Aufbau eines Meßplatzes mit miniaturisierter Evolutions - und Synthesemaschine

Dissertation

zur Erlangung des
akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Dipl. Phys. Gregor Schlingloff

am

Institut für Theoretische Chemie und Strahlenchemie

Universität Wien

im März 1999

Danksagung

Der Aufbau der Maschine und die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden vom Juni 94 bis Juli 97 am Institut für molekulare Biotechnologie, Jena (IMB) in der Arbeitsgruppe von Prof. Schuster durchgeführt.
Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. Andreas Schober, ohne den diese Arbeit nicht durchgeführt worden wäre. Er beantragte das vom BMBF geförderte Projekt, schrieb die erforderlichen Zwischenberichte und stand stets zu konstruktiven Diskussionen bereit. Seine Fähigkeiten sowohl im Vermitteln von Kontakten als von Erledigung von Verwaltungsarbeit sind unübertrefflich.
Daß die hier beschriebene Experimente in dem Zeitraum des Projektes durchgeführt werden konnten, verdanke ich Dr. Hans Kiel, der der Abteilung Gerätetechnologie am IMB vorsteht, sowie seinen Mitarbeitern, die die Geräteadaptionen prompt ausführten.
Herrn Michael Döring von der Fa. Microdrop danke ich für die Hilfe, die er unbürokratisch (und daher teilweise unentgeltlich) beim Adaptieren der Dosiersysteme leistete.
Herr Peter Sparlinek von der Fa. Tietz Video and Imaging Processing, Gauting, die die CCD-Kamera lieferte, half stets bei Problemen mit dem OS9-Rechnersystems, sowie bei der Implementierung und Anpassung der Bildverarbeitungssoftware.
Bei den Kollegen der gesamten Abteilung molekulare Evolutionsbiologie am IMB (auch den nicht namentlich aufgeführten) möchte ich für stete Diskussionsbereitschaft danken
Frau Antje Thamm half bei der Durchführung der Experimente. Ihr unermüdlicher Einsatz und ihre Motivation ermöglichten manchmal erst die erfolgreiche Durchführung der Experimente.
Von Dr. Dirk Vetter stammt das chemische Protokoll der Peptidsynthese; er schlug Optimierungsmöglichkeiten beim Maschinellen Aufbau vor. Die biochemischen Systeme wurden von Dr. Michael Gebinoga, Dr. Andreas Schwienhorst, Dr. Frank Wirsching vorgeschlagen. Ihre Arbeit trug wesentlich zum Erfolg des Projektes bei.
Die Probenträger wurden vom Projektpartner, dem Institut für physikalische Hochtechnologie, Jena hergestellt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Köhler, der nach Abwicklung der Abteilung molekulare Evolutionsbiologie am IMB die Möglichkeit gab, ein Folgeprojekt zusammen mit der Fa. Merck KgaA, Darmstadt zu beginnen.
Last not least möchte ich dem Gründungsdirektor des IMB, Herrn Prof. Peter Schuster danken, für das ausgezeichnete und produktive Arbeitsklima, das zu seiner Zeit als Direktor am IMB herrschte. Leider konnte (aus Gründen, die in keine Danksagung passen) diese Umgebung nach Ernennung der Nachfolger nicht aufrecht erhalten werden, so daß Herr Prof. Schuster die Leitung seiner Abteilung aufgab und nach Wien auf seinen alten Lehrstuhl zurückkehrte.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und der Aufbau eines Automaten beschrieben, der sowohl (Peptid-) Synthese in miniaturisierten Maßstab parallel in bis zu 6000 Kanälen mit einem Volumen von 150 nl durchführen kann, als es auch erlaubt, evolutive Systeme (z.B. serielle-transfer Experimente) und Screening Prozesse in der dafür notwendigen Parallelisierung zu untersuchen. Die Funktionsfähigkeit des Automaten wurde anhand erster Experimente überprüft. Eine derartige Geräte-entwicklung kann in der vorgegebenen Zeit nur dann durchgeführt werden, wenn nur ganz spezielle Bausteine des Automaten Eigenentwicklungen sind und kommerziell erhältliche Geräte in das Gesamtsystem integriert werden. Alle Komponenten sind aufeinander abzustimmen, räumlich zu integrieren, steuerungstechnisch miteinander zu verbinden und von einem Computer aus manipulierbar zu machen.

Um noch kleineren Probenmengen erreichen zu können und den Nachweis der gewünschten Eigenschaften optisch sicher zu detektieren, wurde untersucht, inwieweit der Einsatz von mikrostrukturierten Linsen auf den verwendeten Probenträgern eine Verstärkung des fluorimetrischen Signals ergibt, das schließlich mit einer CCD–Kamera nachgewiesen wird. Die erste Näherung liefert in der Theorie eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment.

Die entwickelte Maschine wurde für folgende Anwendungsbeispiele eingesetzt:

(i) Peptidsynthese: Diese ließ sich erstmalig im beschriebenen Maßstab miniaturisieren, die dabei auftretenden Probleme wie z.B. Verdunstung der Substanzen konnten gelöst werden.

(ii) *In vitro*: Als *in vitro* System wurde die Verstärkung von RNA durch die 3SR (self-sustained sequence replication) in einem Siliziumwafer zum ersten Mal durchgeführt. Gleichermaßen wurde der Nachweis der möglichen biochemischen Synthese von funktionellen Proteinen durch kommerziell verfügbare Translation- und Transskriptionssysteme geführt.

(iii) HTS: Als ein weiteres Beispiel eines Assays und Testbeispiel des HTS (High Throuput Sreening) zur Wirkstoffsuche wurde *in vivo* die Blaufärbung von *E.coli* untersucht, das bei Klonierung von ß-Galactosidase den Metabolismus darstellt, und dabei quantitativ online 40000 verschiedenen Kolonien vermessen.

Summary:

In this study development and construction of a new device for massively parallel processing and analysis of small samples is described. It has been applied to two complementary fields of application: synthesis and screening.

The setup works with up to 6000 channels and a volume of 150nl per reaction vessel and is suitable to perform evolutivable experiments like serial transfer or screening.

Function and reproducibility in the performance of the machine was tested by means of examples for peptide synthesis, RNA replicatis and bacterial growth.

The machine consists of both commercial available components and self constructed modules. This system construction allows to assemble the complex machine for modules in short time and to integrate new designed devices.

All components have to be connected and to allow for complete computer control.

Further miniaturization is limited by the signal of the substances in small volumes. This problem was examined and the signal to noise ratio was improved with amplification of the fluorimetric signal, which is finally received by a CCD camera if the sample carriers are covered by micro-structured lenses. The first approximation of the theory agrees well with the experiment.

The Machine was tested for following examples of application:

(i) Peptide synthesis: For the first time peptide synthesis was miniaturized in the described scale, thereby occurring problems e.g. evaporation of the substances have been solved.

(ii) *In vitro*: As an *in vitro* system, the amplification of RNA molecules by 3SR (self-sustained sequence replication) was performed in the miniaturized scale. The proof of the possibility of biochemical synthesis of functional proteins in microstructures was led by commercial available translation and transcription systems.

(iii) HTS: As an example for an assay for the search of active substances in a HTS application, the metabolism of the blue color by E.coli in vivo, induced by ß-Galactosidase was measured quantitatively on-line in 40000 different colonies.

Inhaltsverzeichnis:

	Zusammenfassung	iii
1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	4
2.1.	DNA - RNA	4
2.2.	Theorie	5
2.2.1.	Quasispezies	5
2.2.2.	Optimierungsalgorithmen	8
2.3.	Verwendete Nachweismethoden	14
2.3.1.	Fluoreszensfarbstoffe:	14
2.3.2.	Luciferase:	15
2.3.3.	ß- Galactosidase:	16
3.	Maschineller Aufbau	17
3.1.	Komponenten der Maschine	17
3.2.	Dosierprinzipien	19
3.2.1.	Microdrops	21
3.2.2.	Autodrops	32
3.2.3.	Gesim Pumpen	32
3.2.4.	Biodot-Systeme	32
3.2.5.	Andere Dosierprinzipien (Waschstation)	33
3.3.	Mikrosystemtechnik	34
3.3.1.	Fertigungsprinzipien	40
3.3.2.	Waferlayout und Nanotiterplatten	44
3.3.3.	Wafertemperierung	47
3.3.4.	Verdunstungsproblem	48
3.4.	CCD und Bildverarbeitung	51
3.4.1.	Theorie der CCD	51
3.4.2.	Integrierte Robotik und Prozeßsteuerung	57
3.4.3.	Bildverarbeitungsalgorithmen	59

3.4.4. Experimentelle Nachweise der CCD-Empfindlichkeit 65
3.5. Optische Detektion 66
3.5.1. Theoretische Überlegung 66
3.5.2. Experimentelle Nachweise 71
4. Experimente 76
4.1. Chemische Synthese 76
4.1.1. Adaption der Mikrodosierer, Waschstation 76
4.1.2. Waferstabilität 78
4.1.3. Protokoll der chemischen Synthese 79
4.1.4. Versuche zur Assay Entwicklung 87
4.2. Experimente mit selbst-verstärkenden Systemen (*in vivo/ in vitro*) 89
4.2.1. Experimente *in vivo* 89
4.2.2. Experimente *in vitro* 94
5. Diskussion und Ausblick 106
5.1. Aufbau des Automaten 106
5.2. Screening 107
5.3. Chemische Synthese organischer Moleküle 107
5.4. *In vitro* Evolution 108
6. Anhang 110
6.1. Bei der chemischen Synthese verwendete Standardanalysemethoden 110
7. Literatur 112

Verzeichnis der Abbildungen:

2–1: evolutiver Optimierungszyklus 9
2–2: neuronales Netz 11
2–3: Serieller Transfer 13
2–4: ß-Galactosidase 16
3–1: Bild des Automaten 17
3–2: Ablaufsteuerung der Experimente 18
3–3: Skizze eines Microdrops 22
3–4: Prinzipskizze für die Tropfenbildung 23
3–5: Geschwindigkeitsprofil in der Düse 24
3–6: Vergleich der Tropfengröße 27
3–7: Tropfenbildungsvorgang 28
3–8: Geschwindigkeit der dosierten Tropfen in Abhängigkeit der Frequenz 30
3–9: Konstruktionszeichnung der entwickelten parallelen Waschstation 33
3–10: Strukturierung von Siliziumwafern 35
3–11: Belichtungsverfahren 36
3–12: Schema der verwendeten Reaktionskompartimenten 42
3–13: doppelseitige Lithographie 43
3–14: Aspektverhältnis – Diffusionszeit 45
3–15: Ansicht von vier Reaktionskammern 46
3–16: Wafer 46
3–17: Temperierkurve des Wafers 47
3–18: Verdunstung in Waferkammern 50
3–19: Prinzipieller Aufbau der verwendeten slow-scan CCD 51
3–20: prinzipielle Wirkungsweise eines CCD 53
3–21: Quantenausbeute in Abhängigkeit der Wellenlänge eines CCD 54
3–22: Dunkelsignal des CCD 55
3–23: Schema der automatischen Erkennung der Reaktionskammern. 58

3–24: Kammerdetektion des Wafers 60
3–25: Kammerdetektion: Schwellwertbildung 61
3–26: Kammerdetektion: Label-Operation 61
3–27: Kammererkennung: Distanz-Transformation 62
3–28: Kammererkennung: Skelett-Bildung 62
3–29: CCD-Empfindlichkeit 65
3–30: Strahlengangs des optischen Systems 70
3–31: Signalverstärkung mit kommerziell erhältlichen Mikrolinsen 72
3–32: Signalverstärkung mit selbst entwickelten Mikrolinsen 74
4–1: Waferstabilität 79
4–2: HPL-Chromatogramme 81
4–3: Titration der Bead - Anzahl 83
4–4: Beispielchromatogramme 84
4–5: Synthesekammern mit einsortierten Beads unter dem Mikroskop. 86
4–6: Studien zu Thrombin-Assays 88
4–7: Wachstum der Bakterien auf dem Silizium – Wafer 90
4–8: serieller Transfer 91
4–9: ß-Galactosidase: Messung des Metabolismus 94
4–10: 3SR 97
4–11: Prinzipielle Kopplung eines in vitro Translation Systems mit einem 3SR Reaktionssystem. 98
4–12: 3SR in 149 Kammern 100
4–13: 3SR: exponentielle Wachstum 100
4–14: 3SR: Online Beobachtung 101
4–15: Translation 104
4–16: Transkription-Translation: 105

1. Einleitung

In der modernen Biotechnologie, vor allem in der pharmazeutischen Industrie ist das hocheffiziente Durchmustern großer Probenzahlen zu einer Schlüsseltechnologie in der Wirkstofforschung geworden. Dabei werden zumeist eingeführte Laborroutinen, die manuell abgearbeitet werden, mit Hilfe moderner Technik automatisiert. Das bedeutet, daß Pipettierautomaten, Mikrotiterplatten und deren Handhabungssysteme bzw. Detektionssysteme in Aufbauten z.B. ähnlich denen der Automobilfertigung an „Werkstraßen" angeordnet werden. Die vorgelegten, gemischten Testsubstanzen werden dort in sogenannten „Assays" auf eine bestimmte, gewünschte Eigenschaft hin getestet und bewertet (Gallop et al.[43], Pauwels et al.[92], DeWitt[25]). Diesen Vorgang des Durchmustern großer Probenzahlen bezeichnet man als „Screening"[1].
Diese technologische Vorgehensweise ist mit folgenden Problemen behaftet:

- die eingesetzten Substanzen (Enzyme, Rezeptoren) etc. sind entweder teuer[2] oder sehr zeitaufwendig aus natürlichen Stoffen zu isolieren.
- die Substanzbibliotheken sind mittlerweile „aufgebraucht" d.h. durchgetestet und werden zu „klein"[3].
- die Anzahl aller möglichen Substanzverbindungen unterliegt der sogenannten „kombinatorischen Explosion" d.h. dem exponentiellen Anstieg aller Varianten als Funktion der Sequenzlänge[4].

Mehrere mögliche Wege aus diesem Dilemma wurden zum Teil in den siebziger und achtziger Jahren, zum Teil erst Mitte der neunziger Jahre aufgezeigt. Diese sind:

---

[1] von engl. screening gleich aussieben

[2] 10000 Proben á 20 µl PCR Lösung kosten ca. 20000.- DM

[3] Dies stellt vor allem zu Ende der 90 er Jahre ein zunehmendes Problem dar

[4] Für Oligonukleotide (4 Buchstaben-Alphabet) der Länge n=6 resultieren 4000 Substanzen, der Länge n=10 sind das schon 10^6 Substanzen für Oligopeptide (20 Buchstaben-Alphabet) der Länge n=6 resultieren $64x10^6$ Substanzen, der Länge n=10 sind das 10^{13} Substanzen.

- die evolutive Biotechnologie. Das ist die Optimierung und das Erreichen der gewünschten Substanzeigenschaften unter Ausnutzung evolutiver Prinzipien (eine Untergruppe hier ist auch das sogenannte irrationale Design).
- die Miniaturisierung (10000 Proben á 20 µl entsprechen 2000000 Proben á 0.1 µl).
- die hochintegrierte Prozeßführung zur Wirkstoffsuche unter Ausnutzung intelligenter Strategien mit dem Ziel der Reduktion an Verfahrensschritten.

Das theoretische Fundament einer evolutiven Biotechnologie wurde 1971 von M. Eigen[32] mit der Quasispeziestheorie und später dann von Peter Schuster et al.[33] und Mitarbeitern weiterentwickelt. Die in der Quasispeziestheorie aufgestellten Differentialgleichungen beschreiben die Dynamik einer Population von Informationsträgern. Sie bildet damit quantitativ einen Zusammenhang zwischen fehlerhafter Reproduktion (Mutation) und Selektion auf molekularbiologischer Ebene. Wichtige Grundlagen der Theorie molekularer Evolution sind das Konzept der Fitneßlandschaft und das des Sequenzraums.

In dem Sequenzraum werden die Mutanten einer Quasispezies unter korrekter Berücksichtigung ihrer Verwandtschaft angeordnet. Die Dimensionalität des Raumes ist dabei abhängig von der Sequenzlänge, wobei jede Sequenz genau einen Punkt im Raum belegt und der Abstand zweier Sequenzen, die sich durch eine Mutation unterscheiden, eins ist. Jeder Sequenz wird eine Fitneß zugeordnet. Durch diese Zuordnung wird die Fitneßlandschaft definiert. Erweist sich eine, in der Quasispezies vorhandene Mutante durch Veränderung der Umgebung (Veränderung des Selektionsdruckes) als vorteilhaft, so kommt es zu einer Verschiebung der Quasispezies im Sequenzraum und die Mutante wird zur neuen Mastersequenz.

Dadurch führt die Evolution automatisch zu einer Population, die der durch den gegebenen Selektionsdruck definierten Umgebung optimal angepaßt ist.

„Künstliche“ Selektion (im Gegensatz zu „natürlicher“ Selektion) stellt sich dann als die vom kompetitiven Wachstum entkoppelte, nicht selbstorganisierende Bevorzugung von Mutanten mit praktisch beliebigen Eigenschaften dar (Lindemann[75]). Wenn die erwünschte Eigenschaft selektiv ist, lassen sich diese biologisch aktiven Makromoleküle

screenen. Der Experimentator übernimmt dabei eine wichtige Funktion des Evolutionsprozesses: er bestimmt den Pfad, den die Evolution beschreitet, in dem er erfolgreiche, vorteilhafte Mutanten sequenziert und stochastisch verteilte (oder durch einen Optimierungszyklus vom Rechner vorgeschlagene) und regiospezifisch definierte Mutationen einfügt. Hierdurch lassen sich Varianten auf biologische Wirksamkeit testen, die durch natürliche Evolution z. B. im Evolutionsreaktor nicht erreicht werden können.

Da der molekularbiologische Apparat der Expression von Proteinen bekannt ist (von der DNA via Transkription zur RNA, von dort via Translation zu den Proteinen), lassen sich Evolutionsexperimente durchführen, die den Apparat der Zelle benutzen.

Zusätzlich erlauben *in vitro* Systeme durch RNA (mit 3SR oder Qß) bzw. DNA (mit PCR) Amplifikationsexperimente das evolutive Design von Molekülen in seriellen Transfer- (Eigen[31]) oder auch in Selex Experimenten (Tuerk et al.[141]). Durch Translations-Transskriptionssysteme lassen sich auch modellhaft *in vitro* intrazelluläre Phänomene studieren. Eine mögliche wichtige Anwendung solcher Systeme könnte die Expremierung für den Zellapparat toxischer Proteine (Schuster et al.[115]) sein.

Chemische Synthese von biologisch aktiven Molekülen bietet zudem die Möglichkeit, eine Fitneßlandschaft (und damit die Hamming-Abstände der Moleküle) in genau definierter Weise zu durchsuchen und somit in einem iterativen, dem evolutiven Optimierungsprozeß ähnlichen Verfahren Moleküle mit gewünschten Eigenschaften zu designen.

2. Grundlagen

2.1. DNA - RNA

Die experimentellen Systeme, welche die Natur einsetzt, um Informationen zu verschlüsseln, sind die DNA und die RNA, ein kettenförmiges, verzweigungsloses Polymer. Das Rückgrat der RNA besteht aus einer alternierenden Folge von Ribose und einer Phosphatgruppe. An jeder Ribosegruppe ist seitlich eine Base gebunden, die aus einem der Moleküle Adenin, Cytosin, Guanin oder Uracil besteht. Da diese Basen fast in beliebiger Reihenfolge aneinander gesetzt werden können, kann so Information gespeichert werden. Die Aufzählung (der Anfangsbuchstaben) der Basennamen legt die sogenannte Primärstruktur fest. Dieser Code besteht aus vier Buchstaben, jedoch lassen sich jeweils zwei nämlich Adenin und Guanin, die zu den Purinen gehören und Cytosin und Uracil, die zu den Pyridinen gehören zusammenfassen, und so als zwei Buchstabensystem beschreiben.

Das Molekül faltet sich aufgrund des flexiblen Rückgrates in eine energetisch günstige Form. Dabei können sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Purinen und Pyrimidinen ausbilden, also zwischen Adenin und Uracil sowie zwischen Guanin und Cytosin. Gegenüberliegende komplementäre Sequenzen eines Moleküls können also doppelsträngige Regionen mit dazwischenliegenden einzelsträngigen Schleifen bilden. Die Verteilung dieser Regionen bildet die sogenannte Sekundärstruktur. Das Molekül nimmt die Sekundärstrukturen an, die die freie Energie minimieren. Die so gefaltete Struktur wird auch als Tertiärstruktur bezeichnet. Die Funktion des Moleküls, also die Wechselwirkung mit Enzymen und Proteinen wird durch die Sekundär und Tertiärstruktur bestimmt.

DNA ist prinzipiell wie RNA aufgebaut, nur unterscheiden sich die Position der Zuckermoleküle. Außerdem tritt die Base Thymin an die Stelle des Uracils. Die DNA bildet aufgrund der Länge der in der Natur vorkommenden Stränge die Doppelhelix aus.

Informationsspeicherung übernimmt in Lebewesen normalerweise die DNA. Durch Transkription wird die DNA in RNA übersetzt, RNA dient der Informationsübermittlung und – Übersetzung in die Aminosäuresequenzen der Proteine (Translation). Allerdings benutzen einige Viren RNA als Träger ihrer Erbinformation (Stryer[132]).

2.2. Theorie

2.2.1. Quasispezies

Der Genotyp bestimmt den Phänotyp eines Organismus, bzw. auf molekularer Ebene die Sequenz die Struktur und damit letztlich seine Funktion[5]. Die Anzahl der möglichen Sequenzen unterliegt der kombinatorischen Explosion (Kap.1), deshalb kann sich die Variabilität des komplexen molekularbiologischen Apparates nicht durch einfaches Durchprobieren aller möglichen Varianten ergeben haben.

Auf Basis der Reaktionskinetik entwickelten deshalb Eigen und Mitarbeiter (Eigen[32], Eigen et al.[33]) eine Theorie, die mathematisch exakt die Selektion und Adaption von Makromolekülen an Umgebungsbedingungen beschreibt.

Die Evolution von Biomolekülen läßt sich in einem Gedankenexperiment wie folgt darstellen: In einem Reaktionsgefäß, dem Evolutionsreaktor werden energiereiche Monomere, selbstreplizierende Moleküle, das replizierende Enzym, die Replikase sowie die entsprechende Pufferlösung eingebracht. Innerhalb des Reaktors gebe es n Sequenzspezies, jede Spezies habe die Konzentration x_i. Die Dynamik des Systems wird in der Theorie dann durch drei Prozesse bestimmt:

1. Neue Systeme werden durch Kopieren bereits bestehender Information einer Sequenz gebildet. Diese Replikation der Moleküle (RNA) kann fehlerbehaftet sein.
2. Es gibt einen Abbauprozeß von existierenden Sequenzen.
3. Die Anzahl der Sequenzen wird durch einen regulierbaren Fluß konstant gehalten.

[5] die mit minimaler freier Energie angenommene „Faltung“ bestimmt meistens die Struktur des Moleküls und damit die Wirkung

Die zeitliche Änderung der Konzentration einer Spezies i läßt sich dann durch

$$dx_i / dt = (A_i Q_i - D_i - \phi)x_i(t) + \sum_{j \neq i} w_{ij} x_j(t); \qquad i, j = 1...n; \quad i \neq j$$

mit

$$\sum_i^n x_i = constant$$

darstellen. Dabei sind:

x_i	: Konzentration der Spezies i
$A_i Q_i x_i$	: Beitrag durch exaktes Kopieren der Sequenz
$D_i x_i$	: Verlust durch Abbau
ϕx_i	: Verlust durch Ausfluß
$w_{ij} x_i$	: Beitrag von Spezies j durch fehlerhaftes Kopieren
n	: Anzahl der Sequenzen.

Diese Formel enthält drei Eigenschaften des Lebendigen: Stoffwechsel ($A_i Q_i x_i$ und $D_i x_i$), Variabilität (Q_{ij}) und Reproduktion (Ratengleichung).

Durch geeignete Transformationen läßt sich das System auf eine Eigenwertgleichung der Form

$$dq/dt = \Omega q$$

bringen undexakt gelöst werden (Jones et al.[62], Thompson et al.[137]).

Die charakteristische Gleichung lautet:

$$\text{Det } (\Omega - \lambda I) = 0.$$

Die Lösung der charakteristischen Gleichung besteht aus den n Eigenwerten λ_i, sowie n Normalmoden υ_i, die sich als Linearkombination der Konzentrationen der Sequenzen darstellen lassen.

Man kann zeigen, daß für $\lim_{t \to \infty}$ der Eigenwert $\lambda_{max} = \max(\lambda_i)$ mit $i \in \{1,...,n\}$ und der zugehörigen Normalmode selektiert wird. Da sie eine Linearkombination aller Konzentrationen ist, ergibt sich im $\lim_{t \to \infty}$ eine Sequenzverteilung, die sich um die

sogenannte Mastersequenz konzentriert, die Mastersequenz wird auch Wildtyp genannt. Aus diesem Grund wird eine Verteilung um eine Sequenz selektiert, die Quasispezies.
Der Sequenzraum (der Dimension N) wird von allen Sequenzen mit a verschiedenen Elementareinheiten, die eine konstanten Länge N haben, definiert. Für a=2 ist der Hamming – Abstand die Anzahl aller Positionen, bei denen sich zwei Sequenzen unterscheiden.
Damit ist die Selektion eine Lokalisation der Quasispezies im Sequenzraum. Evolution kann als Serie solcher Stabilisationen (bzw. Lokalisation) bzw. De-Stabilisationen von Quasispeziesverteilungen im Sequenzraum angesehen werden.

Da die Konzentration des Wildtyps größer sein muß als Null, ergibt sich eine Fehlerschwelle F_{krit} für die Kopiergenauigkeit:

$$F_{krit} \leq \frac{\ln \sigma}{n}$$

mit der Sequenzlänge n und

$$\sigma = \frac{A_m}{\overline{E}_{k \neq m} + D_m}$$

mit

$$\overline{E}_{k \neq m} = \frac{\sum_{k \neq m} E_k \overline{x_k}}{\sum_{k \neq m} \overline{x_k}}.$$

$\overline{x_k}$ ist die mittlere stabile Konzentration der Spezies k, $E_k = A_k - D_k$ die Überschußproduktivität.
Bei zu großer Fehlerwahrscheinlichkeit ($>F_{krit}$) tritt Verlust von Information des Systems ein, die Quasispezies ist delokalisiert. D.h. falls die Speziesanzahl endlich ist, driftet das Sequenzsystem ziellos durch den Sequenzraum, anderenfalls (Speziesanzahl unendlich) haben alle Sequenzen dieselbe Konzentration.
Falls man jedoch stabile Quasispezies betrachtet, wird das Konzept der neutralen Mutation für die Funktionalitätserhaltung von Biopolymeren wichtig. Neutral mutierte

Wildtypen haben gegenüber der nicht mutierten Sequenz weder Selektions-vorteile noch -nachteile. Die Sequenzinformation eines Biopolymers, die Primärstruktur, bestimmt eine räumliche Struktur bei der RNA und Proteinen. Diese sogenannte Tertiärstruktur ist für die biologische Funktionalität der Biopolymere verantwortlich. Da kleine Änderungen der Primärstruktur normalerweise keine Änderung der Tertiärstruktur bewirkt, tragen also neutrale Mutationen zur Robustheit auf funktionaler Ebene bei (Schuster[114], Schuster et al.[115])

2.2.2. Optimierungsalgorithmen

Alle Optimierungsverfahren verfolgen eine Strategie mit abwechselnden Bewertungs – und Variationsschritten, um einen an sich unbekannten Suchraum abzutasten. Gerade bei evolutiven Verfahren wird dabei eine Testpopulation von genetisch diversen Molekülen mit definiertem Phänotyp, der der Funktion bzw. der Fitneß dieser Variante (also ein Punkt im Suchraum) entspricht, auf dieser Landschaft „entwickelt". Besser angepaßte Varianten haben eine höhere Fitneß und damit unabhängig von den einzelnen Regeln eine höhere Wahrscheinlichkeit sich fortzupflanzen, als Varianten mit niedriger Fitneß (siehe Bild 2-1).

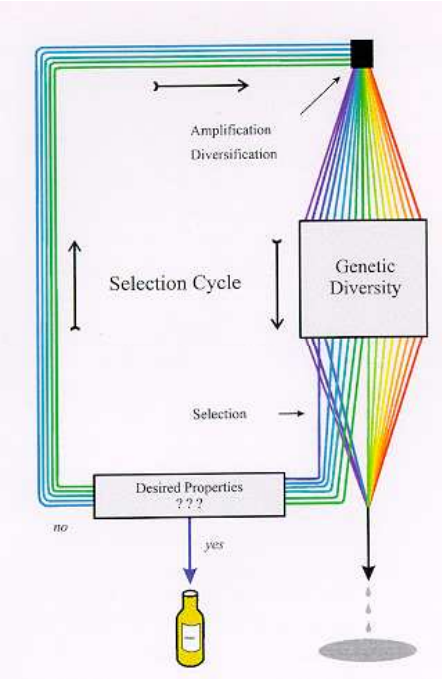


Abbildung 2–1: Evolutiver Optimierungszyklus (aus Schuster[113])

In einer begleitenden Dissertation (Tomandl[139]) wurden Strategien entwickelt und in einem Computerprogramm zusammengefaßt, anhand derer durch bekannte Varianten geeignete optimierte Varianten vorgeschlagen werden sollen, die auf dem Automaten synthetisiert werden können.

Die Arbeit basiert auf einem von Marcel Thürk und Andreas Schober in Schober et al.[107] publizierten Optimierungsalgorithmus. Dieser Algorithmus versucht, auf Fitneßlandschaften, deren Fitneßfunktion nicht explizit bekannt sein müssen, zu optimieren. Einzige Voraussetzung ist dabei eine eindeutige Sequenz - Fitneßzuordnung und die Möglichkeit der Fitneß eindeutig einen Zahlenwert zuordnen. (Für die praktische Anwendung z.B. könnte dies z.B. ein eindeutig physico-chemisch zu messender Parameter sein z.B. die Bindungskonstante eines Moleküls).

Die Grundidee ist, mit Hilfe der statistischen Eigenschaften der bereits abgetasteten Fitneßwerte neue, möglichst erfolgversprechende Sequenzen für die nächste Iterationsrunde vorzuschlagen, deren Fitneß dann (z.B. experimentell) bestimmt werden

kann. Zur Analyse der statistischen Eigenschaften stehen u.a. neuronale Netze als Analysetools zur Verfügung.
Unterschiede zu den üblichen dynamischen Verhalten von genetischen Algorithmen bestehen darin, daß bei letzteren vor allem die mittlere Fitneß einer Population optimiert wird, während bei dem beschriebenen Verfahren die „globalen“ Optima besonders selektiert und im Vergleich zum genetischen Algorithmus „schneller“ gefunden werden während die mittlere Fitneß gegenüber dem genetischen Algorithmen zurückbleibt.

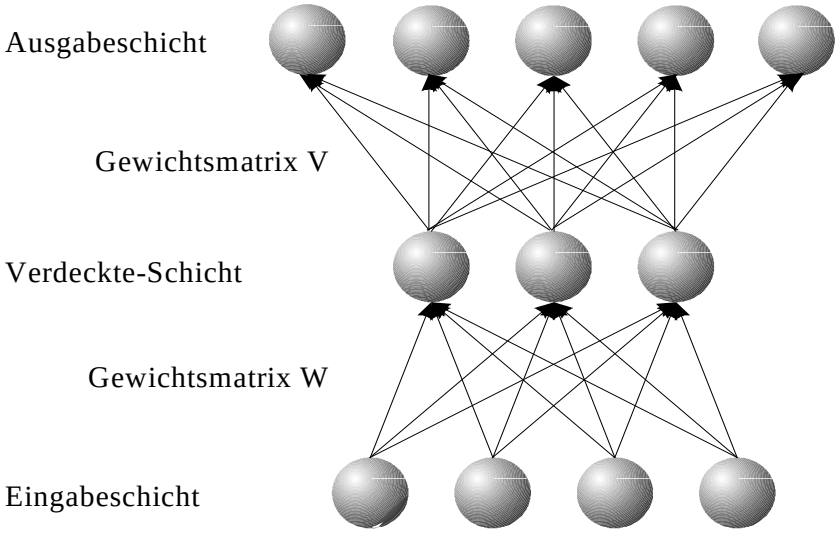
2.2.2.1. Neuronale Netze

Elektronische Netzwerke aus künstlichen Neuronen können dazu gebracht werden, komplizierte Informationen zu repräsentieren. Die Motivation zur Untersuchung solcher Netze beruhte auf dem Wunsch, die Arbeitsweise biologischer Gehirne zu verstehen und einer mathematischen Bearbeitung zugänglich zu machen. Inzwischen sind künstliche Neuronale Netze zu eigenständigen statistischen Verfahren weiterentwickelt worden, die nicht mehr biologisch motiviert werden können.
Künstliche Neuronale Netze bestehen typischerweise aus untereinander verbundenen Einheiten, deren jede ein natürlichen Neuron vertritt. In Analogie zu einem gewöhnlichen Netz spricht man von Knoten. Jeder Verbindung zwischen zwei Knoten ist eine Zahl, das sogenannte Gewicht zugeordnet.

Die Struktur eines Netzes wird also durch die Matrix $W = (w_{ij})$ der Verbindungen aller Neuronen beschrieben. *W* steht für die gerichtete Verbindung von Neuron i zum Neuron j mit dem Gewicht w_{ij}. Biologisch interpretiert bedeutet ein negatives Gewicht Hemmung, ein positives Gewicht Anregung des nachfolgenden Neurons j.
In dem gängigsten Typ neuronaler Netze (feedforward, bzw. Backpropagation-Netze) sind die Knoten in drei Schichten angeordnet:

Eine Schicht aus Eingabeknoten ist mit einer Schicht interner Koten verbunden und diese wiederum mit einer Schicht von Ausgabeknoten. Lernen (das Netz zu trainieren) heißt nun die Gewichte so einzustellen, daß der Fehler zwischen Ausgabe und Eingabe minimal wird. Zu diesem Zweck muß das Netzwerk für jedes Gewicht berechnen, wie sich diese Abweichung ändert, wenn das Gewicht um einen kleinen Betrag verändert wird.

Die Verbindungen der in der Praxis eingesetzten Netztypen verlaufen in Richtung von der Eingabe- zur Ausgabeschicht. In der Gewichtsmatrix (w_{ij}) sind daher alle Gewichte mit $i \leq j$ gleich Null.



SCHEMA EINES NEURONALEN-NETZES

Abbildung 2–2: Neuronales Netz: Die typische Architektur eines feedforward-Netzes ist dargestellt. Das Netz hat eine Eingabeschicht, eine verdeckte Schicht ("hidden layer") und eine Ausgabeschicht.

Das Backpropagation - Trainingsverfahren ist mit seinen Varianten das am häufigsten eingesetzte Trainingsverfahren für neuronale feedforward-Netze.

Backpropagation ist ein Gradientenabstiegsverfahren, d.h. Gewichtsänderungen finden in der negativen Richtung des Gradienten der Fehlerfunktion statt:

$$\Delta W = -\eta \nabla E(W)$$

η ist ein „kleiner“ Wert ($0 < \eta << 1$)und wird als Lernrate bezeichnet.
Man muß eine Fehlerfunktion wie z.B. die quadratische Abweichung zwischen Ist- und Sollwert definieren. Zur Berechnung des Istwertes muß der Ausgabewert des Netzes bestimmt werden, dazu muß die Aktivierungsfunktion der Neuronen, wie die logistische Funktion bekannt sein. Unter Anwendung der Kettenregel kann aus obiger Gleichung die Korrekturfunktion Δw_{ij} abgeleitet werden.

2.2.2.2. Serielle - Transfer – Experimente

Der serielle Transfer ist ein Verfahren zur Optimierung von Molekülen, wobei auf schnelle Vermehrung in einem gegebenen Milieu selektiert wird. Aus einer gegebenen Verteilung von Molekülen wird ein definierter Teil in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und dort unter einem vorgegebenen Selektionsdruck vermehrt. Dabei wird davon ausgegangen, daß sich die an diesen Selektionsdruck am besten angepaßten Varianten am schnellsten vermehren, diese liegen im Reaktionsgefäß am häufigsten vor (Spiegelman[125]).Dieser Prozeß wird dann iteriert (siehe Bild2-3).
Der serielle Transfer eignet sich daher besonders zur Implementation in einem automatisierbarem Prozeß (Strunk[131], Oehlenschläger[88]). Hierbei werden RNA Populationen z.B. mit 3SR oder Qß Systemen auf verschiedene Selektionsdrücke hin optimiert. Eine Verteilung um den Wildtyp wird in ein neues Reaktionsgefäß übergeimpft; man erhält so nach 50-70 fachem Transfer eine auf den Selektionsdruck hin optimierte Variante.
Der Experimentator kann mit diesem Verfahren Makromoleküle optimieren, ohne die Sequenz zu kennen, für Analysezwecke muß er jedoch die optimierte Variante sequenzieren.

Bei einer Vielkanal seriellen Transfermaschine können sowohl eng verwandte wie auch Varianten mit großen Hamming-Abständen gleichzeitig getestet werden. So läßt sich Information über den Suchraum gewinnen, in dem zum Beispiel mit unten beschriebenen Optimierungsalgorithmen gezielt synthetisierte Varianten eingeführt werden können.

Auf Grund des notwendigen hohen Materialeinsatzes (Enzymen) in parallelen makroskopischen Maschinen (Schober[103]) ergibt sich eine Miniaturisierung zwingend. Amplifikationsexperimente mit selbstreplizierenden Systemen *in vitro* und *in vivo* wurden auf der entwickelten Maschine durchgeführt (siehe Kap. 4.2.1.2 und 4.2.2.1). Solche Systeme sind besonders geeignet für gekoppelte *in vitro* Systeme (Gebinoga et al.[45]).

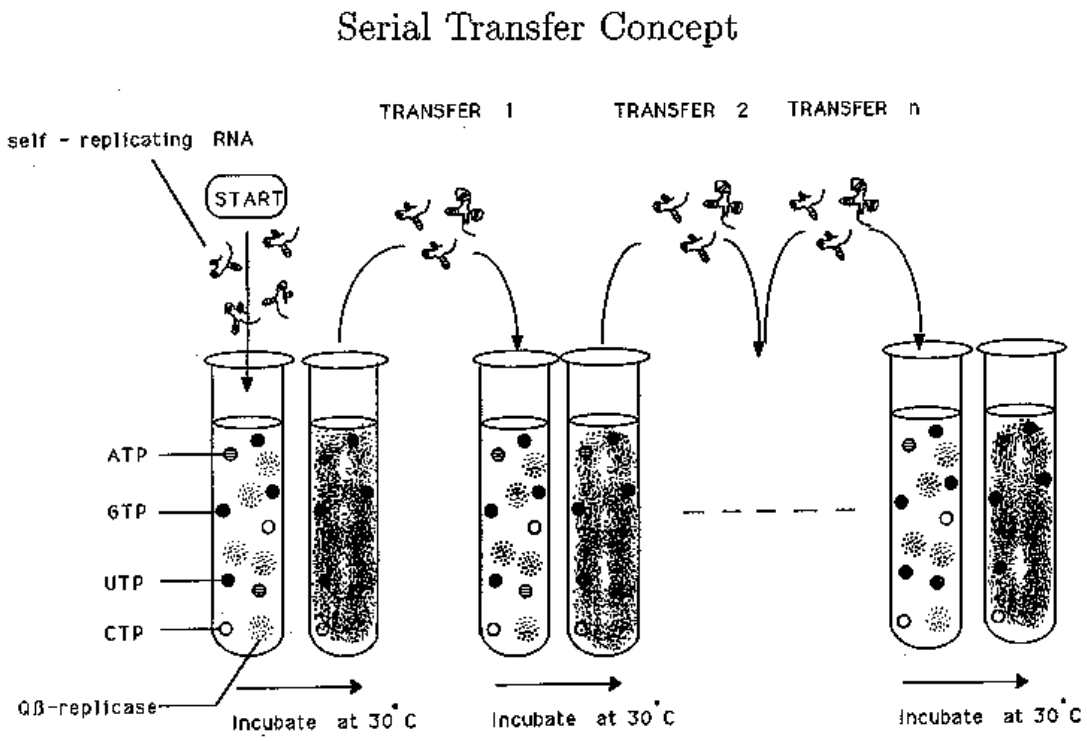


Abbildung2–3: Serieller Transfer (aus Schuster[113])

2.3. Verwendete Nachweismethoden

Um Wachstumskinetiken von selbstreplizierenden Systemen *in vitro* wie zum Beispiel von RNA zu bestimmen, braucht man eine geeignete Nachweismethode. Die zeitlich aufgelöste Messungen der Konzentration muß dabei bestimmt werden, ohne das Wachstum selbst zu beeinträchtigen oder Selektionsbedingungen zu ändern (Bauer[7])

2.3.1. Fluoreszensfarbstoffe:

Dazu kann man verschiedene Farbstoffe benutzen, die in die RNA eingelagert werden und dann durch Anregung mit einer Lichtquelle (z.B. einem Laser) zur Emission von Fluorezenzlicht gebracht werden. (Löber[77]).

Diese Fluoreszenz - Farbstoffe binden durch elektrostatische Kräfte an die Nukleinsäuren oder sind aufgrund ihrer Molekülstruktur in der Lage, zwischen Basenpaare zu interkalieren (Meyer-Almes et al.[82]). Nach der Assoziation verändern sich durch Wechselwirkungen mit den Basen die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe, so daß sich eine Bindung an Nukleinsäuren i. a. in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, der Lebensdauer des angeregten Zustandes oder der Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge äußert.

Als Beispiel eines aromatischen Fluoreszenzfarbstoffes sei Ethidiumbromid genannt (EtBr). EtBr läßt sich im UV oder grünen Spektrum anregen und fluoresziert etwa bei 600nm im orangen Bereich. In Gegenwart von RNA wird die Fluoreszenzausbeute um das 25-fache verstärkt (Le Pecq[72])

Ein anderes Beispiel ist Fluorescein, eine organische Substanz, die im Bereich des sichtbaren Lichts fluoresziert (Erregerwellenlänge 490 nm, Fluoreszenzwellenlänge 515 nm).

2.3.2. Luciferase:

Ein anderer Nachweis, der hier verwendet wurde, besteht in der Verwendung des Luciferase- Gens der American firefly (*Photinus pyralis*) als Reporter-Gen. Luciferase hat dabei den Vorteil der hohen Sensitivität. Die Leuchterscheinung, die von Luciferase katalysiert wird hat die höchste Quantenausbeute der heute bekannten Leuchtreaktionen. Firefly Luciferase ist ein monomeres Protein, das direkt nach der Translation zur Vermessung verwendet werden kann. Die Luciferase wurde in Bakterien, Pflanzen und Tierzellen expremiert. Das Assay, das verwendet wird, basiert auf einem über Minuten stabilen Level der Lichtstärke. Die Leuchterscheinung entsteht dabei nach folgender Formel:

$$\text{ATP} + \text{D-luciferin} + O_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} \text{oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + h\nu$$

2.3.3. ß- Galactosidase:

Als Nachweismethode *in vivo* wurde der in ein Zellsystem (*E.-coli*) eingeführte Lac-Promotor verwendet. Er induziert eine Blaufärbung mit Hilfe der ß-Galactosidase.
Hierbei wirkt die ß-Galactosidase, eines der im Test induzierten Genprodukte, gleichzeitig als hydrolytisches Enzym. Deshalb können mit Hilfe nicht induzierender Substratanaloga induzierte und nicht induzierte Zustände unterschieden werden. Durch die Einwirkung von ß-Galactosidase wird 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid (X-Gal) in das entsprechende Indoxylderivat überführt, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'dichlorindigo oxidiert(Winnaker[145]).

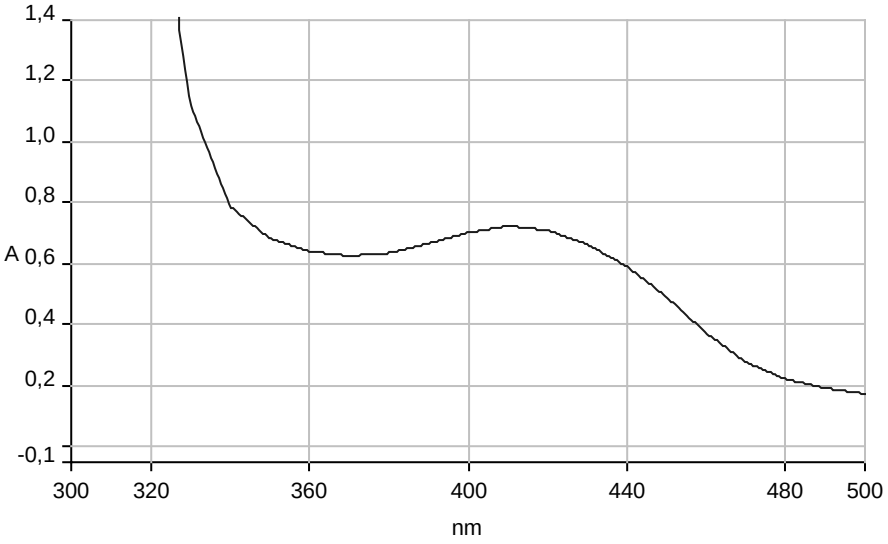


Abbildung2–4: ß-Galactosidase: Absorption von Licht durch mit ß-Galactosidase oxidierten X-Gal Derivates in Abhängigkeit der Frequenz. Man erkennt die deutlich erhöhte Absorption bei 420 nm; dies ruft die blaue Färbung der Bakterien hervor.

3. Maschineller Aufbau

3.1. Komponenten der Maschine

Der aufgebaute Automat besteht aus einer Kombination von gekauften Komponenten und selbst entwickelten Geräten, die zu einem Gesamtsystem integriert wurden.

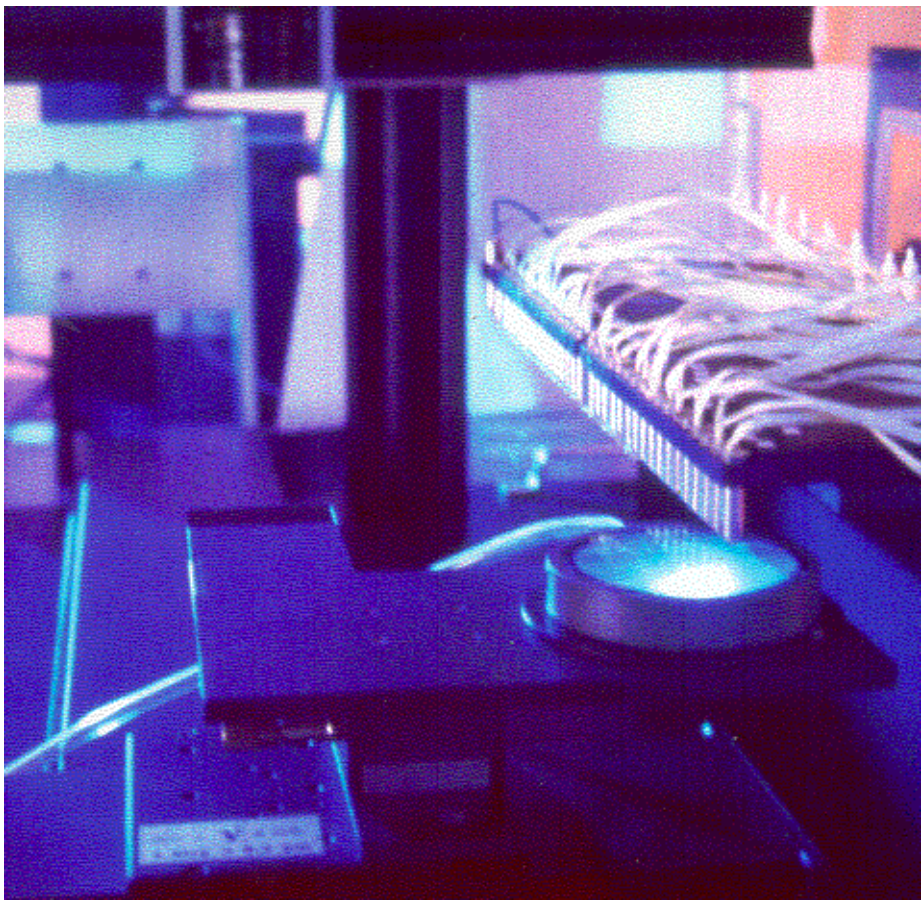


Abbildung3–1: Bild einer frühen Version des Automaten: Man erkennt die Dosiereinheiten (40 Stück) unter denen der Wafer verfahren wird Im Hintergrund sieht man die CCD- Kamera an dem horizontalen Profil.

Die einzelnen Komponenten sind:

- Bildverarbeitung und Rechner
- CCD-Kamera
- Beleuchtungsstationen (Ar-Ionen-Laser, Bogenlampe, Glühlampe)

- Verschiebeeinheiten
- Probenkammern (Wafer) und Probenkammerhalter
- Temperiereinheiten
- Dosiereinheiten, Waschstation
- Selektionsmodul

Um auf der aufgebauten Maschine die in Kap. 2.1.2 beschriebenen Verfahren durchführen zu können, wurde die in Bild 3-2 gezeigte computergestützte Steuerung der Experimente implementiert.

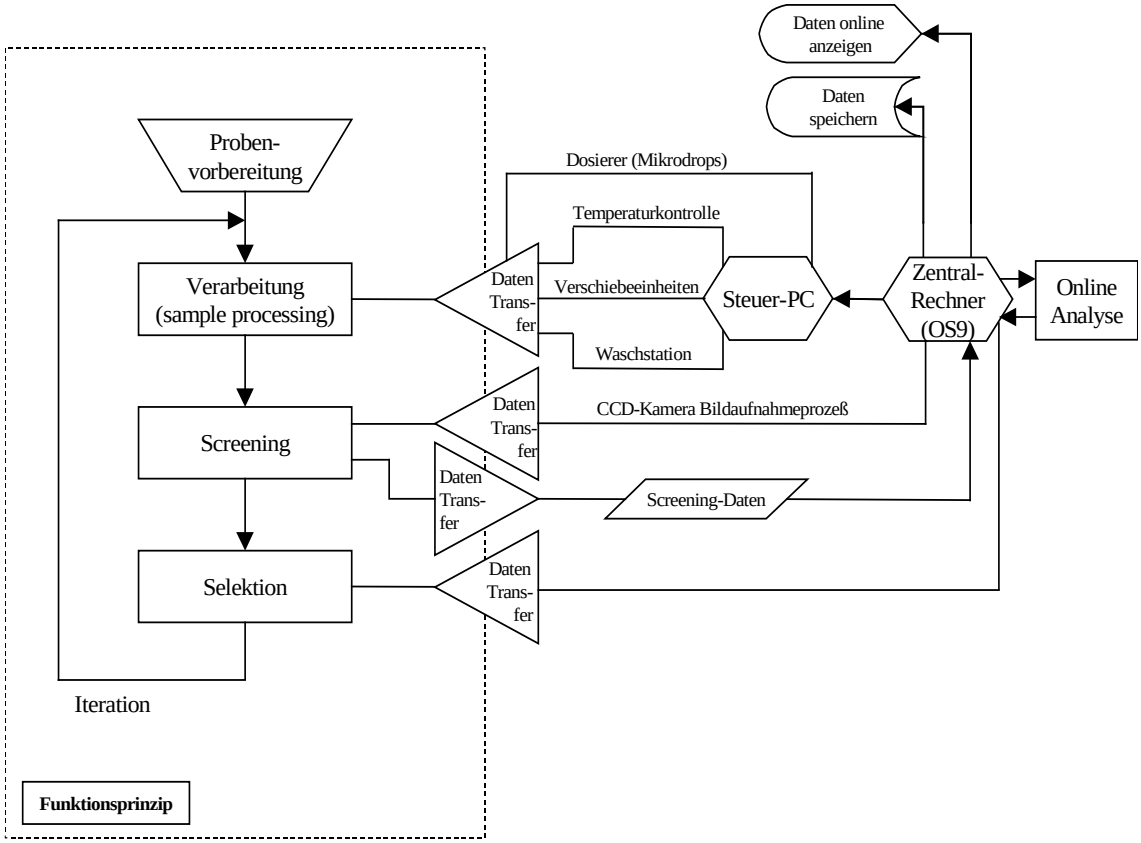


Abbildung3–2: Ablaufsteuerung der Experimente: Auf der rechten Seite ist die Verfahrensweise dargestellt, die Probenvorbereitung umfaßt das Befüllen und Einstellen der Mikrodosierer, sowie das Ausrichten der des Wafers (bzw. das Erkennen der einzelnen Probenkammern (siehe Kap 3.4.3). Die linke Seite stellt die dazugehörigen Datenströme und deren Verarbeitung dar.

3.2. Dosierprinzipien

Um im aufgebauten Automaten mit (bio-) chemischen Reaktionen experimentieren zu können, müssen Flüssigkeitsmengen im Volumen der Probenkammern (ca. 100 nl, siehe Kap 3.3.2) dosiert werden. Dabei haben die Flüssigkeiten unterschiedliche Viskosität, die im Bereich von 0,5 m Pa s (z.B. Methanol) über 1 m Pa s (wäßrige Lösungen) bis zu 100 m Pa s (Öl) liegen.

Herkömmliche Dosiersysteme können bei diesen Anforderungen nicht ausreichend genau pipettieren. Diese eingeführten Systeme arbeiten überwiegend nach dem Prinzip der Kolbenpumpe, wobei ein Kolben Flüssigkeit aus einem Zylinder verdrängt. Über eine Dosierspitze wird die Flüssigkeit ausgestoßen, bis der Tropfen aufgrund der Schwerkraft abreißt. Dabei ergibt sich das dosierte Volumen V aus dem Gleichgewicht zwischen der Schwerkraft g, die den Tropfen nach unten zieht, und den Haftkräften, die den Tropfen an der Dosierspitze festhalten. Erst wenn das Gewicht überwiegt, fällt der Tropfen ab. Die Haftkräfte resultieren aus der Grenzflächenspannung zwischen der Flüssigkeit, dem Dosierspitzenmaterial und der Luft. Um nun das Flüssigkeitsvolumen zu verkleinern müssen die Haftkräfte minimiert werden. Das kann man durch eine Verkleinerung der Dosierspitze erreichen. Aber auch damit ist schnell eine Grenze erreicht, da bei Verkleinerung des Tropfenradius r das Gewicht schneller (proportional r^{-3}) abnimmt als die Haftkräfte (proportional r^{-1}). Ein Zahlenbeispiel: Bei einer Flüssigkeit mit einer Oberflächenspannung von rd. 50 mN/m ergibt sich bei einem Dosierspitzen-außendurchmesser von nur 100 µm und einem entsprechend kleineren Innen-durchmesser ein Abtropfvolumen von rd. 30 Nanoliter. Das entspricht einer Kugel mit einem Durchmesser von etwa 400 µm. Solche extrem feinen Düsen sind mechanisch sehr empfindlich und verstopfen sehr leicht.

Will man nun kleinere Mengen eines Reagenz in die Kammern einbringen, so arbeitet man häufig nach einer anderen Methode, wobei man die Dosierspitze mit dem Objekt, das die Flüssigkeit aufnehmen soll, in Berührung bringt, bevor sie von selbst abtropft.

Dabei haftet die Flüssigkeit auf der Oberfläche und durch Entfernen der Dosierspitze reißt das Volumen auseinander. Damit ist es möglich, noch kleinere Materialmengen zu übertragen. Allerdings ergeben sich hier andere Probleme. Zum einen muß die Dosierspitze in einem sehr genauen Abstand zum Objekt positioniert werden, zum anderen muß aber auch der Kolbenhub sehr genau überwacht werden. Dies läßt sich z.B. durch einen rotierenden Kolben zumindest zum Vermeiden der Haftreibung lösen. Diese als Kontaktverfahren bezeichnete Methode ist allerdings in hohem Maße von dem Benetzungsverhalten der Flüssigkeit abhängig. Diese sowohl an der Dosier-, bzw. Pipettenspitze als auch an der Oberfläche, welche die Flüssigkeit aufnimmt (Fläche oder Kammer) schwer zu kontrollierenden Eigenschaften führen zu großen Ungenauigkeiten.

Pipettiersysteme mit klassischer Pipettiertechnik (Kolbenpumpe und Spitze oder Spitzenarray) wurden daher nur dazu verwendet, um mit Syntheseperlen befüllten Waferkammern mit demselben Reagenz zu waschen. Dabei kam es nicht auf eine Genauigkeit bei der Abgabe der Menge der Substanz an (näheres dazu siehe 3.2.5).

Um kleinste Mengen mit hoher Genauigkeit dosieren zu können, muß man daher unabhängig werden von den Haftkräften der Flüssigkeit an der Dosierspitze und den Benetzungseigenschaften des Substrats.
Dazu wurden im vorliegenden Versuchsaufbau piezoelektrische Dosiersysteme für adressiertes Pipettieren verwendet, das heißt für den genauen Eintrag von bestimmten vorgelegten Substanzen in genau definierte Probenträgerkammern.

3.2.1. Microdrops

Ein Microdrop arbeitet nach der aus der Drucktechnik bekannten Tintenstrahltechnik. Dabei wird eine inkompressibele Flüssigkeit (beim Drucker ist das die Tinte) in einer Düse, die vollständig gefüllt sein muß, zum schwingen angeregt. An diesem Kapillarsystem ist ein piezoelektrisches Element angebracht, das die Geschwindigkeitsverteilung in der Düsenspitze induziert. Wird an die Elektroden der Piezokeramik eine Spannung angelegt, so deformiert sich das Element, wodurch in der Flüssigkeit ein sehr schneller Druckanstieg erzeugt wird. Dieser Druckanstieg pflanzt sich mit Schallgeschwindigkeit durch die Flüssigkeit fort zur Düse, wo die Druckwelle in eine Bewegung der Flüssigkeit transformiert wird. Ein Flüssigkeitsjet verläßt mit sehr hoher Beschleunigung (typischerweise 100000g) die Düse. Die Beschleunigung dauert aber nur sehr kurz (wenige µs), da aufgrund der Inkompressibilität der Flüssigkeit der Druck schnell wieder abnimmt. Die Bewegungsabläufe sind so schnell, daß die Oberfläche um die Düse herum kaum benetzt wird. Dadurch ist man unabhängig von den oben beschriebenen Haftkräften. Ein kleines Flüssigkeitsvolumen schnürt sich ab, formt sich zum Tropfen und fliegt frei durch die Luft davon. Der Dosiervorgang ist unabhängig von den Eigenschaften des Substrats, da erst der frei fliegende Tropfen das Substrat trifft. Durch Kapillarkräfte wird die abgegebene Flüssigkeit aus einem Vorratsbehälter ersetzt.

Die Ausbildung eines Tropfens hängt von der Viskosität, der Oberflächenspannung und der Geschwindigkeitsverteilung der zu dosierenden Flüssigkeit in der Düse ab. Dabei kann die tatsächliche Tropfenform nur näherungsweise angegeben werden. Hier wird eine sehr vereinfachende Theorie dargestellt, die aber den Radius und die Geschwindigkeit des dosierten Tropfens einigermaßen genau vorhersagt. Dabei wird auf nähere Details des Einflusses der Düse nicht eingegangen.

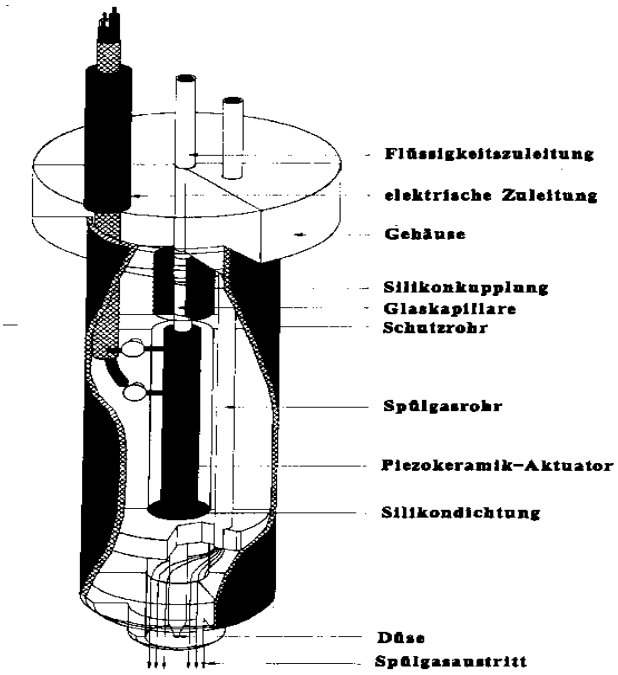


Abbildung3–3: Skizze eines Microdrops: Für die aufgebaute Maschine wurden die Systeme mit einem Spülsystem ausgestattet, durch das die gesättigte Atmosphäre eines Schutzgases geleitet werden kann, um Lösungsmittel an den Düsen vorbei zu leiten und damit die Verstopfung der Düsen aufgrund von Ausfällreaktionen zu verhindern oder wenigstens zu „kontrollieren“.

Folgende vereinfachende Eigenschaften werden vorausgesetzt:

- Der Einfluß der Viskosität ist zu vernachlässigen,
- Die Ausbildung der Tröpfchen bestimmt sich im wesentlichen vom Verhältnis der Energie, die von der Düse nach außen transportiert wird, zur Energie, die gebraucht wird, die Oberfläche des Tröpfchens zu formen. Die Geschwindigkeit des Tröpfchens ist dann der überschüssigen Energie proportional.
- Der Lufteinfluß wird vernachlässigt. Die Kraft, die auf das Tröpfchen wirkt, wird durch $F = \pi R_t^2 \frac{1}{2} \rho v_t^2 f$ beschrieben, wobei der Reibungsfaktor f von der Reynoldszahl abhängt. Der Einfluß von Reibung kann vernachlässigt werden.

- Tritt die Flüssigkeit aus der Düse, wird sie anfangs in einen „Jet“ geformt (siehe Skizze); es werden keine langen Jets geformt.

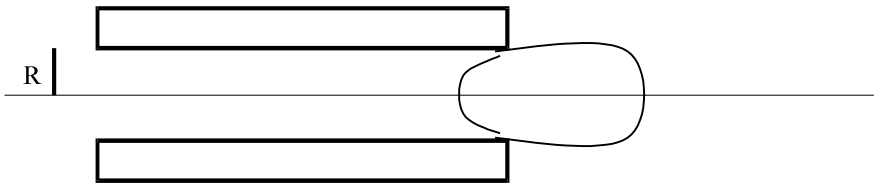


Abbildung3–4: Prinzipskizze für die Tropfenbildung: Darstellung der Düse mit Radius R, die bei der Theorie der Tropfenbildung verwendet werden. Die Grenzfläche der Flüssigkeit ist schematisch zu zwei Zeiten angedeutet.

Bei $t=t_1$ werde die Geschwindigkeit der Flüssigkeit in der Düsenspitze positiv.
Für $t>t_1$ wird ein bestimmter Betrag an Flüssigkeit und kinetischer Energie durch die Oberfläche der Düse transferiert.
Das Volumen bestimmt sich dann zu:

$$V(t) = \pi R^2 \int_{t_1}^{t} v_z \cdot dt \qquad (1)$$

Die kinetische Energie ist durch:

$$T(t) = \frac{1}{2} \rho \pi R^2 \int_{t_1}^{t} v_z^{\,3} \cdot dt \qquad (2)$$

gegeben, v_z ist die Geschwindigkeit der Flüssigkeit in der Düse.
Dann ist anfangs die Vergrößerung der Oberfläche der Flüssigkeit durch:

$$O(t) = 2\pi R \int_{t_1}^{t} v_z \cdot dt \qquad (3)$$

gegeben.
Die kinetische Energie, die durch die Oberfläche der Düse transferiert wird, wird zunächst benötigt, um die Oberflächenenergie $\sigma * O(t)$ aufzubauen, wobei σ die Oberflächenspannung bedeutet.

Anfangs ist dieser Ausdruck negativ, wie aus:

$$T - \sigma \mathrm{O} = \frac{1}{2}\rho\pi \cdot R^2 \int_{t_1}^{t} \mathrm{v_z} \cdot \left(\mathrm{v_z} - \frac{4\sigma}{\rho \cdot \mathrm{R}} \right) \cdot dt \qquad (4)$$

zu ersehen ist.

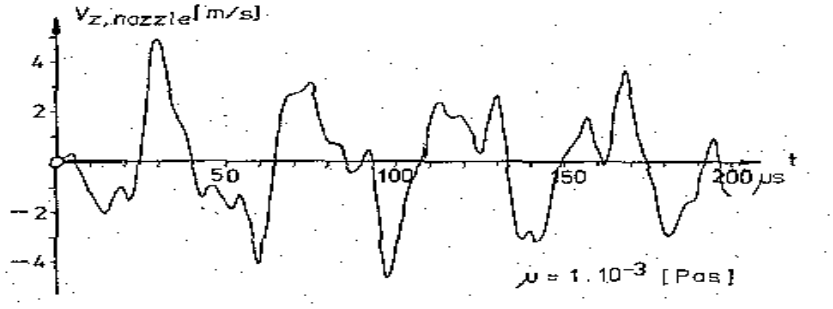


Abbildung3–5: Geschwindigkeitsprofil in der Düse: Typischer Geschwindigkeitsverlauf der Flüssigkeit bei angelegter Rechteckspannung an das Piezoelement in der Düsenspitze (Döring[28])

Wenn die Geschwindigkeit der Flüssigkeit in der Düse ein gewisses Minimum, das durch $\mathrm{v_{z,min}} = 2 \cdot \sqrt{\frac{\sigma}{\rho \cdot \mathrm{R}}}$ definiert wird, überschreitet, wird die rechte Seite von obiger Gleichung positiv. Bei Annahme, daß bei einer gewissen Zeit t_2 folgende Situation auftritt:

$$\frac{1}{2}\rho \cdot V(t_2) \cdot \mathrm{v_z}^2(t_2) = T(t_2) - \sigma \mathrm{O}(\mathrm{t_2}) \qquad (5)$$

ergibt es sich, daß zu diesem Zeitpunkt die kinetische Energie der Flüssigkeit (außerhalb der Düse) genau so groß ist wie die Differenz zwischen der Energie, die durch die Düsenoberfläche geflossen ist und der Energie, die benötigt wird, die Oberfläche aufzubauen.

Diese Situation tritt auf, wenn die Geschwindigkeit in der Düse einen maximalen Wert erreicht hat.

Dies läßt sich folgenderweise sehen:

Um obige Bedingung zu erfüllen, muß wenigstens:

$$\frac{1}{2}\rho \cdot V(t_2) \cdot v_z^{\,2}(t_2) - T(t_2) < 0 \qquad (6)$$

erfüllt werden.

Nach einigen Umformungen und Ersetzung von $V(t_2)$ und $T(t_2)$ erhält man:

$$v_z^{\,3}(t_2) \int_{t_1}^{t_2} \frac{v_z(t)}{v_z(t_2)} \left\{ 1 - \frac{v_z^{\,2}(t)}{v_z^{\,2}(t_2)} \right\} dt \quad < \quad 0 \qquad (7)$$

Solange $v_z(t)$ positiv ist, ist diese Bedingung nur erfüllt, wenn für t ($t_1 < t < t_2$) in einem genügend großem Zeitraum $v_z(t) > v_z(t_2)$ ist.

Für $t > t_2$ ist dann die Geschwindigkeit der Flüssigkeit nicht mehr länger direkt von der Geschwindigkeit in der Düsenspitze abhängig. Die Geschwindigkeit in dem betrachteten (Kontroll-) Volumen (siehe Bild 3-4) hängt vom Gleichgewicht der Energien T(t), σ O(t) und der kinetischen Energie der Flüssigkeitsportion selbst ab. Für $t=t_3>t_2$ gilt:

$$v^2(t_3) \int_{t_1}^{t_3} v_z dt = \int_{t_1}^{t_3} v_z (v_z^{\,2} - \frac{4\sigma}{\rho \cdot R}) \cdot dt \qquad (8)$$

Betrachtet man den Fall, daß $v(t_3)>v_z(t_2)$. Dann kann man (8) umformen (unter Verwendung von (5)) zu:

$$\{v^2(t_3) - v_z^{\,2}(t_2)\} \int_{t_1}^{t_3} v_z dt = \int_{t_2}^{t_3} v_z \{v_z^{\,2} - v_z^{\,2}(t_2) - \frac{4\sigma}{\rho R}\} dt \qquad (9)$$

Aus dieser Gleichung erkennt man, daß, falls $v_z<v_z(t_2)$, für $t>t_2$ gilt: $v(t_3)<v_z(t_2)$

Unter dieser (im folgenden als gültig angenommenen) Bedingung wird erwartet, daß $V(t_2)$ das Volumen des Tropfens ist. Dieses Volumen muß von der Flüssigkeit, die die Düse zur Zeit $t>t_2$ verläßt, getrennt werden.

Deshalb wird die Oberfläche eines zukünftigen Tropfens um einen Betrag vergrößert, der πR^2 entspricht.

Betrachtet man die Energiebilanz des Volumens $V(t_2)$, folgt die Tropfengeschwindigkeit v_t:

$$\frac{1}{2}\rho V(t_2)v_t^{\,2} = \frac{1}{2}\rho V(t_2)v_z^{\,2}(t_2) - \sigma\pi R^2 \qquad (10)$$

Es ist möglich, daß die rechte Seite von (10) negativ ist. Dann wird kein Tropfen bei $t=t_2$ geformt. Dann muß geprüft werden, ob für $t=t_3$ gilt:

$$\frac{1}{2}\rho V(t_3)v^{\,2}(t_3) - \sigma\pi R^2 > 0 \qquad (11)$$

Unter Verwendung von (9) kann gezeigt werden:

$$v^2(t_3)\int_{t_1}^{t_3} v_z dt \;=\; v_z^{\,2}(t_2)\int_{t_1}^{t_2} v_z dt \;+\; \int_{t_2}^{t_3} v_z\{v_z^{\,2} - \frac{4\sigma}{\rho R}\}dt \qquad (12)$$

Solange $v_z > 2\sqrt{\sigma/\rho R}$ für $t>t_2$ besteht die Möglichkeit, daß (9) dennoch erfüllt wird.

Da angenommen wurde, daß für $t>t_2$ v_z eine zeitlich abnehmende Funktion ist, ist der zusätzliche Betrag an Energie, der durch die Oberfläche des Kontrollvolumens transportiert wird, klein. Falls ein Tropfen emittiert wird, wird seine Geschwindigkeit gering sein.

Wenn ein Tropfen nach (10) gebildet wird, muß die Oberfläche zweimal ausgebildet werden. Das bedeutet für die Energie der Flüssigkeit, die die Düse zum Zeitpunkt $t>t_2$ verläßt:

$$T(t) = \frac{1}{2}\rho\,\pi R^2\int_{t_2}^{t} v\,dt - \sigma\pi R^2 \qquad t > t_2 \qquad (13)$$

Die Rechnung liefert z.B. für einen Düsenradius von 50µm (bei ρ=1100 kg/m^3, c=1680m/s, σ=0,050 N/m) eine Tropfenradius von 37µm bei einer Tropfengeschwindigkeit von 3 m/s.

Diese theoretischen Überlegungen zeigen, daß Tropfenbildung möglich ist und die aus der Theorie abgeschätzten Werte (Geschwindigkeit und Tropfengröße) gut mit den gemessenen übereinstimmen.

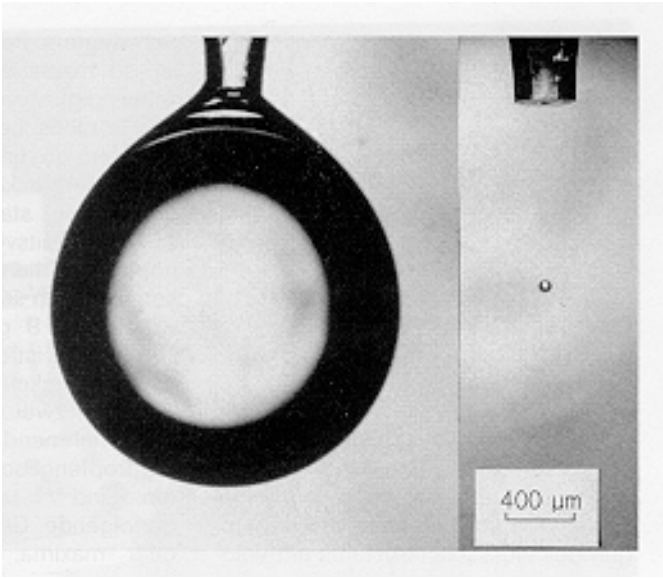


Abbildung3–6: Vergleich der Tropfengröße: links bei herkömmlichen Dosiersystemen, rechts bei den verwendeten piezoelektrischen Dosiersystemen

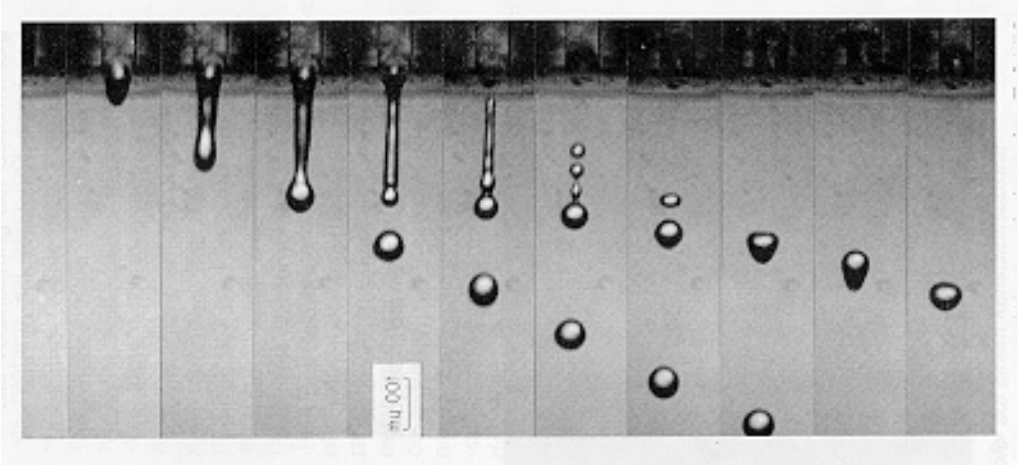


Abbildung3–7: Tropfenbildungsvorgang: Die Emission von Wasser ist in einer Bilderserie gezeigt. Die Bilder wurden mit stroboskopischer Beleuchtung aufgenommen, wobei bis zu 1000 mal pro Bild belichtet wurde. Trotz der Mehrfachbelichtungen ist das Bild nicht unscharf. Dies zeigt, daß die aufeinanderfolgenden Tropfen identisch sind. Für eine Füllung einer von uns verwendeten Reaktionskammern (siehe Kap 2.3) sind bis zu 1000 Tropfen in dieser Größe nötig, d. h. es können prinzipiell stöchiometrische Verhältnisse im Genauigkeitsbereich von 1 ‰ eingestellt werden, das heißt, in eine Kammer kann ein Volumenverhältnis von 1:999 von zwei verschiedenen Reagenzien mit zwei Microdrops pipettiert werden (Döring[27])

Die mit diesem Verfahren dosierbaren Flüssigkeiten erstrecken sich von niederviskosen Materialien wie etwa Methanol (0,5 mPa s) über wäßrige Lösungen (1 mPa s) bis hin zu Flüssigkeiten mit etwa 100 mPa s (Öl). Betrachtet man zunächst die Emission von Wasser in Bild 3-7, so sieht man deutlich, daß die Flüssigkeitssäule schon nach kurzer Zeit charakteristische Einschnürungen zeigt. Diese Einschnürungen stammen von hochfrequenten Schallwellen, die sich relativ wenig gedämpft im System ausbreiten. Sie führen im weiteren Verlauf der Tropfenformung zur Auftrennung der Flüssigkeitssäule in mehrere Einzeltröpfchen (Satelliten), die aber teilweise wieder zu einem größeren Tröpfchen verschmelzen. Gerade bei Wasser bleiben aber wegen der sehr hohen

Oberflächenspannung und der geringen Viskosität zwei getrennte, fast gleich große Tröpfchen erhalten, die nicht mehr verschmelzen. Insbesondere der langsamere Satellit weist noch deutliche Nachschwingungen auf. Bei Dosierung einer Flüssigkeit mit hoher Viskosität kommt es wegen den starken inneren Zusammenhalt der Flüssigkeitsmoleküle nicht zu einer Auftrennung, es wird ein langes dünnes Filament ausgebildet, mit einem Durchmesser von etwa 5 bis 6 µm im hinteren Bereich. Eine Eigenschwingung des Tropfens ist nicht mehr erkennbar. 100 mPa s stellen eine Grenze für das Verfahren dar. Zum einen, weil die Reibungsverluste in der Düse so groß werden, daß die für die Druckerzeugung notwendigen Ansteuerspannungen für das Piezokeramikmaterial zu hoch werden (Depolarisationserscheinungen), zum anderen, weil das Flüssigkeitsfilament in einen sehr feinen Nebel zu zerfallen beginnt, was zu unkontrollierbaren Verschmutzungseffekten führt. Darüber hinaus kann es bei ungünstiger Flüssigkeitszusammensetzung (mehrere Komponenten) zur Bildung von Kavitationsblasen kommen, weil die Zugspannungen in der Flüssigkeit zu hoch werden.
Trotzdem ist es möglich, Materialien mit wesentlich höheren Viskositäten auch noch zu verarbeiten. Erhöht man nämlich die Temperatur der Flüssigkeit, sinkt die Viskosität. So ist es möglich z. B. Epoxidharz mit einer Viskosität von rd. 10000 mPa s bei Raumtemperatur durch Erwärmung auf 140°C zu dosieren. Dabei können Harz und Härter getrennt dosiert werden, so daß sich beide Komponenten im Flug oder erst auf dem Substrat mischen. Diese Möglichkeit ist auch erst mit dem genannten Verfahren gegeben, da herkömmliche Dosierverfahren vor dem Dosieren mischen müssen, was zum Beispiel bei Klebstoffen zu dem Problem der Reaktion in der Mischdüse führt.
Die Aufnahmen in Bild 3-7 zeigen ein Tröpfchen mit einem Durchmesser von 90 µm, abgeschossen aus einer Düse mit 94 µm Durchmesser Dies entspricht einem Volumen von etwa 380 Pikolitern und liegt damit schon im oberen Bereich der dosierbaren Mengen. Die Untergrenze dieses Verfahrens liegt mit Düsendurchmessern von 20 µm etwa bei 5 Pikolitern. Allerdings lassen sich damit nur noch Flüssigkeiten mit geringen Viskositäten dosieren, da mit Verringerung des Düsenquerschnitts der Reibungsverlust stark ansteigt. Nach oben ist das Verfahren seitens des Düsendurchmessers begrenzt auf

etwa 100 µm, da mit Vergrößerung des Querschnitts der Kapillardruck abnimmt, der für die Nachförderung von Flüssigkeit notwendig ist. Mit großen Düsen kann man Einzeltropfen von etwa 100 µm Durchmesser erzeugen. Dies entspricht etwa 500 Pikolitern.

Es ist möglich den Vorgang der Tropfenemission bis zu 10000 mal pro Sekunde zu wiederholen. Begrenzend wirken dabei die Nachschwingungen des Flüssigkeitssystems. Bei der Tropfenemission wird eine verhältnismäßig große Energiemenge in die Flüssigkeit gepumpt, von der der Tropfen nur einen Bruchteil davonträgt. Die Restenergie verbleibt als Flüssigkeitsschwingung im System und muß über innere Reibung in Wärme umgesetzt werden. Startet man nun nach einer Tropfenemission eine zweite, bevor die Schwingung der ersten abgeklungen ist, so macht sich dies in einer Geschwindigkeitsveränderung des zweiten Tropfens bemerkbar und zwar je nachdem ob die zweite Emission in einer Überdruck- oder eine Unterdruckphase startet durch eine Geschwindigkeitsverminderung oder -erhöhung. Variiert man die Tropfenrate kontinuierlich so ergibt sich eine Kurve wie in Bild 3-8 gezeigt.

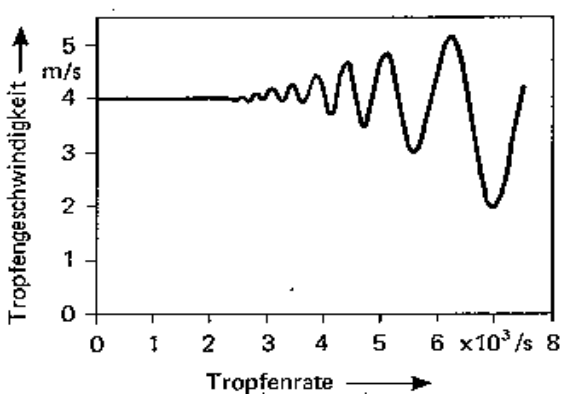


Abbildung3–8: Geschwindigkeit der dosierten Tropfen in Abhängigkeit der Frequenz: Die Oszillation in der Geschwindigkeit läßt sich nach Formel (11) berechnen.

Bei niedrigen Frequenzen ist der Kurvenverlauf glatt, die Flüssigkeitsschwingung kommt zwischen zwei Emissionen zur Ruhe. Mit zunehmender Tropfenrate beginnt die Tropfengeschwindigkeit zu oszillieren. Sind f_1 und f_2 zwei aufeinanderfolgende

Geschwindigkeitsminima oder -maxima, so läßt sich die „Stör“-frequenz, die Frequenz aufeinanderfolgender Maxima, einfach berechnen nach der Gleichung:

$$f_{stör} = f_1 \times f_2 /(f_2 - f_1) \qquad (11)$$

Die daraus berechnete Störfrequenz stimmt gut mit den aus Zeitmessungen am Flüssigkeitsmeniskus oder aus Resonanzmessungen bestimmten Schwingungs-frequenzen überein. Die Veränderung der Geschwindigkeit führt zu Fehlpositionierungen, insbesondere wenn das Dosiersystem gegenüber den Waferkammern in Bewegung ist. Außerdem verändert sich das Volumen in Abhängigkeit der Geschwindigkeit, so daß aus diesen beiden Gründen, die maximale Wiederholrate begrenzt ist.

Manche Flüssigkeiten zeigen ein Verhalten, das sich mit ihren makroskopisch gemessenen physikalischen Parametern nicht in Einklang bringen läßt. So ist es z. B. möglich, daß eine Flüssigkeit, die mit 20 mPa s angegeben ist, mit dem beschriebenen System nicht emittierbar ist. Die Ursache ist in diesem Fall in der Tatsache zu suchen, daß die Viskosität der Flüssigkeit keine Konstante ist, sondern abhängig vom sogenannten Schergefälle. Es ist dies der Quotient aus der Differenzgeschwindigkeit v und der Dicke der Grenzschicht r. Bei herkömmlichen Rotations-Viskosimetern liegt diese Größe bei etwa 1000/s (Δv = 1 m/s, Δr = 1 mm). Bei einem Microdrop-System sind die Werte Δv = 25 m/s und Δr = 25 µm (bei einem Düsendurchmesser von 50 µm), so daß das Schergefälle leicht den Wert 10^6 /s erreicht. Dieser Bereich ist nur mit sehr teuren und aufwendigen High-sheer-Viskosimetern erfaßbar, so daß man in den allermeisten Fällen das Experiment entscheiden lassen muß, ob eine Flüssigkeit zu verarbeiten ist oder nicht. Allerdings muß man sagen, daß die meisten Flüssigkeiten eine vom Schergefälle unabhängige Viskosität haben (sogenannte Newton’sche Flüssigkeiten) und nur Flüssigkeiten, die hochpolymere Bestandteile enthalten, das oben beschriebene Verhalten zeigen.

3.2.2. Autodrops

Das Autodropsystem ist nun eine Weiterentwicklung des Microdrop-Prinzips, bei dem über eine Druckversorgung die Flüssigkeit wie bei einem normalen Pipettierroboter von vorne angesaugt wird, wobei dann durch einen angelegten Haltedruck das Auslaufen aus dieser Dosierkapillare verhindert wird.
Die Mikrodosierung erfolgt dann wie bei dem vorher beschriebenen Microdrop-Prinzips über die Ansteuerung der Piezoelemente.
Die Autodrop-Konstruktion ist somit eine Kombination aus klassischen Pipettierprinzipien und dem aus der Tintenstrahldrucktechnik abgeleiteten Microdrop-Verfahren.

3.2.3. Gesim Pumpen

Bei den Pumpen, die z.B. von der Firma Gesim, Dresden hergestellt werden, handelt es sich ebenfalls um Mikrodosierpumpen, die von der Tintenstrahldrucktechnik inspiriert sind. Das Herstellungsprinzip ist jedoch deutlich näher an der Mikrosystemtechnik orientiert, obwohl die Erzeugung der Schallwellen ähnlich wie bei dem Microdrop/Autodrop Pumpen realisiert ist.
Das angesteuerte Volumen wird durch mikrosystemtechnische Mittel d.h. durch Ätztechnik in Silizium ausgeführt. Über diese Volumen wird nun eine Glasplatte gebondet; die Schwingungsbewegung selbst wird wieder durch eine Piezokeramik, die auf dieser Glasplatte angebracht ist, erzeugt. Die Schwingung wird hier also nur von einer Seite induziert, die Geometrien unterscheiden sich deutlich von den oben genannten Systemen.

3.2.4. Biodot-Systeme

Biodotsysteme (der Fa. Bio.dot Ltd.) wiederum sind eine Kombination aus klassischen Spritzenpumpen und Magnetventilen, wobei der Abriß der einzelnen Tropfen sehr von der Form des Ventils abhängt. Die genaue hydrodynamische Form der Spitzen hängt dabei sensibel von der zu dosierenden Flüssigkeit und der Flüssigkeitsmenge ab. Ein

größeres Problem stellen die verwendeten Lösungsmittel dar, z.B. gegen DMF sind diese Dosiersystemen nicht resistent.

3.2.5. Andere Dosierprinzipien (Waschstation)

Die oben besprochenen Dosiersysteme können die verwendeten Probenkammern nur einzeln adressieren, das heißt die Prozeßführung der Dosierung der einzelnen Probenkammern ist nur quasi-parallel.

Bei Waschschritten müssen alle Kammern mit dem gleichen Reagenz gefüllt werden (Sie müssen zudem häufiger im Syntheseprotokoll abgearbeitet werden). Deswegen kann man auf die Adressierbarkeit der einzelnen Kammer verzichten und so den Zeitbedarf der Synthese optimieren.

Deshalb wurde eine parallele Dosierstation entwickelt. Diese wird direkt auf den Wafer gesetzt und dann wird mit Hilfe einer Druckkammer und einer Kolbenpumpe direkt Flüssigkeit durch 256 Kammern gedrückt. Um alle Kammern sicher zu benetzen, muß man dabei eine größere Menge an Substanz durch die Synthesekammern drücken, als das Volumen der Kammern. Die dabei verbrauchte Substanzmenge beträgt etwa das Doppelte des Volumens der Probenkammern.

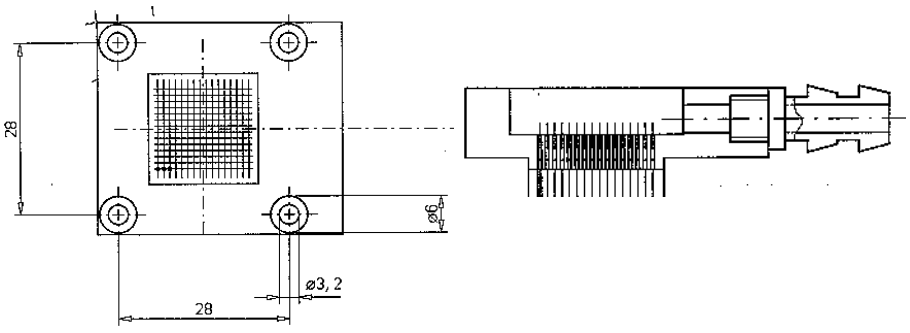


*Abbildung 3–9: Konstruktionszeichnung der entwickelten parallelen Waschstation: Mit diesem System ist es möglich 16*16 Kammern gleichzeitig zu spülen.*

3.3. Mikrosystemtechnik

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, werden für die Dosierung der Reaktionsflüssigkeiten hochgenaue Dosiersysteme verwendet, die zum Teil (siehe z.B. die Systeme der Fa. Gesim) mit mikrosystemtechnischen Mitteln hergestellt werden. Bei dem aufgebauten Automaten ist allerdings der wesentliche Einsatz dieser Techniken die Herstellung der Probenträger.
Das bislang gebräuchliche Format ist die Mikrotiterplatte mit 96 Probenkammern und einem Volumen von bis zu 400µl.
Darüber hinaus wurde das Format inzwischen auf 384 Probenkammern mit 50-20 µl und sogar auf 1536 Probenkammern mit 10-1 µl Substanz erweitert. Allerdings existieren zur Zeit noch keine (Pipettier-) Automaten, die mit diesem Format arbeiten können.

Im folgenden Überblick werden die wichtigsten Verfahren der Mikrosystemtechnik dargestellt, und dann die Herstellung und die Verfahren der verwendeten „Nanotiterplatten“ beschrieben.

Der Ansatz, der mit dem Aufbau der Maschine verfolgt wurde, benötigt als wesentliches Element Miniaturisierung und (quasi-) parallele Prozeßführung. Deshalb wurden am IPHT (Institut für physikalische Hochtechnologie Jena) die sogenannten Nanotiterplates entwickelt, das sind Probenträger mit etwa 6000 auf einen herkömmlichen 4″ - Silizium Wafer geätzte Kammern.
Zur Herstellung werden Verfahrenstechniken der Mikromechanik verwendet. Diese befaßt sich mit Entwurf und Herstellung von dreidimensionalen mechanischen Strukturen mit Abmessungen im Mikrometerbereich (Büttgenbach[18]). Statt konventioneller Feinmechanik wird die Technologie der Mikroelektronik benutzt, vor allem die hochgenaue Strukturübertragung mit lithographischen Verfahren. Die gemeinsame Basis von Mikromechanik und Mikroelektronik bietet zudem die

Voraussetzung für die Integration mechanischer und elektrischer Funktionen in die Probenträger (Sarro[100]).

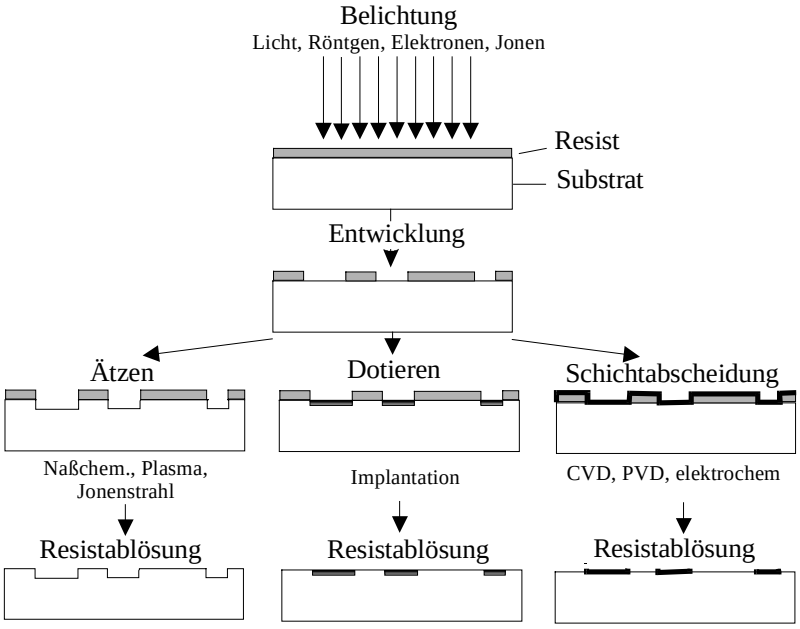


Abbildung3–10: Strukturierung von Siliziumwafern: Auf einem strahlungsempfindlichen Lack (Resist), das auf dem zu strukturierenden Substrat aufgetragen ist, werden die Strukturen mit lithographischen Verfahren erzeugt. Das Belichten verändert die Löslichkeit des Resists in einer Entwicklerlösung. Das Belichten kann mit Röntgenstrahlung, Elektronen, Ionen oder Licht erfolgen. Im Anschluß an die Entwicklung wird die im Resist erzeugte Struktur auf das darunterliegende Substrat übertragen.

Als mögliche optische Anordnungen zur Belichtung werden benutzt:

- Direktschreibende Verfahren
- maskengebundene Verfahren (Kontakt-, Proximity-, Projektionsverfahren)
- Interferenzverfahren (holographische Verfahren).

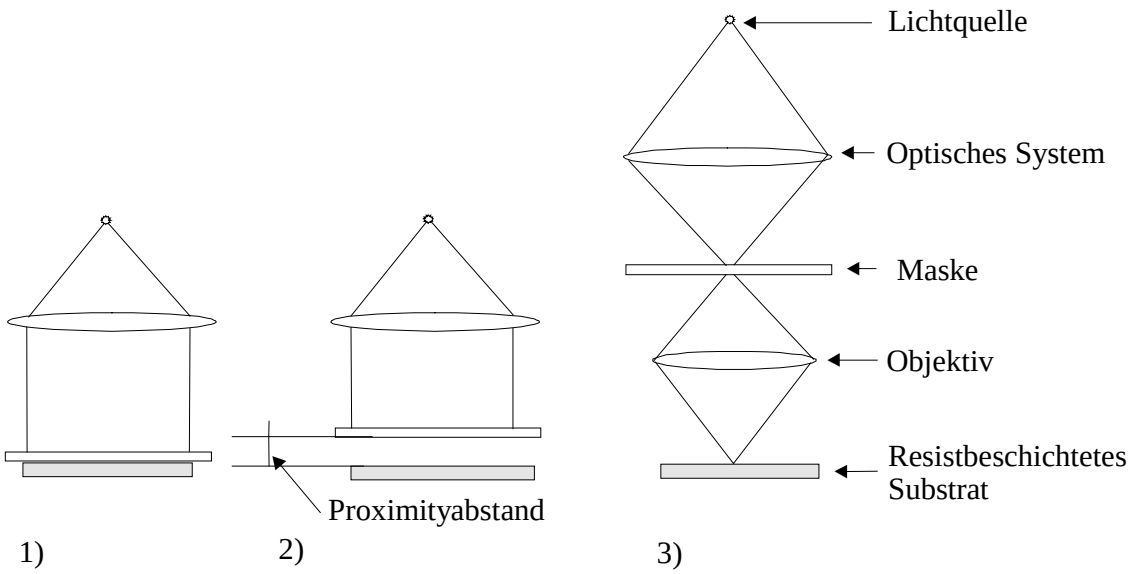


Abbildung3–11: Belichtungsverfahren: Die Belichtung kann mit einer Maskenprojektion oder seriell mit einem fokussiereden Strahl erfolgen. Die Maske bei der Photolithographie besteht in der Regel aus einem Glasträger mit darauf angebrachten Absorberstrukturen. Das Licht wird über 1) Kontakt, 2)Proximity oder 3) Projektionsverfahren auf das Resist abgebildet.

- Bei der Kontaktbelichtung liegt die Maske direkt auf dem resistbeschichteten Substrat. Es läßt sich so eine sehr hohe Auflösung bis in dem sub µm Bereich erreichen; der Nachteil besteht in einer möglichen Beschädigung der Maske oder des Resist durch den Kontakt.
- Bei der Proximitybelichtung durchstrahlt paralleles Licht die Maske, die einen Schatten auf den Photolack wirft. Maske und Resist sind durch den Proximity-Abstand (ca. 10-30 µm) voneinander getrennt. Aufgrund von Beugungseffekten ist jedoch das Auflösungsvermögen gegenüber der Kontaktbelichtung verringert. Die erreichbare Auflösung liegt für sichtbares Licht im µm – Bereich.
- Bei der Projektionsbelichtung wird ein Bild der Maske auf das Substrat mittels einer Optik abgebildet. Nachteil ist hier die hohe Anforderung an die Qualität der abbildenden Optik, die meist nur für ein Teilfeld gut korrigiert ist. Die Auflösungsgrenze bei der Projektionsbelichtung ist durch: $b_{\min} \approx k^* \cdot \lambda / NA$

gegeben. $NA = n * \sin\alpha$ ist die numerische Apertur des Objektivs, k^* ist eine empirisch Konstante (k^* ist ca. 0.7). Mit dieser Methode können Strukturen etwa von 0.5µm erzeugt werden.

Mechanische Bauelemente im Mikrometermaßstab lassen sich als konstruktive Elemente (z.B. Gräben, Einbettungsstrukturen, Klammern, Biegeplatten) für den Aufbau von Mikrosystemen, miniaturisierten Sensorfunktionselementen (z.B. Drucksensor-membranen) oder auch als miniaturisierte Aktorelemente (Mikrozangen, -zahnräder, -gelenke, -pumpen) einsetzen. Für die Konstruktion von Mikromaschinen sind solche Bauteile die Voraussetzung. Ausgehend von lithographischen Verfahren zur Strukturübertragung lassen sich die dreidimensionale Formen mit unterschiedlichen mikromechanischen Prozessen erreichen, z.B. durch anisotropes Ätzen von Silizium, Mikrogalvanikprozesse, Laserprozesse oder mit der sich noch in der Grundlagenentwicklung befindlichen Ion Track Technology (ITT). Mit dem LIGA-Verfahren (Lithographie, Galvanoformung, Abformung) sind Mikrostrukturkörper aus einer breiten Palette von Materialien wie Metalle, Kunststoffe und Keramik realisierbar.

LIGA:

Die LIGA Technik nutzt die Verfahrensschritte Lithographie, Galvanoformung und Abformung zur Herstellung komplexer, präziser dreidimensionaler Mikrostrukturen mit hohem Aspektverhältnis. Die Produkte lassen sich aus Metallen, Metallegierungen, Polymer- und Keramikmaterialien fertigen.

Lithographische Techniken werden im Rahmen der LIGA Technik zur Erzeugung von Primärstrukturen aus Polymermaterialien genutzt. Bei dem Strukturübertrag durch Schattenwurf von Absorberstrukturen mit Synchrotronstrahlung (Röntgentiefen-lithographie) beträgt die laterale Genauigkeit 0,2 µm (Strukturhöhe 0,5 mm). Bisher wurden Strukturhöhen von 10 mm erreicht. Für den Belichtungsschritt werden Substrate mit einem Resistmaterial beschichtet und über eine Maske belichtet. Je nach eingesetztem Resistmaterial bleiben in dem anschließenden Entwicklungsprozeß die

unbelichteten (Positivresist) oder die belichteten Bereiche des Resistmaterials (Negativresist) bestehen.

Bei der Ligatechnik läßt sich neben der üblichen Projektionstechnik mit senkrechtem Strahleinfall Schräg- und justierte Mehrfachbelichtung zur Herstellung komplexer dreidimensionaler Strukturen einsetzen. Durch Integration von Opferschichttechniken können auch bewegliche Mikrostrukturen (Beschleunigungssensoren, Linear- oder Rotationsmotoren usw.) hergestellt werden.

Die nach dem Entwicklungsprozeß entstandenen Resistzwischenräume lassen sich in einem Galvanisierungsprozeß mit einer Reihe von Metallen und Metallegierungen befüllen. Gegenwärtig werden Ni, Cu, Au, Ag, Pd, Fe, Cr und Zn sowie binäre Legierungen wie Ni-Co, Ni-P, Ni-Fe, Ni-B, Cu-Sn und Cu-Zn eingesetzt. Die Parameter des Galvanikprozesses sind für die Anpassung der Materialparameter von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählen: Stromdichte, Badtemperatur, Ionenkonzentration und Additive, z. B. Netzmittel.

Infolge der außerordentlich geringen Wandrauheit der Metallformen (<40 nm), lassen sich trotz extrem senkrechter Strukturwände ohne zusätzliche Entformungsschrägen Mikrostrukturen mit sehr hohem Aspektverhältnis durch Polymermaterialien abformen.

In einem weiteren Abformschritt für keramische Materialien werden die bei der Polymerabformung erzeugten Mikrostrukturen mittels Schlickerguß befüllt und dann gebrannt (Verlorene Form). Eingesetzt werden hierbei Al_2O_3 oder ZrO_2. Wesentlich glattere Oberflächen erhält man durch den Einsatz präkeramischer Materialien, z. B. Polyvinylsilazan.

Laser-Mikromaterialbearbeitung

Die vielfältigen Möglichkeiten der Mikromaterialbearbeitung mit Lasern (Metev et al.[84]) beruhen auf den einzigartigen Eigenschaften von Laserstrahlung: Räumliche Kohärenz, Monochromasie und die Möglichkeit der Erzeugung kurzer, exakt definierter Laserpulse.

Die wichtigsten in der Mikromaterialbearbeitung verwendeten Laser sind Nd:YAG-Laser (1.06 µm; mit Frequenzverdopplung bzw. -vervierfachung 530 nm bzw. 265 nm), Excimer-Laser (172 nm ; 351 nm) und Ar-Ionen-Laser (514 nm).

Feinwerktechnische Verfahren

Die Weiterentwicklung „konventioneller“ feinwerktechnischer Bearbeitungsmethoden erlaubt die hochpräzise Fertigung komplexer dreidimensionaler Mikrostrukturen. Hiermit lassen sich Materialien für die Mikrobearbeitung erschließen, die ansonsten für etablierte Mikrotechnologien nicht zugänglich sind (z. B. Edelstahl, Hartmetall und Titan).

Neuere Methoden der spanabhebenden Bearbeitung meist metallischer Oberflächen erlauben Strukturhöhen bis zu einem Millimeter. Die Fertigung erfolgt an speziellen CNC-Maschinen mit hochgenau profilierten Schneidwerkzeugen (z. B. Cermet für die Edelstahlbearbeitung und Diamant zur Bearbeitung von Buntmetallen). Bei einer Strukturgenauigkeit von etwa 1µm sind Rauheitswerte von 10 nm erzielbar. Typische Produkte sind Mikrowärmeübertrager und Mikroreaktoren.

Funkenerosive Verfahren (Draht- und Senkerodiertechniken) bieten inzwischen die besten Möglichkeiten zur präzisen, dreidimensionalen Mikrobearbeitung elektrisch leitfähiger Materialien, unabhängig von deren Härte oder Spröde. Dies gilt sowohl für Hartmetalle, Titan, hochlegierte Edelstähle als auch für leitfähige Keramiken. Interessante Anwendungen dieser Technik betreffen die Fertigung von Spritzgußformen, Mikroreaktoren sowie die Herstellung präziser Montagewerkzeuge für die Mikromontage (Wolf et al.[146]). Die konventionelle Mikrofunkenerosion eröffnet kleinste Strukturgrößen von 10 µm bei einer Formgenauigkeit von 1 µm und einer Rauheit von 0,2 µm.

3.3.1. Fertigungsprinzipien

Die Hauptanwendung von Mikrostrukturierung liegt bei der Entwicklung und Herstellung integrierter Schaltungen. Die dafür mit hohem Aufwand entwickelten Prozesse wie Lithographie, Ätztechnik und Schichtabscheidung lassen sich für die hier beschriebene Problemstellung anwenden.

Die Mikromechanik wendet Tiefenätztechniken zur Herstellung dreidimensionaler Mikrostrukturen an (Büttgenbach[18]). Grundstrukturen der Mikromechanik sind Gräben, Gruben, Löcher, Stege, mesaförmige Strukturen, Spitzen, Membranen, Brückenstrukturen, Biege- und Torsionsbalken. Als Strukturwerkstoff spielt einkristallines Silizium (Si) die dominierende Rolle aufgrund seiner hervorragenden mechanischen Eigenschaften und wegen seiner Kompatibilität zur Mikroelektronik. Weitere Strukturwerkstoffe sind die III/V-Halbleiter GaAs und InP, einkristalliner Quarz und Glas.

Häufig benutzte Schichtwerkstoffe zur Herstellung freistehender mikromechanischer Strukturen sind Si, GaAs, SiO_2, Si_3N_4, SiON, Diamant und metallische Schichten.

Die Grundprozesse werden naturgemäß aus der Halbleitertechnologie übernommen. Dies sind insbesondere Fotolithographie, Prozesse zur Schichterzeugung, Epitaxie, Ätztechniken, Lift-off-Technik und Dotierungsverfahren (Sze[134]).

Zusätzlich werden in der Mikromechanik spezielle Prozesse eingesetzt, die durch Weiterentwicklung von Verfahren der Halbleitertechnologie, der Ultrapräzisions-mechanik und der Lasermaterialbearbeitung entstehen (Ohlckers et al.[89]). Einige dieser Techniken wurden schon in der Einleitung dieses Kapitel erwähnt.

Naßchemisches Tiefenätzen:

Die Technik, die bei der Herstellung der Nanotiterplatten eingesetzt wird, ist die chemische Naßätztechnik. Da die Ätzrate von der Kristallrichtung des verwendeten Si-Einkristalls abhängt, wird diese Technik auch anisotropes oder richtungsabhängiges Ätzen genannt. Es zeigt sich, daß die (111) Ebenen sehr viel langsamer als die beiden anderen Richtungen geätzt wird.

Ätzlösungen, wie z.B. KOH, die auf dem Silizium Einkristall einwirken, tragen das Material unterschiedlich schnell, je nach Kristallorientierung, ab. Dabei ist das Verhältnis der Ätzabträge senkrecht zu den Flächen (100) und (111) etwa wie 400:1. Die (111) - Ebene wirkt also wie eine natürliche Ätzstoppschicht.

Der Herstellungsprozeß besteht aus folgenden Schritten:

Aufbringen einer ätzresistenten Schicht von SiO_2 oder Si_3N_4 (je nach verwendetem Ätzmittel) auf den Wafer in die mit üblichen photolithographischen Mitteln Durchbrüche (Ätzfenster) eingearbeitet wurden.

Ätzen des Wafers bis zur Rückseitenätzstoppschicht.

Da die (111) Ebenen zur (100) Oberfläche einen Winkel von etwa 55° bilden, ergeben sich pyramidenförmige Ätzgruben mit einem Öffnungswinkel von 110°. Die (111) Ebenen bilden rechte Winkel.

Anisotropes Ätzen erzeugt sehr glatte und genau definierte Flächen, wenn die Strukturen durch die (111) –Ebenen begrenzt werden.

Für andere Geometrien werden andere Kristallebenen (z. B. (211),(311) oder (322)) als Ätzstop verwendet. Die Ätzrate von solchen Ebenen hängt jedoch sehr komplex von den Ätzparametern wie Temperatur und Konzentration ab.

Die am meisten verwendeten und deshalb billigsten Wafer sind längs der (100)- Ebene geschnitten. Die damit erzeugten Mikrokompartimente sind invertierte Pyramidenstümpfe mit Seitenwinkeln von 54.74 ° relativ zur Wafer - Oberfläche.

Auf solche Weise hergestellte Wafer wurden für die im dem Meßaufbau realisierten Experimenten verwendet, die Waferkammern wurden sowohl mit integriertem und mit

Titan verstärkten Siebböden, durch die Reaktionslösungen wieder abgesaugt werden können, als auch mit transparenten Siliziumnitritböden für Durchlicht Messung hergestellt.

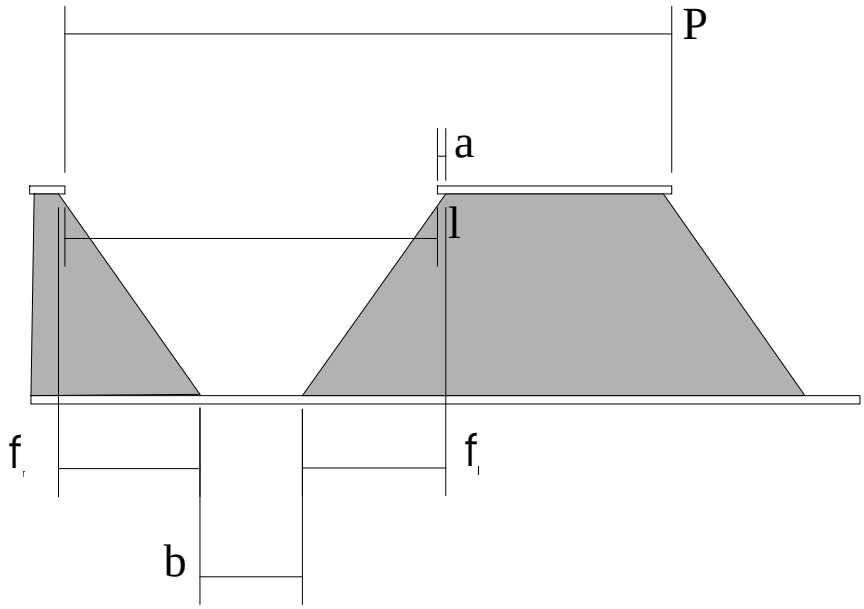


Abbildung 3–12: Schema der verwendeten Reaktionskompartimente: Zahlenwerte sind: P=1000µm; l =805µm (800µm); f=348µm; fl=343µm; b=124µm; a=6.1µm. Die angegebene Daten sind gemessene Werte, in Klammern ist der erwartete Wert genannt.

Zur Herstellung freistehender Mikrostrukturen in der Mikromechanik werden folgende Techniken angewendet: Naßchemisches Tiefenätzen, kombinierter Trocken- und naß-chemischer Ätzprozeß zum Freiätzen von Strukturen in (111)-Si-Substraten, SCREAM-Prozeß (single-crystal silicon reactive ion etching and metalisation) (Shaw et al.[118]), SIMPLE-Prozeß (silicon micromachining by single step plasma etching) und BSM-Prozesse (black silicon method) (deBoer et al.[23]).

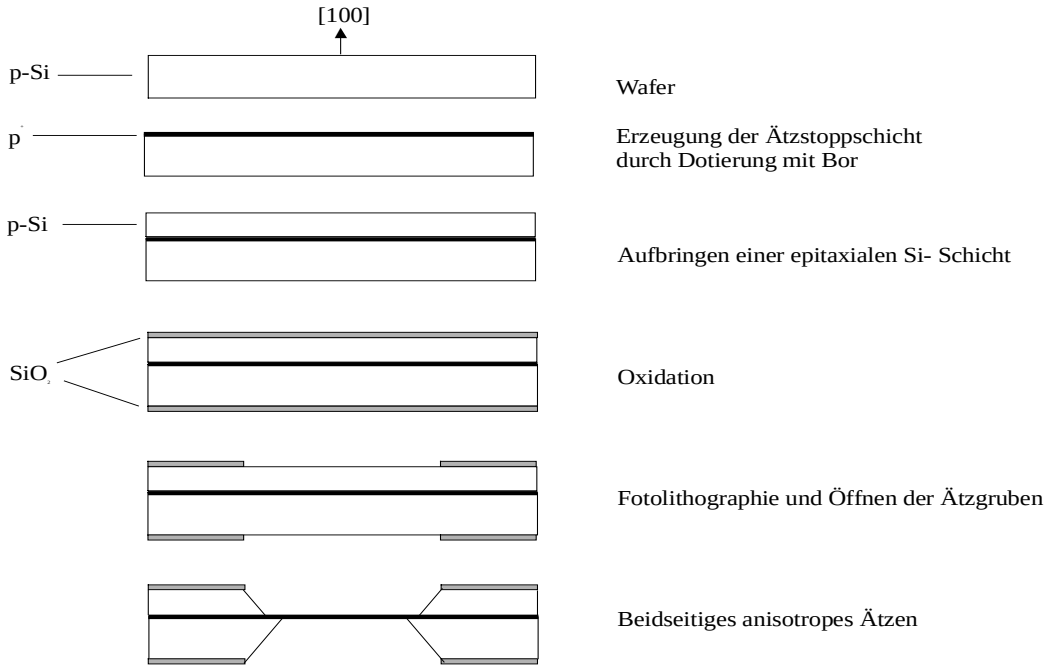


Abbildung3–13 doppelseitige Lithographie: Bei mikromechanischen Elementen, die durch beidseitige Strukturierung der Substratwerkstoffe entstehen, ist eine präzise Justierung von Substrat-Vorderseite zu - Rückseite erforderlich.

Die Herstellung komplexer Systeme kann durch Zusammenfügen mehrerer jeweils separat strukturierter Substrate erfolgen. Fügepartner sind z. B. Si-Si, Si-Glas, Quarz-Quarz, Si-Quarz, Metall-Metall, Metall-Glas. Folgende Waferbondverfahren kommen zum Einsatz: Kleben, Glaslottechnik (v.Münch et al.[86]), anodisches Bonden, Silizium-Direkt-Bonden (Bengtson[10]).

3.3.2. Waferlayout und Nanotiterplatten

Da die Miniaturisierung nicht allein zur Einsparung von Material dienen kann, sondern auch die (physikalischen) Eigenschaften der darin ablaufenden chemischen Prozesse ändern kann, besteht die Möglichkeit, die Mikrokompartimente z.B. bezüglich des Volumen-Oberflächenverhältnisses zu optimieren. Als Beispiele für Prozesse, die betrachtet werden können, sei hier der Wärmeübertrag auf die in die Kompartimente eingebrachten Flüssigkeiten genannt.

Ein anderer wichtiger Parameter ist die Zeit, in der eine chemische Reaktion in der Kammer abläuft. Vernachlässigt man die Konvektion in den Kammern, so ist der bestimmende Parameter der Transport der Reagenzien durch Diffusion.

Die benötigte Zeit dafür hängt nach dem Fick‘schen Gesetz sowohl von dem Konzentrationskoeffizienten (dc/dx) wie auch von der Entfernung (x) ab. Die bedingt eine geometrische Abhängigkeit der Diffusionszeit vom Diffusionsweg.

Der mittlere Weg, den alle Teilchen zurücklegen ist proportional zur Quadratwurzel der Zeit:

$$x_D = \langle x \rangle = 2\sqrt{Dt/\pi}$$

Für kleine Moleküle in Wasser, D ist in der Größenordnung von $10^{-9} m^2/s$, das ergibt eine Diffusionszeit von

$$\tau_D \cong 2 \times 10^8 \sqrt[3]{\left(r^2 * V\right)^2} ,$$

die in Abhängigkeit von Volumen und Aspektverhältnis dargestellt ist. Das Aspektverhältnis ist hier als Verhältnis Tiefe des Kompartiments zur Höhe definiert.

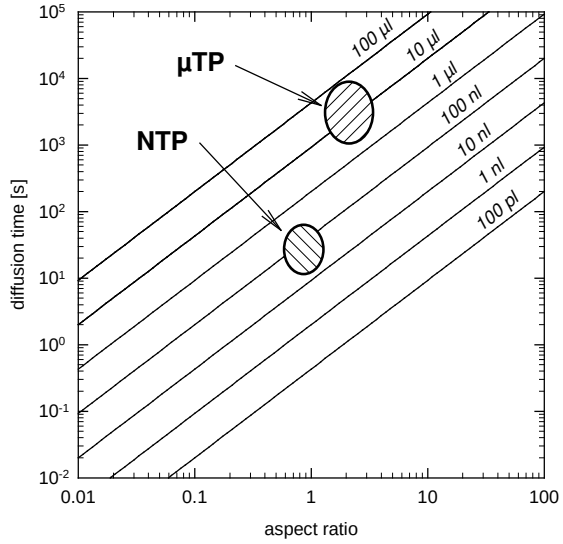


Abbildung 3–14: Aspektverhältnis – Diffusionszeit: geschätzte Diffusionszeiten zweier Reagentien die nacheinander in Kompartimente gefüllt werden sind in Abhängigkeit der Form der Kompartimente dargestellt. Hohes Aspektverhältnis bedeutet tiefe und enge Kammern. Standardisierte Mikrotiterplatten (µTP) werden mit den in den Experimenten verwendeten Nanotiterplatten (NTP) verglichen (aus: Mayer et al.[81])

Bei der obigen Abschätzung muß man beachten, daß andere Parameter wie Temperatur, Verdunstung, Konvektion etc. eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen. Außerdem ist die eingebrachte Substanzmenge zu berücksichtigen, die die untere Nachweisgrenze des Reaktionsproduktes bedingen. Dies setzt der Miniaturisierung zur Zeit nach unten eine Grenze.

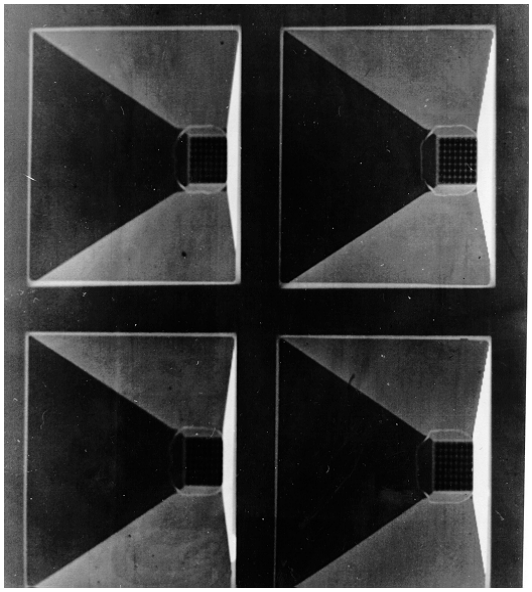


Abbildung3–15: Ansicht von vier Reaktionskammern: An Boden der Kompartimente erkennt man die Siebstruktur, die ein Absaugen von Reaktionsflüssigkeit ermöglicht.

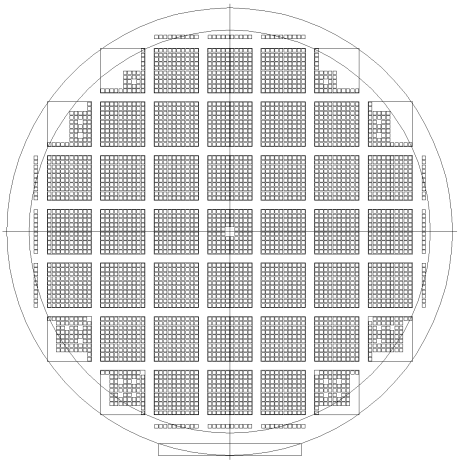


Abbildung3–16: Wafer: Hier ist ein gesamter Wafer mit etwa 4000 Reaktions-kompartimenten dargestellt. Die Anordnung in Segmenten von 100 Kammern ist durch die Stabilität des Wafers beim Absaugen der Reaktionsflüssigkeit bedingt.

3.3.3. Wafertemperierung

Entwicklung der Temperierstation:

Die Integration von mikromechanischen und mikroelektronischen Komponenten ist in die Waferkammern möglich. So wurden erste Tests mit elektrisch durch Widerstandsheizung temperierten und mit Widerstandsthermometern geregelten Wafern durchgeführt. Jedoch standen diese Wafer nicht zu den Experimenten zu Verfügung,. Für die Amplifikationsexperimente mußte die Reaktion zudem durch Kühlen behindert werden, so daß auf eine Heizung und Regelung des Wafers durch Temperierstationen zurückgegriffen werden mußte.

Hierbei wurde ein Temperierblock entwickelt, der das Kühlen des Wafers auf etwa 4 °C erlaubt. Dies setzt die biochemische Reaktion der Lösung während des seriellen Befüllens stark herab. Nach vollzogener Befüllung kann der Wafer auf 37°C geheizt und dann auf dieser Temperatur geregelt werden. Ausgeführt wurde die Kühlung über ein Peltierelement mit nachgeschaltetem Wasserkühler, die Heizung über einen flächig realisierten, elektrischen Wiederstandsheizer, die Regelung erfolgte über einen PID-Regler mit einem Halbleiterwiderstand als Temperaturelement. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft den Verlauf der Temperierung.

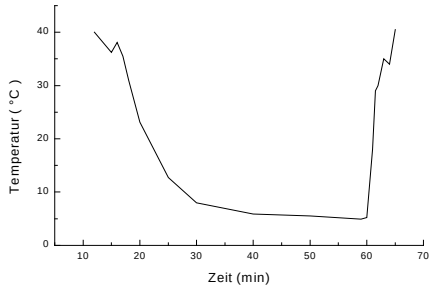


Abbildung3–17: Temperierkurve des Wafers: Das Bild zeigt die zeitliche Abhängigkeit der Temperatur in den Experimenten. Die Genauigkeit betrug mehr als 0,1°C über mehrere Stunden

3.3.4. Verdunstungsproblem

Werden die Zeiten für die chemische Reaktion in den einzelnen Kammern vergleichbar mit der Zeit, in der die Substanz durch Verdunstung eintrocknet, kann man entweder das Oberflächen- Volumenverhältnis (siehe voriges Kapitel) ändern oder man behindert das Verdunsten. Hier wurden folgende Verfahren untersucht:

Aufbau von Begasungskammern (Gesättigte Atmosphäre), Aufbringen von Mineralöl in die einzelnen Kammern, Abdecken durch Glasdeckel.

Begasungskammer:

In den abgeschlossenen Kammern wird über Spülflaschen eine gesättigte Atmosphäre eingestellt: Machbar ist dies auch für große Volumina, Probleme bereitet dabei aber die Kondensation an Grenzflächen. Mögliche Lösungen sind das Anblasen mit trockener Atmosphäre bzw. Heizen der Grenzflächen auf eine über der Umgebungstemperatur liegende Temperatur.

Beschichten mit Mineralöl:

Dies erscheint als eine einfache und elegante Methode zum Lösen des Verdunstungsproblems. Mineralöl kann ohne Probleme mit einer adaptierten Microdrop Apparatur pipettiert werden. Nachteilig kann sich das weiter reduzierte Probenvolumen auswirken; wird zuwenig Öl in die Kammern eingebracht, so sammelte sich das Öl als Fettaugen. Die Realisierung auf der Maschine ergab, daß der Dosierkopf für das Mineralöl auf eine so hohe Energie eingestellt werden mußte, daß Übersprechen der Kammern (Spritzen) nicht immer verhindert werden konnte. Bei der Bewertung von fluoreszierenden Systemen muß zudem zuvor die Eigenfluoreszenz des Öls, sowie die optischen Eigenschaften (Dicke der Ölschicht) genau kontrolliert werden.

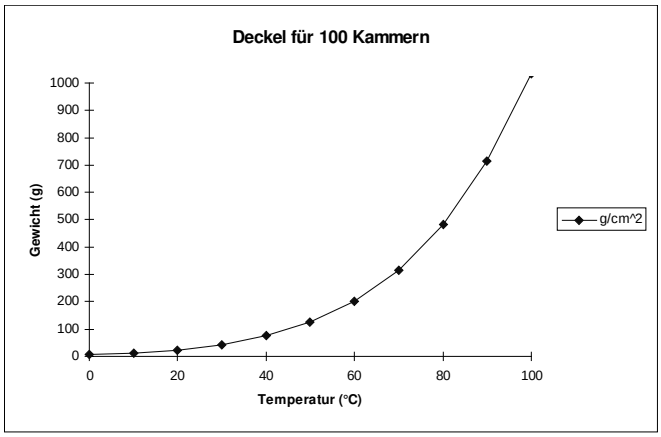
Glasmodul:

Das Verdunsten der Flüssigkeit wird durch eine Glasplatte verhindert, mit der in einem Abstand ($d \approx 0{,}5$ mm) über den Probenkammern der Wafer oder bestimmte Waferkammern abgedeckelt werden. Über den Probenkammern stellt sich dann eine gesättigte Atmosphäre aus Dämpfen des Lösungsmittels ein.

Das Problem des Beschlagen wird durch eine Temperierung des Deckels gelöst. Für die Zellenversuche (Kapitel 4) wurde das Glasmodul realisiert, hier wurde das Agarose-Gel als ganzes zwischen zwei Glasplatten gekapselt. Dies erlaubte Online Beobachtung beim Wachstum der Zellen.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems stellt die lokale Begasung mit gesättigter Atmosphäre dar; die lokale Begasung beim Kühlen wurde getestet um Kondensationseffekte zu verhindern. In weiteren Versuchen wurden lokal stabile Bedingungen während des Befüllens eingestellt. Zusätzliche Kühlung setzt zudem die Verdunstungsrate erheblich herab.

Um die Verdunstung zu behindern, wird die Fläche, die mit den Proben befüllt wird, mit einem Glasdeckel auf einem Gummiring oder einer speziell zugeschnittenen Parafilmfläche abgedichtet. Über der Flüssigkeit bildet sich dann eine gesättigte Atmosphäre, die eine nach oben gerichtete Kraft auf den Glasdeckel ausübt. Beispielhaft wird als Probenflüssigkeit Wasser betrachtet, um abzuschätzen, mit welchem Gewicht der Glasdeckel nach unten gedrückt werden muß (Für wäßrige Lösungen sind aufgrund der Dampfdruck- Erniedrigung die Verhältnisse günstiger). Die Tabelle für den Druck des gesättigten Wasserdampfes läßt sich in ein Gewicht umrechnen, mit dem der Glasdeckel beschwert werden muß um den Dampfdruck entgegenzuwirken und die Kammern zuverlässig abzudichten (1 mbar = 1/100 N/cm^2 = 1/100 * 1/9,81 kg/cm^2)



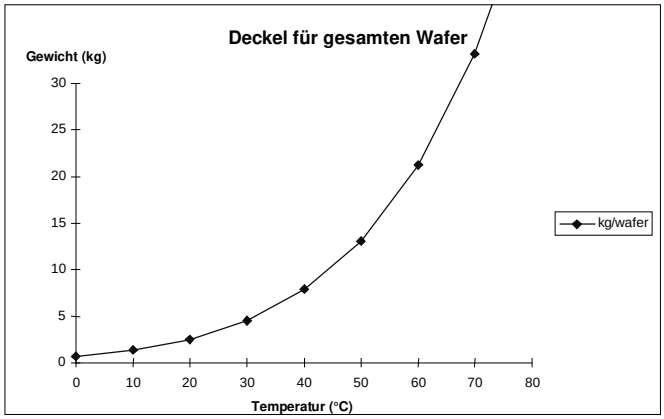


Abbildung3–18: Verdunstung in Waferkammern: Wie man aus obigen Diagrammen entnehmen kann, kann mit dem in der Maschine realisiertem Aufbau und den hier erforderlichen Versuchsbedingungen (ca. 40°C) eine Fläche von 1 cm^2 (das sind 100 Kammern) problemlos mit Glas abgedeckt werden. Um die gesamte Waferfläche abzudecken, wären jedoch größere Umbauten erforderlich. Für die Zellenversuche auf einem Agar (siehe Kapitel 4) wurden die zu erreichenden Kräfte bei ca.40° von Klebeband aufgebracht. Außerdem mußte nicht totales Austrocknen des Agars befürchtet werden, es reichte die Behinderung der Verdunstung aus.

Anhang: Tabelle nach Gerthsen et al.[46] (mit Umrechnungen)

°C	mbar	g/cm^2	kg/Wafer
0	6.1	6.21814475	0.65114339
10	12.3	12.5382263	1.31296126
20	23.3	23.7512742	2.48715426
30	42.4	43.2212029	4.52598029
40	73.7	75.127421	7.8670931
50	123	125.382263	13.1296126
60	199	202.85423	21.2422188
70	311	317.023445	33.1976385
80	473	482.16106	50.490299
90	701	714.576962	74.8281176
100	1013	1032.61978	108.132501
110	1432	1459.73496	152.85858
120	1985	2023.44546	211.888464

3.4. CCD und Bildverarbeitung

3.4.1. Theorie der CCD

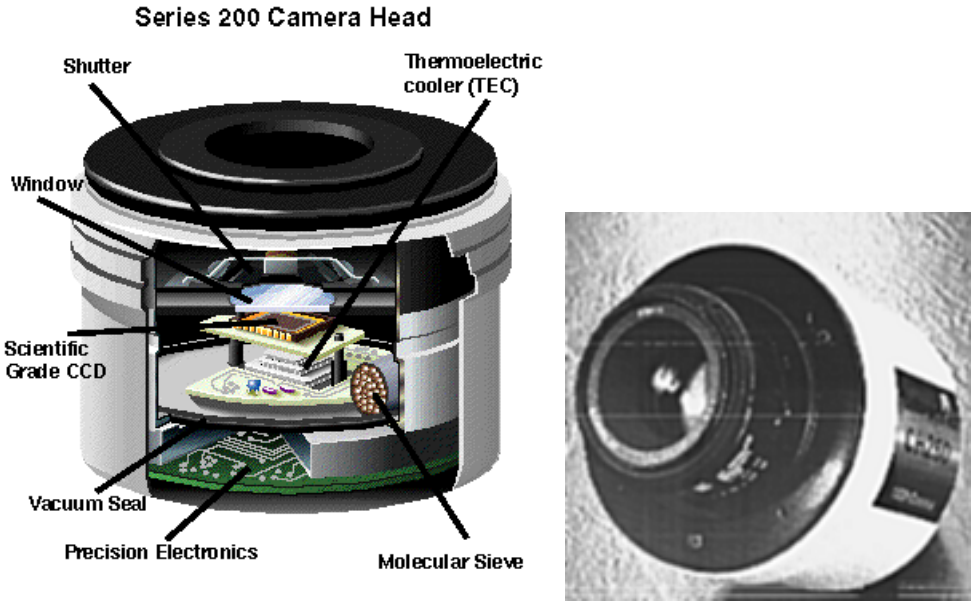


Abbildung 3–19: Prinzipieller Aufbau der verwendeten slow-scan CCD: Model: Photometrics Series 200; Chip: Tektronics TK1024AB; Pixelanzahl: 1024 x 1024; Pixelfläche: 24.5 x 24.5 mm; Pixelgröße: 0.024 mm; Linearität: 0.12 %; Auslesegeschwindigkeit: 40 kHz; Auslesezeit: 25 sec; Dunkelstrom: 0.755 e-/h (Herstellerangaben)

CCD[6] basierte optische Detektionssysteme haben sich seit den 80er Jahren mit einer großen Anzahl an verschiedenen Anwendungen in den “life sciences” (Arndt-Jovin et al.[4], Hiraoka et al.[57]) verbreitet. Ursprünglich wurden gekühlte CCD Kameras für die Astronomie entwickelt, sind aber mittlerweile wichtige Werkzeuge für die Spektroskopie (Sweedler et al.[133]) geworden. Sie werden in der “flow cytometry”

[6] engl: charge coupled device

(Steinkamp et al.[128], Kubota et al.[68]), in der Mikroskopie (Herr et al.[55], Ambroz et al.[3]) und in der confocal scanning microscopy (Highett et al.[56], Hayes et al.[52]) eingesetzt. CCD's werden ebenso auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie (z.B. Faruqui et al.[39]) eingesetzt. Messungen in der Neurobiologie (Nicholson et al.[87]) und ebenso bei Hybridisierungsexperimenten (Maier et al.[78], Lengauer et al.[71]) wurden ebenso mit CCD's durchgeführt. Biolumineszenz Messungen sind zusätzlich weit verbreitet (White et al.[144], Waterhouse et al.[143]). Ein Überblick findet sich bei Earle et al.[30] und bei Warner et al.[142].

Das CCD ist ein Halbleiterdetektor, der aus einer zweidimensionalen Anordnung von Siliziumdioden besteht. Die einfallenden Photonen erzeugen innerhalb des Festkörpers Elektronen-Loch-Paare, wenn ihre Energie ausreicht um die Elektronen vom Valenz- in das Leitungsband des Halbleiters anzuheben (innerer Photoeffekt). Die freigesetzten Ladungen können an der Grenzschicht zwischen p- und n-dotiertem Silizium durch äußere Spannungen in Potentialmulden gesammelt werden, und somit ein Ladungsbild über längere Belichtungszeiten aufbauen. Die erzeugte Ladungsmenge ist dem einfallenden Lichtfluß auf das betrachtete Bildelement (Pixel) proportional. Die Steuerschaltung bewirkt nach Beendigung der Belichtung durch geeignetes Verändern der Potentiale das ladungsgekoppelte Ausleseverfahren, bei dem die Ladungsverteilungen der Pixel Zeile für Zeile an den Bildrand geschoben und über einen Verstärker hintereinander ausgelesen werden. Die während der Belichtungszeit in den Pixeln angesammelten Ladungen werden schließlich nacheinander ausgelesen und in Spannungen umgewandelt. Diese werden anschließend durch einen AD-Wandler digitalisiert und vom Computer als Daten übernommen.

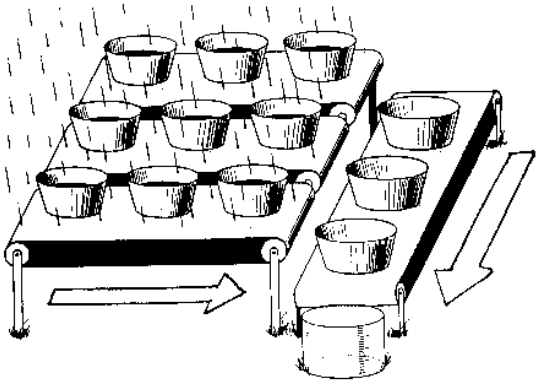


Abbildung3–20: prinzipielle Wirkungsweise eines CCD: Das Schema zeigt den Auslesemechanismus der elektrischen Ladungen.

Der Quantenwirkungsgrad guter CCDs beträgt bis zu ca. 80%. Das bedeutet eine etwa hundertfache höhere Empfindlichkeit gegenüber den konventionellen Photoplatten. Außer der höheren Empfindlichkeit bietet das CCD gegenüber der ‚normalen' Photographie den Vorteil der Linearität: Es ist also nicht nötig, eine sog. Schwärzungskurve zu erstellen, die eine zusätzliche Ungenauigkeit einführen würde. Ein weiterer Vorteil der CCDs liegt darin, daß die Aufnahmen sofort in maschinenlesbarer Form für die weitere Bearbeitung (Bildverarbeitung) am Computer vorliegen.

Andere in Frage kommende digitalen Detektionssysteme sind die PIN- Photodiode oder PDA's / Photodiodenzeilen.

Photodioden und PDA's sind Halbleiterbausteine, die wie die CCD auf dem inneren Photoeffekt beruhen. In der aufgebauten Konstruktion werden jedoch die Probenkammern parallel auf den Detektor abgebildet. Dies würde bei Verwendung von Photodioden, bzw. PDA's entweder serielles abscannen der Probenkammern bedeuten, oder dem Verwenden von mehreren hundert Elementen (für jede Probenkammer eine Photodiode, bzw. für jede Zeile ein PDA). Abgesehen von den Kosten für die PDA's ist serielles abscannen bei den durchgeführten Experimenten nicht immer möglich, z. B.

wegen zeitlich nachlassender Leuchtintensität der Proben oder wegen Verdunstung der Proben.

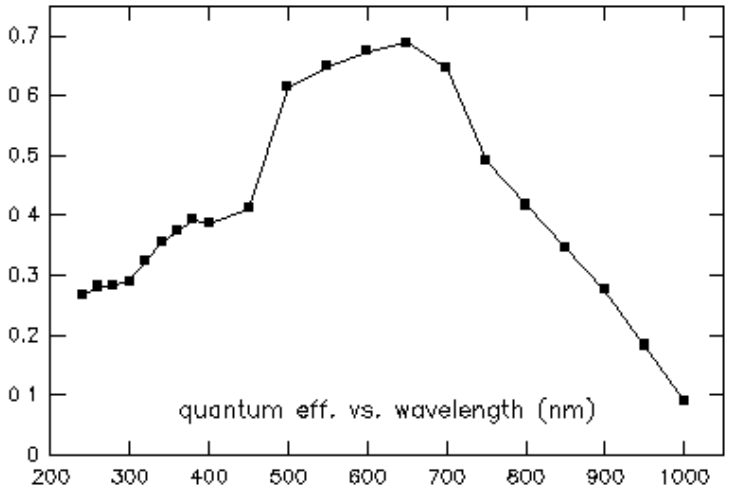


Abbildung3–21: Quantenausbeute in Abhängigkeit der Wellenlänge eines CCD: Das CCD kann auch für Messungen im UV- Bereich verwendet werden

Gewöhnliche CCD-Chips haben ihre Maximalempfindlichkeit im roten Wellenlängenbereich. (600nm-700nm, siehe Abb.:3-21). Mit speziellen Beschichtungen ist es möglich, den Empfindlichkeitsbereich zu kürzeren Wellenlängen auszudehnen. Heute gibt es CCDs, die bis in den Röntgenbereich empfindlich sind (Lemme[70]).

Der gesamte CCD-Chip ist aus einzelnen Pixeln zusammengesetzt. Die übliche Größe eines Pixels liegt zwischen 5-30 µm.

Auch ohne Lichteinfall tritt ein sogenannter Dunkelstrom auf, da eine gewisse Zahl von Elektronen allein aufgrund ihrer thermischen Energie ins Leitungsband gelangt und sich im Bild als Rauschen bemerkbar macht.

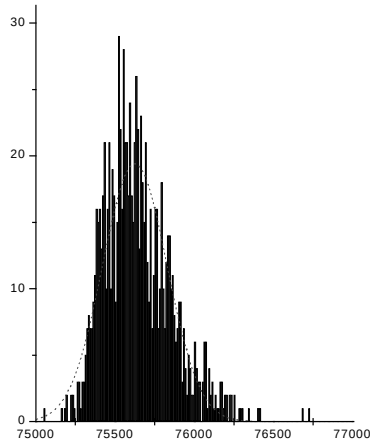


Abbildung3–22: Dunkelsignal des CCD: Gausverteilung der ausgewerteten Bildausschnitte mit der zur Verfügung stehenden CCD- Kamera. Es wurden 1000 Aufnahmen an zwei verschiedenen Bildregionen des CCD belichtet, ohne das Objektiv zu öffnen (Dunkelsignal).

Für das Dunkelsignal eines CCD`s gilt wegen seiner Halbleitereigenschaft (z.B. Beal et al.[9]):

$$I = I_0 T^{3/2}\, e^{\frac{E_{gap}}{2kT} + I_c}$$

mit

$$I_0 = 2\frac{\sqrt{2\pi m_e k}}{h} \approx 1000 \mu m^{-3}$$

I ist die Intensität des Signals, T die absolute Temperatur und E_{gap} die Energielücke im Halbleiter. Der Dunkelstrom ist daher temperaturabhängig. Der Dunkelstrom verhindert, daß mit dem CCD-Chip unendlich lange belichtet werden kann. Im Extremfall würde ein Pixel allein durch diese thermischen Elektronen gesättigt und kein durch Licht erzeugtes Elektron hätte mehr Platz auf dem Pixel. Je geringer der Dunkelstrom ist, desto länger kann die maximale Belichtungszeit sein. In der Praxis wird der Dunkelstrom durch Kühlung des CCD-Chips reduziert. Dies geschieht mit Flüssig-Stickstoff oder bei einfacheren Kameras mit Hilfe eines Peltier-Elements. Bei modernen

CCDs ist der Dunkelstrom inzwischen so weit reduziert, daß auch sehr lange Aufnahmen ohne wesentliche Störung möglich sind.

CCDs registrieren auch einfallende hochenergetische Teilchen kosmischen Ursprungs oder von umgebender Radioaktivität. Ein solches Ereignis hinterläßt eine sehr große Ladungsmenge auf dem getroffenen Pixel, so daß dieses für die laufende Aufnahme nicht mehr verwendbar ist. Diese sog. Cosmics sind die eigentliche Begrenzung bei Langzeitbelichtungen. Belichtungszeiten über eine Stunde sind meist nicht sinnvoll. Längere Aufnahmen müssen in Einzelaufnahmen aufgeteilt werden.

Die minimale meßbare Intensität ergibt sich aus dem Dunkelstrom, die maximale meßbare Intensität aus dem maximalen Speichervermögen des einem Pixel zugeordneten Potentialtopfs.

Die Bildtiefe des im Rechner repräsentierten Bildes hängt vom verwendeten AD-Wandler ab, dessen Dynamik größer sein sollte als die Dynamik des CCD. Sie beträgt meist zwischen 8 und 16 Bit (256 bis ca. 65000). In der aufgebauten Maschine wurde eine 14-bit CCD verwendet, d.h. eine Dynamik bis zu 16834 wurde erreicht

Beim Auslesen des Chips muß darauf geachtet werden, daß das registrierte Ladungsmuster nicht verwischt wird. Die Auslesegeschwindigkeit kann daher nicht beliebig gesteigert werden. Das Auslesen der hier verwendeten Kamera beträgt etwa 25sec (laut Hersteller). Zur Registrierung schnellerer Prozesse sind Standard-CCDs daher nicht geeignet. Für schnelle Photometrie werden daher immer noch fast ausschließlich Photomultiplier verwendet. Die Entwicklung rauscharmer und schneller Ausleseelektronik ist zur Zeit ein aktuelles Thema.

Schwerpunkte der Entwicklung im Bereich der Fotosensoren sind u.a. (nach Lemme[70]):

Größere Auflösungen:

Ein Problem stellt dabei die zur Verfügung stehende Chipfläche dar, die bei „klassischen“ integrierten Schaltungen typischerweise 10 cm² beträgt. Beispielsweise hat der Sensor THX7897M (Thomson) 2048 × 2048 Pixel mit je 15 × 15 µm Größe, und die gesamte lichtempfindliche Fläche beträgt 30,7 × 30,7 mm². Da jedes Sensorelement auf dieser großen Fläche funktionstüchtig sein muß, sind die Qualitätsanforderungen an

den Chip hoch. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den CCD-Sensor mechanisch beweglich zu gestalten. Damit können zwischen den „normalen“ Bildpunkten nach der Verschiebung noch Zwischenpunkte aufgenommen werden.

Reduktion des Dunkelrauschens

Das Dunkelrauschen kann durch Anwendung der MPP-Technologie (Multi-Pinned Phase) reduziert werden. Andere Möglichkeiten zur Reduktion der Fehler, wie sie bisher besonders im astronomischen Bereich verwirklicht wurden, sind eine große Pixelfläche, eine Kühlung bis -40ºC und tiefer und eine niedrige Ausleserate. Dadurch verbessert sich das Ladungs/Rauschverhältnis. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses besteht in der unmittelbaren Ladungsverstärkung auf dem Chip. Das Signal wird schon unmittelbar an der Quelle, der lichtempfindlichen Zelle, in eine Spannung umgewandelt. Die Spannung wird in einem Kondensator gespeichert. Die weiteren Teile des Chips verarbeiten also Spannungen statt Ladungen.

3.4.2. Integrierte Robotik und Prozeßsteuerung

Für die Steuerung der Experimente wurde (siehe Diagramm) ein Programm entwickelt, das automatisch mit derselben CCD – Kamera, die für die Signalverarbeitung benutzt wurde, die einzelnen Probenkammern erkennt und nach den entsprechenden (chemischen) Protokoll den Ablauf steuert. Für die Bestimmung der Position der Probenkammern wird dazu der Wafer in 49 Einzelbildern sequentiell aufgenommen. Da die automatische Kammererkennung auf dem hier verwendeten Rechner mit der verwendeten Programmiersoftware längere Zeit dauert, wird eine Liste erzeugt, die die Positionen der Waferkammern enthält. Fehlerhafte Kammern werden dabei nicht abgespeichert. Durch manuelles Handhaben des Wafers vor dem Experiment (z. B. manuelles Einsortieren der Synthesebeads bei der Peptidsynthese) kann dann im eigentlichen Experiment nur noch ein Winkelfehler und eine Verschiebung zur der vorher abgespeicherten Referenzliste bestehen. Die Korrektur der Liste kann dann bei dem eigentlichen Experiment ohne Zeitverzug erfolgen, insbesondere ist es bei den

verwendeten Wafern nur einmal für jedes Waferlayout erforderlich, eine Referenzliste zu erzeugen.

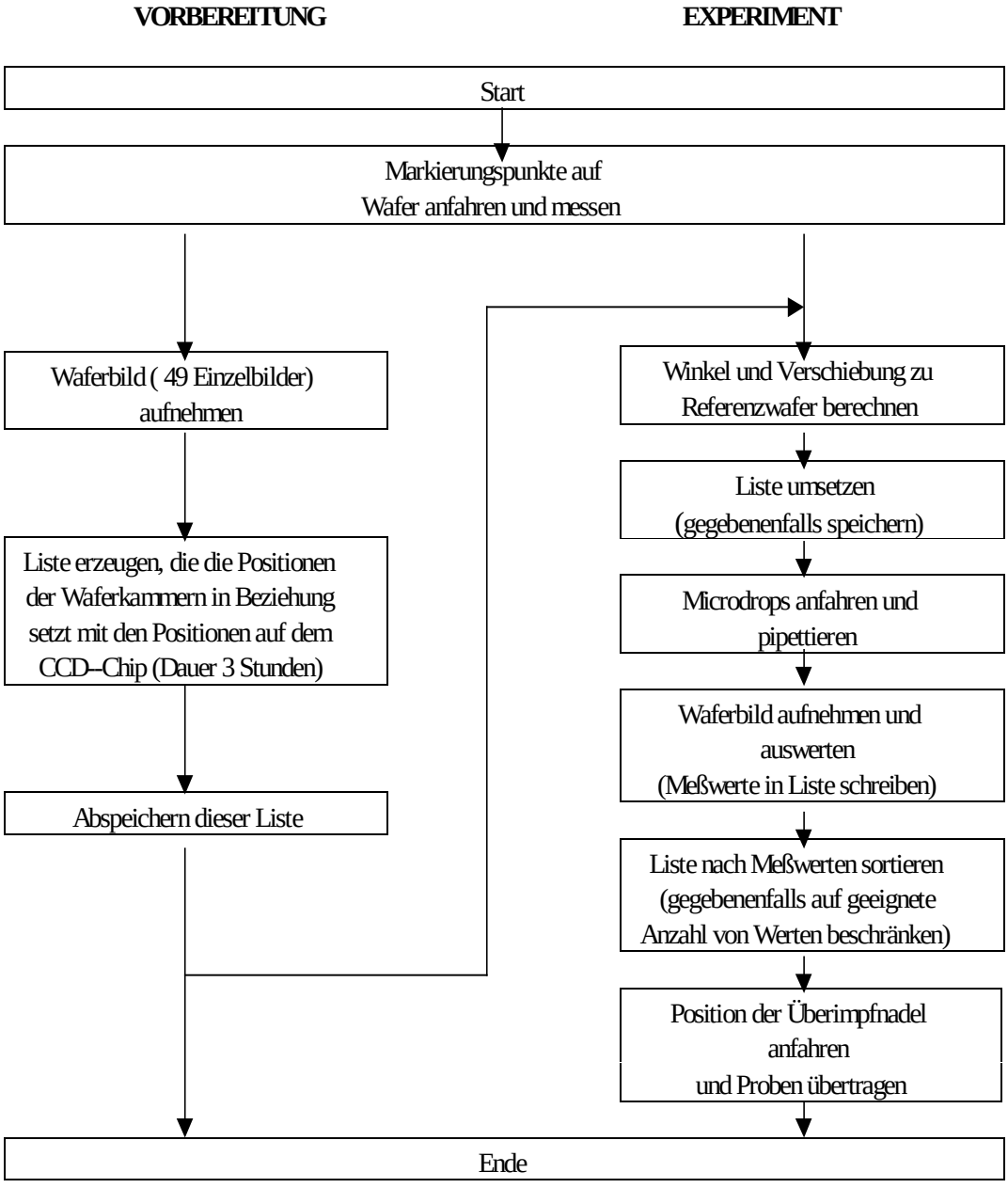


Abbildung3–23: Schema der automatischen Erkennung der Reaktionskammern.

3.4.3. Bildverarbeitungsalgorithmen

Die Software muß mehrere Anforderungen erfüllen:

- Die Online-Fähigkeit muß gewährleistet sein
- Damit die Microdrop-Tropfen abgesetzt werden können, müssen die Kammern mit ausreichender Genauigkeit erkannt werden.
- Zudem sollte für verändertes Kammerdesign keine größere Veränderung der Software nötig sein.

Um diese Anforderungen zu erfüllen, muß entsprechend der oben erklären Prozeßsteuerung vor dem Experiment eine Maske bestimmt werden, die die Informationen des verwendeten Wafers enthält:

Maskenbestimmung

Initialisierung:

Deklaration der Variablen
Initialisierung der Variablen
Kommunikation mit Verschiebetisch initialisieren

Maskenbestimmung:

1. Wafer so unter CCD fahren, daß Markierungspunkte sichtbar werden
2. 49 Bilder aufnehmen
3. Festlegen der Markierungspunkte
4. Bestimmung der Waferkammern
5. Bestimmung der Randkammern und Korrektur der überlappenden Kammern
6. Schritte wiederholen, bis sämtliche Kammern festgelegt sind
7. Abspeichern der Kammern in einer Datei, die so angelegt ist, daß zu diesen Daten Helligkeitswerte zusätzlich abgespeichert werden können

Die einzelnen Probenkammern müssen vor dem eigentlichen Versuch von einem Programm erkannt werden, damit dann die entsprechenden Dosiersysteme angefahren werden können. Nach der (chemischen) Synthese muß dann die Vermessung der Kammern erfolgen. Da spätestens hier die Position der Kammer bekannt sein muß, erweist sich die automatische Detektion als Vorteil, da dann fehlerhafte Kammern nicht erkannt (bzw. aussortiert) werden und in Ihnen keine Synthese vorgenommen wurde.
Für die einzelne Synthese bzw. Kompatibilitätsexperimente und neuer Wafermuster müssen jeweils neue Ausleseraster entwickelt werden. Dies wird durch die im folgenden beschriebene Software geleistet.
Wie im Kapitel über die Prozeßsteuerung erklärt, wird der Wafer in 49 Einzelbildern sequentiell aufgenommen.
Das Bildsignal wird vom CCD – Sensor ausgelesen, übertragen und digitalisiert im Bildspeicher abgelegt. Der Ursprung des rechnerinternen Koordinatensystems befindet sich in der linken oberen Ecke des digitalisierten Bildes. Durch eine Koordinatentransformation (Drehung) wird das Tischkoordinatensystem auf dieses Bild projiziert.

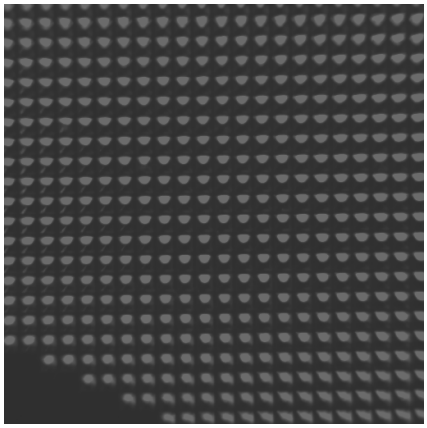


Abbildung3–24: Kammerdetektion des Wafers: Eines von 49 Teilbildern des Wafers, aufgenommen mit der CCD. Unten links liegt der Rand des Wafers. Dies erkennt man an den fehlenden Kammern. Die Grauwerte, die die CCD liefert, wurden auf Maximal - und Minimalwert skaliert und dargestellt.

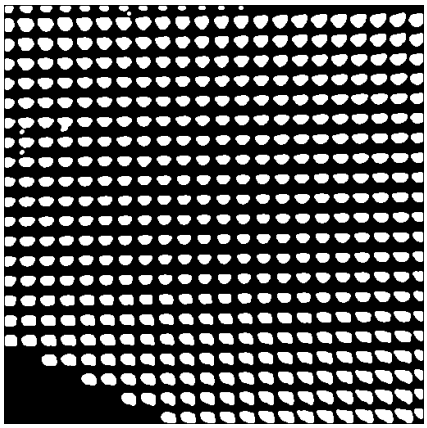


Abbildung3–25: Kammerdetektion - Schwellwertbildung: nachdem für Abbildung3-24 ein Schwellenwert definiert wurde, das Bild dann in ein Binärbild umgewandelt wurde, wurde durch wiederholte Anwendung morphologischer Operationen (opening) einzelne „helle“ Pixel eliminiert.

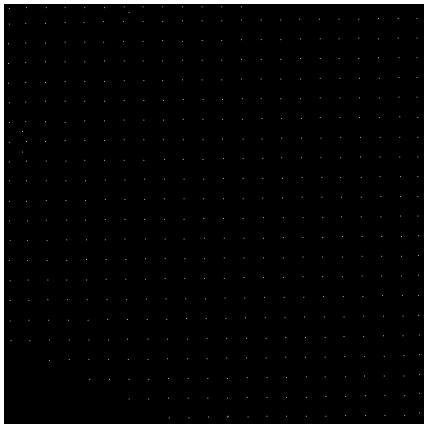


Abbildung3–26: Kammerdetektion - Label-Operation: Jedem zusammenhängenden Gebiet in Abbildung3-25 wurde durch eine „Label Operation“ ein ganzzahliger Wert zugeordnet und in diesem Gebiet der Schwerpunkt berechnet Diese Schwerpunkte sind in der Abbildung dargestellt.

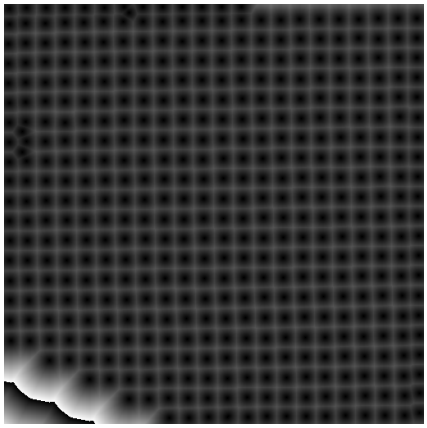


Abbildung3–27: Kammererkennung - Distanz-Transformation: Zwischen den Schwerpunkten in Abbildung3-26 wird durch die Distanz- Transformation je nach Abstand ein größerer Wert zugeordnet.

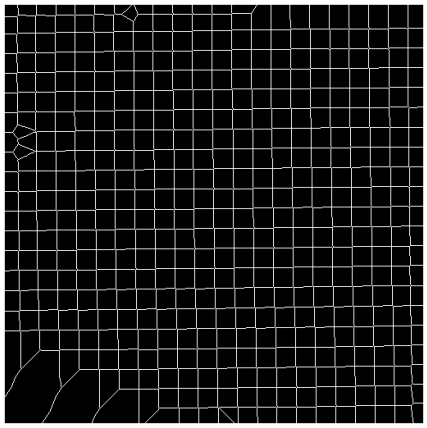


Abbildung3–28: Kammererkennung - Skelett-Bildung: Durch „Skelett-Bildung“ von Abbildung3-27 wird ein Gerüst zur Verfügung gestellt, anhand dessen entschieden werden kann, ob eine Probenkammer gefunden wurde, oder ob es sich um eine Randkammer handelt, oder ob die Kammer beschädigt ist. Als Kammermittelpunkt wird der in Abbildung3-26 gefundene Schwerpunkt gespeichert.

Die Aufnahmen der Kammern zur Maskenbestimmung, die vor den eigentlichen Messungen erfolgen muß, bestehen aus bis zu vier spiegelnden Bereichen, die aufgrund

des Kammerdesigns (54^0 Neigung der Seitenfläche, Bild 3-12) keine zusammenhängende Bereiche bilden. Deshalb muß durch morphologische Operationen (Erosion[7] und Dilatation[8], zu den morphologischen Operatoren siehe Steinbrecher[127], Ballard et al.[6]) die Kammern eindeutig identifizierbar gemacht werden, um dann abgespeichert werden zu können.

Das weitere Vorgehen ist folgendermaßen bestimmt:

Algorithmus:

- Bild einlesen und Minimum Maximum, Mittelwert und Standardabweichung berechnen
- Schwellenwert berechnen, so daß 36% der hellsten Grauwerte des Bildes im Binärbild als hell gespeichert sind. Der Wert 36 ist empirisch, hat sich aber für die Beleuchtungsverhältnisse der Kammern bewährt.
- Vom Binärbild wird ein zweifaches binäres ‚Opening[9]' (2 Dilatationen gefolgt von 2 Erosionen) angewandt. Das Resultat wird untersucht auf zusammenhängende Gebiete. Alle Pixel eines Gebiets bekommen den gleichen Pixelwert. Das erste Gebiet den Wert 1, das zweite den Wert 2, usw.
- Nun werden die Schwerpunkte der Gebiete berechnet und in den Listen gespeichert.
- Zwischen diesen Punkten wird ein Skelett gebildet und die Fläche der Gebiete berechnet (Pavlidis[93])

[7] Die Erosion liefert den Teil des Originalbildes, der komplett von einer vorgegebenen Maske bedeckt wird.

[8] Die Dilatation liefert die „Vereinigungsmenge" von Originalbild und Maske.

[9] Die Kombination Erosion-Dilatation dient im wesentlichen zur Beseitigung von Störungen in Form von vereinzelten Bildpunkten, kleiner Strukturen oder Auswüchse.

Es gilt als Kammer, wenn

Der Schwerpunkt nicht in den linken 20 Pixeln am Rand,
nicht in den rechten 20 Pixeln am Rand,
nicht in den oberen 20 Pixeln am Rand,
nicht in den unteren 20 Pixeln am Rand liegt
und
eine empirische Mindestgröße (Fläche>400),
eine empirische Maximalgröße (Fläche<700) erreicht wird.

Sind die ersten vier Bedingungen erfüllt und eine der letzten beiden nicht, so wird getestet, ob das Kriterium für ein Rechteck mit Seitenverhältnis 2:1 erfüllt ist (dies entspricht dem Quotienten vom Umfang* Umfang zu Fläche).
Wird ein Gebiet mit allen 6 Bedingungen als Kammer akzeptiert, dann werden die Bildnummer, die X und Y Koordinate (Bildkoordinaten) des Schwerpunktes in diesem Bild, die berechneten Tischkoordinaten dieses Gebiets in einer Liste gespeichert und anschließend der Zeiger in die Liste inkrementiert.

Dieses Verfahren wird für die 49 Bilder angewandt. Danach wird die Liste auf doppelt gezählte Kammern getestet und entsprechend korrigiert
Da es durch Optik, evtl. Tischungenauigkeit, evtl. Rechenungenauigkeit und Diskretisierung möglich ist, daß für gleiche Kammern in verschiedenen (sich überlappenden) Bildern leicht unterschiedliche Tischkoordinaten ermittelt werden, gilt, daß zwei Kammern als identisch betrachtet werden, wenn der Absolutbetrag ihrer X-Differenz und der Absolutbetrag ihrer Y-Differenz kleiner als zwei vorgegebene Parameter sind.

3.4.4. Experimentelle Nachweise der CCD-Empfindlichkeit

Um die Empfindlichkeit des Detektors zu testen, wurde eine Konzentrationsreihe von Fluorescein unter nicht optimierten Bedingungen auf den Wafer aufgetragen. Die Stammlösung 1000 µM Fluorescein ergab bei einer Belichtungszeit von 1s und einer eingestrahlten Leistung von 0.1 Watt Laserlicht bereits die Sättigung der digitalen CCD. Es ist ohne weiteres möglich, 9 amol/µl mit der verwendeten CCD nachzuweisen.

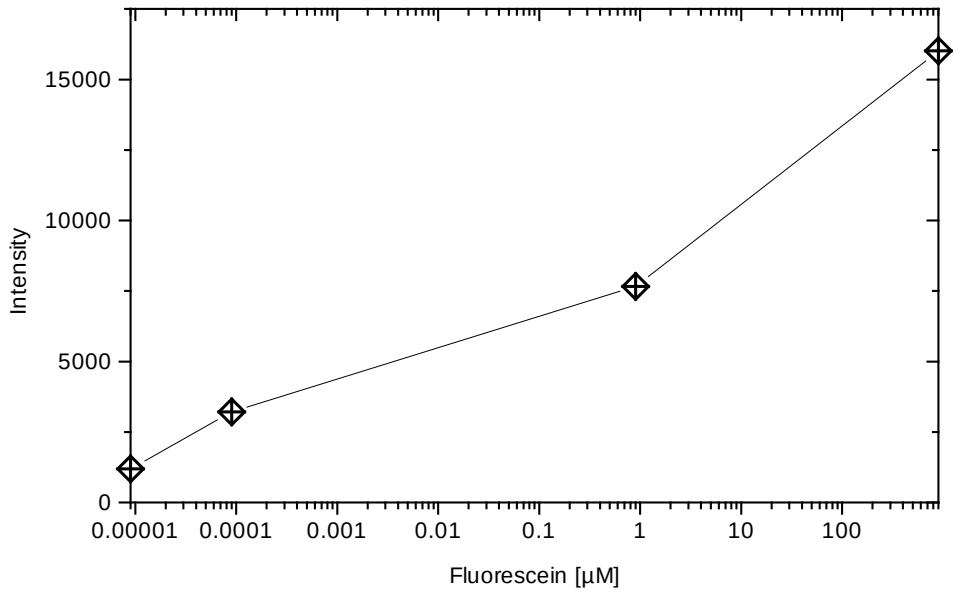


Abbildung3–29: CCD-Empfindlichkeit: Fluorescein ist als empfindlicher Farbstoff eingeführt und als Testsystem geeignet. Das Bild zeigt die Intensität des ausgelesenen Signals in Abhängigkeit der Konzentration des Farbstoffes bei einer Laseranregung von 0.1 Watt und einer Belichtungszeit von 1 sec.

3.5. Optische Detektion

Weitere Miniaturisierung ist nur zu erreichen bei Verstärkung des Signals bei der optischen Abbildung der Proben für das CCD - Kamera System. Hier wird die Amplifikation des Signals durch Mikrolinsen für das CCD - Kamera System vorgestellt. Im folgenden werden die prinzipiellen optischen Parameter von den beiden verfolgten Ansätzen – den adaptierten kommerziellen Mikrolinsen und dem selbst konstruierten Linsenarray dargestellt.

3.5.1. Theoretische Überlegung

Prinzipiell ist es die Aufgabe einer jeglichen Optik, elektromagnetische (oder Materie-) Wellen von einem Objekt auf einen Detektor abzubilden. Hier ist der Detektor ein CCD-Chip und das Objekt eine leuchtende Fläche, die photometrisch vermessen werden soll.

Der Öffnungswinkel und damit die vermessene Intensität läßt sich nicht durch Verringerung des Abstandes der CCD – Kamera zu dem abzubildenden Objekt steigern, er ist vielmehr von dem verwendeten Linsensystem und der dazugehörigen Apertur abhängig. Deshalb ist es von keinem Vorteil für photometrische Messungen, den Abstand zu dem zu vermessendem Objekt zu verringern. Die einfallende Intensität wird von der strahlenbegrenzenden Pupille bestimmt. Diese liegt i.A. im Objektiv. Es ist jedoch möglich, die Probenfläche bei gleichbleibender Flächenintensität zu steigern, indem man mit (Mikro) – Linsen (oder einem Mikroskop allgemein) die abgebildete Fläche vergrößert.

Mikrolinsen:

Mikrolinsen wurden in den letzten zwei Jahrzehnten mit weiten technischen Applikationen auf verschiedenen Feldern eingeführt zum Beispiel in der Kommunikationstechnik, hier ist vor allem die Glasfiber-Optik (Shimada et al.[119], Singer et al.[121]) zu nennen, für die Abbildung in mikrooptischen Systeme (Hamanaka et al.[51]), Anwendungen für Brennpunkt Analysatoren (Engelhardt et al.[37]), oder als wellenoptische Linsen in integrierten optischen Geräten zur Informationsübertragung

und Verarbeitung: Rf Spektrum, Matrix Prozessoren, optischen Köpfen zum Auslesen von CD's (Belostotsky et al.[8]).
Systeme, die aus Mikrolinsen Arrays und CCD Kameras bestehen werden in Tsi et al.[140] dargestellt.

Betrachtungen zur Überhöhung der Signale bei vorgeschalteten Mikrooptiken

Wie oben schon dargestellt ist es Aufgabe einer Optik möglichst viel Signalintensität von der zu untersuchenden Probe auf die Detektorfläche zu bekommen. Hierzu wurden drei Möglichkeiten diskutiert:

- Die Probe ist direkt auf einen Detektor aufzubringen, so daß kein abbildendes System notwendig wird.
- Über ein mikrooptisches Linsensystem wird direkt auf eine CCD Kamera abgebildet.
- Das mikrooptische System wird als ein Array von Linsen eingesetzt, um eine Signalüberhöhung direkt über der Probe zu erreichen und dann wird dieses Signal über eine „normale Optik" auf die Detektorfläche abgebildet.

Überprüft werden sollte auch die Frage, wie "nah" es möglich ist an einen CCD Chip heranzugehen, ohne das Ergebnis der Messung auf Grund thermischer Einflüsse zu beeinflussen. Mit einer kostengünstigen CCD wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt.
Es konnte gezeigt werden, daß eine akzeptable Auflösung bei Abständen > 1 mm ohne Optik nicht zu erzielen ist. Umgekehrt sind aber nähere Abstände bei einer gekühlten CCD nicht zu realisieren. Der Grund hierfür ist der Wärmeübertrag, der entweder die biologischen Proben gefrieren läßt oder umgekehrt bei größeren Probenvolumen zu einer Erwärmung der CCD führt: Das Rauschen (der Dunkelstrom) einer CCD ist auf Grund seiner Halbleitereigenschaften (z.B. Beal et al.[9]) von der Temperatur abhängig (siehe Kap 3.4.1). Bei steigender Temperatur nimmt die Empfindlichkeit einer CCD mehr als exponentiell ab; übrigens ein Argument, daß man auch für das direkte

Auftragen von Proben auf eine faseroptische Platte mit direkter Kopplung zur CCD verifizieren konnte. Ohne spezielle thermische Einrichtungen ist dieser Weg nicht gangbar für biologisch aktive Materialien.
Das Auftragen von Proben direkt auf nicht gekühlte CCD-Chips wurde bisher nicht untersucht, da dazu günstige Bezugsquellen für Chips mit modular einzubauender Elektronik vorhanden sein müßten. Zudem wäre für diesen Ansatz das Problem der elektrischen Isolierung zu dem Chip zu lösen. Der Erfolg erscheint daher auch wegen des hohen thermischen Rauschanteils im Signal als problematisch.
Es wurden daher sowohl handelsübliche wie auch speziell gefertigte Mikrooptiken getestet:

Die Abbildung wird hier durch ein Mikrolinsensystem, als System von vorverstärkenden Linsen, realisiert, das die Apertur der herkömmlichen Optik analog des Immersionsprinzips erhöht.
Die numerische Apertur eines Mikroskopobjektivs läßt sich sogar über den Wert 1 steigern, wenn man das Objektiv samt Probe in Öl taucht (Immersion). Dieses Prinzip läßt sich auf das hier beschriebene Problem anwenden, indem man das Öl (mit hohem Brechungsindex) durch ein Mikrolinsenarray ersetzt. Die Voraussetzung dafür sind natürlich die gleichmäßig strukturierten Probenkammern, die entsprechend entworfen werden müssen.
Die numerische Apertur NA eines Objektives ist durch den maximal einfallenden Strahl gegeben.

$$\sin\delta_{\max} = NA \qquad (1)$$

D.h., die auf das Objektiv fallende Strahlung kommt aus dem Raumwinkel Ω:

$$\Omega = \iint \sin\delta \, \mathrm{d}\delta \, \mathrm{d}\varphi \; = 2\pi \int_0^{\delta_{\max}} \sin\delta \, \mathrm{d}\delta = 2\pi \left[-\cos\delta \right]_0^{\delta_{\max}} \qquad (2)$$

Das Integral ausgewertet, ergibt

$$\Omega \; = \; 2\pi \left(1 - \sqrt{1 \; - NA^2} \right) \qquad (3)$$

Da nur ein Anteil von $4\pi / 2$ nach vorne gestrahlt wird, ergibt sich mit P_{total} als nach vorne abgestrahlter Leistung die auf das Objektiv fallende Leistung zu:

$$P(NA) = \; P_{total} \left(1 - \sqrt{1 - NA^2} \right) \qquad (4)$$

Als numerisches Beispiel betrachte man ein hochgeöffnetes Objektiv 1.5:1. Das entspricht einer numerischen Apertur von *NA* = 0.33. Dann fällt von der Probenfläche nur noch P (*NA*) = 5,6 % Leistung auf das Objektiv. Vergrößert man die effektive Probenfläche und damit den Raumwinkel bezüglich der betrachteten Kammer mit Hilfe eines abbildenden Systems (dem Mikrolinsenarray) um den Abbildungsmaßstab ν, dann ergibt sich als Näherung für die transmittierte Leistung:

$$P_{trans} = P_{total} \left(1 - \sqrt{1 - \sin^2}\delta \right) = \; P_{total} \left(1 - \sqrt{1 - \nu^2 \, \sin^2}\delta' \right) \qquad (5)$$

zur Erklärung der Winkel siehe Bild 3-30:

Das heißt, für eine nur dreifache Vergrößerung der Fläche ergibt sich ein theoretischer Wert von $P_{trans} \; = \; 90\,\%$.

Berücksichtigt man die begrenzte Apertur der Mikrolinsen, so läßt sich der Öffnungswinkel des Objektivs bezüglich einer Kammer von 20° auf 32° steigern unter der Voraussetzung der Linearität der gesamten numerischen Apertur des Systems, das

aus den Mikrolinsen der Apertur 0.2 und dem CCD-Objektiv der Apertur 0.33 besteht. Mit Hilfe der Transfer Matrix Methode läßt sich die lineare Näherung ableiten. Mit Gleichung 4 erhält man eine 2.7 fache Steigerung des Signals. Dies ist der maximale Wert, falls die gesamte Mikrolinse eingesetzt werden kann. Hierbei ist auch zu beachten, daß die Bilder des Mikrolinsenarrays sich nicht überschneiden dürfen, d.h. die Probenkammern weit genug auseinander gelegen sein müssen. Dies läßt sich jedoch durch geeignetes Design der Kammern erreichen:
Überschneiden sich die Bilder nicht, gibt Gleichung 5 die geeignete Näherung. In den Experimenten wurde eine 2-fache Verstärkung des Signals eingesetzt, so daß die Vergrößerung in etwa einem Faktor 4 entsprach (siehe Ergebnisse).

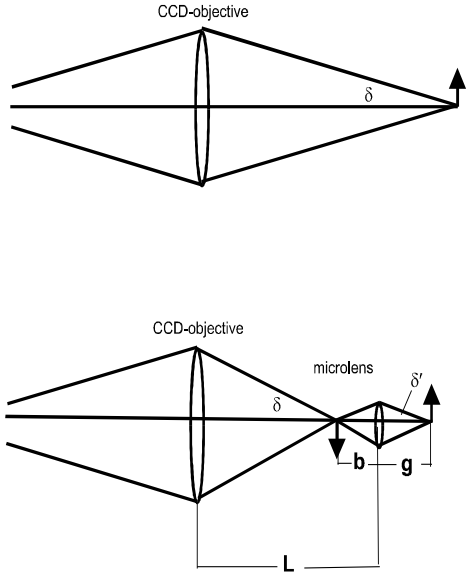


Abbildung3–30: Strahlengangs des optischen Systems: Es besteht aus CCD Objektiv und Mikrolinse. δ bestimmt die winkelabhängige Apertur des CCD Objektivs, δ' ist die Winkelapertur der Mikrolinse. Mit L >> b, g gilt die folgende Näherung: $\sin^2\delta = \nu^2 \sin^2\delta'$ *mit ν=b/g; b und g sind die Abstände zum Bild, bzw. zum Objekt von der Mikrolinse.*

Es wurden daher miniaturisierte Optiken entwickelt und vermessen. Dabei wurden klassische Lösungen (Glasoptiken, klassische Fertigungstechnologie) untersucht.

Zusätzlich wurden am Markt verfügbare miniaturisierte Optiken auf Ihre Eignung untersucht und angefertigt.

3.5.2. Experimentelle Nachweise

Messungen haben hierzu einen Faktor 4.1 in der Vergrößerung der transmittierten Leistung mit einer Mikrooptik (NSG Europe) der Brennweite f = 0.56 mm, Durchmesser 0.25 mm mit einer Apertur von 0.23 ergeben. Dies ist die in der Näherung abgeschätzte Größenordnung der zu erwartenden Signalsteigerung.

Experimente mit kommerziell erwerbbaren Mikrolinsen:

Als Detektor wurde die auf dem Automaten eingesetzte CCD-Kamera (Photometrics, CH 220) verwendet. Die Empfindlichkeit einer solchen gekühlten CCD ist in etwa bei 50 µV per Photon (siehe Kapitel 3.4.1) und besitzt ein Signal/Rausch Verhältnis von etwa 60. Das CCD System (Thompson CCD chip) wurde mit einem Leica Objektiv (Noctilux M 1,5:1) kombiniert.

Als Mikrooptik wurde ein Mikrolinsenarray von NSG Europe (Nippon Sheet Glas) untersucht. Die Linse hat eine Brennweite von f = 0.56 mm, einen Durchmesser von 0.25 mm und eine numerische Apertur von 0.20.

Der InSpeck Green (490/515) „Microskop Image intensity calibration kit“ von Molecular Probes wurde benutzt um die optischen Parameter des Mikrolinsenansatzes zu untersuchen.

Die fluorimetrisch markierten Beads wurden in die Mikrokammern der Nanotiterplatte sortiert, ein 4-inch Wafer mit maximal 6000 Kammern (1mm Raster), der anisotrop in Einkristallmaterial geätzt wurde. Die Geometrie einer Kammer ist eine invertierte Pyramide mit 800 μm^2 Kammeröffnungsfläche und 100 μm^2 Fläche am Boden. Das Volumen entspricht in etwa 100 nl. Die Größe wird durch die Wafer Dicke und den Fabrikationsprozeß bestimmt (Mayer et al.[80])

Das Mikrolinsenarray wurde ca. 1.5 mm über der Kammer justiert, so daß die Vergrößerung $\nu \sim 2$ entsprach. Die optisch transparente Membran am Boden wurde von unten mit einer Strahlungsquelle illuminiert. Ein Lexel Argon Ionen Laser (Model 95) wurde für die fluorimetrischen Experimente benutzt. Das Signal wurde mit der CCD über ein Absorbtionsfilter bei 500nm detektiert. Figur 2a zeigt den beleuchteten Bead im Wafer einsortiert. Das Signal wurde um einen Faktor 4.1 verstärkt. (Figur 2b) zeigt das Bild mit der Mikrolinse. Die Messung wurde mit 400 Pixels (20^2) bei beiden Bildern vorgenommen.

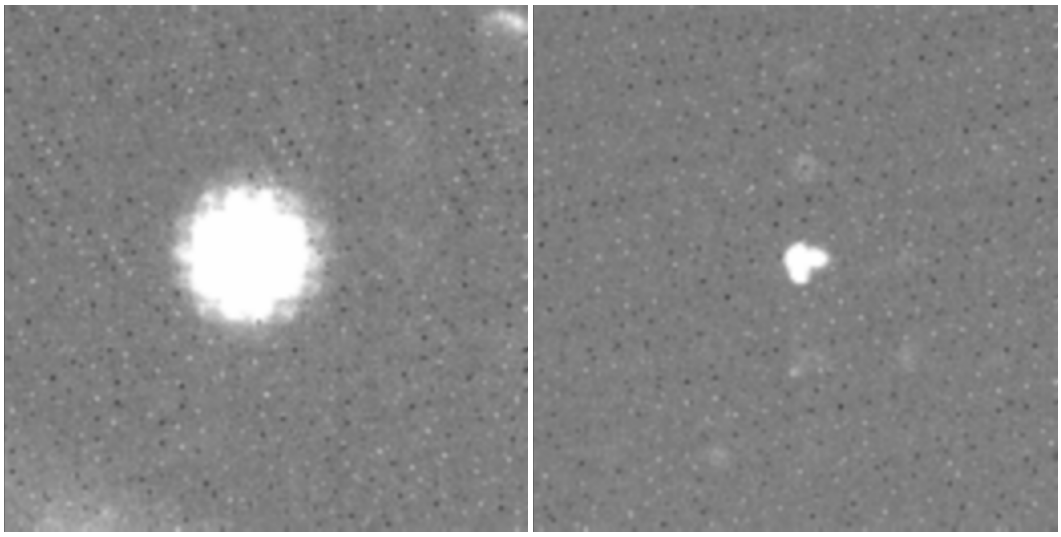


Abbildung3–31: Signalverstärkung mit kommerziell erhältlichen Mikrolinsen: rechts wird der fluoreszenzmarkierte Bead einsortiert und beleuchtet in der Reaktionskammer gezeigt. Das Signal wird um den Faktor 4.1 (links) mit der Linse verstärkt.

Resultate mit selbst konstruierten Mikrolinsenarrays

Für Screening Anwendungen ist es notwendig eine große Anzahl von Probenkammern zur selben Zeit vermessen zu können. Daher wurde ein Mikrolinsenarray für das oben beschriebene Waferformat konstruiert. Auf einer planaren Glasplatte (BK7, Dicke 1.5 mm) wurden Halbkugeln aus Glas (BK7) durch einen Diffussionsschweißprozeß aufgebracht. Die Halbkugeln wurden aus Glaskugeln mit dem Durchmesser von 1 mm durch Polieren gefertigt. Das Mikrolinsenarray besteht aus 68 Linsen. Das Array wurde direkt über den Kompartimenten des Wafers justiert (siehe Abbildung 3-32,oben).

Die Wafer Kompartimente wurden durch eine Lichtquelle und einen Diffusor (Milchglas) beleuchtet, so daß $g \sim 1.5$ mm und wieder $\nu \sim 2$ war (siehe Abbildung 3-32, Mitte). Die Verstärkung durch das Array ist in Abbildung 3-32, unten dargestellt.

Der Fabrikationsprozeß ist nicht perfekt bezüglich der Positionierung der einzelnen Linsen und des Schweißprozesses aus dem Trägerglas. So ist die vierte Position in der zweiten Reihe nicht mit einer Halbkugel besetzt, dasselbe gilt für die zweite Spalte und die letzten beiden Reihen.

Die Messung des Signals ergibt die erwartete Verstärkung um einen Faktor 4 bis 5. Die Auswertung der einzelnen Kammern des beleuchteten Wafers ohne Mikrolinsen ergibt eine Standardabweichung von 18 % des durchschnittlichen Signals. Wird das Signal durch Mikrolinsen verstärkt ergibt sich ein Faktor 4 an Verstärkung. Die Standardabweichung ist 25 %. Auf Grund der Fabrikationsfehler und Justierungsfehler wurden nur die inneren 38 Linsen ausgewertet (nicht die erste und letzte Reihe, nicht die erste und letzte Spalte).

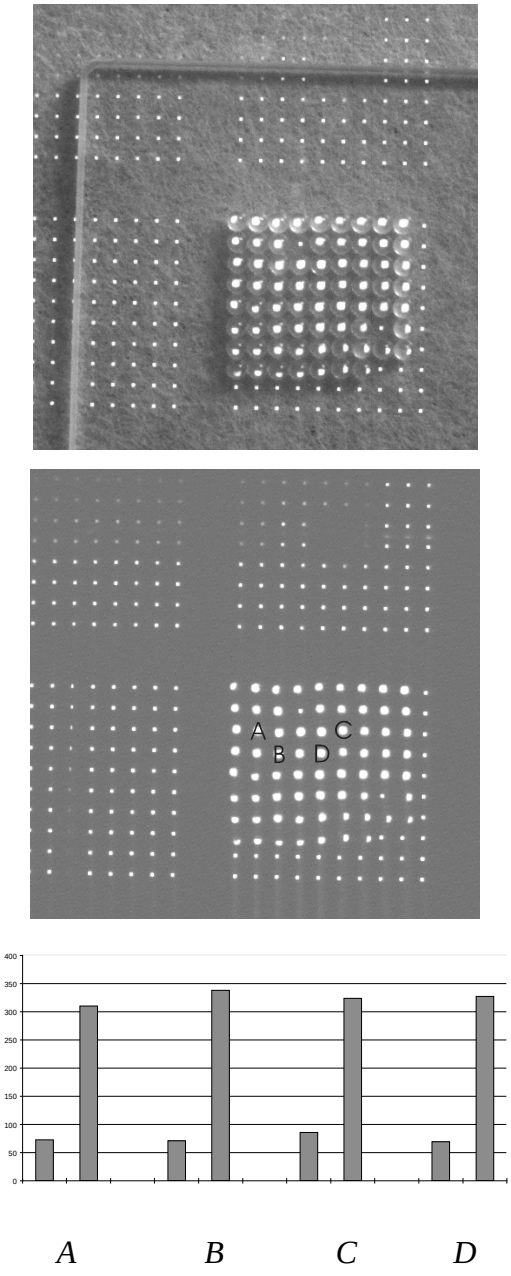


Abbildung3–32: Signalverstärkung mit selbst entwickelten Mikrolinsen: Oben: Ein mit der CCD aufgenommenes Bild des selbstentworfenen Linsenarrays, das von oben und unten beleuchtet wird. Mitte: Die Messung mit der CCD, wobei nur von unten durch eine Streuscheibe belichtet wird. Unten: Das vermessene Signal in vier ausgewählten Kammern ist mit und ohne Mikrolinsenarray gezeigt. Die Verstärkung ist vier bis fünffach.

Der erwartete Effekt der Signalverstärkung bei der Verwendung von Mikrolinsen ist also in guter Übereinstimmung mit dem Experiment. Die theoretische Abschätzung liefert in erster Näherung einen Faktor 4 für die Verstärkung für beide getesteten Linsenarten. Eine weitere Miniaturisierung von Reaktionskammern benötigt für fluorimetrische Messungen eine solche Signalverstärkung. Eine Lösung des Problems könnte die Verwendung der beschriebenen Linsen der Nippon Sheet Glas in Mikroreaktionskammern mit 100µm *100µm Fläche sein. Die fokale Länge bestimmt die maximale Packungsdichte der Miniaturisierung: Das Signal einer Kammer sollte nicht von zwei verschiedenen Linsen abgebildet werden. Für die Nanotiterplatten mit 1 mm Raster kann die Verstärkung des Signals ebenfalls mit einem Mikrolinsenarray gezeigt werden, jedoch ist die Herstellung dieser Linsenarrays nicht optimiert. Eine Möglichkeit alternativer Herstellung solcher Arrays wird in Köhler et al.[64] aufgezeigt.

4. Experimente

4.1. Chemische Synthese

Die automatisierte organische Festphasensynthese in Mikroreaktionskammern sollte anhand der Synthese von Peptiden untersucht werden. Dafür sind bereits Automaten kommerziell erhältlich und Syntheseprotokolle verfügbar. Typisch für die Festphasensynthese von Peptiden ist, daß die Synthesebedingungen weitgehend unabhängig von dem jeweils verwendeten Baustein sind. Inwiefern sich etablierte Syntheseprotokolle auf die Anwendung im minaturiesierten Maßstab übertragen lassen, sollte anhand einer Kopplung einer Aminosäure an eine bereits polymergebundene Aminosäure untersucht werden.

Als Funktionsnachweis der Synthesemaschine wurde eine Bibliothek von 243 Pentapeptiden synthetisiert. Dazu mußten erhebliche Anpassungen sowohl aller Komponenten der Maschine als auch des Syntheseprotokolls erfolgen.

Insbesondere sind hier die Microdrops zu nennen, die für die Reagenzien teilweise umgebaut wurden und die Wafer, die erst durch Titanbeschichtung der Unterseite den nötigen Unterdruck aushielten, um die Reagenzien von den Syntheseperlen abzusaugen.

4.1.1. Adaption der Mikrodosierer, Waschstation

Technische Optimierung. Die unempfindliche Peptidsynthese wurde als ein Modell für den Verfahrensablauf der Chemie in Mikrosiebbodenkammern des Wafers gewählt. Auf Grund des niedrigen Dampfdruckes der verwendeten Lösungsmittel konnte dabei offen gearbeitet werden, so daß hier keine Abdeckelung nötig war. Tests haben ergeben, daß es möglich ist, in den Kammern auf Polystyrolbeads Synthesen durchzuführen, daß aber auf Grund von Oberflächeneffekten die üblichen Parameter zur Synthese wie Oberflächen/Volumenverhältnis, Reaktionszeit, Reaktionsparameter wie Temperatur eigens für dieses Verfahren zu optimieren sind.

Es zeigte sich, daß sich die Aminosäure - Lösungen erheblich in den Viskositäten unterscheiden. Daher mußten für Phe, Glyn und Leu optimierte Kapillaren mit geringerer Dämpfung in die Microdrop- Dosiersysteme eingebaut werden. Zusätzlich auf Grund anderer Oberflächenspannung reichte als Haltedruck in der Microdrop-Düse nicht das Gewicht der Säule aus, die sich aus dem Höhenunterschied der Substanz zum Vorratsgefäßes ergibt, so daß für diese Aminosäuren eine elektronische Regelung für den Haltedruck eingebaut werden mußte.

Wegen Ausfällreaktionen im Düsenkopf aufgrund der Konzentration der Aminosäuren wurde ein spezielles Verfahren zur Befüllung des Dosiersystems entwickelt.

Dagegen benötigte man für Lösungsmittel mit niedrigen Dampfdruck eine angepaßte elektronische Ansteuerung der Mikrodrops z.B. für DCE (Dichlorethan) eine Ansteuerung mit Tiefpaßfilter, die flachere Flanken im Rechtecksignal der Ansteuerung erzeugt.

Es konnten Parameter gefunden werden, die Kopplungseffizienzen größer als 95 % pro Kopplungsschritt gewährleisten. Das bedeutet 100 pMol Ausbeute pro Perle. Die nächsten Verfahrensoptimierungen (siehe unten) betrafen das Reduzieren der Standzeiten und das Optimieren des Ablaufprotokolls [10] und die chemische Verfahrenstechnik.

Waschstation: Zur Optimierung der Synthese war es sinnvoll, alle Schritte, die keine individuelle Substanzabgabe erfordern zu parallelisieren. Entsprechend des Peptid-syntheseprotokolls sind dies der Wasch - und Entschützungsschritt. Dazu wurde eine parallele Waschstation aufgebaut. Sie wurde aus einer pumpengetriebenen Flüssigkeitszufuhr und einer Druckkammer aufgebaut. Diese dient zum gleichmäßigen Verteilen der Flüssigkeit auf eine Kammer, die direkt auf den Wafer gesetzt wird. Daß sich dieser Ansatz zum paralleln Waschen von Synthesekammern eignet, konnte durch Versuche mit Wasser und DMF gezeigt werden. Probleme existierten in der mangelnden

[10] Abschätzung zur aufgebauten Maschine: < 10000 Proben als Obergrenze beim augenblicklichen Verfahren.

Ansteuerbarkeit bzw. Genauigkeit peristaltischer Pumpen, d.h. vor allem das Abschalten der Pumpe wirkte nicht sofort, sondern ergab ein Nachlaufen der Flüssigkeit. Dieser ”Delay” ließ sich durch einen exakteren Pumpenantrieb (eine Hamilton-Kolbenspritze) verkleinern und durch kleinere Druckkammern (kleineres Totvolumen) eliminieren. Zudem sind die Flüssigkeiten genauer pipettierbar. Die im Vergleich zu den Bausteinlösungen eingesetzten großen Mengen an Waschsubstanzen stellen aufgrund des niedrigen Preises und der guten Verfügbarkeit den routinemäßigen Einsatz dieses Verfahrens nicht in Frage. Die Waschlösung wird in Form eines Filmes auf den Wafer aufgetragen. Die so eingebrachte Substanzmenge der Waschsubstanz entsprach in etwa dem Doppelten der Menge, die beim Verwenden von Mikrodosierern eingebracht werden muß (siehe Kap. 3.2.5.)

4.1.2. Waferstabilität

Siebverstärkung: Es zeigte sich, daß bei mehrmaligem Einsatz derselben Siebboden - Wafern, die mechanische Stabilität der Siebstege ermüdet. Durch Aufbringen metallischer Schichten (Sputtern mit Titan, Mayer et al.[81]) konnte dieses Problem gelöst werden.

Absaugdruck: Um großflächiges Absaugen während der Synthese bei großen Probenzahlen zu ermöglichen, wurde der optimale Absaugdruck bei dem verwendeten Waferdesign ermittelt (siehe Bild). Die optimale Fläche von ca. 2.5 cm^2 mündete in ein neues Waferdesign und neuen segmentierten Absaugkammern für Probenzahlen größer 200 Kammern. Der Druck p_0 ist der von der Hausversorgung bereitgestellte Unterdruck von 700 mbar. Die Idealbedingung wurde bei halben Hausdruck gefunden. Der Druck wird über die Absaugfläche skaliert. Zusätzlich muß mit einem konstanten Faktor der Druckabfall in den Leitungen berücksichtigt werden. Dieser Faktor ist nicht bekannt. Für große Absaugflächen bei hohem Druck ist die mechanische Stabilität der Wafer nicht mehr gegeben.

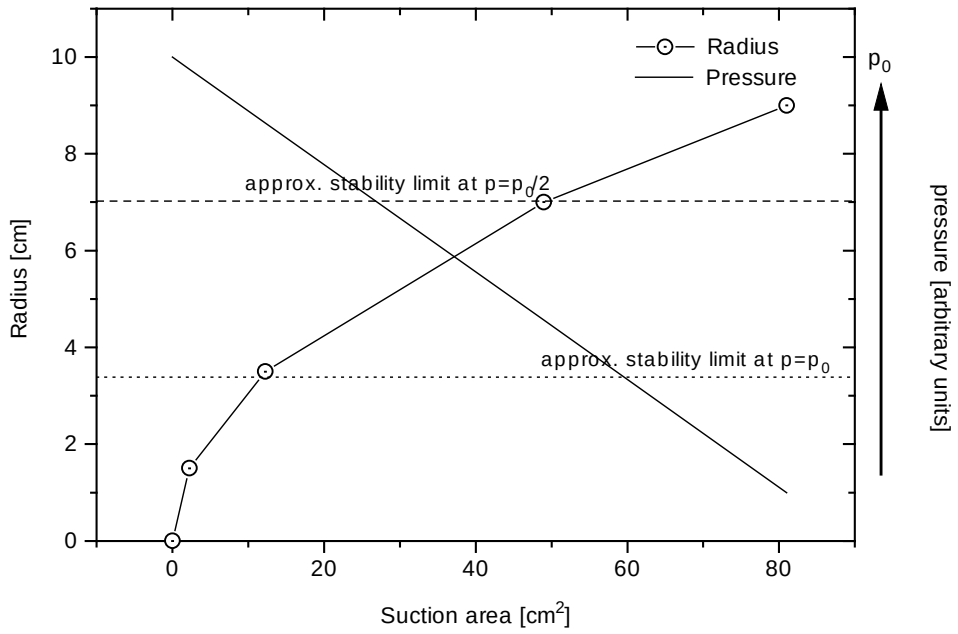


Abbildung4–1: Waferstabilität: Die Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen Absaugdruck, Fläche und Stabilität. Durch Test konnte das optimale Verhältnis ermittelt werden (siehe Text).

4.1.3. Protokoll der chemischen Synthese

Die Peptidsynthese erforderte drei Lösungen: Dimethylformamid (DMF), aktivierte Aminosäure, Piperidin/DMF. Die Verwendung von bereits aktivierten Aminosäuren in Form von Pentafluorphenyl- (OPfp-) Estern machte die in situ Aktivierung überflüssig.
Die Analyse der Peptid-Kupplung sollte mi Hilfe der RP (reversed phase) - HPLC (High performance liquid chromatography) erfolgen. Ein kritischer Punkt ist dabei die erforderliche Empfindlichkeit in der Detektion. Mit UV-Absorption konnten ca. 10-20 Syntheseperlen bequem erfaßt werden (Beladung einer Perle ca. 100 pMol). Eine „Titration“ in der Mikrokammer ergab jedoch, daß obwohl ausreichend Volumen (100 nl) für über 50 Perlen vorhanden war, die Reaktionen nur dann quantitativ verliefen, wenn 1-3 Perlen pro Kammer vorlagen. Um das Detektionsproblem zu

vereinfachen, wurden zunächst identische Synthesen in mehreren Kammern durchgeführt und die Produkte anschließend vereinigt, so daß ausreichend Material für die Analyse zur Verfügung stand. Es war jedoch wünschenswert, den Inhalt einer einzelnen individuellen Kammer, d.h. die von einer einzigen Syntheseperle stammenden Produkte zu detektieren. Dies wurde ermöglicht durch das speziell entworfene Syntheseharz Fmoc-Lys(Dansyl)-SASRIN. Die entstehenden Lysinderivate waren unter milden Bedingungen (0.5 - 1% TFA/DCM) abspaltbar, die fluoreszierende und hydrophobe Seitengruppe erlaubte die Erfassung aller Intermediate und Endprodukte durch Fluoreszenzdetektion unter RP-Bedingungen. Vergleichende Sequenzanalysen wurden mit Verfahren der Massenspektroskopie (siehe auch Hunt et al.[60], und Chaint et al.[19]) durchgeführt.

Versuche zur Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe zeigten, daß die Entschützung sehr langsam fortschritt. Während diese Reaktion unter normalen Bedingungen schon nach 5 min quantitativ verläuft, waren in den Mikrokammern 20 Befüllungen mit Standzeiten von jeweils 3 min erforderlich. Für diese sehr gebremste Kinetik kann man die fehlende Agitation der Reagenzien verantwortlich machen. Die Diffusion vor allem ins Innere der Perlen verläuft durch Mikroviskositätseffekte sehr langsam, und bei mangelnder Durchmischung können aus der Lösung keine Reagenzien nachgeführt werden. Dieser ungünstigen Situation wurde durch Konzentrationserhöhung von 20 auf 50% Piperidin und Temperaturerhöhung von 20 auf 37°C entgegengewirkt und so Bedingungen gefunden, welche die quantitative Abspaltung der Fmoc-Gruppe bewirkten (10 Befüllungen, jeweils 3 min Standzeit).

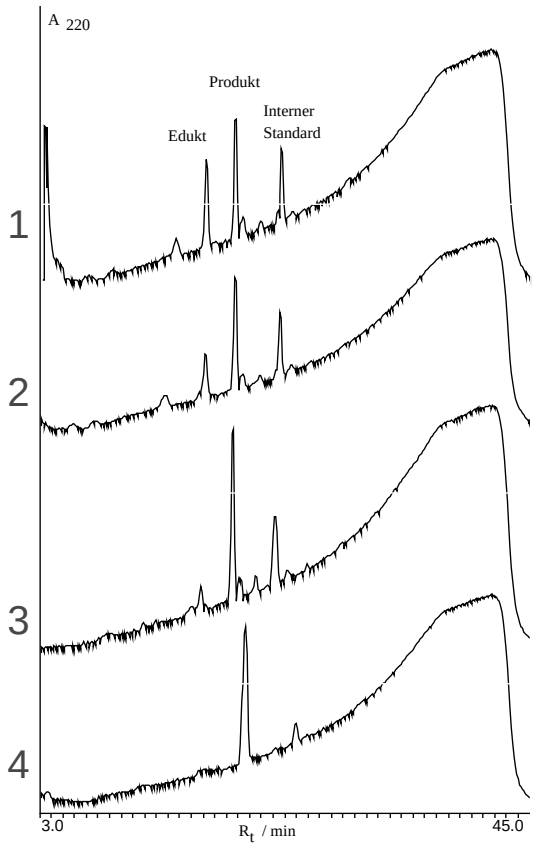


Abbildung4–2: HPL-Chromatogramme: mit UV-Detektion (220 nm) zur Illustration der Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Synthese von Fmoc-Phe-Ala-SASRIN.
(1) 5fache Entschützung bei Raumtemperatur
(2) 5fache Entschützung bei 30° C
(3) 5fache Entschützung bei 40° C
(4) 10fache Entschützung bei 40° C

Für die Optimierung des Kupplungsschrittes wurde durch eine Titration mit Aminosäure-Aktivester festgestellt, daß nur die höchste Konzentration- 0.5 mol/L, nahe dem Sättigungspunkt- die gewünschte quantitative Umsetzung ergab. Die Reaktion war vergleichsweise rasch und erforderte nur vier Zyklen mit jeweils 1 min Inkubationszeit. Als problematisch stellte sich dann jedoch die anschließende Entfernung des

überschüssigen Aktivesters heraus. Aufgrund der hohen Reagenzkonzentration waren die Perlen geradezu mit einem Aminosäuregel verklebt, das durch Waschen mit DMF nicht zu entfernen war. Dichlormethan ist üblicherweise ein geeignetes Lösungsmittel, um Festphasen zu reinigen. Da Dichlormethan mit den Mikrodosierköpfen nicht zu pipettieren war, - es verdunstete bereits auf dem Weg in die Reaktionskammer, wurde das schwerer flüchtige Dichlorethan (DCE) verwendet. Abwechselndes Waschen der Perlen mit DMF und DCE brachte den gewünschten Reinigungseffekt. Mit diesem optimierten Protokoll gelang es dann, drei verschiedene Aminosäuren nacheinander an einen Festphasenträger zu kuppeln. Ein limitierender Faktor ist die Unzuverlässigkeit der Mikrodosiereinheiten bei hohen Konzentrationen. Daher fokussiert sich ein Teil der Arbeiten auf Verfahrenstechniken, die es ermöglichen, die Konzentrationen zu senken und dabei durch andere Verfahrenstechniken die Durchmischung der Kammern zu gewährleisten. Mit sechs Dosierköpfen wurde eine kleine Bibliothek aller möglichen Kombinationen der drei Aminosäuren Histidin, Prolin und Glutamin synthetisiert und das Motif His-Pro-Gln dann in einem Bindungsassay von dem fluoreszenzmarkierten Protein Streptavidin erkannt.

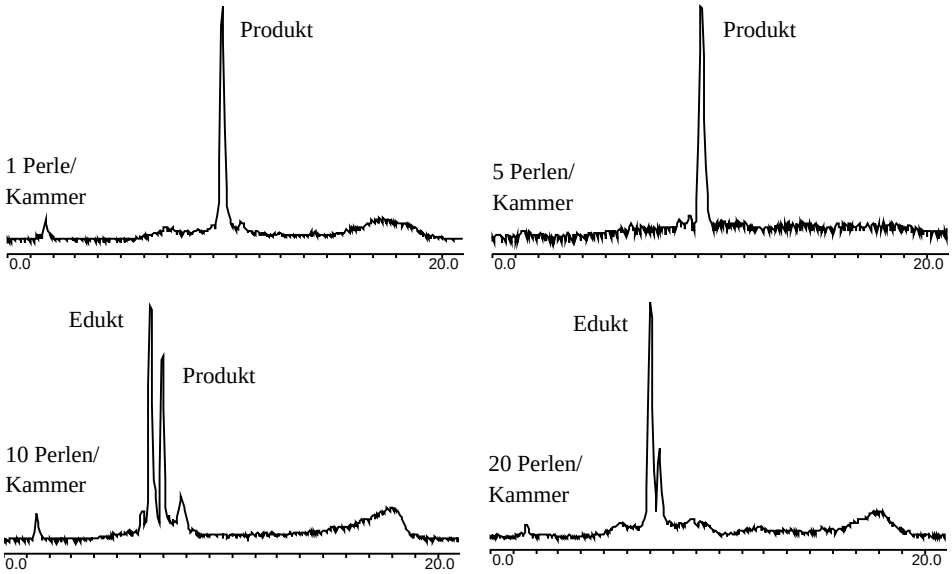


Abbildung4–3: Titration der Bead - Anzahl

Mit dem optimierten Syntheseprotokoll (10 x 3 min Entschützen mit 50% Piperidin/Dimethylformamid (DMF) bei 42°C, 10 x 5 sec Waschen mit DMF, 4 x 1 min Kuppeln mit 0.125 **M** Aminosäure-OPfp-Ester/HOBt/DIEA in DMF, 20 x 10 sec Waschen mit 50% Dichlorethan/DMF) konnten 27 Tripeptide als Permutationen des Streptavidin-Ligandenmotifs His-Pro-Gln erzeugt werden. Jedes Tripeptid lag nach der Synthese in einer Waferkammer auf jeweils einer einzelnen Syntheseharzperle in einer Menge von ca. 100 pMol vor. Die 27 Substanzen waren (in Kurznotation) 1. QQQ, 2. QQP, 3. QQH, 4. QPQ, 5. QPP, 6. QPH, 7. QHQ, 8. QHP, 9. QHH, 10. PQQ, 11. PQP, 12. PQH, 13. PPQ, 14. PPP, 15. PPH, 16. PHQ, 17. PHP, 18. PHH, 19. HQQ, 20. HQP, 21. HQH, 22. HPQ, 23. HPP, 24. HPH, 25. HHQ, 26. HHP, 27. HHH. Das Hauptaugenmerk galt der umfassenden analytischen Erfassung der Produktqualität, um den Syntheseerfolg belegen und die Synthesebedingungen besser zu verstehen und weiter optimieren zu können. Die oben beschriebenen Analysemethoden wurden verwendet. Da pro Produkt jeweils nur eine Perle vorhanden war, waren in allen drei

Fällen Anpassungen konventioneller Verfahren erforderlich. Für die HPLC-Analytik wurde auf einem speziellen, fluoreszenzmarkiertem Harz (Fmoc-Lys(Dansyl)-SASRIN (super acid labile resin)) synthetisiert, die Produkte lagen nach der Abspaltung in Lösung und mit allen Schutzgruppen (z.B. Fmoc-His(Trt)-Pro-Gln(Trt)-Lys(Dansyl)-OH) vor; für die MALDI-MS wurden die Peptide aus derselben Synthese nach Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen abgespalten (z.B. Fmoc-His-Pro-Gln-Lys(Dansyl)-OH). Für die Sequenzierung waren Synthesen auf Harz ohne Linker und ohne Fluoreszenzmarkierung (Amino-TentaGel) erforderlich (Produkt z.B. H-His-Pro-Gln-NH-TentaGel). Wie in Abbildung 4-4 zur HPLC-Analytik zu erkennen ist, sind die Umsetzungen in den Kammern fast ausschließlich in hoher Ausbeute und großer Reinheit verlaufen.

Nach erfolgter Bestätigung des Syntheseprotokolls wurden die Arbeiten mit der Etablierung eines Bioassays fortgesetzt. Dabei wurde die auf TentaGel vorliegende 27er Bibliothek mit Fluorescein-Streptavidin inkubiert und die entsprechende durch Laserlicht angeregte Fluoreszenz miteiner CCD Kamera detektiert.

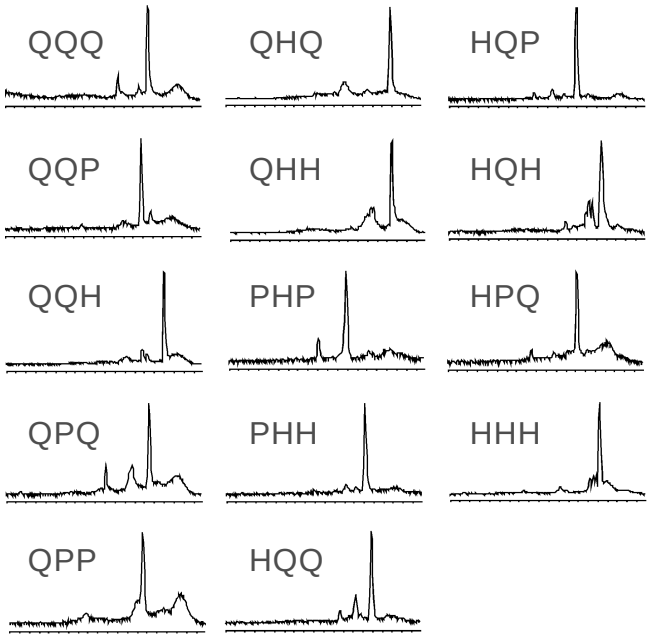


Abbildung4–4: Beispielchromatogramme aus einer Bibliothek von 27 synthetisierte Peptiden (Fmoc-His(Trt)/Pro/Gln(Trt)-OPfp Ester gekoppelt an Fmoc-Lys(Dns)-Sasrin)

Nachdem die prinzipielle Anwendbarkeit des Systems für Peptid-Synthese und Screening gezeigt war, sollte es in einem praxisorientiertem und gut dokumentiertem Beispiel für die Wirkstoffsuche eingesetzt werden. Deshalb wurde beispielhaft ein Thrombin Inhibierungs Test gewählt. Trombin wird durch Hirulog, ein Peptid (Maraganore et al.[79], Szeweczuk et al.[135]) stark inhibiert. Um eine größere Diversität in diesem Peptid zu erzeugen, wurde eine Bibliothek mit der Struktur Ac-fPRPXXXXXNGDFEEIPEYL-NH_2 mit X=G,L,P designed. Deshalb wurde zunächst eine kombinatorische Bibliothek aller Pentapeptide der drei Aminosäuren Gly, Pro und Leu generiert. Für Synthese wurden 243 Syntheseperlen in ein miniaturisiertes Kammerfeld der Größe 16 x 16 sortiert. Es fanden drei verschiedene Perlentypen Verwendung, welche über gleich große Bereiche des Probenfeldes verteilt wurden. Die Perlensorten waren Fmoc-Lys(Dns)-SASRIN für die HPLC-Analytik, Amino-TentaGel für die Edman-Sequenzierung und Fmoc-Photolinker-TentaGel für die Massenspektrometrie. Die Aminosäuren wurden als OPfp-Aktivester eingesetzt. Das Syntheseprotokoll sah sequentielle Schritte für die Aminosäurenverteilung und parallele Befüllschritte für die Entschützung (50% Piperidin in DMF bei erhöhter Temperatur) und das Waschen (50% Dichlorethan in DMF) vor. Nach jedem kombinatorischen Kupplungsschritt erfolgte ein „Capping“ mit Acetanhydrid. Die Perlen mit dem Amino-TentaGel-Träger wurden vor dem letzten „Capping“ entnommen und nach der Behandlung wieder eingelegt. Abschließend erfolgte eine Pseudoseitenkettenabspaltung mit TFA/Wasser/TIPS, um realistische Bedingungen für die Peptidsynthese zu simulieren. Diesmal wurden die säurelabilen Perlen mit SASRIN-Linker der Behandlung entzogen. Nach Wiedereinlegen der Perlen und ausgiebigem Waschen mit Wasser wurden einzelne Perlen willkürlich herausgegriffen und der entsprechenden Analytik unterzogen; Peptidsequenzierung erfolgte nach Edman automatisiert (ABI), Massenspektrometrie nach Belichtung im Puffer am Elektrospray-Gerät (Finnigan) und HPLC an der RP18-Phase mit Fluoreszenzdetektor.

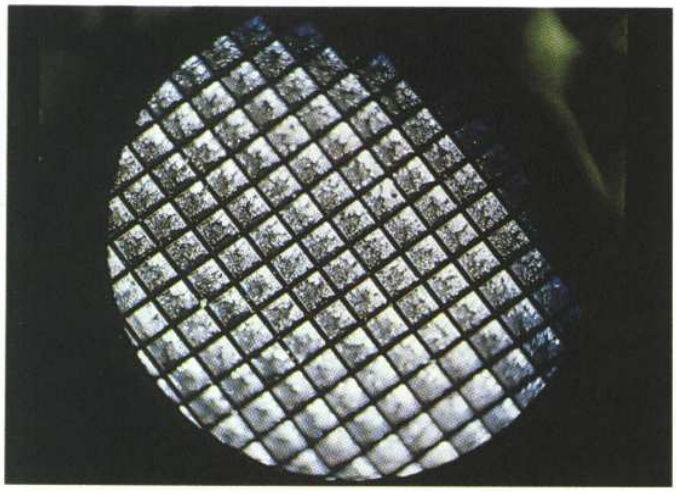


Abbildung 4–5: Synthesekammern mit einsortierten Beads unter dem Mikroskop.

Perle Nr.	**Nachweismethode**	**Erwartete Sequenz**	**tatsächliche Sequenz**	**Mögliche Ursache**
101	ESI_MS	Ac-PGLPG-NH2 : 503M+Na+	464 für M+Na+ von Ac-(G3/L/P)-NH2	Perle verrutscht
118	ESI_MS	Ac-GGPPP-NH2 : 487M+Na+	487 für M+Na+ von AC-(G2P3)-NH2	
195	ESI_MS	Ac-LPGLP-NH2 : 559 M+Na+	kein Produktpeak	
114	ESI_MS	AcLPGPP-NH2 : 575M+Na+	357: kein Zuordnung	
140	Edmann Seq.	PPGLP	PPGLP	
202	Edmann Seq.	GPPPL	GLGGL	Perle verrutscht
156	Edmann Seq.	LGLLP	LGLLP	
60	Edmann Seq.	LPGLG	LPGLG	

4.1.4. Versuche zur Assay Entwicklung

Für die Untersuchung der Peptid- Bibliothek wurde ein Thrombin-Assay etabliert (Maraganore et al.[79], Szeweczuk et al.[135]). Als Substrat für Thrombin wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiertes Peptid eingesetzt (Leytus et al.[73], Leytus et al.[74]).

Es konnte gezeigt werden, daß die Fluoreszenz ein ausreichendes Signal/Rausch Verhältnis besitzt.

Mehrere Gründe hierfür wurden gefunden.

1. Die Silizium-Matrix zeigte eine sehr niedrige Autofluoreszenz.
2. Die einzelnen Kammern ließen sich in der Bildverarbeitung sehr gut auflösen und voneinander trennen, dies lag z.T. auch an der Geometrie der Kammern, welche im Randbereich nur geringe Signalintensitäten erzeugten.
3. Die Silizium-Matrix zeigte sehr geringe unspezifische Bindung und konnte durch wenige einfache Waschschritte vollkommen gereinigt werden.

Insgesamt resultierten diese Effekte in sehr günstigen Signal/Rauschverhältnissen von über 100:1,

In einem zweiten Arbeitsteil wurde das Verhalten von lichtlabilen ”Linker” - Molekülen untersucht. Solche photospaltbaren Harze können ihr Syntheseprodukt bei Lichteinwirkung unmittelbar in den Biotest hinein freisetzen. Auch hier zeigte sich, daß die Photolyse in den Siliziumkammern sehr glatt verlief. Zu begründen ließ sich diese Beobachtung mit einer hohen Lichtausbeute durch den Spiegeleffekt der sehr glatten Oberflächen. Weiterhin wurde beobachtet, daß lichtstarke Spaltungen zu erheblichen Nebenreaktionen führten. Es ließen sich jedoch Bedingungen finden, welche unter Verwendung weniger intensiver Lichtquellen zu sehr sauberen Abspaltungen führten.

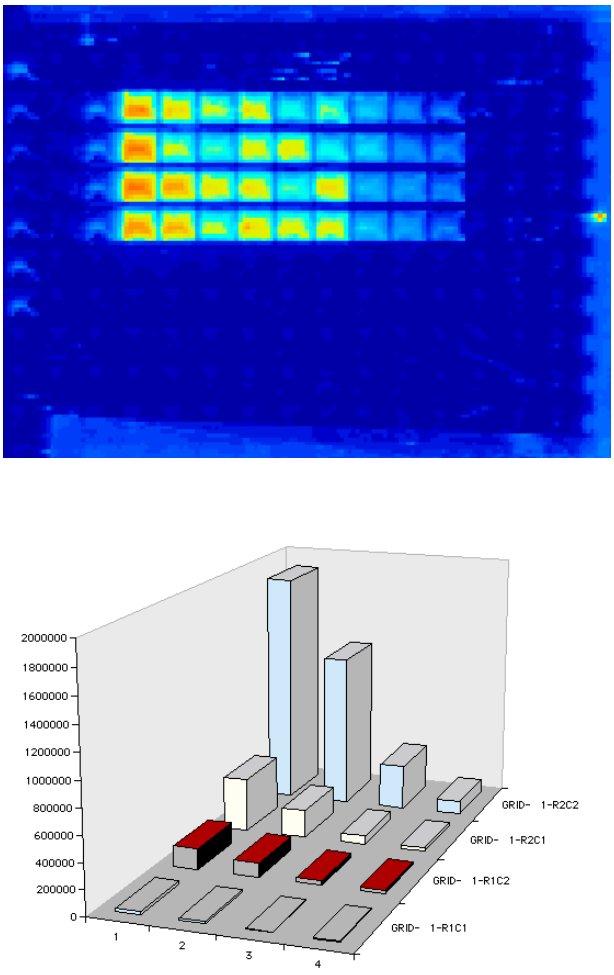


Abbildung4–6: Studien zu Thrombin-Inhibitions-Assays (zu 4.1.3.): Die Optimierung der Konzentrationen von Thrombin – Substrat und Hirulog ist dargestellt.

4.2. Experimente mit selbst-verstärkenden Systemen (*in vivo/in vitro*)

Auf der Maschine wurden auch selbst-verstärkende Systeme untersucht. Die dabei zu lösenden Probleme wurden beispielhaft für Bakterien gelöst, bei anderen Zellkultursystemen müssen die Bedingungen erneut angepaßt werden. Die Anpassungen des maschinellen Aufbaus für die zellfreien Systeme (z.B. die Temperierung) konnten hier weitgehend von den Anpassungen aus der chemischen Synthese übernommen werden.

4.2.1. Experimente *in vivo*

Bakterien sind ideale Wirte zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen. *E. Coli* spielt als ein wohlbekanntes System in der heutigen Biotechnologie eine weitverbreitete Rolle als das *in vivo*- System.

4.2.1.1. Verstärkung von *E. Coli* Zellen auf Wafern

Zuerst mußten die Wachstumsbedingungen und die Kompatibilität des Systems (von *E. Coli* -Zellen) auf den verwendeten Silizium - Wafer untersucht werden.
Eine Kultur des *E. Coli* Klons Mc1061 wurde inkubiert (LB-(Luria-Bertani-)media) und mit einer optischen Dichtemessungen, durch die man die Konzentration des inkubierten Klones bestimmt, ausgewertet. Dazu wurden die Zellen mit dem Microdrop - System in die Wafer - Kammern pipettiert und bei 37^{o} C inkubiert. Der Wafer wurde wegen der Austrocknung der Zellen gekapselt. Die optische Dichte wurde in einem Photometer bei 600 nm durch Probennahme aus dem Wafer bestimmt (siehe Figur 4-9).
Die optische Dichte von 0,4-0,6 entspricht in etwa $4*10^{7}$ bis $5*10^{8}$ Zellen pro ml, umgerechnet auf die Waferkammern kann man also grob von 4000 (bei OD_{600}= 0,4) bis 50000 (bei OD_{600}‘= 0,6) Zellen pro Waferkammer ausgehen. (Lindemann[75])

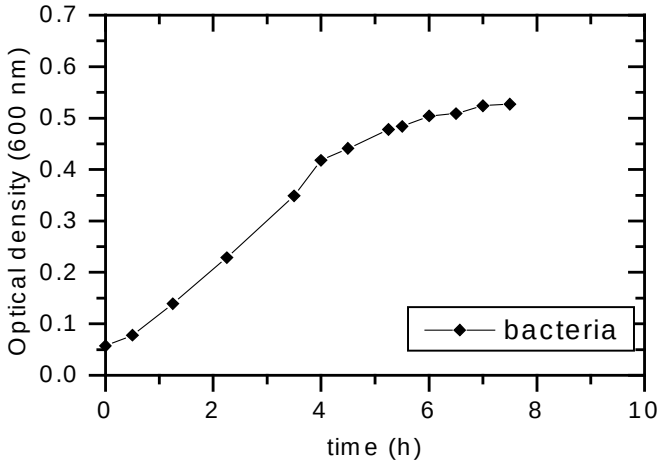


Abbildung4–7: Wachstum der Bakterien auf dem Silizium – Wafer: Der Wafer zeigt keinen Einfluß auf das Wachstum; daher ist die Kompatibilität des Systems gewährleistet.

4.2.1.2. Serieller Transfer der verstärkten *E.coli*

Zuerst wurde die prinzipielle Möglichkeit untersucht, ob Wachstum von *E.coli* durch seriellen Transfer mit einer sterilen Nadel erfolgen kann. Dazu wurden auf dem Wafer 10 Felder ausgewählt und in diesen Feldern jeweils 4*4 Kammern befüllt und 10 mal transferiert. Die Felder wurden so ausgewählt, daß kein unabsichtlicher Übertrag, keine „cross contamination“ möglich war (die Felder wurden durch mindestens eine leere Kammer voneinander getrennt). Die Messungen wurden nach 2, 5 und 6 Stunden durchgeführt.

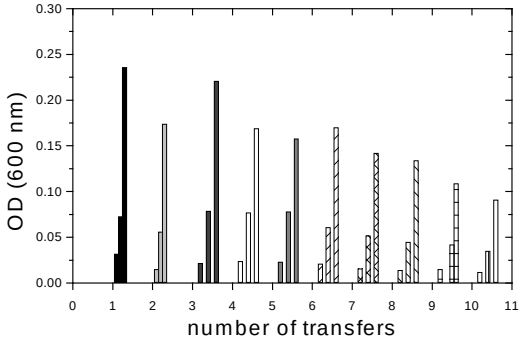


Abbildung 4–8 serieller Transfer: Konzentrationsmessungen von 10 seriellen Transfers von E.coli. Die Bakterien zeigen das erwartete Verhalten.

4.2.1.3. Wachstum von *E. Coli* auf Agar

Wachstumsversuche von Zellen auf Agarplatten

Das *in vivo* Selektionssystem für Gruppe I Introns (siehe auch Borego et al.[13]) eignet sich besonders gut zum Test der Maschine. Hierbei wird die Sequenz des Tetrahymena group I Introns in das Plasmid pUC18 des Lac Z Gens des Stammes XL1-Blue so hineinkloniert, daß das Splicing des Introns ein aktives Lac Z Gen Produkt anzeigt. Die Aktivität drückt sich in einem bläulichen Farbumschlag aus, keine Aktivität äußert sich durch weiße Färbung. Durch Randomisieren der Wildtyp Sequenz läßt sich nun der ”Phänotypen” - Raum abtasten und der Stoffwechselumsatz als Fitneß durch die Blaufärbung detektieren.

Aufgabe des Automaten muß nun das reproduzierbare Prozessieren dieses Selektionsystems sein. Dabei werden als erster Schritt die Zellen auf Agarose Nährböden mit dem Microdrop System aufgetragen. Ein Ziel dieser Versuche war, die maximale Packungsdichte von Bakterienkulturen auf einem Agarmedium zu ermitteln. Dabei ist zu beachten, daß eng beieinander liegende Kulturen um Nährmedium konkurrieren. Es wurden Versuche im 1 mm und 500 µm Raster durchgeführt. Bei einem 1 mm Raster lassen sich ohne Probleme optimale Wachstumsbedingungen

definieren (386 Klone auf 20 x 20 mm^2, auf 100 x 100 mm^2 großen Agarplatten sind das 9650 Klone).

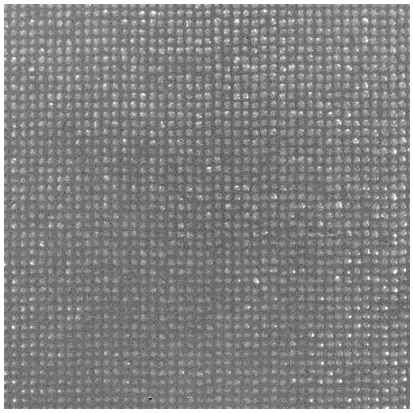
Bei einem 500 µm Raster lassen sich auf einer 100 x 100 mm^2 großen Platte 40000 Klone auftragen.

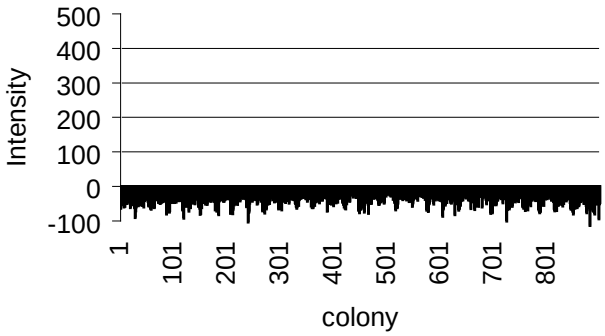
Die Bakterienkulturen wurden bei 37° C inkubiert und mit der CCD Kamera vermessen. Dies ist innerhalb von 15 Minuten zu erreichen, wenn mit einer geeigneten Frequenz pipettiert wird, ohne den x,y-Tisch, der das Agarose - Gel transportiert, anzuhalten. Ein Tropfen beinhaltet schon genügend Keimzellen zur Erzeugung der Kolonie. Die Beleuchtung wurde durch eine Halogenlampe über verschiedene Mattscheiben und Filter realisiert. Das Zellwachstum kann detektiert und online verfolgt werden.

Probleme bei der quantitativen Auswertung macht die optische Inhomogenität des Agars vor allem durch Trocknungsvorgänge. Diese Probleme konnten durch temperierbare Abdeckplatten aus Glas verhindert werden, die das Medium nach dem Pipettieren abkapseln.

Auf diese Art konnte ein 500µm - Raster auf einem 100x110 mm^2 großen Agar erzeugt werden und das Wachstum der Zellen und der Metabolismus der 44000 Kolonien verfolgt werden. Für die quantitative Auswertung wurden 49 Bilder mit der CCD-Kamera (innerhalb von 15 Minuten) aufgenommen und ausgewertet. Das Bild zeigt die quantitative Auswertung von 900 Kolonien. Bevor der Metabolismus einsetzt, die Kolonien also weiß und nicht blau sind, wird die Weißfärbung durch negative Intensität angezeigt.

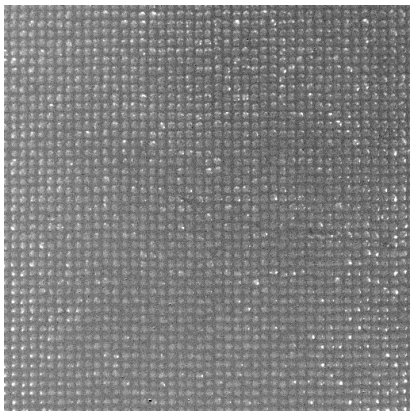
Man sieht deutlich die mit der Zeit steigende Intensität der Blaufärbung. Geht man von einer Zellenanzahl von 10^6 Zellen pro Kolonie bei dem Sättigungswert der Blaufärbung aus, sind bei einer Länge von 2µm pro Coli-Zelle (Stryer[132]) etwa 20 Lagen Coli-Zellen übereinander gewachsen, die eine Dicke von 40-50 µm beanspruchen.

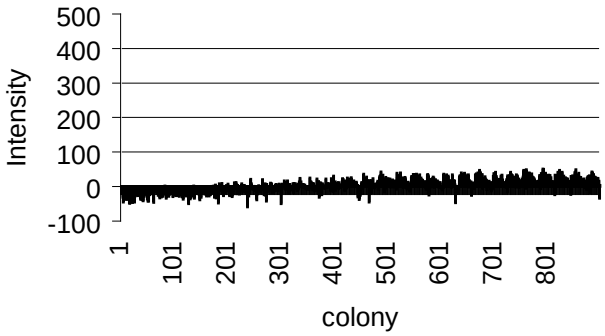




Nach 10 h 24 min Inkubation

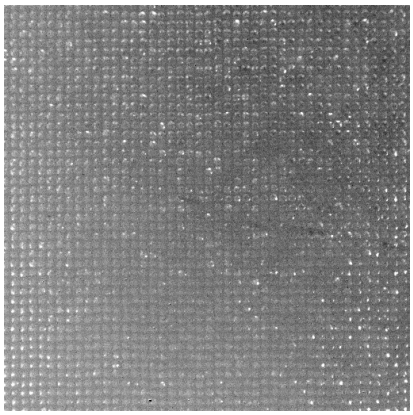
Weißfärbung der Kolonien

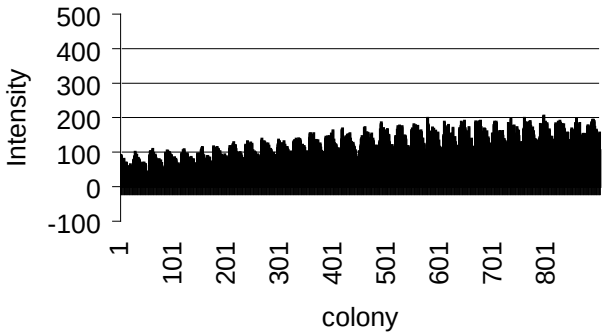




Nach 11 h 29 min Inkubation

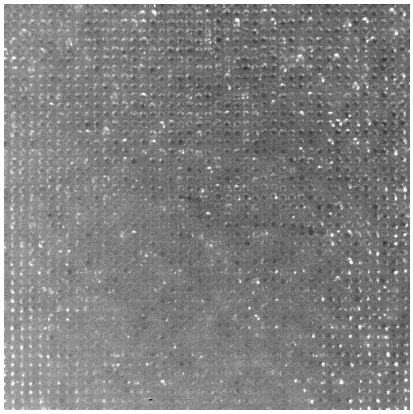
beginnende Blaufärbung

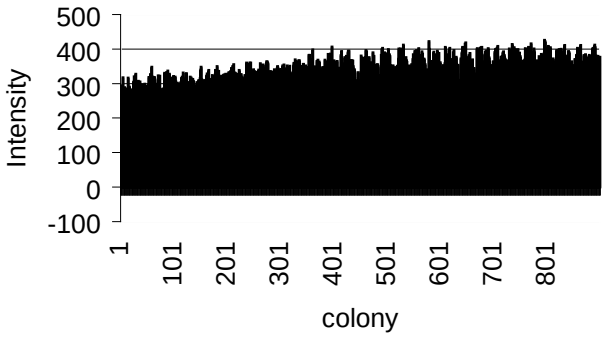




Nach 12 h 34 min Inkubation

Blaufärbung





Nach 14 h 44 min Inkubation Sättigungswert der Blaufärbung

Abbildung 4–9 ß-Galactosidase: Messung des Metabolismus. Die Intensität wurde willkürlich normiert, die Periodizität des Signals ergibt sich aus einem Temperaturgradienten auf dem Agar (die jeweils erste Kolonie einer Reihe hat eine höhere Temperatur als die letzte der Reihe)

4.2.2. Experimente *in vitro*

Zell-freie Protein - Synthese ist seit mehreren Jahren von großen Interesse in der biotechnologischen Forschung. Die verbreitetsten Systeme sind solche, die aus Weizenkeimlysat (Roberts et al.[97]) oder aus Kaninchen Reticulocyten Lysat. (Pelham et al.[94]) hergestellt wurden. Seltener durchgeführte Versuche wurden mit ascites tumor cells (Austin et al.[5]) oder mit Hefeextrakten durchgeführt (Hofbauer et al.[58]). Alle diese Systeme sind jedoch batch Systeme und zeigen Restriktionen für eine breite Anwendung.

Neue Techniken mit einem größeren Potential für die Biotechnologie sind in der letzten Zeit entwickelt worden. Hier ist vor allem der ”continous flow cell-free translation system” Reaktor zu nennen, mit dem man in der Lage ist, Proteine mit hohen Ausbeuten

zu erzeugen (Spirin et al.[126], Kigawa et al.[63], Stiege et al.[130]). Der kontinuierliche "continous flow cell-free translation system“ Reaktor erlaubt große Mengen von zumeist einem Protein zu erzeugen: Die Synthese von einer großen Anzahl verschiedener Proteine ist jedoch wesentlich schwerer, da im allgemeinen für jedes Protein eigene Bedingungen einzustellen sind.

Desweiteren ist es offensichtlich, daß eine serielle oder nur in kleinem Maßstab parallelisierbare Synthese mit obigen Methoden sehr zeitaufwendig ist. Daher ist für die Synthese größerer Peptid - Bibliotheken die miniaturisierte Zell – freie Translation und Transkription ein aussichtsreicher Weg, den Aufwand zu minimieren. Eine andere neue Technik ist die Entwicklung von isothermalen Replikationssystemen für Nukleinsäuren (Fahy et al.[38], Breaker et al.[15], Guatelli et al.[49], Gebinoga et al.[45]).

Besonders wertvolle Techniken wurden für die Produktion großer RNA Bibliotheken mit nachfolgender Selektion spezifischer Mutanten entwickelt (Thuerk et al.[141]).

Zellfreie Translation und zellfreie Nukleinsäureamplifikation weisen also einen weiten Bereich von potentiellen Anwendungen in der modernen Biotechnologie auf: Ein ungelöstes Probleme auf diesem Gebiet ist die Produktion einer großen Anzahl von verschiedenen Varianten – ein Problem, das schon für die evolutive Biotechnologie (siehe Kapitel 2) beschrieben wurde. Zum Teil ist dies eine Konsequenz der hohen Kosten für die Präparation der Komponenten eines solchen Reaktionsansatzes, der aus hochaufgereinigten Stoffen wie Enzymen, Ribosomen etc. besteht. Die Miniaturisierung kann nun eine Möglichkeit sein, diese Kosten unter der Randbedingung eine große Vielzahl verschiedener Proteine oder Peptide zu erzeugen, zu senken.

Neben der bekannte Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase chain reaction: PCR Saiki et al.[99]) sind andere Verstärkungsmechanismen für Nukleinsäuren verfügbar. Die sogenannte self-sustained sequence replication (3SR) ist ein möglicher Verstärkungsmechanismus, der sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Erforschung von RNA (Zaaijer et al.[147]) eingesetzt wird.

Im folgenden werden die Versuche beschrieben, sowohl kommerziell verfügbare Translations/Transkriptions Systeme als auch RNA/DNA Amplifikationssysteme (3SR Reaktion) in den Nanotiterplatten durchzuführen.

In vitro Systeme, die hoch parallele Vieltopf Systeme einsetzen, haben prinzipiell das Potential eine große Varietät verschiedener Proteine zu expremieren – auch solche die für einen Organismus toxisch sein könnten. Zudem können modifizierte oder nicht natürliche Aminosäuren in die Proteine mit Hilfe der Zell freien Proteinsynthese eingebaut werden (Hecht[53]).

Die Miniaturisierung erlaubt nun entweder kommerziell verfügbare *in vitro* Systeme für dieses Ziel einzusetzen oder neue *in vitro* Systeme für die gewünschten Applikationen zu entwickeln – vor allem wenn eine wohl geordnete Zuordnung zwischen Reaktionsgefäß, kodierender Nukleinsäure und dem synthetisierten Protein existiert. Gerade solche Systeme wären in der Lage eine große Anzahl verschiedener Varianten zu erzeugen.

Zur Synthese von Nukleinsäuren oder Proteinen in den sehr kleinen Reaktionskammern muß man die Konzentration der einzelnen Komponenten und die Temperatur sorgfältig überwachen. Speziell die Temperaturkontrolle ist von essentieller Wichtigkeit im miniaturisierten System.

4.2.2.1. 3SR Reaktion

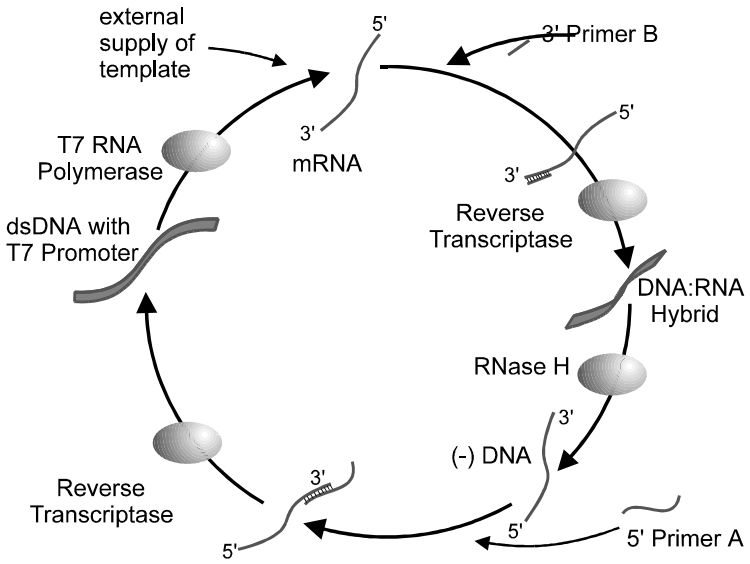


Abbildung 4–10: 3SR: Prinzipielles Schema der Verstärkung von RNA durch self-sustained sequence replication (3SR).

Die self-sustained sequence replication (3SR) ist ein Verstärkungsmechanismus, der sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Erforschung von RNA (Zaaijer et al.[147]) eingesetzt wird. Verglichen mit dem RNA-RNA Replikations Zyklus, der durch die Qβ Replikase (Mills et al.[83]) induziert wird oder der DNA-DNA Amplifikation der PCR Methode, stellt die isothermale Amplifikation durch die 3SR einen RNA-DNA Zyklus dar.

Anstelle des klassischen drei Enzym Systems werden dabei in der genannten Fassung von Gebinoga und Oehlenschläger [45] die HIV-1 reverse Transcriptase zusammen mit der T7 RNA Polymerase eingesetzt. Da die Details der Reaktion noch nicht aufgeklärt sind, ist es zur Optimierung notwendig, die Konzentrationsverhältnisse der beteiligten Substanzen zu variieren und zu testen. Dies ist bei den teuren Enzymen gerade mit kleinen Volumina besonders ökonomisch. Zudem gibt die hohe Mutationsrate der Reaktion ein breites Mutantenspektrum, das gerade durch eine Vereinzelung der Klone ein spezifisches Abscannen der Fitneßlandschaft erlaubt (Schuster[114]) und sich zudem gut als Modellsystem für die Darwinsche Evolution eignet (Eigen[31]).

Die Amplifikation der 3SR eröffnet nun die Möglichkeit einer direkten Kopplung der Nukleinsäureverstärkung mit einem *in vitro* Translation System, da beide Reaktionen bei physiologischen Temperaturen stattfinden.
Daher ist die 3SR ein essentieller Teil des von M. Gebinoga vorgeschlagenen *in vitro* Translations-Transkriptions-Systems (siehe Gebinoga[44], siehe auch Abbildung 4-11.)

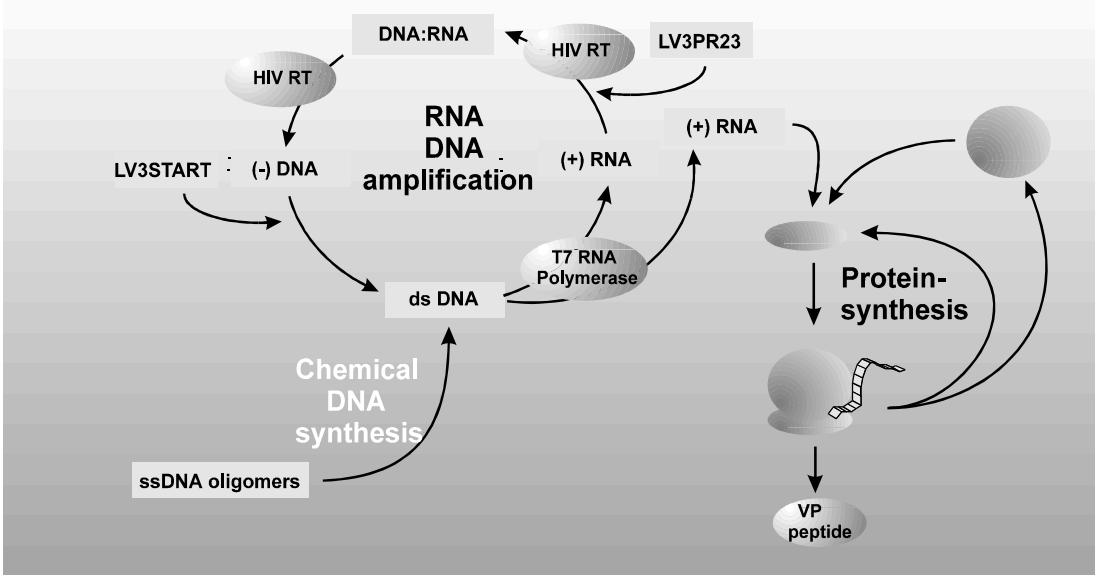


Abbildung4–11: Prinzipielle Kopplung eines in vitro Translation Systems mit einem 3SR Reaktionssystem.

Als erstes Ziel mußte die Adaptation der zwei-Enzyme 3SR auf das Waferformat durchgeführt werden mit der HIV-1 RT und der T7 RNAP als die einzigen involvierten Enzyme. Verglichen mit der originalen drei-Enzym Reaktion (AMV RT, *E.coli* RNase H, T7 RNAP), hat dieses System mehrere Vorteile, die in der höheren Homogenität der Amplifikationsprodukte und der einfacheren Handhabung in einer automatisierten Maschine liegen. Ein Nachteil ist die leicht verringerte Amplifikationsrate, die durch die Verdopplungszeit während der exponentiellen Phase kalkuliert werden kann. Dieser

Wert, der entweder durch das Messen der Fluoreszenzintensität oder durch den Einbau von Radionukleotiden gemessen werden kann, vergrößert sich von ca. 6 min (Drei-Enzym-System) auf 10 min (Zwei-Enzym-System) (Oehlenschläger[88]).

Der Vergleich der verschiedenen Enzyme für die 3SR Reaktion zeigt die gute Brauchbarkeit der HIV reversen Transcriptase für das Reaktions System und für die RNA Matrize/Template, die mit dem Automaten prozessiert wurden.

Die HIV RT liefert für die eingesetzte RNA ein schärferes Produktspektrum verglichen mit der AMV RT. In weiteren Experimenten wird ein besserer linearer Vektor eingesetzt. Das Design der neuen Matrize hat neben der Replikationeigenschaften noch eine kodierende Sequenz eines Peptids, die für die Anwendung in einem gekoppelten Transkription-Translation System nutzbar ist.

Um dieses System in der Evolutionsmaschine einsetzen zu können, müssen sowohl die optimalen Bedingungen für den Einsatz im Silizium Wafer als auch für den Einsatz des Pipettiersystems gefunden werden.

Die 3SR Reaktion liefert einen effektiven Stoffumsatz bei 40°C. Gleichzeitig ist jedoch die Stabilität der Enzyme bei dieser Temperatur nur über einen begrenzten Zeitraum garantiert. Die Temperierung des Wafers ist also ein entscheidendes Problem, das mit einem PID Regler und einer ansteuerbaren Heizmatte gelöst wird (siehe Kapitel 3).

Während des Pipettierens der Lösung auf den Wafer muß die Reaktion auf 4°C gekühlt werden, um die Vermehrung der RNA Stränge zu inhibieren. Wird die Reaktion gestartet, ist eine Reaktionstemperatur von 40°C optimal. Daher muß die Temperiereinrichtung des Wafers nicht nur über eine Kühl- sondern auch über eine Heizeinrichtung mit der entsprechenden Regelung verfügen. Das Problem wurde durch ein kombiniertes System bestehend aus einem wassergekühlten Peltierelement und mehreren Heizelementen mit PID Regler gelöst, das in einem speziell konstruierten Waferhalter eingebaut wurde. Das System wurde wieder gekapselt ähnlich des Systems für den Agar, um die Verdunstung zu reduzieren, allerdings auf einer deutlich miniaturisierten Skala. Das Microdrop-System mußte an die hochviskose 3SR Lösung

angepaßt werden. Um die optimalen Pipettierbedingungen zu finden, mußte in Versuchsreihen das richtige Düse/Drossel Verhältnis gefunden werden.

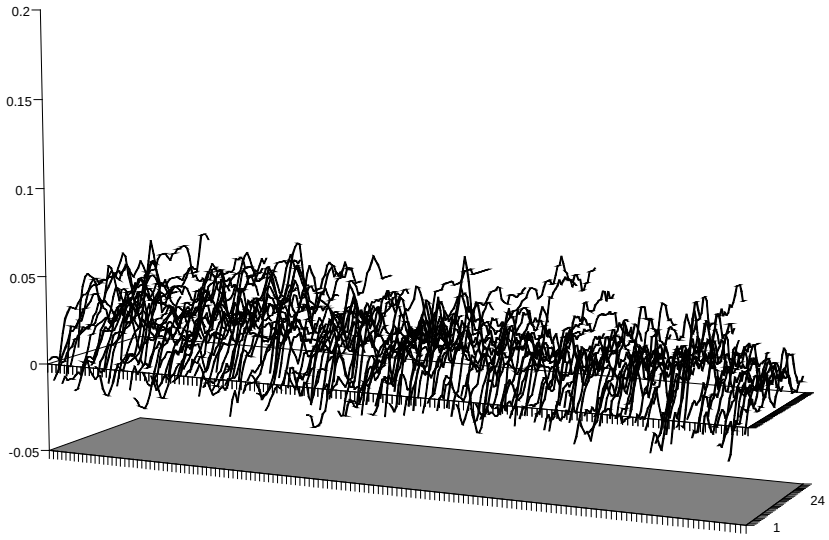


Abbildung4–12: 3SR: Die Verstärkung der RNA ist in 149 ausgewählten Kammern dargestellt.

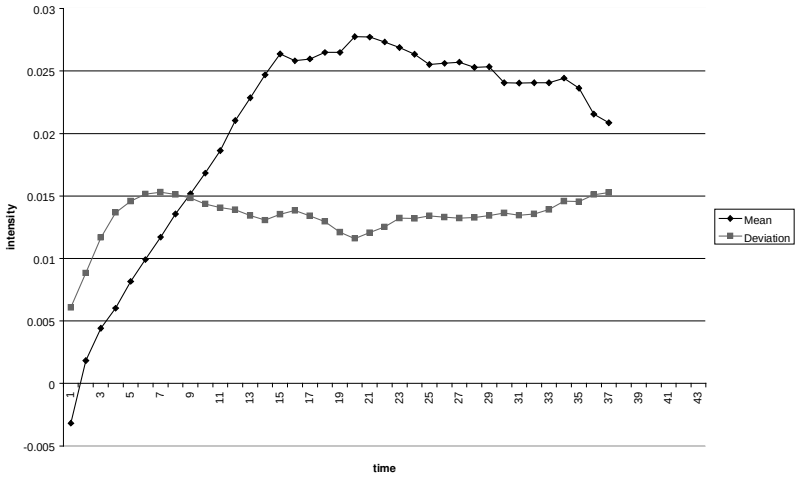


Abbildung4–13: 3SR: Das exponentielle Wachstum der Nukleinsäure geht in Sättigung über. (Hier sind der Mittelwert und die Standardabweichung in den 149 Kammern dargestellt).

Ein Feld von 200 Kammern wurde ausgewählt und mit dem 3SR Mix durch die Microdrops befüllt. Die gefüllten Kammern wurden durch eine temperierte Glasplatte abgekapselt, was das Beschlagen verhindert und damit die online Beobachtung ermöglicht. Die Vermehrung der Nukleinsäuren wird durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids vermessen. Durch Temperieren auf 40°C wird die Reaktion gestartet wurde und über die Messung der Fluoreszenz online verfolgt und quantitativ vermessen (Abbildung 4-14). Die Vermehrung der RNA Stränge verläuft am Anfang der Reaktion exponentiell und geht dann in Sättigung, wie es die Kinetik der Reaktion fordert (Abbildung 4-13).
Diese Kinetik ist typisch für diese Reaktion und kann somit auf einer miniaturisierten Skala reproduziert werden. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Entnahme der Proben mit einer Stahlkanüle und nachfolgender Gelelektrophorese nachgewiesen.

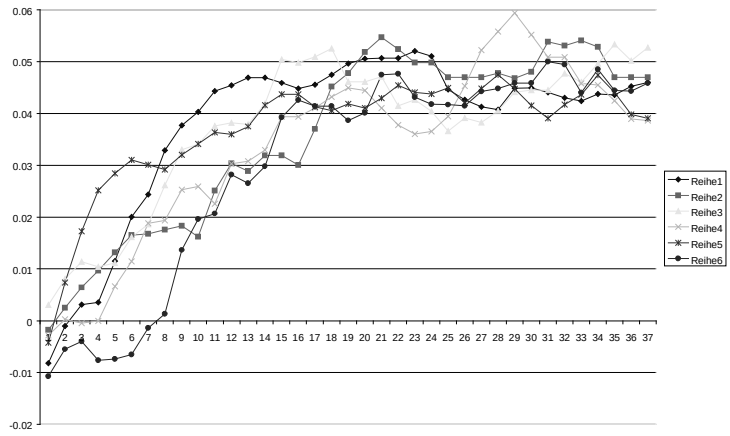


Abbildung4–14: 3SR: Online Beobachtung: Die Verstärkung der RNA in 5 willkürlich ausgewählten Kammern mit online Beobachtung.

Der mögliche Einfluß der Silizium Oberfläche des Wafers auf die Aktivität der eingesetzten Enzyme mußte untersucht werden. Dies ist sowohl für die 3SR Reaktion als auch für die zellfreie Translation wichtig. Experimente mit der PCR auf Silizium

Oberflächen zeigen einen inhibitorischen Effekt auf die Taq DNA Polymerase (Shoffner et al.[120] sowie Cheng et al.[21]). Daher mußte die Silizium Oberfläche mit einem silanisierenden Reagenz behandelt werden. Die Experimente mit der 3SR zeigen allerdings keinen Einfluß des Siliziums auf das System. Es wurde der Einfluß von kleinen Mengen an zerstoßenem Siliziummaterial in einer normalen 3SR Reaktion untersucht. Zu diesem Zweck wurde Wafermaterial in einem Mörser solange zerstoßen bis die Silizium Stücke eine sandartige Körnung erhielten. Verglichen mit der reinen Reaktion wurde die Amplifikation des alfa1 RNA Strangs nur geringfügig verringert. Nach diesen vorbereitetenden Experimenten konnte das 3SR System in den Silizium Wafern ohne Probleme eingesetzt werden. Der von Shoffner[120] beobachtete Effekt kann auch durch den Einsatz eines noch feineren Puders erklärt werden.

4.2.2.2. Translation und Transkription/Translationssysteme

***In vitro* transcription-translation**

Translation:

Als Anwendung von zellfreien Translation Systemen mußten die Reaktionsbedingungen auf dem miniaturisierten Format überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde ein kommerziell verfügbares Kaninchen Reticulocyten Lysat mit der Luciferase Control RNA als Template/Matrize eingesetzt. Das Assay für die firefly Luciferase Aktivität ist extrem sensitiv, schnell und leicht durchzuführen. Es ermöglicht eine gute Kontrolle für *in vitro* Translationsreaktionen da nur die gesamte Länge der Luciferase aktiv sein kann. Das Luciferase Assay läßt sich gut auf dem Automaten einsetzen, so daß es möglich war, die synthetisierte Luciferase sofort in den Silizium Waferkammern zu detektieren. Die Microdrop Pipette mußte wieder an den speziellen und hochviskosen Translationsreaktions-Mix adaptiert werden. Zwei Felder mit 119 Kammern wurden auf dem Wafer ausgewählt und mit den Microdrops mit dem Translations Reaktionmix befüllt. Die befüllten Kammern wurden gekapselt und auf 30°C aufgeheizt. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion durch Kühlen auf 4°C gestoppt. Das Material wurde aus einem Feld aus den Reaktionskammern mit Hilfe einer Stahl Kapillare entnommen und als Kontrolle vermessen. Im verbleibenden Feld wurde die Hälfte des Volumens einer jeder Kammer verdunstet. Die Kammern dieses Feldes wurden dann mit Substrat auf das gesamte Volumen befüllt (Proportion 1:1). Wieder wurde der Wafer abgekapselt. Die einsetzende Bioluminiszenz wurde mit der CCD detektiert.

Die CCD Messung der Lumineszenz gibt folgende Werte: Der gemittelte Wert über alle 119 Kammern mit Substrat ergibt 285.42 ± 11.94 (willkürliche Einheiten). Der gemittelte Wert der 119 Kammern ohne Substrat: 209.40 ± 6.63 (willkürliche Einheiten). Trotz des nichtoptimalen optischen Aufbaus kann die Translations Effizienz

des Prozesses klar detektiert werden. Das Untergrundsignal ist relativ hoch, doch ist trotzdem das Signal gut detektierbar.
Die Homogenität des Signals der verschiedenen Reaktionskammern ist hervorragend.

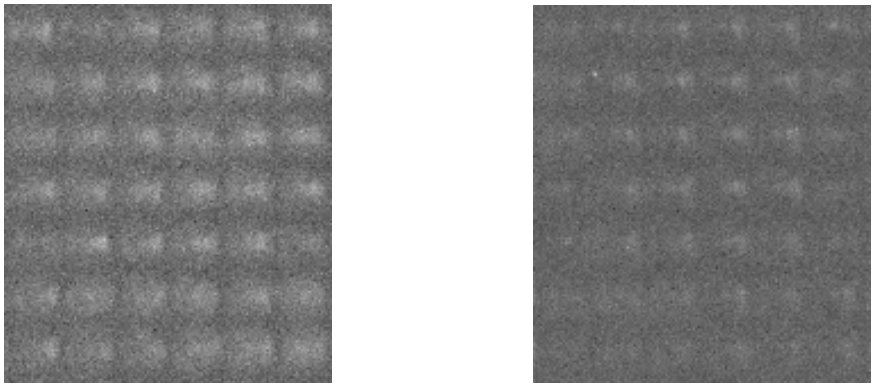


Abbildung4–15: Translation: Signal nach Zugabe des Substrates in die 42 Kammern mit dem inkubierten Reaktionsmix (linke Seite). Das Signal ist homogen und kann eindeutig vermessen werden. Auf der rechten Seite sind dieselben Kammern vor dem Pipettieren des Substrates gezeigt.

Transkription-Translation:

Ein Feld bestehend aus 50 Kammern wurde für diesen Versuch auf dem Wafer ausgewählt und mit dem Autodrop/Microdrop System mit dem Transkription-Translation Reaktionsmix befüllt. Das Feld wurde wieder eingekapselt. Die Temperierung bei 30°C wurde gestartet. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion durch Kühlen auf 4°C gestoppt. Die Hälfte des Flüssigkeitsvolumens jeder Kammer wurde eingedampft. Die Hälfte des Feldes (25 Kammern) wurde wieder auf das Gesamtvolumen durch Auffüllen mit Substrat gebracht (Proportion 1:1). Wieder wurde der Wafer gekapselt. Die einsetzende Bioluminiszenz wurde mit der CCD detektiert.
Die CCD Messung der Lumineszenz gibt folgende Werte: Der gemittelte Wert der 25 Kammern mit Substrat ist 790.39 ± 67.85 (willkürliche Einheiten). Der gemittelte Wert der 25 Kammern ohne Substrat ist 269.89 ± 16.11(willkürliche Einheiten). Die

Expression des Luciferase Gens ist in den Nanotiterplatten klar detektierbar. Abhängig von den biochemischen Substanzen kann das Signal/Rausch Verhältnis verbessert werden (siehe oben).

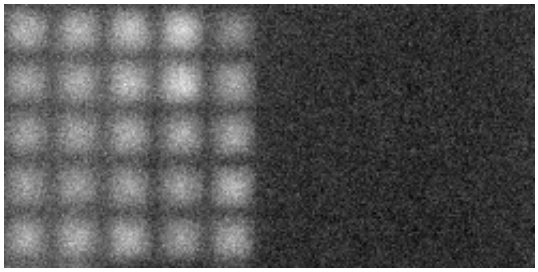


Abbildung4–16: Transkription-Translation: Vermessung des Transkription-Translationssystems in den Probenträgern (Nanotiterplatten) mittels der CCD. Das Signal nach Zugabe von Substrat in 25 der 50 Kammern (auf der linken Seite) mit dem inkubierten Reaktionsmix ist homogen und eindeutig zu identifizieren. Auf der rechten Seite ist der Mix ohne Substrat.

Die gezeigten Ergebnisse demonstrieren die Möglichkeit, Nanotiterplatten sowohl für *in vitro* DNA/RNA Amplifikations Systeme als auch für Translations - und für gekoppelte Translation/Transkriptions Systeme einzusetzen. Die Arbeit zeigt darüber hinaus einen möglichen Weg zur Material und Kosten sparenden *in vitro* Genexpression. Weiter erlaubt ein solches System die Untersuchung komplexer *in vitro* Systeme als Modelle viraler Replikationszyklen in einer kostensparenden und risikomindernden Weise.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Aufbau des Automaten

Durch den Aufbau des Automaten ließ sich zeigen, daß das Konzept der integrierten Wirkstoffsuche mit evolutiven Methoden und integrierter Optimierung mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln durchgeführt werden kann. Die Miniaturisierung in den 100 nl Bereich ließ sich erstmalig durchführen.

Dies geht deutlich über das zur Zeit von Industriefirmen für Automaten entwickelte 1536 Mikrotiterplattenformat mit 10-1 µl Substanz hinaus. Die Detektion wurde mit dem beschriebenen Aufbau gelöst, es wurden Schritte aufgezeigt, um noch kleineren Probenmengen detektieren zu können.

Um die Probenmengen noch weiter zu verkleinern, sind einige Komponenten des Aufbaues zu optimieren. Hier ist vor allem die Verdunstung zu nennen. Desweiteren sind die bestehenden und eingesetzten Dosiersysteme noch unzuverlässig. Eine automatische Tropfendetektion wird für die Microdrop-Systeme zur Zeit entwickelt. Dies würde dann eine automatische Fehlerbehandlung erlauben. Die Dosiersysteme sind vor allem nur quasi-parallel, (d.h. die Verschiebetische, die die Probenkammern zu den Dosiereinheiten bringen, müssen im Stop and Go Verfahren jede einzelne Kammer anfahren um eine definierte Variabilität in den Probenkammern zu erzeugen.) Der dafür benötigte Zeitbedarf limitiert die Miniaturisierung, da sonst die Proben eintrocknen. Dagegen wurden schon auf der aufgebauten Maschine Maßnahmen getroffen; es lassen sich andere, wie zum Beispiel gekapselte Wafer denken. Diese werden zur Zeit für die organische Synthese (siehe 5.3) entwickelt.

Da Verschiebetische in ausreichender Genauigkeit zur Verfügung stehen, ist serieller Transfer auch in weiter verkleinertem Maßstab denkbar. Die dabei auftretenden Justierprobleme scheinen lösbar.

Die Optik und damit die Effizienz der Maschine läßt sich um den Faktor 4, wie im Kapitel Optik gezeigt wurde, steigern, wenn es gelingt Mikrolinsen in den Deckel der

Waferkammern zu integrieren. Der Deckel würde sowohl die Verdunstung verhindern, wie auch das Signal verstärken. Der erwartete Effekt der Signalverstärkung bei der Verwendung von Mikrolinsen wurde experimentell nachgewiesen. Die erste Näherung liefert einen Faktor 4 für die Verstärkung für die getesteten Linsenarten. Das zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment. Die fokale Länge bestimmt dann die maximale Packungsdichte der Miniaturisierung: Das Signal einer Kammer sollte nicht von zwei verschiedenen Linsen abgebildet werden. Für die Nanotiterplatten mit 1mm Raster kann die Verstärkung des Signals ebenfalls mit einem Mikrolinsenarray gezeigt werden, jedoch ist die Herstellung dieser Linsenarrays nicht optimiert.

5.2. Screening

Da Screening schon allein heute eine von der Industrie großtechnisch betriebene Anwendung darstellt, ließe sich eine Maschine entwickeln, die eine große Zahl von Proben prozessiert und in einem Assay auf Wirksamkeit testet, ohne evolutive Methoden oder andere Optimierung zu verwenden

Auf so einer Maschine ließe sich dann ein Verfahren anwenden, bei dem sich bis zu 2 Millionen Varianten pro Tag auf Wirkstoffe testen ließen.

Der Verfahrensablauf bestünde aus dem Animpfen von Agarplatten mit 40 – 50 tausend Kolonien im 0,5 mm Raster (Dauer 15-30 min), dem Inkubieren über 14 Stunden in einer eigenen Station und anschließender Auswertung (Dauer ca. 15 min), während neue Kolonien angeimpft werden.

5.3. Chemische Synthese organischer Moleküle

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen verwendet die chemische Industrie die kombinatorische Synthese organischer Moleküle (Smith[123]) in zunehmenden Maß. Eine Miniaturisierung bestehender Syntheseverfahren ist aufgrund der Kosten (siehe Einleitung) dafür wünschenswert. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden werden zur Zeit auch von anderen Arbeitsgruppen evaluiert (z.B. Oldenburg et al.[90], Litborn et al.[76]).

Die therapeutische Relevanz von Peptiden aus Zufallssynthesen ist gering (Dorsay et al.[29]). Für den routinemäßigen Einsatz in der Wirkstofforschung muß im nächsten Schritt gezeigt werden, daß auch die Herstellung nicht-peptidischer Bibliotheken möglich ist. Deshalb wird der Automat an nicht-peptidische Bibliotheken angepaßt. Die zum Nachweis verwendeten Assays liefern ein Signal, das mit der eingesetzten Probenmenge skaliert[11] (Burbaum et al.[17]). Deshalb besteht Entwicklungsbedarf für neue Detektionsmethoden und dazugehörigen Assays, wie sie z. B. in der zeitaufgelösten Spektroskopie verwendet werden. Ein Lösung des Detektionsproblems für Standard-Assays kann die vorgeschlagene Signalverstärkung mit Mikrolinsen darstellen.

5.4. *In vitro* Evolution

Evolutive Dynamik stellt sich als eine Wanderung einer Population auf einer komplexen Landschaft dar (Schuster et al.[115]). Optimieren auf dieser Landschaft ist also äquivalent dem normalen Darwinschen Ansatz und benötigt nicht den zellulären Apparat. Um eine Variation in der Sequenz zu erhalten, wird normalerweise mit fehlerbehafteter Replikation gearbeitet. Ein anderer Ansatz startet mit einem Ensemble von zufällig synthetisierten Molekülen. Mit der im Kapitel Optimierung beschriebener Methoden ließen sich nun gezielt Varianten in den Selektionszyklus einspeisen und so optimierte Moleküle mit Hilfe des Rechners erzeugen.

Zwei Ansätze lassen sich verwirklichen:

- die „Batch-technique“, die die gewünschte Eigenschaft eng mit dem Selektionsprozeß koppelt und daher die einzelnen Moleküle nicht zu isolieren braucht und
- die Technik des „Molecular screenings“, die durch räumliche Trennung die biologische Information isoliert und einzelne Moleküle testet.

[11] Ein Assay mit z.B. 1000 cpm Signal in 100µl hat nur 10 cpm Signal in 1µl.

Die erste Strategie verlangt chemisches Geschick des Experimentators und Strategien für die Selektion, die Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften produziert.
Die andere Strategie isoliert die Moleküle räumlich. Diese auf dem aufgebauten Automaten zu verfolgen, erscheint als vielversprechendes Konzept. Die Theorie der Darwinsche Evolution wird anwendbar, wenn Proteine zusammen mit der mRNA optimiert werden. Das Hauptproblem ist dabei, die mRNA und die durch Translation erzeugten Proteine zu koppeln.
Dies läßt sich durch die räumliche Trennung der RNA in den Waferkompartimenten erreichen. Nach der Translation können dann die gewünschten Eigenschaften untersucht werden. Da nun einzelne RNA- Moleküle räumlich getrennt vorliegen, müssen zum Nachweis der gewünschten Eigenschaft die Techniken der Einzelmoleküldetektion herangezogen werden; dies scheint aber aus Zeitgründen[12] nicht möglich. Ein weiteres Problem scheint die Spezifität des gemessen RNA Moleküls. Ein einziges Molekül stellt noch keine Verteilung um den Wildtyp dar, wie es die Quasispeziestheorie fordert.
Eine Lösung dieser Probleme stellt die Vermehrung der RNA bis über die Nachweisschwelle mit den vorgestellten Methoden dar, verwendet man DNA-Systeme kann man sie mit PCR hochverstärken. Hier lassen sich verschiedene Varianten der Erzeugung von Diversität denken; entweder vor der Räumlichen Trennung der Moleküle, oder nachher durch fehlerbehaftetes Verstärken der Moleküle, oder Kombinationen davon.
Die RNA Moleküle, die die besten Proteine erzeugt haben, werden dann für den nächsten Selektionszyklus verwendet.

[12] Ein Femtoliter kann man mit Methoden der Fcs in ca. 1msec abscannen, für die Fläche von 1mm^2 (1 Probenkammer) würde man also ca.1000 sec benötigen.

6. Anhang

6.1. Bei der chemischen Synthese verwendete Standardanalysemethoden

Da auf der einzelnen Synthesekugel genügend Substanz synthetisiert wurde und auch mit chemischen Verfahren abgespalten werden kann, konnten Standardmethoden (Römpp[98]) zum Nachweis erfolgreicher Synthesen eingesetzt werden. MSP und HPLC wie auch Edmann Abbau wurden verwendet.

Massenspektrometrie:

Bei der Massenspektroskopie werden Ionen entsprechend ihrem Verhältnis Masse/Ladung (m/z) auftrennt u. registriert. Die Registrierung der getrennten Ionen kann entweder auf einer Photoplatte geschehen oder als Ionenstrom elektrisch erfolgen. Im ersten Fall spricht man von Massenspektroskopie und im zweiten (für die analytische Chemie wichtigeren) von Massenspektrometrie. Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus drei Teilen: einer Einrichtung zur Erzeugung von Ionen („Ionenquelle“), einer Trennvorrichtung („Analysator“) u. schließlich dem Auffänger (Faraday-Käfig, Sekundärelektronen-Vervielfacher) zur Registrierung der Ionen.

HPLC:

Abk. für engl.: High Performance (oder) High Pressure Liquid Chromatography = Hochleistungs- (oder) Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. Die HPLC hat sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie entwickelt, als man erkannte, daß die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Man arbeitet daher bei der HPLC mit erheblich feinerem Material (3–10 mm) als bei der Gelchromatographie (35–75 mm) oder der Säulenchromatographie (120–200 mm). Die Feinteiligkeit der Trennmaterialien erfordert allerdings die Anwendung hoher Drücke

(bis zu 400 bar).Dies ist mit technischem. Aufwand verbunden. Trotz dieses Aufwands und der damit verbundenen Kosten hat sich die auch „Schnelle Flüssigkeitschromatographie“ genannte HPLC wegen ihrer Leistungsfähigkeit als Routinemethode durchgesetzt.

Die quantitative Auswertung erfolgt über die Peak-Flächen. Als Detektor wird wegen seiner leichten Handhabbarkeit überwiegend der UV-Detektor eingesetzt. Je nach Problemstellung werden auch andere Detektoren wie Refraktionsindex-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeitsdetektoren u.a. verwendet. Oft ist die Detektion erst nach einer Derivatisierung mit z.B. Dansylchlorid, Chromo- oder Fluorotags möglich.

Edman-Abbau:

Zur Sequenzanalyse der Aminosäuren in Proteinen wird auch der Edman-Abbau verwendet. Dabei wird für die Peptid-Kette vom Amino-Ende her Schritt für Schritt, d.h. Aminosäure für Aminosäure abgebaut; die jeweiligen „Schlußsteine“ (endständigen Aminosäuren) werden nach ihrer Abtrennung identifiziert, worauf sich der Abbauzyklus wiederholen kann. Die einzelnen Stufen des von Edman automatisierten Verfahrens sind:

Umsetzung der freien Amino-Gruppe mit Phenylisothiocyanat zum Thioharnstoff-Deriv. und dessen cyclisierende Spaltung zu der um die endständige Aminosäure verkürzten Peptid-Kette und zu einem instabilen 2-Anilino-4H-thiazol-5-on-Deriv., das sich zum 3-Phenyl-2-thiohydantoin-Deriv. (PTH-Aminosäure) umlagert.

Dieses Derivat ist dünnschicht- oder gaschromatographisch oder durch HPLC identifizierbar. Für einen vollständigen, in etwa 90 Min. ablaufenden Abbauzyklus mit dem von Edman konstruierten „Sequenator“ werden 30 Reaktions-, Extraktions- u. Trocknungsoperationen benötigt.

7. Literatur

1. Aikens R. S. (1991): Charge-Coupled Devices for Quantitative Electronic Imaging.Tucson, Arizona, Photometrics, Ltd.
2. Alam, J. and J.L. Cook. (1990): Reporter genes, Application to the studyof mammalian gene transcription . Anal. Biochem. 188: 245-254.
3. Ambroz M., A.J. MacRobert, J. Morgan, G. Rumbles, M.S.C. Foley and D. Philipps. (1994): Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminum phthalocyanine. J. Photochem. Photobiol. B, Biol. *22*: 105-117.
4. Arndt-Jovin D.J., M. Robert-Nicoud, S.J. Kaufman, and T.M. Jovin, (1985): Fluorescent digital imaging microscopy in cell biology. Science 230, 247-256.
5. Austin, S.A. and Clemens, M.J. The Effects of Haem on Translational Control of Protein Synthesis in Cell-Free Extracts from Fed and Lysine-Deprived Ehrlich Ascites Tumour Cells. *Eur.J.Biochem.* 117:601-607, 1981.
6. Ballard D. H. und C.M. Brown (1982): Computer Vision, Prentice Hall, New Jersey, ISBN 0-13-165316-4
7. Bauer G. (1990) Biochemische Verwirklichung und Analyse von kontrollierten Evolutionsexperimenten mit RNA Quasispezies *in vitro* , Dissertation Braunschweig
8. Belostotsky L. and A. S. Leonov, (1993): Design of Aplanatic Wafeguide Fresnel Lenses and Aberration-Free Planar Optical Systems , Journal of Lightwave Technology, *2*, 1314 – 1319.
9. Beal G., G. Bouchariat, J. Chabbal, J.P. Dupin, B. Fort, Y. Mellier (1987) Thomson-CSF frame transfer charged coupled device imagers: desing and evaluation at very low flux levels, Optical Energeering 26(9): 902-910
10. Bengtson, S. (1992): Semiconductor wafer bonding: a review of interfacial properties and applications. J. Elec. Mat. 21 S. 841-862
11. Book of abstracts, 1st International Conference on Microreaction Technology 23-25 Februar 1997, Frankfurt/Main
12. Booth RJ. Hodges JC. Polymer-supported quenching reagents for parallel purification. Journal of the American Chemical Society. Vol 119(21) (pp 4882-4886), 1997.
13. Borego, B. et al. (1995): Combinatorial libraries by cassette mutagenesis. Nucleic Acids Research, Vol. 23, No. 10.

14. Brasier A.R., J.E. Tate, and J.F. Habener. (1989): Optimized use of the fireflyluciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. BioTechniques.7: 1116-1122.

15. Breaker R.R. and G.F. Joyce, (1994): Emergence of a replicating species from an in vitro RNA evolution reaction, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 6093-6097.

16. Bronstein I., J. Fortin, P.E. Stanley, G.S.A.B. Stewart, and L. Kricka. (1994): Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. Anal. Biochem.219: 169-181.

17. Burbaum, J.J; Sigal, N.M. "New Technologies for high-throuput screening" (1997) Current opinion in Chemical Biology, 1:72-78.

18. Büttgenbach S., (1991): Mikromechanik, Teubner Studienbücher, Stuttgart

19. Chaint et al. 1993, Science 262:89

20. Chen, L.A. Ahlberg Randall, R.B. Miller, A.D. Jones and M.J. Kurth. Anlogous organic systhesis of small-compound libraries: validation of combinatorial chemistry in small-molecule synthesis, J. Am. Chem. Soc. 116, 2661-2662 (1994)

21. Cheng J., M.A. Shoffner, G.E. Hvichia, L.J. Kricka, and P. Wilding, (1996): Chip PCR, II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. Nucl. Acids Res., 24, 380-385.

22. Cotterill IC. Usyatinsky AY. Arnold JM. Clark DS. Dordick JS. Michels PC. Khmelnitsky YL. Microwave assisted combinatorial chemistry. Synthesis of substituted pyridines.Tetrahedron Letters. Vol 39(10) (pp 1117-1120), 1998.

23. de Boer, M. u. a. (1995): The black silicon method V: a study of the fabricating of movable structures for micro electromechanical systems. Proc. 8th Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators, Stockholm, , Paper No. 142

24. DeLaville F., (1993): Imaging Software and Microscopy Automation with Low Light-Level Detectors for Biomedical Research, American Biotechnology Laboratory, May, Pages 76-77.

25. DeWitt, A.W. Czarnik: Automated synthesis and Combinatorial chemistry Current opinion in biotechnology 1995, 6:640-645

26. DeWitt, A.W. Czarnik: Combinatorial Organic Synthesis Using Parke-Davis's Diversomer Method. Acc. Chem. Res. 29, 114-122 (1996).

27. Döring, M, (1991): Flüssigkeiten mikrofein dosieren, Feinwerktechnik und Messtechnik 99 (1991) 11, 459-463

28. Döring M.: persönliche Mitteilung

29. Dorsay et al. 1994 The design of a potent and orally bioavailable HIV Protease Inhibitor, Med Chem, Vol37,21,3443-3451

30. Earle C.W., M.E. Baker, M.B. Denton and R.S. Pomeroy. (1993): Imaging applications for chemical analysis utilizing charge coupled device array detectors. Trends in analytical chemistry no *12* 10: 395-403.

31. Eigen M., (1986): The Physics of Molecular Evolution. *Chemica Scripta* 26B: 13-26.

32. Eigen, M. (1971): Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. Naturwissenschaften, 58, 466-523

33. Eigen M., J. McCaskill and P. Schuster (1989): The molekular Quasispezies. Adv. Chem. Phys. 75, 149-263.

34. Eigen, M.; R. Rigler, (1994): Sorting single molecules, application to diagnostics and evolutionary biotechnology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740-5747.

35. Ellis Lynda, B.M.: The inverse protein folding question and simulated molecular evolution. Biophysical Journal Vol. 66. February 1994 275

36. Ellmann: Design, Synthesis, and Evaluation of Small-Molecule Libraries. Acc. Chem. Res. 29, 132-143 (1996).

37. Engelhardt K. and K. Knop, (1995): Passive focus sensor , Appl. Opt, *34*, 2339-2344.

38. Fahy E., D.Y. Kwoh, and T. R. Gingeras, (1991): Self-sustained Sequence Replication (3SR), A isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR, *PCR Methods and Applications*, 25-33.

39. Faruqui A.R., H.N. Andrews and C. Raeburn. (1994): A large cooled-CCD detector for electron microscopy. Nuclear Instruments and Methods in Physics research A *348*: 659-663.

40. Fodor, SPA; Read J. L. ; Pirrung MC; Stryer L; Lu A. T. ; Solas, D. : Light directed, Spatially adressable parallel chemical synthesis.

41. Früchtel und G. Jung: Organische Chemie an fester Phase. Ang. Chem. 108, 19-46 (1996).

42. Fulton R., and B. Van Ness. (1993): Luminescent reporter gene assays for luciferaseand beta-galactosidase using a liquid scintillation counter. BioTechniques14: 762-763.

43. Gallop, R.W. Barrett, W.J. dower, S.P.A. Fodor, and E.M. Gordon: Applications of combinatorial technologies to drug discoveries. 1.

Background and peptide combinatorial libraries (Review). J. Med. Chem. 37, 1233-1251 (1994).

44. Gebinoga M., (1997): Hypercycles in biological systems. in, *Eukaryotism and Symbiosis* Schenk, H.E.A. et al. (Eds.), 263-276.

45. Gebinoga, M. and Oehlenschläger, F. (1996) Comparison of self-sustained sequence replication reaction systems. *Eur.J.Biochem.* 235:256-261, 1996.

46. Gerthsen C. und H. Vogel (1993): Physik, 17. Auflage,Springer- Verlag Berlin

47. Gordon, M.A. Gallop, and D.V. Patei: Strategy and Tactics in Combinatorial Organic Synthesis. Applications to Drug Discovery. Acc. Chem. Res. 29, 144-154 (1996).

48. Gordon, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, and M.A. Gallop: Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future irections (Review). J. Med. Chem. 37, 1385-1401 (1994).

49. Guatelli J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwoh, K.J. Barringer, D.D. Richman, and T.R. Gingeras, (1990): Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87, 1874-1878.

50. Hall SE. The future of combinatorial chemistry as a drug discovery paradigm. Pharmaceutical Research. Vol 14(9) (pp 1104-1105), 1997.

51. Hamanaka K., H. Nemoto, M. Oikawa, E Okuda and T. Kishimoto, (1990): Multiple imaging and Fourier transformation using planar microlenses , Appl. Opt. *29*, 4064 – 4070.

52. Hayes St.J., St.A. Hinchliffe, J.D. Pope, P. Eccles, M.M. Khine, R.O.C. Kaschula, A. Sampedro and D. van Velzen, (1995.): Ploidy analysis on Wilms tumor touch imprints using ethidium bromide and automated image analysis integrated confocal scanning microscopy. Virchows Arch *427*: 101-104.

53. Hecht S.M. (1992): Probing the synthetic capabilities of a center of biochemical catalysis. Acc. Chem. Res. 25, 545-552.

54. Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, and D. Rees: Solid Phase organic reactions: A Review of the Recent Literatur. Tetrahedron 52, 4527-4554 (1996).

55. Herr St., Th. Bastian, R. Pepperkok, Ch. Boulin and W. Ansorge. (1993): A fully automated image acquisition and analysis system for low light level fluorescence microscopy. Methods in molecular and cellular biology *4*: 164-170.

56. Highett M.I., D.J. Rawlins and P.J. Shaw. (1993): Different patterns of rDNA distribution in Pisum sativum nucleoi correlate with different levels of nucleor activity. Journal of Cell Science *104*: 843-852.

57. Hiraoka Y., D.A. Agard and J.W. Sedat. (1987): The use of charge coupled devices for quantitative optical microscopy of biological structures. Science *231* 36-41.

58. Hofbauer R., F. Fessl, B. Hamilton and H. Ruis, (1982): Preparation of a mRNA-Dependent Cell-Free Translation System from Whole Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 122: 199-203.

59. Houston, J.G.; Banks, M "The chemical-biological interface:devlopments in automata and miniatruised screening technology" Current opinion in Biotechnology, (1997) 8:734-740

60. Hunt et al. 1992, Science:1261

61. Janesick et al (1989), . Charge-Coupled Device Pinning Technologies. Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers 1071-15.

62. Jones B.L., R.H. Enns, S.S. Rangnekar (1976): On the theorie of selection of coupled macromolecular systems. Bull. Math. Biol. 38,15-28

63. Kigawa T. and S. A Yokoyama, (1991): Continuous Cell-Free Protein Synthesis System for Coupled Transcription-Translation. *J.Biochemistry* 110: 166-168.

64. Köhler J.M., G. Mayer, Th. Schulz, A. Schober, (1996.): Chip elements for combinatorial chemistry, fluid processing and PCR , 5th intern. Conference on Micro-system technologies,Potsdam (1996), , H. Reichl and A. Heuberger (editors),693-698.

65. Köhler J.M., R. Pochmann, A. Schaper, A. Schober, Th.M. Jovin, A. Schwienhorst, (1995): Micromechanical elements for detection of molecules and molecular design , Microsystem Technologies 1.4, 202-208.

66. Köhler, A. Schober, A. Schwienhorst "Micromechanical elements for micromechanical systems" Experimental Technique of physics Vol. 40, No. 1 (1994).

67. Koppel, D. E.; F. Morgan, A. E. Cowan, J. H. Carson, (1994): Scanning concentration correlation spectroscopy using the confocal laser microscope. Biophysical Journal 66, 502-507.

68. Kubota F., H. Kusuzawa, T. Kosaka and H. Nakamoto. (1995): Flow cytometer and imaging device used in combination. Cytometry.*21*, 129-132.

69. Lasser-Ross N, H. Miyakawa, V. Lev-Ram, S. R. Young and W. Ross, (1991): High Time Resolution Fluorescence Imaging with a CCD Camera,. Journal of Neuroscience Methods, 36 253-261.

70. Lemme H., (1993): Sensoren in der Praxis, Daten, Meßverfahren und Applikationen. Franzis-Verlag München.

71. Lengauer Ch., R.M. Speicher, S. Popp, A. Jauch M. Taniwaki, R. Nagaraja, H.C. Riethman, H. Donis-Keller, M. D'Urso, D. Schlessinger and Th. Cremer. (1993): Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. Human Molecular Genetics. *2* no. 5: 505-512.

72. LePecq J.B. (1971): Use of EtBr for Separation and Determination of nucleic acids of various conformatical forms and measurements of their associated enzymes, Methods of Biochemical Analysis 20, 41-86

73. Leytus S. P., LL Melhado, W.F. Mangel (1983): Biochem. J 209,299-307.

74. Leytus S. P., W.L.Patterson, W.F. Mangel (1983): Biochem. J 215-260.

75. Lindemann, Björn Friedrich (1992): Kontrollierte Evolution von RNA-Phagen in kontinuierlicher Kultur, Dissertation TU - Braunschweig

76. Litborn, M. Stjernström and J. Roeraade "Nanoliter Tritratiion based on piecoelectric drop-on-demand technology and laser induced fluorescense detection" Anal. Chem. 1998,70, 4847-4852

77. Löber G. (1981):The fluorescence of dye-nucleic acid complexes, Journal of Luminescence 22,221-265

78. Maier E., H.R. Crollius and H. Lehrach. (1994): Hybridization techniques on gridded high density DNA and in sito colony filters based on fluorescence detection. Nucleic Acids Research. *22* no. 16: 3423-3424.

79. Maraganore J.M., P.Bourdon, J.Jablonski, K. L. Ramachandran, J. W-Fenton (1990) Biochemistry 29,7095-7101

80. Mayer G., und J.M. Köhler, Micomechaanical Compartments for Biotechnological Applications:Fabricaton and Investigation of Liquid Evaporation presented at Eurosensors X, 8.-11. September 1996, Leuven, Belgium

81. Mayer G., K. Wohlfahrt, A. Schober, J.M. Köhler (1998) "Nanotiterplates for screening and synthesis" in H.P. Saluz Microsystem technology: a powerful tool for biomolecular studies

82. Meyer-Almes, J.F. und D. Pörschke (1993): Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium, Biochemistry 32, 4246-4253

83. Mills D.R., R.L. Peterson, and S. Spiegelman, (1967): An extracellular darwinian experiment with a self- duplicating nucleic acid molecule, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 58, 217-222.

84. Metev, S.M.; Veiko, V.P. (1994): Laser-assisted microtechnology. Berlin: Springer

85. Moore Jeffrey and Frances H. Arnold Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. Nature biotechnology Volume 14 April 1996 458-467.

86. von Münch, W.; Crazzolara, H (1992): Spannungsarme Aufbautechnik piezoresistiver Siliziumsensoren durch den Einsatz von Glasloten. VDI-Berichte Nr. 939 S. 513-518

87. Nicholson Ch. and L. Tao. (1993): Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. Biophysical Journal. *65*: 2277-2290.

88. Oehlenschläger F. (1996): *In vitro* Evolution und Diagnostik von HIV-1-Anwendungsbereiche der Self-sustained sequence replication reaction (3SR), Braunschweig, Univ., Diss., 1996

89. Ohlckers, P. u. a. (1995): Batch processing for micromachined devices. J. Micromech. Microeng. 5 S. 47-56

90. Oldenburg K.R., Zhang J.H. et al (1998):Assay Miniaruisation for ultra High Throuput screeningof combinatorial and discrete Compuond Libraries: A9600-Well (0.2 Microliter) Assay System, J of Biomolekuar screening Vol3,1, S 55-62

91. Önnerfjord P., J. Nilsson, L. Wallman, T. Laurell, G. Marko-Varga "Picoliter sample preparation in MALDI-TOF MS using a micromachined silicon flow-through dispenser" Anal. Chem. 1998, 70, 4755-4760

92. Pauwels, H. Azijn, MP. de B, C. Claeys, K. Hertog "Automated techniques in biotechnology 1995, 6:111-117

93. Pavlidis T. (1990): Algorithmen zur Grafik und Bildverarbeitung, Verlag Hans Heise, Hannover, ISBN 3-88229-124-9

94. Pelham H.R.B. and R.J. Jackson (1976): An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates. *Eur.J.Biochem.* 67: 247-256.

95. Radl S. Use of combinatorial chemistry and technology in identification of novel bioactive compounds. Drugs of the Future. Vol 22(12) (pp 1375-1379), 1997.

96. Robert F. Service "High Speed Materials Design" 1997 Science Vol. 277, pp. 474-475.

97. Roberts B.E. and B.M. Paterson (1973), . Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 70: 2330-2334.

98. Römpp (1995): Chemie Lexikon, 9.Auflage

99. Saiki R.K., S. Scharf, F.A. Faloona, K.B. Mullis, C.T. Horn, H.A. Erlich, and Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of ß-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia, *Science,* 1350-1354.

100. Sarro, P.M. (1992): Sensor technology strategy in silicon. Sensors and Actuators A, 31 S. 138-143

101. Schena M., D. Shalon, R.W. Davis PO. Brown, (1995), . Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray , Science Vol.270, 467-70.

102. Schmidt, K. et. al. (1994): Mikrostrukturierung von Glas. F&M 102(1994)1-2 S. 21ff.

103. Schober, A (1994): Strategien einer evolutiven Biotechnologie, Braunschweig, TU, Dissertation

104. Schober A., A. Schwienhorst, J. M. Köhler, M. Fuchs, R. Günther, M. Thürk, (1995): Microsystems for independent parallel chemical and biological processing. Microsystems Technologies 1, 4, 168-172.

105. Schober A., G. Schlingloff, A. Thamm, D. Vetter, D. Tomandl, M. Gebinoga, H.J. Kiel, Ch. Scheffler, M. Döring, J.M. Köhler, G. Mayer (1996), . Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry Microsystems.

106. Schober A., J.M. Köhler, R. Günther, M. Thürk, A. Schwienhorst, J.M. Köhler, M. Eigen, M. Döring, 1993 Parallele Führung von Reaktionen . Patent Application PCT/EP 94/ 02173.

107. Schober A., M. Thürk and M. Eigen (1993): Optimization by hierarchical mutant production . Biol. Cybern. 69: 493-501.

108. Schober A., R. Günther, A. Schwienhorst, M. Döhring, B. Lindemann (1993): Accurate High Speed Liquid Handling of Very Small Biological Samples. Biotechniques Vol. 15, No.2.

109. Schober, A. Schwienhorst, J.M. Köhler, M. Fuchs, R. Günther, M. Thürk “Microsystems for independent parallel chemical and biological processing” Microsystems Technologies 1,4 (1995), 168-172.

110. Schober, A., G. Schlingloff, A. Thamm, D. Vetter, D. Tomandl, M. Gebinoga, H.J. Kiel, Ch. Scheffler, M. Döring, J.M. Köhler, G. Mayer ”Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry” Microsystems (1996).

111. Schober, G. Schlingloff , D. Tomandl, J.M. Köhler, G. Mayer,St. Wuchty, H. Deppe, B. Diefenbach, H. Wurziger “Chemical and Biochemical synthesis and screening in silico” Microsystems 1998

112. Schober, G. Schlingloff, A. Thamm, D. Vetter, D. Thomandl, M. Gebinoga, H.J. Kiel, Ch. Scheffler, M. Döring, J.M. Köhler, G. Mayer (1996). ”Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry” Microsystems (1996).

113. Schuster P., (1994): Extended Molecular Evolutionary Biology: Artificial life bridging the gap between chemistry and biology, Artificial life Vol.1, ,39-60

114. Schuster P., (1995): How to search for RNA structures. Theoretical concepts in evolutionary biotechnology. *J.of Biotechnology* 41: 239-257.

115. Schuster P., J. Weber, W. Grüner, C Reidys: Molekular Evolutionary Biology, from Concepts to technology, in: H. Flyvberg, J. Hertz, M.H. Jensen, O.G. Moutritzen, K. Sneppen (edts.), Physics of Biological Systems: From Molecules to Species, Springer 1997, ISBN 3-540-62475-9

116. Schwesinger N, Olaf Marufke, Feng Qiao, Michael Hohmann, Hanns Wurziger. A Full Wafer Silicon Micro Reactor for Organic Chemistry Second International Conference on Microreaction Technology" held in New Orleans 8. -12. 3. 1998. will be published 1999 in W. Ehrfeld, V. Hessel, Editors, Wiley-VCH "Microreactors-New Technology for Modern Chemistry"

117. Schwesinger, N.: Planarer Tintenstrahldruckkopf mit piezokeramischem Antrieb. F&M 101 (1993) H. 11 - 12 S. 456 - 460)

118. Shaw, K.A. u. a. (1994): SCREAM I: a single mask, single-crystal silicon, reactive ion etching process for microelectromechanical structures. Sensors and Actuators A, 40 S. 63-70

119. Shimada J., O. Ohguchi and R. Sawanda, (1993): Efficient coupling device between a laser diode integrated with a microlens and an optical fiber , European Conference on Integrated Optics 1993 ed. Patrick Roth, Neuchatel (Switzerland), 11.6-11.7.

120. Shoffner M.A., J. Cheng, G.E. Hvichia, L.J. Kricka, and P. Wilding, (1996): Chip PCR, I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. Nucl. Acids Res., 24, 375-379.

121. Singer W., M Testorf and K.H. Brenner, (1995): Gradient – index microlenses, numerical investigation of different spherical index profiles with the wave propagation method , Appl. Opt. *34*, 2165 - 2171.

122. Siuzdak G. Lewis JK. Applications of mass spectrometry in combinatorial chemistry. Biotechnology & Bioengineering. Vol 61(2) (pp 127-134), 1998.

123. Smith P (1997) “In vitro models for selection of development candidates” 1997 Advanced Drug delivery Reviews 23 3-25

124. Smith J. Cooper T. Combinatorial synthesis in medicinal chemistry: Implications in drug discovery and development. Review of Clinical Pharmacology & Pharmacokinetics, International Edition. Vol 11(2-3) (pp 104-107), 1997.

125. Spiegelman S. (1970): The harvey lectures Series 64, Academic Press New York and London

126. Spirin A.S., V.I. Baranov, L.A. Byabova, S.Y. Ovodov, and Y.B. Alakhov, (1988): .A Continous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield. *Science* 242: 1162-1164.

127. Steinbrecher R.(1993): Bildverarbeitung in der Praxis, Oldenburg Verlag München, ISBN 3-489-22372-0

128. Steinkamp J.A., T.M. Joshida and J.C. Martin. (1993): Flow cytometer for resolving signals from heterogeneous fluorescence emissions and quantifying life time in fluorochrome-labeled cells/particles by phase-sensitive detection. Rev. Sci. Instrum.*64* no. 12: 3440-3450.

129. Sternberg S. J., (1993): CCD Bioimaging in Real Time, American Biotechnology Laboratory, August, Pages 56-57.

130. Stiege W. and V.A. Erdmann, (1995): The potentials of the in vitro protein biosynthesis system. *J.of Biotechnology* 41: 81-90.

131. Strunk G. (1992): Automatisierte Evolutionsexperimente in vitro und natürliche Selektion unter kontrollierten Bedingungen mit Hilfe der Serial Transfer Technik Dissertation

132. Stryer L (1990): Biochemie, 4.Auflage, Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft verlagsgesellschaft, ISBN 3-89330-690-0

133. Sweedler J.V., R.B.Bilhorn, P.M. Epperson, G.R. Sims and M.B. Denton,. (1988): High performance charge transfer devices. Analytical Chemistry A40 4: 282-291.

134. Sze, S.M (1983): VLSI technology. New York: McGraw-Hill

135. Szeweczuk Z., B.F. Gibbs, S.Y. Yue, E. Purisima, A Zdynov, M Cygler, Y Konishi 1993: Biochemistry 32, 3396-3404

136. Terrett, M. Gardner, D.W. Gordon, R.J. Kobylecki, and J. Steele: Combinatorial Synthesis - The Design of Compound Libraries and their Application to Drug Discovery. Tetrahedron 51, 8135-8173 (1995).

137. Thompson C.J., J.L. McBride (1974): On Eigen's theorie of the selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. Math Biosci. 21, 127-142

138. Tomandl D., A. Schober, A. Schwienhorst, (1997): Optimizing doped libraries by using genetic algorithms. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 11, 29-38.

139. Tomandl, D. (1999): Selbstlernende Systeme ind ihr Optimierverhalten auf Fitnesslandschaften – Anwendungen in der Biotechnologie, Dissertation, Uni Wien

140. Tsi D., E. Marom, J. Katz and J. Swartz, (1993): System analysis of CCD – based bar code readers , Appl. Opt., *32*, 3504 – 3512.

141. Tuerk C. and L. Gold, (1990): Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* 249: 505-510.

142. Warner I.M, St.A. Soper and L. B. McGown. (1996): Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. Anal. Chem. *68*: 73R-91R.

143. Waterhouse R.N. and L.N. Glover. (1994): CCD monitoring of bioluminescence during the induction of cell wall-deficient, L- form state of a genetically modified strain of Pseudomonas syringae pv.phaseolicola. Letters in Applied Microbiology *19*: 88-91.

144. White M.R.H., J. Morse, Z.A.M. Boniszewski, C.R. Mundy, M.A.W. Brady and D.J. Chriswell. (1990): Imaging of firefly luciferase in single mammalian cells using high sensitive charge coupled device cameras. Technique *2* no. 4: 194-201.

145. Winnaker E.-L.,Gene und Klone VCHVerlag ISBN 3-527-28235-1

146. Wolf, A., U. Berg, W. Ehrfeld, H. Lehr, F. Michel, N. Zimmerschitt, (1997) Form & Werkzeug

147. Zaaijer H.L., W. Kok, J.H. ten Veen, H.W. Reesink, H. Foolen, I.N. Winkel, J.G. Huisman, H.T.M. Cuypers, T. Kievits, and P.N. Lelie, (1995): Detection of HIV-1 RNA in plasma by isothermal amplification (NASBA)

irrespective of the stage of HIV-1 infection. J. of Virological Methods, 52, 175-181.

148. Zhao H. and F. H. Arnold, (1997): Combinatorial protein design, strategies for screening protein libraries Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 480-485.

Eigene Patente und Publikationen:

1. Schober, G. Schlingloff, A. Thamm, D. Vetter, D. Tomandl, M. Gebinoga, H.J. Kiel, Ch. Scheffler, M. Döring, J.M. Köhler, G. Mayer ”Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry” Microsystems (1996).
2. Schober, G. Schlingloff, A. Thamm, D. Tomandl, M. Gebinoga, H.J. Kiel, Ch. Scheffler, M. Döring, J.M. Köhler, G. Mayer ”Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry” Microsystems Technologies 4, (1997), 35
3. G. Schlingloff, H.J. Kiel and A. Schober (1998):”Microlenses as Amplification for CCD based Detection devices for Screening applications in Biology, Biochemistry and Chemistry”, applied optics Vol37.No10.1930-1934
4. Schober, G. Schlingloff , D. Tomandl, J.M. Köhler, G. Mayer,St. Wuchty, H. Deppe, B. Diefenbach, H. Wurziger “Chemical and Biochemical synthesis and screening in silico” Microsystems 1998
5. M. Gebinoga, G. Schlingloff, A. Thamm, Ch. Beck and A. Schober ”Biochemical Synthesis in microstructred silicon wafer” to be submitted
6. Vetter, A. Thamm, G. Schlingloff and A. Schober ”Single Bead synthesis of oligopeptides on silicon” to be submitted

Patente:

Döring, M, G. Mayer, G. Schlingloff, A. Schober “Probensortier-, Übergabe- und Aufnahmevorrichtung für kleine Mikroperlen und Verfahren zu deren Betrieb” 198 50 233.8 Patentanmeldung 1998.

Schober, A, A. Albrecht, M. Kallenbach, H. Wurmus, G. Schlingloff “Magnetischer Greifer für matrixartig angeordnete Objekte”Patentanmeldung 1998