1-C) [41]. Die Mikrogreifer sind jedoch sehr komplizierte Strukturen, so dass die einfach herzustellenden Mikrolöcher, aber auch die Damm-Strukturen sowie die Sandsack-Strukturen oft bevorzugt werden [8].

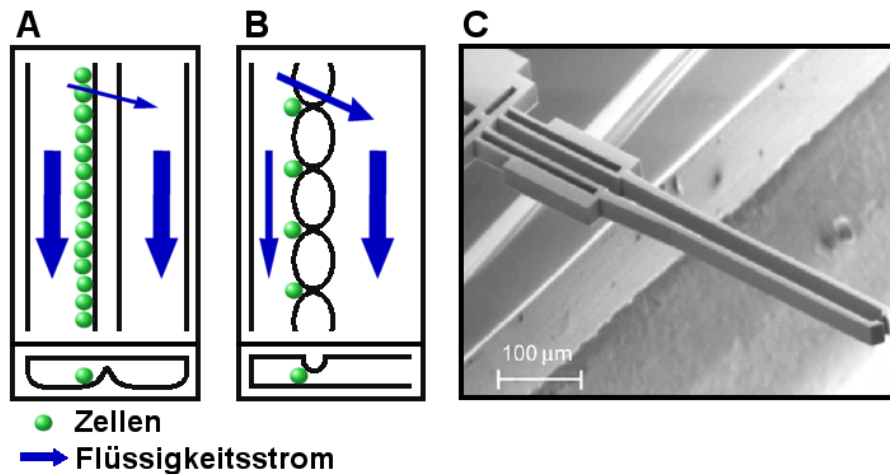


Abb. 2-1: Mikrostrukturen zur mechanischen Manipulation von lebenden Zellen: Schematische Darstellung der Aufsicht (oben) und des Querschnitts (unten) eines Kanals (A) mit parallel zur Strömung verlaufender Damm-Struktur und (B) mit Sandsack-Struktur. (C) Raster-Elektronen-Mikroskop-Aufnahme von einem Mikrogreifer [41].

- Für eine schnelle und einfache mechanische Trennung von Zellen werden oftmals Mikrofilter eingesetzt [42,43], sofern keine hohe Selektivität benötigt wird [8].
- Durch eine Modifizierung von Oberflächen innerhalb der Mikrostrukturen kann die Zelladhäsion lokal kontrolliert werden [44-46]. Zwar führen die schwachen Adhäsionskräfte zu einer schlechten Immobilisierung der Zellen, jedoch ermöglicht die selektive Adhäsion durch Biomoleküle, wie beispielsweise Proteine [47] oder Antikörper [48,49], eine sehr effektive Selektion von Zellen.
- Eine weitere Variante der Manipulation ist die Immobilisierung von lebenden Zellen in Hydrogelen [50,51]. Durch Photostrukturierung des Hydrogels können die Zellen so innerhalb von dreidimensionalen Strukturen festgehalten werden [52]. Durch Kombination mit anderen Manipulationstechniken, wie zum Beispiel mit der Dielektrophorese, können die Zellen vor der Immobilisierung in bestimmten Mustern angeordnet werden, so dass diese Anordnung beibehalten wird [53].
- Bei der akustischen Manipulation werden Partikel oder lebende Zellen durch die mechanischen Kräfte einer stehenden Ultraschallwelle beeinflusst. Sie ist eine sehr sanfte Methode, da sie ohne direkten mechanischen Kontakt mit den Zellen, also kontaktfrei, erfolgt. Die auf ein Partikel wirkenden Kräfte werden direkt von

der Größe und der Dichte bestimmt, so dass im fluidischen System eine kontinuierliche Trennung verschiedenster Partikel möglich ist [54]. Weiterhin dient die akustische Manipulation zum Transport, zum Mischen und zum Waschen von Zellen [55].

- Eine schonende Methode zur Anreicherung seltener Zellen und zur Trennung ist die magnetische Manipulation. Da die Zellen selber diamagnetisch sind, werden dazu ferromagnetische oder stark paramagnetische Kügelchen von 10-100 μm Durchmesser eingesetzt, welche sich auf Grund ihrer modifizierten Oberfläche spezifisch an bestimmte Zellen anlagern [56]. Durch ein äußeres Magnetfeld können diese Kügelchen, und damit auch die Zellen, festgehalten, angeordnet und manipuliert werden [57-59]. In Kombination mit einem hydrodynamischen Fluss sind eine Trennung von verschiedenen Zellen oder auch eine Anreicherung seltener Zellen aus komplexen Proben möglich [56,60]. Modulierte magnetische Felder ermöglichen eine Trennung von diamagnetischen Zellen allein durch ihre natürlichen magnetischen Eigenschaften und ohne zusätzliche paramagnetische Kügelchen. Ein Beispiel für diese kontaktfreie Methode ist die Trennung von weißen und roten Blutkörperchen aus einer Blutprobe [61]. Sogar die gezielte Manipulation einzelner Zellen durch magnetische Fallen ist möglich, jedoch nur in paramagnetischen Pufferlösungen mit hohen Konzentrationen von Salzen, denen Zellen gewöhnlich nicht ausgesetzt sind [62].
- Durch Dielektrophorese ist eine direkte und kontaktfreie Manipulation von polarisierbaren Partikeln, also auch von Zellen oder Molekülen, innerhalb von Mikrostrukturen möglich. Als Folge der Polarisierung durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld wirkt eine Kraft entweder in Richtung eines Feldminimums (negative Elektrophorese) oder eines Feldmaximums (positive Elektrophorese) auf die Partikel. Diese Kraft kann zur selektiven Trennung [63] sowie zur Manipulation [64,65] von Zellen und Bakterien, oder auch von Biomolekülen [66], dienen. Für die dazu notwendigen dielektrophoretischen Fallen gibt es zwei verschiedene Ansätze, wie in Abb. 2-2 vereinfacht dargestellt. Zumeist bestehen sie aus μ -Metallelektroden, welche direkt an eine Wechselspannungsquelle angeschlossen sind (Abb. 2-2-A) [64,65]. Alternativ ist

eine Manipulation auch durch ein äußeres elektrisches Wechselfeld möglich. Die dafür notwendigen starken Gradienten im elektrischen Feld entstehen innerhalb einer leitenden ionischen Flüssigkeit durch Lücken oder Kanäle in isolierenden und nicht polarisierbaren Materialien (Abb. 2-2-B) [66]. Diese Strukturen sind einfacher herzustellen als die μ -Elektroden. Zudem können mit diesen Strukturen stärkere Wechselfelder erzeugt werden, da sich die Elektroden außerhalb der Flüssigkeit befinden und sie somit nicht zur Gasentwicklung durch Elektrolyse führen können [66]. Möglich ist auch die Bewegung von lebenden Zellen oder Tropfen sowie die Kombination oder Teilung einzelner Tropfen durch Dielektrophorese innerhalb von Mikrofluidik-Chips in Kombination mit programmierbaren integrierten Schaltkreisen [67,68]. Nachteile der Manipulation durch Dielektrophorese sind relativ geringe Überlebensraten von Zellen in den elektrischen Feldern und ein hoher instrumenteller Aufwand im Vergleich zu anderen Manipulationsmethoden [8]. Zusätzlich ist eine lokale Erwärmung der Mikrostrukturen durch die starken elektrischen Wechselfelder möglich, was die Vitalität von Zellen beeinträchtigen kann (siehe Kapitel 2.2.2).

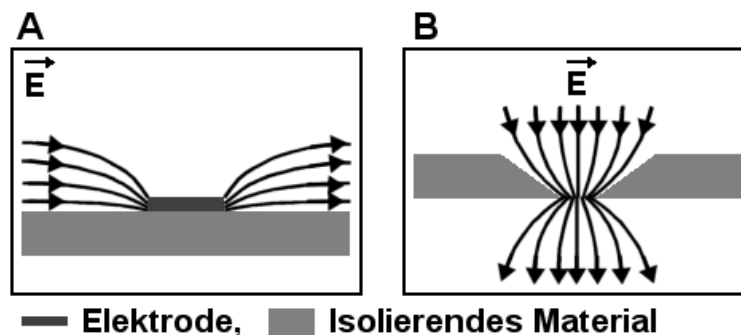


Abb. 2-2: Schematische Darstellungen dielektrophoretischer Fallen und der resultierenden inhomogenen elektrischen Felder: (A) Metallische Mikrostrukturen auf dem nichtleitenden Chip-Material dienen als metallische Fallen. (B) Nichtleitende Mikrostrukturen in einem elektrischen Feld dienen als elektrodenfreie Fallen.

Eine weitere, sehr verbreitete Methode ist die optische Manipulation. Da sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, wird sie in den nachfolgenden Kapiteln separat vorgestellt. Dazu werden zuerst allgemein die Wechselwirkungen von Licht mit Partikeln und Zellen im Kapitel 2.2.1 vorgestellt. Einige Anwendungsmöglichkeiten der optischen Manipulation von Zellen werden im Kapitel 2.2.2 beschrieben.

2.2.1 Wechselwirkungen von Licht und Materie - Optische Kräfte

Eine verbreitete Methode zur Manipulation von einzelnen lebenden Zellen oder Partikeln ist die optische Manipulation. Diese nutzt die aus der Wechselwirkung von Licht und Materie resultierenden optischen Kräfte, welche im Folgenden näher vorgestellt werden.

Licht, als elektromagnetische Welle, besitzt eine Flussdichte an Energie, welche sich aus dem Kreuzprodukt des elektrischen Feldes \vec{E} und des magnetischen Feldes \vec{B} berechnen lässt:

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \times \vec{B} \quad \text{Gl. 2-3}$$

\vec{S} : Poynting-Vektor [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; μ_0 : magnetische Feldkonstante [$\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{A}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$];
 \vec{E} : elektrisches Feld [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$]; \vec{B} : magnetisches Feld [T].

Der resultierende Vektor wird als Poynting-Vektor \vec{S} bezeichnet [69]. Die Intensität einer elektromagnetischen Welle, also die mittlere Leistung $\langle P \rangle$ pro Flächeneinheit A , ergibt sich aus dem zeitlichen Mittel des Betrages des Poynting-Vektors:

$$I = \frac{\langle P \rangle}{A} = \langle |\vec{S}| \rangle \quad \text{Gl. 2-4}$$

I : Intensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; P : Leistung [W]; A : Fläche [m^2]; \vec{S} : Poynting-Vektor [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]

Eine solche elektromagnetische Welle besitzt zudem einen Impuls \vec{p} , dessen Betrag durch die Energie W der Welle und der Lichtgeschwindigkeit c gegeben ist:

$$|\vec{p}| = \frac{W}{c} \quad \text{Gl. 2-5}$$

\vec{p} : Impuls [$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]; W : Energie [J]; c : Lichtgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$].

Der Betrag der aus einer Impulsänderung resultierenden Kraft \vec{F} ergibt sich wie folgt:

$$|\vec{F}| = \frac{dp}{dt} = \frac{1}{c} \cdot \frac{dW}{dt} = \frac{P}{c} \quad \text{Gl. 2-6}$$

\vec{F} : Kraft [N]; dp : Änderung des Impulses [$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]; dt : Änderung der Zeit [s];
 c : Lichtgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]; W : Energie [J]; P : Leistung [W].

Nach Gl. 2-4 und Gl. 2-6 ergibt der Quotient aus Intensität und Lichtgeschwindigkeit einen Druck, welcher als Strahlungsdruck p_s bezeichnet wird:

$$p_s = \frac{I}{c} \quad \text{Gl. 2-7}$$

p_s : Strahlungsdruck [$\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$]; I : Intensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; c : Lichtgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$].

Der Strahlungsdruck des Sonnenlichts ist zum Beispiel für die Orientierung des Schweifes von Kometen verantwortlich.

Trifft Licht senkrecht auf eine Oberfläche, so wird durch Reflexion zweimal eine Kraft übertragen, welche proportional zur reflektierten Leistung ist:

$$|\vec{F}| = \frac{2 \cdot P_R}{c} \quad \text{Gl. 2-8}$$

\vec{F} : Kraft [N]; P_R : Reflektierte Leistung [W]; c : Lichtgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$].

Wenn das Licht mit einer Leistung von 50 mW senkrecht auf eine Oberfläche trifft, an der 10 % des Lichts reflektiert werden, so entspricht die resultierende Kraft nach Gl. 2-8 0,33 nN. Diese Kraft wird als Streukraft bezeichnet. Um ein Teilchen anzuheben, muss die Kraft in entgegengesetzter Richtung zur Gewichtskraft größer sein als die Gewichtskraft des Partikels:

$$|\vec{F}_L| = \frac{2P_R}{c} > m \cdot g_n = |\vec{F}_G| \quad \text{Gl. 2-9}$$

\vec{F}_L : Optische Kraft [N]; P_R : Reflektierte Leistung [W]; c : Lichtgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]; m : Masse des Partikels [g]; g_n : Normalfallbeschleunigung [$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$] ($9,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$); \vec{F}_G : Gewichtskraft [N].

Die geringe Kraft von 0,33 nN ist nach Gl. 2-9 bereits etwa dreimal so groß wie die Gewichtskraft eines runden Goldpartikels von 10 ng ($\sim 5 \mu\text{m}$ Radius). Ein solches Partikel würde demnach mit etwa $2 g_n$ nach oben beschleunigt. Mit einer Laserleistung von 14,7 mW könnte das Goldpartikel stabil in der Schwebelage gehalten werden. Obwohl

die optischen Kräfte so gering erscheinen, haben sie somit auf mikroskopische Objekte einen großen Einfluss.

Eine bevorzugte Lichtquelle für die gezielte Manipulation von Zellen sind Laser. Ihr Vorteil liegt neben der Möglichkeit, eine hohe Intensität zu erreichen, in der guten Parallelisierbarkeit des annähernd monochromen Lichtstrahls hoher Kohärenz. Die zur optischen Manipulation verwendeten Laser weisen in transversaler Richtung ein Intensitätsprofil auf, welches näherungsweise als ein Gaußprofil beschrieben werden kann. Durch Fokussieren erhält er zusätzlich ein longitudinales Lorentzprofil. Beide Profile sind in Abb. 2-3 schematisch dargestellt.

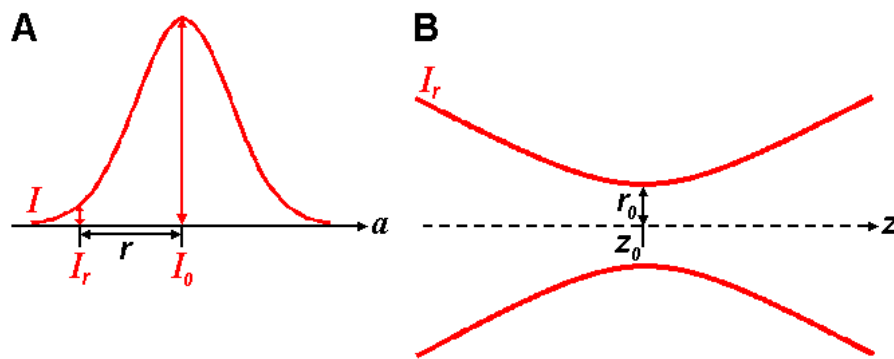


Abb. 2-3: Schematische Darstellung eines Gaußstrahls in (A) transversaler und (B) longitudinaler Richtung.

Als Strahlradius r wird der Abstand vom Strahlmittelpunkt definiert, an dem die Intensität I auf $I_r = I_0/e^2$, also auf etwa 13,5 % gefallen ist. Der minimale Strahlradius im Fokus des Lasers, also bei $z = 0 = z_0$ wird als Strahltaille r_0 bezeichnet. Die Intensität ist in diesem Fokuspunkt maximal. Im Abstand a vom Strahlmittelpunkt in transversaler Richtung und im Abstand z vom Fokus in longitudinaler Richtung ergibt sich die Intensität wie folgt:

$$I(a, z) = I_0 \cdot e^{-2 \frac{a^2}{r^2(z)}} \quad \text{Gl. 2-10}$$

$I(a, z)$: Lokale Intensität [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; I_0 : Maximale Intensität im Fokus [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$];
 a : Abstand vom Strahlmittelpunkt in transversaler Richtung [m]; z : Abstand in longitudinaler Richtung vom Fokus; $r(z)$: Strahlradius im Abstand z vom Fokus [m], wie folgt berechnet:

$$r^2(z) = r_0^2 + \left(\frac{\lambda}{\pi \cdot r_0} \right)^2 \cdot z^2 \quad \text{Gl. 2-11}$$

$r(z)$: Strahlradius im Abstand z vom Fokus [m]; r_0 : Radius des Laserstrahls im Fokus [m]; λ : Wellenlänge des Lasers [m]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; z : Abstand in longitudinaler Richtung vom Fokus [m].

Im Gegensatz zur Intensität ist die Laserleistung leicht messbar. Aus der gemessenen gesamten Laserleistung P_{ges} ergibt sich die maximale Intensität I_0 im kreisförmigen Laserfokus mit dem Radius r_0 nach folgender Gleichung:

$$I_0 = \frac{2 \cdot P_{ges}}{\pi \cdot r_0^2} \quad \text{Gl. 2-12}$$

I_0 : Maximale Intensität im Fokuspunkt [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; P_{ges} : Gesamte Laserleistung [W]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r_0 : Radius des Laserstrahls im Fokuspunkt [m].

Um ein Teilchen durch optische Kräfte in einer so genannten optischen Falle festhalten zu können, sind mindestens zwei entgegengesetzte Kräfte notwendig. Zwei mögliche Realisierungsarten für optische Fallen von 1970 [70] und 1971 [71] sind in Abb. 2-4 dargestellt. Die erste Realisierung erfolgte mit Hilfe zweier entgegengesetzter Laserstrahlen. Das Partikel wird dann durch die entgegengesetzt wirkenden Streukräfte gehalten. Der gleiche Effekt wird auch durch Rückspiegelung eines Laserstrahles erzielt. Eine zweite Möglichkeit ist die bereits am Beispiel eines Goldpartikels und mit Gl. 2-9 beschriebene Ausnutzung der Gewichtskraft entgegengesetzt zur Streukraft in der Schwebefalle.

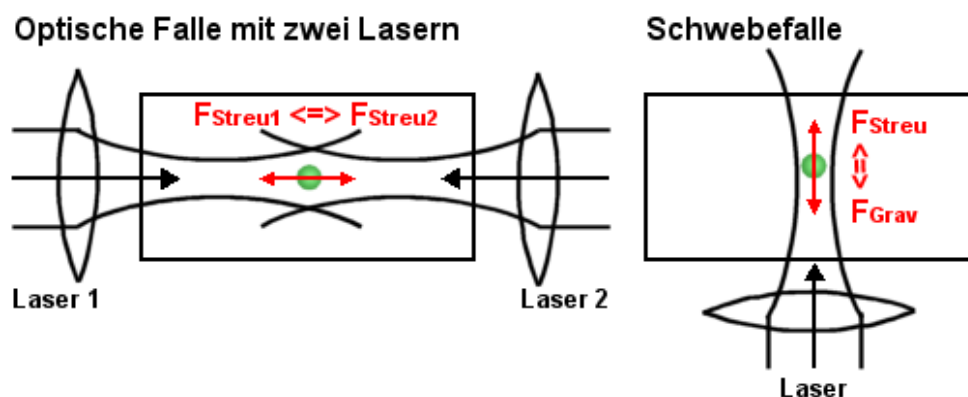


Abb. 2-4: Verschiedene Realisierungsarten für optische Fallen: Bei der Anordnung mit zwei entgegengesetzten Lasern ermöglichen die entgegengesetzt wirkenden Streukräfte eine Manipulation des Teilchens [70], während bei der Schwebefalle die Gewichtskraft des zu manipulierenden Teilchens der Streukraft entgegen wirkt [71].

Eine weitere und sehr häufig verwendete Möglichkeit zur Realisierung einer optischen Falle ist die Ausnutzung der Gradientenkraft entgegen der Streukraft. Hierzu ist ein stark fokussierter Laserstrahl hoher Intensität notwendig. Ein fokussierter Laserstrahl erzeugt ein lokales, aber starkes elektromagnetisches Feld mit einem dreidimensionalen Intensitätsgradienten. Dieser Intensitätsgradient entsteht durch das transversale Gausprofil und das longitudinale Lorentzprofil, so dass ein stärkeres Fokussieren zu einem größeren Gradienten führt. Um den Laserstrahl möglichst stark zu fokussieren, ist ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur, NA , notwendig. Die numerische Apertur ergibt sich aus dem Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Objekt und dem halben Öffnungswinkel zwischen Linse und Fokuspunkt wie folgt:

$$NA = n_m \sin(\Theta / 2) \qquad \text{Gl. 2-13}$$

NA : numerische Apertur; n_m : Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv ; Θ : Öffnungswinkel.

Der Brechungsindex von Öl (1,4-1,6) ist größer als der von Wasser (1,33), und dieser wiederum ist größer als der von Luft (1,0) [72]. Mit diesem Hintergrund wird aus Gl. 2-13 ersichtlich, dass ein Öl-Immersionsobjektiv eine größere numerische Apertur als ein vergleichbares Wasser-Emulsionsobjektiv besitzt. Zum Beispiel betrug die numerische Apertur NA des innerhalb dieser Arbeit verwendeten Wasser-Immersionsobjektivs 1,2. Die numerische Apertur eines Trocken-Objektivs hingegen ist geringer.

Durch starkes Fokussieren wirkt auf ein Partikel eine Kraft in Richtung der räumlichen Strahlungsintensitätsgradienten des Lasers und somit in Richtung des Laserfokus, wie in Abb. 2-5 schematisch dargestellt. Nur wenn diese Gradientenkraft durch möglichst starke Intensitätsgradienten stärker als die ihr entgegengesetzt wirkende Streukraft ist, kann ein Teilchen stabil im Laserfokus gefangen und damit manipuliert werden. Dabei werden zwei verschiedene Situationen unterschieden. Im Rayleigh-Bereich sind die zu manipulierenden Partikel viel kleiner als die Wellenlänge des fokussierten Laserlichts, während sie im Mie-Bereich größer sind. Wird, wie zum Beispiel in der vorliegenden Arbeit, ein 830 nm Diodenlaser zur Manipulation von

Partikeln von mehr als $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser genutzt, erfolgt die Manipulation demnach im Mie-Bereich.

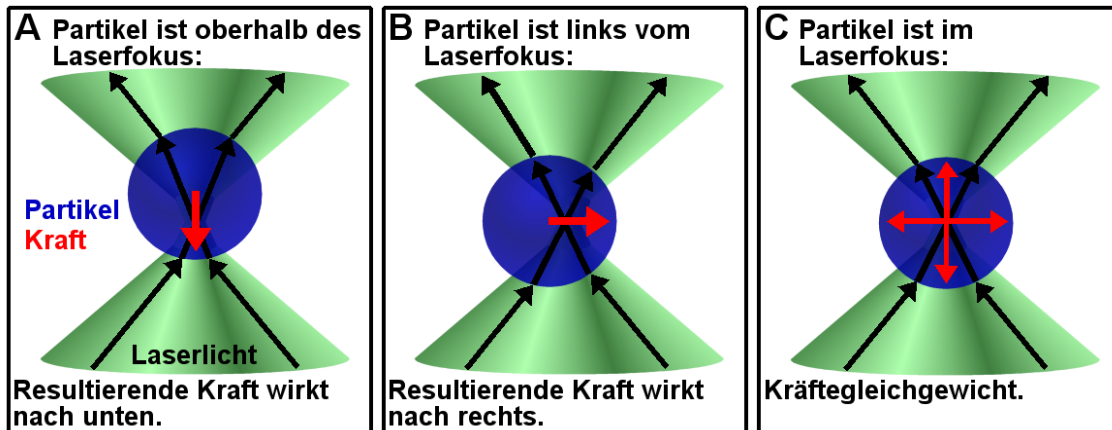


Abb. 2-5: Vereinfachte schematische Darstellung der auf ein Partikel in einer optischen Falle wirkenden Gradientenkraft. (A) Befindet sich das Partikel oberhalb des Laserfokus, wirkt die resultierende Gradientenkraft wegen des stärkeren Intensitätsgradienten nach unten. (B) Ist das Partikel nach links vom Laserfokus verschoben, befindet sich der Bereich mit der höchsten Laserintensität rechts im Partikel, und die resultierende Kraft wirkt ebenfalls nach rechts. (C) Im Laserfokus wird das Partikel stabil gehalten, da dies der Punkt der höchsten Intensität ist.

Eine Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur bedingt eine Einschränkung für die Mikrostrukturen, in denen eine Manipulation erfolgen soll. Der Arbeitsabstand solcher Objektive ist oft gering, so dass nur Mikrostrukturen mit einem dünnen Boden verwendet werden können. Zum Beispiel hatte das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Objektiv einen maximalen Arbeitsabstand von $250\ \mu\text{m}$. Durch einen Aufbau mit zwei entgegengesetzten Laserstrahlen (siehe Abb. 2-4) ist diese Einschränkung nicht gegeben, aber der Aufbau ist komplizierter. Mit speziellen Systemen, wie einer *bar trap* (balkenförmige Falle) [73] oder Arrays von vielen einzelnen Fallen, ist die gleichzeitige Manipulation von mehreren Partikeln möglich. Diese Arrays werden beispielsweise durch mehrere Mikrodioden [74,75] oder holographische Methoden [76,77] realisiert. Allerdings lohnt sich der für diese Aufbauten notwendige Aufwand in den wenigsten Fällen, so dass zumeist der einfachere Aufbau mit nur einem Laser und einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur bevorzugt wird.

Einige Anwendungen von optischen Fallen und weitere Möglichkeiten der Zellmanipulation mit Hilfe von Licht werden im nachfolgenden Kapitel 2.2.2 vorgestellt.

2.2.2 Optische Manipulation von Zellen und die Folgen von Erwärmung

Sonnenlicht auf der Haut wärmt und wird im Allgemeinen als angenehm empfunden. Diese wohltuende Wirkung ist auch medizinisch nachgewiesen. Eine der ersten Anwendungen von Licht in der Medizin war die Bestrahlung der betroffenen Hautpartien gegen eine besonders schwere und chronische Form der Hauttuberkulose Lupus-Vulgaris, wofür Niels Finsen 1903 den Nobel-Preis für Medizin erhielt [78]. Heute wird rotes Licht und Licht aus dem nahen infraroten Bereich (630 nm bis 1.000 nm) vielfältig in der Medizin verwendet, zum Beispiel damit Verletzungen schneller heilen oder zur Regeneration von Nerven [79].

Sonnenlicht kann aber auch negative Folgen haben. Insbesondere das ultraviolette Licht mit Wellenlängen zwischen 150 nm und 300 nm kann zur Zerstörung von Zell-DNA führen [80]. Bei geringer Strahlendosis können die Schäden in der DNA durch Proteine im Zellkern repariert werden. Wenn jedoch zu viele fehlerhafte Stellen in der DNA entstehen, erfolgt die Reparatur nur unvollständig und es kommt zu Mutationen [81]. Die Folge von zuviel Sonne auf der Haut ist Sonnenbrand, und auf längere Sicht möglicherweise auch Hautkrebs [82]. Ultraviolettes Licht kann bei entsprechend hoher Dosis prinzipiell jeden auf DNA basierenden Mikroorganismus abtöten und wird deshalb zur Sterilisation von Flüssigkeiten, Gasen und Oberflächen verwendet [83,84].

Wie diese Beispiele zeigen, kann Licht sehr unterschiedliche Wirkungen auf lebendes Gewebe und Zellen haben. Während zum Beispiel die Absorption von ultraviolettem Licht durch energetische Anregung zu photochemischen Reaktionen innerhalb der Zellen führen kann (zum Beispiel zur Zerstörung der DNA [80]), kann infrarotes Licht zur lokalen Erwärmung innerhalb von Zellen führen [85]. Die Absorption hängt neben der Wellenlänge auch von den Chromophoren innerhalb der Zelle ab. Die Auswirkungen auf die Zelle wiederum werden von der Dauer der

Bestrahlung und der Intensität der Lichtquelle bestimmt [86]. Durch Variation der Wellenlänge und Anpassung der Intensität gibt es für Licht sehr unterschiedliche Anwendungen in der Zellbiologie.

Die Verwendung von Licht in der Biologie, besonders für die Manipulation einzelner Zellen, bietet einige Vorteile. Fokussiertes Laserlicht ermöglicht eine kontaktfreie und damit kontaminationsfreie Manipulation von biologischem Material. Durch Mikroskopobjektive werden die Laserstrahlen auf Durchmesser im Größenbereich von einzelnen Zellen und kleiner fokussiert. Dadurch kann eine Manipulation sehr gezielt erfolgen. Gleichzeitig können optische Methoden gut in Kombination mit Mikrostrukturen verwendet werden.

Eine verbreitete Anwendung von Licht in der Biologie sind die bereits im Kapitel 2.2.1 vorgestellten optischen Fallen. Sie ermöglichen eine Manipulation von Partikeln und lebenden Zellen in drei Dimensionen. Die meisten biologischen Systeme absorbieren Licht im Bereich des nahen Infrarot (~800 nm bis 1.200 nm) kaum [87]. Um mögliche Beschädigungen des biologischen Materials durch Wechselwirkungen mit dem Laserlicht zu minimieren, sollte die Wellenlänge des Laserlichts in diesem Bereich liegen.

Optische Fallen werden in der Zellmanipulation hauptsächlich zur gezielten Positionierung der Zellen für die weitere Manipulation verwendet [77]. Ein Beispiel für die gezielte dreidimensionale Anordnung von Bakterien zeigt Abb. 2-6 A. Sie dienen aber auch zur Auswahl von einzelnen [88,89] oder mehreren Zellen gleichzeitig [73] aus komplexen Mischungen. Auch einzelne Bestandteile innerhalb einer lebenden Zelle, wie kleine Vesikel, können mit optischen Fallen manipuliert werden. Andere Zellbestandteile, wie zum Beispiel der Zellkern, werden nicht durch optische Fallen beeinflusst. Diese Zellbestandteile können aber dennoch manipuliert werden, indem sie mit Hilfe der Vesikel bewegt werden (siehe Abb. 2-6 B) [90].

Eine weitere Anwendung der optischen Fallen ist die Untersuchung von mechanischen Kräften. Eine Kraft von 10 pN reicht bereits aus, um eine Spermatozoe festzuhalten oder biologische Makromoleküle, wie DNA oder RNA, zu dehnen und zu biegen [91]. Üblicherweise erfolgt die Messung der Kräfte einzelner Biomoleküle,

indem das Molekül chemisch an eine Mikrokugel (oft aus Polystyrol) fixiert wird, welche als optische Hantel dient. Anschließend wird über eine Rückkopplungsschleife die Laserleistung bestimmt, welche notwendig ist, um entgegen der auf die Mikrokugel wirkenden Kräfte die Hantel zu bewegen oder an einer bestimmten Stelle festzuhalten. Mit dieser Methode wurden bereits viele wertvolle Informationen über molekulare Motoren wie Kinesin, Myosin oder RNA Polymerase erhalten [92]. Eine direkte Manipulation von Biopolymeren, ohne chemische Fixierung an eine Hantel, ist mit Hilfe von optischen Fallen unter bestimmten Voraussetzungen ebenso möglich. Zum Beispiel wurde die Möglichkeit der Manipulation von einsträngiger DNA nachgewiesen, wenn der pH-Wert von 8 auf 5,7 verringert wurde, wodurch die DNA von einer lang gestreckten Form, welche nicht manipuliert werden kann, in die sehr kompakte und manipulierbare Kugelform übergeht [87]. Die starken optischen Kräfte können auch verwendet werden, um die viskoelastischen Eigenschaften dielektrischer Materialien, wie zum Beispiel Zellen, zu bestimmen [93]. Dazu wird die Zelle zwischen zwei entgegengesetzt gerichtete Laserstrahlen gehalten und die durch den Strahlungsdruck resultierende Deformation gemessen.

Eine andere Form der optischen Manipulation ist die Mikrosezierung. Sie ermöglicht eine kontaktfreie und kontaminationsfreie Auswahl einzelner Zellen oder Zellbestandteile aus dünnen Schichten von gefrorenem oder fixiertem Gewebe sowie aus Abstrichen für die Analyse von DNA, RNA oder Proteinen [94-96]. Eine Methode zur Mikrosezierung verwendet ultraviolettes Laserlicht (*laser-microbeam-microdissection*). Durch die hohe Photonenenergie von ultraviolettem Laserlicht können Moleküle gespalten werden. Dieser Vorgang wird als Photolyse bezeichnet. Im Laserfokus wird durch die hohe Photonendichte alles biologische Material entfernt, ohne die Umgebung merklich zu erwärmen [94]. Dadurch entsteht eine materialfreie Lücke zwischen Gewebe und der zu untersuchenden Zelle, wobei die Zelle unverändert bleibt [97]. Gelangt der Laserstrahl von unten an die Probe, kann er nach der Sezierung auch zum Überführen der isolierten Zelle auf einen darüber platzierten Objektträger dienen. Dazu wird er mit doppelter Energie oberhalb der Probe fokussiert. Durch den entstehenden Strahlungsdruck wird die Zelle nach oben an den Objektträger bewegt [98]. Trifft der Laser hingegen von oben auf die Probe, kann die Gravitationskraft zum Überführen der Probe ausgenutzt werden [99].

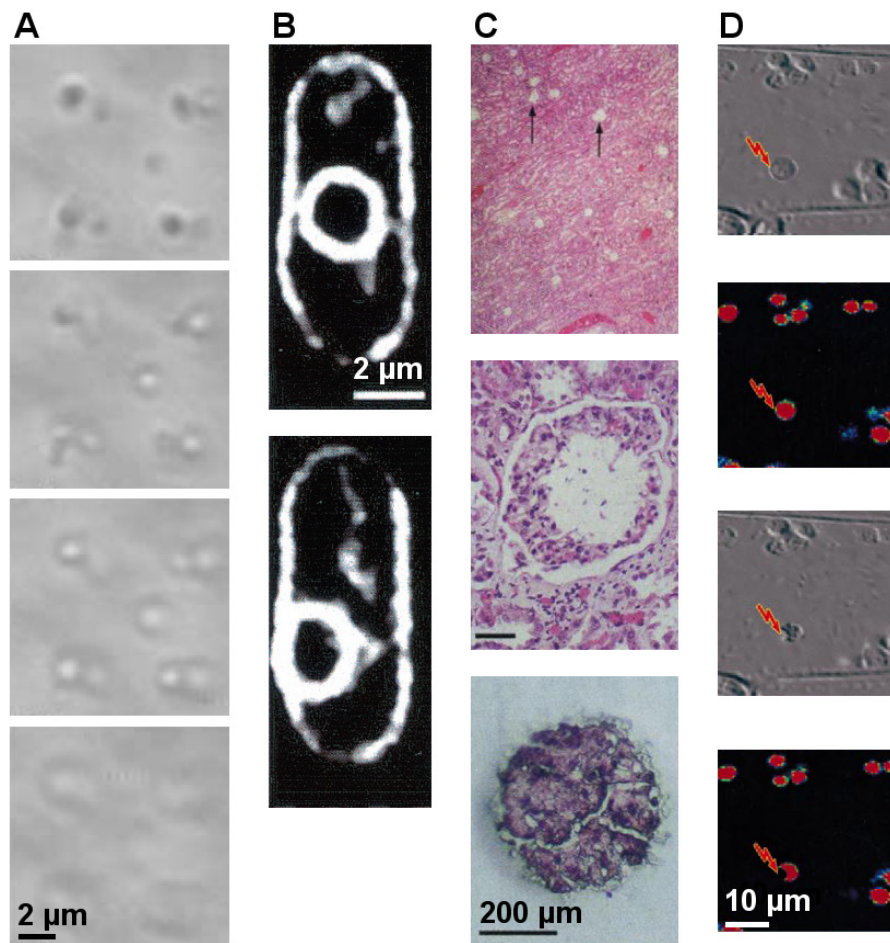


Abb. 2-6: Beispiele für Anwendungen von Lasern mit Wellenlängen um 800 nm: (A) Optische Falle für *E. coli* Bakterien zur kubisch-raumzentrierten Anordnung von 9 Bakterien. Die Bilder zeigen die Anordnung in verschiedenen Ebenen von oben nach unten [77]. (B) Optische Manipulation des Zellkerns einer Hefezelle (*Schizosaccharomyces pombe*) aus der Mitte (oben) um etwa 2 µm (unten) [90]. (C) Abtrennung einzelner Glomeruli aus Nierengewebe mittels *laser-capture-microdissection* [100]. (D) Durchlichtmikroskopaufnahmen und Falschfarbenbilder vor und nach der gezielten Ausschaltung eines Chloroplasts einer Pflanzenzelle (*E. densa*) [101].

Infrarote Laser (z. B. 810 nm [102] oder 1.060 nm [100]) geringer Energie werden für eine andere Variante der Mikrosezierung (*laser-capture-microdissection*) genutzt. Dabei wird eine auf der Probe liegende thermoplastische Folie direkt oder durch einen absorbierenden Farbstoff vom Laserlicht erwärmt, wodurch sie sich mit dem ausgewählten Zellmaterial verbindet. Durch den variablen Durchmesser des Laserfokus von 3 µm bis 60 µm wird die Größe des ausgewählten Bereiches bestimmt [95]. Beim Entfernen der Folie bleibt nur das ausgewählte Zellmaterial haften. In Abb. 2-6 C ist beispielhaft die Abtrennung der Glomeruli aus Nierengewebe dargestellt. Allerdings ist

diese Methode nicht kontaktfrei, und es besteht das Risiko einer Kontamination mit nicht ausgewähltem Material [94].

Durch eine punktuelle Mikrosezierung werden Mikrolöcher in Zellmembranen geschnitten. Zum Beispiel entsteht durch ultraviolettes Laserlicht (337 nm) ein Loch in der Zona pellucida, der äußeren Membran einer Eizelle. Mit Hilfe einer optischen Falle können anschließend Spermien in die Eizelle eingebracht werden, welche zur künstlichen Befruchtung führen [103]. Sogar die relativ dicken Zellwände von Pflanzenzellen können mit 355 nm Laserlicht perforiert werden [104]. Durch künstlich erzeugte Löcher in der Zellmembran können die Moleküle aus der Umgebung in die Zelle gelangen. Die Löcher schließen sich durch die flüssigkristallinen Eigenschaften der Membran wieder und die Zelle überlebt. Diese Methode wird zum Beispiel zum Gentransfer genutzt. Verschiedene Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen wurden zur reversiblen Perforation von lebenden Zellen verwendet. Kontinuierliche Laser mit 488 nm Wellenlänge werden in Kombination mit dem absorbierenden Farbstoff Phenol-Rot eingesetzt [105,106]. Die Farbstoffkonzentration ist wesentlich höher als die anderer absorbierender Moleküle der Zelle, so dass ein gezieltes kurzzeitiges (1-2 min [105] bzw. 5 min [106], abhängig vom Zelltyp) Schmelzen der Zellmembran möglich ist. Eine direkte und reversible Perforation ist mit gepulsten Nanosekundenlasern mit Wellenlängen von 355 nm [104], 532 nm [107] und 1.064 nm [108] sowie mit Femtosekundenlasern [109,110] und sogar mit Laserdioden mit violetterem Laserlicht von 405 nm [111] möglich. Durch Kombination einer optischen Falle mit dieser Perforationstechnik wird die Fusion zweier Zellen ermöglicht [112]. Sogar die gezielte Entfernung einzelner Zellbestandteile ohne Beeinträchtigung der Zellvitalität ist mit Laserlicht möglich (siehe Abb. 2-6 D). Verwendet wurde hierzu ein Femtosekundenlaser mit 800 nm Wellenlänge und einer Lichtintensität von $10^{12} \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [101].

Laserlicht einer Wellenlänge um 800 nm wird demnach einerseits zur Mikrosezierung und Entfernung einzelner Zellbestandteile, andererseits für optische Fallen und zur zerstörungsfreien Manipulation von Zellen und Zellbestandteilen verwendet (siehe Abb. 2-6). Dies ist möglich, da nur bestimmte Zellbestandteile diese Wellenlänge absorbieren. Zudem benötigen optische Fallen wesentlich geringere

Lichtintensitäten (z. B. $10^7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [85]) im Vergleich zur Mikrosezierung (z. B. $10^{12} \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ [101]). Bei diesen geringeren Intensitäten überleben Zellen eine kurzzeitige Manipulation. Es ist jedoch eine lokale Erwärmung durch die absorbierenden Zellbestandteile möglich, was abhängig von der Wellenlänge, der Intensität und der Manipulationsdauer negative Auswirkungen auf die Zellaktivität haben kann.

Lebende Zellen reagieren auf große Temperaturerhöhung sehr empfindlich. Die optimale Temperatur vieler lebender Organismen liegt bei 37°C . Eine Erwärmung auf 70°C bis 100°C führt zu einer Denaturierung der Proteine und Nukleinsäuren sowie zur verstärkten Durchlässigkeit der Zellmembran, was den Tod der Zelle zur Folge hat [113]. Durch Temperaturen über 100°C , zum Beispiel durch lokale Absorption von Laserlicht an Chromophoren oder absorbierenden Partikeln innerhalb der Zellen, erfolgt eine Verdampfung des Wassers der Zelle. Dies ist mit einer starken Volumenzunahme verbunden, was zur physikalischen Zerstörung und somit ebenfalls zum Tod der Zellen führt, auch wenn die Erwärmung lokal begrenzt ist [114].

Nicht nur durch diese starken Temperaturerhöhungen auf über 70°C werden lebende Zellen beeinflusst. Bereits eine geringe Erwärmung auf über 40°C ist für lebende Zellen mit Stress verbunden. Viele Vorgänge innerhalb der Zellen werden dadurch beeinflusst, wie die Funktion der Ionenkanäle, die Übertragungsleistung der Synapsen und die Absonderung von Zellsekreten [7]. Zellen reagieren auf die Temperaturerhöhung unter Aktivierung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors, welcher zu einer verstärkten Synthese von Hitzeschock-Proteinen führt [115]. Diese Proteine gehören zu den ältesten und am weitesten verbreiteten Schutzsystemen lebender Organismen. Sie regulieren die Neuordnung von fehlerhaft gefalteten und die Entfernung von irreparabel zerstörten Proteinen und kontrollieren den natürlichen Zelltod [116]. Dieser erfolgt entweder durch Nekrose oder durch Apoptose. Bei der Nekrose, auch als plötzlicher Zelltod bezeichnet, löst sich die Zellmembran auf und der Zellinhalt wird freigesetzt, wodurch eine Entzündungsreaktion im benachbarten Gewebe einsetzt. Durch die Apoptose, den programmierten Zelltod, bleibt der Zellinhalt innerhalb der toten Zelle, wodurch keine Entzündung auftritt. Sie bietet einem Organismus die Möglichkeit, durch Opfern einer Zelle, welche zum Beispiel

krankhaft verändert ist, die restlichen Zellen zu schützen. Durch die schützende Rolle der Hitzeschock-Proteine für die Zelle gibt es viele Beispiele, wie sie die Apoptose verhindern und das Überleben der Zelle sichern. Es gibt aber auch einige Beispiele, in denen sie sogar die Apoptose auslösen. Beide Formen des Zelltodes sind eng miteinander verbunden, denn beide können die gleichen Ursachen haben, durch die gleichen Mechanismen verhindert werden und in die jeweils andere Form wechseln [117].

Der Zelltod als Folge von stark erhöhten Temperaturen kann als eine künstliche Nekrose angesehen werden, ausgelöst durch eine künstliche Gerinnung der Zellbestandteile [113]. Hingegen führen geringere Temperaturerhöhungen zwischen 40 °C und 70 °C, besonders bei lokal begrenzter Erwärmung, nicht direkt zum Zelltod. Dennoch kann infolge des Stresses durch die Hitzeschock-Proteine künstlich eine Apoptose ausgelöst werden, wenn eine Zelle über einen längeren Zeitraum erhöhten Temperaturen ausgesetzt wird.

Untersuchungen zu den Auswirkungen einer geringen oder sehr lokalen Erwärmung innerhalb von Zellen sind besonders im Zusammenhang mit den zur zerstörungsfreien Manipulation von lebenden Zellen genutzten optischen Fallen von Interesse. Die durch das stark fokussierte Laserlicht hervorgerufene Erwärmung von Wasser, einem Hauptbestandteil der Zellen, ist sehr gering. Zum Beispiel ergibt eine numerische Abschätzung, dass Wasser durch Laserlicht von 850 nm und 100 mW, fokussiert durch ein Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2, nach 1 s um 0,2 °C und nach 10 s um 0,23 °C erwärmt wird [118]. Dennoch kann das Laserlicht zu negativen Effekten für die Zellen führen. Eine Abnahme der Aktivität durch die Manipulation in einer optischen Falle wurde für verschiedene Zelltypen, wie zum Beispiel Eizellen [119], Spermien [120] oder auch Bakterien [121], nachgewiesen. Neben der Laserintensität und der Dauer der Bestrahlung wird die Zellaktivität auch sehr stark durch die verwendete Wellenlänge bestimmt. Für diese drei Zellarten wurde ein Maximum der Zellaktivität für Wellenlängen zwischen 800 nm und 850 nm festgestellt. Zum Beispiel führen innerhalb einer optischen Falle mit einem Fokus kleiner als 1 µm und 88 mW Laserleistung Wellenlängen um 760 nm zu einem vollständigen Verlust der Zellaktivität von Eizellen nach bereits 1 min

Manipulationszeit. Hingegen beträgt die Zellaktivität von Eizellen nach der Manipulation mit einem 820 nm Laser mit 88 mW Leistung, fokussiert auf weniger als 1 μm Durchmesser, nach 1 min Manipulationszeit noch 100 %, nach 10 min 50 % und nach 20 min Manipulationszeit nur noch 20 %. Mit 180 mW Laserleistung sinkt die Zellaktivität nach 1 s auf 75 %, nach 10 min auf 20 % und nach 20 min auf 10 % [119].

Diese Untersuchungen zeigen, dass neben der Wahl einer optimalen Wellenlänge auch möglichst kurze Belichtungszeiten und geringe Laserintensitäten notwendig sind, um die Aktivität der Zellen zu erhalten. Dies gilt nicht nur für die optischen Fallen, sondern auch für andere zerstörungsfreie Anwendungen von Laserlicht. Für das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prinzip der lichtinduzierten Erwärmung ist es ebenfalls notwendig, dass das Laserlicht die Aktivität der Zellen nicht beeinträchtigt, da die Manipulation ausschließlich auf indirektem Wege durch die Erwärmung der μ -Heizplatten erfolgen soll. Daher wurden für die Versuche Belichtungszeiten von maximal 2 s gewählt. Gleichzeitig war die Laserintensität des verwendeten Diodenlasers mit maximal $3 \cdot 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ (56 mW auf 5 μm Durchmesser) deutlich geringer als die üblicherweise bei der optischen Manipulation eingesetzten Intensitäten (z. B. $10^7 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ [85]). Daher ist eine direkte Beeinflussung der Zellen und somit eine Abnahme der Zellaktivität durch das Laserlicht nicht zu erwarten.

2.3 Erwärmen innerhalb von miniaturisierten Systemen

Für viele Anwendungen der Mikrosysteme ist eine genaue Einstellung der Temperatur notwendig. Chemische und biochemische Reaktionen benötigen eine möglichst konstante und einheitliche Temperatur im gesamten Reaktionsraum, um Nebenprodukte zu vermeiden. Eine schnelle und effektive Temperaturerhöhung führt in vielen Systemen zu erhöhten Reaktionsgeschwindigkeiten und erhöhten Ausbeuten. Gleichzeitig muss bei einigen Reaktionen, besonders bei enzymatisch katalysierten, ein optimaler Temperaturbereich eingehalten werden, um maximale Ausbeuten zu erhalten. Insbesondere die Denaturierung von Proteinen, wozu auch die Enzyme gehören, führt zu einer starken Abnahme der Ausbeute bei Erhöhung der Temperatur über das Optimum hinaus. Ein Beispiel für die Notwendigkeit der Einhaltung der benötigten Temperaturen ist die Vervielfältigung von DNA durch die Polymerase Kettenreaktion

(*polymerase chain reaction*, PCR). Hierbei müssen Temperaturzyklen von drei unterschiedlichen Temperaturen durchlaufen werden, um Fehler bei der Vervielfältigung, zum Beispiel durch unvollständige Reaktion, und eine Denaturierung der Enzyme zu vermeiden [122].

Eine lokale Einstellung der Temperatur ermöglicht eine kontinuierliche Durchführung solcher Reaktionen, indem die Reaktionslösung in Mikrokanälen nacheinander Bereiche unterschiedlicher Temperatur durchläuft [123]. Ebenso ist sie für eine Parallelisierung von Reaktionen notwendig, wenn viele verschiedene Reaktionskammern unabhängig von einander temperiert werden müssen [13]. Eine kontrollierte, temperaturabhängige Absorption von Proteinen an Hydrogelen zur Trennung und Anreicherung macht eine lokale Erwärmung für die Analytik interessant [124]. Eine weitere Anwendung für eine lokale Erwärmung in der Analytik ist die Temperaturgradient-Fokussierung. Dabei erfolgt die Aufkonzentration und Trennung verschiedener Analyten durch einen lokal variierten elektrophoretischen Fluss, welcher einem Flüssigkeitsstrom entgegengesetzt wird [125]. Als elektrophoretischer Fluss wird die durch Ladung induzierte Bewegung von Flüssigkeiten im elektrischen Feld bezeichnet. Zur Trennung der ionischen Analyten ist ein Gradient im elektrophoretischen Fluss notwendig. Dieser wird bei der Temperaturgradient-Fokussierung durch eine Pufferlösung mit einer temperaturabhängigen Ionenstärke erzeugt, sobald diese einem Temperaturgradienten ausgesetzt wird [12]. Entsprechend der Ionenstärke des Analyten heben sich die entgegengesetzten Ströme an einer bestimmten Stelle auf, so dass der Analyt an dieser Stelle angereichert wird. Lokale Temperaturerhöhungen innerhalb von Mikrostrukturen werden zudem auch zur Realisierung von Pumpen [14,126], Mischern [127] und Ventilen [128] genutzt.

Zur Erwärmung begrenzter Bereiche innerhalb von Mikrostrukturen werden meist dünne Ohmsche Widerstände [13,14], Hochfrequenz-Wechselspannung [129] oder Peltier Elemente [11,12] eingesetzt. Alle diese Methoden benötigen direkte Anschlüsse zu einem Kontrollgerät. Wenn mehrere kleine Teilbereiche innerhalb der Mikrostruktur zu erwärmen sind, kann dies schnell zu sehr komplexen Systemen führen [124]. Zudem sind diese Heizelemente unflexibel im Hinblick auf den zu erwärmenden Bereich. Die

Anzahl und die Größe dieser Bereiche werden bereits bei der Chipherstellung festgelegt und können nicht nachträglich variiert werden.

Deshalb wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, welche keine direkten Kontakte vom Mikrochip zu einem Kontrollsystem benötigen und somit ein flexibles Erwärmen unterschiedlicher Bereiche innerhalb von Mikrostrukturen ermöglichen. Zum Beispiel ist ein Erwärmen von Wassertropfen von einigen Mikrolitern Volumen in Mineralöl durch amphiphile magnetische Mikropartikel möglich. Die Partikel ordnen sich spontan an der Oberfläche der Wassertropfen an. Eine Erwärmung von 25 °C (Raumtemperatur) auf über 80 °C innerhalb von 5 min erfolgt durch Anlegen eines oszillierenden externen elektromagnetischen Feldes von 338 kHz mit 3 kW übertragener Leistung [130].

Vielfach wird zum kontaktfreien und lokalen Erwärmen innerhalb von Mikrostrukturen Licht verwendet. Durch Absorption des Lichts wird dessen Energie in Wärme umgewandelt, wobei die direkte und die indirekte Erwärmung zu unterscheiden sind. Durch Absorption von Licht an Molekülen erfolgt eine direkte Temperaturerhöhung von Reaktionslösungen. Die Temperaturerhöhung der Reaktionslösung durch absorbierende Partikel oder Mikrostrukturen ist eine indirekte Erwärmung.

Eine direkte Erwärmung von Reaktionslösungen innerhalb von Mikrostrukturen wird durch infrarotes Licht ermöglicht, zum Beispiel bei Enzymreaktionen [15]. Infrarotes Licht ist auch für die Kontrolle der Temperaturzyklen von drei unterschiedlichen Temperaturen während der PCR interessant [16,131]. Durch fokussiertes infrarotes Licht hoher Intensität kann Wasser auf über 100 °C erwärmt und verdampft werden, wobei es dann explosionsartig zur Blasenbildung kommt [17].

Eine Alternative zum direkten Erwärmen der Reaktionslösung ist die indirekte Erwärmung unter Verwendung von absorbierenden Partikeln. Ein Vorteil liegt in der besseren Kontrolle des zu erwärmenden Bereiches und der räumlichen Auflösung, da diese durch die Partikelgröße, und nicht von dem mit Licht bestrahlten Bereich, bestimmt werden. Zudem ist durch die Wahl entsprechender absorbierender Materialien eine Erwärmung bei geringeren Lichtintensitäten als bei der Absorption an

Molekülen der Reaktionslösung möglich. Die Wechselwirkungen zwischen Laserlicht und dem zu erwärmenden Material kann durch die Wahl einer entsprechenden Wellenlänge und durch Reduzierung der Lichtintensität minimiert werden, so dass die Erwärmung ausschließlich auf indirektem Weg erfolgt.

Absorbierende Partikel werden bereits für eine Reihe von Anwendungen eingesetzt, wie zum Beispiel bei photothermischen Aufnahmen von Gold-Kolloiden [18], bei der Detektion von Proteinen ohne Fluoreszenzmarker [19], zur thermischen Aktivierung von molekularen Motoren [20] oder zur optischen Kontrolle der Flüssigkeitsströme in Mikrokanälen [21,132]. In der Zellbiologie werden sie zum Beispiel zur selektiven Entfernung lebender Zellen [133] oder zur Freisetzung von eingekapselten Substanzen innerhalb von lebenden Zellen eingesetzt [134]. Üblicherweise eingesetzte Materialien sind hierbei Graphit [132,135] oder Metalle wie Gold, Platin, Aluminium [20] oder Eisen [133].

Die natürlich in Zellen vorkommenden absorbierenden Chromophore und absorbierenden Partikel können ebenfalls zum lokalen Erwärmen genutzt werden. Zum Beispiel absorbieren Melanosome, das sind in der Haut vorkommende und von Membranen umhüllte Pigmentkörner, Licht von 200 nm bis 1.200 nm Wellenlänge, wobei der Absorptionskoeffizient mit zunehmender Wellenlänge abnimmt [113]. Daher können Zellen, die Melanosome enthalten oder in direkten Kontakt mit einem Melanosom gebracht wurden, durch Bestrahlen mit Licht dieses Wellenlängenbereiches selektiv getötet werden, während andere Zellen überleben [114]. Eine Fokussierung des Lichts auf die einzelnen zu entfernenden Zellen ist nicht notwendig.

Werden Mikropartikel zum Erwärmen verwendet, so sind sie nach ihrer Anwendung oft schwer zu entfernen. Eine interessante Methode, dieses Problem zu umgehen und die Partikel trotzdem möglichst nah an den zu erwärmenden Bereich zu bringen, besteht in der Nutzung einer Mikropipette, deren Spitze mit absorbierenden Partikeln gefüllt wurde [7]. Allerdings ist diese Methode sehr langsam, wenn viele einzelne Punkte erwärmt werden sollen.

Ein indirektes Erwärmen innerhalb von Mikrostrukturen wurde vereinzelt bereits auch durch absorbierende Materialien auf Oberflächen ermöglicht. Zum Beispiel wurde

durch eingetrocknete schwarze Tinte, welche hauptsächlich aus Kohlenstoffpartikeln besteht, eine lokale Erwärmung zur Durchführung von Enzymreaktionen verwirklicht [136]. Dabei trennte eine Glasschicht die Tinte von der Reaktionslösung. Zur Nutzung von Siliziumoxyd- oder Goldschichten zum lokalen Erwärmen von biologischen Proben erfolgten bislang nur theoretische Betrachtungen [137,138]. Allerdings wird in der Elektrochemie die sprunghafte Erwärmung von Elektroden durch Absorption von Laserlicht genutzt, um dynamische Oberflächenprozesse an Elektroden zu untersuchen [139]. Alle diese Methoden nutzen jedoch keine mikrostrukturierten Materialien für die lokale Erwärmung, wie sie bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode verwendet werden. Die Methoden zur Herstellung der verwendeten Mikrostrukturen werden im nachfolgenden Kapitel 2.4 vorgestellt.

2.4 Herstellungsmethoden für Mikrostrukturen

Um das Ziel dieser Arbeit, ein kontrolliertes Erwärmen kleiner Volumina von wenigen Femtolitern, zu erreichen, mussten absorbierende Mikrostrukturen definierter Größe hergestellt werden. Eine verbreitete Methode zur Mikrostrukturierung ist die Photolithographie. Nachfolgend werden diese (Kapitel 2.4.1) sowie die Möglichkeiten zur Herstellung der als μ -Heizplatten verwendeten Mikrostrukturen aus Gold (Kapitel 2.4.2) und aus Kohlenstoff (Kapitel 2.4.3) vorgestellt.

Durch die lokale Erwärmung sollten neben lebenden Zellen auch Systeme aus künstlicher Zellmembran, den Lipiden, manipuliert werden. Die Herstellung der zur Erzeugung dieser Lipid-Schläuche benötigten Mikrostrukturen aus Silizium wird abschließend im Kapitel 2.4.4 beschrieben.

2.4.1 Photolithographie

Die Photolithographie ist ein lithografisches Reproduktionsverfahren, bei dem mittels Belichtung Muster auf Materialien aufgebracht werden. Diese Methode stammt ursprünglich aus der Drucktechnik und wird zur Mikrostrukturierung in der Halbleitertechnik eingesetzt.

Bei der Photolithographie wird eine Schicht eines photosensitiven Polymers, dem Photolack, auf das Substrat aufgetragen und durch eine photolithographische Maske belichtet. Nach dem Entwickeln des Photolacks ist dieser entsprechend der Maske strukturiert. Erfolgt nun eine chemische Behandlung des Substrates, so wird seine Oberfläche durch die Polymerschicht geschützt und die Strukturen der Maske werden auf das Substrat übertragen. Abschließend wird der restliche Photolack durch geeignete Lösungsmittel entfernt.

Für das Aufbringen der Polymerschicht auf das Substrat gibt es verschiedene Methoden, wie zum Beispiel das Aufsprühen oder die Verwendung einer Lackschleuder. Diese für die Strukturierung als Schutzschicht verwendeten Polymere reagieren auf Licht bestimmter Wellenlängen mit Veränderungen ihrer chemischen Struktur. Üblicherweise reagieren sie auf UV-Licht, weshalb oft das 365 nm Licht von Quecksilber-Dampflampen zum Belichten eingesetzt wird [24].

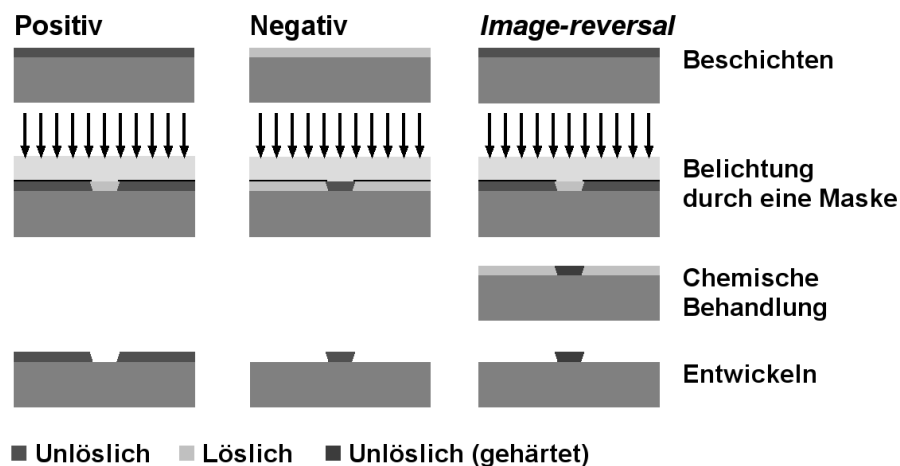


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der Strukturierung unter Verwendung eines positiven, eines negativen und eines *image-reversal* Photolacks.

Auf Grund der unterschiedlichen Änderung ihrer Löslichkeiten durch das Belichten werden drei Arten dieser Polymere unterschieden, deren nach dem Entwickeln resultierenden Strukturen schematisch in Abb. 2-7 dargestellt sind. Bei einem positiven Photolack wird durch Licht die Löslichkeit im Entwickler erhöht und der Photolack wird in den belichteten Bereichen vom Entwickler entfernt. Bei einem negativen Photolack wird durch Vernetzung des Polymers die Löslichkeit geringer, so dass er nach dem Entwickeln nur noch in den belichteten Bereichen vorhanden ist. Eine

dritte Variante wird als *image-reversal* Photolack bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen positiven Photolack, bei dem nach dem Belichten durch chemische Reaktionen die belichteten Bereiche unlöslich und die unbelichteten löslich werden können. Dies ermöglicht die Herstellung kleinerer Strukturen und eine flexiblere Verwendung, da er als positiver und negativer Photolack Anwendung finden kann.

Die zur Strukturierung des Photolackes benötigte Maske ist normalerweise eine Glasplatte mit Chromstrukturen, welche kein Licht durchlassen. Die Herstellung kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Oft wird ein mit Chrom und Photolack beschichtetes Glas verwendet, wobei die Strukturierung des Photolackes durch einen Laser Punkt für Punkt erfolgt. Nach dem Entwickeln des Photolackes wird das Chrom in den Bereichen der Maske, in denen der Photolack entfernt wurde, ebenfalls entfernt. Die resultierenden Strukturen haben je nach Laser eine minimale Linienbreite um 1 μm . Feinere Strukturen von etwa 200 nm können durch Belichten mittels Elektronenstrahlen erreicht werden, wobei die Kosten und der Zeitaufwand deutlich höher sind. Für gröbere Strukturen können von Laserdruckern beschriebene Folien verwendet werden. Diese sind besonders kostengünstig und schnell herzustellen. Ein 600 dpi Laserdrucker schafft eine Auflösung von 120 μm , aber bereits ein 4.800 dpi Drucker erreicht 20 μm [24]. Diese Folien sind allerdings schwer zu reinigen, kratzempfindlich und sehr biegsam, was ihre Nutzung als Maske erschwert. Dennoch können sie zur Herstellung einer Glasmaske verwendet werden, welche anschließend diese Nachteile nicht besitzt.

Teilweise werden die mit Photolack strukturierten Substrate direkt genutzt. Zum Beispiel finden mit Photolack strukturierte Siliziumwafer als Masken zur Strukturierung von Polymeren Verwendung. Eine weitere Möglichkeit zur direkten Nutzung von strukturiertem Photolack ist die Herstellung von Kohlenstoffstrukturen, welche im Kapitel 2.4.3 vorgestellt wird.

Zumeist erfolgt nach dem Aufbringen und Strukturieren des Photolacks die eigentliche Strukturierung des Substrates durch Entfernen von Substrat in den nicht durch Photolack geschützten Bereichen. Je nach Substrat und den geforderten Ansprüchen an die Tiefe der Strukturen im Verhältnis zur Breite, dem so genannten Aspektverhältnis, und an die Form der Seitenwände, finden verschiedene Methoden

Anwendung. Einige Beispiele zur Mikrostrukturierung von Silizium werden im Kapitel 2.4.4 vorgestellt.

2.4.2 Herstellung von Metall-Mikrostrukturen

Mikrostrukturierte Metallschichten, wie sie aus der Mikroelektronik bekannt sind, werden auch für Mikrosysteme verwendet. Viele Anwendungen in der Analytik, der Bioanalytik oder Biologie benötigen Metallstrukturen zur Erzeugung eines elektrischen Feldes [25,66], als Detektoren [22] oder auch zum Erwärmen [13,14].

Zur direkten Beschichtung auf Dielektrika wie Silizium oder Glas sind nur bestimmte Metalle geeignet, da viele nicht gut an der Oberfläche haften [24]. Aus diesem Grund wird oft eine Zwischenschicht, die Haftschrift, verwendet, welche sowohl am Metall, als auch am Dielektrikum, gut haftet. Einige Metalle können aber durch diese Haftschrift hindurch diffundieren. Soll dies verhindert werden, so ist in solchen Fällen eine Diffusionsbarriere, also eine dritte Zwischenschicht zwischen Haftschrift und Metall, notwendig.

Für Mikrosysteme werden oft Strukturen aus Aluminium verwendet, da es wegen seiner Stabilität bereits lange in der Mikroelektronik Anwendung findet. Ebenfalls oft verwendet wird Gold. Als Edelmetall ist es sehr oxidationsbeständig und die Beschichtung ist verhältnismäßig einfach. Zudem entstehen beim Beschichten geringere Spannungen innerhalb des Goldes, so dass dickere Schichten von bis zu 30 µm erreicht werden können [24]. Da Gold an den meisten in der Miniaturisierung verwendeten Oberflächen nicht gut haftet, muss eine Haftschrift, zumeist aus Chrom oder Titan, verwendet werden. Soll Gold auf Silizium verwendet werden, so ist eine zusätzliche Diffusionsbarriere notwendig, damit das Gold nicht in das Silizium diffundiert. Titan stellt keine gute Diffusionsbarriere dar, während Chrom stabiler ist. Für die Arbeit bei höheren Temperaturen eignet sich Platin als Haftschrift und Diffusionsbarriere [24].

Die eigentliche Beschichtung kann auf verschiedensten Wegen erfolgen. In Forschungslaboratorien werden die dünnen Metallschichten oft entweder durch thermisches Verdampfen, auch als Bedampfen bezeichnet, oder durch das so genannte

Sputtern hergestellt. Beim Bedampfen wird das Metall im Vakuum über seinen Schmelzpunkt hinaus erhitzt, so daß sich ein Dampf aus Metall bilden kann. Dieser setzt sich anschließend am kälteren Substrat ab. Zum Sputtern wird das Metall und das Substrat innerhalb einer Plasmakammer plaziert. Das Metall wird mit positiven Ionen aus einem Plasma beschossen. Dadurch gelangen Atome aus dem Metall in das Plasma, wo sie durch die Plasmaatome beschleunigt werden. Möglichst dicht am Plasma befindet sich auch das Substrat, welches durch die auftreffenden Metallatome beschichtet wird.

Um mikrostrukturierte Metallschichten zu erhalten, wird zumeist der *lift-off* Prozess verwendet. Dazu wird zuerst das Substrat mit Photolack beschichtet und mittels Photolithographie strukturiert. Anschließend erfolgt die Beschichtung mit dem gewünschten Metall oder den Metallschichten. Abschließend wird der Photolack entfernt, wodurch auch das Metall in den zuvor mit Photolack bedeckten Bereichen entfernt wird.

Lässt sich das Metall relativ einfach vom Substrat entfernen, wie zum Beispiel Chrom, so kann auch das gesamte Substrat zuerst mit Metall überzogen werden. Anschließend wird mit Photolack beschichtet und dieser photolithographisch strukturiert. Nun kann das Metall in den nicht mit Photolack bedeckten Bereichen entfernt werden, während in den anderen Bereichen der Photolack die Metallschicht schützt. Abschließend muss nur noch der verbliebene Photolack entfernt werden, um die gewünschten Metall-Mikrostrukturen zu erhalten.

2.4.3 Mikrostrukturen aus Kohlenstoff

Kohlenstoffstrukturen finden in der Miniaturisierung bislang hauptsächlich als elektrochemische Detektoren Verwendung [140,141]. Diese sind sehr sensitiv und haben den großen Vorteil, dass Moleküle direkt detektiert werden können. Im Gegensatz hierzu ist beispielsweise bei der optischen Detektion oft eine Derivatisierung mit Fluoreszenzmarkern notwendig. Zudem ändert sich die Funktionsweise der Elektroden durch die Miniaturisierung nicht. Im Vergleich zu Metallelektroden haben sich Elektroden aus Kohlenstoff besonders für die Amperometrie als vorteilhaft

herausgestellt. Sie sind langlebiger [140] und besitzen eine geringere Überspannung, so dass ein größerer Spannungsbereich zur Verfügung steht.

Für die Amperometrie in Mikrostrukturen wurden erfolgreich Elektroden aus herkömmlichen Materialien wie Kohlenstoff-Fasern [140] oder Kohlenstoff-Paste [141] verwendet. Mikrostrukturen aus Kohlenstoff mit mindestens 100 μm Dicke können aus herkömmlichen Kohlenstoff-Tinten durch Siebdruck auf Keramikplatten hergestellt werden. Die Herstellung ist schnell, kostengünstig und der Detektor kann jederzeit durch das Austauschen der Keramikplatte samt Elektroden erneuert werden [142]. Durch ihre Dicke sind diese Strukturen aber nur durch exaktes Positionieren in die Mikrokanäle in die Mikrostrukturen integrierbar. Integrierbare, dünne Kohlenstoffstrukturen entstehen aus Kohlenstoff-Tinte durch Füllen von reversibel gebundenen Mikrostrukturen aus PDMS auf Glas. Nach dem Trocknen der Tinte kann das PDMS entfernt werden und die Kohlenstoffstruktur bei 120 $^{\circ}\text{C}$ aushärten. Die Dicke der resultierenden Struktur wird durch die Mikrostruktur aus PDMS bestimmt, abzüglich der Verluste durch das Verdunsten des Lösungsmittels. So wurden zum Beispiel Elektroden mit 6 μm Dicke aus 12 μm dicken Kanälen hergestellt, während Elektroden mit 90 μm Dicke aus 120 μm dicken Kanälen entstanden [143]. Komplexe Kohlenstoffstrukturen sind aber auch mit dieser Methode nur unter sehr großem Aufwand herstellbar.

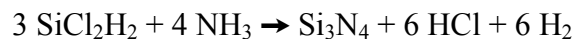
Komplexe Strukturen aus Kohlenstoff können durch Pyrolyse von strukturierten Polymeren hergestellt werden. So wurden aus PDMS bei 900 $^{\circ}\text{C}$ unter Ausschluss von Sauerstoff Elektroden aus glasartigem Kohlenstoff hergestellt. Diese Kohlenstoffstrukturen waren besonders beständig gegenüber hohen Temperaturen [144]. Aus Photolacken entstanden bei Temperaturen bis 1.100 $^{\circ}\text{C}$ Elektroden aus amorphem Kohlenstoff [145]. Die Form und Größe der resultierenden Kohlenstoffstrukturen wird durch die Polymerstrukturen vorgegeben, abzüglich von bis zu 50 % Verlust durch die Pyrolyse. Dadurch ist diese Methode besonders flexibel und erlaubt sogar die Herstellung von freistehenden Strukturen wie Kragträgern (*Cantilever*) als Mikroresonatoren [144]. Wegen der Einfachheit und der Flexibilität wurde diese Methode für die Herstellung der μ -Heizplatten aus Kohlenstoff im Rahmen dieser Arbeit gewählt.

2.4.4 Mikrostrukturen aus Silizium

Ein Standardmaterial für Mikrosysteme ist Silizium. Seine Herstellung in sehr hoher Reinheit von bis zu 99,99999 % und Methoden zur Strukturierung sind aus der Mikroelektronik bekannt. Das Ausgangsmaterial ist zumeist ein Silizium-Einkristall, der in scheibenförmige Wafer von typischerweise 200 µm bis 600 µm Dicke und 2 Zoll bis 5 Zoll Durchmesser geschnitten wird [24].

Die eigentliche Strukturierung geschieht in drei Teilschritten. Zuerst wird auf dem Silizium eine Schutzschicht hergestellt. Anschließend wird diese mit einem Photolack beschichtet und durch photolithographische Prozesse strukturiert. Abschließend erfolgt die eigentliche Strukturierung durch Entfernen des Siliziums in den Bereichen, die nicht von der Schutzschicht bedeckt sind.

Als Schutzschicht findet zumeist Siliziumnitrid Verwendung, da es stabil ist und daher als Maske für das KOH-Ätzen genutzt werden kann. Die Beschichtung erfolgt durch *chemical vapor deposition* (CVD) nach folgender Gleichung:



Dabei wird der Siliziumwafer den gasförmigen Chemikalien ausgesetzt, welche an der Oberfläche reagieren. Durch erhöhte Temperaturen kann die Oberflächendiffusion der Reaktionsprodukte erhöht werden, was zu einer gleichmäßigeren Schichtbildung führt. Schichtdicken über 700 nm reißen auf Grund der starken Oberflächenspannung. Enthält die Schicht mehr Silizium, verringert sich die Oberflächenspannung, und Schichtdicken bis 3 µm können erreicht werden. Neben Siliziumnitrid, Silizium oder Siliziumoxid können unter anderem auch Metalle direkt auf den Wafer aufgebracht und strukturiert werden, um anschließend als Mikroelektroden verwendet zu werden. Auf die Beschichtung mit Metallen wurde im Kapitel 2.4.2 näher eingegangen.

Die Strukturierung des Siliziums erfolgt durch Ätzen. Dies kann, abhängig von der geforderten Kanal-Geometrie, isotrop, anisotrop, vertikal oder entsprechend der Kristallorientierung des Siliziums erfolgen, wie in Abb. 2-8 dargestellt. Dabei wird zwischen dem nasschemischen und dem trockenchemischen Ätzen unterschieden. Bei

dem nasschemischen Ätzen werden saure oder basische Lösungen verwendet. Die häufig verwendeten Flusssäurelösungen (HF) oder Mischungen aus Flusssäure und Salpetersäure (HNO_3) entfernen das Material gleichermaßen in vertikaler wie in lateraler Richtung, auch unterhalb der Schutzschicht, was zu halbrunden Seitenwänden führt. Diese isotropen Prozesse erlauben keine Kontrolle in lateraler Richtung und führen dadurch zu schlechten Aspektverhältnissen (Verhältnis von Höhe zur Breite der resultierenden Struktur). Basische Lösungen von Kaliumhydroxid (KOH) oder Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) führen zu unterschiedlichen Ätzraten in vertikaler und lateraler Richtung (anisotropes Ätzen), da das Material entlang der Kristallebenen entfernt wird. Je nach Orientierung der Siliziumkristalle innerhalb des Wafers können dadurch vertikale Seitenwände oder Winkel von $54,7^\circ$ erhalten werden.

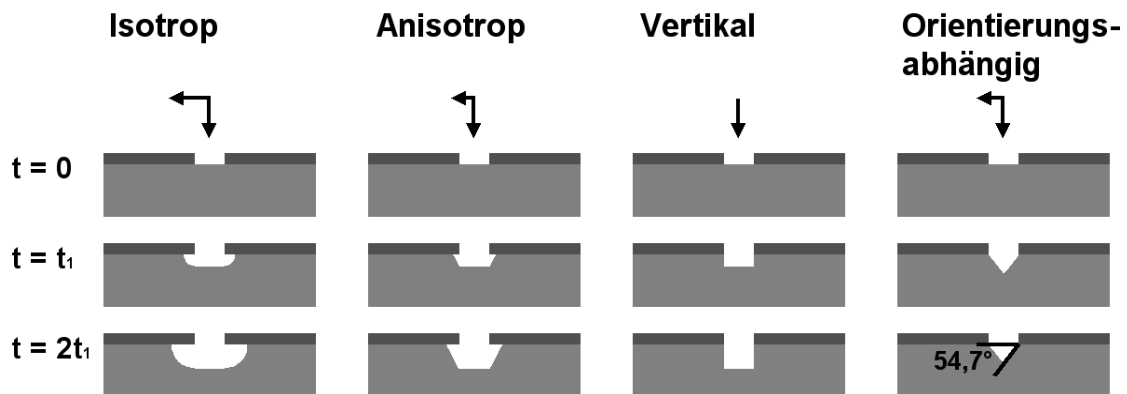


Abb. 2-8: Schematische Darstellung der resultierenden Profile für verschiedene Arten des Ätzens.

Eine Möglichkeit zur besseren Kontrolle über das Entfernen des Materials in lateraler Richtung bietet das trockenchemische Ätzen, wodurch höhere Aspektverhältnisse erreicht werden. Hierbei wird die reaktive Substanz nicht in einer Lösung, sondern in der Gasphase gebildet. In einem Plasma dissoziieren die hierfür verwendeten, zumeist fluor- oder chlorhaltigen Gase in reaktive, geladene Bestandteile, welche durch ein elektrisches Feld auf die Substratoberfläche beschleunigt werden. Ist diese Beschleunigung besonders groß, erfolgt dort, wo die Atome auf die Oberfläche treffen, vorwiegend ein physikalisches Ätzen, wobei das resultierende Ätzprofil anisotrop ist. Ist die Beschleunigung gering und erfolgt das Ätzen hauptsächlich auf Grund chemischer Reaktionen, entsteht ein isotropes Ätzprofil. Erfolgt das Ätzen gleichermaßen durch chemische Reaktion als auch durch physikalisches Ätzen, so ist

die Ätzrate am höchsten. Diese Variante wird als Reaktivionen-Ätzen, *reactive ion etching* (RIE) bezeichnet. Nachteilig beim trockenchemischen Ätzen sind die im Vergleich zum nasschemischen Ätzen langsameren Ätzraten und der hohe instrumentelle Aufwand. Dafür ist die Durchführung sicherer und es entsteht eine geringere Menge gefährlicher Abfallstoffe.

Nach der Strukturierung des Siliziums und dem Entfernen des verbleibenden Photolackes sowie der restlichen Schutzschicht kann der mikrostrukturierte Siliziumchip verwendet werden.

3 Lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln

Um das im Kapitel 1 genannte Hauptziel dieser Arbeit, ein kontrolliertes Erwärmen kleiner Volumina von wenigen Femtolitern, zu erreichen, wurde die Methode des lichtinduzierten Erwärmens eingesetzt, welche im nachfolgenden Kapitel 3.1 vorgestellt wird. Als absorbierende Strukturen wurden zuerst Graphitpartikel verwendet. Jedoch sollten sie nicht als frei bewegliche Partikel eingesetzt, sondern fixiert verwendet werden, damit sie nicht in die später verwendeten Lösungen mit lebenden Zellen oder künstlichen Zellsystemen aus Lipiden gelangen. Die Fixierung dieser Graphitpartikel erfolgte innerhalb einer dünnen Schicht des Elastomers PDMS. Die Beschreibung der Fixierung der verwendeten Graphitpartikel und der Herstellung der verwendeten Mikrochips erfolgt im Kapitel 3.2.1.

Die eigentliche Erwärmung erfolgte durch Absorption eines fokussierten Laserstrahles an diesen Graphitpartikeln oder an mikrostrukturierten Materialien. Gleichzeitig sollten die Effekte dieser Erwärmung mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden können. Hierfür war eine Weitfeldausleuchtung mit dem entsprechenden Anregungslicht notwendig. Daher wurde ein optischer Aufbau entwickelt, welcher lichtinduziertes Erwärmen und Fluoreszenzmikroskopie sowohl simultan als auch getrennt voneinander ermöglicht. Der optische Aufbau zum lichtinduzierten Erwärmen wird im Kapitel 3.2.2 und die Bestimmung des resultierenden Laserfokus im Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Es galt zu untersuchen, ob trotz dieser Fixierung und der Verwendung eines 830 nm Diodenlasers mit einer Laserleistung von maximal 56 mW die gewünschte Erwärmung erreicht werden kann. Hierzu erfolgten Untersuchungen in zwei Versuchsschritten. Zuerst wurden die Folgen des Bestrahlers der Graphitpartikel mit 830 nm Laserlicht untersucht, wenn sich oberhalb der Graphit-PDMS-Schicht nur Luft befand (Kapitel 3.3.1). Da für spätere Anwendungen besonders das Erwärmen von kleinen Flüssigkeitsmengen von Interesse war, wurde für den zweiten Versuchsschritt eine oberhalb der Graphit-PDMS-Schicht befindliche Reaktionskammer mit Wasser gefüllt und bestimmt, ob eine nachweisbare Erwärmung erreicht wurde (Kapitel 3.3.2). Eine Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 3.4.

3.1 Das Prinzip der lichtinduzierten Erwärmung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zum lokalen Erwärmen kleiner Volumina, im folgenden als lichtinduzierte Erwärmung bezeichnet, basiert auf der Absorption von Laserlicht an Mikropartikeln oder an mikrostrukturierten Materialien, den μ -Heizplatten. In Abb. 3-1 ist schematisch der entwickelte Aufbau zur lichtinduzierten Erwärmung dargestellt.

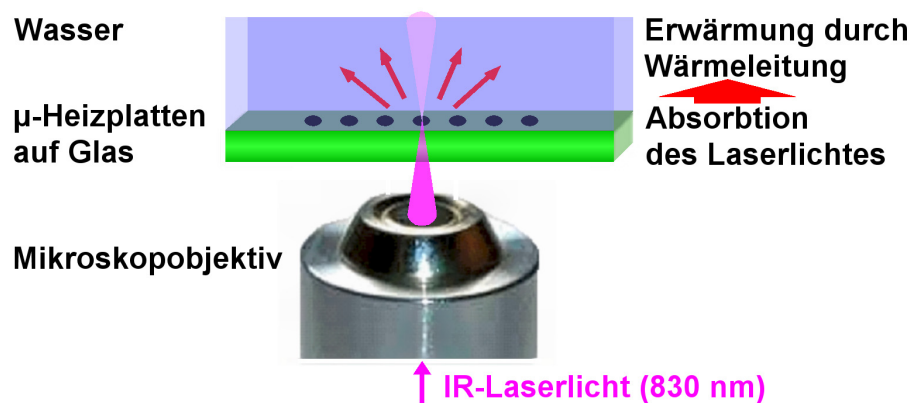


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Prinzips der lichtinduzierten Erwärmung an μ -Heizplatten. Ein durch das Objektiv eines Inversen-Lichtmikroskopes fokussierter Laserstrahl wird an Mikropartikeln oder an μ -Heizplatten absorbiert, welche diese Energie in Form von Wärme über Wärmeleitung an ihre Umgebung abgeben.

Im Vergleich zur direkten Erwärmung der Flüssigkeit oder zur Nutzung von frei beweglichen, absorbierenden Partikeln haben μ -Heizplatten einige Vorteile. Zum Beispiel wird keine Kontamination mit Partikeln notwendig bei gleichzeitiger sehr guter Kontrolle des zu erwärmenden Bereiches und der räumlichen Auflösung, welche im Wesentlichen von der Größe der Mikrostrukturen bestimmt werden. Ihr Nachteil liegt in der etwas geringeren Flexibilität in der Wahl der zu erwärmenden Bereiche. Da sie jedoch sehr leicht auch in großer Anzahl herstellbar sind, können sie in entsprechend hoher Zahl innerhalb der Mikrostrukturen verteilt werden, so dass dennoch ein flexibles Erwärmen ermöglicht wird. Im Gegensatz zum Material der μ -Heizplatten sollte das umgebende Material das Laserlicht möglichst nicht absorbieren, um mögliche Wechselwirkungen zu minimieren. Durch die Wahl einer entsprechenden Wellenlänge können diese Wechselwirkungen minimiert werden (siehe auch Kapitel 2.2.1), so dass die Erwärmung möglichst ausschließlich auf indirektem Weg erfolgt. Der zum Erwärmen verwendete 830 nm Laser wurde gewählt, da wässrige Lösungen erwärmt

werden sollten und Wasser 830 nm Licht kaum absorbiert, wie im Absorptionsspektrum erkennbar (siehe Abb. 3-2). Der Absorptionskoeffizient α ist mit $0,032 \text{ cm}^{-1}$ sehr gering [146]. Somit sollte die Bestrahlung der Probe zu keiner merklichen Erwärmung führen. Da letztlich lebende Zellen manipuliert werden sollen, gelten zudem die bereits im Kapitel 2.2.2 vorgestellten Überlegungen über mögliche Wechselwirkungen des Laserlichts mit den lebenden Zellen und die Folgen für die Zellaktivität. Neben der Wahl einer optimalen Wellenlänge sind danach möglichst kurze Belichtungszeiten und geringe Laserleistungen notwendig, um die Aktivität der Zellen zu erhalten.

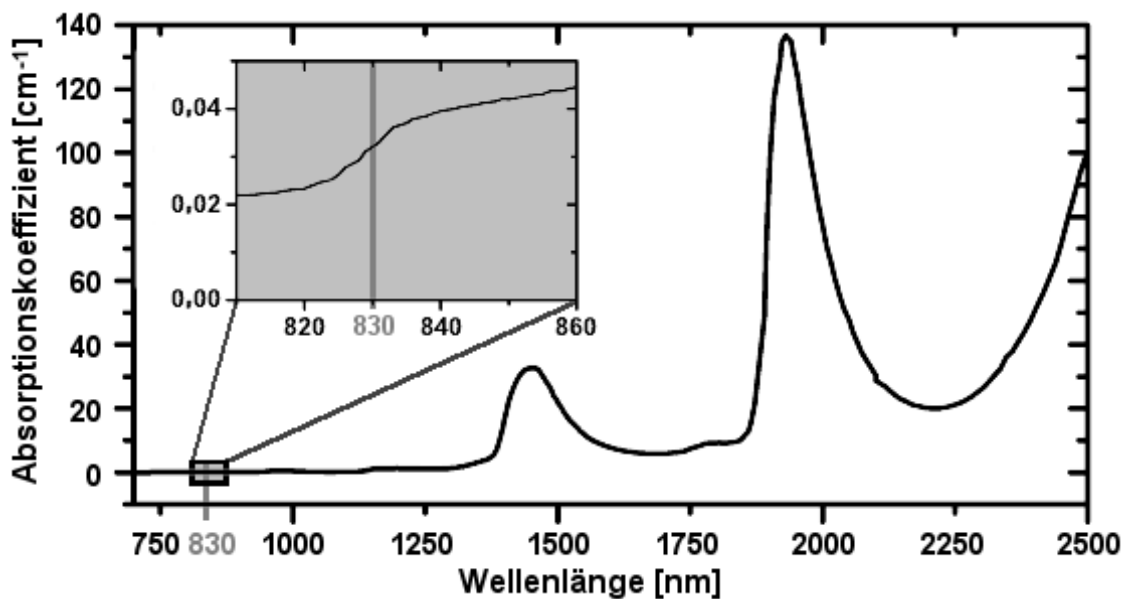


Abb. 3-2: Abhängigkeit der Absorption von der Wellenlänge für Wasser bei 22 °C nach Daten von Lou et al. [146]. Für 830 nm ist der Absorptionskoeffizient α mit $0,032 \text{ cm}^{-1}$ sehr gering.

Im Gegensatz zum Wasser und zu den lebenden Zellen müssen die μ -Heizplatten Licht dieser Wellenlänge von 830 nm besonders gut absorbieren. Durch die Energie des absorbierten Laserlichts erfolgt eine Erwärmung der absorbierenden Struktur, so dass sie wie eine Heizplatte wirkt. Durch Wärmeleitung erfolgt eine Erwärmung der Umgebung der μ -Heizplatte und somit auch eine Erwärmung der umgebenden Flüssigkeit. Die Wärmeabfuhr an die kältere Umgebung der μ -Heizplatte sollte schließlich zu einem stationären Temperaturprofil führen.

An die Materialien der μ -Heizplatten werden gleichzeitig verschiedenste Ansprüche gestellt. Die wichtigste Voraussetzung ist die Absorption von 830 nm Laserlicht und einer daraus resultierenden Erwärmung. Weiterhin sollten sich die

Materialien unter den Bedingungen in den Mikrostrukturen und durch das lichtinduzierte Erwärmen nicht verändern, so dass ihre Heizwirkung konstant bleibt. Um lebende Zellen manipulieren zu können, sollten sie biokompatibel sein. Für eine leichte Handhabung der resultierenden Mikrosysteme mit den lebenden Zellen sollten die μ -Heizplatten zudem sterilisierbar sein, möglichst durch Autoklavieren. Eine sehr wichtige Voraussetzung für eine reproduzierbare Erwärmung ist eine gute Strukturierbarkeit der verwendeten Materialien. Die Möglichkeit zur Herstellung möglichst kleiner Strukturen ist notwendig, da deren Größe im Wesentlichen den erwärmten Bereich bestimmt.

Graphitpartikel absorbieren Licht unter Erwärmung [135] und sind relativ stabil gegenüber chemischen Einflüssen [140]. Somit sollten fixierte Graphitpartikel den Anforderungen zum lichtinduzierten Erwärmen entsprechen, weshalb sie als erstes Testmaterial gewählt wurden.

3.2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zuerst die Fixierung der Graphitpartikel und die Herstellung der zum lichtinduzierten Erwärmen verwendeten Mikrochips vorgestellt. Anschließend wird der für alle Versuche verwendete optische Aufbau erläutert. Zuletzt wird die Bestimmung des aus dem optischen Aufbau resultierenden Laserradius beschrieben.

3.2.1 Fixierung der Graphit-Mikropartikel und Herstellung der Mikrochips

Da die Möglichkeit der Erwärmung von Graphitpartikeln durch Bestrahlen mit Licht bekannt ist [135], sollte untersucht werden, ob Graphitpartikel auch zum lichtinduzierten Erwärmen kleiner Bereiche von wenigen Mikrometern verwendet werden können. Um zu verhindern, dass die Partikel in die später verwendeten Lösungen mit lebenden Zellen oder künstlichen Zellsystemen aus Lipiden gelangen, mussten die Partikel fixiert werden.

Zuerst wurde eine Suspension von Graphitpartikel (Partikeldurchmesser von $2\ \mu\text{m}$, Reinheit: 99,5 %, Fluka) in Poly(dimethyl)siloxan (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) hergestellt. Hierzu wurde die Basislösung mit der Vernetzungslösung im Verhältnis 10:1 gemischt und mit Graphitpartikeln versetzt. Diese Mischung wurde 30 min lang entgast, bevor sie mit einer selbstgebauten Lackschleuder auf ein $150\ \mu\text{m}$ dickes Deckglas (Mänzel Gläser) aufgebracht wurde. Dazu wurde ein Tropfen der Suspension auf das Deckglas gegeben und anschließend die Lackschleuder für 10 s bei $1.900\ \text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ und für 30 s bei $2.950\ \text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben, um eine PDMS-Graphitpartikel-Schicht von $10\ \mu\text{m}$ bis $15\ \mu\text{m}$ zu erhalten (Abb. 3-3). Diese Schicht wurde anschließend zum Aushärten für mindestens 30 min bei $60\ ^\circ\text{C}$ auf einer Heizplatte erwärmt.

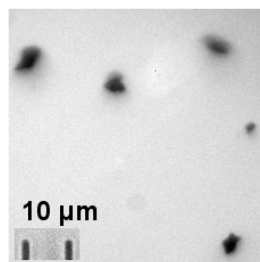


Abb. 3-3: Graphitpartikel ($2\ \mu\text{m}$) in einer $15\ \mu\text{m}$ dicken Schicht PDMS. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht $10\ \mu\text{m}$.)

Die Versuche des Erwärms an Graphitpartikeln in Kontakt mit Luft (Kapitel 3.3.1) erfolgten mit diesen Graphit-PDMS-Schichten auf Deckgläsern. Zur Bestimmung der Höhe der Graphit-PDMS-Schicht und zur Untersuchung der Folgen des lichtinduzierten Erwärms an dieser Schicht wurde ein Weißlicht-Interferometer (ZYGO New View 5000 System) genutzt.

Für die Versuche zum Erwärmen von Wasser im Kapitel 3.3.2 wurden Reaktionskammern oberhalb der Graphitpartikel benötigt. Dazu wurden Mikrochips aus Glas und einem Rahmen aus PDMS verwendet (siehe Abb. 3-4 B). Die PDMS-Rahmen wurden in einer im Haus angefertigten Aluminiumform gegossen (siehe Abb. 3-4 A). Durch diese entstand ein Rahmen für acht Reaktionskammern aus PDMS, wovon jede etwa $120\ \mu\text{L}$ fasste (Breite: 5 mm, Länge: 6 mm, Höhe: 4 mm). Zur Herstellung der PDMS-Rahmen wurde die Aluminiumform mit frischer, entgaster PDMS-Lösung, Mischungsverhältnis 10:1, befüllt. Anschließend erfolgte für 3 h das

Aushärten auf einer Heizplatte bei 60 °C. Durch Zerschneiden der ausgehärteten PDMS-Rahmen konnten auch Rahmen für Mikrochips mit jeweils nur zwei oder vier statt der acht Reaktionskammern hergestellt werden.

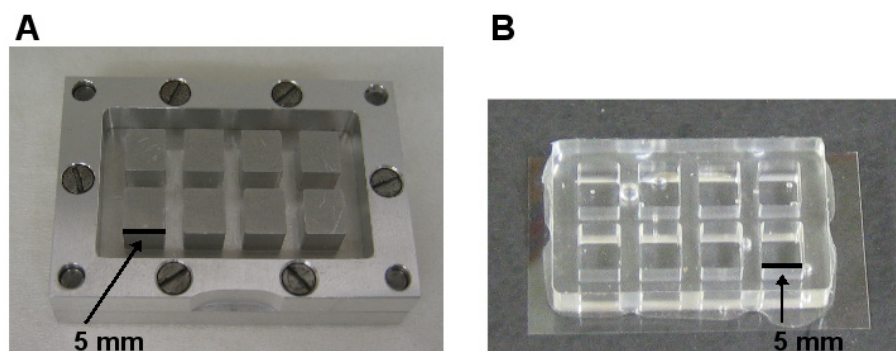


Abb. 3-4: Herstellung der Mikrochips aus einem PDMS-Rahmen auf einem Deckglas mit Mikrostrukturen: (A) Gußform aus Aluminium für die PDMS-Rahmen. (B) Resultierender Mikrochip mit PDMS-Rahmen für acht Reaktionskammern von 5 mm x 6 mm x 4 mm Größe.

Der PDMS-Rahmen und das Glas mit der Graphit-PDMS-Schicht wurden anschließend in einem selbstgebauten Plasma-Reiniger für 4 min aktiviert und anschließend aufeinander gepresst, um sie permanent zu verbinden. Eine Verbesserung der Bindung wurde erreicht, indem für mehrere Stunden ein Gewicht von 150 g auf dem Rahmen gelagert wurde.

3.2.2 Optischer Aufbau

Der vereinfachte optische Strahlengang zum lichtinduzierten Erwärmen bei gleichzeitiger Weitfeldausleuchtung mit einer Quecksilberdampfampe ist in Abb. 3-5 dargestellt. Ein kontinuierlicher Diodenlaser (DC 70 32, Sanyo) mit $I_{\max} = 100$ mW und einer Wellenlänge von 830 nm wurde mittels eines Controllers (pro 800, Profile) permanent mit einem Strom I_{set} deutlich unterhalb der Laserschwelle I_{LS} betrieben ($I_{\text{set}} = 10$ mA, $I_{LS} = 35$ mA). Durch einen Signalgeber (HM 8130, HAMEG Instruments) wurde ein zweites Signal generiert, durch welches die Laserschwelle überschritten und somit der Laser an- und ausgeschaltet wurde. Über dieses Signal wurden die Bestrahlungsdauer und die Laserleistung, zwischen 5 mW und 56 mW, bestimmt.

Mit Hilfe zweier Aluminiumspiegel wurde der kollimierte Laserstrahl von der Rückseite in ein modifiziertes inverses Mikroskop (Olympus IX 71) eingekoppelt. Die innerhalb des Mikroskops befindliche Optik weitete eingehendes Licht zur Weitfeldausleuchtung auf. Um diese Aufweitung des eingehenden Laserlichts auszugleichen, wurde der Laserstrahl mit Hilfe einer Linse mit einer Brennweite f von 100 mm (BK7 Plano-Convex-Lens, Thorlabs GmbH, Dachau) auf diese Mikroskopoptik fokussiert. Durch das Einkoppeln des Laserstrahles von der Rückseite konnte dieser durch einen dichroitischen Spiegel (725dcSPXR, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) mit dem Licht der am Mikroskop befindlichen Quecksilberdampfampe überlagert werden. Hierdurch wurde ein lichtinduziertes Erwärmen bei gleichzeitiger Untersuchung durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Der Strahlengang außerhalb des Mikroskops betrug 2,5 m. Ein zweiter dichroitischer Spiegel (z488/800-1064rdc, AHF) reflektierte das Laserlicht in das Immersionsobjektiv des Mikroskops (UPlanApo 60x/1.20W, Olympus).

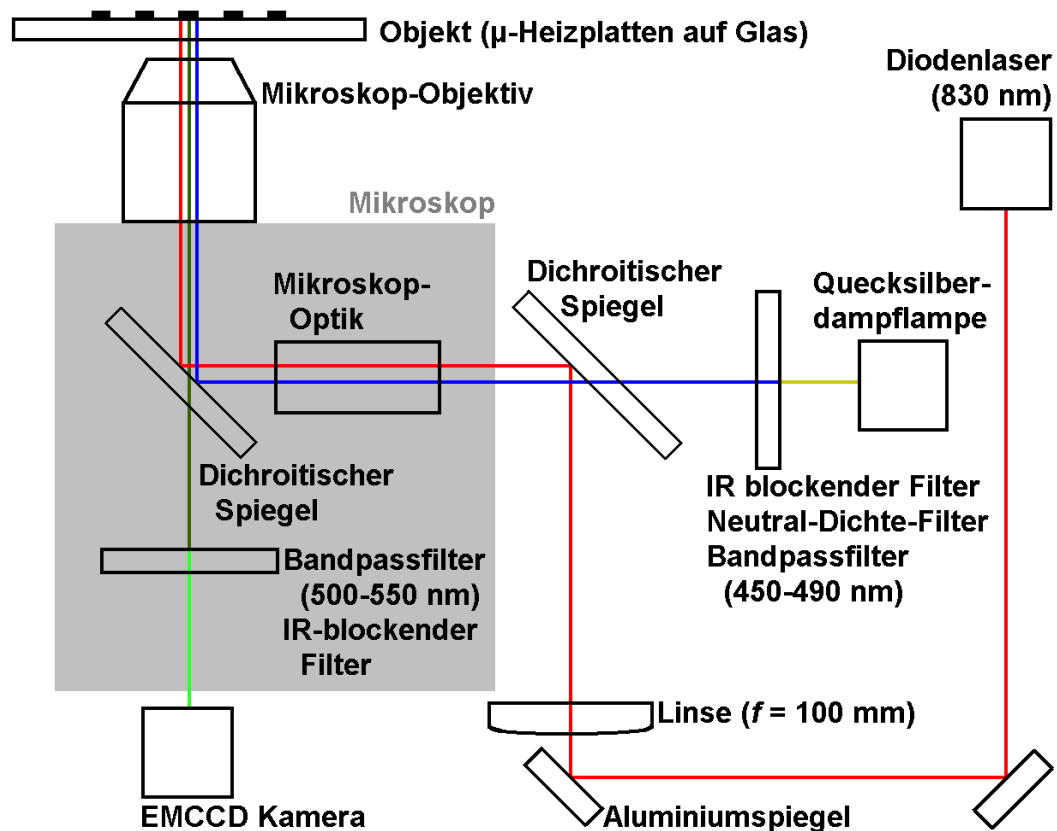


Abb. 3-5: Vereinfachte Darstellung des Strahlenganges zum lichtinduzierten Erwärmen und für simultane Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Laserleistung wurde durch Entfernen des Mikroskop-Objektivs direkt vor dem Eintritt in das Objektiv mit Hilfe eines Laserleistungsmessgerätes (Fieldmaster CT 87, Sensor: LM-2 VIS, Coherent, Dieburg, Deutschland) bestimmt. Da die Transmission des verwendeten Objektivs bei der Wellenlänge des Lasers von 830 nm vom Hersteller mit etwa 55 % angegeben wurde, betrug die effektive Laserleistung am absorbierenden Material nur 55 % der angegebenen Werte.

Das Anregungslicht für die Fluoreszenzmikroskopie stammte von einer 100 W Quecksilberdampfampe (Olympus). Dieses Licht passierte zuerst einen Neutral-Dichte-Filter mit einer optischen Dichte von 0,6 (Thorlabs), um die Intensität zu verringern und damit ein Bleichen von Fluoreszenzfarbstoffen, also den Zerfall auf Grund zu starker Anregung, zu reduzieren. Ein nachfolgender Wärmeschutzfilter (IR-blockend, KG1, AHF) blockte das infrarote Licht der Quecksilberdampfampe, um eine Erwärmung der Probe zu vermeiden. Im Anschluss folgte ein Filtersatz, bestehend aus einem Anregungsfilter, einem dichroitischen Spiegel und einem Filter für das von der Probe emittierte Licht, wodurch die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wurde. Die Transmissionsspektren dieser Filter sind in Abb. 3-6 dargestellt.

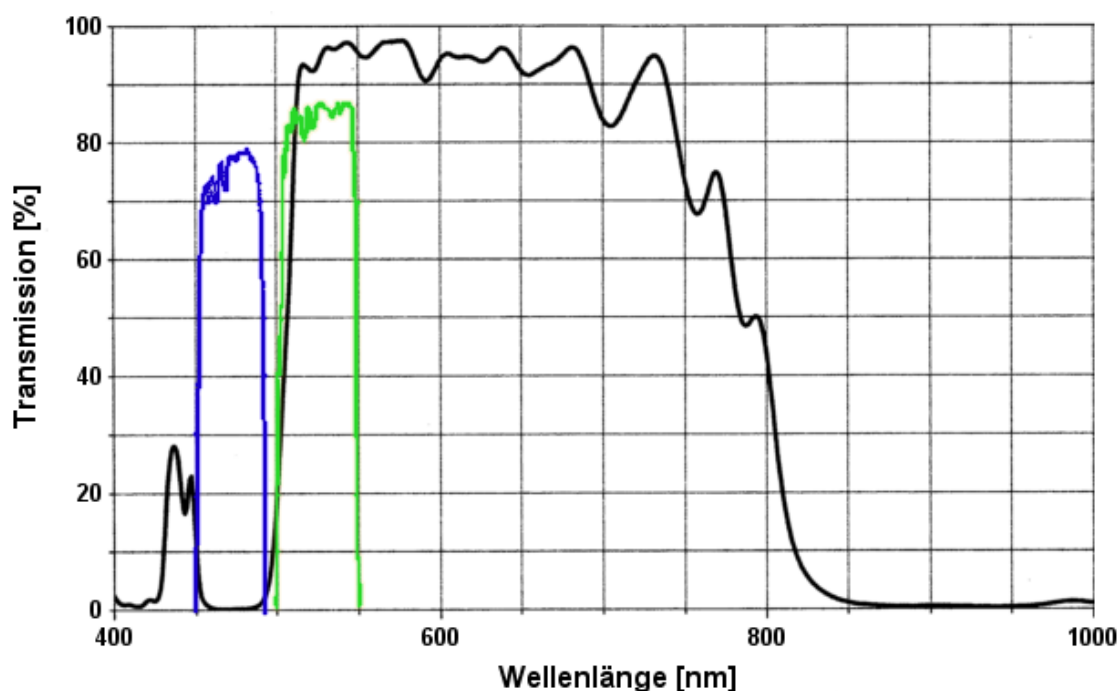


Abb. 3-6: Transmissionsspektrum des Filtersatzes zur Fluoreszenzmikroskopie unter gleichzeitiger Nutzung des 830 nm Lasers: Anregungsfilter - blaue Linie, dichroitischer Spiegel - schwarze Linie, Emitter - grüne Linie [147].

Der Anregungsfilter, oder auch *exciter* genannt (HQ 470/40, AHF), hatte eine 70%ige bis 80%ige Transparenz für Licht der Wellenlängen von 450 nm bis 490 nm. Der nachfolgende erste dichroitische Filter, welcher das Laserlicht mit dem Licht dieser Quecksilberdampflampe überlagerte, war für diesen eben genannten, blauen Wellenlängenbereich durchlässig. Deshalb ist das Spektrum dieses Filters nicht in Abb. 3-6 dargestellt. Danach folgte der zweite dichroitische Spiegel, welcher das Licht der Quecksilberdampflampe und des Lasers in das Mikroskop-Objektiv reflektierte. Das von der Probe emittierte Licht wurde über das gleiche Objektiv durch einen weiteren, das Streulicht blockenden Filter, den Emitter (HQ 525/50, AHF), geleitet. Abschließend folgte zur zusätzlichen Sicherheit für die Kamera bzw. die Augen des Beobachters ein Wärmeschutzfilter (IR-blockend, Thorlabs), um Streulicht, vor allem von dem Diodenlaser, zu reduzieren.

Alle Aufnahmen der Proben unter dem Mikroskop erfolgten durch eine EMCCD Kamera (iXon DV887, Andor Technology). Als Belichtungszeit wurde für alle Aufnahmen 0,2 s gewählt. Bilderserien entstanden mit 0,3 s Zeitdifferenz zwischen den einzelnen Aufnahmen.

3.2.3 Bestimmung des Laserfokus und dessen Form

Der Strahl eines kontinuierlichen Diodenlasers mit 830 nm Wellenlänge wurde, wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben, mittels Immersionsobjektiv fokussiert. Im Fokus ist der Strahlenradius r minimal (siehe Abb. 2-3 B). Im Folgenden werden Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gezeigt, mit denen die Form und der Radius r_0 des Laserstrahls im Fokus bestimmt wurden.

Hierzu wurden 0,3 mL einer Fluorescein-Lösung mit einer Konzentration von $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf ein Deckglas (Mänzel Gläser) gegeben und kontinuierlich mit Laserlicht angeregt.

Abb. 3-7 zeigt den Laserstrahl im Fokus, wie er durch Zweiphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar wurde. Die Profile in x - und in y -Richtung waren gleich. Deshalb wurde von einem kreisförmigen Fokus ausgegangen.

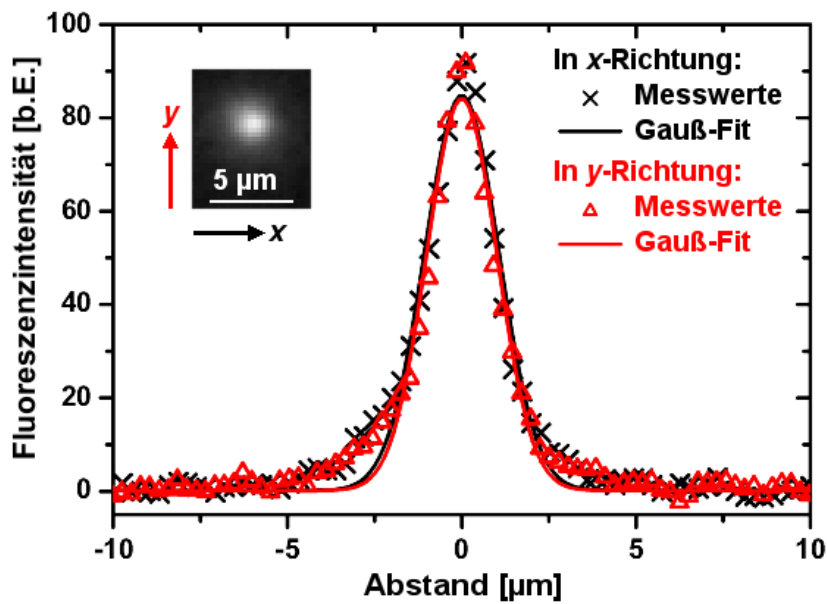


Abb. 3-7: Fluoreszenzaufnahme und daraus ermitteltes Profil des Laserspots in x - und in y -Richtung, sichtbar durch Zweiphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein bei 56 mW Laserleistung.

Um den Radius des Laserstrahls im Fokus abzuschätzen, wurde eine Gaußfunktion an die gemessene Verteilung der Fluoreszenzintensität angepasst:

$$y(x) = \frac{A}{\omega \cdot \sqrt{\pi/2}} \cdot e^{-\frac{2x^2}{\omega^2}} \quad \text{Gl. 3-1}$$

$y(x)$: Lokale Intensität in Abhängigkeit vom Abstand x vom Maximum [b.E.];
 A : Vorfaktor [b.E.]; ω : Breite [m]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; x : Abstand vom Maximum bzw. Mittelpunkt der Funktion [m].

Die gemessene Fluoreszenzintensität ist die Folge einer Zweiphotonenanregung, wobei die Anzahl absorbierter Photonen proportional zum Quadrat der Anregungsintensität ist. Für die Intensitätsverteilung des zur Anregung verwendeten Laserlichts ergibt sich nach Gl. 2-10 und Gl. 2-11 im Fokus ($z = 0$, a entspricht x):

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\frac{2x^2}{r_0^2}} \quad \text{Gl. 3-2}$$

$I(x)$: Lokale Intensität im Fokus ($z = 0$) in Abhängigkeit von Abstand x vom Strahlmittlepunkt [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; I_0 : Maximale Intensität im Fokus [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; x : Abstand vom Strahlmittlepunkt in transversaler Richtung [m]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m].

Das Quadrat dieser Anregungsintensität führt zur Fluoreszenzintensität aus Gl. 3-1, so dass gelten muss:

$$I_f(x) = \alpha \cdot I(x)^2 = \alpha \cdot I_0 \cdot e^{-\frac{2x^2}{r_0^2}} \cdot I_0 \cdot e^{-\frac{2x^2}{r_0^2}} = \alpha \cdot I_0^2 \cdot e^{-\frac{4x^2}{r_0^2}} \quad \text{Gl. 3-3}$$

$I_f(x)$: Fluoreszenzintensität im Fokus in Abhängigkeit vom Abstand x vom Strahlmittelpunkt [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; α : Vorfaktor [$\text{m}^2 \cdot \text{W}^{-1}$]; $I(x)$: Lokale Intensität im Fokus ($z=0$) in Abhängigkeit von Abstand x vom Strahlmittelpunkt [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; I_0 : Maximale Intensität im Fokus [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]; x : Abstand vom Strahlmittelpunkt bzw. Maximum oder Mittelpunkt der Funktion [m]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m].

Da das Quadrat der Anregungsintensität ebenfalls einer Gaußverteilung entspricht, ist ein Vergleich der Gl. 3-1 und Gl. 3-3 zulässig. Aus diesem Vergleich folgt:

$$-4 \frac{x^2}{r_0^2} = -2 \frac{x^2}{\omega^2} \Rightarrow r_0 = \sqrt{2} \cdot \omega \quad \text{Gl. 3-4}$$

x : Abstand vom Strahlmittelpunkt bzw. Maximum oder Mittelpunkt der Funktion [m]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m]; ω : Breite [m].

Die Anpassung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten an die Gaußfunktion (Gl. 3-1) ergab ein ω von $1,9 \mu\text{m}$, so dass der Strahlradius nach Gl. 3-4 $r_0 = 2,8 \mu\text{m}$ betrug.

Wie in Abb. 3-7 erkennbar, ist die Anpassung an eine Gaußfunktion nur eine Näherung. Das Maximum und die Verbreiterung an den Flanken der Verteilung wurden nicht erfasst. Die Abweichungen der gemessenen Intensitätsverteilung vom Gaußprofil wurden hervorgerufen, da der Diodenlaser kein ideales Gaußprofil lieferte.

Bei dieser Messung der Fluoreszenzintensität zur Bestimmung des Laserradius erfolgte keine Auflösung in der z -Achse, entlang des Laserstrahls in longitudinaler Richtung. Die Fluoreszenzanregung erfolgt überall entlang des Laserstrahls. Wie in Abb. 2-3 dargestellt, ist der Radius des Laserstrahls aber vor und nach dem Fokus größer. Die Detektion erfolgt hauptsächlich in der Fokusebene, aber die Fluoreszenz in angrenzenden Bereichen wird ebenfalls detektiert, was zu einem etwas größeren bestimmten Radius führt. Somit ist der bestimmte Wert für den Radius eine Abschätzung, welche aber dem tatsächlichen Wert recht nahe kommen sollte. Der Strahlradius im Fokus r im verwendeten optischen Aufbau wurde anhand dieser Überlegungen und der Beobachtungen auf $r = 2,5 \mu\text{m}$ abgeschätzt.

3.3 Ergebnisse des lichtinduzierten Erwärmens an Graphitpartikeln

Ziel dieser Versuche war der Nachweis einer lichtinduzierten Erwärmung an fixierten Graphitpartikeln unter Verwendung eines 830 nm Diodenlasers mit einer Laserleistung von maximal 56 mW. Hierzu wurde zuerst betrachtet, welche Folgen ein Bestrahlen der Partikel mit 830 nm Laserlicht hatte, wenn sich oberhalb der zum Fixieren genutzten PDMS-Schicht nur Luft befand. Anschließend wurde untersucht, ob auf der Graphit-PDMS-Schicht befindliches Wasser erwärmt werden konnte.

3.3.1 Lichtinduziertes Erwärmen von fixierten Graphitpartikeln

Wenn ein Graphitpartikel in der PDMS-Schicht vom kontinuierlichen, auf 5 μm Durchmesser fokussierten Laserstrahl mit 56 mW eingestellter Laserleistung getroffen wurde, war ein deutliches Aufblitzen am Graphit erkennbar. Um das Graphit herum entstanden Krater im PDMS. Abb. 3-8 zeigt eine Weißlicht-Interferometer-Aufnahme dreier Graphitpartikel nach dem Bestrahlen für 5 s sowie drei verschiedene Tiefenprofile solcher Krater.

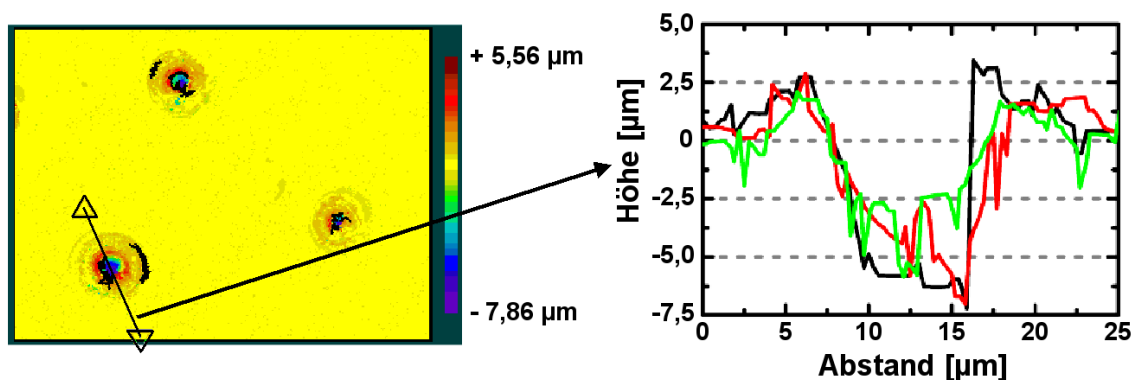


Abb. 3-8: Links: Aufnahme von Kratern mit einem Weißlicht-Interferometer, entstanden durch lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln in einer PDMS-Schicht mit 56 mW Laserleistung für 5 s. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .) Rechts: Drei verschiedene Tiefenprofile solcher Krater – sie variieren deutlich in ihrer Form bei vergleichbarer Breite und Tiefe.

Die durch die Erwärmung entstandenen Krater waren etwa 8 μm breit und 8 μm tief. Trotz vergleichbarer Ausmaße in Breite und Tiefe variierte ihre Form im Einzelfall stark. Gründe hierfür waren die stark variierende Partikelgröße (siehe auch Abb. 3-3),

da mehrere Partikel akkumulierten, und die Verteilung innerhalb der im Vergleich zur Partikelgröße dicken Polymerschicht.

Mit Hilfe des Lasers konnten nicht nur einzelne Krater bzw. Löcher, sondern auch gezielt Linien, Strukturen und ganze Schriftzüge in die PDMS-Schicht gebrannt werden, wie in Abb. 3-9 gezeigt. Dazu wurde über die Höhe des Mikroskoptisches die optische Ebene so eingestellt, dass beim Bestrahlen eines Graphitpartikels ein permanenter Lichtpunkt erkennbar war. Dabei bewegte sich das Graphitpartikel innerhalb einer Zeit von weniger als drei Sekunden durch das PDMS auf die Glasoberfläche, wo der Lichtpunkt stabil blieb. Das Graphitpartikel wurde dort durch die Streukräfte des Laserlichts, wie in Kapitel 2.2.1 erläutert, im Fokus des Lasers festgehalten. Anschließendes Verschieben des Mikroskoptisches und des Mikrochips führte dazu, dass im PDMS Linien entstanden. Der Bewegungsradius eines solchen Partikels war auf einige Mikrometer begrenzt, bis es sich nicht mehr bewegen ließ. Zur Erzeugung einer Linie war daher die Verwendung von mehreren Partikeln nacheinander notwendig.

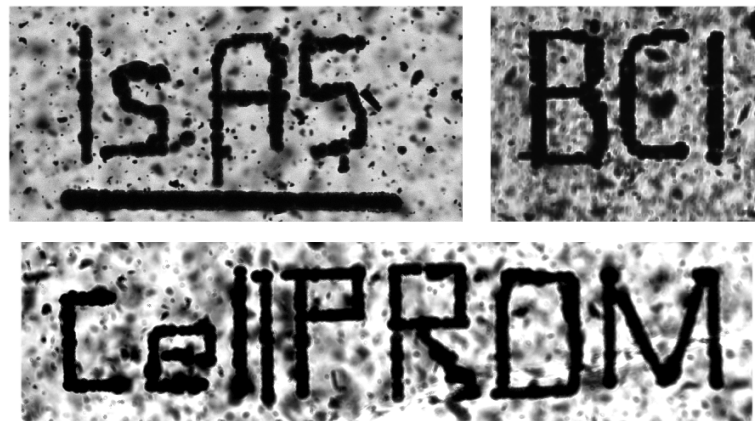


Abb. 3-9: Beispiele für Schreiben in PDMS-Graphit-Schichten durch lichtinduziertes Erwärmen mit 56 mW Laserleistung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Um zu untersuchen, ob derartige Strukturen auch als Kanalsysteme genutzt werden können, wurde eine etwas dickere Graphit-PDMS-Schicht, von 120 μm Höhe, hergestellt und auf ein Deckglas gelegt. Mit kontinuierlich eingestellter Laserleistung von 56 mW wurden mehrere, sich überkreuzende Kanäle hergestellt. Da der Laser durch das Glas auf das PDMS mit dem Graphit trifft, befanden sich die Kanäle direkt über dem Glas im PDMS, auf der Unterseite der Graphit-PDMS-Schicht. Nach dem

3 Lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln

Bestrahlen mit dem Laser wurde das PDMS abgenommen und mit der Unterseite nach oben auf ein neues Glasplättchen gelegt, so dass sich die Kanäle auf der Oberseite des PDMS befanden. Aufnahmen des Weißlicht-Interferometers dieser Kanäle im PDMS zeigt Abb. 3-10.

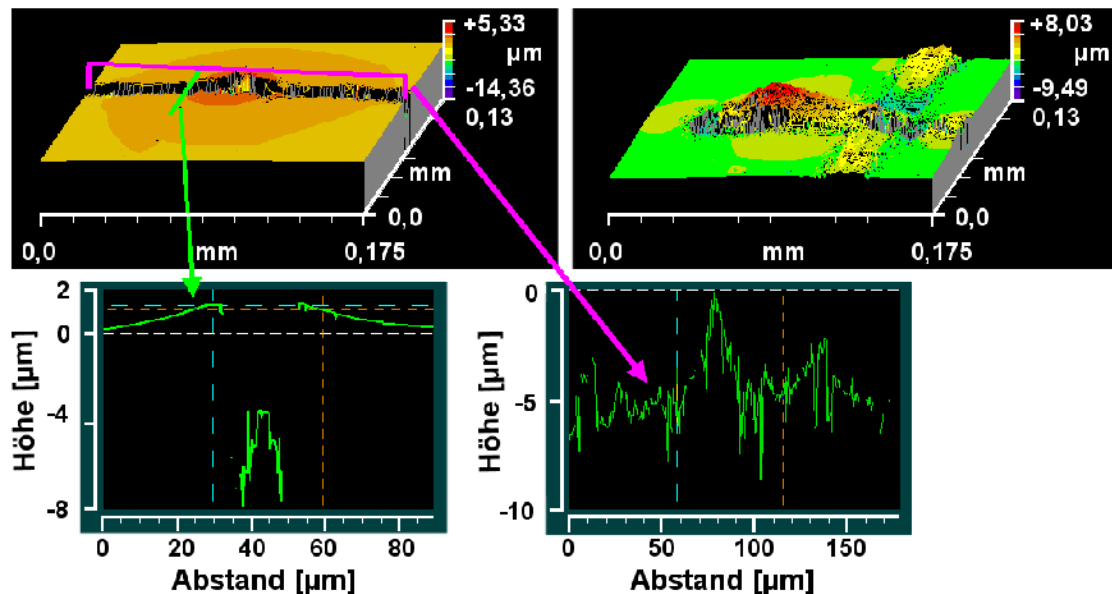


Abb. 3-10: Weißlicht-Interferometer-Aufnahmen von Strukturen in PDMS-Graphit-Schichten, erzeugt durch lichtinduziertes Erwärmen mit 56 mW Laserleistung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm.) Links und unten: Gerader Kanal mit einer Breite von 10 μm bis 20 μm und einer stark variierenden Tiefe von 0 μm bis 8 μm. Rechts: Sich überkreuzende Kanäle, die noch teilweise von einer dünnen PDMS-Schicht überdeckt sind, welche sich nach außen wölbt.

Die resultierenden Kanäle wiesen eine große Rauigkeit auf. Die steilen Seitenwände der Kanäle konnten mit dem Weißlicht-Interferometer nicht aufgelöst werden, so dass die entsprechenden Profile unterbrochen waren (siehe Abb. 3-10 unten links). Die Breite der Kanäle variierte zwischen 10 μm und 30 μm. Die Tiefe der Kanäle variierte ebenfalls sehr stark. Im Durchschnitt betrug sie 6 μm. An den Stellen, wo der Bewegungsradius eines Partikels endete, war der Kanal unterbrochen (Tiefe von 0 μm). Die maximale Tiefe der Kanäle betrug 8 μm. In einigen Fällen kam es bei der Erzeugung der Kanäle durch die starke Erwärmung zur Ausdehnung von Gasen, wodurch das PDMS an den Kanalwänden nach außen gewölbt wurde, wie im rechten oberen Bild in Abb. 3-10 erkennbar. Diese Auswölbungen konnten eine Höhe von bis zu 8 μm auf der PDMS-Schicht erreichen. Sie entstanden dadurch, dass über dem Kanal eine dünne PDMS-Schicht bestehen blieb und die sich beim Erwärmen

ausdehnenden Gase nicht durch Öffnungen im Kanal oder Poren im PDMS entweichen konnten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die starke Erwärmung durch Absorption von Laserlicht an Graphitpartikeln Graphit-PDMS-Schichten strukturiert werden konnten. Auf Grund der unregelmäßigen Form und Größe der Graphitpartikel und ihrer unregelmäßigen Verteilung innerhalb der PDMS-Schicht waren die resultierenden Kanalstrukturen nicht sehr gleichmäßig in ihrer Breite und Tiefe, und die Kanalwände wiesen eine große Rauigkeit auf. Durch die Verwendung von Partikeln einheitlicher Größe und bei einer gleichmäßigeren Verteilung sollten gleichmäßigere Strukturen mit einheitlichen Ausdehnungen herstellbar sein. Es ist sogar die Herstellung von 3D Strukturen vorstellbar. Dazu müsste der Laserstrahl als optische Falle dienen, was ein besseres Strahlprofil und eine stärkere Fokussierung als im verwendeten optischen Aufbau voraussetzt. Dadurch könnten Graphitpartikel in alle drei Dimensionen bewegt werden, so dass auch Kanäle in anderen Ebenen als direkt an der Glasoberfläche hergestellt werden könnten.

3.3.2 Lichtinduziertes Erwärmen von Wasser an fixierten Graphitpartikeln

Im Folgenden werden Untersuchungen gezeigt, inwieweit die im Kapitel 3.3.1 beschriebene Erwärmung auch zum Erwärmen von Wasser genutzt werden kann. Dies war von besonderem Interesse, da die späteren Versuche mit lebenden Zellen und Lipiden in mit wässrigen Lösungen gefüllten Reaktionskammern erfolgen sollten.

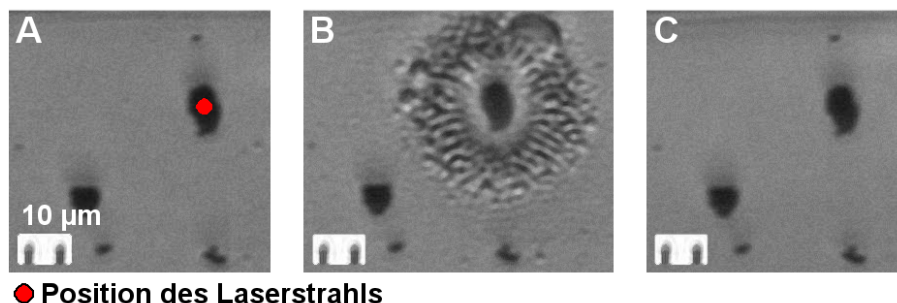


Abb. 3-11: Blasenbildung in einer mit Wasser gefüllten Reaktionskammer aus Glas und PDMS durch lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln (A) vor und (B) nach dem Bestrahlen mit dem Laser für 10 s mit 14 mW eingestellter Laserleistung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 µm.) (C) nach Entleeren und Füllen mit frischem Wasser – kein Schaden im PDMS erkennbar. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 µm.)

3 Lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln

Dazu wurde eine Reaktionskammer des Glas-PDMS Mikrochips mit 100 μL Wasser gefüllt und so auf dem Mikroskopisch platziert, dass die Mitte des Laserstrahls ein Graphitpartikel traf (Abb. 3-11 A). Sobald der Laser angeschaltet wurde (Leistung von 14 mW), war eine deutliche Blasenbildung im Wasser rund um das Partikel erkennbar (Abb. 3-11 B). Wasser absorbiert, wie bereits im Kapitel 3.1 erläutert, das verwendete Laserlicht kaum, daher sollte ein Erhitzen durch das Laserlicht ohne ein Graphitpartikel nicht möglich sein. Erwartungsgemäß wurde keine Blasenbildung beobachtet, wenn das fokussierte Laserlicht nicht auf ein Graphitpartikel traf.

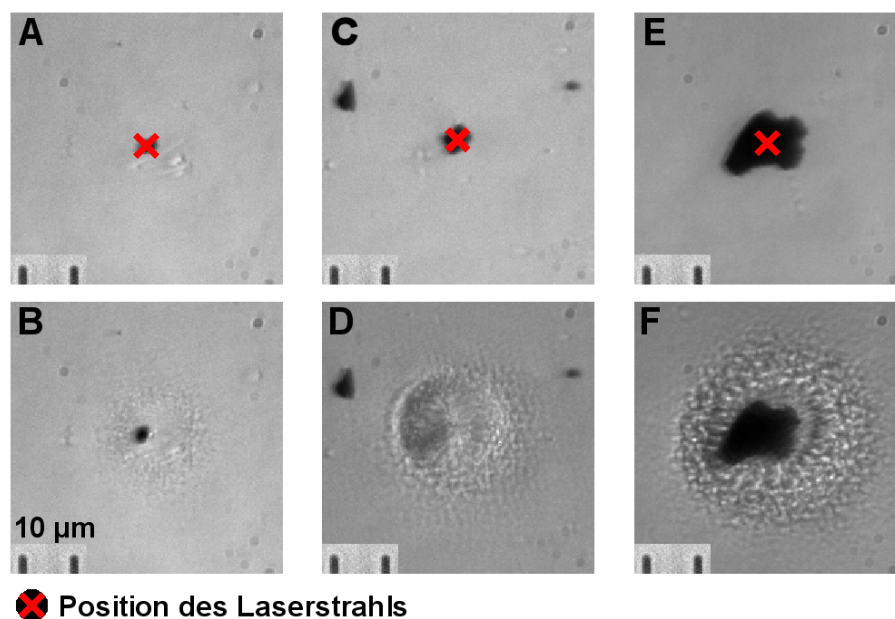


Abb. 3-12: Blasenbildung in einer mit Wasser gefüllten Reaktionskammer aus Glas und PDMS durch lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln unterschiedlicher Größe. (A), (C) und (E): Graphitpartikel vor, (B), (D) und (F) nach dem Bestrahlen mit dem Laser für 1 s mit 14 mW. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .) Im Fall (D) wurde der Graphitpartikel durch die starke Erwärmung entfernt. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm .)

Die Blasenbildung im Wasser an den Graphitpartikeln deutet auf eine starke Temperaturerhöhung der Graphitpartikel hin. Die Ursache der Blasenbildung ist die Verdunstung des Wassers, wenn die Oberfläche der Partikel Temperaturen oberhalb der Siedetemperatur (100 $^{\circ}\text{C}$) erreichte [148]. Die Blasenbildung war nur um das Graphitpartikel herum und nicht darüber erkennbar, da dies der optischen Ebene entsprach. Zusätzlich verdeckte das undurchsichtige Partikel darüber befindliche Blasen. Diese Blasen waren sehr stabil und blieben nach dem Bestrahlen noch mindestens 10 min erhalten. Wurde das Wasser entfernt und die Reaktionskammer

erneut mit 100 μL Wasser gefüllt, waren keine Veränderungen innerhalb der PDMS-Schicht um das Graphitpartikel herum erkennbar (Abb. 3-11 C).

Da die Temperaturerhöhung direkt von der vom Partikel absorbierten Energie abhängt, ist sie auch direkt von der Laserleistung und der Partikelgröße abhängig. Der Laserstrahl hatte in der Fokusebene einen Durchmesser von 5 μm . Wie zu erwarten, führte ein Bestrahlen von Partikeln, die kleiner als der Laserstrahl waren, zu einem weniger effizienten Erwärmen (Abb. 3-12 A-B) als das Bestrahlen von Partikeln, welche die gleiche Größe wie der Laserstrahl hatten (Abb. 3-12 C-D). Ist ein Graphitpartikel größer als der Laserstrahl, wird durch die Wärmeleitung innerhalb des Partikels eine größere Fläche erwärmt, so dass ein größeres Volumen an Wasser erwärmt werden kann. Bei gleicher Laserleistung führte ein größeres Graphitpartikel zu deutlich stärkerer Blasenbildung (Abb. 3-12 E-F).

3.4 Zusammenfassung

Die Erwärmung von Graphitpartikeln durch absorbiertes Laserlicht konnte eindeutig bestätigt werden. Sowohl bei der direkten Bestrahlung an Luft als auch bei Kontakt der Graphitpartikel mit Wasser waren deutliche Folgen in Form von Kratern und eingebrannten Strukturen oder Blasenbildung erkennbar. Hingegen wurde keine Erwärmung durch den Laser ohne die Graphitpartikel festgestellt.

Die Graphitpartikel sind eindeutig zum Erwärmen sehr kleiner Volumina geeignet. Die Blasenbildung an den Graphitpartikeln belegt, dass an ihrer Oberfläche Temperaturen von über 100 $^{\circ}\text{C}$ erreicht werden können. Durch die unregelmäßige Form und Größe der Graphitpartikel und ihrer unregelmäßigen Verteilung innerhalb der PDMS-Schicht war eine kontrollierte Erwärmung jedoch nicht möglich.

Eine gezielte Strukturierung der Graphit-PDMS-Schicht an Luft durch die laserinduzierte Erwärmung der Graphitpartikel konnte ebenfalls gezeigt werden. Jedoch konnten keine gleichmäßigen Strukturen, wie sie für Mikrokanäle notwendig wären, hergestellt werden. Der Grund hierfür war wiederum die unregelmäßige Form und Größe der Graphitpartikel und die unregelmäßige Verteilung innerhalb der PDMS-Schicht.

3 Lichtinduziertes Erwärmen an Graphitpartikeln

Aufbauend auf diesen Versuchen wurden deshalb durch photolithographische Prozesse genau definierte Mikrostrukturen aus Kohlenstoff und Gold hergestellt und hinsichtlich ihrer Heizwirkung untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 4 vorgestellt.

4 Lichtinduzierte Erwärmung an μ -Heizplatten

Die im vorherigen Kapitel 3 vorgestellten Graphitpartikel erlaubten auf Grund ihrer sehr unregelmäßigen Form und Größe und ihrer unregelmäßigen Verteilung innerhalb der PDMS-Schicht kein reproduzierbares Erwärmen kleiner Volumina. Um reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, wurden durch photolithographische Prozesse genau definierte μ -Arrays absorbierender Materialien hergestellt. Diese so genannten μ -Heizplatten sollten eine Einstellung einer gewünschten Temperatur durch lichtinduziertes Erwärmen ermöglichen. Um dies nachzuweisen, müssen die Temperaturänderungen innerhalb von Bereichen von wenigen Mikrometern bestimmt und verglichen werden.

Deshalb werden im nachfolgenden Kapitel 4.1 zuerst Möglichkeiten zur Temperaturmessung innerhalb von Mikrostrukturen vorgestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden der Fluoreszenzthermometrie (Kapitel 4.1.1) und des Schmelzens doppelsträngiger DNA (Kapitel 4.1.2) werden in diesem Zusammenhang näher betrachtet. Im Kapitel 4.2 wird die Herstellung der strukturierten μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und Gold sowie der verwendeten Mikrochips erläutert. Anschließend werden die Versuche und Ergebnisse zum Nachweis der Temperaturerhöhung durch das von den μ -Heizplatten absorbierte Laserlicht mittels Fluoreszenzthermometrie (Kapitel 4.3) und durch das Schmelzen von doppelsträngiger DNA (Kapitel 4.4) vorgestellt.

4.1 Möglichkeiten der Temperaturmessung kleiner Volumina

Für makroskopische Temperaturmessungen werden für gewöhnlich Thermometer oder Thermoelemente eingesetzt. Ihre Anwendbarkeit in Mikrostrukturen ist jedoch auf Grund ihrer Größe, aber auch wegen einer möglichen Störung von Strömungseigenschaften dynamischer Systeme und wegen ihrer Beeinflussung durch vorhandene elektrische oder elektromagnetische Felder, sehr begrenzt. Deshalb wurden verschiedene optische Methoden der Temperaturmessung, basierend auf der Absorption des sichtbaren oder ultravioletten Lichts, sowie der Infrarot-, Raman- oder Fluoreszenzspektroskopie, entwickelt [149]. So ist zum Beispiel eine direkte und lokale

Temperaturmessung von Geweben über die temperaturabhängige Änderung der Absorption der 1200 nm Absorptionsbande des im Gewebe befindlichen Wassers möglich [150]. Allerdings ist der instrumentelle Aufwand recht hoch und die Methode ist nicht sehr schnell (ein Spektrum benötigt 2-5 min).

Eine bevorzugte Methode der Temperaturmessung in Mikrostrukturen ist die Fluoreszenz-Thermometrie. Ihre Vorteile liegen in der sehr guten räumlichen Auflösung, resultierend aus der geringen Größe der fluoreszenten Moleküle, und in der großen Geschwindigkeit der Fluoreszenz von typischer Weise etwa 10 ns [151], wodurch eine sehr schnelle Messung möglich ist. Zudem ist es eine zerstörungsfreie Methode, welche bei Verwendung nichttoxischer Fluorophore keine Nebenwirkung für lebendes Gewebe hat. Die Grundlagen und einige Anwendungen dieser Methode, welche auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde, werden im folgenden Kapitel 4.1.1 vorgestellt.

4.1.1 Fluoreszenz-Thermometrie

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie, die nur so lange auftritt, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption angeregt werden. Eine zeitlich stark verzögerte, spontane Emission von Licht nach Anregung von Molekülen wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Als spontane Emission wird die Emission ohne ein zusätzliches äußeres elektromagnetisches Feld bezeichnet [152]. Abb. 4-1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Vorgänge, welche zur Fluoreszenz oder zur Phosphoreszenz führen.

Durch Absorption von Photonen des Anregungslichts erfahren die Elektronen der Moleküle einen Übergang aus besetzten Orbitalen geringer Energie (in Abb. 4-1 dunkelblau dargestellt) in freie Orbitale höherer Energie (in Abb. 4-1 rot dargestellt) [153]. Da jedes Elektron einen Elektronen-Spin von $+\frac{1}{2}$ oder $-\frac{1}{2}$ besitzt, kann der Elektronenübergang nach der Absorption in zwei verschiedenen elektronisch angeregten Zuständen enden, dem Singulett oder dem Triplett Zustand. Im Singulett-Zustand ist der Elektronen-Spin der Elektronen des Anregungszustandes und des

Grundzustandes nach dem Elektronenübergang gepaart (entgegengesetzter Spin). Hingegen ist im Triplet-Zustand der Elektronen-Spin der Elektronen des Anregungszustandes und des Grundzustandes ungepaart (gleicher Spin). Ein Übergang in den Grundzustand kann in diesem Fall nicht direkt erfolgen, da er spinverboten ist. Er kann aber durch strahlungslose Interkombination (*intersystem crossing*) erfolgen, einem unter Spin-Umkehr verlaufenden Übergang aus dem 1. angeregten Singulett-Zustand in einen energiegleichen Triplet-Zustand [152] (in Abb. 4-1 dunkelgrün dargestellt).

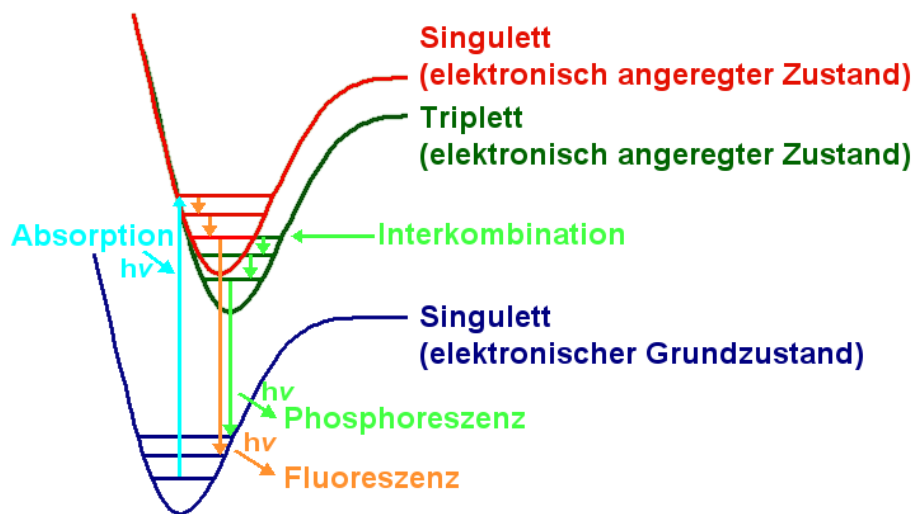


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Mechanismen der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz. Durch Absorption von Licht (hellblau) erfolgt eine Elektronenanregung in freie Orbitale höherer Energie (rot). Die Rückkehr zum Grundzustand (dunkelblau) kann nicht allein durch strahlungslose Deaktivierung erreicht werden. Sie erfolgt aus dem angeregten Singulettzustand durch Fluoreszenz (orange) oder nach Interkombination aus dem Tripletzustand (dunkelgrün) durch Phosphoreszenz (hellgrün).

Ein elektronisch angeregtes Molekül kann seine Energie entweder über eine strahlungslose oder über eine strahlende Deaktivierung abgeben. Bei der strahlungslosen Deaktivierung wird die elektronische Energie durch interne Umwandlung in Rotations-, Schwingungs- und Translationsenergie der umgebenden Moleküle umgewandelt, das angeregte Molekül nimmt an einer chemischen Reaktion teil oder es erfolgt eine Interkombination (in Abb. 4-1 hellgrün dargestellt). Diese strahlungslose Deaktivierung erfolgt, bis das Molekül im Schwingungs-Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands angekommen ist.

Die strahlende Deaktivierung aus diesem Schwingungs-Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands in einen Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes durch spontane Emission eines Photons wird als Photolumineszenz bezeichnet [153]. Dabei wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Erfolgt der strahlende Übergang aus einem Triplett-Zustand zurück in den Grundzustand, so handelt es sich um Phosphoreszenz. In diesem Fall erfolgt die Deaktivierung auf Grund des spinverbotenen Überganges in den Grundzustand nur sehr langsam, so dass die Emission noch zwischen einigen Millisekunden bis Stunden anhält, nachdem die anregende Strahlungsquelle entfernt wurde [151]. Der Übergang aus einem angeregten Singulett-Zustand in den elektronischen Grundzustand erfolgt hingegen spontan innerhalb von einigen Nanosekunden und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Als Fluorophore werden Systeme wie Moleküle, funktionelle Gruppen von Molekülen, Atome, Ionen oder auch Nanopartikel bezeichnet, welche zur Fluoreszenz fähig sind.

Die Fluoreszenz erfolgt zumeist bei einer höheren Wellenlänge als die Absorption, da vor der Emission ein Teil der Anregungsenergie über strahlungsfreie Übergänge abgegeben wird (Rotverschiebung). Die Quantenausbeute eines Fluoreszenzmoleküls, φ_F , ist definiert als das Verhältnis aus emittierten zu absorbierten Photonen [153]:

$$\varphi_F = \frac{k_f}{k_f + k_i} \quad \text{Gl. 4-1}$$

φ_F : Quantenausbeute [b.E.] ; k_f : Geschwindigkeitskonstante aller strahlenden Übergänge [s^{-1}]; k_i : Geschwindigkeitskonstante aller nichtstrahlenden Übergänge [s^{-1}].

Für Fluorophore, welche für Fluoreszenzmessungen verwendet werden, sollte die Quantenausbeute größer als 10^{-4} sein [153]. Die Quantenausbeute der meisten Fluorophore ist Temperaturabhängig und meist am größten bei niedrigen Temperaturen. Den Grund hierfür liefert bereits die Gl. 4-1, denn die Geschwindigkeitskonstante aller nichtstrahlenden Übergänge k_i beinhaltet unter anderem auch die thermisch aktivierten Prozesse. Mit zunehmenden Temperaturen wird diese Geschwindigkeitskonstante größer und somit die Quantenausbeute kleiner. Befindet sich der Fluorophor in Lösung, wird die Quantenausbeute zusätzlich durch die Temperaturabhängigkeit der

Lösungsmiteigenschaften, wie die Viskosität oder die Dielektrizitätskonstante, beeinflusst. Die Lösungsmiteinflüsse sind sehr komplex, aber die meisten Fluorophore zeigen auch in Lösung bei steigenden Temperaturen eine Abnahme der Quantenausbeute und somit der Fluoreszenzintensität.

Neben der Quantenausbeute wird auch das Fluoreszenzspektrum von der Temperatur beeinflusst. Die Verschiebung einer Fluoreszenzbande ist eine Folge der veränderten Polarisierbarkeit der einzelnen Elektronenzustände [153]. Ebenso wie bei der Änderung der Quantenausbeute spielt aber auch das Lösungsmittel bei der Verschiebung der Wellenlänge eine wesentliche Rolle. Unter anderem führen die angeregten Elektronenzustände des Fluorophors zu einem größeren Dipolmoment und dadurch zu einer Umordnung der umgebenden Lösungsmittelmoleküle. Wiederum sind die Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel, mit seinen temperaturabhängigen Eigenschaften, und dem Fluorophor sehr komplex. Generell ist die temperaturbedingte Verschiebung der Wellenlänge durch temperaturabhängige Veränderungen des Fluorophors geringer als die Verschiebung durch die Änderung der Solvathülle. Für die meisten Fluorophore verschiebt sich mit steigenden Temperaturen die Fluoreszenzbande zu einer niedrigeren Wellenlänge (Blauverschiebung) [153].

Für Anwendungen, welche die temperaturabhängige Änderung der Quantenausbeute eines Fluorophores ausnutzen, ist es ausreichend, die Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Wellenlänge, möglichst bei dem Maximum der Fluoreszenzbande, zu messen. Diese Methode ist wesentlich einfacher als die Bestimmung der Quantenausbeute, beinhaltet aber folgende Nachteile. Die Fluoreszenzintensität wird durch viele äußere Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise die Fluorophor-Konzentration, die Intensität des Anregungslichts, den optischen Pfad oder den Detektor. Eine Kalibrationskurve im gleichen System unter den gleichen Bedingungen ist für diese Ein-Farbstoff-Methode unabdingbar. Ein häufig verwendeter Fluorophor zur Temperaturmessung über die Änderung der Fluoreszenzintensität, mit Mikrometer und Millisekunden Auflösung innerhalb von Mikrosystemen, ist Rhodamin B [154-156]. Die Auflösung ist hierbei hauptsächlich durch die Detektion begrenzt.

Für den Fall, dass eine homogene Farbstoffverteilung im System nicht möglich ist, wurde eine Microthermometer-Pipette entwickelt [7]. Eine mit Farbstoff gefüllte, geschlossene Pipettenspitze von 1 μm bis 2 μm Durchmesser wird möglichst dicht an die zu untersuchende Zelle gebracht und die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Auf diesem Weg ist eine sehr genaue Temperaturmessung möglich, allerdings auf Kosten der Auflösung und der Möglichkeit, eine Temperaturverteilung zu bestimmen.

Ein anderer Ansatz zur Bestimmung der Temperaturverteilung über einen kompletten Mikrochip nutzt eine dünne, mit Rhodamin B gesättigte Schicht PDMS [157]. Ein dünnes Glasplättchen trennt hierbei diese Rhodamin B-Schicht von den Mikrostrukturen und den darin befindlichen Flüssigkeiten, um eine Konzentrationsänderung des Farbstoffes zu verhindern. Die Anwendungsmöglichkeiten sind durch die Dicke des Glases und der PDMS-Farbstoff-Schicht begrenzt. Da die Bestimmung der Temperatur nicht direkt innerhalb der Mikrostrukturen erfolgt, wird die bestimmte Temperatur von diesen Schichtdicken beeinflusst.

Die vielen äußeren Einflussgrößen, welche die Fluoreszenzintensität beeinflussen und somit eine Temperaturmessung über die alleinige Messung der Fluoreszenzintensität erschweren, beeinflussen nicht die Verschiebung der Wellenlänge der Emission. Deshalb kann diese Verschiebung alternativ zur Intensitätsmessung zur Bestimmung der Temperaturänderung verwendet werden. Allerdings sind derartige Messungen nicht sehr empfindlich und das Maximum der Bande ist nicht leicht zu bestimmen, da viele Fluoreszenzbanden sehr breit sind. Temperaturänderungen von mehr als 10 $^{\circ}\text{C}$ sind mindestens notwendig, um spektroskopisch messbare Veränderungen zu erhalten. Deshalb wurde die Zwei-Farbstoff-Methode entwickelt, bei welcher zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet werden [158,159]. Während die Fluoreszenzintensität des einen Farbstoffes stark temperaturabhängig ist, sollte die des zweiten weitestgehend temperaturunabhängig sein. Gleichzeitig müssen die Emissionsspektren der beiden Farbstoffe ausreichend weit auseinander liegen, um sie optisch trennen zu können. Durch den zweiten Farbstoff als Referenz wird die Temperaturmessung von einigen Einflussgrößen, wie der Intensität des Anregungslichts oder dem optischen Pfad, unabhängig. Allerdings

muss das Verhältnis der Konzentrationen beider Farbstoffe konstant bleiben, was zum Beispiel bei diffusionskontrollierten Prozessen nicht gewährleistet werden kann [158]. Dieses Problem wird umgangen, wenn zwei oder drei verschiedene Banden ein und desselben Farbstoffes zur Temperaturmessung genutzt werden [160,161]. Dabei muss wieder die Voraussetzung erfüllt sein, dass eine der Banden durch Temperaturänderungen nicht beeinflusst wird. Diese Methode wurde erfolgreich zur Temperaturmessung einzelner Tropfen angewendet [161].

Neben der Quantenausbeute und der Verschiebung der Wellenlänge kann auch die Fluoreszenz-Lebensdauer zur Temperaturbestimmung herangezogen werden. Hierbei erfolgen eine zeitabhängige Anregung des Fluorophors und eine zeitabhängige Messung der resultierenden Fluoreszenzintensität. Diese Methode benötigt keine Normierung und ermöglicht sogar eine Temperaturmessung auf undurchsichtigen Oberflächen, wie zum Beispiel Metallen [162]. Dazu werden diese Oberflächen mit dem Fluoreszenzfarbstoff beschichtet, über eine Licht emittierende Diode, LED, mit einem sinusförmigen Signal angeregt und die Fluoreszenzintensität durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert. Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und erlaubt auf Grund der punktuellen Detektion nicht die Bestimmung einer Temperaturverteilung.

Eine besondere Herausforderung stellt die Temperaturmessung von einzelnen lebenden Zellen dar. Durch die sehr gute räumliche Auflösung und der geringen Nebenwirkungen ist die Fluoreszenz-Mikroskopie auch in diesem Bereich eine bevorzugte Methode. Fluoreszenzfarbstoffe, welche sich in die Zellmembran einlagern, wurden entwickelt, um eine Temperaturbestimmung zu ermöglichen. Die Bestimmung erfolgt auch hier, je nach verwendetem Farbstoff, über die Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenz-Lebensdauer oder die Verschiebung der Wellenlänge der Emission [149].

Die Bestimmung der Temperaturverteilung während des Erwärmens an absorbierenden Materialien, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, erfolgte über die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Rhodamin B. Diese Methode ist relativ einfach durchführbar, ermöglicht eine gute räumliche Auflösung und ein zeitliches Verfolgen des Erwärmens und des Abkühlens auch von Temperaturänderungen deutlich unter 10 °C.

4.1.2 Nachweis der Erwärmung durch Schmelzen doppelsträngiger DNA

Die DNA (*deoxyribonucleic acid*) ist der Träger der Erbinformationen, welcher in allen Lebewesen vorkommt. Im Normalzustand liegt die DNA in Form einer Doppelhelix vor, bestehend aus zwei komplementären Einzelsträngen. Diese Einzelstränge wiederum bestehen aus einem Rückgrat aus Phosphatrest und dem Zucker Desoxyribose. An den Zucker ist jeweils eine der vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T) gebunden. Diese Basen sind über Wasserstoffbrücken jeweils mit ihrer Komplementärbase des zweiten Einzelstranges verbunden. Zwischen den Komplementärbasen Adenin und Thymin bilden sich jeweils zwei, zwischen Cytosin und Guanin jeweils drei Wasserstoffbrücken, so dass letztere Bindung entsprechend stärker ist [163]. Als das Schmelzen von DNA wird das Aufspalten der Doppelhelix in die zwei Einzelstränge durch das Lösen dieser Wasserstoffbrücken beim Erwärmen bezeichnet. Die Schmelztemperatur T_S ist dabei die Temperatur, bei der eine Hälfte der DNA als Doppelhelix und die andere Hälfte als Einzelstränge vorliegt [164].

Es gibt verschiedene Ansätze, um diese Schmelztemperatur abzuschätzen. Für Oligomere bis 18 Basenpaaren kann die Wallace-Methode verwendet werden, welche die einfachste, aber auch die ungenaueste Methode darstellt. Danach ergibt sich die Schmelztemperatur wie folgt:

$$T_S = 2^\circ\text{C} \cdot (A + T) + 4^\circ\text{C} \cdot (G + C) \quad \text{Gl. 4-2}$$

T_S : Schmelztemperatur [$^\circ\text{C}$]; A : Anzahl von Adenin-Gruppen; T : Anzahl von Thymin-Gruppen; G : Anzahl von Guanin-Gruppen; C : Anzahl von Cytosin-Gruppen.

Eine weitere Möglichkeit der Abschätzung, welche auch für längere DNA-Stränge verwendet werden kann, erfolgt über den prozentualen Anteil an Guanin und Cytosin von der Gesamtanzahl der Basenpaare wie folgt [165]:

$$T_S = 0,41(\%GC) + 16,6 \cdot \lg[c(\text{Na}^+) \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}] - \frac{675}{N} \quad \text{Gl. 4-3}$$

T_S : Schmelztemperatur [$^\circ\text{C}$]; N : Anzahl der Basenpaare des Oligomers; $\%GC$: prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin an der Gesamtzahl der Basenpaare N ; $c(\text{Na}^+)$: Konzentration der Natriumionen [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$].

Bei dieser Methode wird angenommen, dass nur zwei verschiedene Bindungsarten existieren. Alle Bindungen zwischen Guanin und Cytosin sind identisch, ebenso wie alle Bindungen zwischen Adenin und Thymin. Zusätzlich wird der Einfluss der Salzkonzentration der DNA-Lösung auf die Schmelztemperatur berücksichtigt, was eine genauere Abschätzung der Schmelztemperatur ermöglicht.

Die genaueste Abschätzung ist über die Nächste-Nachbarn-Methode möglich, bei welcher immer zwei benachbarte Basenpaare gleichzeitig betrachtet werden. Je nach Kombination tragen sie mit einem anderen Anteil zur gesamten Standard-Enthalpie und zur Standard-Entropie bei. Die Standard-Entropie und -Enthalpie werden dabei als temperaturunabhängig angenommen. In Tabelle 4-1 sind die ermittelten Werte für die möglichen Kombinationen von Basenpaaren zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Nächste-Nachbarn-Parameter [164].

Sequenz	ΔH [cal·mol ⁻¹]	ΔS [cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]
AA/TT	-7.900	-22,2
AG/CT	-7.800	-21,0
AT/AT	-7.200	-20,4
AC/GT	-8.400	-22,4
GA/TC	-8.200	-22,2
GG/CC	-8.000	-19,9
GC/GC	-9.800	-24,4
TA/TA	-7.200	-21,3
TG/CA	-8.500	-22,7
CG/CG	-10.600	-27,2
Endständiges A-T-Paar	2.300	4,1
Endständiges G-C-Paar	100	-2,8

Über die Summen kann die Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA wie folgt abgeschätzt werden: [164]

$$T_s = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \cdot \ln c(\text{DNA})} - 273,15^\circ\text{C} + 16,6^\circ\text{C} \cdot \lg[c(\text{Na}^+) \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}] \quad \text{Gl. 4-4}$$

T_s : Schmelztemperatur [$^\circ\text{C}$]; ΔH : Standard-Entropie [$\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$]; ΔS : Standard-Enthalpie [$\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$]; R : Universelle Gaskonstante [$\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$] ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); $c(\text{DNA})$: Konzentration der Doppelsträngigen DNA [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]; $c(\text{Na}^+)$: Konzentration der Natriumionen [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$].

Durch das Schmelzen verändern sich die physikalischen Eigenschaften der DNA-Lösungen, wie zum Beispiel die Viskosität. Messbar ist die Schmelztemperatur am einfachsten über die Absorption der DNA-Lösung im UV-Spektrum, üblicherweise bei 260 nm. Durch das Schmelzen erhöht sich die Absorption um etwa 40 % bis zu einem maximalen Wert, bei dem die DNA in der Lösung vollständig geschmolzen ist. Dieser Anstieg der Absorption, der so genannte hyperchrome Effekt, ist die Folge der Aufhebung der Wechselwirkungen zwischen den Elektronen benachbarter Basen. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der die Änderung der Absorption 50 % der maximalen Änderung beträgt.

Um das Schmelzen doppelsträngiger DNA leichter nachzuweisen, können so genannte Interkalationsfarbstoffe, zumeist Cyanin-Derivate, zugegeben werden. Dies sind sehr selektive Farbstoffe, welche erst durch Einlagern in doppelsträngige DNA fluoreszieren. YOYO-1 ist ein symmetrisches Dimer eines Cyanin-Farbstoffes (Struktur siehe Abb. 4-2) mit besonderer Sensitivität für Nukleinsäuren.

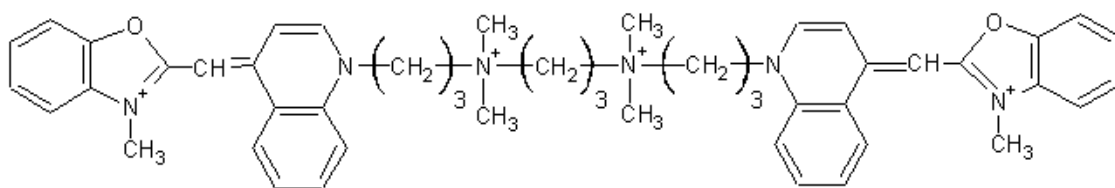


Abb. 4-2: Strukturformel des Interkalationsfarbstoffes YOYO-1 zum Anfärben doppelsträngiger DNA.

Diese Sensitivität von YOYO-1 beruht auf seiner hohen Affinität in Kombination mit einer um das 100 bis 1.000fache verstärkten Fluoreszenzintensität und stark verbesserter Quantenausbeute von 0,2 bis 0,6 durch die Bindung an Nukleinsäuren. Ohne Nukleinsäuren sind diese Farbstoffe nicht fluoreszent. Bei geringem Anteil von YOYO-1 im Verhältnis zu den Basenpaaren der Nukleinsäure erfolgt eine Bindung

hauptsächlich über bis-Interkalationsverbindungen (Einschiebungsverbindungen). Dabei schiebt sich jede Monomereinheit des Farbstoffes zwischen zwei Basen, mit dem Benzazolin-Ringsystem zwischen Pyrimidinbasen und dem Quinolin-Ring zwischen Purinbasen, was zu einem Entwinden der Doppelhelix führt [166]. Durch die hohe Sensitivität können einzelne Moleküle von mit YOYO-1 gefärbten Nukleinsäuren detektieren werden.

Eine Lösung mit doppelsträngiger DNA einer Schmelztemperatur um 50 °C, angefärbt mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1, sollte demnach merklich an Fluoreszenzintensität verlieren, wenn Temperaturen über 50 °C erreicht werden. Daher sollte es ein solches System ermöglichen, durch das lichtinduzierte Erwärmen erreichte Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur der DNA nachzuweisen und wird daher als zweite Methode der Temperaturbestimmung im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

4.2 Herstellung der μ -Heizplatten

Zwei verschiedene Materialien, und zwar Kohlenstoff und Gold, wurden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit zum lichtinduzierten Erwärmen untersucht. Dafür wurden verschiedene μ -Arrays definierter Mikrostrukturen aus diesen Materialien hergestellt. Alle diese als μ -Heizplatten verwendeten Mikrostrukturen, ihre Form und Größen, sind in der Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Material und Geometrie aller verwendeten μ -Heizplatten.

Material	Form	Durchmesser	Höhe
Kohlenstoff (aus SU-8)	Säule	8 μm	8 μm
Gold auf Chrom	Scheibe	3 μm	110 nm
Gold auf Chrom	Scheibe	5 μm	110 nm
Gold auf Chrom	Scheibe	10 μm	110 nm

Die μ -Heizplatten aus Kohlenstoff entstanden durch Pyrolyse aus dem negativen Photolack SU-8. Von den im Kapitel 2.4.3 vorgestellten Methoden war diese am geeignetsten, um die gewünschten gleichmäßigen μ -Arrays zu erhalten. Die als

μ -Heizplatten verwendeten Strukturen vor und nach der Pyrolyse sind in Abb. 4-3 dargestellt.

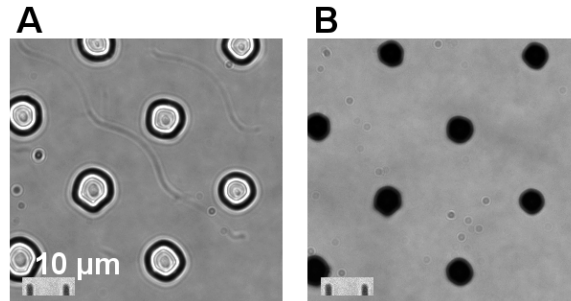


Abb. 4-3: (A) Photolithographisch hergestellte Säulen aus dem Photolack SU-8 auf Glas. (B) Nach der Pyrolyse des Photolackes resultierende Säulen aus Kohlenstoff. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm .)

Zur Herstellung wurde der Photolack mit einer Lackschleuder 10 μm stark auf 150 μm dicke Deckgläser aufgetragen und durch photolithographische Prozesse strukturiert (siehe Kapitel 2.4.1). Es entstanden Säulen von 10 μm Durchmesser. Die Pyrolyse des Photolackes erfolgte in einem mit Stickstoff gefluteten Muffelofen unter den folgenden, speziell für diesen Ofen und die Mikrostrukturen angepassten Bedingungen. Nachdem die Deckgläser mit dem strukturierten Photolack im Ofen platziert waren, wurde dieser mit Stickstoff geflutet. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurde der Ofen innerhalb von 120 min auf 700 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt. Die Abschaltung des Ofens erfolgte nach weiteren 60 min bei 700 $^{\circ}\text{C}$. Erst nachdem die Ofentemperatur auf unter 200 $^{\circ}\text{C}$ gesunken war, wurde der Stickstoffstrom abgeschaltet. Die resultierenden Säulen aus amorphem Kohlenstoff hatten eine Höhe von 8 μm bei einem Durchmesser von ebenfalls 8 μm (Abb. 4-3 B).

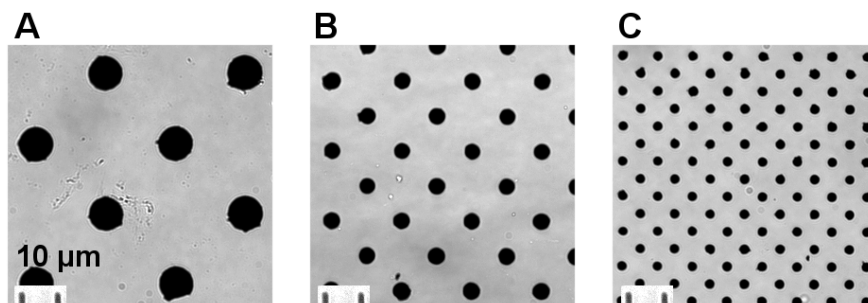


Abb. 4-4: Verwendete μ -Heizplatten aus Gold auf einer Haftschrift aus Chrom mit (A) 10 μm , (B) 5 μm und (C) 3 μm Durchmesser. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm .)

Runde μ -Heizplatten aus Gold mit drei unterschiedlichen Größen von 3, 5 und 10 μm Durchmesser (Abb. 4-4) wurden von GeSiM (Großerkmannsdorf, Deutschland) hergestellt. Diese bestanden aus Goldstrukturen einer Dicke von 100 nm, auf einer Haftschrift von 10 nm dickem Chrom, welche auf 150 μm dickem Borosilikatglas (D263) aufgedampft waren.

Durch Aufbringen von Rahmen aus PDMS (analog wie in Kapitel 3.2.1) auf die verschiedenen Gläser mit den μ -Heizplatten entstanden die für die folgenden Versuche verwendeten Mikrochips.

4.3 Fluoreszenzthermometrie mittels Rhodamin B

Im Folgenden wird die Bestimmung der durch das lichtinduzierte Erwärmen hervorgerufenen Temperaturänderungen von wässrigen Lösungen unter Verwendung des temperaturempfindlichen Farbstoffes Rhodamin B (siehe Kapitel 4.1.1) vorgestellt.

4.3.1 Kalibrierungsmessung zur Bestimmung der Temperaturänderung

Um die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur zu bestimmen und eine Kalibrierung zu ermöglichen, wurde eine Reaktionskammer des Mikrochips mit 100 μL 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ wässriger Rhodamin B-Lösung (Radiant Dyes Laser & Accessories GmbH, Wermelskirchen, Deutschland) gefüllt.

Ein Deckel aus 3 mm dickem PDMS auf der Reaktionskammer hielt einen mit einem Multimeter (M215, Precision Gold) verbundenen Thermistor (S867/IOK/J, EPCOS) und einen mit Silber beschichteten Kupferdraht (Abb. 4-5).

Der 40 mm lange Draht wurde über einen Signalgenerator (HR 20-10A, Systron Donner) durch Anlegen einer Spannung von etwa 1 V bei einem Strom von bis zu 5 A erhitzt, um die Lösung in der Reaktionskammer um bis zu 18 $^{\circ}\text{C}$ zu erwärmen. Nach dem Erreichen von bestimmten Temperaturen wurde die Reaktionskammer mit dem blauen Licht der Quecksilberdampfampe belichtet und drei Bilder wurden in Folge aufgenommen. Die Belichtungszeit der Kamera betrug 0,2 s bei einer

Wiederholungsrate von $3,3 \text{ s}^{-1}$. Die Intensität dieser drei Bilder wurde gemittelt, um leichte Schwankungen der Quecksilberdampfampe auszugleichen.

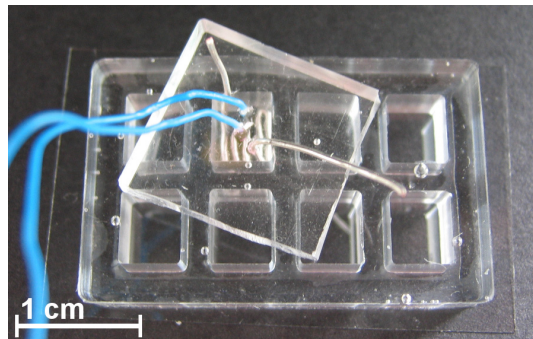


Abb. 4-5: 1: Mikrochip bestehend aus μ -Heizplatten auf einem Deckglas und einem PDMS-Rahmen für acht $100 \mu\text{L}$ Reaktionskammern. Ein flaches Stück PDMS dient als Deckel, der einen Heizdraht und einen Thermistor hält.

Die Fluoreszenzintensität in der Mitte des Bildes wurde so für verschiedene Temperaturen bestimmt. Nach Abzug des Hintergrundes wurde die Differenz zur Fluoreszenzintensität bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt und auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ normiert. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Messungen zeigt Abb. 4-6.

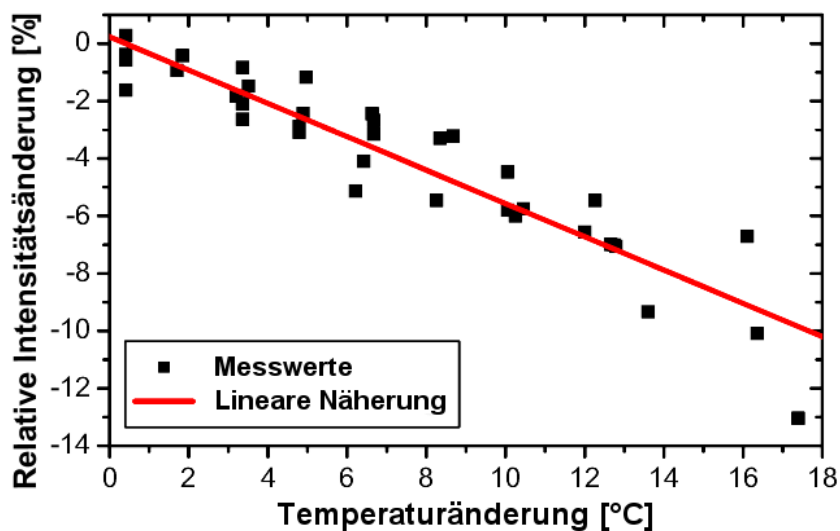


Abb. 4-6: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Rhodamin B von der Temperatur, sowie die lineare Näherung. Diese Ergebnisse wurden aus vier unabhängigen Messreihen erhalten.

Die absolute Standardabweichung der relativen Intensitätsänderung betrug im Durchschnitt $1,1 \%$. Für die lineare Näherung ergab sich die Gleichung:

$$\frac{\Delta I}{I_0} = 0,0024 - \frac{0,0058}{^\circ\text{C}} \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 4-5}$$

$$R^2 = 0,865$$

ΔI : Änderung der Fluoreszenzintensität [b.E.]; I_0 : Fluoreszenzintensität bei 25 °C [b.E.]; ΔT : Temperaturänderung [°C].

Die Annahme einer linearen Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität mit der Temperatur ist als Näherung ausreichend, da nur ein kleiner Temperaturbereich von 18 °C betrachtet wird. Für größere Temperaturbereiche würde zur Anpassung ein Polynom dritter Ordnung benötigt [154,156].

4.3.2 Maximale Temperaturänderung durch lichtinduziertes Erwärmen

Im Folgenden wurde die maximale Temperaturänderung innerhalb einer wässrigen Lösung an den vier verschiedenen Arten von μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und Gold (siehe auch Tabelle 4-2) durch das lichtinduzierte Erwärmen untersucht.

Die maximale Temperaturänderung wurde in der gleichen Reaktionskammer ermittelt, welche bereits zur Ermittlung der Referenzkurve diente. Im Anschluss an die Kalibrierungsmessung wurde abgewartet, bis sich die Lösung in der Reaktionskammer auf 25 °C abgekühlt hatte. Danach erfolgte die Bestimmung der Temperaturverteilung durch das Erwärmen an den μ -Heizplatten. Eine Serie von 20 Bildern mit 0,2 s Belichtungszeit und einem zeitlichen Abstand von 0,3 s wurde aufgenommen, während die Reaktionskammer mit der Quecksilberdampfampe ausgeleuchtet wurde. Gleichzeitig wurde mit dem Laser eine μ -Heizplatte für 1 s bestrahlt. Auf Grund der linearen Abhängigkeit zwischen Intensitätsänderung und Temperaturänderung ergibt sich letztere, nach Abzug des Hintergrundes, aus der Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität während des Erwärmens und der Fluoreszenzintensität davor, normiert auf 25 °C.

Abb. 4-7 zeigt zwei Beispiele für die Temperaturverteilung um μ -Heizplatten aus Kohlenstoff nach 1 s Bestrahlung mit 5 bzw. 9 mW Laserleistung. Dabei ist zu beachten, dass bei dieser Art der Temperaturmessung keine Auflösung der z-Richtung, also der Höhe, möglich ist. Am Boden der Reaktionskammer, direkt an der

μ -Heizplatte, war die Änderung der Temperatur sehr groß. Da die Temperaturverteilung in z -Richtung zumindest näherungsweise der in x - und y -Richtung entsprechen sollte, ist anzunehmen, dass sich die Temperatur bereits nur 50 μm über dem Boden nicht mehr änderte. Die ermittelten Werte waren daher relative Temperaturänderungen, gemittelt über die Höhe der Reaktionskammer. Dennoch ist diese Art der Temperaturmessung eine geeignete Methode, um die verschiedenen Materialien der μ -Heizplatten miteinander zu vergleichen, da sie die Heizwirkung auf die umgebende Flüssigkeit misst.

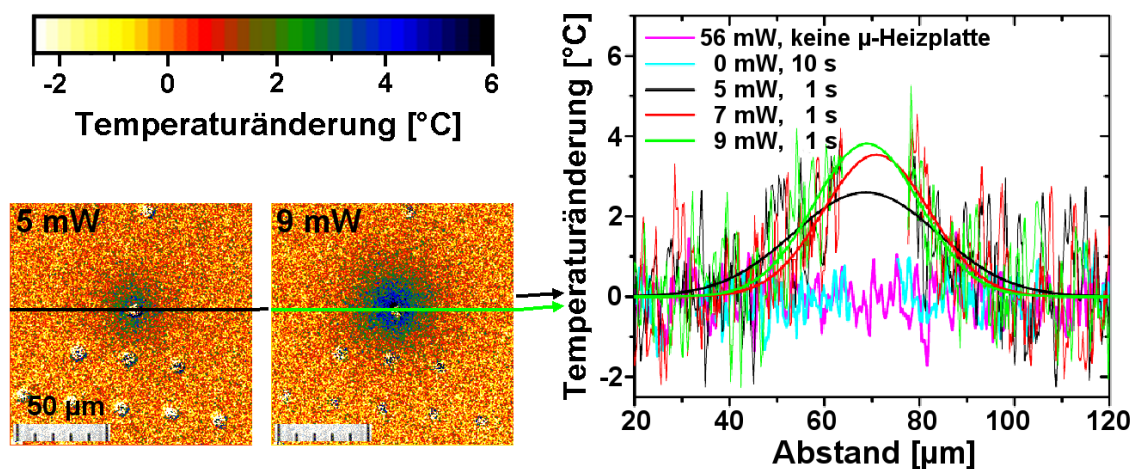


Abb. 4-7: Links: Temperaturverteilung, berechnet aus der Änderung der Fluoreszenzintensität während des lichtinduzierten Erwärmens für 1 s mit 5 mW und 9 mW Laserleistung an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .) Rechts: Temperaturverteilung durch die Mitte der μ -Heizplatte (schwarzer und grüner Pfeil) und die zugehörige Gauß-Näherung nach dem Bestrahlen für 1 s (schwarze Linie 5 mW; rote Linie 7 mW; grüne Linie 9 mW), nach 10 s ohne Laser (nur Quecksilberdampf Lampe; blaue Linie 0 mW) und nach Bestrahlen mit 56 mW für 10 s ohne μ -Heizplatte (pinkfarbene Linie 56 mW). (Der Abstand zwischen den kleinen Strichen unten links entspricht jeweils 10 μm .)

Um verschiedene Messungen miteinander zu vergleichen, wurde das jeweilige Temperaturprofil durch die Mitte der μ -Heizplatte (in x -Richtung) genutzt (siehe z. B. Abb. 4-7 links, schwarze Linie). Für die Temperaturänderung wurde eine Gaußfunktion angenommen und die Kurven entsprechend angenähert, wie im rechten Graph in Abb. 4-7 zu sehen. Als maximale Temperaturänderung ΔT_M wurde das Maximum dieser angenäherten Kurven bestimmt, welches nun zum Vergleich der verschiedenen Materialien genutzt werden konnte. Da bereits das Temperaturprofil auf 25 $^{\circ}\text{C}$ normiert wurde, bezog sich auch die maximale Temperaturänderung ΔT_M auf diese Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$. Die Fläche unter den μ -Heizplatten wurde nicht für die Anpassung der

Gaußfunktion genutzt. In diesem Bereich erfolgte keine Intensitätsänderung durch die Temperaturänderung, da die μ -Heizplatten nicht durchsichtig waren. Bei Berücksichtigung dieser Bereiche wären somit die Ergebnisse verfälscht worden. Aus dem gleichen Grund wurde bereits bei der Auswahl der zum Erwärmen verwendeten μ -Heizplatte darauf geachtet, dass möglichst keine weiteren μ -Heizplatten auf der zur Bestimmung von ΔT_M genutzten x-Achse lagen.

Zwei zusätzliche Experimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich Folgen des lichtinduzierten Erwärmens an den μ -Heizplatten waren. Zuerst wurde eine μ -Heizplatte nur mit dem blauen Licht der Quecksilberdampfampe 10 s lang bestrahlt. Wie in Abb. 4-7 (blaue Linie) zu erkennen, ergab sich dadurch keine Änderung der Fluoreszenzintensität. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das blaue Licht zusätzlich zur Erwärmung beitrug. Da sich die Fluoreszenzintensität nicht änderte, kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass durch die relativ kurze Belichtungszeit der Effekt des Bleichens des Farbstoffes vernachlässigt werden kann. In einem zweiten Versuch wurde der Mikrochip so platziert, dass der Laser keine μ -Heizplatte traf. Auch in diesem Fall konnte keine Änderung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden (Abb. 4-7 pinkfarbene Linie). Somit kann eine direkte Erwärmung durch Absorption des Laserlichts innerhalb der Farbstofflösung ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die maximale Temperaturänderung ΔT_M bei variiertem Laserleistung für die drei verschiedenen μ -Heizplatten aus Gold und einer μ -Heizplatte aus Kohlenstoff zeigt Abb. 4-8. Alle verwendeten μ -Heizplatten führten zu einer lokalen Erwärmung und einem Anstieg von ΔT_M mit erhöhter Laserleistung. Durch die starke Erwärmung kam es in allen Fällen für höhere Laserleistungen zur Blasenbildung durch Verdampfen von Wasser an der heißen Oberfläche der μ -Heizplatten. Die geringere Fluoreszenzintensität im Bereich der Blasen und höhere Fluoreszenzintensität durch Turbulenzen im Bereich der μ -Heizplatten machten in diesen Fällen eine Temperaturmessung unmöglich. Deshalb wurde die Temperaturverteilung durch indirektes Erwärmen nur für Laserleistungen untersucht, bei denen keine Blasenbildung auftrat. Diese Blasenbildung erfolgte abhängig vom Material und der Größe der μ -Heizplatten unter verschiedenen Bedingungen. An den μ -Heizplatten aus Gold

erfolgte die Blasenbildung bei Laserleistungen über 28 mW für die 10 μm durchmessenden Strukturen sowie über 42 mW für die Strukturen mit 3 μm bzw. 5 μm Durchmesser. Hingegen erfolgte die Blasenbildung an Kohlenstoff deutlich früher, bei einer Laserleistung von über 9 mW.

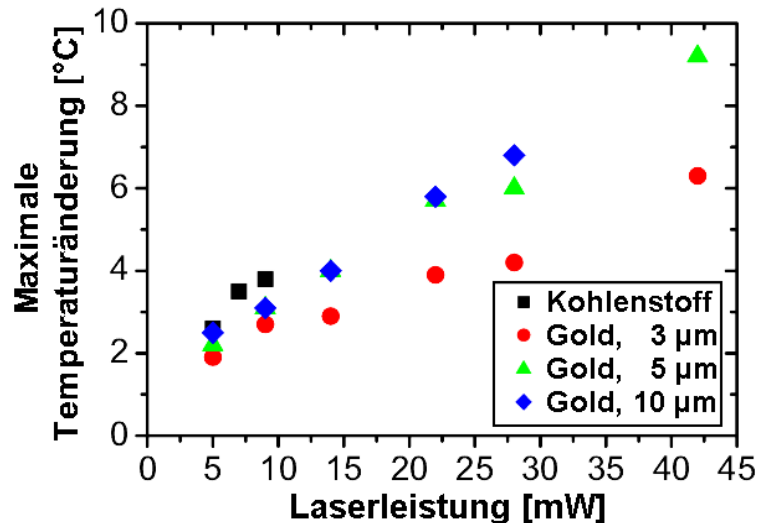


Abb. 4-8: Maximale Temperaturänderung ΔT_M nach dem Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff von 8 μm Durchmesser und μ -Heizplatten aus Gold von 3 μm , 5 μm und 10 μm Durchmesser bei variiert Laserleistung, unterhalb der Grenze zur Blasenbildung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Die Messungen ergaben für die 10 μm und 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold fast identische maximale Temperaturänderungen ΔT_M (siehe Abb. 4-8), abgesehen von einer etwas geringeren ΔT_M für die μ -Heizplatten mit 5 μm Durchmesser bei 28 mW Laserleistung. Hingegen entsprach die maximale Temperaturänderung nach dem Erwärmen an den 3 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold im Durchschnitt 75 % der ΔT_M der 5 μm durchmessenden Strukturen. Die μ -Heizplatten aus Kohlenstoff führten bei gleicher Laserleistung zu 5 % bis 25 % höheren Werten für ΔT_M im Vergleich zu den 10 μm Goldstrukturen.

Folgende Faktoren können Unterschiede beim Erwärmen an den Goldstrukturen bedingen. Durch die unterschiedlichen Größen der μ -Heizplatten und den konstanten Durchmesser des Laserstrahls von 5 μm variierte die Laserleistung, welche auf die μ -Heizplatten traf. Zum Beispiel traf auf Grund ihrer geringeren Größe und des Gaußprofils des Laserstrahls nur 70 % der Laserleistung auf die 3 μm durchmessenden Goldstrukturen. Hingegen sind sowohl die μ -Heizplatte mit 5 μm Durchmesser, als

auch die 10 μm durchmessende μ -Heizplatte, mindestens so groß wie der Durchmesser des Lasers, so dass sie annähernd von der vollen Laserleistung (100%) getroffen wurden. Als Folge sollten die μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser zu einer 30% geringeren Temperaturerhöhung führen als die mit 5 μm und 10 μm Durchmesser. Die gemessenen maximalen Temperaturänderungen von 75% (siehe Abb. 4-8) für 3 μm durchmessende μ -Heizplatten im Vergleich zu denen mit 5 μm Durchmesser bestätigten diese Annahme. Der Grund für die etwas größere Temperaturänderung als die erwartete war die stärkere lokale Erwärmung an den 3 μm durchmessenden Strukturen. Durch die Wärmeleitung innerhalb des Goldes wurde mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten ein größeres Volumen erwärmt, wobei die absolute Temperaturerhöhung an der Oberfläche geringer wurde. Dies führte zu einer etwas stärkeren Erwärmung an den 3 μm Strukturen und einer geringeren lokalen Erwärmung an den 10 μm durchmessenden Strukturen im Vergleich zu denen mit einem Durchmesser von 5 μm .

Diese stärkere lokale Erwärmung führte weiterhin dazu, dass die Blasenbildung bei der gleichen Laserleistung von 56 mW wie an den 5 μm durchmessenden Strukturen erfolgte, obwohl nur ein Teil der Laserleistung auf die μ -Heizplatte traf. Die annähernd gleiche bzw. für 22 mW sogar stärkere Erwärmung an den μ -Heizplatten mit 10 μm Durchmesser im Vergleich zu denen mit 5 μm Durchmesser resultierte aus der gleichen absorbierten Laserenergie. Eine aus der Wärmeleitung resultierende etwas geringere Erwärmung an 10 μm durchmessenden Strukturen wurde nicht beobachtet. Dies war die Folge des größeren Volumens, das bei einer größeren Struktur erwärmt wurde. Dadurch sank die Fluoreszenzintensität etwas weniger, aber in einem größeren Volumen, so dass trotz geringerer absoluter Temperaturen die beobachtete Änderung der Fluoreszenzintensität gleich war.

Beim lichtinduzierten Erwärmen an den Gold- und an Kohlenstoffstrukturen sind Unterschiede auf Grund der unterschiedlichen Materialeigenschaften und den sehr unterschiedlichen Geometrien zu erwarten. Mit den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff sollte das erwärmte Volumen wesentlich größer als an 10 μm durchmessenden Goldstrukturen sein, da mit 250 μm^2 eine wesentlich größere Oberfläche im Kontakt mit dem Wasser ist als bei den Goldstrukturen (80 μm^2 für die Goldstrukturen mit 10 μm Durchmesser). Das Verhältnis zwischen Oberfläche im Kontakt mit Wasser zur

Oberfläche im Kontakt mit Glas ist bei den Kohlenstoffstrukturen deutlich zugunsten des Wassers verschoben. Bei ihnen sind fünf Sechstel der Oberfläche in Kontakt mit dem Wasser, während es beim Gold die Hälfte ist. Dadurch sollte mehr der absorbierten Energie als Wärme an das Wasser als an das Glas abgegeben werden. Insgesamt sollten die Graphitstrukturen bei gleicher Laserleistung zu einer stärkeren Erwärmung als die verwendeten Goldstrukturen führen.

Die gemessenen maximalen Temperaturerhöhungen durch lichtinduziertes Erwärmen an Graphitstrukturen waren tatsächlich 5 % bis 25 % höher als an 10 μm durchmessenden Goldstrukturen (siehe Abb. 4-8). Ebenso erfolgte die Blasenbildung an Graphit bereits bei geringeren Laserleistungen von über 9 mW statt 28 mW bzw. 42 mW bei den Goldstrukturen. Ein eher unerwartetes Ergebnis war die frühere Blasenbildung an den μ -Heizplatten aus Gold mit 10 μm Durchmesser als an denen mit 5 μm und 3 μm Durchmesser, welche ja zu einer stärker lokalisierten Erwärmung führen sollten. Durch die starke lokale Erwärmung an den μ -Heizplatten bildeten sich demnach Konvektionsströme. Diese führten zu einer zusätzlichen Abkühlung der kleineren μ -Heizplatten durch die umgebende, kältere Flüssigkeit. Eine Blasenbildung konnte erst bei höheren Laserleistungen erfolgen. Bei den größten μ -Heizplatte mit 10 μm Durchmesser konnten diese Konvektionsströme das Zentrum der μ -Heizplatte nicht abkühlen, so dass in diesem Fall eine Blasenbildung nicht verhindert wurde.

Die Messungen zeigen, dass ein lokales Erwärmen an den μ -Heizplatten aus Gold und aus Kohlenstoff möglich ist. Mit Hilfe der maximalen Temperaturänderung ΔT_M konnten die verschiedenen μ -Heizplatten verglichen und die resultierende Erwärmung abgeschätzt werden. Die Blasenbildung bei hohen Laserleistungen zeigt, dass an den Oberflächen der μ -Heizplatten Temperaturen von deutlich über 100 °C erreicht werden können. Hingegen ist die bestimmte maximale Temperaturänderung der wässrigen Lösung um die μ -Heizplatten herum mit maximal 9,5 °C relativ gering. Die Werte für ΔT_M sind Mittelwerte über die z -Richtung auf Grund der fehlenden Auflösung in dieser Richtung. Die absoluten Temperaturänderungen an den μ -Heizplatten, resultierend aus der lichtinduzierten Erwärmung, konnten nicht bestimmt werden. Sie sollten aber deutlich über den bestimmten Werten für ΔT_M liegen, da die stärkere

Fluoreszenzintensität der höheren, nicht erwärmten Schichten zu geringeren Messwerten führte.

Beide Materialien ermöglichen eine merkliche Erwärmung und ein Abkühlen des Systems innerhalb von einer Sekunde. Allerdings reichten bei der Verwendung von μ -Heizplatten aus Kohlenstoff etwas niedrigere Laserleistungen aus, um die gleiche Erwärmung wie an μ -Heizplatten aus Gold zu erreichen. Dies kann für einige Anwendungen von Vorteil sein, da durch geringere Laserleistungen mögliche unerwünschte Wechselwirkungen des Laserlichts mit lebenden Zellen verringert werden (siehe auch Kapitel 2.2.2). Neben der Beeinflussung der maximalen Temperaturerhöhung könnten die unterschiedlichen μ -Heizplatten auch Unterschiede beim zeitlichen Verlauf des Erwärmens bedingen. Zum Beispiel könnten die wesentlich voluminöseren μ -Heizplatten aus Kohlenstoff zu einem etwas langsameren Aufwärmen und Abkühlen führen. Daher wird nachfolgend (Kapitel 4.3.3) die Geschwindigkeit des Erwärmens und Abkühlens für beide Materialien betrachtet.

4.3.3 Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Erwärmung

Mit Hilfe der während des lichtinduzierten Erwärmens aufgenommenen Bilderserien mit 0,3 s Zeitdifferenz zwischen den einzelnen Aufnahmen war neben der Bestimmung der maximalen Temperaturänderung ΔT_M auch eine zeitliche Verfolgung des Erwärmens durch 1 s Bestrahlungsdauer möglich. Dazu wurde jedes einzelne Bild untersucht und analog zur Ermittlung von ΔT_M (siehe Kapitel 4.3.2) die größte erreichte Temperaturänderung ΔT an der μ -Heizplatte bestimmt, ebenfalls normiert auf 25 °C. Daher entspricht die maximal erreichte ΔT während des Erwärmens der maximalen Temperaturänderung ΔT_M . Temperaturänderungen unter 1 °C konnten nicht bestimmt werden, da diese durch das starke Rauschen der Fluoreszenzaufnahmen überdeckt wurden. Zu Beginn des Erwärmens sind die zu beobachtenden Temperaturänderungen aber unter 1 °C und konnten somit nicht ermittelt werden. Daher fehlt in den nachfolgenden Graphen teilweise der erste Wert für ΔT .

Die Ergebnisse für das lichtinduzierte Erwärmen wässriger Lösung an den Kohlenstoffstrukturen zeigt Abb. 4-9. Wie bereits im Kapitel 4.3.2 beschrieben, nahm

die maximale Temperaturänderung ΔT_M mit zunehmender Laserleistung zu. Während des Erwärmens nach 0,4 s und 0,7 s waren die Unterschiede der Temperaturänderungen ΔT für die drei unterschiedlichen Laserleistungen maximal 0,5 °C. Erst nach 1 s waren die Unterschiede größer, demnach benötigte die Erwärmung mindestens 1 s. 0,6 s nach Beendigung des Erwärmens konnte keine Temperaturänderung mehr festgestellt werden.

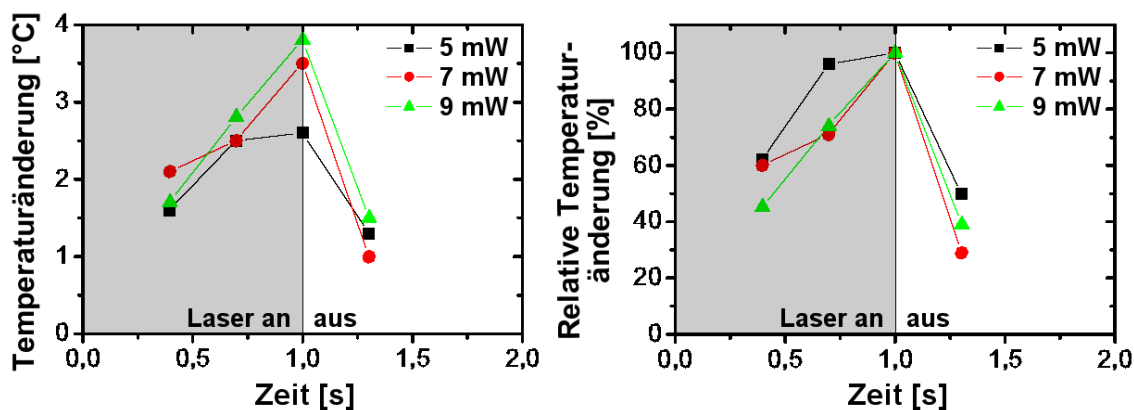


Abb. 4-9: Zeitlicher Verlauf des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff (8 μ m Durchmesser) für variierte Laserleistungen. Links ist die Temperaturänderung ΔT , rechts die relative Temperaturänderung, $\Delta T/\Delta T_M$ gegen die Zeit aufgetragen. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

Bei der Betrachtung der relativen Temperaturänderung $\Delta T/\Delta T_M$, also der Temperaturänderung ΔT im Verhältnis zur maximalen Temperaturänderung ΔT_M , wird deutlich, dass das Erwärmen und das Abkühlen sehr ähnlich verliefen (Abb. 4-9 rechts). Das Erwärmen verlief dabei mit zunehmender Laserleistung etwas steiler, während beim Abkühlen kein Trend erkennbar war.

Den Verlauf des lichtinduzierten Erwärmens an den Goldstrukturen mit 5 μ m Durchmesser zeigt Abb. 4-10. Wie bei den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff nahm auch in diesem Fall die maximale Temperaturänderung ΔT_M mit zunehmender Laserleistung zu. Entsprechend erfolgte auch eine größere Temperaturänderung während des Erwärmens mit zunehmender Laserleistung. Während für 5 mW Laserleistung der Anstieg der Temperaturänderung nach 0,4 s des Erwärmens sehr gering war, war der Anstieg für 9 mW und für 14 mW größer. Für höhere Laserleistungen ab 22 mW war die maximale Temperaturänderung ΔT_M bereits vor dem Beenden des Erwärmens, nach etwa 0,7 s, erreicht. Der letzte Wert für ΔT nach 1 s des Erwärmens war wieder etwas geringer,

was eine Folge der Messungenauigkeit ist. Das Abkühlen erfolgte für 5 mW und 9 mW und Laserleistung innerhalb von weniger als 0,6 s nach Beendigung des Erwärmens. Für die höheren Laserleistungen dauerte dies nicht einmal doppelt so lange, also weniger als 1 s, obwohl zum Beispiel die maximale Temperaturänderung durch die Erwärmung mit 42 mW mehr als viermal so groß war als 5 mW.

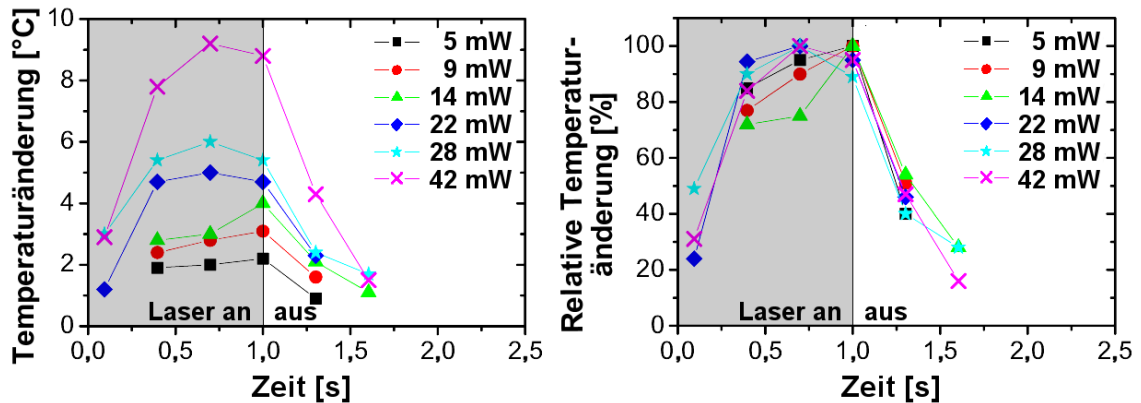


Abb. 4-10: Zeitlicher Verlauf des lichtinduzierten Erwärmens an 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold mit variiertem Laserleistung. Der linke Graph zeigt die Temperaturänderung ΔT mit der Zeit, während der rechte die relative Temperaturänderung $\Delta T/\Delta T_M$ zeigt. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Wiederum zeigte die Betrachtung der relativen Temperaturänderung, dass das Erwärmen und das Abkühlen sehr einheitlich erfolgten (Abb. 4-10 rechts). Für die Laserleistungen von 5 mW bis 14 mW verlief mit höherer Laserleistung das Erwärmen mit einem etwas steileren Anstieg, während für höhere Laserleistungen der Anstieg gleich blieb. Das Abkühlen verlief unabhängig von der Laserleistung und den erreichten Temperaturen einheitlich.

Den zeitlichen Verlauf der Erwärmung der wässrigen Lösung an μ -Heizplatten aus Gold mit unterschiedlichen Größen bei gleicher Laserleistung zeigt Abb. 4-11 am Beispiel der Bestrahlung mit 28 mW für 1 s. Mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten nimmt nicht nur die maximale Temperaturänderung ΔT_M zu. Während der gesamten Erwärmung wurden mit den größeren μ -Heizplatten deutlich größere Temperaturänderungen ΔT erreicht. Beim Abkühlen werden diese Temperaturunterschiede geringer.

4 Lichtinduzierte Erwärmung an μ -Heizplatten

Der Verlauf der relativen Temperaturänderungen $\Delta T/\Delta T_M$ war für alle drei verschiedenen μ -Heizplatten einheitlich. Ein Einfluss der unterschiedlichen Größen auf den Verlauf der Erwärmung oder Abkühlung war nicht erkennbar.

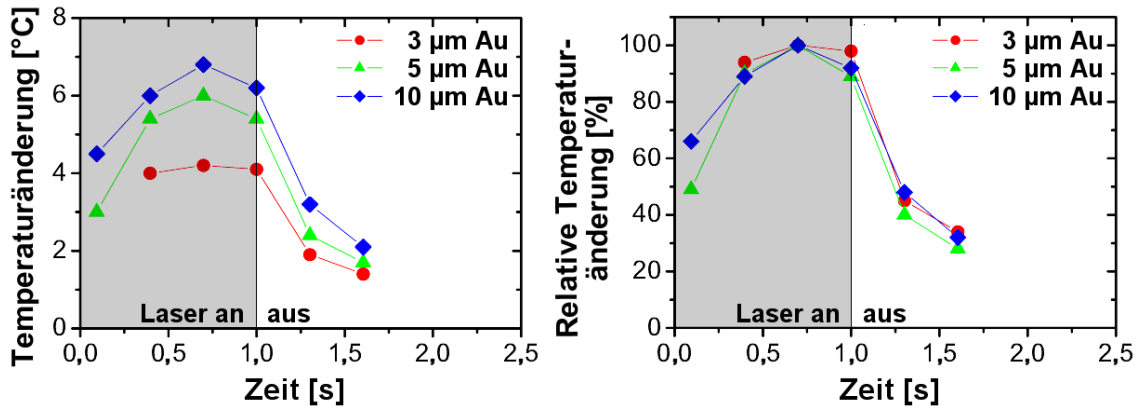


Abb. 4-11: Zeitlicher Verlauf des lichtinduzierten Erwärmens mit 28 mW Laserleistung an μ -Heizplatten aus Gold mit unterschiedlichen Größen. Links ist die Temperaturänderung, rechts die relative Temperaturänderung gegen die Zeit aufgetragen. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Da sich die Größe und Form der μ -Heizplatten sowie die thermischen Eigenschaften von Gold und Kohlenstoff deutlich unterscheiden, ist ein Vergleich dieser beiden Materialien von besonderem Interesse. Abb. 4-12 zeigt den zeitlichen Verlauf des Erwärmens an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff (8 μm Durchmesser und 8 μm Höhe) im Vergleich zu den μ -Heizplatten (0,11 μm Höhe) aus Gold mit 5 μm Durchmesser.

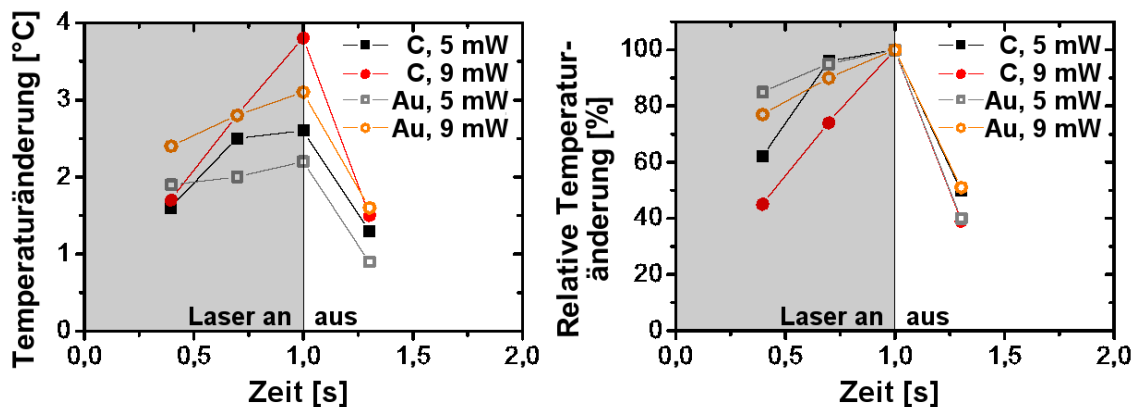


Abb. 4-12: Zeitlicher Verlauf des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff (8 μm Durchmesser) für 5 mW und 9 mW Laserleistung, im Vergleich mit 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold mit ebenfalls 5 mW und 9 mW Laserleistung. Der linke Graph zeigt die Temperaturänderung mit der Zeit, während der rechte den Verlauf der relativen Temperaturänderung zeigt. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Nach 0,4 s der Erwärmung waren die Temperaturänderungen an den μ -Heizplatten aus Gold etwas höher als die an denen aus Kohlenstoff. Nach 0,6 s waren die Temperaturänderungen an Gold bereits gleich oder geringer und nach 1 s deutlich geringer, was den Beobachtungen des vorhergehenden Kapitels 4.3.2 entspricht. Die Temperaturänderung erfolgte mit den Gold-Strukturen zuerst schneller und nahm dann stark ab. Dieser schnelle Anstieg der relativen Temperaturänderung war am Kohlenstoff etwas geringer, aber er nahm im weiteren Verlauf weniger ab. Daraus resultierte ein steilerer Verlauf der relativen Temperaturänderung für die Kohlenstoff-Strukturen im Vergleich zum Gold. Das Abkühlen verlief sehr ähnlich, ohne einen erkennbaren Trend. Somit erfolgte an den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff ein schnellerer Wärmeaustausch mit dem umgebenden Wasser als an denen aus Gold. Der Grund hierfür ist die wesentlich größere Kontaktfläche der Kohlenstoffstrukturen ($250 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu denen aus Gold ($20 \mu\text{m}^2$ bei den $5 \mu\text{m}$ Strukturen).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der verwendeten Größen der μ -Heizplatten aus Gold auf den Verlauf des Erwärmens sehr gering war. Hingegen wurde ein unterschiedlicher Verlauf für zunehmende Laserleistungen und für die beiden unterschiedlichen Materialien festgestellt. Mit zunehmender Laserleistung wird die Energiedichte höher, was nicht nur zu größeren Temperaturerhöhungen, sondern auch zu einer schnelleren Erwärmung führt. Erkennbar ist dies am steileren Anstieg der relativen Temperaturänderung. Durch die Verwendung unterschiedlich großer μ -Heizplatten ändert sich die Energiedichte nicht und der Verlauf der Erwärmung ist sehr ähnlich. Somit hat die Energiedichte einen größeren Einfluss auf den Verlauf der Erwärmung als die Menge an absorbierter Energie. Das Abkühlen der μ -Heizplatten verlief trotz Variation dieser Faktoren und den unterschiedlichen erreichten Temperaturen immer gleich. Somit bestimmt hauptsächlich die Umgebung, also das Glas, auf dem sich die μ -Heizplatten befinden, und die umgebende wässrige Lösung, die Abkühlung der μ -Heizplatten.

Das Erwärmen und die Abkühlung der wässrigen Lösung um die μ -Heizplatte herum erfolgt trotz kleiner gemessener Temperaturänderungen unter 10°C relativ langsam. Dies ist aber besonders für die Manipulation von lebenden Zellen von Vorteil, da diese dann hauptsächlich lokal durch die heiße Oberfläche der μ -Heizplatten, und

weniger durch die Erwärmung der Umgebung, beeinflusst werden. Dies wiederum verhindert unerwünschte Nebenreaktionen, wie zum Beispiel die Denaturierung von Proteinen innerhalb der Zellen (siehe auch Kapitel 2.2.2).

4.3.4 Reproduzierbarkeit des lichtinduzierten Erwärmens

Nachfolgend werden Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des lichtinduzierten Erwärmens und zur Temperaturkonstanz bei kontinuierlicher Bestrahlung mit dem Laser an Hand von μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und aus Gold mit 5 μm Durchmesser vorgestellt. Dies ist von Interesse, da ausgeschlossen werden soll, dass durch das Laserlicht die absorbierenden Strukturen durch Abtragung, Alterung oder chemische Reaktionen ihre Heizwirkung verändern.

Dazu wurde genau wie bei den vorhergehenden Messungen während des Erwärmens eine Bilderserie aufgenommen. In diesem Fall erfolgte das Erwärmen im zeitlichen Abstand von 3 s jeweils 1 s mit 5 mW bzw. 14 mW Laserleistung mit einer frischen, noch nicht verwendeten μ -Heizplatte. Anhand einer Bilderserie aus 120 Bildern wurden elf Wiederholungen des Erwärmens verfolgt. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt (Kapitel 4.3.3) beschrieben, wurde aus der Änderung der Fluoreszenzintensität durch Anpassung über eine Gaußfunktion die maximal erreichte Temperaturänderung ΔT ermittelt.

Den resultierenden Verlauf des wiederholten Erwärmens und Abkühlens an einer μ -Heizplatte aus Kohlenstoff zeigt Abb. 4-13. Der Mittelwert der maximalen Temperaturänderung ΔT_M über alle Wiederholungen betrug $(2,4 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. Die Standardabweichung betrug demnach 8%. Ein genereller Trend zu einer stärkeren oder geringeren Temperaturänderung durch wiederholtes Erwärmen war nicht erkennbar. Um einen besseren Überblick über den Verlauf des Erwärmens zu erhalten, wurde jedes Erwärmen einzeln betrachtet, entsprechend in einer neuen Zeitskala von 0 s (Beginn der Erwärmung) bis 2 s (1 s nach Beendigung des Erwärmens) eingeordnet. Anschließend wurden für jeden Zeitpunkt die Mittelwerte der Temperaturänderungen ΔT über die elf einzelnen Wiederholungen des Erwärmens ermittelt. Die Ergebnisse (siehe

Abb. 4-13 rechts) ergaben eine Standardabweichung von durchschnittlich 15 % um den jeweiligen Mittelwert.

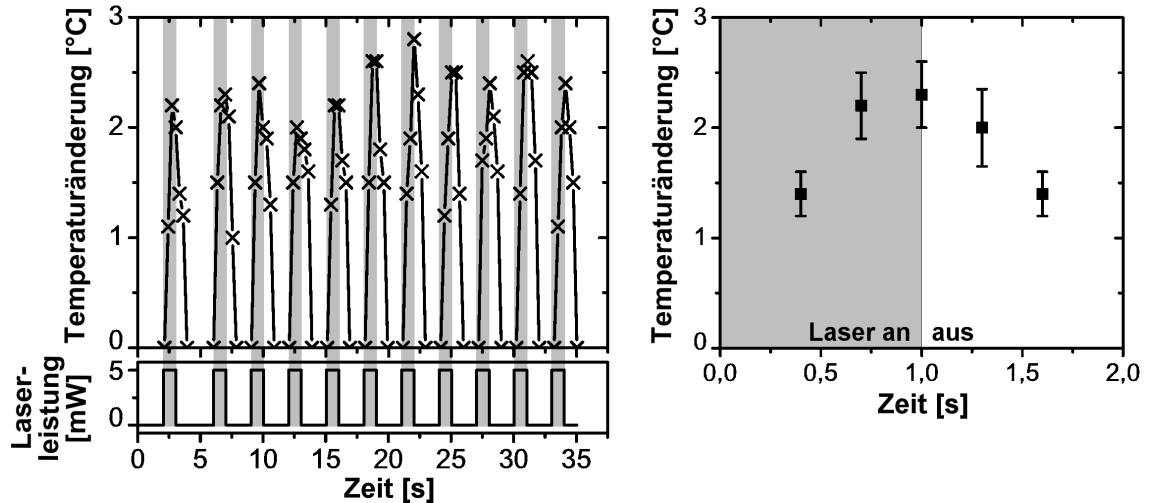


Abb. 4-13: Verlauf der Temperaturänderung ΔT für wiederholtes Erwärmen an einer μ -Heizplatte aus Kohlenstoff (8 μm Durchmesser) für 1 s mit 5 mW Laserleistung im zeitlichen Abstand von 3 s. Der linke Graph zeigt die Temperaturänderung und den Verlauf der Laserleistung mit der Zeit. Der rechte Graph zeigt den Verlauf des Erwärmens anhand der Mittelwerte der Temperaturänderungen über die elf einzelnen Wiederholungen. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Die Ergebnisse für das lichtinduzierte Erwärmen mit 14 mW an den 5 μm durchmessenden Goldstrukturen zeigt Abb. 4-14. Für die maximale Temperaturänderung ΔT_M ergab sich ein Mittelwert von $(3,9 \pm 0,3) \text{ } ^\circ\text{C}$. Die Standardabweichung betrug demnach 8 %, wie bei der Erwärmung an den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff. Ein genereller Trend zur Abnahme oder Zunahme der maximalen Temperaturänderung mit zunehmender Anzahl der einzelnen Erwärmungen war, wie auch bei den Kohlenstoffstrukturen, nicht zu beobachten. Für die Mittelwerte der Temperaturänderungen ΔT über alle elf Wiederholungen für jeden Zeitpunkt während des Erwärmens (siehe Abb. 4-14 rechter Graph) ergaben sich im Durchschnitt Standardabweichungen von 11 %.

Diese Messungen zum wiederholten lichtinduzierten Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und aus Gold ergaben die gleichen Standardabweichungen für die gemessenen maximalen Temperaturänderung ΔT_M . Hingegen waren die Standardabweichungen der Temperaturänderungen ΔT während des Erwärmens an Kohlenstoff größer (15 %) als die beim Erwärmen an Gold (11 %).

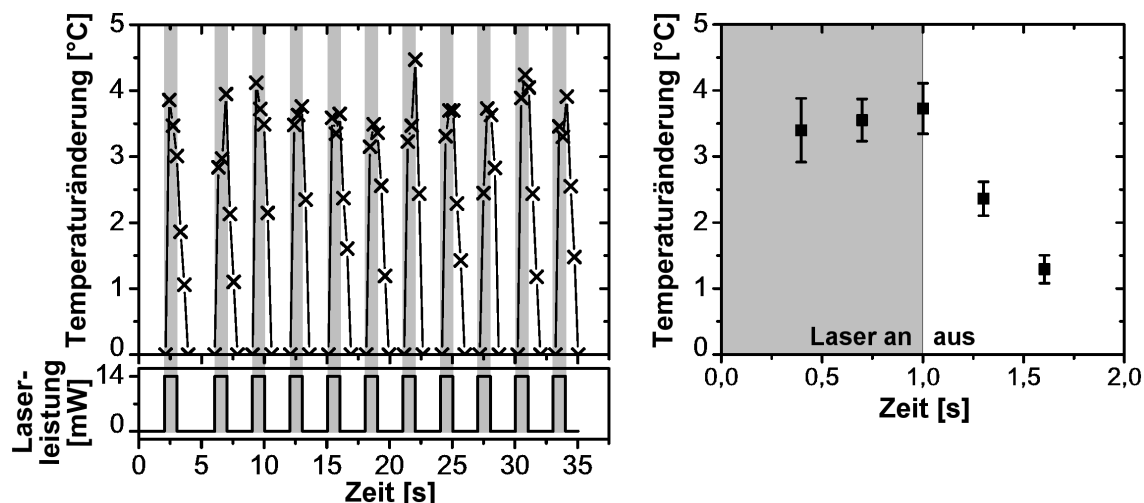


Abb. 4-14: Verlauf der Temperaturänderung ΔT für wiederholtes Erwärmen an einer μ -Heizplatte aus Gold mit 5 μm Durchmesser für 1 s mit 14 mW Laserleistung im zeitlichen Abstand von 3 s. Der linke Graph zeigt die Temperaturänderung und den Verlauf der Laserleistung mit der Zeit. Der rechte Graph zeigt den Verlauf des Erwärmens anhand der Mittelwerte der elf einzelnen Wiederholungen. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Stärkere Schwankungen zu Beginn des Erwärmens können entstehen, da die Temperaturänderung zuerst nur direkt an den μ -Heizplatten erfolgte. Dieser starke lokale Anstieg in der Kurve der Temperaturverteilung kann bei einer Anpassung an eine Gaußfunktion zu Fehlern führen. Ebenso kann diese Anpassung zu Fehlern führen, wenn beim Abkühlen die Temperaturänderung sehr gering und die Temperaturverteilung sehr breit ist. Eine weitere Fehlerquelle sind Schwankungen der zur Fluoreszenzanregung genutzten Quecksilber-Dampf Lampe. Diese Fehlerquellen beeinflussen aber alle Messungen und erklären somit nicht die stärkeren Schwankungen der Mittelwerte der ΔT bei der Nutzung der Kohlenstoffstrukturen. Die gemessenen Temperaturänderungen an den Goldstrukturen waren, auf Grund der höheren Laserleistung, um 150 % größer als die Temperaturänderungen an Kohlenstoffstrukturen und konnten dadurch genauer durch eine Gaußfunktion angepasst und bestimmt werden. Dennoch erklärt dies nicht die deutlich größeren Schwankungen, da auch bei einem ähnlichen Mittelwert von 2,3 °C bzw. 2,4 °C größere Standardabweichungen beim Erwärmen an den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff (13 %) im Vergleich zum Gold (10 %) gefunden wurden. Somit müssen die unterschiedliche Form und Größe der beiden Materialien dieses Phänomen verursachen.

Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass ein Erwärmen mit Schwankungen von ΔT_M um 8 % sowohl an μ -Heizplatten aus Gold als auch an denen aus Kohlenstoff möglich ist. Somit ist eine gewisse Reproduzierbarkeit gegeben. Es kann ausgeschlossen werden, dass sich die μ -Heizplatten durch die starke Erwärmung in ihren Eigenschaften verändert hatten.

4.3.5 Untersuchung der Stabilität der Temperaturerhöhung

Um zu untersuchen, ob auch eine längere Erwärmung von 10 s keinen Einfluss auf die Eigenschaften der verwendeten μ -Heizplatten hat, wurden die Versuche aus dem vorhergehenden Kapitel 4.3.4 unter einmaligem Erwärmen mit 10 s Belichtungszeit wiederholt. Das Erwärmen an den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff erfolgte mit 5 mW und das Erwärmen an den 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold mit 14 mW. Anhand der aufgenommenen Bilderserie wurde wie zuvor das Erwärmen zeitlich verfolgt (siehe Abb. 4-15).

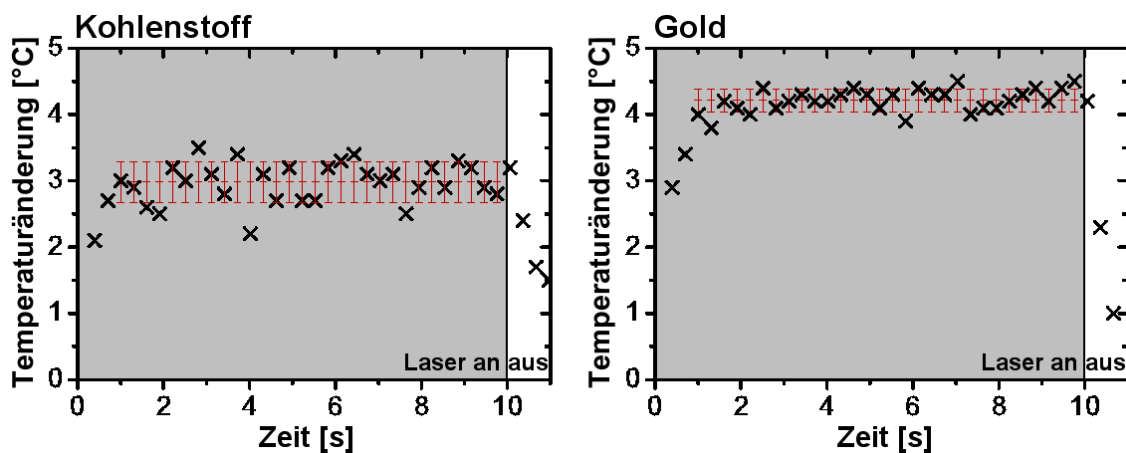


Abb. 4-15: Zeitlicher Verlauf der Temperaturänderung für 10 s Erwärmen an einer μ -Heizplatte aus Kohlenstoff (8 μm Durchmesser) mit 5 mW Laserleistung und einer 5 μm durchmessenden μ -Heizplatte aus Gold mit 14 mW Laserleistung. Die roten Punkte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert über die letzten neun Sekunden des Erwärmens und dessen Standardabweichung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Beim Erwärmen über 10 s wurde deutlich, dass die Temperaturen an beiden Materialien nach etwa 1 s nicht mehr anstiegen. Ebenso benötigte das System etwa 1 s, um sich nach dem Erwärmen abzukühlen. Nach der ersten Sekunde des Erwärmens blieb die Temperaturänderung konstant. Weder für die μ -Heizplatte aus Kohlenstoff

noch für die aus Gold konnte ein allgemeiner Trend zur Zunahme oder Abnahme der Temperaturänderung festgestellt werden. Allerdings waren die Schwankungen sowohl absolut als auch relativ zu den Messwerten bei der μ -Heizplatte aus Kohlenstoff deutlich höher als bei der μ -Heizplatte aus Gold. Die relative Abweichung betrug $\pm 10\%$ im Vergleich zu $\pm 4\%$ bei der μ -Heizplatte aus Gold.

Mit diesen Messungen wurden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Erwärmens im Kapitel 4.3.4 bestätigt. Die Materialien veränderten sich nicht merklich, aber das Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff führte zu stärkeren Schwankungen der gemessenen Temperaturänderung als das Erwärmen an Gold. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen Formen und Größen sowie bei den unterschiedlichen Oberflächen der beiden Materialien. Eine starke lokale Erwärmung führt auf Grund der Temperaturunterschiede zu Strömungen im System. Durch die größere Oberfläche der Kohlenstoffstrukturen können lokal stark unterschiedliche Temperaturen an der Oberfläche entstehen, was wiederum zu stärkeren Strömungen direkt an der μ -Heizplatte und dadurch zu den Schwankungen der gemessenen Temperaturänderung führt. Hingegen erfolgt die Erwärmung an den μ -Heizplatten aus Gold gleichmäßiger, so dass auch die Schwankungen geringer sind. Für ein gleichmäßiges Erwärmen sind diese Strukturen somit zu bevorzugen.

4.4 Nachweis der Erwärmung durch Schmelzen doppelsträngiger DNA

Alternativ zur Fluoreszenzthermometrie wird im Folgenden eine zweite Methode zum Nachweis des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten vorgestellt. Diese beruht auf dem bereits im Kapitel 4.1.2 vorgestellten Schmelzen doppelsträngiger DNA. Durch Anfärben doppelsträngiger DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 sollte die Lösung an Fluoreszenzintensität verlieren, wenn Temperaturen über der Schmelztemperatur der DNA erreicht werden. Daher sollte mit einem solchen System ein Nachweis von Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur der DNA, falls diese beim Erwärmen an den μ -Heizplatten erreicht werden, ermöglicht werden.

4.4.1 Durchführung

Einer Lösung von 40 μL einer $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lösung doppelsträngiger DNA (66 bp, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurden 400 μL einer $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ YOYO-1-Lösung (Invitrogen) und 800 μL demineralisiertes Wasser zugegeben. Die verwendete PBS Lösung bestand aus $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 und $136 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl in demineralisiertem Wasser. Der pH-Wert wurde mit einer Lösung von $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl auf 7,4 eingestellt, die Lösung filtriert und anschließend im Autoklav sterilisiert. Die Sequenz der verwendeten DNA lautete wie folgt:

5'-GATACGAGCGCAAAGCCCGTAGGTACCAATATT
GAATTCGGATCCCTATTCTCGGTCATTAGCCAT-3'

Als Endkonzentrationen in der Lösung wurden $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA, $323 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ YOYO und $4,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na^+ erhalten. Als Schmelzpunkt der verwendeten DNA in dieser Lösung wurde nach Gl. 4-4 eine Temperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ berechnet.

Eine Reaktionskammer des PDMS-Glas-Chips (siehe Kapitel 3.2.1) wurde mit 100 μL dieser DNA-Lösung gefüllt und mit einer PDMS-Schicht, wie mit einem Deckel, verschlossen. Die Versuche erfolgten, wie auch bereits im Kapitel 3.2.2, unter Ausleuchtung mit dem blauen Licht der Quecksilberdampfampe für maximal 30 s für die Fluoreszenzanregung und unter 1 s Bestrahlung einer μ -Heizplatte mit dem 830 nm Laserlicht für die lichtinduzierte Erwärmung. Für diese Experimente wurde darauf geachtet, dass für jeden einzelnen Versuch eine neue μ -Heizplatte verwendet wurde, um immer die gleichen Bedingungen einzuhalten.

4.4.2 Ergebnisse

Die Bestimmung der maximalen Änderung der Fluoreszenzintensität während des Schmelzens der doppelsträngigen DNA durch die Erwärmung an einer μ -Heizplatte erfolgte analog der Bestimmung der maximalen Temperaturerhöhung mit Rhodamin B im Kapitel 4.3.2. Die Änderung der Fluoreszenzintensität ergibt sich, nach Hintergrundkorrektur, aus der Differenz der erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen während des Erwärmens und der ersten Aufnahme vor dem Erwärmen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Betrachtet

wurde der Verlauf der Intensität durch die Mitte der μ -Heizplatte, in x -Richtung. Als Beispiel ist im linken Graphen in Abb. 4-16 der Intensitätsverlauf für das Erwärmen an Kohlenstoff μ -Heizplatten mit unterschiedlichen Laserleistungen dargestellt.

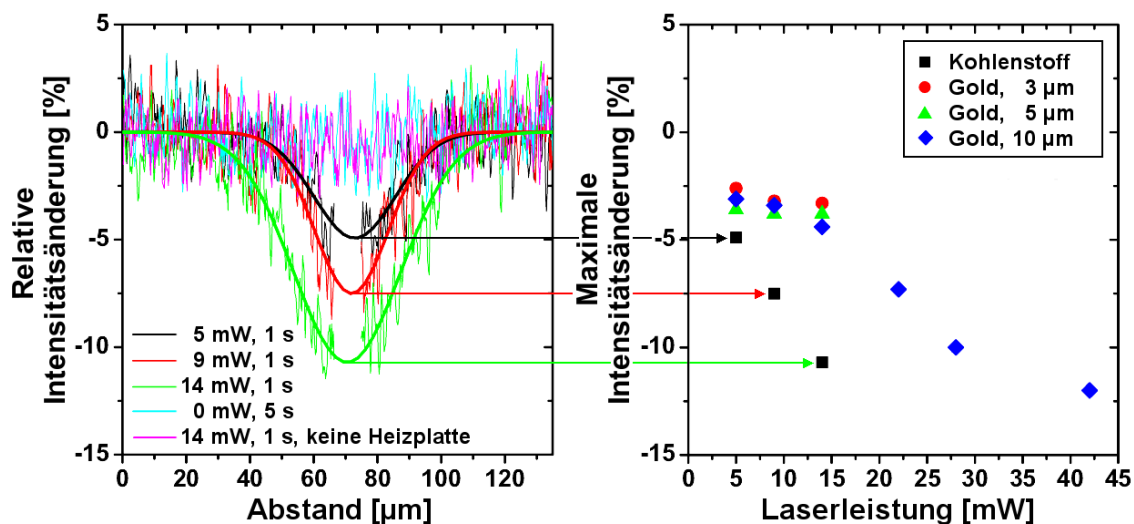


Abb. 4-16: Links: Verlauf der relativen Intensitätsänderung durch Schmelzen doppelsträngiger DNA nach 1 s Erwärmen an Kohlenstoff μ -Heizplatten mit variiertem Laserleistung sowie nach Belichten mit dem Laser ohne μ -Heizplatte (pinkfarbene Linie) und Belichten mit der Quecksilberdamflampe ohne Laserlicht (blaue Linie). Rechts: Maximale Intensitätsänderung nach dem Erwärmen für 1 s an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und Gold mit unterschiedlicher Laserleistung jeweils unterhalb der Grenze zur Blasenbildung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

Aus diesem Verlauf wurde, durch eine Anpassung mit einer Gaußfunktion, die maximale Intensitätsänderung ΔI ermittelt. Wie bereits im Kapitel 4.3.2 beschrieben, erfolgt die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch das Erwärmen nur direkt an der μ -Heizplatte. Durch die unverändert hohe Fluoreszenzintensität der darüber liegenden Bereiche wurde die Fluoreszenzänderung überlagert, so dass die bestimmten Werte für die Änderung der Fluoreszenzintensität Mittelwerte über die gesamte Höhe der Reaktionskammer waren. Für das Ziel dieser Messungen, der Nachweis des Erreichens von Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA von 50 °C, sind diese Mittelwerte absolut ausreichend, da hierzu nur eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden muss.

Durch Bestrahlen mit dem Licht der Quecksilberdampfampe für die Dauer von 5 s konnte keine Änderung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, wenn kein Laserlicht verwendet wurde (Abb. 4-16 links, blaue Linie). Auch durch das Bestrahlen

mit 14 mW Laserlicht für 1 s ohne eine μ -Heizplatte war keine Intensitätsänderung erkennbar (Abb. 4-16 links, pinkfarbene Linie). Nur durch die Verwendung der μ -Heizplatten in Kombination mit dem Laserlicht war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität um die μ -Heizplatte herum erkennbar. Somit wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität nicht durch das Licht der Quecksilberdampfampe oder des Lasers hervorgerufen, sondern war die direkte Folge des Erwärmens der DNA an den μ -Heizplatten.

Bereits bei einer Laserleistung von 5 mW betrug die maximale Intensitätsänderung ΔI nach dem Erwärmen an einer μ -Heizplatte aus Kohlenstoff -5 % (Abb. 4-16 links, schwarze Linie). Mit zunehmender Laserleistung von 14 mW sank ΔI auf -11 % (Abb. 4-16 links, grüne Linie). Für eine Laserleistung über 14 mW bildeten sich Blasen an der μ -Heizplatte, so dass keine Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen mehr möglich war. Die μ -Heizplatten aus Gold mit 10 μm Durchmesser führten zu einer geringeren maximalen Intensitätsänderung ΔI um -3 % für 5 mW Laserleistung, die sich für Laserleistungen bis 14 mW nur wenig änderte (-4,5 %). Ab einer Laserleistung von 22 mW war eine starke Intensitätsänderung mit zunehmender Laserleistung erkennbar, so dass für 42 mW Laserleistung ΔI bereits -12 % betrug. Eine höhere Laserleistung führte zur Blasenbildung. Die kleineren μ -Heizplatten aus Gold mit 3 μm und 5 μm Durchmesser zeigten eine sehr geringe maximale Intensitätsänderung ΔI zwischen -2,5 % bis -4 % und führten bereits bei einer Laserleistung von mehr als 14 mW zur Blasenbildung.

Diese kleinen μ -Heizplatten führten demnach ausschließlich zu einem sehr lokalen Schmelzen der DNA an ihrer Oberfläche. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn nur die Oberfläche der μ -Heizplatte und nicht die umgebende Flüssigkeit Temperaturen oberhalb von 50 °C erreichte. Die Fluoreszenzänderung erfolgte dann hauptsächlich oberhalb der flachen μ -Heizplatten aus Gold, so dass sie kaum detektiert werden konnte. Bei der Verwendung der größeren μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und der aus Gold mit 10 μm Durchmesser war die Erwärmung weniger lokal, so dass eine Erwärmung der umgebenden Flüssigkeit möglich war, bevor es zur Blasenbildung kam.

Im Vergleich zum Kapitel 4.3.2 unterscheiden sich die Ergebnisse im Hinblick auf die Blasenbildung deutlich. Während in der DNA-Lösung mit zunehmender Größe

der Goldstrukturen eine höhere Laserleistung für eine Blasenbildung notwendig war, erfolgte die Blasenbildung in der Rhodamin B-Lösung mit zunehmender Größe früher. Die lichtinduzierte Erwärmung wurde demnach durch die DNA in der Lösung beeinflusst. Die vorhandene DNA scheint sich an den Oberflächen der μ -Heizplatten anzulagern und diese soweit zu isolieren, dass es zu einer stärkeren lokalen Erwärmung bei kleineren Strukturen kommt. Diese resultierte in der deutlich früheren Blasenbildung. Bei den größeren Strukturen war diese Isolierung weniger wirksam, so dass sie sich fast wie bei den vorhergehenden Versuchen verhielten und die Blasenbildung sogar erst bei etwas höheren Laserleistungen einsetzte.

Diese Ergebnisse zeigten, dass direkt an der Oberfläche des Kohlenstoffes und des Goldes während des lichtinduzierten Erwärmens Temperaturen von über 50 °C herrschten. Mit den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und den 10 μm μ -Heizplatten aus Gold war auch ein Schmelzen der doppelsträngigen DNA in der Lösung um die μ -Heizplatten möglich, wie die deutliche Abnahme der Fluoreszenzänderung belegten. Da Temperaturen über 50 °C erreicht werden können und lebende Zellen sehr empfindlich auf so große Temperaturerhöhungen reagieren (siehe Kapitel 2.2.2), sollte auch eine Kontrolle des Zellwachstums mit beiden Materialien möglich sein.

4.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Fluoreszenzthermometrie mit Rhodamin B konnte gezeigt werden, dass ein kontrolliertes lokales Erwärmen durch absorbiertes Laserlicht an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und aus Gold möglich ist.

An den Oberflächen der μ -Heizplatten wurden Temperaturen über 100 °C erreicht, wie die beobachtete Blasenbildung belegte. Beim Erwärmen an Gold waren im Vergleich zum Kohlenstoff etwas höhere Laserleistungen nötig, um gleiche Temperaturänderungen zu erzielen. Dieser Unterschied resultierte aus den sehr unterschiedlichen Geometrien und Materialeigenschaften der verwendeten μ -Heizplatten. Mit zunehmender Größe der verwendeten μ -Heizplatten aus Gold wurde eine stärkere Erwärmung der umgebenden Flüssigkeit gemessen. Durch die Wärmeleitung innerhalb des Goldes wurde mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten

ein größeres Volumen erwärmt, was zu einer stärkeren Fluoreszenzänderung innerhalb der Lösung und somit zu den höheren bestimmten Temperaturänderungen führte. Gleichzeitig sollte dadurch die absolute Temperaturerhöhung an der Oberfläche geringer werden. Beobachtet wurde aber eine frühere Blasenbildung an den μ -Heizplatten aus Gold mit 10 μm Durchmesser im Vergleich zu denen mit 3 μm und 5 μm Durchmesser. Durch die starke lokale Erwärmung konnten demnach Konvektionsströme entstehen, die zu einer zusätzlichen Abkühlung der kleineren μ -Heizplatten durch die umgebende, kältere Flüssigkeit führten. Eine Blasenbildung erfolgte durch diese Abkühlung erst bei höheren Laserleistungen. Bei den größten μ -Heizplatte mit 10 μm Durchmesser konnten diese Konvektionsströme das Zentrum der μ -Heizplatte nicht abkühlen, so dass eine Blasenbildung in diesem Fall nicht verhindert wurde.

Für unterschiedlich große Goldstrukturen konnten keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Erwärmens festgestellt werden. Hingegen wurden für die beiden verwendeten Materialien, die sich deutlich in Form und Größe unterscheiden, sowie für variierte Laserleistungen, Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Erwärmens festgestellt. Demnach hat die Energiedichte einen größeren Einfluss auf den Verlauf der Erwärmung als die Menge an absorbierter Energie. Das Abkühlen verlief unabhängig von der Laserleistung, von dem Material oder von der Größe der μ -Heizplatte sehr einheitlich. Im Gegensatz zur Erwärmung bestimmten demnach hauptsächlich die Umgebung, also das Glas, auf dem sich die μ -Heizplatten befinden, und die umgebende wässrige Lösung, die Abkühlung der μ -Heizplatten.

Es wurde gezeigt, dass beide Materialien ein reproduzierbares Erwärmen und Abkühlen des Systems innerhalb von einer Sekunde ermöglichen. Eine merkliche Veränderung der Eigenschaften der μ -Heizplatten durch die starke Erwärmung konnte ausgeschlossen werden. Die Temperaturänderungen bei der Erwärmung an den μ -Heizplatten aus Gold zeigten allerdings geringere Schwankungen, so dass sie für ein gleichmäßiges Erwärmen zu bevorzugen sind. Der Grund hierfür ist eine kleinere und gleichmäßigere Oberfläche des Goldes im Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit im Vergleich zur 3,5fach größeren und durch die Pyrolyse sehr rauen Oberfläche der Kohlenstoffstrukturen.

Die Versuche mit doppelsträngiger DNA konnte nachgewiesen werden, dass die Lösung um die μ -Heizplatten herum auf über 50 °C erwärmt wurde, wenn μ -Heizplatten aus Kohlenstoff oder aus Gold mit 10 μm Durchmesser verwendet wurden. Bei diesen Versuchen wurde eine deutlich frühere Blasenbildung an den μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und aus Gold mit 3 μm und 5 μm Durchmesser festgestellt als an denen aus Gold mit 10 μm Durchmesser. Die vorhandene DNA scheint sich an den Oberflächen der μ -Heizplatten anzulagern und diese soweit zu isolieren, dass es zu einer stärkeren lokalen Erwärmung bei kleineren Strukturen kommt, während bei den größeren Strukturen diese Abschirmung weniger wirksam war.

5 Simulation der lichtinduzierten Erwärmung

In diesem Kapitel werden die im vorherigen Kapitel 4 vorgestellten, experimentell ermittelten Ergebnisse zur Erwärmung an absorbierenden Mikrostrukturen (μ -Heizplatten) durch einen 830 nm Diodenlaser den Ergebnissen von theoretischen Betrachtungen gegenübergestellt. Dabei soll insbesondere der Einfluss der Laserleistung und der Größe der μ -Heizplatten auf die Temperaturänderung untersucht werden. Deshalb wurden nur die bereits in Tabelle 4-2 aufgeführten, runden μ -Heizplatten aus Gold mit drei unterschiedlichen Durchmessern von 3 μm , 5 μm und 10 μm betrachtet.

Die für die Simulationen notwendigen theoretischen Grundlagen zur Wärmeleitung werden im Kapitel 5.1 vorgestellt. Zur Beschreibung der lichtinduzierten Erwärmung wurden in Zusammenarbeit mit einem Kollegen zwei unterschiedliche Modelle entwickelt, welche im Kapitel 5.2 beschrieben werden. Die Ergebnisse der beiden Modelle werden im Kapitel 5.3 vorgestellt und abschließend im Kapitel 5.4 mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5.5.

5.1 Theoretische Grundlagen zur Wärmeleitung

Bei der lichtinduzierten Erwärmung wird die Energie des Laserlichts durch Absorption an den μ -Heizplatten in Wärme umgewandelt. Diese durch den Laser zugeführte Wärme wird entweder an die kältere Umgebung abgegeben, oder entsprechend der Wärmekapazität gespeichert. Für ein beliebiges Volumenelement innerhalb des Materials folgt daraus, dass es durch den Laser als Wärmequelle um den Wärmestrom \dot{Q}_{Quell} und durch benachbarte wärmere Bereiche um \dot{Q}_{ein} erwärmt wird. Gleichzeitig wird der Wärmestrom \dot{Q}_{aus} an benachbarte kältere Bereiche abgegeben.

Allgemein ergibt sich die zeitliche Änderung der innerhalb eines Volumenelementes des Materials gespeicherten Wärme aus der Summe der ein- und austretenden Ströme sowie des Quellterms:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \dot{Q}_{ein} - \dot{Q}_{aus} + \dot{Q}_{Quell} \quad \text{Gl. 5-1}$$

Q : Wärme [J]; t : Zeit [s]; \dot{Q}_{ein} : eintretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$];
 \dot{Q}_{aus} : austretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; \dot{Q}_{Quell} : Wärmestrom durch eine äußere
 Quelle (z. B. Laser) [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$].

Die zeitliche Änderung der innerhalb eines Volumenelementes des Materials gespeicherten Wärme wird gleichzeitig durch die Materialeigenschaften wie folgt bestimmt:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = V \cdot \rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} \quad \text{Gl. 5-2}$$

Q : Wärme [J]; t : Zeit [s]; V : Volumen [m^3]; ρ : Dichte des Materials [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$];
 c_p : spezifische Wärmekapazität [$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; T : Temperatur [K].

Im betrachteten System tritt keine erzwungene Konvektion auf, wozu zum Beispiel durch Pumpen erzeugte Flüssigkeitsströme in Mikrokanälen zählen würden. Eine mögliche Konvektion durch Wärmeströmung wird nicht berücksichtigt. Daher sind nur die Wärmeströme, resultierend aus der Wärmeleitung sowie aus dem Wärmeverlust an Grenzflächen durch Wärmeübergang, zu betrachten.

Die Wärmeströme durch Wärmeleitung werden durch das Fourier'sche Gesetz der Wärmeleitung beschrieben:

$$\dot{Q} = -\lambda \cdot A \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \quad \text{Gl. 5-3}$$

\dot{Q} : Wärmestrom durch Wärmeleitung [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; λ : Wärmeleitfähigkeitskoeffizient [$\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; A : Wärmeaustauschfläche [m^2]; T : Temperatur [K]; x : Strecke [m].

Für den Wärmestrom durch Wärmeübergang gilt folgende Gleichung:

$$\dot{Q}_{Ü/V} = \alpha \cdot A \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 5-4}$$

$\dot{Q}_{Ü/V}$: Wärmestrom durch Wärmeübergang [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; α : Wärmeübergangskoeffizient [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$]; A : Wärmeaustauschfläche [m^2]; ΔT : Temperaturdifferenz zwischen den Grenzschichten [K].

Die letzte fehlende Größe in Gl. 5-1 ist der Wärmestrom durch eine äußere Quelle \dot{Q}_{Quell} . Als Energiequelle wurde nur der Laser eingesetzt, so dass sich der Wärmestrom aus dem Produkt der Intensität und der bestrahlten Fläche A ergibt:

$$\dot{Q}_{Quell} = P(r) = I(r) \cdot A \quad \text{Gl. 5-5}$$

\dot{Q}_{Quell} : Wärmestrom durch den Laser als äußere Quelle [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; $P(r)$: Lokale Laserleistung in Abhängigkeit vom Abstand r vom Strahlmittelpunkt [W]; $I(r)$: Lokale Intensität in Abhängigkeit vom Abstand r vom Strahlmittelpunkt [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; A : Bestrahlte Fläche [m^2].

Für die übertragene Energie des Lasers wird ein Gaußprofil angenommen. Für das Intensitätsprofil eines Gaußstrahls gilt (nach Gl. 2-10 mit $z = z_0$):

$$I(r) = I_0 \cdot e^{-\frac{2r^2}{r_0^2}} = I_0 \cdot e^{-g \cdot r^2} \quad \text{Gl. 5-6}$$

$I(r)$: Lokale Intensität in Abhängigkeit vom Abstand r vom Strahlmittelpunkt [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; I_0 : Maximale Intensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; r : Abstand vom Strahlmittelpunkt [m]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m]; g : Gaußfaktor für Anpassung [m^{-2}].

Die maximale Intensität I_0 wird nach Gl. 2-12 berechnet:

$$I_0 = \frac{2 \cdot P_{ges}}{\pi \cdot r_0^2} \quad \text{Gl. 2-12}$$

I_0 : Maximale Intensität im Fokuspunkt [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; P_{ges} : Gesamte Laserleistung; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r_0 : Radius des Laserstrahls im Fokuspunkt [m].

Daraus ergibt sich bei einer maximalen Laserleistung P_{ges} von 56 mW und dem für den verwendeten optischen Aufbau abgeschätzten Strahlradius r_0 von 2,5 μm (siehe Kapitel 3.2.3) eine maximale Laserintensität I_0 von $5,7 \cdot 10^6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$. Für den zur Anpassung des Intensitätsprofils nötigen Gauß-Faktor g muss nach Gl. 5-6 gelten:

$$g = \frac{2}{r_0^2} \quad \text{Gl. 5-7}$$

g : Gaußfaktor für Anpassung [m^{-2}]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m].

Damit ergibt sich ein Gaußfaktor g von $8 \cdot 10^{10} \text{ m}^{-2}$.

Diese fünf Gleichungen Gl. 5-1 bis Gl. 5-5 wurden zur Beschreibung der lichtinduzierten Erwärmung an μ -Heizplatten genutzt. Die hierzu verwendeten Modelle werden im nachfolgenden Kapitel 5.2 vorgestellt.

5.2 Verwendete Modelle zur Simulation des lichtinduzierten Erwärmens

Zwei unterschiedliche Modelle wurden entwickelt, um den Einfluss der Laserleistung und der Größe der μ -Heizplatten auf die lichtinduzierte Erwärmung zu simulieren. Ein erstes Modell diente zur Simulation der Temperaturverteilung innerhalb des Wassers und des Glases um die μ -Heizplatte herum im stationären System. Ein zweites Modell wurde entwickelt, um die Temperaturverteilung innerhalb des Glases für den Grenzfall zu beschreiben, wenn durch extreme Konvektion die Temperatur des Wassers konstant 25 °C beträgt.

Mit Hilfe dieser beiden Modelle wurde die lichtinduzierte Erwärmung mit dem Programm Aspen Custom Modeller (Aspen Technology, Inc., Burlington, Massachusetts, USA) basierend auf einer *Finite-Differenzen*-Methode simuliert. Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Messungen zu ermöglichen, wurden die Durchmesser der μ -Heizplatten und die Laserleistungen entsprechend denen im Experiment gewählt. Die Simulationen erfolgten deshalb mit μ -Heizplatten von 3 μm , 5 μm und 10 μm Durchmesser für jeweils fünf verschiedene Laserleistungen von 5 mW, 9 mW, 14 mW, 28 mW und 42 mW. Der Laserdurchmesser betrug 5 μm .

5.2.1 Erstes Modell zur Simulation - Stationäres System

Im ersten Modell wurde das System in drei Bereiche unterteilt. Diese waren die Fläche der μ -Heizplatte, das darunter befindliche Glas und das oberhalb des Glases und der μ -Heizplatte befindliche Wasser, wie in Abb. 5-1 dargestellt.

Als Zentrum des Systems wurde der Mittelpunkt der μ -Heizplatte gewählt. Ausgehend von diesem Punkt erfolgt die Wärmeverteilung innerhalb einer Ebene des Systems (in r -Richtung) rotationssymmetrisch. Deshalb genügt eine Betrachtung der Wärmeverteilung auf einer einzigen Achse beginnend im Zentrum des Laserspots, so dass sich über die Tiefe ein zweidimensionales Modell ergibt. Hierzu wurde das System in z -Richtung in einzelne rotationssymmetrische Ebenen unterteilt, welche über Wärmeleitung bzw. Wärmeübergang miteinander in Wechselwirkung standen. Innerhalb der einzelnen Ebenen wurden entlang des Radius Punkte mit konstantem Abstand definiert.

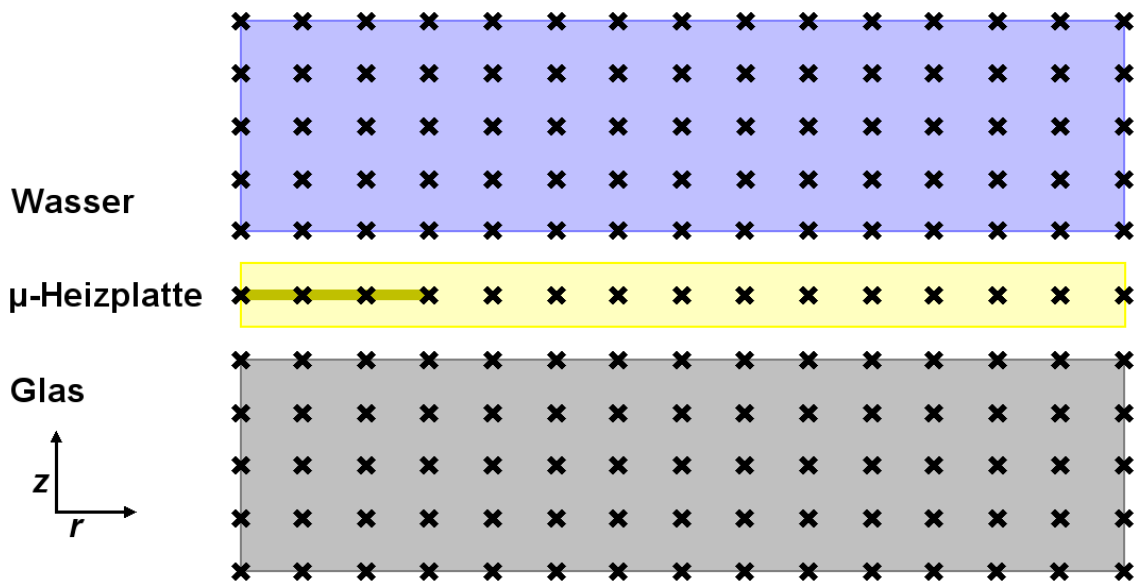


Abb. 5-1: Schematische Darstellung des ersten Modells zur Berechnung der Wärmeverteilung innerhalb des Wassers, des Glases und der μ -Heizplatte bei lichtinduzierter Erwärmung. Es erfolgt eine zweidimensionale Betrachtung in radialer und in z -Richtung.

In diesem Modell wurde das 150 μm dicke Glas und die Wasserschicht bis in 150 μm Höhe in jeweils 20 Ebenen unterteilt. Innerhalb einer Ebene wurden entlang des Radius bis in 200 μm Entfernung vom Mittelpunkt 500 Punkte mit konstantem Abstand definiert. Zwischen dem Glas und dem Wasser wurde eine Ebene als die der μ -Heizplatte definiert. Diese Ebene wurde ebenfalls entlang des Radius bis in 200 μm Entfernung vom Mittelpunkt in 500 Punkte aufgeteilt. Zusätzlich wurde definiert, bis zu welchem dieser Punkte, ausgehend vom Mittelpunkt des rotationssymmetrischen Systems, die μ -Heizplatte reichte. Außerhalb dieses Radius der μ -Heizplatte befand sich Wasser. Dieser Ebene wurde keine Dicke zugeordnet. Die Simulationen erfolgten für einen Zeitraum von 0,5 s mit Zeitintervallen von jeweils 1 ms. Eine ausführlichere Beschreibung dieses Modells und dessen Berechnung erfolgt im Kapitel A.1.

5.2.2 Zweites Modell zur Simulation - Grenzfall für extreme Konvektion

Um den Grenzfall für extreme Konvektion zu beschreiben, wurde ein zweites, sehr vereinfachtes Modell entwickelt. In diesem Modell wurde das System in nur zwei Bereiche unterteilt, wie schematisch in Abb. 5-2 dargestellt.

Diese zwei Bereiche waren zum einen die Fläche der μ -Heizplatte und zum anderen das darunter befindliche Glas. Das oberhalb des Glases und neben dem Gold der μ -Heizplatte befindliche Wasser hatte eine konstante Temperatur von 25 °C. Dies entspricht dem Grenzfall, dass durch extrem starke Konvektion stets Wasser mit einer Temperatur von 25 °C das System kühlt. Es wurden keine Konvektionsströme betrachtet. Wie beim ersten Modell wurde das System in einzelne, rotationssymmetrische Ebenen unterteilt.

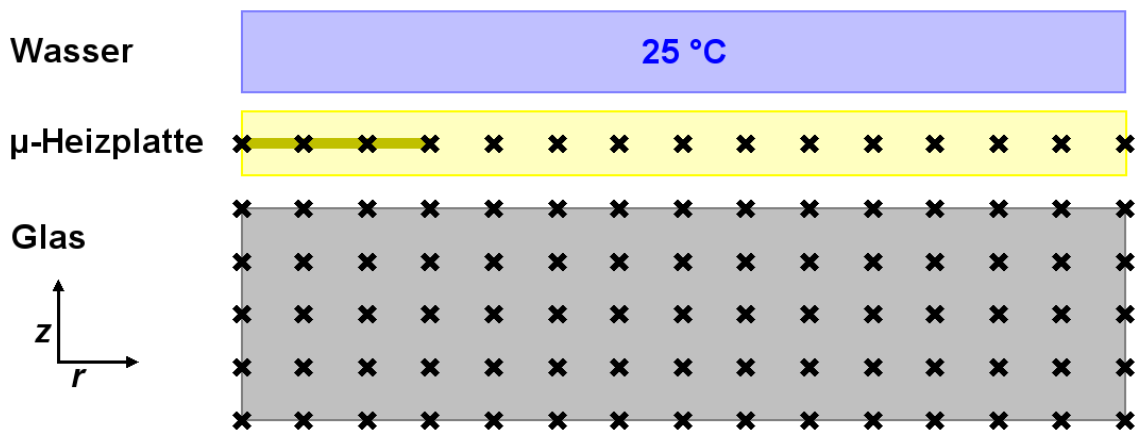


Abb. 5-2: Schematische Darstellung des zweiten Modells zur Berechnung der Wärmeverteilung innerhalb des Glases und der μ -Heizplatte bei lichtinduzierter Erwärmung. Es erfolgte eine zweidimensionale Betrachtung in radialer und in z -Richtung.

Das 150 μm dicke Glas wurde in 10 Ebenen unterteilt. Innerhalb einer Ebene wurde ausgehend vom Mittelpunkt ein Bereich von 300 μm entlang des Radius, aufgeteilt in 750 Punkte, untersucht. Eine Ebene oberhalb des Glases wurde als μ -Heizplatte definiert. Diese Ebene wurde in r -Richtung, genau wie das Glas, in einem Radius von 300 μm in 750 Punkte aufgeteilt. Zusätzlich wurde definiert, bis zu welchem dieser Punkte die μ -Heizplatte reichte. Außerhalb dieses Radius der μ -Heizplatte befand sich Wasser. Die Simulationen erfolgten für einen Zeitraum von einer Sekunde mit zeitlichen Intervallen von 1 ms. Dieses zweite Modell und dessen Berechnung wird im Kapitel A.2 ausführlicher vorgestellt.

5.3 Ergebnisse der Simulationen

Die Ergebnisse der Simulationen mit beiden Modellen werden nachfolgend vorgestellt. Es wurden jeweils μ -Heizplatten von 3 μm , 5 μm und 10 μm Durchmesser

simuliert, welche jeweils für 1 s mit fünf verschiedenen Laserleistungen von 5 mW, 9 mW, 14 mW, 28 mW und 42 mW bestrahlt wurden. Alle angegebenen Temperaturänderungen beziehen sich auf die Umgebungstemperatur von 25 °C.

5.3.1 Ergebnisse des ersten Modells - Stationäres System

Mit dem ersten Modell, dem eines stationären Systems (siehe auch Abb. 5-1), wurde innerhalb von weniger als 0,3 s nach Beginn der Erwärmung ein stationärer Zustand erreicht. Für die Auswertung wurde die Temperaturverteilung im stationären Zustand innerhalb der untersten Ebene des Wassers, welche nicht im direkten Kontakt zur μ -Heizplatte steht, betrachtet. Die Temperaturverteilungen in dieser Wasserschicht neben den μ -Heizplatten nach 0,5 s Erwärmung sind in Abb. 5-3 dargestellt.

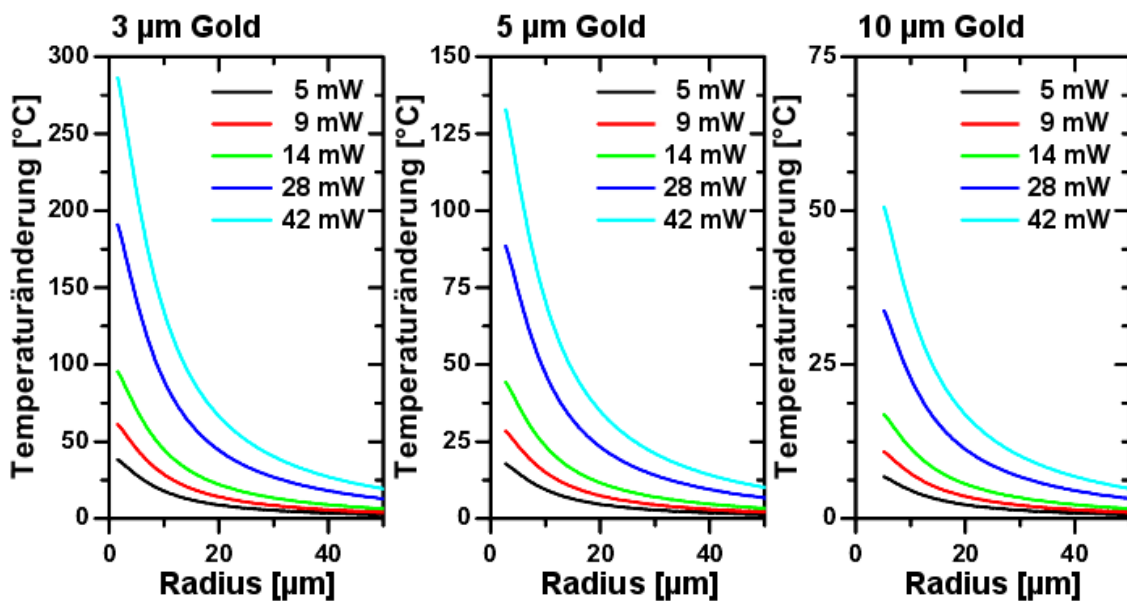


Abb. 5-3: Mit Hilfe des ersten Modells simulierte Temperaturverteilung neben den μ -Heizplatten innerhalb der untersten Wasserschicht während der lichtinduzierten Erwärmung an drei μ -Heizplatten unterschiedlicher Größe für fünf verschiedene Laserleistungen im stationären Zustand des Systems. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

Erwartungsgemäß wurden mit zunehmender Laserleistung die Temperaturänderungen größer. Dieses System zeigte zudem eine starke Abhängigkeit der Temperaturänderung von der Größe der μ -Heizplatten. Die μ -Heizplatten mit 3 μ m Durchmesser führten zu einer deutlich stärkeren Erwärmung des Systems als die größeren. Die Temperaturänderung wurde durch Vergrößerung der μ -Heizplatte von

3 μm auf 5 μm Durchmesser um 50 % reduziert. Durch eine weitere Vergrößerung der μ -Heizplatten von 5 μm auf 10 μm Durchmesser nahm die Temperaturänderung noch einmal um 50 % ab.

Diese Ergebnisse entsprachen den bereits im Kapitel 4.3.2 erläuterten Erwartungen, dass kleinere μ -Heizplatten lokal zu einer stärkeren Erwärmung führen. Die kleinsten μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser führten zu einer deutlich stärkeren Erwärmung des gesamten Systems als die größeren, obwohl auf Grund des Laserradius von 5 μm nur 70 % der Laserleistung auf diese kleinen μ -Heizplatten traf. Der Grund hierfür waren die starken lokalen Temperaturerhöhungen direkt an den μ -Heizplatten. Da mit einem größeren Temperaturgradienten die Antriebskraft für einen Wärmetransport größer wird, verteilt sich die Wärme stärker innerhalb des simulierten Systems. Die kühlende Wirkung der Umgebung reicht nicht aus, um die Wärme schnell genug aus dem System abzuführen, zum Beispiel über die Unterseite des Glases oder den oberen Rand des Wassers. Hingegen wird die Wärme bei den größeren μ -Heizplatten sofort auf ein größeres Volumen verteilt, wodurch der Temperaturgradient geringer wird. Die Wärme kann über ein größeres Volumen aus dem System abgeführt werden, so dass sich das System weniger erwärmt.

Dieses Modell beschreibt einen Extremfall eines statischen Systems. Deshalb wurde ein zweites Modell entwickelt, in dem die Wärme sofort durch Wasser einer konstanten Temperatur abgeführt wurde, was ein anderes Extrem einer sehr starken Konvektion entspricht. Die Realität sollte zwischen beiden Extremen liegen.

5.3.2 Ergebnisse des zweiten Modells - Grenzfall für extreme Konvektion

Das zweite Modell zur Simulation, welches den Grenzfall für extreme Konvektion beschreibt, bestand aus einer Glasschicht mit einer μ -Heizplatte und darüber befindlichem Wasser mit einer konstanten Temperatur von 25 °C (siehe auch Abb. 5-2).

Die Simulationen mit diesem Modell erreichten innerhalb eines Zeitraumes von weniger als 0,2 s nach Beginn der Erwärmung einen stationären Zustand. Für die Auswertung wurde im stationären Zustand des Systems die Temperaturverteilung innerhalb der obersten Glasschicht betrachtet. Diese Ergebnisse der Bereiche neben den

μ -Heizplatten nach 1 s Erwärmung sind in Abb. 5-4 dargestellt. Wie zu erwarten, wurden mit steigender Laserleistung die Temperaturänderungen innerhalb des Glases größer.

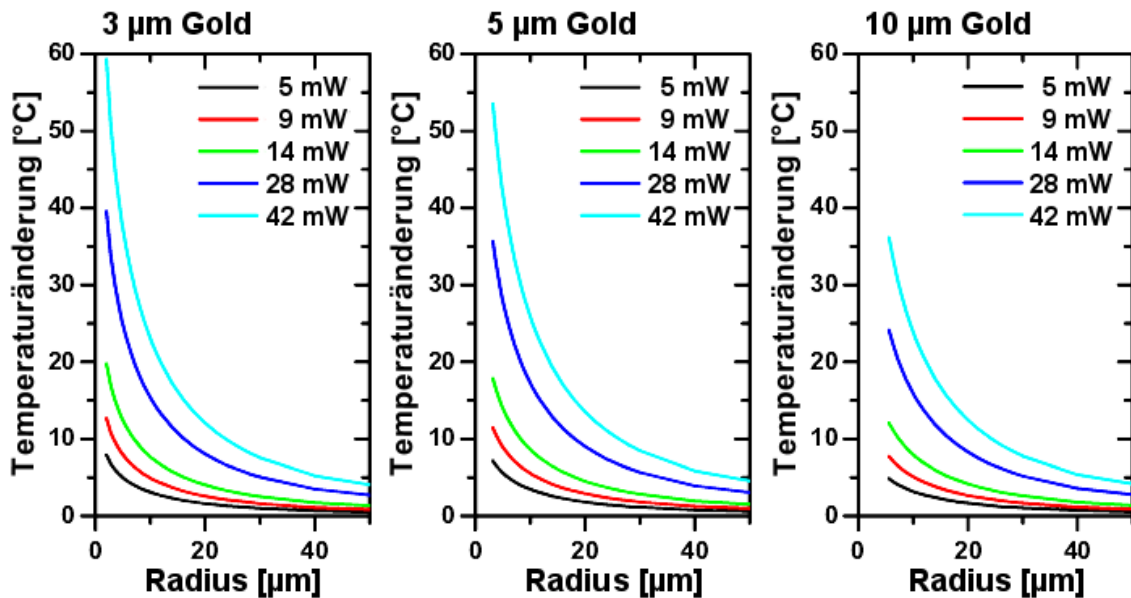


Abb. 5-4: Mit Hilfe des zweiten Modells simulierte Temperaturverteilung innerhalb der obersten Glasschicht neben den μ -Heizplatten während der lichtinduzierten Erwärmung an drei μ -Heizplatten unterschiedlicher Größe für fünf verschiedene Laserleistungen im stationären Zustand des Systems. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

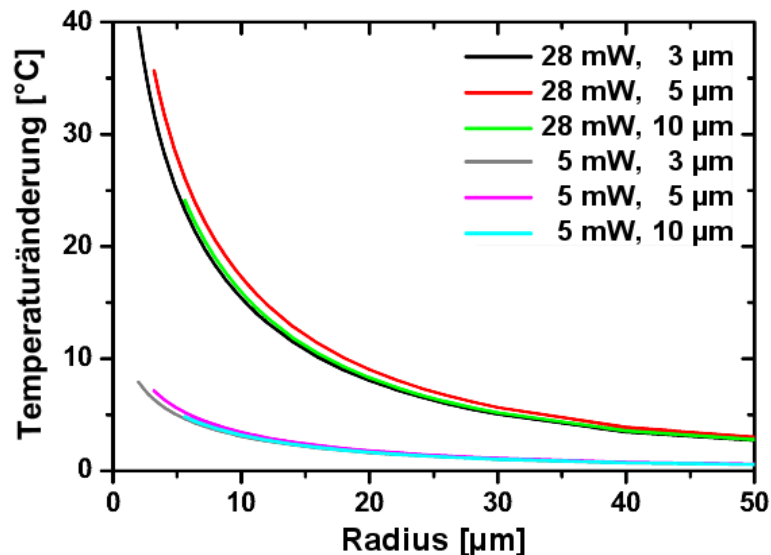


Abb. 5-5: Mit Hilfe des zweiten Modells simulierte Temperaturverteilung innerhalb der obersten Glasschicht neben den μ -Heizplatten nach lichtinduzierter Erwärmung mit jeweils 5 mW und 28 mW Laserleistung für 1 s an drei μ -Heizplatten unterschiedlicher Größe. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Der Einfluss der Größe der μ -Heizplatte hingegen war minimal, wie in Abb. 5-5 erkennbar ist. Die μ -Heizplatten mit 5 μm Durchmesser führten im Glas zu einer etwas höheren, und die mit 3 μm Durchmesser zu einer minimal geringeren Erwärmung im Vergleich zur Erwärmung an μ -Heizplatten mit 10 μm Durchmesser. Die maximalen Unterschiede betragen bei einer Laserleistung von 42 mW 2 °C im Vergleich zu den 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten und 1 °C im Vergleich zu den 3 μm durchmessenden μ -Heizplatten. Für geringe Laserleistungen bis 14 mW waren die Unterschiede vernachlässigbar.

Direkt an den μ -Heizplatten hingegen waren die Temperaturänderungen deutlich von der Größe der μ -Heizplatten abhängig. Die Temperaturänderungen waren für die kleinsten μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser am größten, für die mit 5 μm Durchmesser bereits deutlich kleiner und für die größten mit 10 μm Durchmesser am kleinsten.

Diese Ergebnisse bestätigten ebenfalls, dass kleinere μ -Heizplatten zu einer stärkeren lokalen Erwärmung führen. Die größte Erwärmung des Glases um die μ -Heizplatte herum bei Verwendung der μ -Heizplatten mit 5 μm Durchmesser war darin begründet, dass in diesem Fall der Durchmesser mit dem des Laserstrahls übereinstimmte. Dadurch trafen 100 % der Laserleistung auf die kleinstmögliche Fläche, während bei größeren μ -Heizplatten die Leistung auf eine größere Fläche verteilt wurde und bei kleineren nur weniger (70 %) Leistung zur Erwärmung zur Verfügung stand.

5.4 Vergleich der Simulationen mit den Messergebnissen

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Ergebnisse der Simulationen mit den beiden unterschiedlichen Modellen und die der Messungen mit den beiden realen Systemen, zum einen die Rhodamin B-Lösung (siehe auch Kapitel 4.3.2) und zum anderen die Lösung mit doppelsträngiger DNA (siehe Kapitel 4.4.2), werden nachfolgend dargestellt. Durch einen Vergleich der Ergebnisse dieser sehr unterschiedlichen Systeme sollen mögliche Ursachen für die Unterschiede festgestellt

werden, um einen besseren Einblick in die Vorgänge während der lichtinduzierten Erwärmung zu erhalten.

Mit Hilfe der Fluoreszenzthermometrie mit Rhodamin B wurde die über die Höhe der Reaktionskammer gemittelte Temperaturverteilung um die μ -Heizplatte bestimmt und mit einer Gaußverteilung angenähert. Von diesen Näherungen sind beispielhaft die für zwei unterschiedliche Laserleistungen von 5 mW und 28 mW und den drei verschiedenen Größen der μ -Heizplatten in Abb. 5-6 dargestellt.

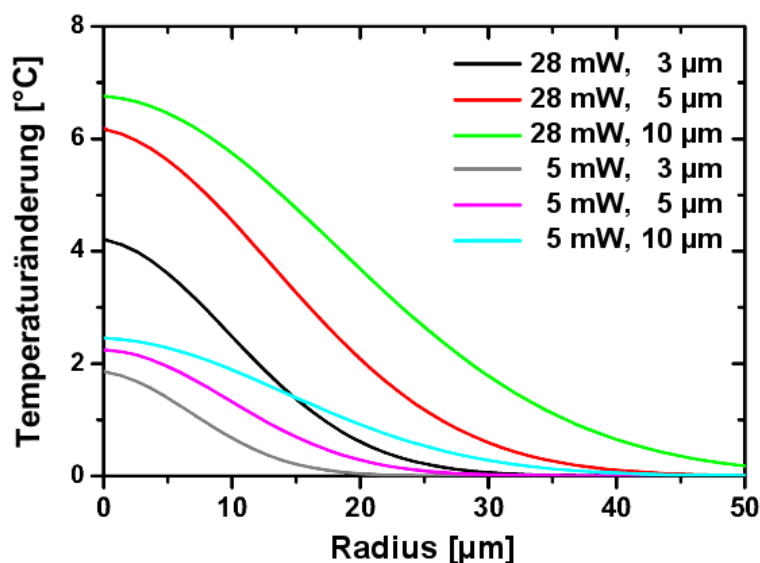


Abb. 5-6: Näherungen nach Gauß der mit Hilfe von Rhodamin B experimentell bestimmten Temperaturverteilungen nach lichtinduzierter Erwärmung mit jeweils 5 mW und 28 mW Laserleistung für 1 s an drei μ -Heizplatten unterschiedlicher Größe. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

Die entsprechenden Ergebnisse der Simulationen mit dem ersten Modell mit den gleichen Laserleistungen und μ -Heizplatten der gleichen Größe sind in Abb. 5-7 abgebildet. Die Ergebnisse der Simulationen mit dem zweiten Modell wurden bereits im vorherigen Kapitel 5.3.2 in Abb. 5-5 vorgestellt.

Sowohl die Ergebnisse der Fluoreszenzthermometrie, als auch die der Simulationen mit beiden Modellen, zeigten eine zunehmende Erwärmung mit zunehmender Laserleistung. Weiterhin zeigten die Ergebnisse in allen drei Fällen eine geringere Erwärmung direkt an den μ -Heizplatten mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fluoreszenzthermometrie (Abb. 5-6) wurde bei den Simulationen mit dem ersten Modell (Abb. 5-7) eine

Abnahme der Erwärmung mit zunehmender Größe der μ -Heizplatte festgestellt. Mit dem zweiten Modell für die Simulationen wurde eine stärkere Erwärmung für die mittleren μ -Heizplatten mit 5 μm Durchmesser im Vergleich zu den kleineren und den größeren ermittelt (Abb. 5-5).

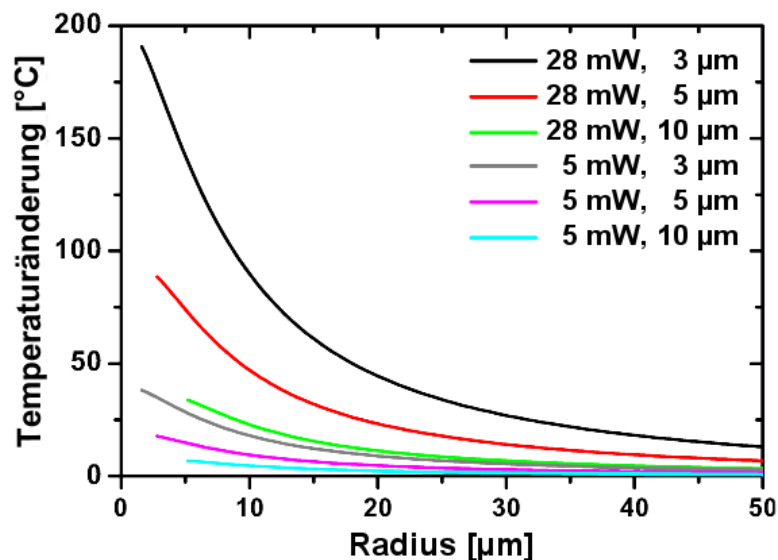


Abb. 5-7: Mit Hilfe des ersten Modells simulierte Temperaturverteilungen innerhalb der untersten Wasserschicht nach lichtinduzierter Erwärmung mit jeweils 5 mW und 28 mW Laserleistung für 1 s an drei μ -Heizplatten unterschiedlicher Größe. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Sowohl das zweite Modell als auch die Experimente mit Rhodamin B führten zu einer stärkeren Erwärmung für 5 μm durchmessende μ -Heizplatten als für die mit 3 μm Durchmesser. Das Modell für den Grenzfall extremer Konvektion, bei dem die Wassertemperatur konstant 25 °C betrug, beschreibt demnach den realen Versuch mit Rhodamin B etwas besser als das erste Modell, insbesondere bei der Betrachtung dieser μ -Heizplatten mit 3 μm und 5 μm Durchmesser. Somit sind die durch die entstehenden starken Temperaturgradienten auftretenden Konvektionsströme dafür verantwortlich, dass mit Rhodamin B eine Zunahme der Temperaturänderung mit zunehmendem Durchmesser der μ -Heizplatten detektiert wurde. Da mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten die absolute Temperaturänderung an der Oberfläche der μ -Heizplatten geringer wird, nehmen diese Konvektionsströmungen im realen System mit Rhodamin B ebenfalls mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten ab. Diese Strömungen führten zu einer stärkeren Abkühlung der kleineren μ -Heizplatten, während die größten μ -Heizplatten mit 10 μm Durchmesser wegen ihrer Größe und dem

geringsten Temperaturgradienten nicht so effektiv gekühlt wurden. Im Gegensatz zur Simulation mit dem zweiten Modell, bei dem die Kühlung für alle Größen der μ -Heizplatten konstant war, waren wegen dieser unterschiedlichen Kühlung im Experiment mit Rhodamin B die resultierenden Temperaturerhöhungen an den 10 μm durchmessenden μ -Heizplatten größer im Vergleich zu denen mit 5 μm Durchmesser.

Nachfolgend werden die Simulationen und Experimente im Bezug auf die zum Erreichen von 100 °C notwendigen Laserleistungen, in Abhängigkeit der Größe der μ -Heizplatten, verglichen. Da die Versuche und die Simulationen nur bei einigen Laserleistungen durchgeführt wurden, wurden die Bereiche bestimmt, innerhalb derer eine Blasenbildung bzw. Temperaturen von über 100 °C zuerst erreicht wurden. Diese Bereiche ergaben sich durch die höchsten verwendeten Laserleistungen, bei denen die nötigen Temperaturen noch nicht erreicht wurden, und die niedrigsten verwendeten Laserleistungen, bei denen Temperaturen 100 °C überschritten bzw. eine Blasenbildung auftrat. Diese Bereiche der Laserleistung für die Experimente mit Rhodamin B- und DNA-Lösung sowie die für die Simulationen mit beiden unterschiedlichen Modellen sind für die drei verwendeten Größen der μ -Heizplatten in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Vergleich der Experimente mit Rhodamin B- und DNA-Lösung mit den Simulationen mit beiden Modellen. Angegeben ist der Bereich der Laserleistung, in dem zuerst eine Blasenbildung auftrat bzw. in dem die Oberfläche der μ -Heizplatte eine Temperatur von mehr als 100 °C erreichte, in Abhängigkeit von der Größe der μ -Heizplatte. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Durchmesser der μ -Heizplatte	Rhodamin B	DNA	Modell 1	Modell 2
$d = 3 \mu\text{m}$	42 - 56 mW	14 - 21 mW	5 - 9 mW	0 - 5 mW
$d = 5 \mu\text{m}$	42 - 56 mW	14 - 21 mW	14 - 28 mW	0 - 5 mW
$d = 10 \mu\text{m}$	28 - 42 mW	42 - 56 mW	> 56 mW	9 - 14 mW

Die Ergebnisse der Simulationen mit beiden Modellen sowie der Experimente mit der DNA-Lösung zeigten den gleichen Trend, dass mit zunehmender Größe der μ -Heizplatte höhere Laserleistungen notwendig sind, um die gleiche Temperatur von 100 °C zu erreichen. Dies bestätigt die Annahme, dass die kleineren μ -Heizplatten zu

einer stärkeren lokalen Erwärmung führen. Bei den Experimenten mit der Rhodamin B-Lösung wurde ein entgegengesetzter Trend festgestellt.

Im Fall der Experimente mit Rhodamin B führten demnach Effekte zu diesem entgegengesetzten Trend, welche bei den Simulationen vernachlässigt wurden. Folgende zwei wesentliche Effekte wurden zur Vereinfachung in beiden Modellen nicht betrachtet. Als erster Effekt wurden mögliche Konvektionsströmungen vernachlässigt, welche abhängig von der erreichten Erwärmung waren. Der Ursprung dieser Strömungen ist eine Abnahme der Dichte von Wasser um 4% bei einer Temperaturerhöhung von 25 °C auf 100 °C. Auf Grund der erhöhten lokalen Erwärmung an den kleinen μ -Heizplatten traten die Strömungen dort stärker auf und führten zu einer zusätzlichen Abkühlung. Dass diese Abkühlung durch diese Konvektionsströme im Experiment auftrat, zeigte der Vergleich der Experimente mit Rhodamin B mit den Simulationen mit dem zweiten Modell. Der zweite Effekt, welcher nicht beachtet wurde, war die Temperaturabhängigkeit der Materialeigenschaften wie Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit, welche aber für das Wasser eine Rolle spielen können. Während die Wärmekapazität bei einer Temperaturerhöhung von 25 °C auf 100 °C um maximal 1% zunimmt und somit vernachlässigt werden kann, nimmt seine Wärmeleitfähigkeit um 13% zu [167]. Dies führt zu einer geringeren Speicherung der Wärme und einer verstärkten Wärmeleitung im Vergleich zu den verwendeten Modellen.

Im Vergleich zu diesen Versuchen mit Rhodamin B waren die gleichen Effekte bei den Versuchen mit der DNA-Lösung offensichtlich deutlich geringer ausgeprägt, denn das letztere System wurde durch die Simulationen besser beschrieben. Insbesondere die Ergebnisse der Simulationen mit dem zweiten Modell, bei dem die Umgebungstemperatur konstant 25 °C betrug, beschrieben die experimentellen Ergebnisse mit der DNA-Lösung gut. Somit war bei diesem Experiment der Temperaturgradient im Wasser um die μ -Heizplatten gering, wodurch beide Effekte abgeschwächt wurden. Gleichzeitig wurden die μ -Heizplatten wärmer, wodurch es früher zu einer Blasenbildung kam. Dies bestätigt die im Kapitel 4.4.2 vorgestellte Vermutung, dass sich die DNA an der Oberfläche der μ -Heizplatten anlagerte und dadurch einen isolierenden Effekt auf die μ -Heizplatten hatte, so dass die Wärme

schlechter an das umgebende Wasser abgegeben wurde. Ein weiterer Grund für die bessere Übereinstimmung der Ergebnisse mit der DNA-Lösung mit denen der Modelle im Vergleich zu denen mit Rhodamin B war die fehlende Tiefenauflösung im letzten Fall. Mittels Fluoreszenzthermometrie mit Rhodamin konnten nur Mittelwerte über die Höhe der Reaktionskammer ermittelt werden, so dass auch Temperaturerhöhungen in höheren Bereichen betrachtet wurden. Hingegen wurden mit Hilfe der Modelle und der Versuche mit DNA-Lösung nur die Temperaturen an der Oberfläche des Glases erfasst.

5.5 Zusammenfassung

Die theoretische Betrachtung der lichtinduzierten Erwärmung anhand von zwei unterschiedlichen Modellen zeigte, dass die Erwärmung der μ -Heizplatten stark von der Laserleistung und der Größe der μ -Heizplatten abhing. Beide Modelle bestätigten die Annahme, dass die lokale Erwärmung der μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser am stärksten und die mit 10 μm am geringsten ist. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass auftretende Konvektionsströme mit abnehmender Größe der μ -Heizplatten eine zunehmende Rolle spielten.

Für die resultierende Temperaturverteilung um die μ -Heizplatten herum wurden zwei unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Wurde die Wärme direkt durch Wasser mit einer konstanten Temperatur von 25 °C abtransportiert, führten die 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten zu einer etwas stärkeren Erwärmung als die größeren und die kleineren. Die Betrachtung der Temperaturverhältnisse innerhalb des angrenzenden Wassers führte zu dem Ergebnis, dass die μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser das System deutlich stärker erwärmten und die mit 10 μm deutlich weniger als die mit 5 μm Durchmesser. In diesem Modell erfolgten eine stärkere Verteilung der Wärme innerhalb des Systems und ein schlechterer Wärmeausgleich mit der Umgebung bei der Verwendung der kleinen μ -Heizplatten im Vergleich zu den größeren.

Im Vergleich zu den experimentellen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Erwärmung der DNA-Lösung in Näherung durch die Modelle beschrieben wurde, während die Ergebnisse mit der Rhodamin B-Lösung deutlich abwichen. Das zweite

Modell für den Grenzfall extremer Konvektionsströmung, bei dem die Wassertemperatur konstant 25 °C betrug, bildete die Temperaturverteilung des realen Versuchs mit Rhodamin B etwas besser nach, insbesondere bei der Betrachtung der μ -Heizplatten mit 3 μm und 5 μm Durchmesser. Der Grund hierfür waren auftretende Konvektionsströme, welche im Experiment mit Rhodamin B besonders die kleineren μ -Heizplatten zusätzlich kühlten. Diese auftretenden Konvektionsströme und die Temperaturabhängigkeit der Materialkonstanten von Wasser wurden in beiden Modellen der Simulationen nicht beachtet. Diese beiden Effekte führten zu den abweichenden Ergebnissen bei den Experimenten mit Rhodamin B, hingegen hatten sie bei den Experimenten mit der DNA-Lösung einen sehr geringen Einfluss. Dies bestätigte die Annahme, dass die DNA einen isolierenden Effekt auf die μ -Heizplatten hatte, so dass kaum eine Temperaturerhöhung des umgebenden Wassers auftreten konnte, während die μ -Heizplatten umso stärker erwärmt wurden.

6 Reaktion lebender Zellen auf lichtinduziertes Erwärmen

Komplexe biologische Systeme wie lebende Zellen reagieren, wie bereits im Kapitel 2.2.2 beschrieben, schon auf Temperaturänderungen von wenigen Grad Celsius sehr empfindlich. Eine Zelle kann nicht leben, wenn sie dauerhaft erhöhten Temperaturen ausgesetzt wird. Somit können derartige Temperaturerhöhungen das Zellwachstum im Bereich der Erwärmung hemmen. Eine solche Kontrolle des Zellwachstums wäre sehr hilfreich und leicht realisierbar für die Kultivierung und Analyse von Einzelzellen, kleinen Zellkulturen und Zellgeweben innerhalb von Mikrochips.

Nachfolgend wird daher zuerst untersucht, wie einzelne lebende Zellen der humanen Zelllinie SW 480 auf das lichtinduzierte Erwärmen an fixierten Graphitpartikeln und an μ -Heizplatten aus Gold oder Kohlenstoff reagieren. Anschließend wird überprüft, ob eine Regulierung des Zellwachstums in einem größeren Gebiet auf dem Mikrochip durch lichtinduziertes Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff erreicht werden kann.

6.1 Kultivierung der Zellen und Herstellung der Zell-Mikrochips

Für alle Experimente wurden humane Dickdarm-Krebszellen der Zelllinie SW 480 (LGC Promochem), Stadium IV (Duke B), verwendet (siehe Abb. 6-1 B). Die Zellkultur erfolgte in einem Medium aus 10 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nährlösung F-12 Ham (DMEM/F-12) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS). Kultiviert wurde im Inkubator (Thermo Electron Corporation) bei 36 °C, 5,5 % CO₂ (v/v) und erhöhter Luftfeuchtigkeit. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Dazu wurden die Zellen, nach Entfernen des Mediums, für 15 min mit 1,5 mL EDTA-Trypsin-Lösung behandelt, um sie von der Flaschenwand abzulösen. Zu dieser Zellsuspension wurden 3 mL Medium gegeben, und die Lösung zentrifugiert. Das Pellet aus Zellen wurde anschließend in 2 mL Medium suspendiert und die Zelldichte mit einem Zellzähler (CASY Cell Counter Modell DT, Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Eine neue Subkultur wurde mit einer Zellkonzentration von 7500 Zellen pro mL in 50 mL Zellkulturflaschen aus Polystyrol (Sarstedt, Deutschland)

angelegt (siehe Abb. 6-1 A), während die restlichen Zellen für Versuche zum lichtinduzierten Erwärmen zur Verfügung standen. Alle verwendeten Chemikalien wurden von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, bezogen.

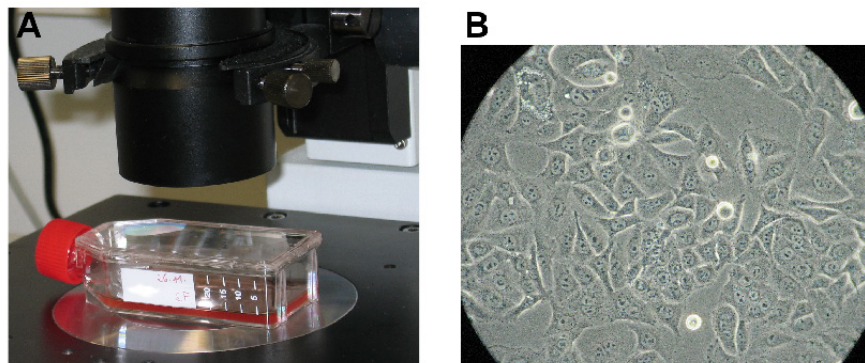


Abb. 6-1: A) Zellkulturflasche aus Polystyrol mit lebenden Zellen unter dem Durchlichtmikroskop. B) Aufnahme von Dickdarm-Krebszellen der Zelllinie SW 480 durch das Durchlichtmikroskop.

Um die Folgen des lichtinduzierten Erwärmens für lebende Zellen unter reproduzierbaren Bedingungen untersuchen zu können, wurden die adhärenenten Zellen direkt auf dem Glas mit den μ -Heizplatten kultiviert. Die Zellen sind dadurch im Kontakt mit dem Glas und den μ -Heizplatten. Würden die Zellen in Suspension, also im Medium verteilt, eingesetzt, wäre dies nicht gegeben und eine Reproduzierbarkeit könnte nicht erreicht werden.

Für die Laserversuche zum lichtinduzierten Erwärmen wurden die bereits im Kapitel 3.2.1 vorgestellten Mikrochips, bestehend aus Reaktionskammern mit Rahmen aus PDMS und den absorbierenden Materialien, hergestellt. Als absorbierende Materialien wurden fixierte Graphitpartikel (siehe auch Kapitel 3.2.1) bzw. μ -Heizplatten aus Gold oder Kohlenstoff (siehe auch Kapitel 4.2, Tabelle 4-2) eingesetzt. Von diesen Mikrochips wurden eine bzw. zwei Reaktionskammern mit 100 μ L poly-D-Lysin (0,01 % w/v, Sigma Aldrich) gefüllt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gespült. In diese mit poly-D-Lysin beschichteten Reaktionskammern wurden jeweils 100 μ L Zellsuspension einer Konzentration von 15000 Zellen pro mL gefüllt. Die Zellen wurden unter den bereits beschriebenen Bedingungen für 24 h inkubiert. Sie ließen sich sowohl auf den

Mikrochips mit fixierten Graphitpartikeln, als auch auf denen mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff (siehe Abb. 6-2) oder aus Gold, problemlos kultivieren.

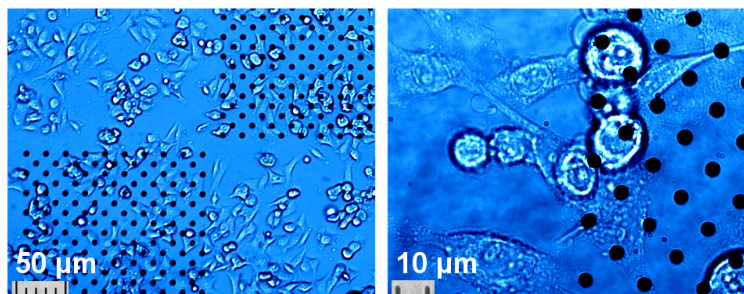


Abb. 6-2: Direkt auf Glas mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff gewachsene Dickdarm-Krebszellen der Zelllinie SW 480, nach einem Tag Inkubationszeit.

Direkt vor den Laserexperimenten wurde das Medium entfernt und die Reaktionskammern mit 100 μ L farblosem Medium (DMEM/F-12) und einer 0,1%igen Erythrosin B-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in PBS gefüllt. Abhängig vom Experiment wurden 2 μ L oder 20 μ L der Erythrosin B-Lösung zum Medium hinzugegeben (Strukturformel siehe Abb. 6-3).

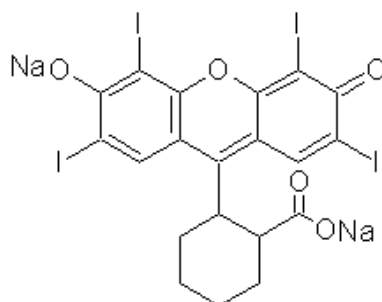


Abb. 6-3: Strukturformel von Erythrosin B, einem Farbstoff, der gezielt gestorbene Zellen anfärbt.

Erythrosin B dringt durch die poröse Zellmembran toter Zellen, wodurch diese Zellen angefärbt werden. Die Zellmembran einer lebenden Zelle hingegen ist für diesen Farbstoff undurchdringbar, so dass sich die Farbe dieser Zellen nicht ändert. Bei einer Verwendung von 20 μ L auf 100 μ L Medium führt dieser Farbstoff zu einer sehr starken Verfärbung toter Zellen. Diese werden anschließend im Durchlichtmikroskop, je nach verwendeten Filtern, an der roten bzw. schwarzen Farbe erkennbar. In geringerer Konzentration, wie beispielsweise bei den verwendeten 2 μ L auf 100 μ L Lösung, ist eine Fluoreszenzanregung des Farbstoffes notwendig, um tote Zellen von lebenden zu

unterscheiden. Der Farbstoff zeigt in der Lösung keine Fluoreszenz, hingegen nimmt die Fluoreszenz toter Zellen deutlich zu. Für die Laserversuche galt eine Zelle als tot, wenn sie innerhalb einer Minute nach der Behandlung eine deutliche Schwarzfärbung zeigte oder sich innerhalb einer Minute ihre ursprünglich sehr geringe Fluoreszenzintensität nach Hintergrundkorrektur mindestens verdoppelt hatte. Von diesen beiden Methoden wurde die Fluoreszenzmessung bevorzugt, da weniger Farbstoff benötigt wurde und die Ergebnisse nicht subjektiv waren. Hingegen war eine Verfärbung von Zellen bei der Durchlichtmikroskopie nicht immer eindeutig erkennbar.

Die Laserexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Unter diesen Bedingungen überlebten die Zellen für mindestens 60 Minuten. Nach den Versuchen wurden die verwendeten Mikrochips mit den Zellen autoklaviert und entsorgt.

Für die Versuche zum Nachweis der Regulation des Zellwachstums durch lichtinduziertes Erwärmen im Kapitel 6.2.4 wurde dem farblosen Zellmedium zusätzlich 10 % FCS und 1,2 % Streptomycin (Invitrogen) hinzugefügt. Durch diese zusätzlichen Nährstoffe und das Antibiotikum zum Schutz der Zellen konnte der Mikrochip nach der Bestrahlung am Mikroskop zurück in ein steriles Gefäß und in den Inkubator gegeben werden, obwohl die Arbeit unter dem Mikroskop nicht unter sterilen Bedingungen erfolgte. Die weitere Inkubation nach der Bestrahlung wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob weiterhin Zellwachstum erfolgte.

6.2 Ergebnisse der lichtinduzierten Erwärmung lebender Zellen

Die Reaktionen einzelner lebender Zellen auf die lichtinduzierte Erwärmung an fixierten Graphitpartikeln und an μ -Heizplatten aus Gold oder Kohlenstoff werden nachfolgend vorgestellt. Dazu wurde mit Hilfe des Farbstoffes Erythrosin B untersucht, ob die Zellen direkt nach der Erwärmung noch lebten. Ziel dieser Untersuchungen war die Entwicklung einer Methode zur Regulierung des Zellwachstums als eine mögliche Anwendung der lichtinduzierten Erwärmung. Hierzu wurde abschließend im Kapitel 6.2.4 untersucht, wie lebende Zellen auf eine lichtinduzierte Erwärmung eines größeren Bereiches des Mikrochips reagieren.

6.2.1 Lichtinduziertes Erwärmen von Zellen an Graphitpartikeln

Im Folgenden wird gezeigt, inwieweit die lichtinduzierte Erwärmung an fixierten Graphitpartikeln groß genug ist, um lebende Zellen zu beeinflussen. Dazu wurden lebende Zellen einen Tag lang in einer Reaktionskammer direkt auf den fixierten Graphitpartikeln kultiviert (siehe auch Kapitel 6.1). Vor den Laserexperimenten wurde das Medium gewechselt und gegen ein farbloses Medium mit 20 μL einer 0,1%igen Erythrosin B-Lösung ausgetauscht. Bei dieser hohen Konzentration von Erythrosin B waren tote Zellen an der dunklen Färbung im Durchlichtmikroskop erkennbar. Lebende Zellen wurden durch Erythrosin B nicht gefärbt.

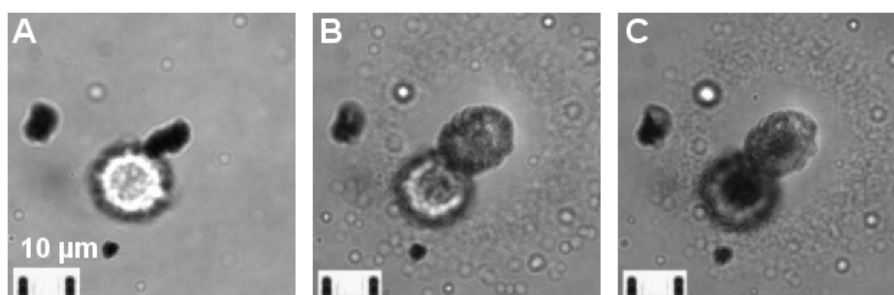


Abb. 6-4: Dickdarm-Krebszelle auf einem Glas-PDMS-Mikrochip (A) vor, (B) 1 s nach und (C) 1 min nach lichtinduziertem Erwärmen für 1 s bei 56 mW an einem Graphitpartikel. Die Zelle starb durch die starke Wärmeentwicklung. Diese starke Wärmeentwicklung war deutlich an der Blasenbildung um das Graphitpartikel herum erkennbar. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

An den Zellen wurden keine Veränderungen beobachtet, wenn sie direkt mit dem Laserlicht bestrahlt wurden. Eine direkte, mehrere Minuten andauernde Bestrahlung mit einer eingestellten Laserleistung von 56 mW überlebten alle behandelten Zellen. Wurde hingegen ein Graphitpartikel, welches die Zelle berührte, für 1 s mit der gleichen Leistung bestrahlt, so starb die Zelle. Bereits nach 1 s erschienen die so bestrahlten und ursprünglich hellen Zellen deutlich dunkler, und nach 1 min waren sie fast schwarz (Abb. 6-4). Gleichzeitig erfolgte eine starke Blasenbildung um das Graphitpartikel herum durch verdampfendes Wasser, da die Oberfläche des Graphitpartikels Temperaturen über 100 $^{\circ}\text{C}$ erreichte, wie bereits im Kapitel 3.3.2 beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass einzelne Zellen durch lichtinduzierte Erwärmung an fixierten Graphitpartikeln gezielt abgetötet werden können. Eine systematische Untersuchung der Folgen des lichtinduzierten Erwärmens für lebende Zellen war jedoch

nicht möglich. Genau wie bereits im Kapitel 3.3.2 beschrieben, führten die stark variierende Größe der Partikel und deren Verteilung in der PDMS-Schicht zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen.

In einem weiteren Versuch, unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, wurde an Kratern im PDMS, wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben, statt an fixierten Graphitpartikeln, erwärmt. Diese Krater wurden bereits vor der Kultivierung der Zellen in das PDMS gebrannt. Dazu wurden die Graphitpartikel mit 56 mW für 5 s bestrahlt, ohne dass sich Wasser in der Reaktionskammer befand. Die resultierenden Krater zeigten eine einheitlichere Größe als die Graphitpartikel, was möglicherweise zu einer einheitlicheren Erwärmung und reproduzierbareren Ergebnissen führen könnte.

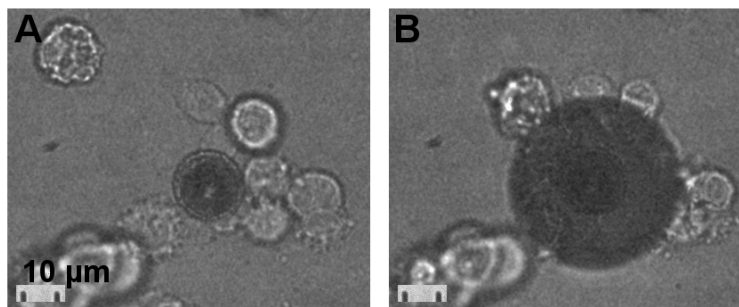


Abb. 6-5: Lebende Zellen auf einem Mikrochip mit Kratern in der Graphit-PDMS-Schicht (A) vor und (B) nach dem Bestrahlen mit 56 mW für 1 s. Trotz Bildung einer großen Blase und Ablösen von Zellen (oben links) überlebten alle Zellen diese Behandlung. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 µm. Durchmesser des Laserstrahls: 5 µm.)

Ein Beispiel für die Folgen der lichtinduzierten Erwärmung für lebende Zellen, durch Bestrahlen eines solchen Kraters mit 56 mW Laserleistung, zeigt Abb. 6-5. Wie im vorhergehenden Versuch erfolgte eine starke Blasenbildung durch verdampfendes Wasser im Zentrum des Kraters. Gleichzeitig lösten sich die Zellen von der Chip-Oberfläche und wurden zum Krater hin oder vom Krater weg bewegt. Der Grund hierfür war eine Konvektion in Folge der starken lokalen Erwärmung. Allerdings überlebten die Zellen die Erwärmung. Durch den Krater und die große Blase im Zentrum kamen die Zellen nicht in direkten Kontakt mit den absorbierenden Graphitpartikeln. Diese Entfernung von wenigen µm reichte demnach schon aus, um das Überleben der Zellen trotz starker Wärmeentwicklung zu sichern.

Somit waren diese Krater nicht für eine Kontrolle des Zellwachstums geeignet. Hingegen zeigten die Zellen eine deutliche Reaktion auf die lokale Erwärmung an fixierten Graphitpartikeln, so dass eine Manipulation durch lichtinduziertes Erwärmen möglich ist. Jedoch waren die verwendeten Graphitpartikel sehr inhomogen in ihrer Größe. Zudem waren die durchschnittlich 2 μm kleinen Graphitpartikel zufällig innerhalb der 15 μm dicken PDMS-Schicht verteilt (vgl. Kapitel 3.4). Dadurch war auch der Abstand des Partikels zur adhärenen Zelle auf dem PDMS nicht genau definiert. Da aber die Erwärmung direkt von der Partikelgröße und dem Abstand abhängt, konnten keine ausreichend reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Deshalb wurden für die weiteren Experimente die μ -Heizplatten verwendet, deren Verwendbarkeit für eine reproduzierbare Erwärmung bereits im Kapitel 4 nachgewiesen wurde.

6.2.2 Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff

Nachfolgend wurde untersucht, welche Auswirkungen eine lichtinduzierte Erwärmung an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff auf lebende Zellen hat. Dazu wurden die Zellen, wie bei den vorherigen Experimenten, einen Tag im Mikrochip mit den μ -Heizplatten kultiviert. Beim Mediumwechsel direkt vor den Laserexperimenten wurden zu den 100 mL Medium 2 μL der Erythrosin B-Lösung hinzugefügt. Fluoreszenzaufnahmen vor der lichtinduzierten Erwärmung an den μ -Heizplatten und eine Minute nach Beendigung der Erwärmung wurden verglichen und die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle bestimmt. Tote Zellen konnten so über eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Zwischen 5 und 25 μ -Heizplatten wurden unter den gleichen Bedingungen bestrahlt und anschließend überprüft, ob die angrenzenden Zellen noch lebten.

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel 6.2 beschrieben, überlebten die Zellen eine direkte Bestrahlung mit 56 mW Laserlicht, wenn keine μ -Heizplatte getroffen wurde. Ebenso überlebten alle Zellen eine Erwärmung der μ -Heizplatte mit Laserleistungen bis 14 mW für 1 s (Abb. 6-6 A). Bei verwendeten Laserleistungen über 22 mW erfolgte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zellen innerhalb von 1 s (Abb. 6-6 B). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen die resultierende

Erwärmung nicht überlebten. Wurde die Laserleistung auf 36 mW erhöht, führte dies, bei gleicher Belichtungszeit, zu einer kompletten Zerstörung der Zelle (Abb. 6-6 C).

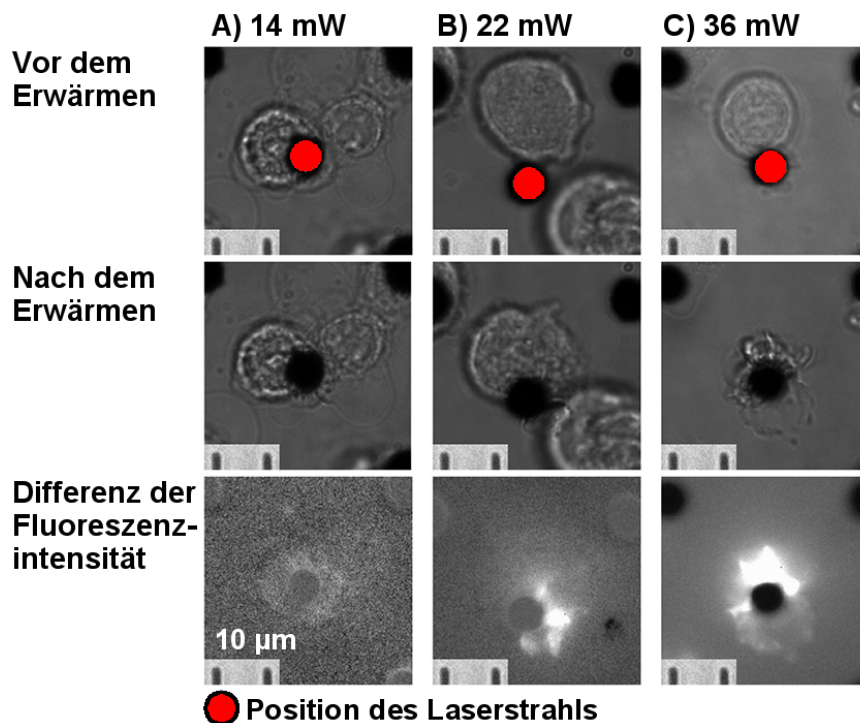


Abb. 6-6: Aufnahmen von Zellen auf Glas-PDMS-Mikrochips mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff vor und 30 s nach dem lichtinduzierten Erwärmen für 1 s. Die Differenzen der Fluoreszenzaufnahmen vor und 1 min nach dem Versuch wurden zur besseren Veranschaulichung mit unterschiedlichen Grauskalen dargestellt. (A) 14 mW, die Zelle überlebte, nur leichte Fluoreszenz der Zelle erkennbar. (B) 22 mW und (C) 36 mW, die Zellen starben, sie zeigten eine starke Fluoreszenz. (Der Abstand zwischen den Strichen entspricht 10 μ m. Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

Neben der Laserintensität wurde auch die Belichtungszeit variiert, um festzustellen, unter welchen Bedingungen die Zellen eine lichtinduzierte Erwärmung überlebten. In Tabelle 6-1 sind die verwendeten Bedingungen zusammengefasst und dargestellt, ob die Zellen überlebten, starben oder ob nur einige überlebten, da das Überleben abhängig von der Kontaktfläche F_K war.

Bei einer Erhöhung der Bestrahlungsdauer auf 2 s führten ebenfalls Laserleistungen ab 22 mW dazu, dass die Zellen starben. Hingegen war nur bei Laserleistungen bis maximal 9 mW ein Überleben der Zellen gewährleistet. Eine Erwärmung mit 14 mW Laserleistung überlebten nur einige Zellen. In diesem Fall wurde das Überleben der Zellen von der Kontaktfläche F_K zwischen Zellen und μ -Heizplatte bestimmt (siehe auch Abb. 6-7 B und C). Im nachfolgenden Kapitel 6.2.3

wird die Abhängigkeit von der Kontaktfläche näher erläutert. Bei einer Verringerung der Bestrahlungsdauer auf 0,75 s überlebten die Zellen sogar Laserleistungen von 22 mW, und erst Laserleistungen von 28 mW waren ausreichend, um das Zellwachstum zu verhindern. Wurde die Bestrahlungsdauer auf 0,5 s verkürzt, waren relativ hohe Laserleistungen von 36 mW notwendig, um ein Zellwachstum zu verhindern.

Tabelle 6-1: Auswirkungen auf die Zellen durch das Bestrahlen der μ -Heizplatten aus Kohlenstoff unter variierten Bedingungen. \checkmark : alle behandelten Zellen überlebten. \times : Keine Zellen überlebten. F_K : Einige Zellen überlebten, denn das Überleben der Zellen hing von der Kontaktfläche zwischen Zellen und μ -Heizplatte ab. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Laserleistung P Belichtungszeit t	$P = 5 \text{ mW}$	$P = 14 \text{ mW}$	$P = 22 \text{ mW}$	$P = 28 \text{ mW}$	$P = 36 \text{ mW}$
$t = 0,5 \text{ s}$	\checkmark	\checkmark	\checkmark	F_K	\times
$t = 0,75 \text{ s}$	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\times	\times
$t = 1 \text{ s}$	\checkmark	\checkmark	\times	\times	\times
$t = 2 \text{ s}$	\checkmark	F_K	\times	\times	\times

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellen, welche die μ -Heizplatte berührten, abhängig von der Laserleistung und Bestrahlungsdauer überlebten oder starben. Somit können μ -Heizplatten aus Kohlenstoff verwendet werden, um das Zellwachstum auf einem Mikrochip zu kontrollieren. Eine Blasenbildung an den μ -Heizplatten, als ein Nebeneffekt der starken Erwärmung, hatte bei Laserleistungen unter 36 mW keine Auswirkungen auf die Experimente. Hingegen führte die stärkere Blasenbildung bei verwendeten Laserleistungen ab 36 mW in einigen Fällen dazu, dass Zellen von der μ -Heizplatte wegbewegt wurden. Daher sind derartig hohe Laserleistungen nicht sinnvoll für eine Behandlung der Zellen.

6.2.3 Erwärmen an μ -Heizplatten aus Gold

Nachfolgend werden die Folgen für lebende Zellen des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten aus Gold aufgezeigt. Diese Experimente erfolgten genau wie die zuvor im Kapitel 6.2.2 beschriebenen, allerdings betrug die Bestrahlungsdauer immer 1 s. Für diese Experimente wurde die Laserleistung und die Größe der

μ -Heizplatten aus Gold variiert. Die verwendeten Bedingungen und die Auswirkungen für die Zellen sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst.

Tabelle 6-2: Auswirkungen auf die lebenden Zellen durch das Bestrahlen der μ -Heizplatten aus Gold mit 3 μm , 5 μm , und 10 μm Durchmesser. \checkmark : Die Zellen überlebten. \times : Keine Zellen überlebten. F_K : Das Überleben der Zellen hing von der Kontaktfläche zwischen Zellen und μ -Heizplatte ab. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Laserleistung P Durchmesser d	$P = 5 \text{ mW}$	$P = 14 \text{ mW}$	$P = 22 \text{ mW}$	$P = 28 \text{ mW}$	$P = 42 \text{ mW}$
$d = 10 \mu\text{m}$	\checkmark	\checkmark	F_K	F_K	\times
$d = 5 \mu\text{m}$	\checkmark	F_K	\times	\times	\times
$d = 3 \mu\text{m}$	\checkmark	F_K	\times	\times	\times

Zuerst wurden die Auswirkungen auf lebende Zellen durch eine lichtinduzierte Erwärmung an μ -Heizplatten aus Gold mit 10 μm Durchmesser untersucht. Bei diesen μ -Heizplatten überlebten die Zellen eine Erwärmung durch Laserleistungen bis 14 mW (Abb. 6-7 A). Bei Laserleistungen von 22 mW und 28 mW wurde das Überleben der Zellen durch die Kontaktfläche F_K zwischen Zelle und μ -Heizplatte beeinflusst. Dieser Einfluss ist in Abb. 6-7 B und -C erkennbar. Die Laserleistung betrug in beiden Fällen 28 mW. Im Fall einer sehr kleinen Kontaktfläche von etwa 6 μm^2 wurde nur die Zellmembran im Bereich der μ -Heizplatte fluoreszent, und die Zelle überlebte (Abb. 6-7 B). Befand sich die Zelle direkt auf der μ -Heizplatte, war die Kontaktfläche mit 80 μm^2 besonders groß. In diesem Fall überlebte die Zelle die gleiche Laserleistung von 28 mW nicht (Abb. 6-7 C). Zellen können demnach eine kurzzeitige, lokale Erwärmung ihrer Membran überleben, während die großflächige Erwärmung zum Zelltod führt. Laserleistungen von 42 mW und mehr waren notwendig, um den Zelltod zu induzieren (Abb. 6-7 D).

Wurden die kleineren, 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten aus Gold genutzt, war eine geringere Laserleistung von 22 mW ausreichend, um ein Zellwachstum zu verhindern. Bereits Laserleistungen über 5 mW überlebten nicht alle Zellen. Die gleichen Ergebnisse wurden für die μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser erhalten. An den 10 μm durchmessenden Strukturen war somit etwa die doppelte Laserleistung für eine Verhinderung des Zellwachstums notwendig. Gleichzeitig überlebten alle Zellen

eine Erwärmung mit mehr als der doppelten Laserleistung, verglichen mit den kleineren Strukturen.

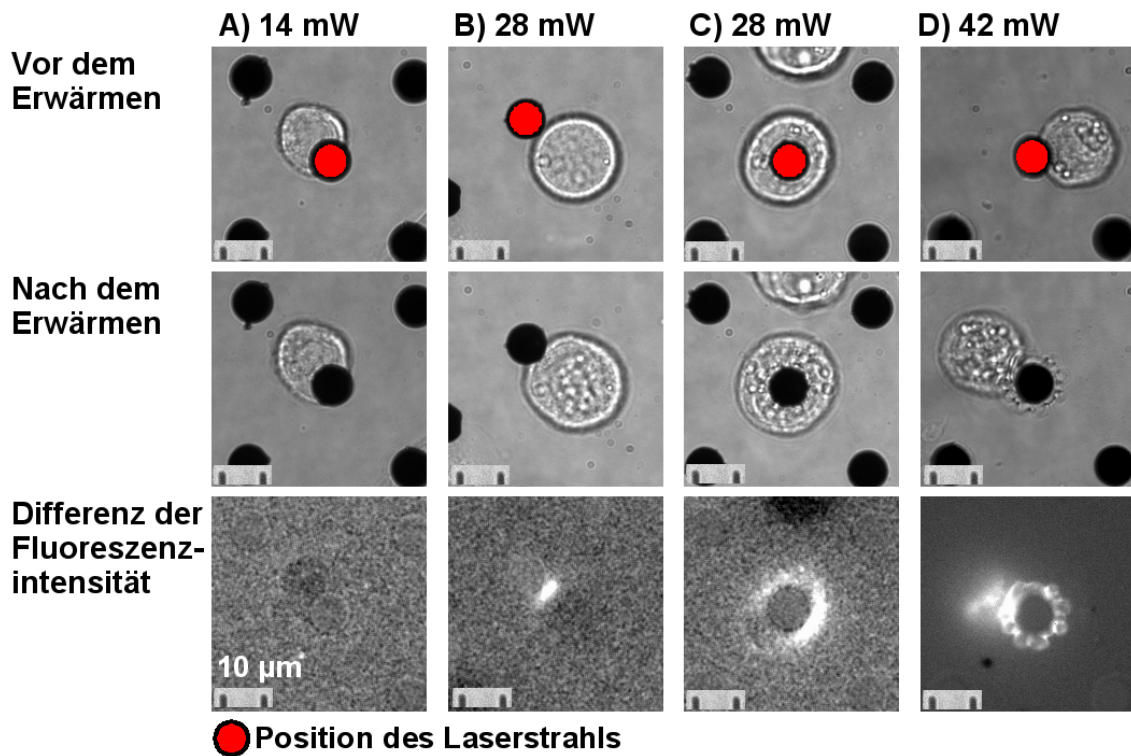


Abb. 6-7: Aufnahmen von Zellen auf Glas-PDMS-Mikrochips mit μ -Heizplatten aus Gold mit 10 μm Durchmesser vor und 30 s nach dem Erwärmen durch Bestrahlen mit dem Laser. (A) 14 mW, die Zelle überlebte; (B) und (C) 28 mW, das Überleben der Zelle hing von der Größe der Kontaktfläche zwischen Zelle und μ -Heizplatte ab – sie überlebte im Fall von (B) und starb im Fall von (C); (D) 42 mW, die Zelle starb. (Der Abstand zwischen den Strichen entspricht 10 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Die Ergebnisse zeigen, dass die μ -Heizplatten aus Gold ebenfalls zur Kontrolle des Zellwachstums genutzt werden können. Obwohl die mittels Fluoreszenzthermometrie bestimmte maximale Temperaturänderung für die 10 μm durchmessenden μ -Heizplatten gleich oder größer war als für die μ -Heizplatten mit 5 μm Durchmesser (siehe Abb. 4-8), überlebten die Zellen höhere Laserleistungen (Tabelle 6-2), auf Grund der weniger lokalisierten Erwärmung im Vergleich zu den kleineren, 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten. Unter den vorliegenden Bedingungen überleben die Zellen demnach leichter das Erwärmen einer größeren Fläche als die stärkere Erwärmung einer kleinen Fläche. Die kleinsten genutzten μ -Heizplatten mit 3 μm Durchmesser sind kleiner als der Durchmesser des Laserstrahls. Dennoch sind sie

so effizient wie die 5 μm durchmessenden μ -Heizplatten, da die Erwärmung noch stärker lokalisiert ist.

6.2.4 Kontrolle des Zellwachstums

Nachfolgend soll gezeigt werden, dass eine Kontrolle des Zellwachstums durch lichtinduziertes Erwärmen nicht nur für einzelne Zellen möglich ist. Die Kontrolle des Zellwachstums, also das gezielte Töten aller Zellen in einem bestimmten Bereich, darf kein Absterben der Zellen in anderen Gebieten auslösen. Dazu wurden die Zellen in einem Glas-PDMS-Mikrochip mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff für 5 h inkubiert. Vor dem Experiment wurde das Medium durch 100 mL farbloses Medium mit 10 % FCS und 1,2 % Streptomycin ersetzt. Das FCS lieferte die Nahrung für die Zellen, da die Zellen im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen statt 60 min mindestens einen Tag überleben sollten. Das Antibiotikum Streptomycin war notwendig, da die Arbeit am Mikroskop nicht unter sterilen Bedingungen erfolgte. Zwei Versuche zur Kontrolle des Zellwachstums mit variierter Laserleistung wurden durchgeführt, wobei die Bestrahlungsdauer jeweils 1 s betrug. Nach den Versuchen kam der Mikrochip mit den Zellen in einem sterilen Gefäß zurück in den Inkubator, wo die Zellen über Nacht weiter wachsen konnten. Anschließend wurde, wie bei den vorhergehenden Versuchen, 2 μL einer 0,1%igen Erythrosin B-Lösung in PBS zugegeben, um tote Zellen anzufärben.

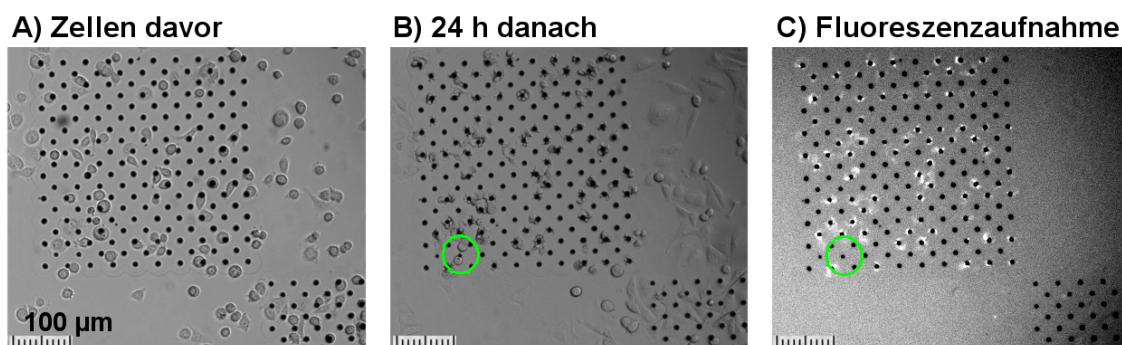


Abb. 6-8: Array aus Kohlenstoff- μ -Heizplatten mit Krebszellen (A) vor und (B) nach der Inkubation 24 h nach dem Bestrahlen mit 28 mW Laserleistung für 1 s. Während sich die Zellen in den angrenzenden Bereichen vermehrt hatten, waren im behandelten Bereich nach 24 h keine lebenden Zellen mehr vorhanden (C). Nur am unteren linken Rand (grüner Kreis) waren zwei neue, lebende Zellen erkennbar. (Der Abstand zwischen den kleinen Strichen entspricht jeweils 10 μm , Skalen insgesamt jeweils 100 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Im ersten Versuch erfolgte das Erwärmen mit 28 mW Laserleistung an allen 181 μ -Heizplatten aus Kohlenstoff eines Arrays (Abb. 6-8). Dabei wurde teilweise Blasenbildung an den μ -Heizplatten beobachtet, was den Versuch jedoch nicht beeinträchtigte. Bei vielen Zellen trat der Zelltod sofort ein, erkennbar an einer deutlichen Veränderung von Form und Struktur der Zellen. Die Fluoreszenzaufnahmen 24 h später bestätigten, dass sich innerhalb des bestrahlten Arrays keine lebenden Zellen mehr befanden (Abb. 6-8 C). In den angrenzenden Bereichen um das behandelte Array herum hatten sich die Zellen vermehrt. Es war keine Beeinflussung vom vielfachen Zelltod in direkter Umgebung erkennbar. Die Zellen begannen sogar, wieder in das behandelte Array hineinzuwachsen. Zum Beispiel sind am unteren linken Rand im Array zwei neue, lebende Zellen erkennbar (Abb. 6-8 grüner Kreis). Ein erneutes Bestrahlen innerhalb der nächsten 24 h wäre somit notwendig geworden, um den Bereich weiterhin zellfrei zu halten.

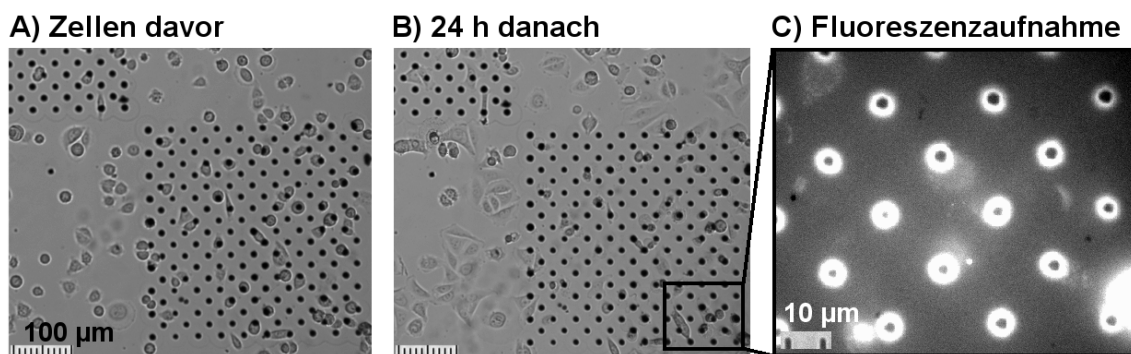


Abb. 6-9: Array aus Kohlenstoff- μ -Heizplatten mit Krebszellen (A) vor und (B) 24 h nach dem Bestrahlen mit 14 mW Laserleistung für 1 s. Während sich die Zellen in den angrenzenden Bereichen vermehrt hatten, war im behandelten Array nach 24 h ein deutlich geringeres Zellwachstum erkennbar. Fluoreszenzaufnahmen wie (C) zeigten, dass weniger als 50% der ursprünglich in diesem Array vorhandenen Zellen überlebt hatten. (Der Abstand zwischen den kleinen Strichen entspricht jeweils 10 μ m. Durchmesser des Laserstrahls: 5 μ m.)

In einem zweiten Versuch erfolgte das Erwärmen aller μ -Heizplatten eines weiteren Arrays mit je 14 mW Laserleistung. Unter diesen Bedingungen hatten die vorhergehenden Versuche eine 100%ige Überlebensrate 1 min nach dem Versuch ergeben. Bei diesen Versuchen erfolgte keine Blasenbildung an den μ -Heizplatten, und wie erwartet, wurde kein offensichtlicher Zelltod beobachtet. Nach 24 h war im behandelten Array ein deutlich geringeres Zellwachstum erkennbar (Abb. 6-9 B) als in den angrenzenden Bereichen. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass innerhalb des

Arrays mehr als 50 % der ursprünglich vorhandenen Zellen durch das Rhodamin B als tot markiert wurden (Abb. 6-9 C).

Es ist demnach anzunehmen, dass auch Zellen, die wenige Minuten nach dem Versuch noch nicht als tot erkannt werden können, durch den erlittenen Stress zum programmierten Zelltod, der Apoptose, gezwungen wurden. Einige der überlebenden Zellen hatten sich dennoch vermehrt, besonders im linken und im unteren Bereich des behandelten Arrays.

6.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine direkte Bestrahlung mit dem fokussierten Laserlicht mit 830 nm Wellenlänge überlebten. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass ein gezieltes Abtöten einzelner Zellen mit Hilfe des lichtinduzierten Erwärmens möglich ist. Die starke lokale Erwärmung führte zum Zelltod innerhalb von weniger als einer Minute. Für höhere Laserleistung erfolgte durch die starke Aufweichung der Zellmembran eine komplette Zerstörung der Zelle unter Freigabe des Zellinhaltes. Eine leichte Erwärmung durch geringe Laserleistungen hingegen überlebten alle Zellen.

Weiterhin bestätigten die Ergebnisse, dass eine Kontrolle des Zellwachstums für ganze Bereiche auf dem Mikrochip möglich ist. Dazu muss die Laserleistung ausreichend hoch sein (28 mW und höher), und das Bestrahlen muss regelmäßig alle 48 h bis 72 h wiederholt werden. Die recht häufige Wiederholung ist notwendig, da Zellen in den Bereichen, die nicht bestrahlt wurden, keine merkliche Beeinflussung durch die toten Zellen zeigten. Sie vermehrten sich, wodurch neue Zellen in die bestrahlten Gebiete wuchsen. Insgesamt ist das lichtinduzierte Erwärmen eine sehr sichere und saubere Methode, um das Zellwachstum auf einem Mikrochip zu kontrollieren.

7 Manipulation von Lipid-Schläuchen

Da die lebenden Zellen, wie im vorherigen Kapitel 6 gezeigt, so deutlich auf das lichtinduzierte Erwärmen reagierten, sollten Lipidstrukturen ebenfalls stark beeinflusst werden. Die Eigenschaften von Membranen aus Lipiden ähneln denen von Zellmembranen. Damit bieten sie die Möglichkeit, zellähnliche Strukturen mit ihren wichtigsten Eigenschaften künstlich nachzubilden. Dies ist notwendig, da die Reaktionen innerhalb von lebenden Zellen und der Einfluss der Umgebung auf diese Reaktionen extrem komplex sind. Durch künstliche Membranen, Vesikel oder Schläuche (*tubes*) aus Lipiden können einzelne Moleküle von ihrer Umgebung getrennt werden, so dass in einer definierten Umgebung nur Reaktionen zwischen bestimmten Molekülen zugelassen werden [168]. Diese Systeme ermöglichen neben der Nachbildung biologischer Reaktionen, wie zum Beispiel von Enzymreaktionen [169] oder von zellulären Signalwegen [170], zudem die Aufklärung von Kinetik und Mechanismen chemischer Reaktionen innerhalb von Nanostrukturen [171]. Die Verwendung von Netzwerken aus diesen Lipid-Schläuchen und Vesikeln als Mikroreaktoren hätte alle Vorteile der Mikrosysteme, wie schnelle Mischung durch Diffusion, schnelle Wärmeübertragung und die Möglichkeit, Flüssigkeitsvolumen im Bereich von Femtolitern zu beherrschen, innerhalb einer künstlichen biologischen Umgebung. Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Methode der lichtinduzierten Erwärmung zur Manipulation von Lipid-Strukturen und zur Herstellung von Lipid-Netzwerken verwendet werden kann.

Nachfolgend wird im Kapitel 7.1 eine kurze Einführung über Lipide und die Möglichkeiten, aus ihnen gezielt Vesikel, Schläuche oder komplexere Strukturen herzustellen, gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lipid-Mikro-Schläuche in einem Mikrochip durch Mikroextrusion hergestellt. Die Herstellung der hierzu verwendeten Mikrostrukturen und der Lipid-Schläuche wird im Kapitel 7.2 beschrieben.

Eine Manipulation der hergestellten Lipid-Schläuche durch die lokal begrenzte lichtinduzierte Erwärmung an den μ -Heizplatten ist nur möglich, wenn die Lipid-Schläuche zuvor an die μ -Heizplatten heranbewegt wurden. Daher wurde zuerst untersucht, ob der zum lichtinduzierten Erwärmen verwendete Laser auch als optische Falle fungieren kann und ob die Lipid-Schläuche durch optische Manipulation gezielt

an gewünschte Stellen im Mikrochip bewegt werden können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur optischen Manipulation, zur lichtinduzierten Erwärmung und zur Bildung von komplexen Strukturen werden im Kapitel 7.3 aufgezeigt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt im Kapitel 7.4.

7.1 Künstliche Zellen und Mikrostrukturen aus Lipiden

Eine Methode, um komplexe biologische Systeme vereinfacht nachzubilden und zu untersuchen, ist die Verwendung von künstlichen Modellsystemen aus Lipiden. Ein Lipid ist ein Naturstoff mit einer sehr geringen Polarität, welcher sich daher zumeist nicht in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, hingegen aber sehr gut in unpolaren Lösungsmitteln, löst [163]. Die meisten biologischen Lipide sind amphiphil. Sie besitzen einen polaren und dadurch hydrophilen Bereich, die Kopfgruppe, und einen oft großen und unpolaren Kohlenwasserstoffrest, den hydrophoben Bereich.

Phospholipid DLPC:

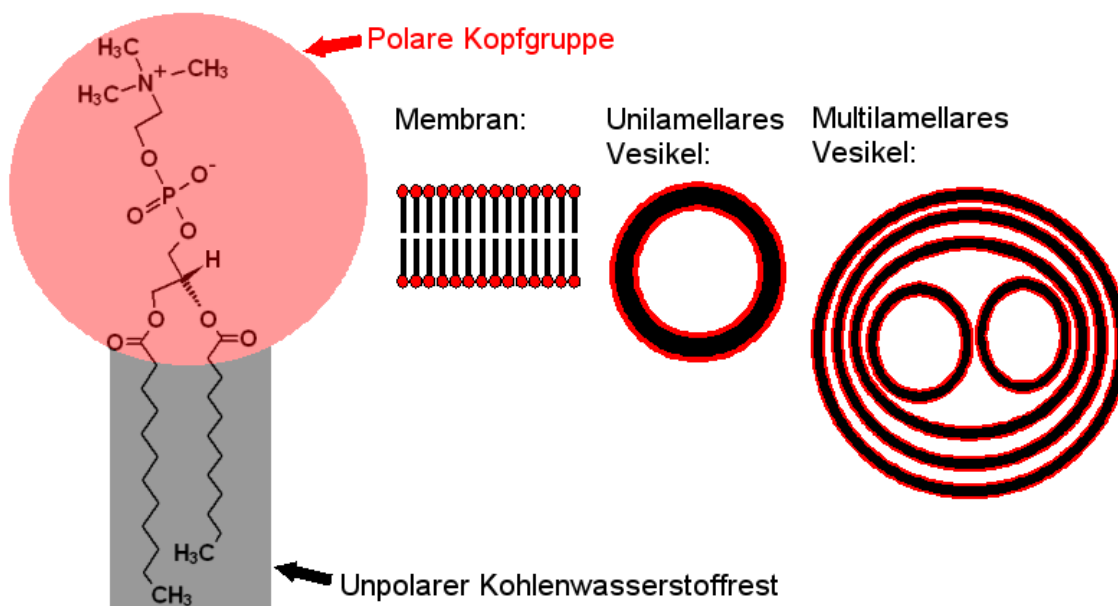


Abb. 7-1: Strukturformel des Phospholipids DLPC und schematische Darstellung der Anordnung solcher amphiphilen Lipide zu Membranen und Vesikeln mit einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Doppelschichten dieser Membranen.

Die charakteristischen Komponenten der zellulären Membran sind Phospholipide. Sie sind Phosphorsäurediester mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol bzw. dem zweiwertigen Aminoalkohol Sphingosin und einem zweiten Alkohol. Als Beispiel ist in

Abb. 7-1 die Strukturformel des Phospholipids DLPC (1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) dargestellt, welcher im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung der künstlichen Membranen verwendet wurde. Der zweite Alkohol des Phospholipids enthält oft ein positiv geladenes Stickstoffatom, das zusammen mit der negativ geladenen Phosphatgruppe den polaren Teil des Phospholipids bildet. Die langkettigen Kohlenwasserstoffreste der Glycerolkomponente bilden den unpolaren Teil des Moleküls [163].

Amphiphile Lipide bilden auf polaren Lösungsmitteln spontan eine Membran und innerhalb der Lösungsmittel Micellen, welche auch Vesikel genannt werden. Dabei zeigen die polaren Kopfgruppen in Richtung des Lösungsmittels und Kontakt zwischen Lösungsmittel und dem unpolaren Rest wird minimiert, wie in Abb. 7-1 schematisch dargestellt. Dabei können Vesikel mit einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Doppelschichten entstehen. Innerhalb der Membranen oder Micellen werden die einzelnen Moleküle durch polare Wechselwirkungen angeordnet und zusammengehalten. Die resultierende Struktur wird als flüssig-kristallin bezeichnet. Durch die kompakte Anordnung der Moleküle besitzen die Lipidmembranen eine mechanische Stabilität vergleichbar mit Stahl der gleichen Dicke [172]. Gleichzeitig sind sie durch die flüssigkeitsähnliche Struktur in zwei Dimensionen sehr flexibel, so dass sie die verschiedensten Formen annehmen können.

Die molekulare Selbstanordnung der amphiphilen Lipide führt zu einer hohen Ordnung auf molekularer Ebene und kann daher zur gezielten Bildung von einfachen Mikro- und Nanostrukturen genutzt werden. Generell kann bei der Bildung von Strukturen aus Lipiden zwischen der Entstehung durch molekulare Selbstanordnung und der Formung durch künstlich erzeugte äußere Kräfte unterschieden werden. Für Letztere bietet sich, allein schon wegen der entsprechenden Größenordnung, die Verwendung von Mikrostrukturen an. Im Folgenden sollen einige der Herstellungs- und Manipulationsmöglichkeiten, geordnet nach den resultierenden Strukturen, vorgestellt werden.

7.1.1 Stabilisierung von Lipid-Strukturen

Eine wesentliche Herausforderung bei der Herstellung einfacher oder komplexer Strukturen aus Lipiden ist ihre Stabilisierung. Durch ihre flüssigkeitsähnliche Struktur sind Lipidmembranen sehr flexibel. Dies hat den Vorteil, dass sie die verschiedensten Formen annehmen können. Gleichzeitig macht dies aber die Handhabung schwierig, da sie empfindlich auf Scherspannungen, auf Temperaturänderungen und auf Änderungen des sie umgebenden Lösungsmittels reagieren [172]. Verschiedene Möglichkeiten der Stabilisierung ergeben sich durch Variation der Lipid-Zusammensetzung und der Nutzung von Lipiden mit bestimmten funktionellen Gruppen.

Eine Form der Stabilisierung ist die Bindung der Lipidstrukturen an eine Oberfläche. Bestimmte funktionelle Gruppen im Lipidmolekül in Kombination mit beschichteten Oberflächen ermöglichen eine solche Bindung. Oft wird der von Bakterien verwendete Komplex zwischen Aktin und Biotin, oder die Adhäsion von Thiolen auf Goldoberflächen ausgenutzt [173]. Dabei darf die Adhäsion der Vesikel an die Oberfläche nicht zu groß sein, da sie sonst durch die resultierende starke Deformation der Membran kollabieren. In Kombination mit der Mikrostrukturierung von Oberflächen können Vesikel gezielt innerhalb von bestimmten Bereichen festgehalten werden, um zum Beispiel Vesikel-Arrays zu erhalten [173]. Besonders zur Herstellung komplexerer Strukturen wird eine solche Stabilisierung zumeist notwendig.

Eine weitere Methode ist die Nutzung von synthetischen, polymerisierbaren Lipiden [174]. Nach der Bildung der gewünschten Strukturen können diese anschließend durch Polymerisation stabilisiert werden. So ist sogar eine Stabilisierung von komplexen Strukturen möglich, beispielsweise von Netzwerken aus Nanoschläuchen [175].

7.1.2 Herstellung von Lipid-Vesikeln

Am einfachsten ist die Herstellung einfacher runder oder ovaler Vesikel aus Lipiden, da sie sich spontan durch molekulare Selbstanordnung in polaren Lösungsmitteln bilden. Dabei ordnen sie sich mit den unpolaren Kohlenwasserstoffketten dicht nebeneinander zu einer Doppelmembran von nur 5 nm

Dicke [168] an, wobei die polaren Kopfgruppen die jeweils nach außen gerichtete Schicht der Membran bilden. Diese Vesikel werden nach ihrer Größe als kleine (10 nm bis 50 nm), große (50 nm bis 1.000 nm) oder Riesen-Vesikel ($>1 \mu\text{m}$) bezeichnet.

Bei der spontanen molekularen Selbstanordnung durch Lösen der Lipide im polaren Lösungsmittel entstehen zumeist multilamellare Vesikel, also Vesikel mit mehreren der doppelten Membranschichten, unterschiedlichster Größe. Durch mehrfache Extrusion durch eine Membran mit definierter Porengröße oder durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen können vermehrt unilamellare Vesikel mit einer einheitlicheren Größe erhalten werden [176]. Kleine Vesikel können auch direkt aus lebenden Zellen gewonnen werden, so dass sie die gleiche Zusammensetzung wie die Zellmembran besitzen [170].

Riesen-Vesikel werden zumeist durch Elektroformung (*electroformation*) hergestellt [177]. Die Vesikel entstehen dabei durch Anlegen einer Gleichspannung direkt an der Elektrodenoberfläche. Die Erzeugung von Riesen-Vesikeln auf nichtleitenden Oberflächen wie Glas oder PET ist durch Anlegen eines äußeres Wechselfeldes ebenfalls möglich [178].

Mit Hilfe der Mikrofluidik können gezielt Vesikel definierter Größe hergestellt werden. Eine Möglichkeit ist zum Beispiel die Herstellung von Riesen-Vesikeln durch die Bildung einer Emulsion mit definierter Tropfengröße. Diese Emulsion besteht aus einer wässrigen Phase und einer Ethanolphase, in der die Phospholipide gelöst sind [179]. Die Vesikel entstehen durch die Anordnung der Lipide um die Wassertropfen. In der wässrigen Phase vorhandene Reaktanden oder sogar lebende Zellen können gezielt durch diese Vesikel eingeschlossen werden. Kleine Vesikel definierter Größe, regulierbar zwischen 50 nm bis 150 nm Durchmesser, können auch durch hydrodynamisches Fokussieren innerhalb einer Mikrostruktur hergestellt werden [180]. Dazu wird das Lipid in Isopropylalkohol gelöst und der Alkoholstrom in der Mikrostruktur durch äußere Wasserströme fokussiert. Die Größe der resultierenden Vesikel wird hauptsächlich durch die Breite des fokussierten Alkoholstrahls definiert. Durch Diffusion an der Phasengrenze mischen sich Alkohol und Wasser, wodurch das Lipid ausfällt und die Vesikel entstehen.

7.1.3 Herstellung von Lipid-Schläuchen

Lipide mit bestimmten strukturellen Voraussetzungen bilden durch molekulare Selbstanordnung Schläuche. Die Vielfalt reicht von Phospholipiden über Glycolipide bis hin zu einfachen Salzen von Fettsäuren [181]. Es wurde festgestellt, dass Chiralität eine wesentliche Voraussetzung für die Schlauchbildung ist [182]. Chiral ist ein Objekt, dessen Spiegelbild nicht durch Drehung des Originalen in Übereinstimmung gebracht werden kann. Dadurch können sich die Moleküle nicht exakt parallel zueinander anordnen und es entsteht eine Krümmung der Membran, welche anschließend zur Schlauchbildung führt. Diese Chiralität muss nicht notgedrungen bereits im Molekül vorhanden sein. Sie kann auch durch chirale Symmetriefehler achiraler Moleküle entstehen [183]. Oft entstehen neben den Schläuchen auch rechts- und linksdrehende Helices. Die Form der entstehenden Schläuche wird sehr stark vom verwendeten Lipid, aber auch merklich von dem Lösungsmittel und der Temperatur beeinflusst.

Erstmals wurden Lipid-Schläuche beim Abkühlen multilamellarer Vesikel beobachtet, wenn nur soweit abgekühlt wurde, dass sich aus der flüssig-lamellaren eine kristallin-lamellare Phase bildete [184]. Eine oft genutzte Möglichkeit zur Erzeugung von Lipid-Schläuchen nutzt Lipidlösungen in Ethanol [185]. Entweder wird Wasser hinzugefügt oder ein Ethanol/Lipid/Wassergemisch wird abgekühlt, bis die Schläuche entstehen. Ein Array von parallelen Lipid-Schläuchen mit definierten Abständen kann mit Hilfe einer PDMS-Maske mit parallelen Mikrokanälen hergestellt werden [186]. Dazu werden die Kanäle durch Kapillarkräfte mit einer Suspension der frisch polymerisierten Lipid-Schläuche in Wasser gefüllt. Nach dem Verdunsten des Wassers bleiben die Lipid-Strukturen mindestens eine Woche lang unverändert stabil. Durch Mikroextrusion einer wässrigen Lipidlösung können einzelne Nano-Schläuche auf einer Glasoberfläche angeordnet werden, wie am Beispiel eines Glykolipids demonstriert wurde [187]. Lange Lipid-Vesikel bis 1,5 cm mit einer definierten Dicke können innerhalb von Mikrostrukturen hergestellt werden [188]. Sie entstehen durch Extrusion des Lipids durch eine Membran mit Poren definierter Größe, wie in Abb. 7-2 vereinfacht dargestellt. Bei geringen Fließgeschwindigkeiten von $0,1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ bis $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ in einem Kanal oberhalb der Membran entstehen Vesikel definierter Größe.

Durch Fließgeschwindigkeiten oberhalb von $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ in einem Kanal unterhalb der Membran hingegen entstehen Lipid-Schläuche.

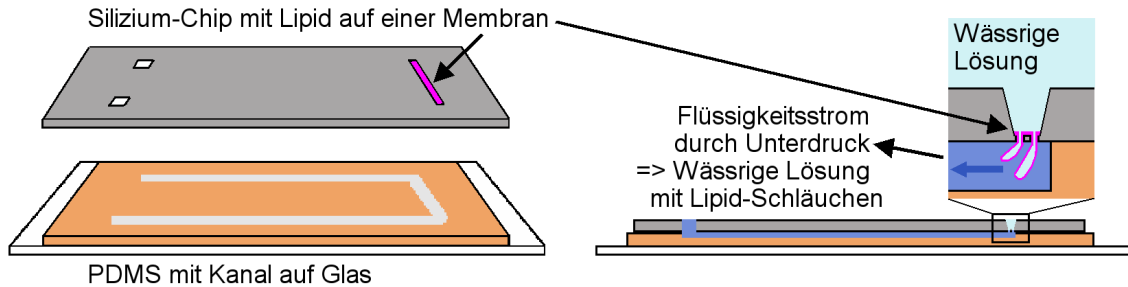


Abb. 7-2: Schematische Darstellung des Mikrochips zur Herstellung von Lipid-Schläuchen, bestehend aus einem Silizium-Chip und einer etwa $100 \mu\text{m}$ dünnen Schicht PDMS mit einem Kanal auf einem Deckglas. Die Siliziumnitrid-Membran des Silizium-Chips mit Poren definierter Größe wird so plziert, dass der Kanal im PDMS unter der Membran entlang verläuft und zwei weitere Löcher im Silizium als Zulauf und Reservoir dienen können.

Wegen der Einfachheit und Robustheit dieser Methode wurde sie in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung der Lipid-Mikroschläuche verwendet.

7.1.4 Herstellung komplexer Mikrostrukturen aus Lipiden

Komplexere Lipid-Strukturen können nicht durch molekulare Selbstanordnung der Lipide erhalten werden [168]. Zusätzliche Voraussetzungen sind notwendig. Es wird ein Lipid-Reservoir benötigt, die entstehenden Strukturen müssen stabilisiert werden und es sind zusätzliche äußere Kräfte notwendig. Je nach Art der äußeren Kräfte gibt es verschiedene Ansätze zur Bildung von komplexen Mikrostrukturen aus Lipiden.

So können zum Beispiel durch mechanische Teilung aus unilamellaren Riesen-Vesikeln gezielt Netzwerke aus Vesikeln und Nano-Schläuchen hergestellt werden [189]. Mit unilamellaren Vesikeln ist allerdings nur eine einmalige Teilung möglich, ohne eine Zerstörung der Struktur zu riskieren.

Eine relativ simple und sehr vielseitige Methode zur Herstellung komplexer Strukturen aus Riesen-Vesikeln ist die Manipulation mit Mikropipetten in Kombination mit Elektroinjektion [190]. Dazu wird mit Hilfe von mehreren Stromstößen von $10 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ bis $40 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ für 1 ms bis 4 ms die Membran eines immobilisierten,

multilamellaren Riesen-Vesikels mit der Pipette durchstoßen. Durch langsames Herausziehen der Pipette bildet sich ein sehr dünner, unilamellarer Lipid-Schlauch zwischen dem Vesikel und der Pipette. Durch Elektroinjektion einiger Femtoliter Pufferlösung entsteht ein zweites, unilamellares Vesikel, welches nun durch den Schlauch mit dem ersten verbunden ist. Dieses Vesikel kann auf der adhärenen Oberfläche ebenfalls immobilisiert werden. Das Lipid-Material für die Membran stammt dabei ausschließlich aus dem multilamellaren Riesen-Vesikel. Zur zusätzlichen Stabilisierung von langen Lipid-Schläuchen oder für die Herstellung von Strukturen mit Winkeln von bis zu 180° können Mikrostrukturen wie Säulen aus Photolack dienen (siehe Abb. 7-3 A) [191]. Mit dieser Methode können auch sehr komplizierte, dreidimensionale Netzwerke hergestellt werden (siehe Abb. 7-3 B) [192]. Eine Abwandlung dieser Methode in Kombination mit mikrostrukturierten Oberflächen ermöglicht die Herstellung komplizierter Strukturen von bis zu 25 Vesikeln mit definierten Ausmaßen und definierter Adhäsion, verbunden von Nano-Schläuchen (siehe Abb. 7-3 C) [173]. Die mikrostrukturierte Oberfläche bestand dabei aus adhärenen Punkten aus einer Schicht Neutraavidin, gehalten von einer Biotinschicht auf Gold. Diese Punkte waren umgeben von einer doppelschichtigen Membran aus Phosphatidylcholin, welche eine Adhäsion der Liposome verhinderte.

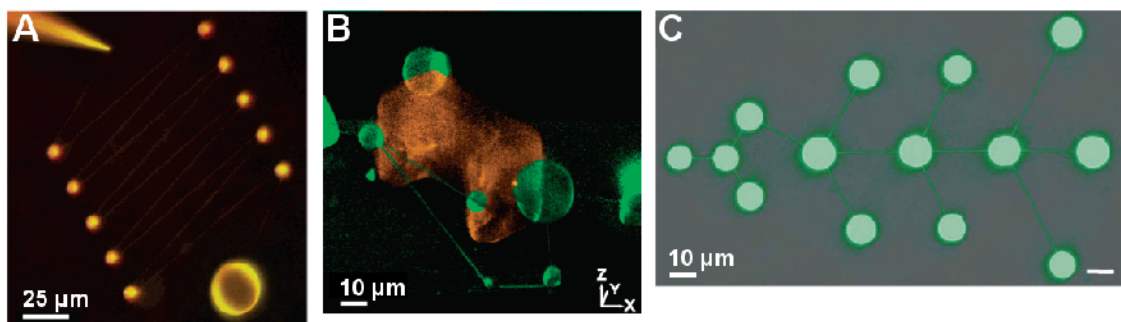


Abb. 7-3: Komplexe Strukturen aus Lipid-Vesikeln und Nanoschläuchen. (A) Langer Lipid-Nanoschlauch mit 170° Biegungen stabilisiert durch Strukturen aus Photolack [191]. (B) Dreidimensionale Lipid-Struktur an einer adhärenen Photolack-Struktur [192]. (C) Komplexe Struktur auf einer mikrostrukturierten Oberfläche [173].

Die Manipulation mit Mikropipetten ermöglicht nur die Bildung einfacher Nano-Schlauch-Verbindungen zwischen zwei Vesikeln, aber keine geschlossenen Systeme oder Kreuzungen aus mehreren dieser Schläuche. Durch Elektrofusion mit Hilfe einer zusätzlichen Kohlenstoff-Faser-Elektrode dicht an dem Vesikel, welches mit einem

kleinen Vesikel an der Pipettenspitze fusionieren soll, können geschlossene Systeme erzeugt werden (siehe Abb. 7-4 A). Diese Methode wurde sogar erfolgreich zur Kombination der Membranen von Riesen-Vesikeln mit lebenden Zellen verwendet [193].

Auf Grund der unterschiedlichen Oberflächenspannungen der Membranen des Vesikels und eines davon ausgehenden Nano-Schlauchs kann der Schlauch nur existieren, wenn er durch ein weiteres Vesikel stabilisiert wird. Ohne diese Stabilisierung würde er zurück in das Vesikel gezogen werden. Der Nano-Schlauch wird immer die kürzest mögliche Verbindung zwischen diesen Vesikeln darstellen, und ohne die Immobilisierung würden die Vesikel fusionieren, um die Oberflächenspannung zu minimieren. Dieses Verhalten kann auch gezielt zur Umstrukturierung von Netzwerken aus Vesikeln und Nano-Schläuchen ausgenutzt werden [169]. Gehen aus einem Vesikel zwei Schläuche zu zwei weiteren Vesikeln ab, so müssen die Austrittsstellen einen bestimmten Mindestabstand voneinander haben. Durch Bewegen von einem Schlauchende zudem anderen fusionieren diese (siehe Abb. 7-4 B). Dabei bilden sie in der Mitte zwischen den Vesikeln einen gemeinsamen Knotenpunkt, von dem die einzelnen Schläuche im Winkel von 120° abgehen. Diese Umstrukturierung durch Selbstorganisation kann durch einen Dominoeffekt alle Schläuche eines Systems betreffen [193].

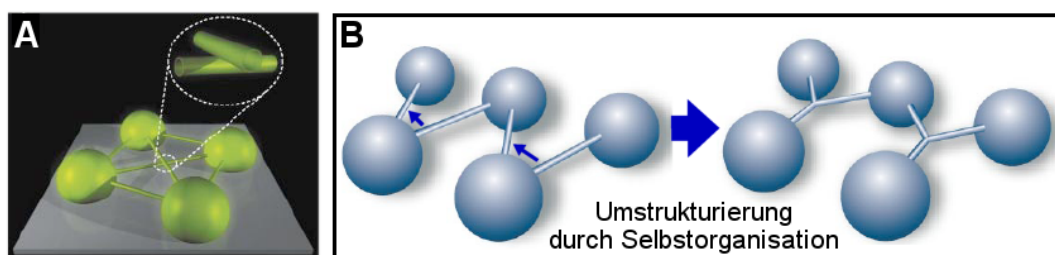


Abb. 7-4: (A) Geschlossenes System aus Lipid-Vesikeln und Nanoschläuchen durch Elektrofusion [168]. (B) Umstrukturierung eines Systems aus Lipid-Vesikeln und Nanoschläuchen durch Selbstorganisation, ausgelöst durch manuelle Verringerung des Abstandes zwischen den zwei Schläuchen der unteren Vesikel [168].

Alle diese Methoden zur Herstellung komplexerer Lipid-Strukturen beruhen auf einer mechanischen Manipulation mittels Mikropipette oder einer elektrischen Manipulation mittels Mikroelektrode. Oft funktionieren diese Methoden nur an fixierten Lipid-Strukturen, was eine zusätzliche Oberflächenbehandlung erfordert. Alle

diese vorgestellten Strukturen benötigen eine Kombination aus Vesikeln und Schläuchen zur Stabilisierung. Eine Herstellung komplexerer Strukturen nur aus Lipid-Schläuchen mittels lichtinduzierter Erwärmung an μ -Heizplatten wäre eine Alternative, die durch die indirekte Manipulation zudem eine kontaktfreie, und damit eine sehr saubere, Methode darstellen würde.

7.2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird die Herstellung der zur Mikroextrusion und zur Manipulation von Lipid-Schläuchen verwendeten Mikrochips vorgestellt. Im Anschluss wird die Durchführung der Mikroextrusion und der Manipulation der Lipid-Schläuche beschrieben.

7.2.1 Herstellung der Mikrochips

Der Mikrochip zur Mikroextrusion und Manipulation der Lipid-Schläuche bestand aus drei Teilen (siehe Abb. 7-2). Der erste Teil war wahlweise ein 150 μm dickes Deckglas oder, für die lichtinduzierte Erwärmung, eines der im Kapitel 4.2 beschriebenen Gläser mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff. Auf diesem Glas befand sich der zweite Teil, eine etwa 100 μm dünne PDMS-Schicht mit einem Kanal. Der dritte Teil war ein mikrostrukturierter Silizium-Chip mit einer Membran aus Siliziumnitrid mit definierten Poren. Dieser wurde auf der PDMS-Schicht so platziert, dass der Kanal in der PDMS-Schicht unter der Siliziummembran entlang verlief. Zudem musste der Kanal zwei größere Löcher im Silizium verbinden, welche anschließend als Flüssigkeitseingang und Reservoir dienten.

Die mikrostrukturierten Silizium-Chips für diesen Mikrochip wurden nach den im Kapitel 2.4.4 beschriebenen Standardmethoden in der EPFL (*Ecole Polytechnique Federale de Lausanne*, Schweiz) hergestellt. Dazu wurde ein von beiden Seiten polierter Siliziumwafer von 380 μm Dicke mit einer 200 nm dünnen Schicht Siliziumnitrid beschichtet. Zur Herstellung einer definierten Membran im Silizium-Chip wurden zwei verschiedene photolithographische Masken benötigt. Mit Hilfe der ersten Maske und eines Photolackes (Shipley 1805 positive photoresist) wurden Löcher

in der Siliziumnitrid-Membran definiert. Mit einer zweiten, speziell ausgerichteten Maske, wurden der Bereich der Siliziumnitrid-Membran und die Löcher für Zulauf und Ablauf im späteren Mikrochip auf der Rückseite des Silizium-Chips definiert. Das Siliziumnitrid wurde mittels RIE (*reactive ion etching*) strukturiert. Die freistehende Membran (Abb. 7-5 A) entstand anschließend durch Entfernen des Siliziums (*KOH etching*) durch die gesamte Dicke des Wafers.

Drei verschiedene Silizium-Chips mit Löchern von jeweils 3 μm Durchmesser wurden verwendet. Die erste Struktur enthielt eine Membran mit 32 Gruppen von je vier Löchern innerhalb eines 40 μm Quadrates (Abb. 7-5 A und B). Die zweite Struktur bestand aus drei Membranen, wovon eine Membran mit 44 Löchern, jeweils versetzt in zwei Reihen, verwendet wurde (Abb. 7-5 C). Eine dritte Struktur beinhaltete vier Membranen mit jeweils vier Löchern (Abb. 7-5 D).

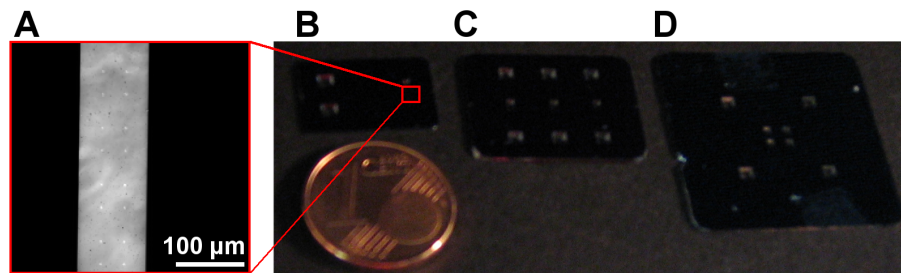


Abb. 7-5: (A) Ausschnitt einer Siliziumnitrid-Membran auf einem der drei verwendeten Silizium-Chips mit Löchern von jeweils 3 μm Durchmesser: (B) Chip mit einer Membran mit 128 Löchern, (C) drei Membranen mit je 44 Löchern und (D) vier Membranen mit je 4 Löchern.

Um eine PDMS-Schicht definierter Dicke mit einem Kanal zu erzeugen, wurde noch nicht vernetztes PDMS zwischen zwei Gläser mit drei Schichten aus durchsichtigem Klebeband gebracht und ausgehärtet. Die Dicke der Schicht wurde durch das Klebeband definiert und betrug etwa 100 μm . Mit einem Skalpell konnte nach dem Aushärten aus dieser Schicht der benötigte Kanal herausgeschnitten werden. Weder zwischen dem Siliziumchip und dem Kanal, noch zwischen dem Glas und dem Kanal, durfte eine PDMS-Schicht verbleiben. PDMS in diesen Bereichen würde entweder die Extrusion durch die Poren oder eine lichtinduzierte Erwärmung an den μ -Heizplatten auf dem Glas verhindern. Das Ausschneiden des Kanals war die wirksamste Methode, um sicherzustellen, dass diese Bereiche nicht durch eine PDMS-Schicht verdeckt wurden.

Die Herstellung der μ -Heizplatten aus Kohlenstoff auf Deckgläsern wurde bereits im Kapitel 4.2 vorgestellt. Die PDMS-Schicht mit dem Kanal wurde reversibel mit dem Glas mit μ -Heizplatten verbunden. Diese Methode erlaubte die Herstellung und Manipulation der Lipid-Schläuche in ein und demselben Mikrochip durch die Integration der μ -Heizplatten. Darüber hinaus war der entstandene Mikrochip zur Lipid-Herstellung wieder verwendbar, da kein irreversibles Verbinden von PDMS und Glas, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, erfolgte. Durch die Verwendung der dünnen und dadurch sehr flexiblen PDMS-Schicht dichtete sich der Mikrochip beim Anlegen von Unterdruck, welcher zur Extrusion der Lipid-Schläuche notwendig war, automatisch selber ab.

7.2.2 Durchführung der Mikroextrusion

Zur Herstellung der Lipid-Schläuche durch Mikroextrusion wurde zuerst eine Lipid-Schicht auf der Siliziumnitrid-Membran des Mikrochips benötigt (siehe Abb. 7-2). Dazu wurden 6,2 mg des Lipids DLPC (1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids) in 200 μ L Chloroform gelöst, um eine 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lipid-Lösung zu erhalten. Für die nachfolgenden Fluoreszenzaufnahmen der Lipid-Schläuche in diesem Kapitel wurden zu dieser Lipid-Lösung 2 μ L einer 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes DiI-C18 (1,1'-dilinoleyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorat) (Molecular Probes) in Methanol hinzugegeben, um 0,01 mol% Farbstoff in der Lipid-Membran zu erhalten.

3 μ L der Lipid-Lösung wurden auf die Siliziumnitrid-Membran des Mikrochips gegeben. Das Lösungsmittel Chloroform verdunstete bei Raumtemperatur innerhalb von 15 min vollständig. Dadurch wurde ein gleichmäßiger, multilamellarer Lipid-Film auf der Membran des Mikrochips erhalten. Anschließend wurde der Mikrochip, wie in Abb. 7-2 dargestellt, zusammengesetzt und mit demineralisiertem Wasser gefüllt. Die eigentliche Erzeugung der Lipid-Schläuche erfolgte durch einen Flüssigkeitsstrom innerhalb des Kanals, der unter der Siliziumnitrid-Membran entlang führte. Dieser Flüssigkeitsstrom entstand durch Anlegen von Unterdruck an einem Ende dieses Kanals. Möglichst hohe Fließgeschwindigkeiten von mehr als 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ waren notwendig, damit statt Vesikeln ausschließlich Schläuche entstanden [188].

Die innerhalb des Mikrochips entstehenden Lipid-Schläuche zeichneten sich durch eine große Stabilität aus, trotz einer Länge von teilweise über einem Zentimeter bei gerade einmal $3\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Abb. 7-6-A zeigt einige Schläuche im Kanal nach der Herstellung bei einer Fließgeschwindigkeit von etwa $70\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Wurde erneut durch Anlegen von Unterdruck am Ausgang des Kanals die Fließgeschwindigkeit erhöht, strafften sich die Schläuche und wurden länger (Abb. 7-6-B). Obwohl sie sich berührten, vereinten sie sich nicht.

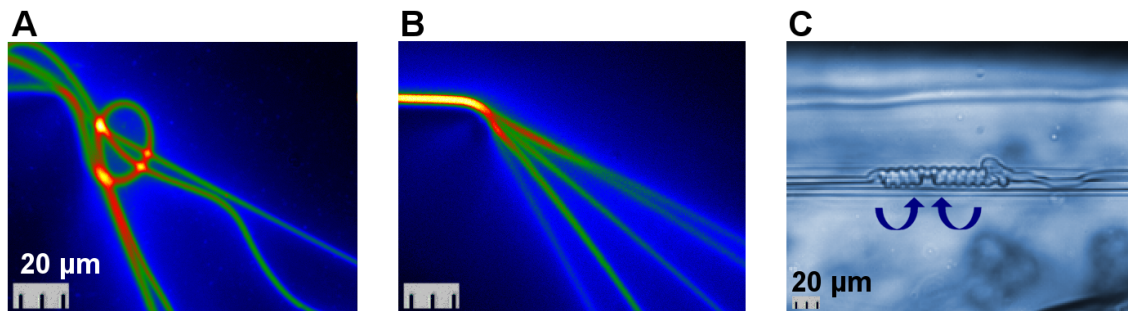


Abb. 7-6: Lipid-Schläuche im Kanal (A) direkt nach der Herstellung und (B) bei erneutem Erhöhen der Fließgeschwindigkeit des Wassers im Kanal. (C) Verdrehte Schläuche, wobei die Spiralen in entgegengesetzte Richtungen gedreht sind. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht jeweils $10\ \mu\text{m}$.)

Oft wurde beobachtet, dass sich die Lipid-Schläuche verdrehten und Spiralen entstanden. Dies geschah sowohl spontan bei der Herstellung als auch noch mehrere Minuten später, so dass ihre Anzahl zunahm, wenn die Lösung über einen längeren Zeitraum beobachtet wurde. Besonders bei kurzen Lipid-Schläuchen, unter $200\ \mu\text{m}$ Länge, waren nach etwa 1 h keine Schläuche mehr ohne Spiralen zu finden. Bevorzugt entstand diese Formen am Ende eines Schlauchs, sie konnte aber überall, auch in der Mitte, entstehen. Ebenso war die Richtung der Spiralen offensichtlich willkürlich. In ein und demselben Schlauch konnten sie in zwei verschiedene Richtungen entstehen (Abb. 7-6-C).

Nach der Bildung der Lipid-Schläuche wurde der Siliziumchip entfernt und der PDMS-Kanal für die Manipulation mit einem kleinen Glasdeckel abgedeckt, um ein Verdunsten der Flüssigkeit zu vermindern. Der zur anschließenden Manipulation notwendige optische Aufbau wurde bereits im Kapitel 3.2.2 vorgestellt.

Für die Versuche im Kapitel 7.3.1 wurden die Lipid-Schläuche auf ein frisches Deckglas mit einem Rahmen aus PDMS überführt. Zwei verschiedene Überführungsmethoden wurden hierbei angewendet. Zum einen wurde die auf dem Chip vorhandene Flüssigkeit mit den Lipid-Schläuchen mit einer 1000 μ L Pipette überführt. Allerdings wurden dabei alle langen Lipid-Schläuche zerstört, so dass nur noch Vesikel und kurze Schläuche unter 200 μ m Länge gefunden wurden. Zum anderen wurde die auf dem Chip vorhandene Flüssigkeit durch Gießen auf ein Glas mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff überführt. Mit dieser Methode konnten, im Gegensatz zur Verwendung einer Pipette, auch die längeren Lipid-Schläuche erhalten werden. Durch den Rahmen aus PDMS und einen Glasdeckel entstand eine Reaktionskammer, in der mehrere Lipid-Schläuche und viele Lipid-Vesikel zu finden waren.

7.3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zuerst die Ergebnisse zur optischen Manipulation von Lipid-Schläuchen vorgestellt. Anschließend werden die Reaktionen der Lipid-Schläuche auf das lichtinduzierte Erwärmen an μ -Heizplatten aus Kohlenstoff beschrieben. Als eine mögliche Anwendung der lichtinduzierten Erwärmung wird abschließend die Herstellung komplexer Strukturen aus Lipid-Schläuchen erläutert.

7.3.1 Optische Manipulation von Lipid-Schläuchen

Um die hergestellten Lipid-Schläuche durch die lokal begrenzte lichtinduzierte Erwärmung an den μ -Heizplatten manipulieren zu können, müssen sie zuvor nah an die μ -Heizplatten heranbewegt werden. Daher wurde untersucht, ob eine optische Manipulation mit dem zum lichtinduzierten Erwärmen verwendeten Laser möglich ist.

In einem Vorversuch wurde getestet, ob der Laserstrahl als optische Falle zur Manipulation genutzt werden kann. Dazu wurden 1 mL einer Lösung von $1,8 \cdot 10^6$ beads/mL Polystyrol-Kugeln mit 10 μ m Durchmesser (FluoSpheres, 10 μ m, 505/515, Invitrogen) auf ein Deckglas gegeben. Durch den Laser wurden diese Kugeln, wovon jede etwa 0,55 ng wog, schon bei einer Leistung von 5 mW durch die Streukraft aus der Fokusebene nach oben bewegt (siehe Abb. 7-7). Weiterhin war es möglich, die

Kugeln, bevor sie nach oben bewegt wurden, auf dem Deckglas frei zu bewegen. Dafür verantwortlich war die Gradientenkraft, welche aber offensichtlich nicht ausreichte, um entgegen der Streukraft die Kugeln in einer Ebene festzuhalten.

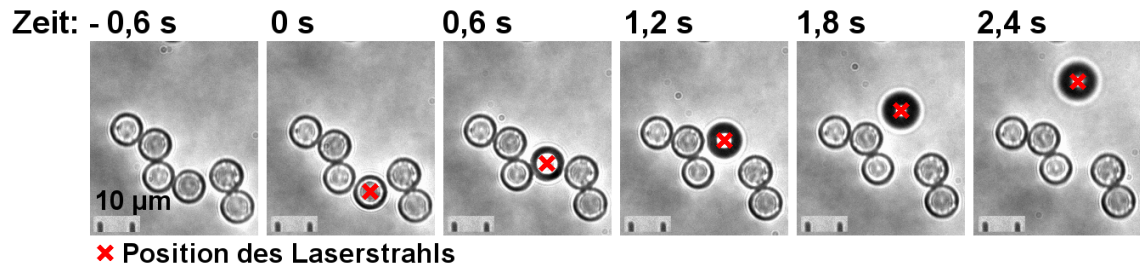


Abb. 7-7: Manipulation von kleinen Polystyrol-Kugeln durch fokussiertes Laserlicht von 830 nm und 5 mW Laserleistung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 µm.) Durch Bewegen des Mikroskoptisches konnten einzelne Kugeln bewegt werden, wobei sie aber gleichzeitig durch das von unten auf die Kugel treffende Laserlicht angehoben wurden. Somit wurde eine Schwebefalle nach Atkins realisiert, aber eine Fokussierung in z-Richtung, wie sie für eine stabile optische Falle benötigt wird, erfolgte nicht. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 µm.)

Da die Streukraft immer vom Fokus weg in Richtung des Laserlichts wirkt, ist in einer stabilen optischen Falle eine entgegenwirkende Kraft notwendig, um ein Teilchen in der Fokusebene zu halten. Diese entgegenwirkende Kraft war im vorliegenden optischen Aufbau die Gradientenkraft, welche aber im Versuch nicht groß genug war, um eine stabile optische Falle zu erhalten. Ursache hierfür waren ein nicht ideales Strahlenprofil des Diodenlasers und der mit 2,5 m relativ lange Strahlengang. Dennoch war das Bewegen von Polystyrol-Kugeln möglich, solange sie sich in der optischen Ebene befanden.

Da das Bewegen der Polystyrol-Kugeln möglich war, wurde im Anschluss untersucht, wie Lipid-Schläuche auf das fokussierte Laserlicht reagieren und ob auch sie sich bewegen lassen. Dazu wurden etwa 5 mL einer Lösung von frisch hergestellten Lipid-Schläuchen auf ein Glas mit einem Rahmen aus PDMS überführt. Mit einem Deckel aus Glas wurde verhindert, dass das Wasser zu schnell verdunstete.

Die optische Manipulation eines etwa 65 µm langen und 3 µm breiten Lipid-Schlauchs mit 56 mW Laserleistung zeigt Abb. 7-8. Der Schlauch konnte an einem Ende gezielt bewegt werden, wenn eine Laserleistung von mindestens 48 mW verwendet wurde. Die volle Laserleistung von 56 mW reichte nicht aus, um den

gesamten Schlauch auf einmal zu bewegen. Eine beliebige Manipulation war dennoch durch abwechselndes Bewegen der beiden Schlauchenden möglich.

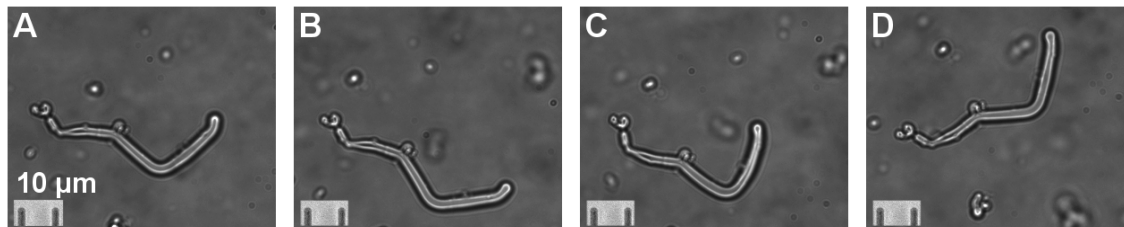


Abb. 7-8: Manipulation eines kurzen Lipid-Schlauchs durch den 830 nm Diodenlaser bei 56 mW Leistung (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm). Das rechte Ende des Schlauchs wurde (A) festgehalten, und der Schlauch (B) nach unten gestreckt, (C) gestaucht, und (D) nach oben gestreckt. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm .)

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob es möglich ist, die Lipid-Schläuche während der Herstellung mit Hilfe des Lasers, statt durch einen Flüssigkeitsstrom, zu verlängern. Dazu wurden die Schläuche direkt an der Siliziumnitrid-Membran des zur Herstellung verwendeten Silizium-Chips bewegt. Die maximale Laserleistung von 56 mW reichte nicht aus, um einen Ansatz eines Schlauchs zu verlängern. Nur durch einen Flüssigkeitsstrom konnten die Schläuche verlängert werden.

Diese Versuche zeigen, dass mit Hilfe des 830 nm Laserlichts ohne μ -Heizplatte ein Bewegen der Lipid-Schläuche möglich war, gleichzeitig aber keine sichtbare Veränderung der Lipid-Membran auf Grund des Laserlichts erfolgte. Somit konnte der gleiche Laser für die Positionierung der Lipid-Schläuche und das lichtinduzierte Erwärmen an den μ -Heizplatten genutzt werden.

7.3.2 Lichtinduziertes Erwärmen von Lipid-Schläuchen

Nachfolgend wurden die Folgen des lichtinduzierten Erwärmens für Lipid-Schläuche untersucht. Dazu wurden die Schläuche direkt in einem Mikrochip mit μ -Heizplatten aus Kohlenstoff hergestellt (siehe auch Kapitel 7.2.2). Nach Entfernen des Siliziumchips wurde durch einen Glasdeckel ein Verdunsten der Flüssigkeit verhindert.

In einem ersten Versuch zur lichtinduzierten Erwärmung wurde ein Lipid-Schlauch mit Hilfe des Lasers mit 56 mW Leistung an eine μ -Heizplatten bewegt. Diese wurde anschließend 5 s lang erwärmt. Ein und derselbe Schlauch wurde nacheinander einer immer höheren Laserleistung ausgesetzt. Der verwendete Lipid-Schlauch war etwa 500 μm lang und im Durchschnitt etwa 15 μm breit. Die Veränderungen an diesem Schlauch durch das lichtinduzierte Erwärmen sind in Abb. 7-9 dargestellt. Bei geringer Laserleistung bis 14 mW wurde der Schlauch durch die Wärmeentwicklung von der μ -Heizplatte wegbewegt und deformiert (Abb. 7-9 A und B, unten). Durch das Bewegen des Schlauchs mit dem Laser bildeten sich alle Deformationen zurück (Abb. 7-9 B und C, oben). Nach dem Erwärmen mit 22 mW hatten sich an der Membran des Schlauchs kleine Ausstülpungen gebildet (Abb. 7-9 C, unten), welche sich durch das Bewegen mit dem Laser nicht mehr zurück bildeten (Abb. 7-9 D, oben, roter Bereich). Nach dem Erwärmen mit 28 mW waren diese Ausstülpungen sehr deutlich erkennbar (Abb. 7-9 D, unten). Sie hatten die Form von kleinen Schläuchen.

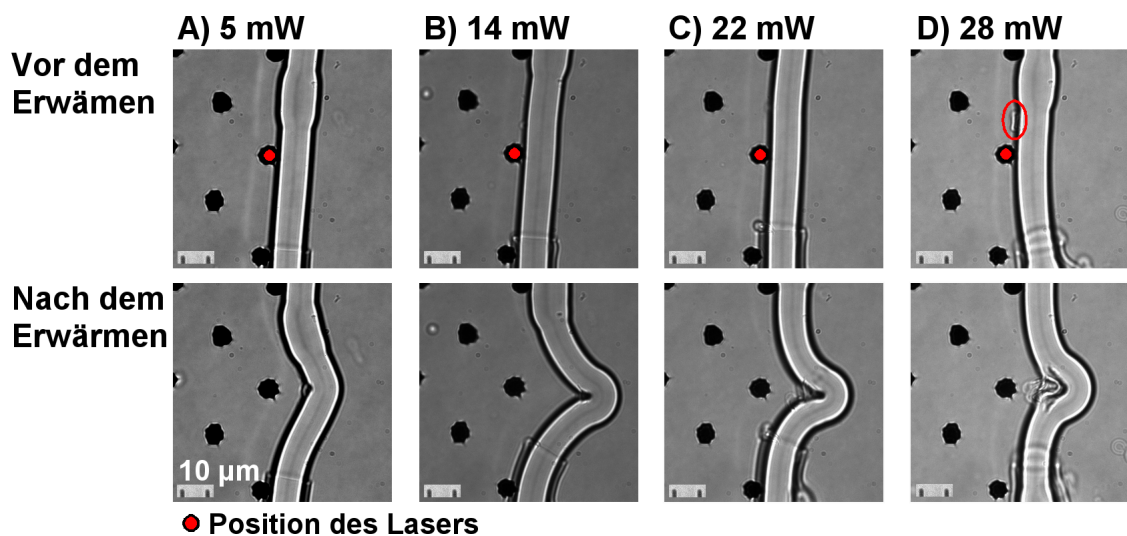


Abb. 7-9: Veränderungen an ein und demselben Abschnitt eines Lipid-Schlauchs durch lichtinduziertes Erwärmen für 5 s. Mit Hilfe des Lasers wurde zwischen den einzelnen Versuchen der Schlauch wieder in die Ausgangslage bewegt. Laserleistungen bis 14 mW (A, B) führten zu keinen bleibenden Veränderungen am Lipid-Schlauch. Bei 22 mW Laserleistung (C) entstand eine kleine, irreversible Verformung in Form einer Ausstülpung der Membran (D, oben, roter Bereich). Mit 28 mW (D) war die irreversible Deformierung der Membran des Lipid-Schlauchs sehr deutlich erkennbar. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Diese Ausstülpungen können entstehen, da mit der Membran gleichzeitig die Flüssigkeit im Inneren des Schlauchs erwärmt wird. Der Druck innerhalb des Schlauchs wird sich an der weichsten Stelle der Membran, also am erwärmten Bereich, abbauen. Die hergestellten Schläuche sind offensichtlich multilamellar und verfügen über ausreichend Lipidmembran, um durch diese Ausstülpungen den inneren Druck auszugleichen.

Um Verzweigungen der geraden Lipid-Schläuche zu erhalten, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, wie diese Ausstülpungen gezielt geformt werden können. Dazu wurde der vorhergehende Versuch mit unterschiedlich dicken Lipid-Schläuchen wiederholt. In Tabelle 7-1 sind die für einen Lipid-Schlauch aus der lichtinduzierten Erwärmung resultierenden Effekte, in Abhängigkeit vom Durchmesser des erwärmten Schlauchs und der verwendeten Laserleistung, zusammengefasst.

Tabelle 7-1: Zusammenfassung der aus der lichtinduzierten Erwärmung resultierenden Effekte für Lipid-Schläuche unterschiedlicher Dicke in Abhängigkeit der hierfür erforderlichen Laserleistung P bei einer Bestrahlungsdauer von 5 s. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Durchmesser d des Lipid-Schlauchs	Reversible Verformung	Verzweigung	Irreversible Verformung
$d \sim 5 \mu\text{m}$	$P \leq 5 \text{ mW}$	-	$P > 5 \text{ mW}$
$d \sim 10 \mu\text{m}$	$P < 14 \text{ mW}$	$14 \text{ mW} \leq P < 22 \text{ mW}$	$P \geq 22 \text{ mW}$
$d \sim 15 \mu\text{m}$	$P < 22 \text{ mW}$	$22 \text{ mW} \leq P < 42 \text{ mW}$	$P \geq 42 \text{ mW}$

Wurden Schläuche mit einer Dicke von 5 μm oder weniger verwendet, so wurden sie bereits bei 9 mW Laserleistung und einer Bestrahlungsdauer von 5 s sehr stark deformiert (siehe Abb. 7-10). Eine gezielte Verzweigung derartig dünner Schläuche war durch die starke Verformung nicht möglich. Für diese Schläuche müssten entsprechend kleinere μ -Heizplatten verwendet werden, da sonst ein zu großer Bereich der Lipid-Membran erwärmt wird, was zu diesen starken Verformungen führt.

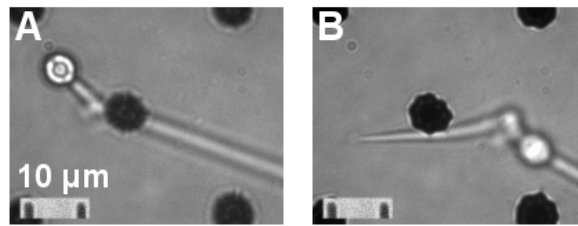


Abb. 7-10: Folgen des lichtinduzierten Erwärmens an einem 6 µm dicken Schlauch. (A) Vor dem Erwärmen mit 9 mW Laserleistung für 5 s und (B) nach dem Erwärmen. Derartig dünne Lipid-Schläuche wurden auf Grund der Erwärmung stark deformiert. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 µm. Durchmesser des Laserstrahls: 5 µm.)

An dickeren Schläuchen mit einem Durchmesser von etwa 10 µm konnten die Verzweigungen gezielt mit 14 mW Laserleistung und 5 s Bestrahlungsdauer hergestellt werden, wenn der verwendete Schlauch auf der µ-Heizplatte oder direkt daneben lag. Je dicker der verwendete Schlauch, umso höher war die benötigte Laserleistung. Für Schläuche um 15 µm Dicke war eine Laserleistung von 22 mW bis 36 mW notwendig.

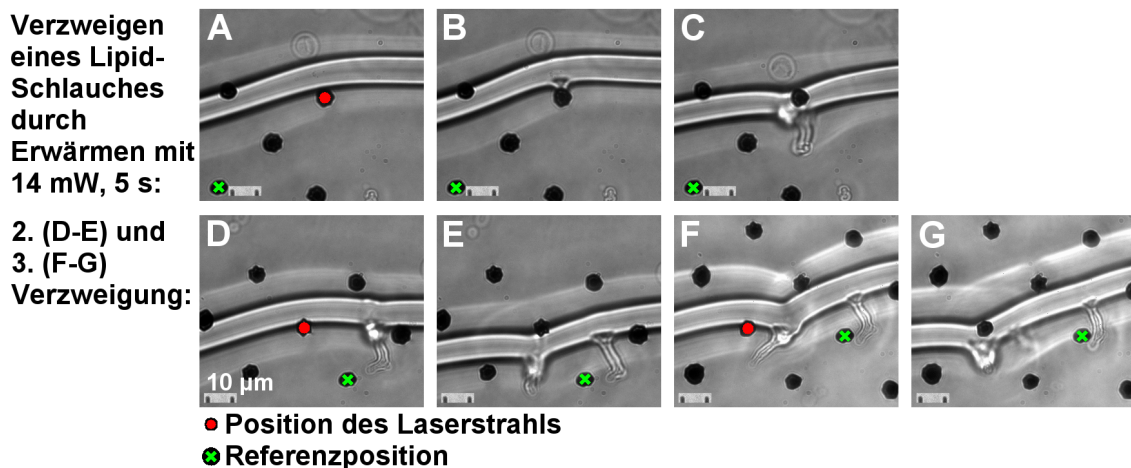


Abb. 7-11: Reaktion eines Lipid-Schlauches auf lichtinduziertes Erwärmen an Kohlenstoff-µ-Heizplatten für 5 s mit 14 mW. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 µm.) (A) Schlauch vor dem Erwärmen. (B) Während des Erwärmens wurde der Schlauch zuerst von der Wärmequelle weg bewegt, aber die Membran blieb an der µ-Heizplatte. (C) Durch den Druck innerhalb des Schlauchs entstand an der erwärmten Stelle eine dünne Verzweigung. (D-G) Durch erneutes Erwärmen entstanden weitere Verzweigungen. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 µm.)

Ein Beispiel für die gezielte Bildung von drei derartigen Verzweigungen an einem 12 µm dicken Lipid-Schlauch zeigt Abb. 7-11. Beim lichtinduzierten Erwärmen wurde der Schlauch durch die starke Wärmeentwicklung etwas von der µ-Heizplatte wegbewegt, wobei aber ein Teil der Membran an der µ-Heizplatte blieb (Abb. 7-11 B). Nach zwei bis drei Sekunden des Erwärmens zog sich der Schlauch über die

μ -Heizplatte, und an der am stärksten erwärmten Stelle der Membran entstand ein etwa 20 μm langer Seitenarm (Abb. 7-11 C). Weitere Verzweigungen zu Seitenarmen konnten in direkter Nachbarschaft zueinander unter gleichen Bedingungen hergestellt werden (Abb. 7-11 D-G).

Versuche, einen Lipid-Schlauch an einem Ende zu verlängern, waren nicht erfolgreich. Durch das Erwärmen entstand nur eine kleine, dünne Verlängerung des Schlauchs unter Rückgang bereits gebildeter Seitenarme (Abb. 7-12 C). Ebenso konnte ein künstlich gebildeter Seitenarm nicht nachträglich verlängert werden.

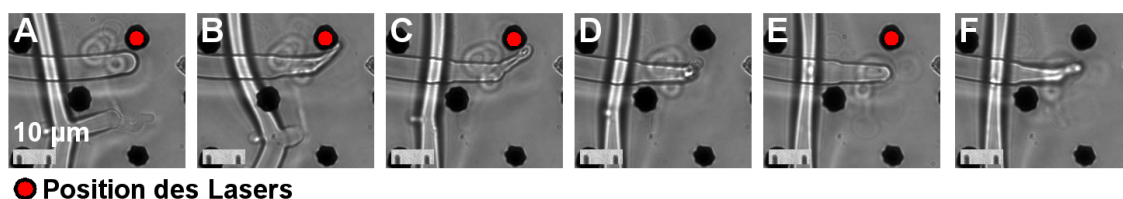


Abb. 7-12: Versuch zur Verlängerung eines Lipid-Schlauchs durch lichtinduziertes Erwärmen mit 14 mW Laserleistung. (Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .) Lipid-Schlauch mit kurzem Seitenarm (A) vor, (B) während und (C) nach dem Erwärmen. Es entstand eine dünne Verlängerung des Schlauchs unter Rückbildung des Seitenarmes. (D) Weiteres Erwärmen führte, wie bei dünnen Schläuchen, zu starker Verformung. (E) 5 min später war die Verformung zurückgebildet. (F) Erneutes Erwärmen führte zu einer neuen Verlängerung des Schlauchs. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm .)

Eine Verlängerung würde eine Zunahme des inneren Volumens oder eine deutliche Verringerung des Durchmessers der nicht erwärmten Bereiche des Schlauchs voraussetzen, was beides unter den gegebenen Umständen nicht möglich war. Durch erneutes Erwärmen an der dünnen Verlängerung des Schlauchs reagierten diese, wie dünne Schläuche unter 5 μm Dicke, durch starke Verformung (Abb. 7-12 D). Nach etwa fünf Minuten hatte sich die deformierte Membran zu einem normalen Schlauch der ursprünglichen Dicke zurückgebildet (Abb. 7-12 E). Durch erneutes Erwärmen am Ende des Lipid-Schlauchs bildete sich wieder eine dünne Verlängerung (Abb. 7-12 F).

Demnach konnten durch lichtinduzierte Erwärmung zwar Seitenarme hergestellt werden, hingegen war eine nachträgliche Verlängerung dieser Seitenarme oder des Schlauches nicht möglich. Die durch lichtinduzierte Erwärmung erzeugten Seitenarme waren über viele Minuten hinweg stabil. Daher stellte sich die Frage, ob sich auf eine ähnliche Weise auch direkt größere Seitenarme, und somit sogar komplexere

Strukturen, herstellen lassen. Dieser Frage wird im nachfolgenden Kapitel 7.3.3 nachgegangen.

7.3.3 Herstellung komplexer Strukturen aus Lipid-Schläuchen

In der Mikrofluidik werden oft Kreuzungen aus drei oder vier Kanälen benötigt, zum Beispiel für die Injektion einer Probe bei der Analyse. Deshalb wurde untersucht, ob und wie derartige Strukturen aus Lipid-Schläuchen nachgebildet werden können.

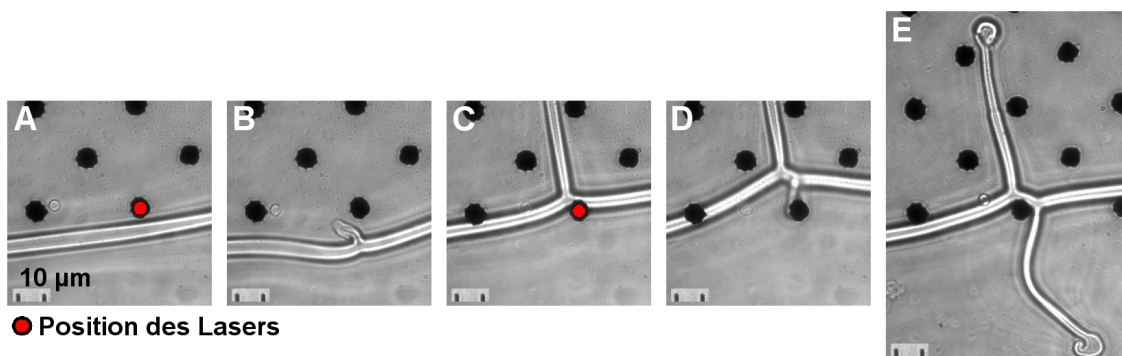


Abb. 7-13: Bildung einer Kreuzung durch zweimaliges lichtinduziertes Erwärmen eines Lipid-Schlauchs. (A) Vor dem Erwärmen mit 14 mW für 5 s. (B) Während des Erwärmens entstand eine kleine Ausstülpung. (C) Die Ausstülpung wuchs zu einem Seitenarm und es entstand eine T-Kreuzung. (D) Entstehung einer zweiten Ausstülpung durch erneute Erwärmung. (E) Resultierende Kreuzung aus einem Lipid-Schlauch und zwei gleichlangen Seitenarmen. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Ein Ergebnis dieser Untersuchungen, eine Kreuzung aus vier Lipid-Schläuchen, hergestellt aus einem einzigen Lipid-Schlauch, zeigt die Abb. 7-13. Ausgehend von den im vorherigen Kapitel 7.3.2 beschriebenen Seitenarmen wurden durch lichtinduzierte Erwärmung gezielt möglichst lange Seitenarme an Lipid-Schläuchen hergestellt. Dies war nur an langen Lipid-Schläuchen mit einer Länge von mehr als 300 μm möglich. Der ausgewählte Lipid-Schlauch wurde mit dem Laser bei 56 mW Leistung an eine μ -Heizplatte bewegt (Abb. 7-13 A). Anschließend erfolgte die Erwärmung der μ -Heizplatte 5 s lang bei 14 mW Laserleistung. Durch die anhaltende, lokale Erwärmung bildete sich zuerst ein kleiner Seitenarm (Abb. 7-13 B), der nach den 5 s der Bestrahlung durch den Laser immer größer wurde, bis sich ein Seitenarm von über

50 μm Länge gebildet hatte (Abb. 7-13 C). Gleichzeitig verkürzte sich der Lipid-Schlauch. Die resultierende Lipid-Struktur entsprach einer Kreuzung aus drei Kanälen.

Durch erneutes lokales Erhitzen des Lipid-Schlauchs direkt an dieser Kreuzung entstand ein zweiter langer Seitenarm (Abb. 7-13 D und E). Die beiden Seitenarme waren nur leicht seitlich versetzt und jeweils etwa 50 μm lang. Mit der Bildung des zweiten Seitenarmes wurden der ursprünglich längere erste Seitenarm und der Lipid-Schlauch etwas kürzer. Ein Gleichgewicht war erreicht, als beide Seitenarme etwa gleich lang waren.

Wurde der Lipid-Schlauch in der Nähe einer derartigen Kreuzung erneut erwärmt, so entstand ein dritter Seitenarm, wie in Abb. 7-14 zu erkennen ist. Dabei bildeten sich aber die vorherigen Seitenarme zurück und der Abstand zwischen ihnen wurde größer (Abb. 7-14 B). Die resultierende Struktur bestand aus dem Lipid-Schlauch mit einem Seitenarm und zwei kleinen Ausstülpungen, die aus den beiden Seitenarmen der Kreuzung zurückgeblieben waren (Abb. 7-14 C).

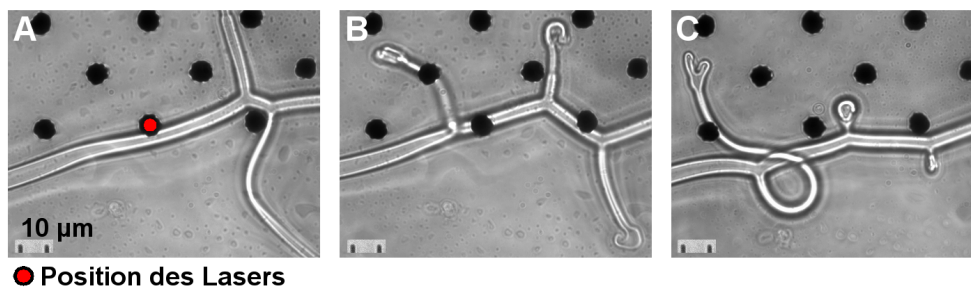


Abb. 7-14: Entstehung einer Verzweigung durch lichtinduziertes Erwärmen direkt neben einer Kreuzung. (A) Kreuzung vor dem Erwärmen. (B) Ein neuer Seitenarm entstand auf Kosten der vorher gebildeten beiden Seitenarme, die sich zurückbildeten. (C) Von der ursprünglichen Kreuzung waren nur noch Ausstülpungen in der Membran übrig. (Der Abstand zwischen den Strichen unten links entspricht 10 μm . Durchmesser des Laserstrahls: 5 μm .)

Diese langen Seitenarme entstanden, da die Flüssigkeit im Lipid-Schlauch sehr stark erwärmt wurde, was zu einer stärkeren Volumenausdehnung führte. Der so innerhalb des Lipids aufgebaute Druck wurde schlagartig im weichsten Bereich, der an der μ -Heizplatte erwärmten Membran, durch Bildung des Seitenarms abgebaut. Mit einem höheren Druck innerhalb des Lipid-Schlauchs, zum Beispiel durch längeren Kontakt zur μ -Heizplatte während der Erwärmung, wurden die Seitenarme länger. Wenn der Lipid-Schlauch nicht nah genug an der μ -Heizplatte war oder er sich durch

die Erwärmung von der μ -Heizplatte weg bewegte, entstanden nur die im Kapitel 7.3.2 beobachteten kurzen Seitenarme.

Die Verkürzung des Lipid-Schlauchs und des Seitenarmes während der Bildung von neuen Seitenarmen resultierte aus der Konstanz des Gesamtvolumens. Ebenso wie das Lipid zur Bildung der Membran stammte die Flüssigkeit, welche den neuen Seitenarm füllte, aus dem ursprünglichen Lipid-Schlauch. Während aber das Lipid für die Membran in den verwendeten multilamellaren Lipid-Schläuchen im Überschuss vorhanden ist, kann sich das Gesamtvolumen der im Inneren der Lipid-Struktur vorhandenen Flüssigkeit nicht ändern. Daher erfolgte eine Umverteilung dieser Flüssigkeit unter Verkürzung des ursprünglichen Lipid-Schlauchs.

7.4 Zusammenfassung

Es wurde eine Methode entwickelt, Lipid-Schläuche innerhalb eines Mikrochips herzustellen und zu manipulieren. Als Hilfsmittel für die Manipulation wurden nur der 830 nm Laser und die μ -Heizplatten aus Kohlenstoff verwendet.

Diese Versuche zeigten, dass mit Hilfe des verwendeten optischen Aufbaus die Lipid-Schläuche an die μ -Heizplatten aus Kohlenstoff bewegt werden konnten, um anschließend durch lichtinduziertes Erwärmen gezielt Seitenarme zu erzeugen. Die Bildung dieser Seitenarme wurde durch das Gesamtvolumen der Lipid-Schläuche beschränkt. Dadurch konnten nicht ein Seitenarm nachträglich merklich verlängert oder mehr als zwei lange Seitenarme gleichzeitig an einem Lipid-Schlauch geformt werden. Durch das lichtinduzierte Erwärmen wurde jedoch die Bildung von bis zu zwei langen Seitenarmen direkt nebeneinander an einem Lipid-Schlauch ermöglicht. Dadurch konnten gezielt Kreuzungen aus drei bzw. vier Schläuchen geformt werden, wie sie oft in der Mikrofluidik verwendet werden.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige, kontaktlose Methode zum kontrollierten lokalen Erwärmen kleiner Volumina von wenigen Femtolitern entwickelt und untersucht sowie zwei mögliche Anwendungen dieser Methode vorgestellt.

Ausgehend von theoretischen Vorüberlegungen entstand die Methode der lichtinduzierten Erwärmung. Dabei erfolgte die Erwärmung durch Absorption von infrarotem Licht eines Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 830 nm an Mikropartikeln und mikrostrukturierten Materialien, den so genannten μ -Heizplatten. Der entwickelte optische Aufbau ermöglichte eine lichtinduzierte Erwärmung und eine Fluoreszenzmikroskopie sowohl simultan als auch getrennt voneinander, was eine Verfolgung der Effekte der lichtinduzierten Erwärmung mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte.

Die lichtinduzierte Erwärmung wurde an innerhalb einer PDMS-Schicht fixierten Graphitpartikeln nachgewiesen. Deutliche Folgen der Erwärmung in Form von Kratern und eingebrannten Strukturen oder von Blasenbildung waren sowohl bei der direkten Bestrahlung an Luft als auch bei Kontakt der Graphitpartikel mit Wasser erkennbar. Die Blasenbildung belegte, dass an der Oberfläche der Graphitpartikel Temperaturen von über 100 °C erreicht wurden. Die unregelmäßige Größe und Verteilung innerhalb der PDMS-Schicht erschwerten jedoch eine reproduzierbare Erwärmung.

Deshalb wurden durch photolithographische Prozesse genau definierte Mikrostrukturen aus Kohlenstoff und Gold hergestellt und mit zwei verschiedenen Methoden zum Nachweis von Temperaturerhöhungen untersucht. Beide Materialien ermöglichten eine kontrollierte und reproduzierbare lokale Temperaturerhöhung durch absorbiertes Laserlicht. An den Oberflächen dieser μ -Heizplatten wurden ebenfalls Temperaturen über 100 °C erreicht, wie die beobachtete Blasenbildung belegte. Die mittels Fluoreszenzthermometrie mit Rhodamin B ermittelten, über die Höhe der Reaktionskammer gemittelten Temperaturerhöhungen der umgebenden Flüssigkeit betragen weniger als 10 °C. Versuche mit doppelsträngiger DNA zeigten, dass unter Verwendung der μ -Heizplatten aus Kohlenstoff und der aus Gold mit 10 μ m Durchmesser die Flüssigkeit Temperaturen von über 50 °C erreichte.

Beim Erwärmen an Gold waren im Vergleich zum Kohlenstoff etwas höhere Laserleistungen nötig, um die gleichen Temperaturänderungen zu erzielen, wobei die Erwärmung aber gleichmäßiger erfolgte, was zu geringeren Schwankungen der Messergebnisse führte. Der zeitliche Verlauf der Erwärmung des Systems war vom Material der μ -Heizplatten und von der eingesetzten Energiedichte abhängig, während die Abkühlung hingegen hauptsächlich von der Umgebung der μ -Heizplatten abhing und dadurch für die verwendeten μ -Heizplatten und Laserleistungen immer gleich verlief. Im Vergleich zu den Experimenten mit Rhodamin B waren in der DNA-Lösung deutlich geringere Laserleistungen notwendig, um eine Blasenbildung an den kleinen μ -Heizplatten aus Gold zu erhalten. Dies führte zu der Annahme, dass die DNA eine isolierende Wirkung auf die μ -Heizplatten hatte.

Simulationen der lichtinduzierten Erwärmung anhand zweier, eigens entwickelter Modelle bestätigten die Annahme einer stärkeren lokalen Erwärmung sowie eines stärkeren Einflusses daraus resultierender Konvektionsströmungen an kleineren μ -Heizplatten. Für die resultierende Temperaturverteilung um die μ -Heizplatten herum wurden abhängig vom Modell unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Die Betrachtung der Temperaturverteilung in einem stationären System mit dem ersten Modell führte zu einer Abnahme der Temperaturänderung mit zunehmender Größe der μ -Heizplatten. Im zweiten Modell für den Grenzfall extremer Konvektion wurde die Wärme direkt durch konstant 25 °C kaltes Wasser abtransportiert, wodurch die Erwärmung an der 5 μ m durchmessenden μ -Heizplatte stärker als an der größeren und der kleineren war.

Im Vergleich der Simulationen mit den Experimenten wurde deutlich, dass die Ergebnisse mit der DNA-Lösung in Näherung durch die Simulationen beschrieben wurden, während die Ergebnisse mit der Rhodamin B-Lösung deutlich von denen der Simulationen abwichen. Der Grund hierfür waren die mit zunehmender lokaler Erwärmung stärker auftretenden Konvektionsströmungen und die Veränderungen der Eigenschaften des Wassers, welche in den Simulationen vernachlässigt wurden. Diese beiden Effekte wurden offensichtlich bei den Versuchen mit DNA-Lösung unterdrückt, was die Annahme bestätigte, dass die DNA die μ -Heizplatten isolierte.

Als eine erste mögliche Anwendung der lichtinduzierten Erwärmung wurde die Möglichkeit einer Kontrolle des Zellwachstums für definierte Bereiche auf einem

Mikrochip nachgewiesen. Hierfür wurde gezeigt, dass lebende Zellen direkt auf den μ -Heizplatten kultiviert und durch die lichtinduzierte Erwärmung manipuliert werden können. Die Zellen überleben eine direkte Bestrahlung mit dem fokussierten Laserlicht mit 830 nm Wellenlänge oder eine leichte Erwärmung durch geringe Laserleistungen. Hingegen ist ein gezieltes Abtöten einzelner Zellen mit Hilfe des lichtinduzierten Erwärmens mit höheren Laserleistungen möglich.

Als eine zweite mögliche Anwendung der lichtinduzierten Erwärmung wurde eine Methode entwickelt, Lipid-Schläuche innerhalb eines Mikrochips herzustellen, zu manipulieren und daraus komplexe Mikrostrukturen zu formen. Als Hilfsmittel für die Manipulation und die Bildung der komplexen Strukturen wurden nur ein 830 nm Laser und μ -Heizplatten aus Kohlenstoff verwendet. Durch lichtinduzierte Erwärmung wurde die Bildung von bis zu zwei langen Seitenarmen direkt nebeneinander an einem Lipid-Schlauch ermöglicht. Dadurch konnten gezielt Kreuzungen aus drei bzw. vier Schläuchen geformt werden.

Wie diese beiden vorgestellten, sehr unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten bereits andeuten, ist die entwickelte Methode der lichtinduzierten Erwärmung ausgesprochen vielseitig einsetzbar. Allein für die Zellbiologie eröffnet diese Methode viele weitere Möglichkeiten. Es wurde gezeigt, dass durch starke Erwärmung an einer μ -Heizplatte der Inhalt einer einzelnen Zelle freigesetzt wird. Der Zellinhalt könnte dadurch gezielt für Einzelzellanalysen zugänglich gemacht werden. Anschließend könnte der so freigesetzte Zellinhalt direkt mittels PCR analysiert werden, indem die hierfür notwendigen Temperaturzyklen von drei unterschiedlichen Temperaturen ebenfalls durch lichtinduzierte Erwärmung realisiert werden. Durch eine lokale und kurzzeitige Erwärmung der Zellmembran durch lichtinduzierte Erwärmung ist eine kurzzeitige Perforation denkbar. Durch eine kurzzeitig perforierte Zellmembran könnten Biomoleküle oder Mikropartikel in lebende Zellen eingeschleust werden. Gezielt platzierte, absorbierende Mikropartikel innerhalb von lebenden Zellen könnten zur lokalen Erwärmung von Teilbereichen der Zelle genutzt werden. Die lichtinduzierte Erwärmung bietet damit die Möglichkeit zur Untersuchung von Zellvorgängen auf Grund derartiger lokaler Temperaturerhöhungen.

Neben solchen Anwendungen in der Zellbiologie könnte die lichtinduzierte Erwärmung auch zur Herstellung neuartiger, dreidimensionaler Mikrostrukturen verwendet werden. Mit Graphitpartikeln innerhalb von PDMS-Schichten wurden Löcher und Kanäle im PDMS hergestellt. Durch bessere Fokussierung des Laserstrahls zu einer optischen Falle und die Verwendung von Partikeln definierter Größe ist die Herstellung von gleichmäßigen, dreidimensionalen Strukturen denkbar. Ebenso ist die Herstellung von noch komplexeren Mikrostrukturen aus Lipid-Membranen denkbar, zum Beispiel durch eine Kombination der lichtinduzierten Erwärmung mit anderen Methoden der Manipulation von Lipid-Strukturen. Derartige Lipid-Mikrostrukturen bilden eine biologische Umgebung nach und besitzen gleichzeitig allen Vorteilen von Mikrosystemen, weshalb sie als Bioreaktoren interessant wären.

Zum besseren Verständnis der lichtinduzierten Erwärmung wäre eine Erweiterung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modelle für die Simulationen hilfreich, welche die durch starke lokale Erwärmung entstehenden Konvektionsströme sowie die Temperaturabhängigkeit der Materialeigenschaften des Wassers berücksichtigt.

Da die lichtinduzierte Erwärmung eine indirekte Methode ist, bei der keine direkten Kontakte zur Steuerung notwendig sind, kann sie leicht innerhalb von Mikrosystemen integriert werden. Letztendlich könnten alle Prozesse innerhalb von Mikrosystemen, welche eine lokale Erwärmung benötigen, durch lichtinduzierte Erwärmung gesteuert werden. Dazu gehören zum Beispiel die Durchführung chemischer Reaktionen und Analysen ebenso wie der Flüssigkeitstransport oder das Mischen von Flüssigkeiten. Durch die mögliche Variation des Materials, der Form, der Größe und der Anordnung der μ -Heizplatten sowie der Leistung und Belichtungszeit des Lasers ist diese Methode zudem sehr variabel, ohne dass der Aufbau verändert werden muss. Durch diese leichte Integrierbarkeit, die große Variabilität und die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten besitzt die lichtinduzierte Erwärmung das Potential, um zukünftig als hauptsächliche Methode zur lokalen Temperaturerhöhung innerhalb von Mikrosystemen eingesetzt zu werden.

Literaturverzeichnis

- [1] U.S. Army Photo, Historical Monograph: Electronic Computers Within the Ordnance Corps. <http://ftp.arl.army.mil/ftp/historic-computers/gif/eniac1.gif>
- [2] ENIAC-on-a-Chip. <http://www.upenn.edu/computing/printout/archive/v12/4/chip.html>
- [3] Blutzuckermessgeräte. http://www.testberichte.de/testsieger/level3_messgeraete_blutzucker_messgeraete_865.html
- [4] S. P. Newman, J. Brown, K. P. Steed, S. J. Reader, and H. Kladders, Lung Deposition of Fenoterol and Flunisolide Delivered Using a Novel Device for Inhaled Medicines. *Chest*, **1998**, 113 (4), 957-963.
- [5] Informationen zu Schwangerschaftstests. <http://www.clearblue.info/de/infoczubschwangerschaftstest.cfm>
- [6] Geschichte der Blutzucker - Selbstkontrolle bei Bayer Diagnostika. http://www.ascensia.ch/pub/de/fachpersonen/documents/Geschichte_Bayer_Diagnostika_0604.pdf
- [7] V. Zeeb, M. Suzuki, and S. Ishiwata, A novel method of thermal activation and temperature measurement in the microscopic region around single living cells. *J. Neurosci. Methods*, **2004**, 139, 69-77.
- [8] C. Yi, C.-W. Li, S. Ji, and M. Yang, Microfluidics technology for manipulation an analysis of biological cells. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 560, 1-23.
- [9] P. S. Dittrich and A. Manz, Lab-on-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2006**, 5, 210-218.
- [10] CellProm. <http://www.cellprom.net>
- [11] E. Garcia-Egido, S. Y. F. Wong, and B. H. Warrington, A Hantzsch Synthesis of 2-Aminothiazoles Performed in a Heated Microreactor System. *Lab Chip*, **2002**, 2 (1), 31-33.
- [12] T. Matsui, J. Franzke, A. Manz, and D. Janasek, Temperature Gradient Focusing in a PDMS/Glass Hybrid Microfluidic Chip. *Electrophoresis*, **2007**, 28 (24), 4606-4611.
- [13] Q. Zou, Y. Miao, Y. Chen, U. Sridhar, C. S. Chong, T. Chai, Y. Tie, C. H. L. Teh, T. M. Lim, and C. K. Heng, Micro-Assembled Multi-Chamber Thermal Cycler for Low-Cost Reaction Chip Thermal Multiplexing. *Sens. Act. A*, **2002**, 102, 114-121.
- [14] P. Sethu and C. H. Mastrangelo, Polyethylene Glycol (PEG)-Based Actuator for Nozzle-Diffuser Pumps in Plastic Microfluidic Systems. *Sens. Act. A*, **2003**, 104, 283-289.
- [15] M. N. Slyadnev, Y. Tanaka, M. Tokeshi, and T. Kitamori, Photothermal Temperature Control of a Chemical Reaction on a Microchip Using an Infrared Diode Laser. *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (16), 4037-4044.
- [16] B. C. Giordano, J. Ferrance, S. Swedberg, A. F. R. Hühmer, and J. P. Landers, Polymerase Chain Reaction in Polymeric Microchips: DNA Amplification in Less Than 240 Seconds. *Anal. Biochem.*, **2001**, 291, 124-132.
- [17] A. Takamizawa, S. Kajimoto, J. Hobley, K. Hatanaka, K. Ohta, and H. Fukumura, Explosive Boiling of Water After Pulsed IR Laser Heating. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, 5, 888-895.

- [18] D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit, Photothermal Imaging of nanometer-Sized Metal Particles Among Scatterers. *Science*, **2002**, 297 (5584), 1160-1163.
- [19] L. Cagnet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, and B. Lounis, Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **2003**, 100 (20), 11350-11355.
- [20] H. Kato, T. Nishizaka, T. Iga, K. Kinoshita, and S. Ishiwata, Imaging of thermal activation of actomyosin motors. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **1999**, 96, 9602-9606.
- [21] G. L. Liu, J. Kim, Y. Lu, and L. P. Lee, Optofluidic control using photothermal nanoparticles. *Nat. Mater.*, **2006**, 5, 27-32.
- [22] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, A gas chromatographic air analyzer fabricated on silicon wafer. *IEEE Trans. Electron Devices*, **1979**, 26, 1880-1886.
- [23] B. He, N. Tait, and F. Regnier, Fabrication of Nanocolumns for Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3790-3797.
- [24] O. Geschke, H. Klank, and P. Telleman, Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., *Weinheim*, **2004**.
- [25] D. J. Harrison, A. Manz, Z. H. Fan, H. Ludi, and H. M. Widmer, Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip. *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1926-1932.
- [26] P. S. Dittrich and A. Manz, Single-Molecule Fluorescence Detection in Microfluidic Channels - The Holy Grail in μ Tas? *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382, 1771-1782.
- [27] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens. Act. B*, **1990**, 1, 244-248.
- [28] L. J. Bousse, J. W. Parce, J. C. Owicki, and K. M. Kercso, Silicon Micromachining in the Fabrication of Biosensors using Living Cells. *IEEE*, **1990**, 173-176.
- [29] D. Sobek, A. M. Young, M. L. Gray, and S. D. Senturia, A Microfabricated Flow Chamber for Optical Measurements in Fluids. *IEEE*, **1993**, 219-224.
- [30] M. A. Northrup, C. Gonzalez, D. Hadley, R. F. Hills, P. Landre, S. Lehew, R. Saiki, J. J. Sninsky, R. T. Watson, and R. J. Watson, A MEMS-Based Miniature DNA Analysis System. *Transducers*, **1995**, 764-767.
- [31] A. Folch and M. Toner, Microengineering of Cellular Interactions. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2000**, 02, 227-256.
- [32] J. El-Ali, P. K. Sorger, and K. F. Jensen, Cells on Chips. *Nature*, **2006**, 442, 403-411.
- [33] H. Anderson and A. van den Berg, Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sens. Act. B*, **2003**, 92, 315-325.
- [34] J. Park, S.-H. Jung, Y.-H. Kim, B. Kim, S.-K. Lee, and J.-O. Park, Design and Fabrication of an Integrated Cell Processor for single embryo Cell Manipulation. *Lab Chip*, **2005**, 5, 91-96.
- [35] K. Sato, A. Egami, T. Odake, M. Tokeshi, M. Aihara, and T. Kitamori, Monitoring of Intercellular Messengers Released From Neuron Networks Cultured in a Microchip. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1111, 228-232.
- [36] A. Revzin, R. G. Tompkins, and M. Toner, Surface Engineering with Poly(ethylene glycol) Photolithography to Create High-Density Cell Arrays on Glass. *Langmuir*, **2003**, 19 (23), 9855-9862.
- [37] A. Khademhosseini, J. Yeh, G. Eng, J. Karp, H. Kaji, J. Borenstein, O. C. Farokhzad, and R. Langer, Cell Docking Inside Microwells Within Reversibly

- Sealed Microfluidic Channels For Fabricating Multiphenotype Cell Arrays. *Lab Chip*, **2005**, 5, 1380-1386.
- [38] M. Yang, C.-W. Li, and J. Yang, Cell Docking and On-Chip Monitoring of Cellular Reactions with a Controlled Concentration Gradient on a Microfluidic Device. *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (16), 3991-4001.
- [39] J. Yang, C.-W. Li, and M. Yang, Hydrodynamic Simulation of Cell Docking in Microfluidic Channels With Different Structures. *Lab Chip*, **2004**, 4 (1), 53-59.
- [40] C.-W. Li, C. N. Cheung, J. Yang, C. H. Tzang, and M. Yang, PDMS-Based Microfluidic Device With Multi-Height Structures Fabricated by Single-Step Photolithography Using Printed Circuit Board as Masters. *Analyst*, **2003**, 128, 1137-1142.
- [41] N. Chronis and L. P. Lee, Elektrothermally Activated SU-8 Microgripper for Single Cell Manipulation in Solution. *J. Microelectromech. S.*, **2005**, 14 (4), 857-863.
- [42] J. Moorthy and D. J. Beebe, In Situ Fabricated Porous Filters for Microsystems. *Lab Chip*, **2003**, 3, 62-66.
- [43] L. Zhu, Q. Zhang, H. Feng, S. Ang, F. S. Chau, and W.-T. Liu, Filter-Based Microfluidic Device as a Platform for Immunofluorescent Assay of Microbial Cells. *Lab Chip*, **2004**, 4, 337-341.
- [44] E. Detrait, J.-B. Lhoest, B. Knoop, and P. van den Bosch de Aguilar, Orientation of Cell Adhesion and Growth on Patterned Heterogeneous Polystyrene Surface. *J. Neurosci. Meth.*, **1998**, 84, 193-204.
- [45] J. D. Cox, M. S. Curry, S. K. Skirboll, P. L. Gourley, and D. Y. Sasaki, Surface Passivation of a Microfluidic Device to Glial Cell Adhesion: A Comparison of Hydrophobic and Hydrophilic SAM Coatings. *Biomaterials*, **2002**, 23, 929-935.
- [46] B. J. Kirby, A. R. Wheeler, R. N. Zare, J. A. Fruetel, and T. J. Shepodd, Programmable Modification of Cell Adhesion and Zeta Potential in Silica Microchips. *Lab Chip*, **2003**, 3 (1), 5-10.
- [47] W. C. Chang, L. P. Lee, and D. Liepmann, Biometric Technique for Adhesion-Based Collection and Separation of Cells in a Microfluidic Channel. *Lab Chip*, **2005**, 5 (1), 64-73.
- [48] A. Revzin, K. Sekine, A. Sin, R. G. Tompkins, and M. Toner, Development of a Microfabricated Cytometry Platform for Characterization and Sorting of Individual Leukocytes. *Lab Chip*, **2005**, 5 (1), 30-37.
- [49] S. K. Murthy, A. Sin, R. G. Tompkins, and M. Toner, Effect of Flow and Surface Conditions on Human Lymphocyte Isolation Using Microfluidic Chambers. *Langmuir*, **2004**, 20, 11649-11655.
- [50] W.-G. Koh, A. Revzin, and M. V. Pishko, Poly(ethylene glycol) Hydrogel Microstructures Encapsulating Living Cells. *Langmuir*, **2002**, 18 (7), 2459-2462.
- [51] T. Braschler, R. Johann, M. Heule, L. Metref, and P. Renaud, Gentle Cell Trapping and Release on a Microfluidic Chip by in Situ Alginate Hydrogel Formation. *Lab Chip*, **2005**, 5, 553-559.
- [52] V. A. Liu and S. N. Bhatia, Three-Dimensional Photopatterning of Hydrogels Containing Living Cells. *Biomed. Microdev.*, **2002**, 4 (4), 257-266.
- [53] D. R. Albrecht, V. L. Tsang, R. L. Sah, and S. N. Bhatia, Photo- and Electropatterning of Hydrogel-Encapsulated Living Cell Arrays. *Lab Chip*, **2004**, 5, 111-118.

- [54] F. Petersson, L. Aberg, A.-M. Swärd-Nilsson, and T. Laurell, Free Flow Acoustophoresis: Microfluidic-Based Mode of Particle and Cell Separation. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (14), 5117-5123.
- [55] J. J. Hawkes, R. W. Barber, D. R. Emerson, and W. T. Coakley, Continuous Cell Washing and Mixing Driven by an Ultrasound Standing Wave Within a Microfluidic Channel. *Lab Chip*, **2004**, 4, 446-452.
- [56] A. G. J. Tibbe, B. G. de Groot, J. Greve, P. A. Liberti, G. J. Dolan, and L. W. M. M. Terstappen, Optical Tracking and Detection of Immunomagnetically Selected and Aligned Cells. *Nature Biotechnol.*, **1999**, 17, 1210-1213.
- [57] H. Lee, A. M. Purdon, and R. M. Westervelt, Manipulation of Biological Cells Using a Microelectromagnet Matrix. *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, 85 (6), 1063-1065.
- [58] C. Gosse and V. Croquette, Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophys. J.*, **2002**, 82 (6), 3314-3329.
- [59] T. Deng, G. M. Whitesides, M. Radhakrishnan, G. Zabow, and M. Prentiss, Manipulation of Magnetic Microbeads in Suspension Using Micromagnetic Systems Fabricated with Soft Lithography. *Appl. Phys. Lett.*, **2001**, 78 (12), 1775-1777.
- [60] T. Kimura, Y. Sato, F. Kimura, M. Iwasaka, and S. Ueno, Micropatterning of Cells Using Modulated Magnetic Fields. *Langmuir*, **2005**, 21 (3), 830-832.
- [61] K.-H. Han and B. Frazier, Continuous Magnetophoretic Separation of Blood Cells in Microdevice Format. *J. Appl. Phys.*, **2004**, 96 (10), 5797-5802.
- [62] A. Winkelman, K. L. Gudiksen, D. Ryan, and G. M. Whitesides, A Magnetic Trap for Living Cells Suspended in a Paramagnetic Buffer. *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, 85 (12), 2411-2413.
- [63] Y. Huang, S. Joo, M. Duhon, M. Heller, B. Wallace, and X. Xu, Dielectrophoretic Cell Separation and Gene Expression Profiling on Microelectronic Chip Arrays. *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (14), 3362-3371.
- [64] S. Fiedler, S. G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr, Dielectrophoretic Sorting of Particles and Cell in a Microsystem. *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (9), 1909-1915.
- [65] J. Voldman, M. L. Gray, M. Toner, and M. A. Schmidt, A Microfabrication-Based Dynamic Array Cytometer. *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (16), 3984-3990.
- [66] C.-F. Chou, J. O. Tengenfeldt, O. Bakajin, S. S. Chan, E. C. Cox, N. Darnton, T. Duke, and R. H. Austin, Electrodeless Dielectrophoresis of Single- and Double-Stranded DNA. *Biophys. J.*, **2002**, 83 (4), 2170-2179.
- [67] N. Manaresi, A. Romani, G. Medoro, L. Altomare, A. Leonardi, M. Tartagni, and R. Guerrieri, A CMOS Chip for Individual Cell Manipulation and Detection. *IEEE J. Solid-State Circuits*, **2003**, 38 (12), 2297-2305.
- [68] T. P. Hunt, D. Issadore, and R. M. Westervelt, Integrated Circuit/Microfluidic Chip to Programmably Trap and Move Cells and Droplets with Dielectrophoresis. *Lab Chip*, **2008**, 8, 81-87.
- [69] P. A. Tipler, Physik. Spektrum Akademischer Verlag, *Heidelberg*, **2000**.
- [70] A. Ashkin, Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.*, **1970**, 24 (4), 156-159.
- [71] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, Optical Levitation by Radiation Pressure. *Appl. Phys. Lett.*, **1971**, 19 (8), 283-285.
- [72] Formeln und Tabellen. paetec Gesellschaft für Bildung und Technik mbH, *Berlin*, **1993**.

- [73] R. W. J. Applegate, J. Squier, T. Vestad, J. Oakey, and D. W. M. Marr, Optical Trapping, Manipulation, and Sorting of Cells and Colloids in Microfluidic Systems with Diode Laser Bars. *Optic Express*, **2004**, 12 (19), 4390-4398.
- [74] R. A. Flynn, A. L. Birbeck, M. Gross, M. Ozkan, B. Shao, M. M. Wang, and S. C. Esener, Parallel Transport of Biological Cells Using Individually Addressable VCSEL Arrays as Optical Tweezers. *Sens. Act. B*, **2002**, 87, 239-243.
- [75] A. L. Birbeck, R. A. Flynn, M. Ozkan, D. Song, M. Gross, and S. C. Esener, VCSEL Array as Micromanipulators in Chip-Based Biosystems. *Biomed. Microdevices*, **2003**, 5 (1), 47-54.
- [76] J. E. Curtis, B. A. Koss, and D. G. Grier, Dynamic Holographic Optical Tweezers. *Optics Commun.*, **2002**, 207, 169-175.
- [77] P. Jordan, J. Leach, M. Padgett, P. Blackburn, I. Neil, M. Goksör, D. Hanstorp, A. Wright, J. Girkin, and J. Cooper, Creating Permanent 3D Arrangements of Isolated Cells Using Holographic Optical Tweezers. *Lab Chip*, **2005**, 5, 1224-1228.
- [78] Nobelprize. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/
- [79] J. T. Eells, M. T. T. Wong-Riley, J. VerHoeve, M. Henry, E. V. Buchman, M. P. Kane, L. J. Gould, R. Das, M. Jett, B. D. Hodgson, D. Margolis, and H. T. Whelan, Mitochondrial Signal Transduction in Accelerated Wound and Retinal Healing by Near-Infrared Light Therapy. *Mitochondrion*, **2004**, 4, 559-567.
- [80] D. E. Brash, J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, and G. J. Mc Kenna, A Role for Sunlight in Skin Cancer: UV-Induced p53 Mutations in Squamous Cell Carcinoma. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **1991**, 88, 10124-10128.
- [81] L.-E. Wang, P. Xiong, S. S. Strom, L. H. Goldberg, J. E. Lee, M. I. Ross, P. F. Mansfield, J. E. Gershenwald, V. G. Prieto, J. N. Cormier, M. Duvic, G. L. Clayman, R. S. Weber, S. M. Lippman, C. I. Amos, M. R. Spitz, and Q. Wei, In Vitro Sensitivity to Ultraviolet B Light and Skin Cancer Risk: A Case-Control Analysis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **2005**, 97 (24), 1822-1831.
- [82] J. M. Elwood and J. Jopson, Melanoma and Sun Exposure: An Overview of Published Studies. *Int. J. Cancer*, **1997**, 73, 198-203.
- [83] M. Mori, A. Hamamoto, A. Takahashi, M. Nakano, N. Wakikawa, S. Tachibana, T. Ikehara, Y. Nakaya, M. Akutagawa, and Y. Kinouchi, Development of a New Water Sterilization Device with a 365 nm UV-LED. *Med. Bio. Eng. Comput.*, **2007**, 45, 1237-1241.
- [84] A. Wekhof, F.-J. Trompeter, and O. Franken, Pulsed UV Disintegration (PUVD): A New Sterilisation Mechanism for Packaging and Broad Medical-Hospital Applications. *I. Int. Conf. UV Techn.*, **2001**.
- [85] Y. Liu, D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg, Evidence for Localized Cell Heating Induced by Infrared Optical Tweezers. *Biophys. J.*, **1995**, 68, 2137-2144.
- [86] R. Lubart, M. Eichler, R. Lavi, H. Friedman, and A. Shainberg, Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. *Photomed. Laser Surg.*, **2005**, 23 (1), 3-9.
- [87] C. L. Kuyper and D. T. Chiu, Optical Trapping: A Versatile Technique for Biomanipulation. *Appl. Spectroscopy*, **2002**, 56 (11), 300A-312A.
- [88] T. N. Buican, M. J. Smyth, H. A. Crissman, G. C. Salzman, C. C. Stewart, and J. C. Martin, Automated Single-Cell Manipulation and Sorting by Light Trapping. *Appl. Optics*, **1987**, 26 (24), 5311-5316.

- [89] S. C. Grover, A. G. Skirtach, R. C. Gauthier, and C. P. Grover, Automated Single-Cell Sorting System Based on Optical Trapping. *J. Biomed. Optics*, **2001**, 6 (1), 14-22.
- [90] L. Sacconi, I. M. Tolic-Norrelykke, C. Stringari, R. Antolini, and F. S. Pavone, Optical micromanipulations inside yeast cells. *App. Optics*, **2005**, 44 (11), 2001-2007.
- [91] K. Svoboda and S. M. Block, Biological Applications of Optical Forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, 23, 247-285.
- [92] A. D. Metha, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, and R. M. Simmons, Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods. *Science*, **1999**, 283, 1689-1695.
- [93] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and J. Käs, The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophys. J.*, **2001**, 81 (2), 767-784.
- [94] A. Ladanyi, F. Sipos, D. Szoke, O. Galamb, B. Molnar, and Z. Tulassay, Laser Microdissection in Translational and Clinical Research. *Cytometry Part A*, **2006**, 69A, 947-960.
- [95] N. L. Simone, R. F. Bonner, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, and L. A. Liotta, Laser Capture Microdissection: Opening the Microscopic Frontier to Molecular Analysis. *Trends Gen.*, **1998**, 14 (7), 272-276.
- [96] S. Curran, J. A. Mc Kay, H. L. McLeod, and G. I. Murray, Laser Capture Microscopy. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, **2000**, 53, 64-68.
- [97] I. Becker, K.-F. Becker, M. H. Röhr, and H. Höfler, Laser-Assisted Preparation of Single Cells From Stained Histological Slides for Gene Analysis. *Histochem. Cell Biol.*, **1997**, 108, 447-451.
- [98] K. Schütze and G. Lahr, Identification of Expressed Genes by Lasermediated Manipulation of Single Cells. *Nature Biotech.*, **1998**, 16, 737-742.
- [99] Leica LMD6000 Laser microdissection system. http://www.light-microscopy.com/website/sc_mqm.nsf
- [100] M. R. Emmert-Buck, R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, and L. A. Liotta, Laser Capture Microdissection. *Science*, **1996**, 274, 998-1001.
- [101] U. K. Tirlapur and K. König, Femtosecond Near-Infrared Laser Pulses as a Versatile Non-Invasive Tool for Intra-Tissue Nanoprocessing in Plants Without Compromising Viability. *Plant J.*, **2002**, 31 (3), 365-374.
- [102] ArcturusXT™ Microdissection System Flexible and Modular Laser Capture Microdissection. <http://www.moleculardevices.com/pages/instruments/arcturusXT.html>
- [103] A. Clement-Sengewlad, K. Schütze, A. Ashkin, G. A. Palma, G. Kerlen, and G. Brem, Fertilization of Bovine Oocytes Induced Solely with Combined Laser Microbeam and Optical Tweezers. *J. Ass. Repr. Gen.*, **1996**, 13 (3), 259-265.
- [104] C. S. Buer, K. T. Gahagan, G. A. J. Swartzlander, and P. J. Weathers, Insertion of Microscopic Objects through Plant Cell Walls Using Laser Microsurgery. *Biotech. Bioeng.*, **1998**, 60 (3), 348-355.
- [105] G. Palumbo, M. Caruso, E. Crescenzi, M. F. Tecce, G. Roberti, and A. Colasanti, Targeted Gene Transfer in Eucaryotic Cells By Dye-Assisted Laser Optoporation. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1996**, 36, 41-46.
- [106] H. Schneckenburger, A. Hendinger, R. Sailer, W. S. L. Strauss, and M. Schmitt, Laser-Assisted Optoporation of Single Cells. *J. Biomed. Opt.*, **2002**, 7 (3), 410-416.

- [107] J. S. Soughayer, T. Krasieva, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, B. J. Tromberg, and N. L. Allbritton, Characterization of Cellular Optoporation with Distance. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (6), 1342-1347.
- [108] S. K. Mohanty, M. Sharma, and P. K. Gupta, Laser-Assisted Microinjection into Targeted Animal Cells. *Biotechn. Lett.*, **2003**, 25, 895-899.
- [109] E. Zeira, A. Manevitch, A. Khatchatouriants, O. Pappo, E. Hyam, M. Darash-Yahana, E. Tavor, A. Honigman, A. Lewis, and E. Galun, Femtosecond Infrared Laser - An Efficient and Safe in Vivo Gene Delivery System for Prolonged Expression. *Molec. Therapy*, **2003**, 8 (2), 342-350.
- [110] D. Stevenson, B. Agate, X. Tsampoula, P. Fischer, C. T. A. Brown, W. Sibbett, A. Riches, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, Femtosecond Optical Transfection of Cells: Viability and Efficiency. *Optics Express*, **2006**, 14 (16), 7125-7133.
- [111] L. Paterson, B. Agate, M. Comrie, R. Ferguson, T. K. Lake, J. E. Morris, A. E. Carruthers, C. T. A. Brown, W. Sibbett, P. E. Bryant, F. Gunn-Moore, A. C. Riches, and K. Dholakia, Photoporation and cell transfection using a violet diode laser. *Optical Express*, **2005**, 13 (2), 595-600.
- [112] R. W. Steubing, S. Cheng, W. H. Wright, Y. Numajiri, and M. W. Berns, Laser Induced Cell Fusion in Combination With Optical Tweezers: The Laser Cell Fusion Trap. *Cytometry*, **1991**, 12, 505-510.
- [113] R. R. Anderson and J. A. Parrish, Selective Photothermolysis: Precise Microsurgery by Selective Absorption of Pulsed Radiation. *Science*, **1983**, 220 (4596), 524-527.
- [114] C. P. Lin, M. W. Kelly, S. A. B. Sibayan, M. A. Latina, and R. R. Anderson, Selective Cell Killing by Microparticle Absorption of Pulsed Laser Radiation. *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electronics*, **1999**, 5 (4), 963-968.
- [115] J. C. Luft, I. J. Benjamin, R. Mestril, and D. J. Dix, Heat shock factor 1-mediated thermotolerance prevents cell death and results in G2/M cell cycle arrest. *Cell stress chaperones*, **2001**, 6 (4), 326-336.
- [116] A. S. Sreedhar and P. Csermely, Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, **2004**, 101, 227-257.
- [117] S. Y. Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, and V. L. Gabai, Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell. Res.*, **2003**, 283, 1-16.
- [118] A. Schönle and S. W. Hell, Heating by Absorption in the Focus of an Objective Lens. *Opt. Lett.*, **1998**, 23 (5), 325-327.
- [119] H. Liang, K. T. Vu, P. Krishnan, T. C. Trang, D. Shin, S. Kimel, and M. W. Berns, Wavelength Dependence of Cell Cloning Efficiency after Optical Trapping. *Biophys. J.*, **1996**, 70, 1529-1533.
- [120] K. König, H. Liang, M. W. Berns, and B. J. Tromberg, Cell Damage in Near-Infrared Multimode Optical Traps as a Result of Multiphoton Absorption. *Opt. Lett.*, **1996**, 21 (14), 1090-1092.
- [121] K. C. Neumann, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block, Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical traps. *Biophys. J.*, **1999**, 77, 2856-2863.
- [122] A. J. de Mellow, DNA Amplification: Does 'Small' really mean 'efficient'? *Lab Chip*, **2001**, 1, 24N-29N.
- [123] M. U. Kopp, A. J. de Mello, and A. Manz, Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip. *Science*, **1998**, 280, 1046-1048.

- [124] D. L. Huber, R. P. Manginell, M. A. Samara, B.-I. Kim, and B. C. Bunker, Programmed Adsorption and Release of Proteins in a Microfluidic Device. *Science*, **2003**, 301, 352-354.
- [125] D. Ross and L. E. Locascio, Microfluidic Temperature Gradient Focusing. *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (11), 2556-2564.
- [126] T. S. Sammarco and M. A. Burns, Thermocapillary Pumping of Discrete Drops in Microfabricated Analysis Devices. *AIChE J.*, **1999**, 45 (2), 350-366.
- [127] A. N. Hellman, K. R. Rau, H. Yoon, H., S. Bae, J. F. Palmer, K. S. Phillips, N. L. Allbritton, and V. Venugopalan, Laser-Induced Mixing in Microfluidic Channels. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (12), 4484-4492.
- [128] C. Yu, S. Mutlu, P. Selvaganapathy, C. H. Mastrangelo, F. Svec, and J. M. J. Fréchet, Flow Control Valves for Analytical Microfluidic Chips without Mechanical Parts Based on Thermally Responsive Monolithic Polymers. *Anal. Chem.*, **2003**, 75 (8), 1958-1961.
- [129] J. West, E. Hurley, N. Cordero, J. K. Collins, W. Lane, and H. Berney, Accessing DNA by Low Voltage Alternating Current Joule Effect Heating. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 527, 1-12.
- [130] J.-H. Park, A. M. Derfus, E. Segal, K. S. Vecchio, S. N. Bhatia, and M. J. Sailor, Local Heating of Discrete Droplets Using Magnetic Porous Silicon-Based Photonic Crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (24), 7938-7946.
- [131] R. P. Oda, M. A. Strausbauch, A. F. R. Huhmer, N. Borson, S. R. Jurens, J. Craighead, P. J. Wettstein, B. Eckloff, B. Kline, and J. P. Landers, Infrared-Mediated Thermocycling for Ultrafast Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA. *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (20), 4361-4368.
- [132] spinx technologies. <http://www.spinx-technologies.com/web/tech/tech02.html>
- [133] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. wei, R. R. Anderson, and C. P. Lin, Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles. *Biophys. J.*, **2003**, 84 (6), 4023-4032.
- [134] A. G. Skirtach, A. M. Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. P. Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, and G. B. Sukhorukov, Laser-Induced Release of Encapsulated Materials inside Living Cells. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2006**, 45, 4612-4617.
- [135] T. E. McGrath, A. C. Beveridge, and G. J. Diebold, Sonoluminescence Initiated by Laser Irradiation of Carbon Suspensions. *Appl. Phys. Lett.*, **1998**, 73 (8), 1029-1031.
- [136] Y. Tanaka, M. N. Slyadnev, A. Hibara, M. Tokeshi, and T. Kitamori, Non-Contact Photothermal Control of Enzyme Reactions on a Microchip by Using a Compact Diode Laser. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 894, 45-51.
- [137] B. C. Steel, M. M. Bilek, D. R. McKenzie, and C. G. dos Remedios, A Technique for Microsecond Heating and Cooling of a Thin (Submicron) Biological Sample. *Eur. Biophys. J.*, **2002**, 31, 378-382.
- [138] B. Steel, M. M. Bilek, C. G. dos Remedios, and D. R. McKenzie, Apparatus for exposing cell membranes to rapid temperature transients. *Eur. Biophys. J.*, **2004**, 33, 117-120.
- [139] J. F. Smalley, L. Geng, S. W. Feldberg, L. C. Rogers, and J. Leddy, Evidence for Adsorption of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ on Gold Using the Indirect Laser-Induced Temperature-Jump Method. *J. Electroanal. Chem.*, **1993**, 356, 181-200.

- [140] A. J. Gawron, R. S. Martin, and S. M. Lunte, Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips. *Electrophoresis*, **2001**, 22 (2), 242-248.
- [141] R. S. Martin, A. J. Gawron, B. A. Fogarty, F. B. Regan, E. Dempsey, and S. M. Lunte, Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. *Analyst*, **2001**, 126 (3), 277-280.
- [142] J. Wang, B. Tian, and E. Sahlin, Micromachined Electrophoresis Chip with Thick-Film Electrochemical Detectors. *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (23), 5436-5440.
- [143] M. L. Kovarik, N. J. Torrence, D. M. Spence, and R. S. Martin, Fabrication of carbon microelectrodes with a micromolding technique and their use in microchip-based flow analyses. *Analyst*, **2004**, 129, 400-405.
- [144] O. J. A. Schueller, S. T. Brittain, C. Marzolin, and G. M. Whitesides, Fabrication and Characterization of Glassy Carbon MEMS. *Chem. Mater.*, **1997**, 9, 1399-1406.
- [145] A. Singh, J. Jayaram, M. Madou, and S. Akbar, Pyrolysis of Negative Photoresists to Fabricate Carbon Structures for Microelectromechanical Systems and Electrochemical Applications. *J. Electrochem. Soc.*, **2002**, 149 (3), E78-E83.
- [146] L. Kou, D. Labrie, and P. Chylek, Refractive indices of water and ice in the 0.65-2.5 μm spectral range. *Appl. Opt.*, **1993**, 32 (19), 3531-3540.
- [147] ahf. <http://www.ahf.de>
- [148] J. Neumann and R. Brinkmann, Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *J. Biomed. Optics*, **2005**, 10 (2), 024001-024001.
- [149] C. F. Chapman, Y. Liu, G. J. Sonek, and B. J. Tromberg, The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells. *Photochem. Photobiol.*, **1995**, 62 (3), 416-425.
- [150] J. J. Kelly, K. A. Kelly, and C. H. Barlow, Tissue temperature by near-infrared spectroscopy. *SPIE*, **1995**, 2389, 818-828.
- [151] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic /Plenum Publishers, *New York*, **1999**.
- [152] G. Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie. WILEY-VCH Verlag GmbH, *Weinheim*, **1997**.
- [153] J. Lou, T. M. Finegan, P. Mohsen, T. A. Hatton, and P. E. Laibinis, Fluorescence-Based Thermometry: Principles and Applications. *Rev. Anal. Chem.*, **1999**, 18 (4), 235-284.
- [154] D. Ross, M. Gaitan, and L. E. Locascio, Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4117-4123.
- [155] U. Seger-Sauli, M. Panayiotou, S. Schnydrig, M. Jordan, and P. Renaud, Temperature measurements in microfluidic systems: Heat dissipation of negative dielectrophoresis barriers. *Electrophoresis*, **2005**, 26, 2239-2246.
- [156] R. Fu, B. Xu, and D. Li, Study of the temperature field in microchannels of a PDMS chip with embedded local heater using temperature-dependent fluorescent dye. *Int. J. Therm. Sci.*, **2006**, 45, 841-847.
- [157] R. Samy, T. Glawdel, and C. L. Ren, Method for Microfluidic Whole-Chip Temperature Measurement Using Thin-Film Poly(dimethylsiloxane)/Rhodamine B. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (2), 369-375.

- [158] J. Copetta and C. Rogers, Dual Emission Laser Induced Fluorescence for Direct Planar Scalar Behavior Measurements. *Exp. Fluids*, **1998**, 25 (1), 1-15.
- [159] J. Sakakibara and R. J. Adrian, Whole Field Measurement of Temperature in Water Using Two-Color Laser Induced Fluorescence. *Exp. Fluids*, **1999**, 26 (1-2), 7-15.
- [160] J. Lou, T. A. Hatton, and P. E. Laibinis, Fluorescent Probes for Monitoring Temperature in Organic Solvents. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1262-1264.
- [161] P. Lavieille, F. Lemoine, G. Lavergne, and M. Lebouché, Evaporating and combusting droplet temperature measurements using two-color laser-induced fluorescence. *Exp. in Fluids*, **2001**, 31 (1), 45-55.
- [162] C. W. Meyer, D. C. Meier, C. B. Montgomery, and S. Semancik, Temperature measurements of microhotplates using fluorescence thermometry. *Sens. Act. A*, **2006**, 127, 235-240.
- [163] H. P. Latscha and H. A. Klein, Organische Chemie. Springer-Verlag, Berlin, **1993**.
- [164] J. SantaLucia JR., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Nat. Ac. Sc.*, **1998**, 95, 1460-1465.
- [165] W. Rychlik, W. J. Spencer, and R. E. Rhoads, Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification in Vitro. *Nucleic Acid Research*, **1990**, 18 (21), 6409-6412.
- [166] F. Johansen and J. P. Jacobsen, ¹H NMR studies of the bis-intercalation of a homodimeric oxazole yellow dye in DNA oligonucleotides. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1998**, 16, 205-222.
- [167] Wasser Eigenschaften - wissenschaft-technik-ethik. http://www.wissenschaft-technik-ethik.de/wasser_eigenschaften.html
- [168] M. Karlsson, M. Davidson, R. Karlsson, A. Karlsson, J. Bergenholtz, Z. Konkoli, A. Jesorka, T. Lobovkina, J. Hurtig, M. Voinova, and O. Orwar, Biomimetic Nanoscale Reactors and Networks. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2004**, 55, 613-649.
- [169] A. Karlsson, K. Sott, M. Markström, M. Davidson, Z. Konkoli, and O. Orwar, Controlled Initiation of Enzymatic Reactions in Micrometer-Sized Biomimetic Compartments. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109 (4), 1609-1617.
- [170] H. Pick, E. L. Schmid, A.-P. Tairi, E. Ilegems, R. Hovius, and H. Vogel, Investigation cellular signalling reactions in single attoliter vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (9), 2908-2912.
- [171] D. T. Chiu, C. F. Wilson, A. Karlsson, S. Danielsson, A. Lundqvist, A. Strömberg, F. Ryttsén, M. Davidson, S. Nordholm, O. Orwar, and R. N. Zare, Manipulating the Biochemical Nanoenvironment Around Single Molecules Contained within Vesicles. *Chem. Phys.*, **1999**, 247 (1), 133-139.
- [172] R. Karlsson, A. Karlsson, A. Ewing, P. Dommersnes, J.-F. Joanny, A. Jesorka, and O. Orwar, Analysis in Nanoscale Surfactant Networks. *Anal. Chem.*, **2006**, 5961-5968.
- [173] K. Sott, M. Karlsson, J. Pihl, J. Hurtig, T. Lobovkina, and O. Orwar, Micropipet Writing Technique for Production of Two-Dimensional Lipid Bilayer Nanotube-Vesicle Networks on Functionalized and Patterned Surfaces. *Langmuir*, **2003**, 19 (9), 3904-3910.

- [174] H.-H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, and H. Ringsdorf, Polymerizable Phospholipid Analogues - New Stable Biomembrane and Cell Models. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1980**, 19 (11), 938-940.
- [175] E. Evans, H. Bowman, A. Leung, D. Needham, and D. Tirrell, Biomembrane Templates for Nanoscale Conduits and Networks. *Science*, **1996**, 273, 933-935.
- [176] P. Walde and S. Ichikawa, Enzymes Inside Lipid Vesicles: Preparation, Reactivity and Applications. *Biomol. Eng.*, **2001**, 18 (4), 143-177.
- [177] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, Liposome Electroformation. *Faraday Disc. Chem. Soc.*, **1986**, 81, 303-311.
- [178] Y. Okumura, H. Zhang, T. Sugiyama, and Y. Iwata, Electroformation of Giant Vesicles on a Non-Electroconductive Substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1490-1491.
- [179] Y.-C. Tan, K. Hettiarachchi, M. Siu, Y.-R. Pan, and A. P. Lee, Controlled Microfluidic Encapsulation of Cells, Proteins, and Microbeads in Lipid Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5656-.
- [180] A. Jahn, W. N. Vreeland, D. L. DeVoe, L. E. Locascio, and M. Gaitan, Microfluidic Directed Formation of Liposomes of Controlled Size. *Langmuir*, **2007**, 23, 6289-6293.
- [181] J.-P. Douliez, C. Gaillard, L. Navailles, and F. Nallet, Novel Lipid System Forming Hollow Microtubes at High Yields and Concentration. *Langmuir*, **2006**, 22, 2942-2945.
- [182] J. M. Schnur, Lipid Tubules: A Paradigm for Molecularly Engineered Structures. *Science*, **1993**, 262, 1669-1676.
- [183] A. Singh, P. E. Schoen, and J. M. Schnur. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 1988, 1222.
- [184] P. Yager and P. E. Schoen. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1984**, 106, 371.
- [185] J. H. Georger, A. Singh, R. R. Price, J. M. Schnur, P. Yager, and P. E. Schoen, Helical and Tubular Microstructures Formed by Polymerizable Phosphatidylcholines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 6169-6175.
- [186] N. Mahajan and J. Fang, Two-Dimensional Ordered Arrays of Aligned Lipid Tubules on Substrates with Microfluidic Networks. *Langmuir*, **2005**, 21, 3153-3157.
- [187] H. Frusawa, A. Fukagawa, Y. Ikeda, J. Araki, K. Ito, G. John, and T. Shimizu, Aligning a Single-Lipid Nanotube with Moderate Stiffness. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (1), 72-74.
- [188] P. S. Dittrich, M. Heule, P. Renaud, and A. Manz, On-Chip extrusion of lipid vesicles and tubes through microsized apertures. *Lab Chip*, **2006**, 6 (4), 488-493.
- [189] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A.-S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsén, and O. Orwar, Networks of Nanotubes and Containers. *Nature*, **2001**, 409, 150-152.
- [190] M. Karlsson, K. Sott, A.-S. Cans, A. Karlsson, R. Karlsson, and O. Orwar, Micropipet-Assisted Formation of Microscopic Networks of Unilamellar Lipid Bilayer Nanotubes and Containers. *Langmuir*, **2001**, 17, 6754-6758.
- [191] J. Hurtig, B. Gustafsson, M. Tokarz, and O. Orwar, Electrophoretic Transport in Surfactant Nanotube Networks Wired on Microfabricated Substrates. *Anal. Chem.*, **2006**.
- [192] J. Hurtig, M. Karlsson, and O. Orwar, Topographic SU-8 Substrates for Immobilization of Three-Dimensional Nanotube-Vesicle Networks. *Langmuir*, **2004**, 20 (13), 5637-5641.

- [193] M. Karlsson, K. Sott, M. Davidson, A.-S. Cans, P. Linderholm, D. Chiu, and O. Orwar, Formation of Geometrically complex lipid Nanotube Vesicle Networks of Higher-Order Topologies. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **2002**, 99 (18), 11573-11578.
- [194] The engineering ToolBox. http://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-d_429.html
- [195] vio borosilicate glasses. http://www.vio-verres.com/vio_english_version/vio_borosilicate_glasses.htm
- [196] The engineering ToolBox. http://www.engineeringtoolbox.com/specific-heat-solids-d_154.html

Abkürzungsverzeichnis

DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Dulbecco's modifiziertes Medium / Nährlösung F-12 Ham
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Desoxyribonukleinsäure (auch DNS)
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> – fetales Kälber-Serum
IR	Infrarot
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Polymerase Kettenreaktion
PDMS	Poly(dimethyl)siloxan
RIE	<i>Reactive ion etching</i> – Reaktivionen-Ätzen

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass beim Verfassen der eingereichten Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Teilergebnissen dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

- 1 H. Reinhardt, P. S. Dittrich, A. Manz und J. Franzke, "μ-Hotplate Array for Manipulation of Adhesive Cells by Means of IR Diode Laser Light", *Proc. of the μTAS conference 2006*, Tokyo, **2006**, 407-409
- 2 H. Reinhardt, P. S. Dittrich, A. Manz und J. Franzke, "μ-Hotplate enhanced optical heating by infrared light for single cell treatment", *Lab Chip*, **2007**, 7, 1509-1514
- 3 P. S. Dittrich, U. Marggraf, H. Reinhardt, J. West, H. van Lintel, P. Renaud, A. Manz, "Biomimetic lipid structures on a microfluidic platform", *Gordon Conference*, 12.07. - 20.07. **2007**, Waterville, USA
- 4 H. Reinhardt, J. Franzke, A. Manz und P. S. Dittrich, "Formation of Lipid Microtube Networks Induced by Localised Optical Heating", *MSB Konferenz*, 09.03. - 13.03. **2008**, Berlin
- 5 P. S. Dittrich, U. Marggraf, H. Reinhardt, J. West, H. van Lintel, P. Renaud, A. Manz, "Formation of Biomimetic lipid Structures on Microfluidic Platforms", *Bunsentagung*, 01.05. - 04.05. **2008**, Saarbrücken

Die Veröffentlichung dieser Teilergebnisse erfolgte im Einvernehmen mit dem Betreuer.

Dortmund, 25.10.2009

Helke Reinhardt

Lebenslauf



Helke Reinhardt

Geboren 1978 in Weimar

Promotion

- 09/04 – heute Promotionsthema: „ μ -Heizplatten zur lichtinduzierten Erwärmung für die Manipulation von lebenden Zellen und Lipid-Strukturen“, Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund
- 09/04 - 11/07 Forschungstätigkeit, Abteilung Miniaturisierung, ISAS - Institute for Analytical Sciences, Dortmund

Studium

- 09/03 – 08/04 Diplomarbeit „Herstellung ultradünner Hydrogelschichten durch elektrochemisch induzierte Polymerisation“, Institut für Physikalische Chemie, TU Clausthal
- 09/02 – 08/04 Mitglied im europäischen Graduiertenkolleg „Microstructural Control in Free-Radical Polymerization“
- 04/01 – 09/01 Auslandssemester, Vertiefungsarbeit „Voltammetric Analysis of 6-Mercapto-1-Hexanol Monolayers Electrochemically Deposited on Gold“, Universidad de Sevilla, ERASMUS – Austausch
- 10/99 Vordiplom Chemie, TU Clausthal
- 10/97 – 08/04 Diplomstudium der Chemie, TU Clausthal

Berufliche Erfahrungen

- 10/02 – 07/04 Praktikumsbetreuung, Institut für Physikalische Chemie, TU Clausthal
- 06/02 – 08/02 Laborarbeit in der Miniaturisierung, Department of Analytical Chemistry, Imperial College London, bei Prof. A. Manz, IAESTE – Programm
- 06/00 – 12/00 Hilfswissenschaftliche Tätigkeiten, hauptsächlich Literaturrecherche, Institut für Polymer und Kunststofftechnik, TU Clausthal

Fortbildungen

- 06/05 CellPROM (Cell Programming by Nanoscaled Devices) Summer School, Barcelona
- 05/03 „Condensed Course on Emulsion Polymerisation“, Eindhoven

Schulbildung

- 06/97 Abitur
- 09/93 – 06/97 Albert - Schweitzer - Gymnasium Erfurt, Spezialschulteil mathematisch
- naturwissenschaftlicher Richtung
- 09/91 – 08/93 Gymnasium Südkreis Weimar, Albert - Schweitzer - Schule
Blankenhain
- 09/85 – 08/91 Polytechnische Oberschule "Friedrich Leßner" Blankenhain



Helke Reinhardt

Dortmund, 25.10.2009

Anhang

Zum Vergleich der verschiedenen zur lichtinduzierten Erwärmung verwendeten Materialien sind in Tabelle 8-1 die Werte der für die Berechnung wichtigen Materialeigenschaften zusammengefasst.

Tabelle 8-1: Werte zu einigen Materialeigenschaften der benutzten Materialien. Diese Werte wurden insbesondere für die Simulation des lichtinduzierten Erwärmens an μ -Heizplatten aus Gold im Kapitel 5 benötigt.

Material	ρ Dichte [g·cm ⁻³]	c_p spezifische Wärmekapazität [J·kg ⁻¹ ·K ⁻¹]	λ Wärmeleitfähigkeits- koeffizient [W·m ⁻¹ ·K ⁻¹]
Gold	19,3 [72]	130 [148]	310 [194]
Wasser	0,998 [72]	4180 [148]	0,6 [72]
Glas	2,2 [195]	830 [195]	1,12 [195]
Kohlenstoff	2,26 [72]	710 [196]	1,7 [194]

Diese Werte wurden zum Beispiel für die im Kapitel 5 vorgestellte und im nachfolgenden Kapitel A.1 näher beschriebene Simulation benötigt.

A. Theorie der Modelle zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung

Im Kapitel 5 wurden zwei eigens entwickelte Modelle zur Beschreibung der lichtinduzierten Erwärmung an μ -Heizplatten vorgestellt. Zum besseren Verständnis dieser Modelle werden nachfolgend die diesen Modellen zugrunde liegenden Annahmen und Berechnungen aufgezeigt.

In beiden Modellen wurde eine mögliche Konvektion durch Wärmeströmung vernachlässigt. Zur Berechnung wurden die in Tabelle 8-1 angegebenen Werte für die Materialeigenschaften verwendet, wobei Temperaturabhängigkeiten der Materialeigenschaften vernachlässigt wurden.

A.1. Theorie zum ersten Modell der Simulation - Stationäres System

Das erste zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung entwickelte Modell bestand aus einer μ -Heizplatte auf einem Glas, auf dem sich eine Wasserschicht befand (siehe auch Kapitel 5.2.1 und Abb. 8-1).

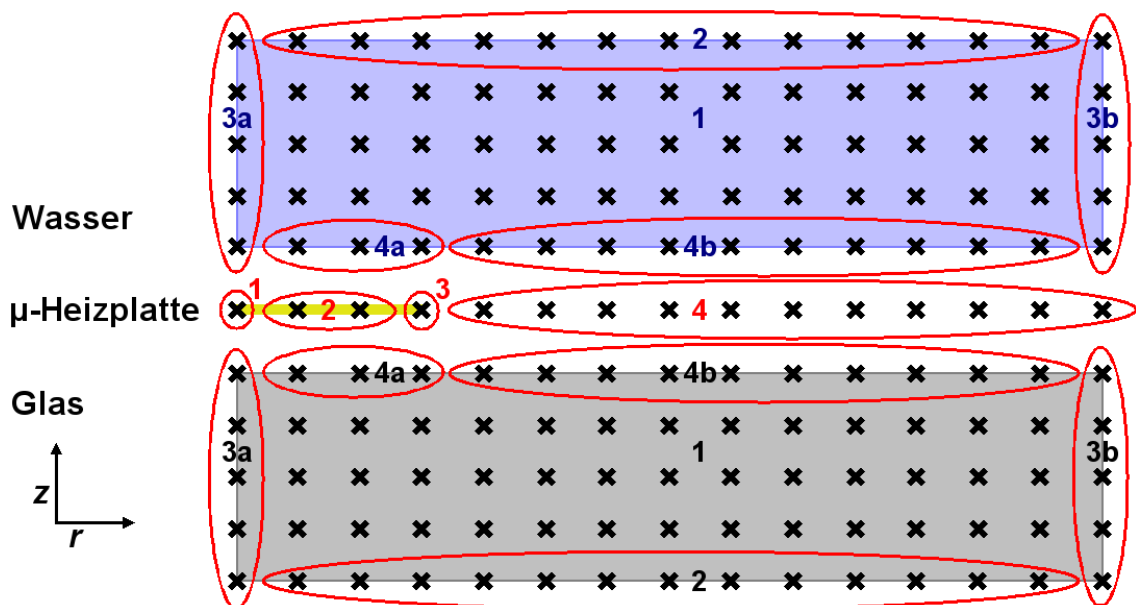


Abb. 8-1: Schematische Darstellung des Modells zur Berechnung der Wärmeverteilung innerhalb des Wassers, des Glases und der μ -Heizplatte beim lichtinduzierten Erwärmen. Es erfolgt eine zweidimensionale Betrachtung in radialer und in z -Richtung. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Bereiche, die auf Grund verschiedener Randbedingungen unterschieden werden müssen.

Innerhalb des Glases (schwarzer Bereich 1, Abb. 8-1) erfolgte nur eine Wärmeleitung in radialer und in z -Richtung, wie in Abb. 8-2 schematisch dargestellt.

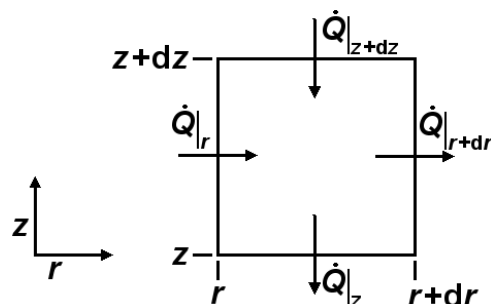


Abb. 8-2: Schematische Darstellung eines Volumenelementes innerhalb des Glases mit den entsprechenden Wärmeströmen. Beschriftung siehe Gl. 8-1.

Als Wärmebilanz ergab sich:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \dot{Q}|_r - \dot{Q}|_{r+dr} - \dot{Q}|_z + \dot{Q}|_{z+dz} \quad \text{Gl. 8-1}$$

Q : Wärme [J]; t : Zeit [s]; $\dot{Q}|_r$: Im Abstand r vom Zentrum des Systems in radialer Richtung eintretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; $\dot{Q}|_{r+dr}$: Im Abstand $r+dr$ austretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; $\dot{Q}|_z$: Im Abstand z von der μ -Heizplatte in z -Richtung eintretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; $\dot{Q}|_{z+dz}$: Im Abstand $z+dz$ von der μ -Heizplatte in z -Richtung austretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$].

Durch Anwenden der nach dem ersten Glied abgebrochenen Taylorreihenentwicklung wurde die Änderung des Wärmestroms in radialer Richtung wie folgt beschrieben:

$$\dot{Q}|_{r+dr} = \dot{Q}|_r + \frac{\partial \dot{Q}|_r}{\partial r} \cdot dr \quad \text{Gl. 8-2}$$

$\dot{Q}|_{r+dr}$: Im Abstand $r+dr$ austretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; $\dot{Q}|_r$: Im Abstand r vom Zentrum des Systems in radialer Richtung eintretender Wärmestrom [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m].

Entsprechend wurde die Änderung des Wärmestroms in z -Richtung beschrieben. Danach ergab sich für die Wärmebilanz folgende Gleichung:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = -\frac{\partial \dot{Q}|_r}{\partial r} dr + \frac{\partial \dot{Q}|_z}{\partial z} dz \quad \text{Gl. 8-3}$$

Q : Wärme [J]; t : Zeit [s]; $\dot{Q}|_r$: Wärmestrom in radialer Richtung [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; $\dot{Q}|_z$: Wärmestrom in z -Richtung [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m].

Die im Kapitel 5.1 vorgestellten Gleichung für den Speicherterm lautete:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = V \cdot \rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial T}{\partial t} \quad \text{Gl. 5-2}$$

Q : Wärme [J]; t : Zeit [s]; V : Volumen [m^3]; ρ : Dichte des Materials [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]; c_p : spezifische Wärmekapazität [$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; T : Temperatur [K].

Das hierfür zu betrachtende Volumenelement lautet:

$$V = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot dr \cdot dz \quad \text{Gl. 8-4}$$

V : Volumenelement [m^3]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m].

Für die Wärmeleitung galt die Gleichung:

$$\dot{Q} = -\lambda \cdot A \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \quad \text{Gl. 5-3}$$

\dot{Q} : Wärmestrom durch Wärmeleitung [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; λ : Wärmeleitfähigkeitskoeffizient [$\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; A : Wärmeaustauschfläche [m^2]; T : Temperatur [K]; x : Strecke [m].

In radialer und horizontaler Richtung wurden folgende Flächen betrachtet:

$$A_r = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot dz \quad \text{Gl. 8-5}$$

$$A_z = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot dr \quad \text{Gl. 8-6}$$

A_r : Wärmeaustauschfläche in radialer Richtung [m^2]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; A_z : Wärmeaustauschfläche in z -Richtung [m^2]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m].

Aus Gl. 8-3 ergab sich mit Gl. 5-2 und Gl. 5-3 folgende Gleichung für die Energiebilanz:

$$c_{p_glas} \cdot \rho_{-glas} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right)_{glas} = \lambda_{-glas} \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right) - \lambda_{-glas} \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \quad \text{Gl. 8-7}$$

c_{p_glas} : spezifische Wärmekapazität von Glas [$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; ρ_{-glas} : Dichte von Glas [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]; T : Temperatur vom Glas [K]; t : Zeit [s]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; λ_{-glas} : Wärmeleitfähigkeitskoeffizient von Glas [$\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m].

Der untere Rand des Glases (schwarzer Bereich 2, Abb. 8-1) besaß keinen Speicherterm. Die Wärme wird durch Wärmeübergang nach unten an die umgebende kalte Luft abgegeben. Für den Wärmeübergang galt folgende Gleichung:

$$\dot{Q}_{\dot{U}/V} = \alpha \cdot A \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 5-4}$$

$\dot{Q}_{\dot{U}/V}$: Wärmestrom durch Wärmeübergang [$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]; α : Wärmeübergangskoeffizient [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$]; A : Wärmeaustauschfläche [m^2]; ΔT : Temperaturdifferenz zwischen den Grenzschichten [K].

Für den Wärmeübergangskoeffizienten α_L wurde hierbei ein Wert von $\sim 2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ angenommen. Diese Wärme stammte ausschließlich von den darüber liegenden warmen Bereich des Glases und wurde durch Wärmeleitung nach Gl. 5-3 übertragen. Die Randbedingung bei $z = 0$ lautet:

$$0 = -\lambda_{\text{-glas}} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} - \alpha_L \cdot (T_{\text{umg}} - T_{\text{glasrand}}) \quad \text{Gl. 8-8}$$

$\lambda_{\text{-glas}}$: Wärmeleitfähigkeitskoeffizient von Glas [$\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; T : Temperatur [K]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m]; α_L : Wärmeübergangskoeffizient an Luft [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$]; T_{umg} : Temperatur in der Umgebung des Glases [K]; T_{glasrand} : Temperatur am Glasrand [K].

Die Temperatur des rotationssymmetrischen Modells hatte im Zentrum bei $r = 0$ (schwarzer Bereich 3a, Abb. 8-1) ihr Maximum oder Minimum. Die Randbedingung lautete entsprechend:

$$\left. \frac{\partial T}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad \text{Gl. 8-9}$$

T : Temperatur [K]; r : Radius [m].

Am äußeren Rand des Glases bei $r = \infty$ gilt diese Randbedingung ebenfalls, das sich dort die Temperatur nicht weiter ändert. Allerdings ist dies bei $r = 200$ noch nicht der Fall (schwarzer Bereich 3b, Abb. 8-1), so dass ein konstanter Wärmeübergang zum Glas hinter dem simulierten Gebiet angenommen wurde. Damit lautete die verwendete Randbedingung:

$$\left. \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right|_{r=200} = 0 \quad \text{Gl. 8-10}$$

T : Temperatur [K]; r : Radius [m].

Im Bereich der oberen Grenzfläche des Glases im Kontakt mit der μ -Heizplatte und der umgebenden Luft wurden zwei Fälle unterschieden.

Bei $z = z(\text{Glasdicke})$ gelten die folgenden beiden Randbedingungen. Die erste betrifft den Bereich direkt unter der μ -Heizplatte. Die Temperatur des Glases unter der μ -Heizplatte (schwarzer Bereich 4a, Abb. 8-1) entsprach der Temperatur der μ -Heizplatte. Die zweite betrifft den Bereich neben der μ -Heizplatte (schwarzer Bereich 4b, Abb. 8-1), welcher in direkter Wechselwirkung mit dem umgebenden Wasser stand (blauer Bereich 4b, Abb. 8-1). Daher wurden diese beiden Bereiche zu einer gemeinsamen Mischschicht zusammengefasst, wobei als Werte für die Materialeigenschaften die gemittelten Werte der Materialeigenschaften von Wasser und von Glas angenommen wurden. Zur Berechnung wurde zuerst eine Grenztemperatur für diese Mischschicht definiert, für die im Modell die Temperatur des Glases angenommen wurde. Die Wärmebilanz innerhalb dieser Mischschicht ergab sich aus der gespeicherten Wärme, die der Wärmeleitung in radialer Richtung durch diese Mischschicht abzüglich der Wärmeleitung in z -Richtung an das Glas und an das Wasser entspricht. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\rho_{-gem} \cdot c_{p_gem} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right)_{wasser} = \lambda_{-gem} \cdot \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T_{wasser}}{\partial r^2} \right) \quad \text{Gl. 8-11}$$

$$+ \frac{1}{dz} \cdot \left(\lambda_{-glas} \cdot \frac{\partial T_{glas}}{\partial z} + \lambda_{-wasser} \cdot \frac{\partial T_{wasser}}{\partial z} \right)$$

ρ_{-gem} : Mittelwert der Dichten von Glas und Wasser [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]; c_{p_gem} : Mittelwert der spezifischen Wärmekapazitäten von Glas und Wasser [$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]; T_{wasser} : Temperatur des Wassers [K]; t : Zeit [s]; λ_{-gem} : Mittelwert der Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten von Glas und Wasser [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m]; λ_{-glas} : Wärmeleitfähigkeitskoeffizient von Glas [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]; T_{glas} : Temperatur des Glases [K]; $\lambda_{-wasser}$: Wärmeleitfähigkeitskoeffizient von Wasser [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$].

Zur Bestimmung der Temperatur innerhalb der μ -Heizplatte wurde diese in drei Bereiche unterteilt. Im Zentrum der μ -Heizplatte ($r = 0$, roter Bereich 1, Abb. 8-1) wurde als Randbedingung eine maximale Temperatur Gl. 8-9 angenommen. Daneben bis zum Rand der μ -Heizplatte (roter Bereich 2, Abb. 8-1) war der Speicherterm gleich der Wärmeleitung in radialer Richtung und in z -Richtung zum Glas, abzüglich des

Wärmeverlustes durch Wärmeleitung an das Wasser, zuzüglich des Wärmeeintrags durch den Laser:

$$d_{-gold} \cdot \rho_{-gold} \cdot c_{p_gold} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right)_{gold} = \lambda_{-gold} \cdot d_{-gold} \cdot \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right)_{gold} \quad \text{Gl. 8-12}$$

$$+ \lambda_{-glas} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial z} \right)_{glas,rand} + \lambda_{-wasser} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial z} \right)_{wasser,rand} + e_p \cdot \eta \cdot I$$

d_{-gold} : Dicke der μ -Heizplatte [m], ρ_{-gold} : Dichte der μ -Heizplatte [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]; c_{p_gold} : spezifische Wärmekapazität von Gold [$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; T : Temperatur [K], t : Zeit [s]; λ_{-gold} : Wärmeleitfähigkeit der μ -Heizplatte, r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; λ_{-glas} : Wärmeleitfähigkeit des Glases, z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m]; $\lambda_{-wasser}$: Wärmeleitfähigkeit vom Wasser, e_p : Effizienz der Absorption [-], η : Verwendeter Anteil der Laserleistung von der vollen Laserleistung von 56 mW [b.E.], I : Laserintensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$].

Die Berechnung der Laserintensität $I(r)$ für 56 mW Laserleistung erfolgte wie in Kapitel 5.1 beschrieben über die maximale Laserintensität nach Gl. 2-12:

$$I_0 = \frac{2 \cdot P_{ges}}{\pi \cdot r_0^2} \quad \text{Gl. 2-12}$$

I_0 : Maximale Intensität im Fokuspunkt [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; P_{ges} : Gesamte Laserleistung; π : Ludolfische Zahl [$\sim 3,14159$]; r_0 : Radius des Laserstrahls im Fokuspunkt [m].

Damit konnte mit Gl. 5-6 die Laserintensität bestimmt werden:

$$I(r) = I_0 \cdot e^{-\frac{2r^2}{r_0^2}} = I_0 \cdot e^{-g \cdot r^2} \quad \text{Gl. 5-6}$$

$I(r)$: Lokale Intensität in Abhängigkeit vom Abstand r vom Strahlmittelpunkt [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; I_0 : Maximale Intensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]; r : Abstand vom Strahlmittelpunkt [m]; r_0 : Strahlradius im Fokus [m]; g : Gaußfaktor für Anpassung [m^{-2}].

Als Effizienz der Absorption des Laserlichtes an der μ -Heizplatte e_p wurde ein Wert von 0,025 angenommen. Er berücksichtigt die Transmission des verwendeten Objektivs, die Reflektivität des Goldes sowie die Transmission der mit 100 nm noch leicht lichtdurchlässigen Goldschicht. Dieser Wert konnte nicht bestimmt werden und wurde daher während der Simulation angenähert.

Um nicht für jede Laserleistung die Laserintensität I_0 erneut berechnen zu müssen, wurde über den Vorfaktor η der resultierende Anteil der Laserintensität berechnet, wenn

die Laserleistung von 56 mW auf einen anderen Wert reduziert wurde. In Tabelle 8-2 sind die entsprechenden Werte für η aufgelistet.

Tabelle 8-2: Verwendete Werte des Vorfaktors η zum Einstellen der Laserleistung.

Laserleistung P	5 mW	9 mW	14 mW	28 mW	42 mW
Vorfaktor η	0,09	0,16	0,25	0,5	0,75

Am äußeren Rand der μ -Heizplatte (roter Bereich 3, Abb. 8-1) waren in r -Richtung keine benachbarten Bereiche der μ -Heizplatte vorhanden, an die eine Wärmeleitung erfolgen konnte, und eine Wärmeleitung an das kältere Wasser wurde wegen der geringen Dicke der μ -Heizplatte von 100 nm vernachlässigt. Als Randbedingung wurde angenommen:

$$\left. \frac{\partial T}{\partial r} \right|_{r=r_{\text{gold}}} = 0 \quad \text{Gl. 8-13}$$

T : Temperatur [K]; r : Radius [m]; r_{gold} : Radius der μ -Heizplatte.

Die Temperatur des neben der μ -Heizplatte befindlichen Wassers (roter Bereich 4, Abb. 8-1) ging in keine weitere Rechnung oder Auswertung ein und konnte somit beliebig festgelegt werden. Als Temperatur wurde die Temperatur des in der Ebene darüber befindlichen Wassers angenommen.

Die Bilanzierung für alle Bereiche innerhalb des Wassers (blauer Bereich 1 bis 4 in Abb. 8-1) erfolgte analog der entsprechenden Bereiche innerhalb des Glases, mit den Materialkonstanten für Wasser.

Als Anfangsbedingung für die Simulationen wurde, entsprechend der Laborbedingungen, festgelegt, dass die Temperaturen überall 25 °C betragen. Durch diese Randbedingungen und Annahmen wurde das System vollständig beschrieben und die Simulationen konnten durchgeführt werden.

A.2. Zweites Modell zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung

Das zweite Modell zur Simulation der lichtinduzierten Erwärmung an μ -Heizplatten aus Gold im Grenzfall einer extremen Konvektion war eine Vereinfachung des ersten Modells, bestehend aus Glas und einer darauf befindlichen μ -Heizplatte (siehe auch Kapitel 5.2 bzw. Abb. 8-3). Eine wesentliche Vereinfachung dieses Modells bestand in der Annahme, dass die Temperatur des über dem Glas mit der μ -Heizplatte befindlichen Wassers konstant 25 °C betrug. Auf Grund der Ähnlichkeit zum ersten Modell werden nachfolgend nur die Unterschiede aufgezeigt.

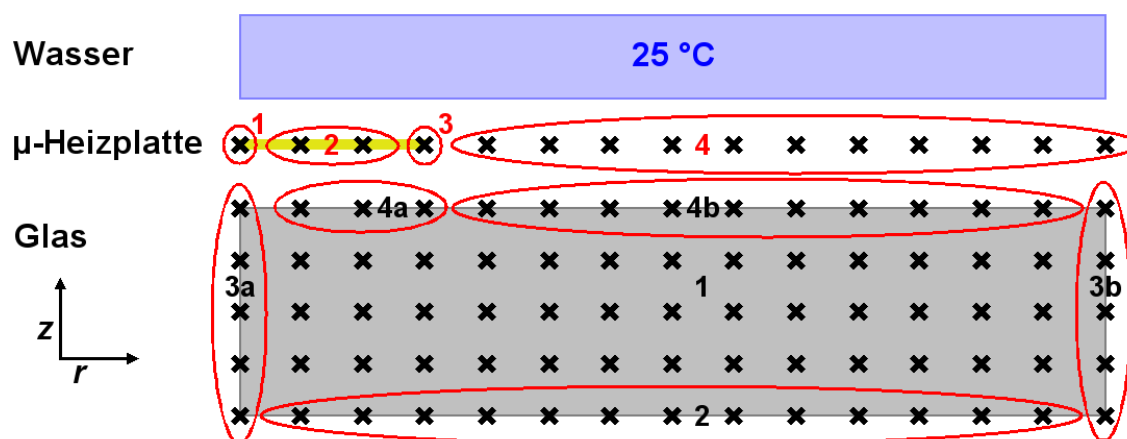


Abb. 8-3: Schematische Darstellung des zweiten Modells zur Berechnung der Wärmeverteilung innerhalb des Glases und der μ -Heizplatte beim lichtinduzierten Erwärmen. Es erfolgte eine zweidimensionale Betrachtung in radialer und in z -Richtung. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Bereiche, die auf Grund verschiedener Randbedingungen unterschieden wurden.

Für das Glas änderte sich nur die Berechnung des oberen Randes im Kontakt mit dem Wasser, neben der μ -Heizplatte (schwarzer Bereich 4b, Abb. 8-3). In diesem Modell wurde dieser Bereich wie der untere Rand (schwarzer Bereich 2, Abb. 8-3) betrachtet, mit dem Unterschied, dass der Wärmeübergang an Wasser mit einer konstanten Temperatur von 25 °C erfolgte:

$$0 = -\lambda_{\text{glas}} \cdot \frac{\partial T}{\partial z} - \alpha_W \cdot (T_{\text{wasser}} - T_{\text{glasrand}}) \quad \text{Gl. 8-14}$$

λ_{glas} : Wärmeleitfähigkeitskoeffizient von Glas [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]; π : Ludolfsche Zahl [$\sim 3,14159$]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer Richtung [m]; T : Temperatur [K]; z : Abstand von der μ -Heizplatte in z -Richtung [m]; α_W : Wärmeübergangskoeffizient an Wasser [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$]; T_{wasser} : Temperatur des Wassers [K], T_{glasrand} : Temperatur am Glasrand [K].

Für den Wärmeübergangskoeffizienten α_L wurde ein Wert von $\sim 6000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ angenommen.

Die Bilanzierung innerhalb der Ebene der μ -Heizplatte erfolgte analog zum ersten Modell. Der Wert für die Effizienz der Absorption e_P nach Anpassung an dieses Modell betrug 0,05. Zudem wurde innerhalb der μ -Heizplatte und an ihrem äußeren Rand (roter Bereich 2 und 3 in Abb. 8-3) in Gl. 8-12 bzw. Gl. 8-13 jeweils statt der Wärmeleitung mit dem Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten von Wasser ein Wärmeübergang vom Gold an Wasser angenommen. Damit ergab sich zum Beispiel für den Bereich innerhalb der μ -Heizplatte aus Gl. 8-12 folgende Gleichung:

$$d_{\text{gold}} \cdot \rho_{\text{gold}} \cdot c_{p_{\text{gold}}} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right)_{\text{gold}} = \lambda_{\text{gold}} \cdot d_{\text{gold}} \cdot \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right)_{\text{gold}} \quad \text{Gl. 8-15}$$

$$+ \lambda_{\text{glas}} \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial z} \right)_{\text{glas,rand}} - \alpha_W \cdot (T_{\text{wasser}} - T_{\text{goldrand}}) + e_P \cdot \eta \cdot I$$

d_{gold} : Dicke der μ -Heizplatte [m], ρ_{gold} : Dichte der μ -Heizplatte [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$];
 $c_{p_{\text{gold}}}$: spezifische Wärmekapazität von Gold [$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]; T : Temperatur [K],
 t : Zeit [s]; λ_{gold} : Wärmeleitfähigkeit der μ -Heizplatte, z : Abstand von der
 μ -Heizplatte in z -Richtung [m]; r : Abstand vom Zentrum des Systems in radialer
Richtung [m]; α_W : Wärmeübergangskoeffizient an Wasser [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$],
 T_{wasser} : Temperatur des Wassers [K], T_{goldrand} : Temperatur am Goldrand [K];
 e_P : Effizienz der Absorption [-], η : Verwendeter Anteil der Laserleistung von der
vollen Laserleistung von 56 mW [b.E.], I : Laserintensität [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$].

Wie im ersten Modell wurde als Anfangsbedingung festgelegt, dass die Temperaturen überall $25 \text{ }^\circ\text{C}$ betragen.