

Anwendung von Mikro- und Akustofluidik auf biophysikalische Systeme in Experiment und Simulation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.



eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität Augsburg

von

Lukas Gabriel Schnitzler

Augsburg, März 2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph Westerhausen
Zweitgutachter: Prof. Dr. Manfred Albrecht

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Verpacken passiver Moleküle – Mikrofluidisches Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen	7
1.1 Einleitung	8
1.2 Grundlagen	10
1.2.1 Fluiddynamik	10
1.2.2 Akustische Oberflächenwellen	13
1.2.3 Finite Elemente Methode	23
1.3 Diffusives Mischen	24
1.4 Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen	26
1.4.1 Flussrate und Leistung der Oberflächenwelle	28
1.4.2 Geometrie des Schallwandlers	30
1.4.3 Zeitliche Modulation der Oberflächenwelle	33
1.5 Fazit	35
2 Manipulation aktiver Moleküle – Einfluss statischer und dynamischer Variation der Membranfläche gebundener Enzyme	37
2.1 Einleitung	39
2.2 Materialien und Methoden	40
2.2.1 Herstellung Lipidmembran	40
2.2.2 Ellmans Reagenz	41
2.2.3 Akustische Stehwellenfelder	44
2.3 Manipulation Lipidmembran mittels akustischer Oberflächenwellen .	47
2.3.1 Akustische Stehwellenfelder	48
2.3.2 Nachweis Lipidmembran	50
2.3.3 Domänenbildung Lipidmembran	52
2.4 Enzymaktivität	55
2.4.1 Dynamische Variation der Membranfläche	57
2.4.2 Statische Variation der Membranfläche	64
2.5 Fazit	68
3 Verfolgung lebender Zellen – Akustische Detektion migrierender Zellen bei in vitro Wundheilungsexperimenten	69
3.1 Einleitung	70
3.2 Simulation akustischer Oberflächenwellen	74
3.2.1 Eigenfrequenzstudie	74

3.2.2	Zeitabhängige Simulation	80
3.3	Simulation von in vitro Wundheilungsexperimenten	82
3.3.1	Einfluss einer Zellschicht	83
3.3.2	Simulation eines Modellsensors	88
3.4	Fazit	90
4	Steuerung lebender Zellen – Invasion von Zellaggregaten in mikrofluidisch strukturierten Kollagennetzwerken	93
4.1	Einleitung	94
4.2	Vermessung und Simulation des Strömungsfeldes	96
4.2.1	Numerische Berechnung des Strömungsfeldes	96
4.2.2	Laminare Strömung im Kanal	99
4.2.3	Laminare Umströmung eines Zellaggregats	101
4.3	Simulation der Invasion im Kollagennetzwerk	103
4.3.1	Einfache 2D-Zufallsbewegung	103
4.3.2	Richtungs- und ortsabhängige 2D-Zufallsbewegung	105
4.3.3	Simulation der Invasion von Zellen im Kollagennetzwerk	108
4.4	Fazit	113
5	Mobile Mikroorganismen – Einzel- und Ensemblemessungen zur Bewegungs- und Zustandsanalyse	115
5.1	Einleitung	117
5.2	Materialien und Methoden	118
5.3	Mikrofluidische Einzelzellmessungen	121
5.3.1	Fallenentwicklung	121
5.3.2	Beobachtung des Schwimmverhaltens	126
5.4	Ensemblemessungen	128
5.4.1	DLS Messungen mit Paramecien-Zellen	128
5.4.2	Korrelationsmessungen mit Paramecien-Zellen	131
5.5	Fazit	135
	Fazit und Ausblick	137
	Literaturverzeichnis	143
	Abkürzungsverzeichnis	157
	Anhang	159
A.1	Zu Kapitel 1	159
A.2	Zu Kapitel 2	162

Inhaltsverzeichnis

A.3	Zu Kapitel 3	167
A.4	Zu Kapitel 4	177
A.5	Zu Kapitel 5	184
	Publikationsliste	189
	Danksagung	191

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich grundsätzlich mit der Anwendung von Mikro- und Akustofluidik in biologischen Systemen in Experiment und Simulation. Der Begriff Akustofluidik umfasst die aktive Beeinflussung kleiner Flüssigkeitsvolumina und darin enthaltener Teilchen. Dazu wird in dieser Arbeit die Akustische Oberflächenwelle (Surface Acoustic Wave, SAW) eingesetzt. Akustische Oberflächenwellen sind Wellen, die sich – wie der Name schon sagt – an der Oberfläche von Festkörpern ausbreiten. Auf piezoelektrischen Materialien lassen sich SAW mit einer Amplitude im Nanometerbereich erzeugen. Die SAW-gesteuerte Akustofluidik lässt sich gezielt zur Erzeugung von mikrofluidischen Strömungen einsetzen und ist damit ideal für die Biowissenschaften geeignet. Zusätzlich zur aktiven Verwendung von SAW (Aktorik) lässt sich die SAW auch zur passiven Untersuchung (Sensorik) nutzen. Neben dem experimentellen Einsatz der SAW werden in dieser Arbeit Simulationen anhand der Finite Elemente Methode (FEM) durchgeführt. Die Arbeit untergliedert sich in fünf Hauptkapitel, die jeweils durch relevante Fragestellungen der Grundlagenforschung und durch bio- bzw. medizintechnische Anwendungen motiviert sind. Dabei zeigen sich eindrucksvoll die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der genannten Techniken, die von einfachen nichtlebenden Systemen bestehend aus Lipiden und Enzymen bis hin zu komplexeren lebenden Systemen wie Zellen und Mikroorganismen reichen. *Abb. 1* zeigt eine Übersicht der einzelnen Kapitel dieser Arbeit. Die Komplexität der betrachteten biophysikalischen Systeme steigert sich dabei von Kapitel zu Kapitel. Angefangen von verpackten passiven Molekülen in Form von therapeutischen Nanopartikeln (TNP) über aktive Moleküle (Enzyme als Biokatalysatoren), bis hin zu Zellen und Mikroorganismen. Immer im Blick ist dabei, wie sich die SAW und die Mikrofluidik als Werkzeuge zur Untersuchung und Manipulation einsetzen lassen.

Verpacken passiver Moleküle – Mikrofluidisches Mischen mit Akustischen Oberflächenwellen

Das erste Kapitel befasst sich damit, wie eine Durchmischung von Flüssigkeiten in einem Mikrofluidikkanal schnell und kontrolliert erreicht werden kann. Dazu werden zwei Flüssigkeiten durch einen Mikrokanal gepumpt und mittels einer SAW-Strömung vermischt (siehe *Abb. 1 - Mikrofluidisches Mischen mit SAW*). Es wird hierzu die Rayleighwelle, eine spezielle Ausprägungsform einer SAW, verwendet.

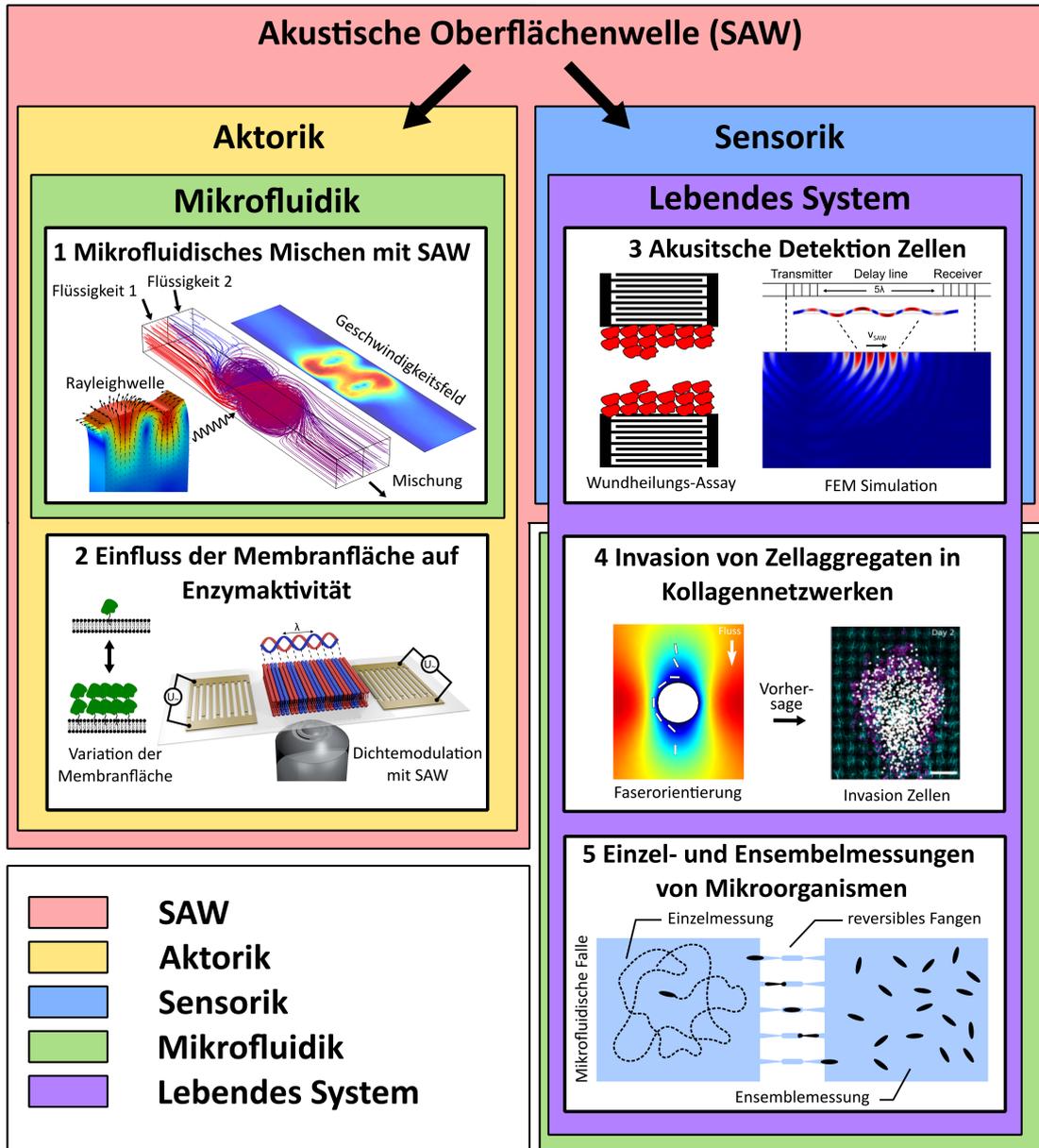


Abb. 1: Übersichtsgrafik über die einzelnen Kapitel dieser Arbeit. Die Komplexität der betrachteten biophysikalischen Systeme steigert sich dabei von Kapitel zu Kapitel. Angefangen von der Erzeugung passiver verpackter Moleküle (beispielsweise therapeutische Nanopartikel) mittels mikrofluidischen Mischens über aktive Moleküle (Enzyme als Biokatalysatoren), bis hin zu lebenden Systemen wie Zellen und Mikroorganismen. Immer im Blick ist dabei, wie sich die SAW und die Mikrofluidik als Werkzeug zur Untersuchung und Manipulation einsetzen lässt.

Mittels mikrofluidischen Mischens lassen sich beispielsweise Lipidnanopartikel – bestehend aus einer Lipidhülle und einem eingeschlossenen Wirkstoff wie Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid, DNA) oder Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid, RNA) – erzeugen. Diese Nanopartikel haben aktuell eine große Aufmerksamkeit für die Verwendung als Trägersysteme für Impfstoffe erhalten. Sie bieten aber auch das Potential in der Krebstherapie und anderen Gebieten eingesetzt zu werden. Ausgehend von Experimenten zur Durchmischung durch SAW in einem mikrofluidischen Kanal, werden hier Simulationen basierend auf der Finite Elemente Methode durchgeführt. Der diffusive Mischprozess in einem mikrofluidischen Kanal ist sehr langsam und erfordert daher in der Regel lange Kanalstrukturen. Durch den Einsatz von SAW kann der Mischprozess deutlich beschleunigt und eine vollständige Durchmischung erreicht werden. Zur Optimierung des Mischens in Mikrofluidikkanälen fehlt noch eine umfassende Studie des Parameterraums. Ziel der Simulationen ist es, den Einfluss verschiedener Parameter, wie z. B. der Strömungsgeschwindigkeit und der SAW-Leistung, besser zu verstehen. Daraus können Rückschlüsse gezogen werden, wie der Mischprozess weiter optimiert und damit die Erzeugung therapeutischer Nanopartikel gezielt beeinflusst werden kann. Wie sich zeigt, hat das Verhältnis zwischen der Strömungsgeschwindigkeit im Kanal und der von der SAW erzeugten Geschwindigkeit einen starken Einfluss auf das Mischverhalten. Zur Erzeugung von SAW werden Interdigitale Schallwandler (Interdigital Transducer, IDT) verwendet. Auch die Geometrie der IDT beeinflusst das Mischverhalten.

Manipulation aktiver Moleküle – Einfluss statischer und dynamischer Variation der Membranfläche gebundener Enzyme

Im ersten Kapitel wird ein Mischverfahren vorgestellt, mit dem passive Moleküle verpackt werden können, um als therapeutische Nanopartikel eingesetzt zu werden. Das zweite Kapitel hingegen beschäftigt sich mit der Beeinflussung von Enzymen. Diese können als aktive Biomoleküle angesehen werden, da sie durch ihre katalytische Wirkung verschiedenste biologische Prozesse steuern. Neben dem Einsatz der SAW zur Erzeugung von Strömungen in Flüssigkeiten ist eine weitere aktorische Anwendung der SAW die Erzeugung akustischer Stehwellenfelder. Diese Stehwellenfelder können dazu genutzt werden, eine festkörpergestützte Lipidmembran (Supported Lipid Bilayer, SLB) dynamisch zu modulieren. Damit lassen künstlich sog. Lipid Rafts, das sind Membrandomänen, deren Komposition sich von der restlichen Membran unterscheidet, nachahmen. Die Rolle dieser Membranbereiche für zelluläre Funktionen

ist noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur ist bereits bekannt, der Membranzustand hat Einfluss auf die Enzymaktivität. In diesem Kapitel wird daher die Frage untersucht, ob die Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) auch künstlich durch Dichtemodulationen in einem SLB beeinflusst werden kann (siehe *Abb. 1 - Einfluss der Membranfläche auf Enzymaktivität*). Nach dem derzeitigen Modell der Nervenenausbreitung besteht die Funktion der AChE darin, die synaptische Übertragung von Nervensignalen zu beenden, indem der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) im synaptischen Spalt zu Essigsäure (Acetat) und Cholin hydrolysiert wird. Die außersynaptischen Funktionen, die als *nicht-klassische* Funktionen bezeichnet werden, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Um weitere relevante physikalische Einflussfaktoren der AChE zu identifizieren, wird hier die AChE Aktivität mit der Ellmans Reagenz *in vitro* gemessen, wobei das Enzym an eine Lipidmembran gebunden ist. In den Experimenten wird festgestellt, dass das Enzym an die Membran anbindet. Die Aktivität wird jedoch nicht durch die Dichtemodulation und die damit zur Verfügung stehende Membranfläche im SLB beeinflusst. Hingegen wird eine doppelt so hohe Aktivität in Anwesenheit von Lipidmembranen in Form von kleinen unilamellaren Vesikeln (Small Unilamellar Vesicle, SUV) im Vergleich zu lipidfreien Proben gefunden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Zunahme der Aktivität mit der verfügbaren Membranfläche pro Enzym skaliert und für große Membranflächen sättigt.

Verfolgung lebender Zellen – Akustische Detektion migrierender Zellen bei *in vitro* Wundheilungsexperimenten

In den ersten beiden Kapiteln wird die SAW als aktorisches Werkzeug eingesetzt, darüber hinaus kann diese aber auch zur Sensorik verwendet werden, um beispielsweise Änderungen der Materialeigenschaften einer bedeckenden Schicht zu untersuchen. Dieses Messprinzip wird hier auf ein *in vitro* Wundheilungsexperiment angewendet, bei dem Zellen durch Migration auf einem Substrat eine künstlich eingefügte Wunde – dargestellt durch einen initial zellfreien Bereich – schließen (siehe *Abb. 1 - Akustische Detektion Zellen*). Aufbauend auf Experimenten wird hier mittels FEM Simulationen die akustische Detektion von Zellen untersucht. Erkenntnisse aus solchen Experimenten sind z. B. relevant für die Materialforschung für Implantate oder den Einfluss chemischer Substanzen auf das Migrationsverhalten. In Experimenten wurde festgestellt, dass das gemessene Phasensignal der SAW zunimmt, wenn die Wunde geschlossen wird. Dies ist gleichbedeutend mit einer Zunahme der SAW-Geschwindigkeit. Anhand von sowohl Eigenfrequenzstudien als auch zeitabhängigen Simulationen konnte ge-

zeigt werden, dass die elektrischen Eigenschaften der adhärirten Zellschicht für die Zunahme des gemessenen Phasensignals verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine Abhängigkeit des Signals vom Abstand der Zellschicht zur Substratoberfläche festgestellt, der die Abnahme des Signals nach vollständigem Wundschluss zugeschrieben wird. Somit konnte mithilfe der Simulationen der Verlauf des Sensorsignals im Experiment vollständig erklärt werden.

Steuerung lebender Zellen – Invasion von Zellaggregaten in mikrofluidisch strukturierten Kollagenetzwerken

Neben der Migration von Zellen auf einem Substrat, also in zwei Dimensionen, was im Körper etwa relevant beim Wachsen von Zellen auf Knochen oder Implantaten ist, wird die Invasion von Zellen in ein Modellsystem für menschliches Körpergewebe betrachtet. Als Modellsystem eignet sich Kollagen. Dieses bildet im Körper Netzwerke und gibt den Zellen Struktur und halt. *In vitro* hergestellte Kollagenetzwerke können zufällig oder gezielt strukturiert vorliegen, z. B. durch Anlegen einer mikrofluidischen Strömung während der Polymerisierung. Hier stellt sich die Frage, wie sich Zellen in dieser Umgebung verhalten und ob diese ggf. sogar gezielt gesteuert werden können. Konkret wird die Umströmung eines Zellaggregats in einem Mikrofluidikkanal dazu genutzt, um eine Ausrichtung der Kollagenfasern zu bewirken und die anschließende Invasion der Zellen zu beobachten (siehe *Abb. 1 - Invasion von Zellen in Kollagenetzwerken*). In dieser Arbeit wird sowohl experimentell als auch mit Hilfe von FEM Simulationen gezeigt, dass die dabei beobachtete Asymmetrie der Faserorientierung durch das Strömungsprofil und den aus der Form der Fasern resultierenden Trajektorien zu erklären ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die anschließende Invasion der Zellen in dieser Matrix durch einen richtungs- und ortsabhängigen Zufallsweg (engl. Random Walk) der Zellen beschrieben werden kann. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, ein strukturiertes Kollagenetzwerk kann zur gezielten Steuerung der Invasion von Zellen genutzt werden.

Untersuchung mobiler Mikroorganismen – Einzel- und Ensemblemessungen zur Bewegungs- und Zustandsanalyse

Ein noch komplexeres Bewegungsmuster im Vergleich zu Zellen weisen bewegliche Mikroorganismen, wie die Spezies *Paramecium caudatum* – auch als Pantoffeltierchen bekannt – auf. Gerade aufgrund ihrer hohen Agilität erweisen sich Einzelzellmessungen allerdings als äußerst schwierig. In dieser Arbeit wird daher eine mikrofluidische

Falle entwickelt, mit der die Beobachtung einzelner Mikroorganismen möglich ist (siehe *Abb. 1 - Einzel- und Ensemblemessungen von Mikroorganismen*). In diesen Fällen können die Mikroorganismen reversibel, ohne dem Einzeller Schaden zuzufügen, eingefangen und wieder freigelassen werden. Die Bewegung wird räumlich stark eingeschränkt und ermöglicht damit unter anderem optische Messungen des Phasenzustands der Membran der Mikroorganismen. Darüber hinaus lässt sich aber auch das Schwimmverhalten einzelner Mikroorganismen beobachten. Somit wird u.a. die Korrelation von Membranordnung und zellulärer Funktion, hier die Bewegung, auf Einzelzellniveau möglich. Neben diesen Einzelzellmessungen wird eine alternative Technik verwendet, um das Schwimmverhalten des Ensembles zu quantifizieren. Dazu werden Messungen mittels DLS und Mikroskopie durchgeführt. Abweichend zur Analyse von Einzelzelltrajektorien wird bei letzterem jedoch die Korrelation aufeinanderfolgender Mikroskopbilder berechnet, um in Analogie zur Lichtstreuung eine Zeitkonstante zu ermitteln, über deren Dauer das Bild und somit die Positionen der Einzeller im Bildbereich korreliert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Abklingkonstante, mit der das mit sich selbst korrelierte Signal abfällt, direkt proportional zur Schwimgeschwindigkeit ist. Die beiden verwendeten Techniken bieten den Vorteil gegenüber herkömmlichen Trackingverfahren, dass eine große Anzahl an Mikroorganismen problemlos gleichzeitig beobachtet werden kann.

1 Verpacken passiver Moleküle

Mikrofluidisches Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen

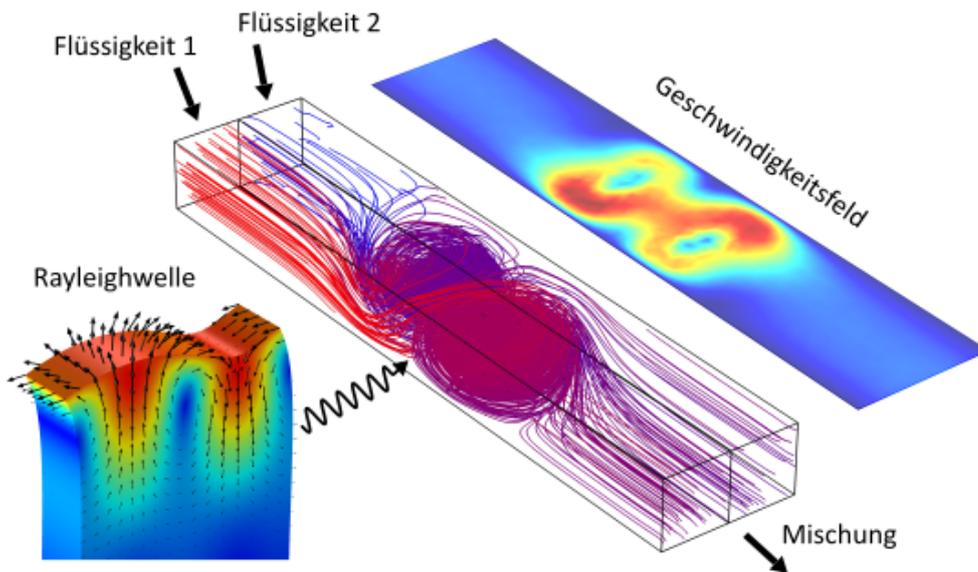


Abb. 1.1: Grundprinzip des Mischens mit akustischen Oberflächenwellen in einem Mikrofluidikkanal: Eine Rayleighwelle erzeugt beim Einkoppeln in den Kanal eine Strömung quer zur Flussrichtung. Dadurch kommt es durch Faltung der Stromlinien zur Mischung der beiden zuvor getrennten Flüssigkeitsphasen. Damit lassen sich beispielsweise therapeutische Nanopartikel herstellen.

In diesem Kapitel werden aufbauend auf Experimenten zum Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen in einem Mikrofluidikkanal FEM Simulationen durchgeführt (siehe *Abb. 1.1*). Diffusives Mischen im Kanal ist sehr langsam und erfordert daher in der Regel lange Kanalstrukturen. Durch Verwendung von SAW kann der Mischprozess deutlich beschleunigt und eine schnellere vollständige Durchmischung erreicht werden. Das Mischverhalten wird maßgeblich vom Verhältnis der Flussgeschwindigkeit im Kanal zu der durch SAW erzeugten Geschwindigkeit beeinflusst. Weiterhin wird das Mischverhalten durch die Geometrie des Akustischen Oberflächenwellenbauelements beeinflusst, wobei die optimale Breite des IDT etwa der halben Kanalbreite entspricht. Durch periodische Variation des Einkopplungsortes kann das Mischverhalten weiter gesteigert werden.

Dieses Mischverfahren ist dazu geeignet passive Moleküle, wie DNA oder RNA in einer Lipidhülle zu verpacken, um als therapeutische Nanopartikel eingesetzt zu werden.

Schlagwörter: Aktorik, SAW, Akustofluidik, Mikrofluidik, Mischen, FEM Simulation

1.1 Einleitung

Experimentelle Anwendung des Mischens kleinster Flüssigkeitsmengen mit Hilfe akustischer Oberflächenwellen hat eine lange Tradition am Lehrstuhl für Experimentalphysik I der Universität Augsburg [1–7]. So hat sich der Autor dieser Arbeit bereits in der Vergangenheit experimentell mit der Nutzung akustofluidischen Mischens zur kontrollierten Herstellung von TNP befasst [6–9]. TNP sind sehr kleine Partikel, die für medizinische Zwecke entwickelt werden. Sie haben eine Größe von weniger als 100 Nanometern und können beispielsweise zur zielgerichteten Freisetzung von Medikamenten eingesetzt werden. Zur Optimierung des Mischens in Mikrofluidikkanälen fehlt noch eine umfassende Studie des Parameterraums. Um diese Lücke zu schließen, wurden im Rahmen dieser Arbeit FEM-Simulationen zum Mischen in Mikrofluidikkanälen durchgeführt. Die experimentellen Daten, auf die sich die Simulationen beziehen, wurden zum Teil bereits in der Fachzeitschrift *Micromachines* veröffentlicht:

C. Westerhausen, L.G. Schnitzler, D. Wendel, R. Krzysztoń, U. Lächelt, E. Wagner, J. O. Rädler, and A. Wixforth. „Controllable acoustic mixing of fluids in microchannels for the fabrication of therapeutic nanoparticles,“ *Micromachines*, vol. 7, no. 9, 2016. [6]¹

Der Beitrag des Autors dieser Arbeit in der Veröffentlichung waren die Experimente zum Mischen mit SAW im Mikrofluidikkanal. In dieser Arbeit liegt der Fokus allerdings auf den Simulationen, während die experimentellen Daten nur als Referenz herangezogen werden.

¹Internet-Adresse zur Veröffentlichung:
<https://www.mdpi.com/2072-666X/7/9/150>

Das Mischen kleiner Flüssigkeitsvolumina stellt eine Herausforderung dar. Hier überwiegen die Reibungskräfte im Verhältnis zu den Trägheitskräften. Daher liegen lamina-re Strömungsverhältnisse vor. Bei einer laminaren Strömung treten keine Turbulenzen auf und die Stromlinien kreuzen sich nicht. Daher mischen sich verschiedene Flüssigkeitsphasen oder in der Flüssigkeit enthaltene Teilchen nur aufgrund von Diffusion. Diffusion ist vergleichsweise langsam. Um den Mischprozess zu verbessern bzw. zu beschleunigen, gibt es verschiedene Ansätze. Im Wesentlichen lassen sich die Techniken in passive und aktive Mikromischer unterteilen [10, 11]. Zu den passiven Mikromischern gehören recht simple Geometrien wie T- oder Y-Formen aber auch aufwändigere Strukturen, die zum Beispiel auf Fischgräten-Muster, Tesla-Ventilen oder 3D-Strukturen basieren. Diese passiven Methoden haben meist das Problem relativ großer Mischzeiten und Kanallängen. Eine effiziente Methode Strömungen in kleinen Flüssigkeitsvolumina zu erzeugen ist die Verwendung von SAW. Bedeckt eine Flüssigkeit das Substrat, auf der sich die SAW ausbreitet, so lässt sich das sog. *SAW Streaming* [12–14] beobachten. Dabei handelt sich um eine Strömung, die in der Flüssigkeit induziert wird. Dieser Effekt lässt sich ausnutzen, um kleine Flüssigkeitsvolumina zu mischen. Die SAW kann als aktiver Mikromischer eingesetzt werden. Am Lehrstuhl für Experimentalphysik I der Universität Augsburg wurde das *SAW Streaming* und seine Anwendung zum Mischen und für biophysikalische Fragestellungen bereits eingesetzt. Beginnend mit der Verschiebung und Fusion kleinster Flüssigkeitstropfen auf der planaren Oberfläche eines piezoelektrischen Chips mittels SAW [1, 2]. Weiterhin wurde das durch *SAW Streaming* erzeugte Strömungsprofil in einem Kapillarspalt und die Pumpeffizienz einer akustischen Mikropumpe sowohl experimentell als auch theoretisch untersucht [15]. Es wurde festgestellt, dass die Strömungsgeschwindigkeit von der angelegten Leistung linear abhängt und mit zunehmendem Abstand von der Chipoberfläche schnell abnimmt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Kombination einfacher Y-förmiger Kanäle mit einem SAW-Chip zu einer schnellen akustischen Vermischung bei niedrigen Reynold'schen Zahlen führt [16]. Dieses Prinzip wurde von anderen Gruppen aufgegriffen [17]. Frommelt *et al.* [3–5] entwickelten einen theoretischen Ansatz zur Bestimmung von Strömungsmustern, die durch Rayleighwellen in beliebigen 3D-Geometrien erzeugt werden. Sie verwendeten dabei die FEM. Ein effizienter Raytracing-Algorithmus wurde auf das akustische Problem angewendet, während die akustische Strömungsinteraktion durch einen Volumenkraftbeitrag in der Stokes-Gleichung modelliert wurde [3–5]. Eine detaillierte theoretische Untersuchung der

durch akustische Oberflächenwellen induzierten Strömung wurde von Vanneste *et al.* präsentiert [18]. In dieser Arbeit wird nun die FEM verwendet, um das Mischverhalten in einem Mikrofluidikkanal mit SAW genauer zu untersuchen. Dazu wird zum einen die Navier-Stokes-Gleichung zur Berechnung des Strömungsfelds gelöst. Zum anderen wird die Verteilung des Farbstoffs durch eine Konvektions-Diffusions-Gleichung beschrieben, wobei sich der Beitrag der Konvektion aus dem zuvor berechneten Geschwindigkeitsfeld ergibt. Im Vergleich zu Frommelt *et al.* [3–5] wird die durch SAW erzeugte Volumenkraft direkt durch einen empirischen Ansatz vorgegeben. Mit diesem Ansatz lassen sich verschiedene Einflussgrößen auf die Mischqualität, wie die Flussrate und die SAW-Leistung untersuchen und sie können mit Experimenten verglichen werden [6].

1.2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die mathematischen Grundlagen zur Beschreibung von Flüssigkeitsströmungen und zur Beschreibung von akustischen Oberflächenwellen und das damit verbundene *SAW Streaming* betrachtet. Darüber hinaus wird das Grundprinzip der Finite Elemente Methode erläutert.

1.2.1 Fluiddynamik

Die Grundgleichung der Hydrodynamik ist die Navier-Stokes-Gleichung. Sie ergibt sich im Wesentlichen aus dem 2. Newtonschen Axiom und der Impuls- und Energieerhaltung angewendet auf ein Kontinuum. Für eine ausführlichere Betrachtung können die Quellen [19–21] herangezogen werden.

Navier-Stokes-Gleichung

Für ein kompressibles Fluid hat die Navier-Stokes-Gleichung folgende Form:

$$\rho \frac{\partial}{\partial t} \vec{u} + \rho (\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u} + \vec{f} + (\lambda + \eta) \nabla (\nabla \cdot \vec{u}), \quad (1.1)$$

dabei ist ρ die Dichte des Fluids, \vec{u} das zeit- und ortsabhängige Geschwindigkeitsfeld, p der Druck, η die dynamische Viskosität, \vec{f} eine äußere Volumenkraft und λ die erste Lamé-Konstante. Für Flüssigkeiten kann in der Regel eine konstante Dichte

ρ angenommen werden, sodass ein inkompressibles Fluid vorliegt. Aus der Kontinuitätsgleichung:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla(\rho \vec{u}) = 0, \quad (1.2)$$

lässt sich somit folgern, dass bei konstanter Dichte $\nabla \cdot \vec{u} = 0$ gilt. Das Geschwindigkeitsfeld also divergenzfrei ist. Somit verschwindet der letzte Term in Gl. 1.1 und man erhält die Navier-Stokes-Gleichung für inkompressible Fluide:

$$\rho \frac{\partial}{\partial t} \vec{u} + \underbrace{\rho(\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u}}_{\text{Trägheitskraft}} = \underbrace{-\nabla p}_{\text{Druckänderung}} + \underbrace{\eta \nabla^2 \vec{u}}_{\text{Reibungskraft}} + \underbrace{\vec{f}}_{\text{äußere Kräfte}} \quad (1.3)$$

Trotz der Vereinfachung im Vergleich zur Navier-Stokes-Gleichung für kompressible Fluide ist bis heute die Eindeutigkeit und Existenz von Gl. 1.3 nicht bewiesen. Sie gehört daher zu den ungelösten mathematischen Millennium-Problemen [22]. Abgesehen von wenigen Spezialfällen, für die analytische Lösungen bekannt sind, werden daher zur Berechnung numerische Verfahren wie die FEM Simulation angewendet.

Mikrofluidik

Das Verhalten von makroskopischen Flüssigkeitsmengen kann sich stark von mikroskopischen Flüssigkeitsmengen unterscheiden, da Reibungskräfte gegenüber Trägheitskräften in der Regel überwiegen. In der Mikrofluidik treten daher meist laminare Strömungen auf. Eine Strömung ist dann laminar, wenn sich die Moleküle der Flüssigkeit in parallelen Schichten oder Schichten aneinander vorbeibewegen, ohne dass Verwirbelungen auftreten. Die Strömung verläuft also glatt und ordentlich ohne Unterbrechungen. Dies ist der Fall, wenn die Geschwindigkeit der Strömung nicht zu hoch ist und die Flüssigkeit ausreichend viskos ist. Eine Kennzahl mit der sich einschätzen lässt, welche Strömungsart vorliegt, ist die Reynold'sche Zahl. Diese geht aus der entdimensionalisierten Navier-Stokes-Gleichung hervor. Hierbei werden die charakteristische Größen L für die Länge, u_c für die Geschwindigkeit und ρ_c für die Dichte eingeführt. Damit ergibt sich per Definition die Reynold'sche Zahl und die entdimensionalisierte Navier-Stokes-Gleichung für inkompressible Fluide ohne Berücksichtigung äußerer Kräfte zu:

$$Re = \frac{\rho_c \cdot u_c \cdot L}{\eta}, \quad (1.4)$$

$$\rho^* \frac{\partial \vec{u}^*}{\partial t^*} + \rho^* (\vec{u}^* \cdot \nabla^*) \vec{u}^* = -\nabla^* p^* + \frac{1}{Re} \Delta^* \vec{u}^*, \quad (1.5)$$

mit

$$\begin{aligned} \vec{x}^* &:= \frac{\vec{x}}{L}, & \nabla^* &:= L\nabla, & \Delta^* &:= L^2\Delta, & \vec{u}^* &:= \frac{\vec{u}}{v_c}, \\ t^* &:= \frac{v_c t}{L}, & \rho^* &:= \frac{\rho}{\rho_c}, & p^* &:= \frac{p}{\rho_c v_c^2}. \end{aligned}$$

Anhand von Re lässt sich abschätzen, wie groß die Anteile der Reibungs- und Trägheitskräfte sind. Bei laminaren Verhältnissen überwiegen die Reibungskräfte, wohingegen bei turbulenten Verhältnissen die Trägheitskräfte überwiegen. Als kritischen Wert, der die beiden Bereiche voneinander trennt, findet man in der Literatur $Re_{\text{krit}} = 2300$ [21]. Im Bereich $Re < Re_{\text{krit}}$ ist die Strömung laminar. Für $Re > Re_{\text{krit}}$ liegt eine turbulente Strömung vor. Für die in diesem Kapitel betrachtete Strömung im Mikrofluidikkanal (Breite: $200 \mu\text{m}$, Höhe: $100 \mu\text{m}$) und bei Strömungsgeschwindigkeiten zwischen 10^{-6} bis 10^{-1} m/s erhält man Werte im Bereich $Re = 2 \cdot 10^{-4}$ bis $Re = 2 \cdot 10^1$. Man befindet sich also deutlich unter der kritischen Grenze, bei der Turbulenzen auftreten, was in der Mikrofluidik die Regel ist. Anhand dieser Abschätzung wird deutlich, warum das Mischen auf diesen kleinen Skalen eine Herausforderung darstellt. Ohne Turbulenzen findet eine Durchmischung nur durch Diffusion statt. Die chaotische Advektion bietet hier eine Möglichkeit eine Durchmischung zu beschleunigen. Aref führte dieses Konzept im Zusammenhang mit laminaren Strömungen ein [23]. Experimentell konnte es von Frommelt *et al.* [4] anhand von SAW-Mischen nachgewiesen werden. Bei der chaotischen Advektion treten weiterhin keine Turbulenzen auf. Durch Überlagerung von Strömungen kommt es allerdings zu einer Streckung und Faltung. Hierdurch wird die Grenzfläche zwischen zwei vorher getrennten Flüssigkeitsphasen maximiert. An dieser vergrößerten Grenzfläche kann dann mehr Diffusion stattfinden. Zusätzlich ergeben sich höhere Konzentrationsgradienten in den Flüssigkeitsstreifen. Chaotisches Mischen kann näherungsweise mit Strecken und Falten gleichgesetzt werden [24].

Diffusions-Konvektionsgleichung

Ohne Einwirkung äußerer Kräfte mischen sich verschiedene Stoffe in Gasen oder Flüssigkeiten nur aufgrund der Brown'schen Bewegung. Dieser Prozess wird als Diffusion bezeichnet. Der Ausgleich von Konzentrationsunterschieden kann durch das 2. Fick'sche Gesetz mathematisch beschrieben werden:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c), \quad (1.6)$$

mit c der Teilchenkonzentration und D dem Diffusionskoeffizienten. Mit der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich D für ein Objekt mit Radius R berechnen [20]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi R \eta}, \quad (1.7)$$

mit k_B der Boltzmann-Konstanten, T der Temperatur und η der Viskosität. Findet zusätzlich gerichteter Transport von Teilchen statt, kann *Gl. 1.6* um einen Konvektionsterm erweitert werden und man erhält die Konvektions-Diffusions-Gleichung:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) - \vec{u} \cdot \nabla c. \quad (1.8)$$

Hier beschreibt \vec{u} das Geschwindigkeitsfeld, das den Transport verursacht.

1.2.2 Akustische Oberflächenwellen

Akustische Oberflächenwellen sind Wellen, die sich an der Oberfläche eines Festkörpers ausbreiten. Sie können sich in Materialien mit elastischen Eigenschaften ausbreiten und werden oft in der Materialprüfung und in der Hochfrequenztechnik eingesetzt. In dieser Arbeit werden zwei piezoelektrische Kristalle zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen verwendet. Dies sind Lithiumniobat (LiNbO_3) und Lithiumtantalat (LiTaO_3). Abhängig vom jeweiligen Kristallschnitt lassen sich damit verschiedene Wellenmoden erzeugen. Mit dem LiNbO_3 128° Y-Schnitt lassen sich hauptsächlich sog. Rayleighwellen erzeugen (siehe *Abb. 1.2*).

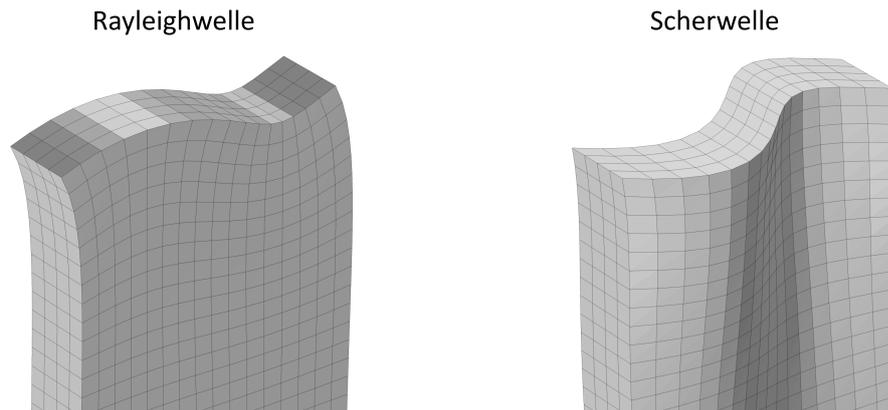


Abb. 1.2: Gegenüberstellung einer Rayleighwelle und einer Scherwelle. Die Rayleighwelle hat transversale und longitudinale Anteile. Die Scherwelle hingegen ist eine reine Transversalwelle.

Diese sind nach dem englischen Physiker und Entdecker Lord Rayleigh benannt [25]. Im Gegensatz dazu lassen sich mit dem LiTaO_3 36° Y-Schnitt hauptsächlich Scherwellen oder auch Love-Wellen, benannt nach dem britischen Physiker A. E. H. Love [26], erzeugen (siehe *Abb. 1.2*). Wie der Name schon beschreibt, handelt es sich bei beiden Formen um Wellen, die sich überwiegend an der Oberfläche eines Materials ausbreiten. In der Natur treten solche Wellen im Zusammenhang mit Erdbeben auf und werden dann seismische Wellen genannt. Gleichzeitig treten in der Regel zu einem gewissen Anteil auch Volumenwellen auf. Diese spielen in der Akustik und Sensorik mit Flüssigkeiten allerdings eine untergeordnete Rolle zu. Da die mathematische Beschreibung von Wellen in Festkörpern ein sehr umfassendes Themengebiet darstellt, wird hier nur auf die für diese Arbeit relevanten Aspekte eingegangen. Für den interessierten Leser können die Quellen [3, 27–33] empfohlen werden, die als Grundlage für dieses Kapitel verwendet werden. Zuerst wird eine Beschreibung von akustischen Wellen in elastischen Wellen basierend auf der Quelle [29] gegeben.

Akustische Wellen in elastischen Festkörpern

Zur Beschreibung von akustischen Wellen in einem Festkörper wird dieser im Folgenden als elastisch und homogen angenommen. Ein elastischer Festkörper wird sich nach Auslenkung aus seiner Ruhelage bzw. seiner kraftfreien Konfiguration wieder in seine ursprüngliche Lage zurückbewegen. Dabei wirkende Kräfte werden durch die Spannung T ausgedrückt, wohingegen Verschiebungen durch die Dehnung S beschrieben werden. Der Dehnungstensor S_{ij} ist folgendermaßen definiert:

$$S_{ij}(x_1, x_2, x_3) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right), \quad i, j = 1, 2, 3. \quad (1.9)$$

Hier ist $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ der Ort eines Partikels im Material und $\mathbf{u} = (u_1, u_2, u_3)$ dessen Verschiebung. Der Dehnungstensor ist symmetrisch und ein Tensor 2. Stufe. Für kleine Kräfte bzw. Auslenkungen besteht eine lineare Beziehung zwischen T und S . Dies stellt eine allgemeine Form des Hooke'schen Gesetzes dar:

$$T_{ij} = \sum_k \sum_l c_{ijkl} S_{kl}, \quad i, j, k, l = 1, 2, 3, \quad (1.10)$$

mit dem Elastizitätstensor c_{ijkl} und dem symmetrischen Spannungstensor T_{ij} . Der Elastizitätstensor c_{ijkl} ist ein Tensor 4. Stufe und hat grundsätzlich 81 Elemente. Durch Ausnutzung von Symmetrien ist die Anzahl von unabhängigen Elementen in der Regel aber deutlich geringer. Aus Kombination der *Gl. 1.9* und *Gl. 1.10* und unter Berücksichtigung des dritten Newton'schen Gesetzes, lässt sich folgende Bewegungsgleichung aufstellen:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \sum_j \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j}, \quad i, j = 1, 2, 3, \quad (1.11)$$

mit ρ der Dichte des Materials. Bei einem piezoelektrischen Festkörper gibt es zusätzlich noch eine Abhängigkeit der Spannung vom elektrischen Feld E . Geht man davon aus, dass das elektrische Feld nicht zu groß ist, ist die Beziehung linear. *Gl. 1.10* erweitert sich dann zu:

$$T_{ij} = \sum_k \sum_l c_{ijkl}^E S_{kl} - \sum_k e_{kij} E_k, \quad (1.12)$$

wobei c_{ijkl}^E der Elastizitätstensor bei konstantem elektrischem Feld und e_{kij} der piezoelektrische Tensor ist. In einem piezoelektrischen Material muss die Dehnung ebenfalls bei der dielektrischen Verschiebung D berücksichtigt werden:

$$D_i = \sum_j \varepsilon_{ij}^S E_j + \sum_j \sum_k e_{ijk} S_{jk}, \quad (1.13)$$

wobei ε_{ij}^S der Permittivitätstensor bei konstanter Dehnung ist. Die Umkehrung des piezoelektrischen Effekts zeigt sich durch Inversion der Indizes im piezoelektrischen Tensor [30]. Da sich elektromagnetische Störungen in einem Festkörper viel schneller als

akustische Störungen ausbreiten, kann eine quasi-statische Näherung gemacht werden. Damit gilt der aus der Elektrostatik bekannte Zusammenhang zwischen dem elektrischen Feld E und dem elektrischen Potential Φ :

$$E_i = -\partial\Phi/\partial x_i. \quad (1.14)$$

Für einen piezoelektrischen Festkörper ergibt sich somit aus *Gl. 1.11*, *Gl. 1.12* und *Gl. 1.14*:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \sum_j \sum_k \left\{ e_{kij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_j \partial x_k} + \sum_l c_{ijkl}^E \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} \right\}. \quad (1.15)$$

Ein piezoelektrischer Festkörper ist ein Isolator. Er ist also quellenfrei und es gilt $\nabla D = 0$. Damit erhält man unter Verwendung von *Gl. 1.13* zusätzlich folgende Gleichung:

$$\sum_i \sum_j \left\{ \varepsilon_{ij}^S \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_i \partial x_j} - \sum_k e_{ijk} \frac{\partial^2 u_j}{\partial x_i \partial x_k} \right\} = 0. \quad (1.16)$$

Die *Gl. 1.15* und *1.16* liefern vier Beziehungen zwischen den vier Größen u_1 , u_2 , u_3 und Φ . Wenn geeignete Randbedingungen gewählt werden, kann somit eine Lösung der Gleichung gefunden werden. Für anisotrope Materialien ist die Komplexität dieser Gleichungen allerdings so groß, dass die Lösung in der Regel nur durch numerische Verfahren ermittelt werden kann. Im Gegensatz dazu sind Lösungen für isotrope Materialien viel einfacher zu erhalten [29]. Grundsätzlich ergeben sich ohne Berücksichtigung von Grenzflächen als Lösungen akustische Volumenwellen (engl. *Bulk Acoustic Waves*, *BAW*). Betrachtet man den Fall, dass eine Grenzfläche zum Vakuum vorliegt mit $x_3 = 0$, ergeben sich zusätzliche Randbedingungen. Dann gilt:

$$T_{31} = T_{32} = T_{33} = 0 \text{ für } x_3 = 0. \quad (1.17)$$

Mit diesen Randbedingungen ergeben sich auch akustische Oberflächenwellen als Lösungen der *Gl. 1.15* und *1.16*. Diese propagieren parallel zur Grenzfläche. Wie oben schon erwähnt, spielen für diese Arbeit die Rayleighwelle und die Scherwelle eine Rolle. Auch wenn es sich bei den verwendeten piezoelektrischen Materialien um anisotrope Festkörper handelt, wird im Folgenden die analytische Lösung für Rayleighwellen und Scherwellen für den isotropen Fall betrachtet. Dies erscheint sinnvoll, da diese einige Gemeinsamkeiten mit den Lösungen im anisotropen Fall haben.

Rayleighwellen im Halbraum

Rayleighwellen in einem isotropen Festkörper sind Oberflächenwellen, die sowohl einen longitudinalen als auch einen transversalen Schwingungsanteil aufweisen. In der Nähe der Oberfläche ist die Amplitude der Auslenkungen am größten und Teilchen bewegen sich auf einer Ellipsenbahn entgegen der Ausbreitungsrichtung der Welle, wie *Abb. 1.3 a* beispielhaft für Silica zeigt (Materialkonstanten siehe Anhang A.1). Mit zunehmender Tiefe nimmt die Amplitude der Auslenkungen ab und Teilchen bewegen sich auf einer Ellipsenbahn in Richtung der Ausbreitungsrichtung der Welle. Dies lässt sich durch den Vorzeichenwechsel der u_1 -Komponente erklären (siehe *Abb. 1.3 b*). Die Auslenkung u_1 und u_3 sind um $\lambda/4$ phasenverschoben zueinander (siehe *Abb. 1.3 c*). Die Phasengeschwindigkeit kann folgendermaßen approximiert werden [27]:

$$\frac{v_{\text{SAW}}}{v_t} \approx \frac{0.72 - (v_t/v_l)^2}{0.75 - (v_t/v_l)^2} \quad (1.18)$$

mit $v_t = \sqrt{\mu/\rho}$ der Geschwindigkeit der Transversalwelle, $v_l = \sqrt{(\lambda + 2\mu)/\rho}$ der Geschwindigkeit der Longitudinalwelle und μ und λ den Lamé-Konstanten.

Für die Auslenkungen des Festkörpers ergibt sich:

$$\begin{aligned} u_1 &= A [\gamma \exp(akx_3) - \exp(bkx_3)] \exp[i(\omega t - kx_1)], \\ u_2 &= 0, \\ u_3 &= Ai [\gamma a \exp(akx_3) - b^{-1} \exp(bkx_3)] \exp[i(\omega t - kx_1)], \end{aligned} \quad (1.19)$$

wobei A die Amplitude, ω die Kreisfrequenz und k die Wellenzahl ist. Zusätzlich gelten folgende weiteren Zusammenhänge: $a = -iL/k$, $b = -iT/k$, $\gamma = (2 - v_{\text{SAW}}^2/v_t^2)/(2ab)$, $T^2 = \omega^2/V_t^2 - k^2$ und $L^2 = \omega^2/V_l^2 - k^2$.

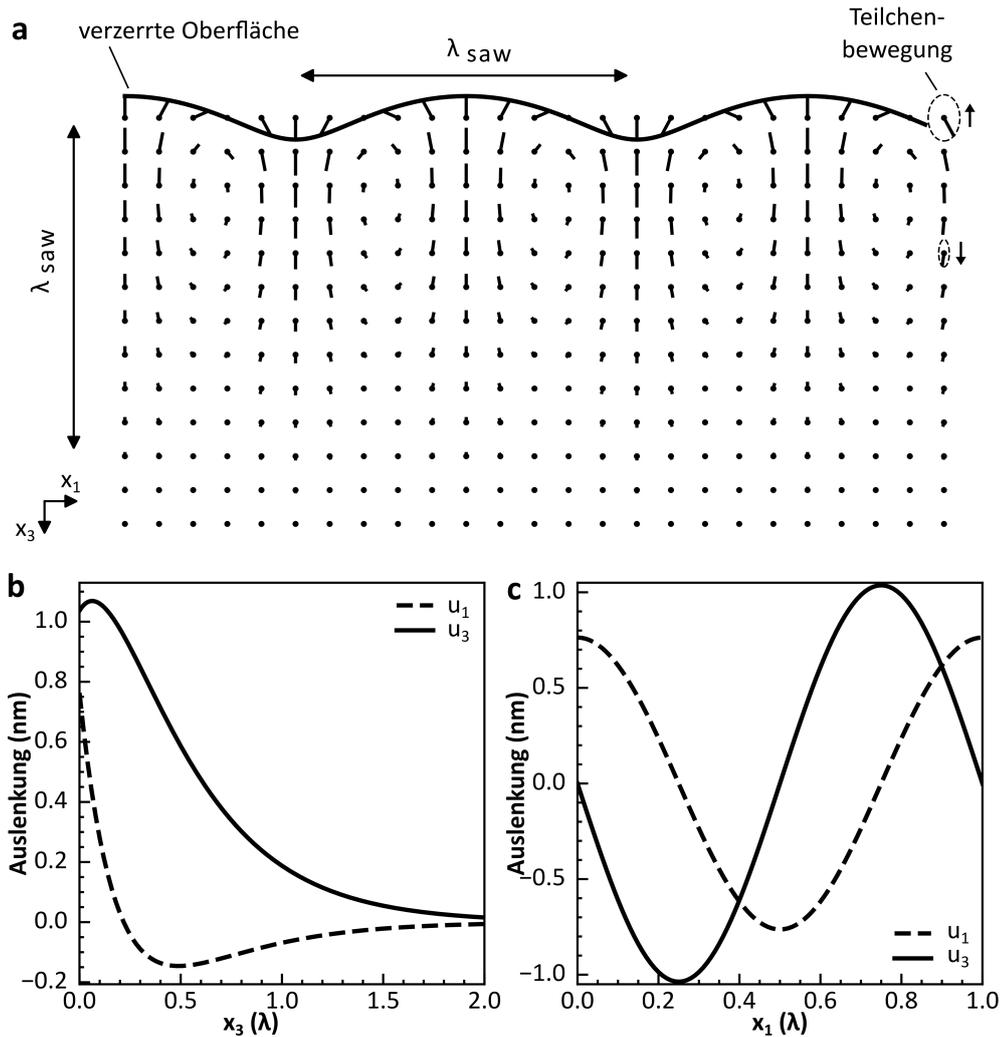


Abb. 1.3: Rayleighwelle im isotropen Festkörper beispielhaft für Silica mit Ausbreitungsrichtung in x_1 . a) Die Rayleighwelle hat sowohl longitudinale als auch transversale Anteile. An der Oberfläche bewegen sich Teilchen auf Ellipsenbahnen entgegen der Ausbreitungsrichtung. b) Die Amplitude der Auslenkungen fällt in x_3 -Richtung, also ins Innere des Festkörpers schnell ab. c) Die Auslenkung u_1 und u_3 sind um $\lambda/4$ phasenverschoben zueinander. (Abb. nach [29])

Scherwellen im Halbraum

Bei Rayleighwellen wird angenommen, dass keine Auslenkung in der x_2 -Richtung erfolgt. Lässt man Auslenkungen in der x_2 -Richtung zu, ergeben sich als Lösung ebene Scherwellen, die sich parallel zur Oberfläche ausbreiten. Diese sind allerdings nicht an die Oberfläche gebunden, sprich die Amplitude ist unabhängig von der Position x_3 im Material. Mathematisch beschrieben wird dies durch:

$$\begin{aligned}
 u_1 &= 0, \\
 u_2 &= A \exp(-ikx_1) \exp[i(\omega t - kx_1)], \\
 u_3 &= 0,
 \end{aligned} \tag{1.20}$$

Wird ein Material mit einer dünnen Schicht bedeckt, können Oberflächenwellen auftreten. Dazu muss die Geschwindigkeit der Transversalwelle v_t' der bedeckenden Schicht kleiner sein als v_t des Materials. Diese Wellen werden Love-Wellen genannt [26]. Für eine ausführliche Beschreibung von Love-Wellen siehe [29].

Erzeugung akustischer Oberflächenwellen

Akustische Oberflächenwellen (SAW) lassen sich mit sog. Interdigitalen Schallwandlern (Interdigital Transducer, IDT) erzeugen. Dabei wird der inverse piezoelektrische Effekt ausgenutzt. Bringt man Elektroden in Form von periodischen Fingerstrukturen auf ein piezoelektrisches Material auf und legt ein Hochfrequenz-Signal (HF-Signal) an, werden periodische Spannungen im Material verursacht. Wird dabei die Resonanzbedingung erfüllt führt das zur Anregung von SAW:

$$\lambda_{\text{SAW}} = \frac{v_{\text{SAW}}}{f_0}, \tag{1.21}$$

mit der SAW-Geschwindigkeit v_{SAW} , der Resonanzfrequenz f_0 und der Wellenlänge λ_{SAW} .

Die Wellenlänge wird durch den Abstand der Fingerelektroden zueinander festgelegt, wobei $\lambda_{\text{SAW}} = 2d$ gilt (siehe *Abb. 2.4*). Jeder zweite Finger liegt auf dem gleichen elektrischen Potential, da diese über eine Verbindungsschiene miteinander verbunden sind. Daher entspricht die SAW-Wellenlänge dem doppelten Fingerabstand. Wellenfronten breiten sich in beide Richtungen aus. Die Breite der Fronten entspricht der Apertur b . Ist der Fingerabstand entlang der Apertur b konstant, handelt es sich um einen *Standard IDT*. Beim *Tapered IDT* ist die Fingeranordnung von einer Seite zur anderen verjüngt. Damit ergeben sich die Grenzwellenlängen λ_1 und λ_2 . SAW lassen sich dann im entsprechenden Frequenzbereich zwischen f_1 und f_2 anregen. Für den Anregungsort p gilt nach Frommelt [3]:

$$p(f) = b \frac{\lambda(f) - \lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} = d \frac{f_2}{f} \frac{f_1 - f}{f_1 - f_2}, \tag{1.22}$$

mit f der eingestellten Frequenz, b der Breite der Apertur, λ_2 der oberen Grenzwellenlänge, λ_1 der unteren Grenzwellenlänge und f_2 und f_1 den entsprechenden Frequenzen.

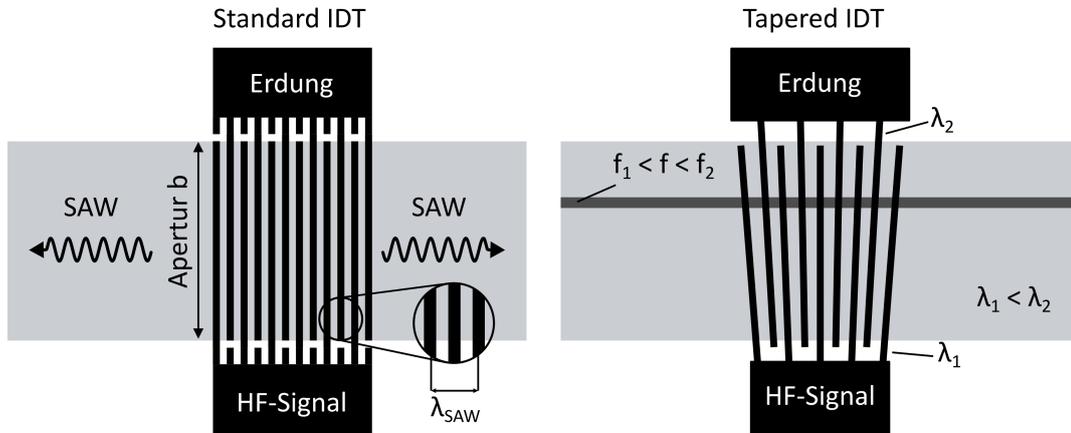


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines *Standard IDT* und eines *Tapered IDT*. Beim *Standard IDT* ist der Fingerabstand entlang der Apertur b konstant. Durch Anlegen eines HF-Signals mit passender Frequenz können akustische Oberflächenwellen erzeugt werden. Wellenfronten breiten sich in beide Richtungen aus. Beim *Tapered IDT* ist die Fingeranordnung von einer Seite zur anderen verjüngt. Damit ergeben sich die Grenzwellenlängen λ_1 und λ_2 . SAW lassen sich dann im entsprechenden Frequenzbereich zwischen f_1 und f_2 anregen.

Die Breite des Schallpfads entspricht dann nicht der Apertur b , sondern ist verschmälert. Eine Abschätzung der Breite findet sich im Anhang A.1. Durch Aufbringen einer metallischen Schicht lässt sich die Oberfläche kurzschließen und damit die Phasengeschwindigkeit v_{SAW} verändern. Das führt zu einer Aufhebung der piezoelektrischen Versteifung an der Oberfläche. Die Geschwindigkeit für eine kurzgeschlossene Oberfläche ($v_{SAW} = v_{kurz}$) ist damit kleiner als die Geschwindigkeit der freien Oberfläche ($v_{SAW} = v_{frei}$). Diese beiden Geschwindigkeiten sind mit dem elektromechanischen Kopplungskoeffizienten k_{eff} wie folgt verknüpft:

$$\frac{k_{eff}^2}{2} = \frac{v_{frei} - v_{kurz}}{v_{frei}}. \quad (1.23)$$

Akustische Strömung

Ist die Substratoberfläche, auf der sich eine Rayleighwelle ausbreitet, mit einer Flüssigkeit bedeckt, kann ein interessanter Effekt beobachtet werden. In der Flüssigkeit bildet sich eine stationäre Strömung aus, das sog. *SAW Streaming*. Erklären lässt sich dieser Effekt durch Anwendung der *Acoustic Streaming Theorie*. Aus dieser ergibt sich die *SAW Streaming Kraft*. Die in diesem Kapitel verwendeten Gleichungen sind aus [34]

entnommen. Die allgemeine Gleichung der Hydrodynamik für viskose Flüssigkeiten (Navier-Stokes-Gleichung) lautet wie folgt:

$$\begin{aligned} F &= \rho \frac{Dv}{Dt} = \rho \frac{\partial v}{\partial t} + \rho(v\nabla)v \\ &= -\nabla p + \eta \nabla^2 v + \frac{1}{3} \eta \nabla(\nabla v), \end{aligned} \quad (1.24)$$

wobei F die auf die Spannung zurückzuführende Nettokraft pro Volumeneinheit, ρ die Dichte, η die Viskosität und v die Partikelgeschwindigkeit ist. Unter Verwendung der Kontinuitätsgleichung:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \rho v = 0 \quad (1.25)$$

erhält man

$$\frac{\partial(\rho v)}{\partial t} + \rho(v\nabla)v + v\nabla\rho v = F_0 - F_1, \quad (1.26)$$

mit

$$\begin{aligned} F_0 &= \frac{\partial(\rho v)}{\partial t}, \\ -F_1 &= \rho(v\nabla)v + v\nabla\rho v. \end{aligned} \quad (1.27)$$

Im Folgenden wird angenommen, dass sich eine sinusförmige Schallwelle mit der Frequenz ω fortbewegt. Betrachtet man den zeitlichen Mittelwert von F_0 und F_1 über eine passende Anzahl von Perioden unter Vernachlässigung von Termen höher als der zweiten Ordnung, so gilt:

$$\begin{aligned} \langle F_0 \rangle &= 0, \\ \langle -F_1 \rangle &= \langle \rho_0(v\nabla)v + v\nabla\rho_0 v \rangle, \end{aligned} \quad (1.28)$$

wobei das Symbol $\langle X \rangle$ den Zeitmittelwert von X darstellt. $\langle -F_1 \rangle$ beschreibt die zeitlich gemittelte Kraft der akustischen Strömung. Diese Kraft tritt auf, wenn das Substrat, auf dem sich eine Rayleighwelle ausbreitet, mit einer Flüssigkeit bedeckt ist. Die SAW wird dann zur Leck-SAW und breitet sich entlang der Grenze zwischen Festkörper und Flüssigkeit aus (siehe *Abb. 1.5*). Dabei fällt die Amplitude der Leck-SAW exponentiell ab. Nach [34] ergibt sich für die Abklinglänge der Leck-SAW für den LiNbO_3 128° rot Y-Schnitt ein Wert von $\Delta x/\lambda \approx 9$, das heißt, die Amplitude ist nach etwa neun Wellenlängen auf 1/e ihres ursprünglichen Wertes abgefallen. Gleichzeitig

wird eine longitudinale Schallwelle, mit der eine Strömung verbunden ist, unter dem Rayleigh-Winkel θ_R erzeugt.

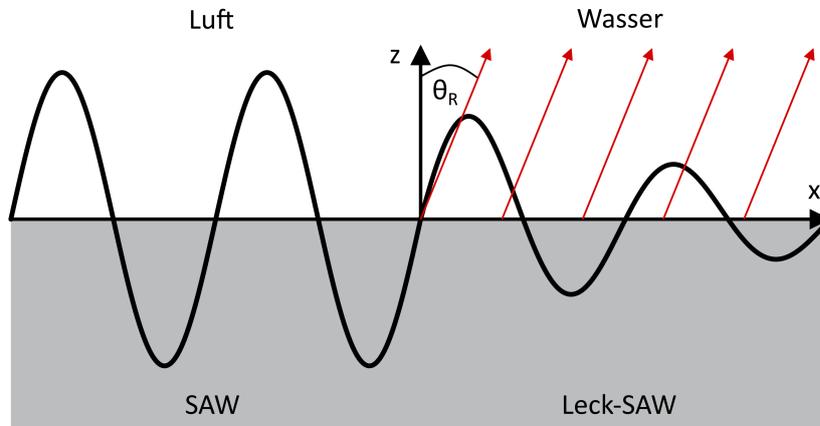


Abb. 1.5: Skizze für das Zustandekommen des SAW Streaming. Eine in x-Richtung zunächst freilaufende SAW wird von einer das Substrat bedeckenden Flüssigkeit gedämpft. Diese wird dann als Leck-SAW bezeichnet. Gleichzeitig wird dadurch eine Strömung unter dem Rayleigh-Winkel θ_R zur z-Richtung erzeugt. (Abb. nach [34])

Für den Rayleigh-Winkel gilt:

$$\theta_R = \arcsin\left(\frac{v_{SAW}}{v_W}\right), \quad (1.29)$$

mit der Schallgeschwindigkeit v_{SAW} im Substrat und v_W in der Flüssigkeit. Für den LiNbO_3 128° rot Y-Schnitt mit der Ausbreitung der Welle in x-Richtung und Wasser als bedeckende Flüssigkeit ergibt sich ein Rayleigh-Winkel von $\theta_R \approx 22^\circ$ ($v_{SAW} = 3931$ m/s und $v_W = 1500$ m/s [34]). Die Teilchenbewegung in der Flüssigkeit ($z > 0$) kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\begin{aligned} u_x &= A \exp(i\omega t) \cdot \exp(-ik_L x) \cdot \exp(-\alpha k_L z) \\ u_z &= -i\alpha A \exp(i\omega t) \cdot \exp(-ik_L x) \cdot \exp(-\alpha k_L z) \end{aligned} \quad (1.30)$$

mit der Konstanten A , dem Dämpfungsterm $\alpha = \sqrt{1 - (v_{SAW}/v_W)^2}$, der komplexen Wellenzahl k_L und der Frequenz ω . Aus der Teilchenverschiebung lässt sich die SAW Streaming Kraft berechnen. Durch zeitliche Ableitung von Gl. 1.30 ergeben sich die Geschwindigkeitskomponenten v_x und v_y . Diese können in Gl. 1.28 eingesetzt werden und man erhält:

$$\begin{aligned} F_x &= -\rho_0 (1 + \alpha_1^2) A^2 \omega^2 k_i \exp^2(k_i x + \alpha_1 k_i z), \\ F_z &= -\rho_0 (1 + \alpha_1^2) A^2 \omega^2 \alpha_1 k_i \exp^2(k_i x + \alpha_1 k_i z), \end{aligned} \quad (1.31)$$

wobei $\alpha_1 = i\alpha$ und $k_L = k_r + ik_i$ ist. Aus $F_{1s} = \sqrt{F_x^2 + F_z^2}$ ergibt sich dann für die Gesamtkraft:

$$F_{1s} = -\rho_0 (1 + \alpha_1^2)^{3/2} A^2 \omega^2 k_i \exp^2(k_i x + \alpha_1 k_i z). \quad (1.32)$$

Die *SAW Streaming Kraft* ist dabei proportional zur SAW- Leistung. Da die *SAW Streaming Kraft* in der Mikrofluidik proportional zur Fluidgeschwindigkeit ist, ergibt sich letztendlich ein linearer Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und SAW-Leistung [3].

1.2.3 Finite Elemente Methode

Gerade in der Strömungsmechanik, aber auch in anderen Bereichen sind physikalische Problemstellungen so komplex, dass keine analytische Lösung existiert bzw. gefunden werden kann. Die Finite Elemente Methode (FEM) hat sich für solche Problemstellungen als numerisches Lösungsverfahren etabliert. Unter Anwendung verschiedener Annahmen und Näherungen kann eine Lösung angenähert werden. Jedoch kann den Ergebnissen nicht blind vertraut werden. Diese müssen anhand von Experimenten verifiziert werden. In dieser Arbeit wird die Software COMSOL Multiphysics² für die Durchführung von FEM Simulationen eingesetzt. Im Prinzip lässt sich der Ablauf einer solchen Simulationsstudie in drei Phasen aufteilen [35]:

1. Vorverarbeitung

- Modellbildung
- Diskretisierung des Modells - Erzeugen eines Netzes (engl. *Mesh*)
- Wahl der Randbedingungen

2. Berechnung

- Wahl eines numerischen Lösungsverfahrens
- Berechnung der Lösung

² COMSOL Multiphysics 5.6, Comsol Inc., Burlington, MA, USA

3. Nachverarbeitung

- Auswertung der Lösung
- Darstellung der Ergebnisse

Die physikalischen Prozesse, die in einem Modell ablaufen, werden in der Regel durch einen Satz von Differentialgleichungen mathematisch beschrieben. Bei der FEM wird ein kontinuierliches Berechnungsgebiet in endliche (finite) Elemente aufgeteilt. Beispielweise können diese Elemente Dreiecke (in 2D) oder Tetraeder (in 3D) sein. Für diese Elemente wird das Differentialgleichungssystem anhand von Anfangs-, Rand- und Stetigkeitsbedingungen numerisch gelöst. Eine ausführliche Einführung in die FEM ist in [36] zu finden.

1.3 Diffusives Mischen

In Experimenten wurde das Mischverhalten von Flüssigkeiten in einem Mikrofluidikanal untersucht. Zur Visualisierung und Quantisierung des Mischprozesses wurde ein Farbstoff zur Flüssigkeit zugegeben [6]. Ohne Einsatz von SAW mischen sich Flüssigkeiten nur durch Diffusion, da in der Mikrofluidik laminare Strömungsverhältnisse herrschen. In dieser Arbeit werden nun Simulationen durchgeführt. Um das Mischverhalten simulieren zu können, muss zum einen das Strömungsfeld im Kanal berechnet werden, zum anderen muss die Verteilung des Farbstoffs bestimmt werden. Beide Phänomene können mit dem Modul *Numerische Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics, CFD)* von Comsol Multiphysics berechnet werden. Für das Strömungsfeld im Kanal wird der Physikbereich *Laminare Strömung*, der ein Spezialfall der *Fluidströmung* ist, verwendet. Die Verteilung des Farbstoffs wird mit dem Physikbereich *Transport verdünnter Spezies*, der ein Spezialfall des *Chemischen Stofftransports* ist, berechnet. Eine Beschreibung der verwendeten Einstellungen in der Software findet sich im Anhang A.1. Zur Beurteilung der Mischqualität wird ein Mischparameter M wie folgt eingeführt:

$$M = 1 - \frac{\sigma}{\bar{c}}, \quad (1.33)$$

mit \bar{c} der mittleren Farbstoffkonzentration und σ der Standardabweichung im ausgewerteten Bereich. Für einen theoretisch komplett ungemischten Ausgangszustand, bei

dem der gefärbte und ungefärbte Flüssigkeitsanteil zu gleichen Teilen vorliegt, entspricht $M = 0$, da der Mittelwert und die Standardabweichung jeweils 0.5 entsprechen. Für eine vollständige Durchmischung erhält man den Wert $M \approx 1$, da die Standardabweichung theoretisch gegen null läuft.

Zunächst wird das Mischverhalten im Kanal ohne SAW untersucht. Für die im Experiment verwendeten Kanalabmessungen (Breite: 200 μm , Höhe: 100 μm) und die betrachteten Flussraten (maximal 4 ml/h) liegen laminare Strömungsverhältnisse vor. Das heißt eine Durchmischung findet im Prinzip nur aufgrund von Diffusion statt, da sich die Stromlinien nicht kreuzen. Wie im Experiment gibt es zwei Einlässe, wobei bei einem die einfließende Farbstoffkonzentration $c = 0$ mmol und beim anderen $c = 1$ mmol beträgt. *Abb. 1.6 a* zeigt beispielhaft die Farbstoffverteilung bei einer Flussrichtung von links nach rechts. Die Farbstoffkonzentration und die daraus abgeleitete Mischqualität wird für alle Simulationen am Ende des Kanals ausgewertet, wie durch die rote Linie gekennzeichnet wird. *Abb. 1.6 b* zeigt die Farbstoffkonzentration als Funktion der Position x entlang der in a) gezeichneten Linie für verschiedene Flussraten. Für die höchste Flussrate von $F = 4$ ml/h ist die am Einlass vorgegebene Stufenfunktion nur leicht aufgeweicht. Das heißt im linken Bereich ist die Konzentration immer noch $c = 0$ mmol und im rechten Bereich gilt immer noch $c = 1$ mmol. Der Übergangsbereich ist schmal. Mit abnehmender Flussrate F wird der Übergangsbereich der Stufe immer breiter. Das Minimum und Maximum nähert sich beidseitig $c = 0.5$ mmol an. Folglich nimmt die Durchmischung zu. Unterhalb einer Flussrate von $F = 5 \cdot 10^{-4}$ ml/h ist praktisch keine Stufe mehr zu erkennen. Die Konzentration entlang des gesamten Querschnitts des Kanals liegt bei $c = 0.5$ mmol. Dies ist gleichbedeutend mit einer vollständigen Durchmischung. *Abb. 1.6 c* zeigt den nach Gl. 1.33 definierten Mischparameter M in Abhängigkeit der Flussrate F . Hier wird das eben schon beschriebene Verhalten noch deutlicher. Oberhalb von $F = 1$ ml/h ist $M \approx 0$. Es liegt somit keine Durchmischung vor. Mit abnehmender Flussrate F nimmt dann der Mischparameter zu und erreicht bei $F = 1 \cdot 10^{-4}$ ml/h den Wert $M \approx 1$. Ab hier liegt dann eine vollständige Durchmischung vor. Physikalisch lässt sich dieses Verhalten damit erklären, dass die Diffusion zwar gleich schnell abläuft, bei niedrigerer Flussrate allerdings die Verweildauer im Kanal länger ist. Somit haben die Farbstoffmoleküle länger Zeit aufgrund von Diffusion in die andere Hälfte des Kanals zu gelangen.

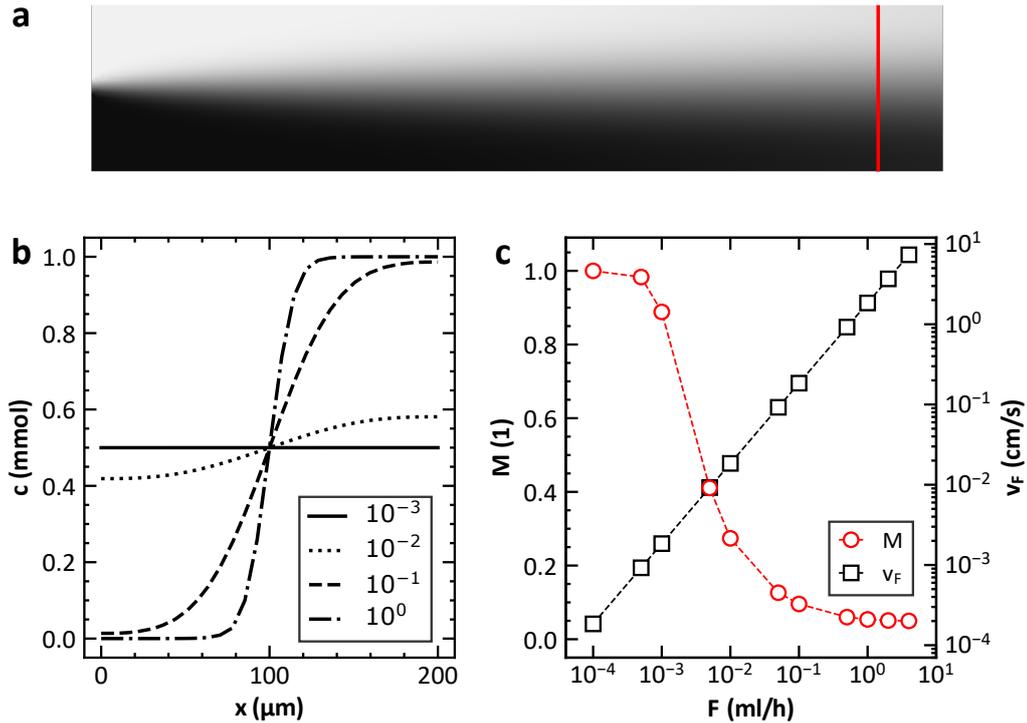


Abb. 1.6: Simulation der Mischung durch Diffusion im Mikrofluidikkanal in Abhängigkeit von der Flussrate: a) Beispielhafte Farbstoffverteilung bei laminarer Strömung von links nach rechts. b) Farbstoffkonzentration c als Funktion der Position x entlang der in a) gezeichneten roten Linie für verschiedene Flussraten (ml/h). c) Mischparameter M in Abhängigkeit von der Flussrate F bzw. der maximalen Flussgeschwindigkeit v_F . Mit zunehmender Flussrate nimmt M ab.

1.4 Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen

Im nächsten Schritt wird der Einfluss einer senkrecht zur Strömung verlaufenden SAW auf das Mischverhalten untersucht. Bekanntermaßen verursacht eine Rayleighwelle in einer Flüssigkeit eine Strömung, was als *SAW Streaming* bezeichnet und in Kapitel 1.2.2 erklärt wird. Durch diese Abstrahlung von Energie in das Medium wird die Welle gleichzeitig relativ stark gedämpft. Zur Simulation des durch die einkoppelnde SAW verursachten *SAW Streaming* wird eine exponentiell abfallende Volumenkraft eingeführt. Im Experiment wurde ein Tapered IDT (TIDT) verwendet. Die Form der Volumenkraft wird daraus abgeleitet. Für den LiNbO_3 128° Y-Schnitt ergibt sich eine $1/e$ -Abklinglänge $l \approx 9 \lambda_{\text{saw}}$ [34]. Die Breite des Schallpfads lässt sich nach Frommelt [3] für die durch das Experiment vorgegebene IDT-Geometrie zu $b \approx 175 \mu\text{m}$ abschätzen.

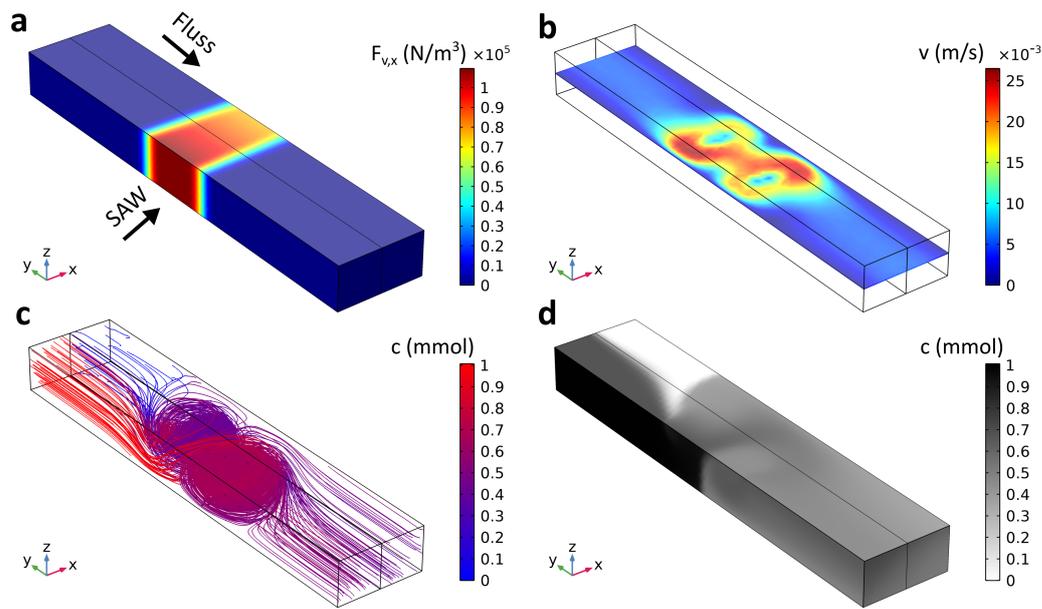


Abb. 1.7: Simulation der Mischung mit SAW im Mikrofluidikkanal bei einer Flussrate $F = 0.2 \text{ ml/h}$. a) Vorgegebene Volumenkraft $F_{v,x}$, die das durch SAW verursachte Acoustic Streaming beschreibt. b) Geschwindigkeitsfeld v in der xy -Ebene mittig im Kanal. c) Farbcodierter Stromlinienverlauf im Kanal. d) Farbstoffkonzentration c als Farbcode. Am Ende des Kanals liegt eine fast vollständige Mischung vor.

Abb. 1.7 zeigt beispielhaft die Simulation der Durchmischung in 3D mit SAW bei einer Flussrate $F = 0.2 \text{ ml/h}$. In Abb. 1.7 a ist die vorgegebene Volumenkraft F_V im Kanal zu sehen. Diese beschreibt das durch die SAW verursachte SAW Streaming. Das Maximum von F_V wird für die x -Komponente mit $F_{V,x} = 1 \cdot 10^5 \text{ N/m}^3$ und für die z -Komponente mit $F_{V,z} = 3.5 \cdot 10^5 \text{ N/m}^3$ vorgegeben. Abb. 1.7 b zeigt das resultierende Geschwindigkeitsfeld in der xy -Ebenen mittig im Kanal. In diesem Fall ist die durch SAW verursachte Geschwindigkeit größer als die Flussgeschwindigkeit. Deutlich ausgeprägt sind daher zwei Wirbel. Diese führen dazu, dass es zu einer Durchmischung der zu Beginn getrennten Flüssigkeitsphasen kommt (Abb. 1.7 c und d). Die zu Beginn ungemischten Flüssigkeitsphasen, sind am Ende des Kanals fast komplett gemischt. Für den Mischparameter erhält man einen Wert von $M = 0.88$. Als Vergleich dazu werden 2D-Simulationen durchgeführt. Bei gleichen Parametern, wobei für die maximale Volumenkraft der Wert der x -Komponente gewählt wird, erhält man einen Mischparameter $M = 0.87$. Das Ergebnis der 2D- und 3D-Simulation stimmen also nahezu überein. Daraus lässt sich schließen, dass die Durchmischung hauptsächlich durch die in der

xy-Ebene verursachte Strömung bewirkt wird. Die z-Komponente spielt eine untergeordnete Rolle. Dies ist durchaus auch erwartbar, da der Konzentrationsgradient entlang der x-Richtung zeigt. Weiterhin kann daraus geschlossen werden, dass bereits mit der 2D-Simulation das Mischverhalten ausreichend gut beschrieben wird. Für die weiteren Untersuchungen werden daher im Folgenden 2D-Simulationen verwendet.

1.4.1 Flussrate und Leistung der Oberflächenwelle

Zwei wesentliche Einflussfaktoren auf das Mischverhalten sind die Flussrate F und die HF-Leistung der SAW, wie experimentell gezeigt werden konnte. Als wesentlich hat sich hier das Verhältnis der durch die SAW erzeugten Geschwindigkeit v_{SAW} , die proportional zur HF-Leistung ist, zur Geschwindigkeit in Flussrichtung v_F erwiesen [6]:

$$r_M := \frac{v_{SAW}}{v_F}. \quad (1.34)$$

Je größer dieses Verhältnis ist, desto besser ist die Mischqualität. Diese Aussage soll mithilfe von FEM-Simulationen überprüft werden. Dazu wird einmal die Flussrate und einmal die Volumenkraft der SAW festgehalten. *Abb. 1.8 a* zeigt das Strömungsfeld für verschiedene Volumenkräfte F_V bei fester Flussrate $F = 0.2 \text{ ml/h}$ ($v_F = 0.4 \text{ cm/s}$). Zur besseren Veranschaulichung ist der Farbcode jeweils auf das Minimum und Maximum normiert. Entsprechend dazu sind in *Abb. 1.8 b* die dazugehörige Farbstoffkonzentration und die Stromlinien gezeigt. Bei einer niedrigen Volumenkraft ist das parabolische Strömungsprofil sichtbar. Es findet fast keine Durchmischung statt. Mit zunehmender Volumenkraft wird das Strömungsprofil immer stärker verzerrt. Die Durchmischung nimmt zu. Bei einer Volumenkraft von $F_V = 4 \cdot 10^4 \text{ N/m}^3$ sind dann deutlich zwei Wirbel, die durch die Überlagerung der senkrecht zueinander verlaufenden Strömungen entstehen, zu sehen. Es liegen aber immer noch geschlossene Stromlinien vor. Bei weiter zunehmender Volumenkraft sind die Wirbel immer stärker ausgeprägt und es liegt eine vollständige Durchmischung vor.

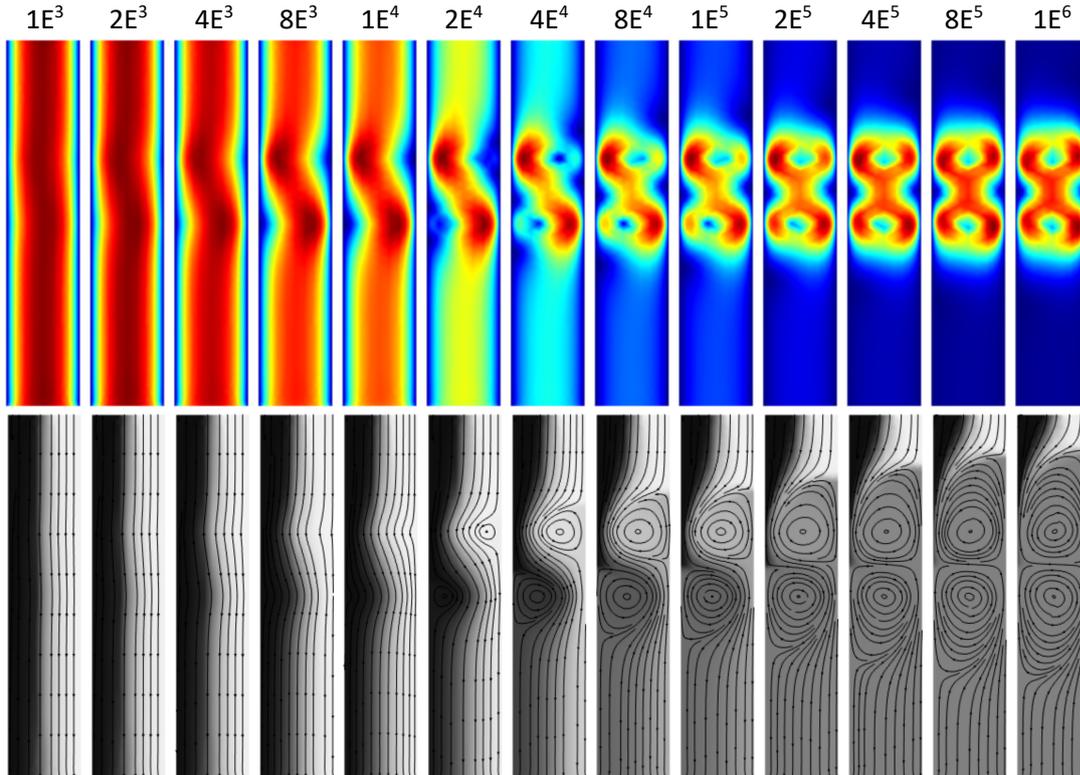


Abb. 1.8: Strömungsfeld und Farbstoffkonzentration in Abhängigkeit der Volumenkraft F_V (N/m^3). Zur besseren Veranschaulichung ist der Farbcode des Strömungsfeldes jeweils auf das Minimum und Maximum normiert. Mit zunehmendem F_V bilden sich zwei Wirbel, die das parabolische Flussprofil überlagern. Bei hohem F_V wird dann eine vollständige Durchmischung erreicht.

Abb. 1.9 a zeigt den Mischparameter M in Abhängigkeit von der Flussrate F bei fester Volumenkraft $F_V = 4 \cdot 10^5 \text{ N/m}^3$ ($v_{\text{SAW}} = 5.5 \text{ cm/s}$). Das Mischverhalten lässt sich in drei Zonen einteilen. Für Flussraten im Bereich $F < 1 \text{ ml/h}$ ist $M \approx 1$. Hier liegt eine fast vollständige Durchmischung vor. In einem Übergangsbereich bis $F \approx 4 \text{ ml/h}$ nimmt die Mischqualität deutlich ab. Im Bereich darüber sättigt M gegen einen festen Wert von $M \approx 0.25$. M entspricht hier dem Wert, den man für rein diffusives Mischen erhält (siehe Abb. 1.6). Dieses Verhalten lässt sich durch Betrachtung des Verhältnisses der durch die SAW erzeugten Geschwindigkeit v_{SAW} zur Geschwindigkeit in Flussrichtung v_F erklären. Um gute Mischergebnisse zu erhalten muss $r_M \gg 1$ gelten. Umgekehrt gilt für $r_M \ll 1$, dass die SAW quasi keinen Einfluss auf die Durchmischung hat. In analoger Weise kann man dieses Verhalten in Abhängigkeit der Volumenkraft F_V bei fester Flussrate $F = 0.2 \text{ ml/h}$ ($v_F = 0.4 \text{ cm/s}$) beobachten (siehe Abb. 1.9 b). Da mit zunehmender Volumenkraft die SAW-Geschwindigkeit v_{SAW} und damit auch

das Geschwindigkeitsverhältnis steigt, ist das Mischverhalten invers zum Verhalten bei fester Flussrate. Maßgeblich für das Mischverhalten ist also das Verhältnis der durch die SAW erzeugten Geschwindigkeit v_{SAW} zur Geschwindigkeit in Flussrichtung v_{F} , welche sich durch die Volumenkraft bzw. SAW-Leistung und die Flussrate einstellen lässt.

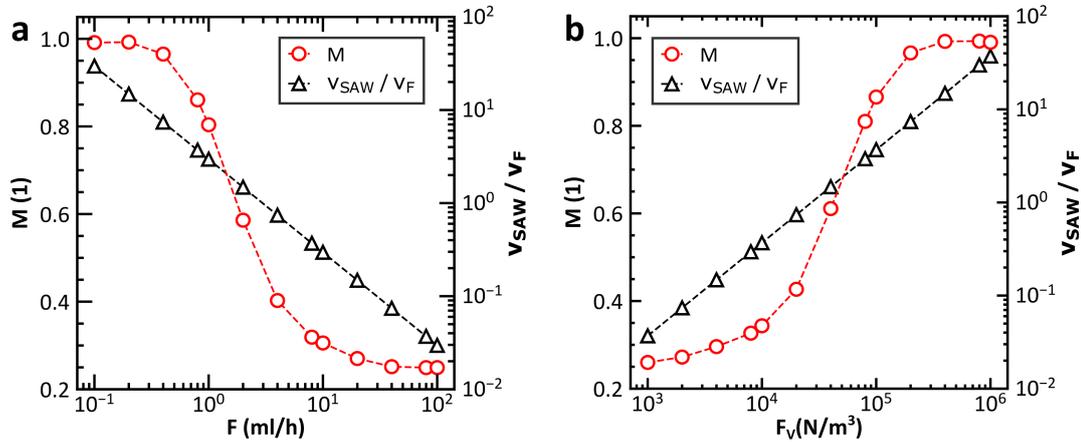


Abb. 1.9: Mischqualität in Abhängigkeit der Flussrate F und der maximalen Volumenkraft F_{V} der SAW. a) Mit zunehmendem F nimmt die Durchmischung ab, da die Flussgeschwindigkeit v_{F} die durch SAW erzeugte Geschwindigkeit v_{SAW} übersteigt. b) Mit zunehmendem F_{V} nimmt die Durchmischung hingegen zu, da hier die SAW-Geschwindigkeit die Flussgeschwindigkeit übersteigt.

1.4.2 Geometrie des Schallwandlers

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Mischverhalten ist die Breite der Apertur b des IDT. Diese wird in der Simulation vorgegeben und kann daher leicht variiert werden. Um den Einfluss zu untersuchen macht es Sinn für die Flussrate und die Volumenkraft Werte anzunehmen, bei denen noch keine vollständige Durchmischung vorliegt. Diese können aus *Abb. 1.9 b* ermittelt werden. Für die Volumenkraft wird ein Wert von $F_{\text{V}} = 1 \cdot 10^5 \text{ N}/\text{m}^3$ und für die Flussrate ein Wert von $F = 0.2 \text{ ml}/\text{h}$ gewählt. Der Mischparameter entspricht hier knapp $M = 0.9$. Die Apertur wird zwischen den Werten $b = 25 \mu\text{m}$ und $b = 300 \mu\text{m}$ variiert. Zunächst wird die eingekoppelte Leistung konstant gehalten. Das heißt das Produkt aus maximaler Volumenkraft F_{V} und Aperturbreite b wird konstant gehalten. Das Ergebnis dieser Simulation ist in *Abb. 1.10 a* gezeigt. Für kleinere Aperturen als im Experiment ($b < 175 \mu\text{m}$) nimmt M zu. Allerdings nimmt M unterhalb von $b = 100 \mu\text{m}$ wieder leicht ab. Für Aperturen größer als $b = 175 \mu\text{m}$ nimmt M weiter ab. Die Abnahme der Durchmischung mit zunehmender Apertur er-

scheint logisch, da die maximale Geschwindigkeit der SAW sowohl in x - als auch in y -Richtung abnimmt. Interessant ist die Abnahme der Durchmischung unterhalb von $b = 100 \mu\text{m}$, obwohl die SAW Geschwindigkeit hier weiter zunimmt. Die Geschwindigkeit kann hier nicht als Erklärung des Mischverhaltens herangezogen werden. Als zweites wird der Fall betrachtet, dass die maximale Volumenkraft konstant gehalten wird. Das hat zur Folge, dass die eingekoppelte Leistung mit Zunahme der Apertur zunimmt. Grundsätzlich würde man hier erwarten, dass mit zunehmender eingekoppelter Leistung auch die Durchmischung größer wird. Dies ist allerdings nicht der Fall. Zunächst steigt M mit Zunahme der Apertur an, erreicht wieder bei etwa $b = 100 \mu\text{m}$ ein Maximum und fällt dann aber wieder leicht ab. Ein möglicher Ansatzpunkt bietet eine Betrachtung der maximalen Geschwindigkeiten in x - und y -Richtung. Beide nehmen zunächst zu. In x -Richtung fällt v dann aber wieder ab und in y -Richtung stagniert v . Damit lässt sich schlussfolgern, dass eine optimale Apertur bei etwa $b = 100 \mu\text{m}$ liegt. Sowohl schmalere als auch breitere Aperturen führen zu schlechteren Durchmischungen. Dieser Effekt trifft sogar zu, wenn bei einer breiteren Apertur mehr Leistung eingekoppelt wird. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die zwei Wirbel, die durch die quer zur Flussrichtung verlaufende SAW entstehen, bei großen Aperturen zu weit auseinanderliegen (siehe *Abb. 1.10 c* und *d*).

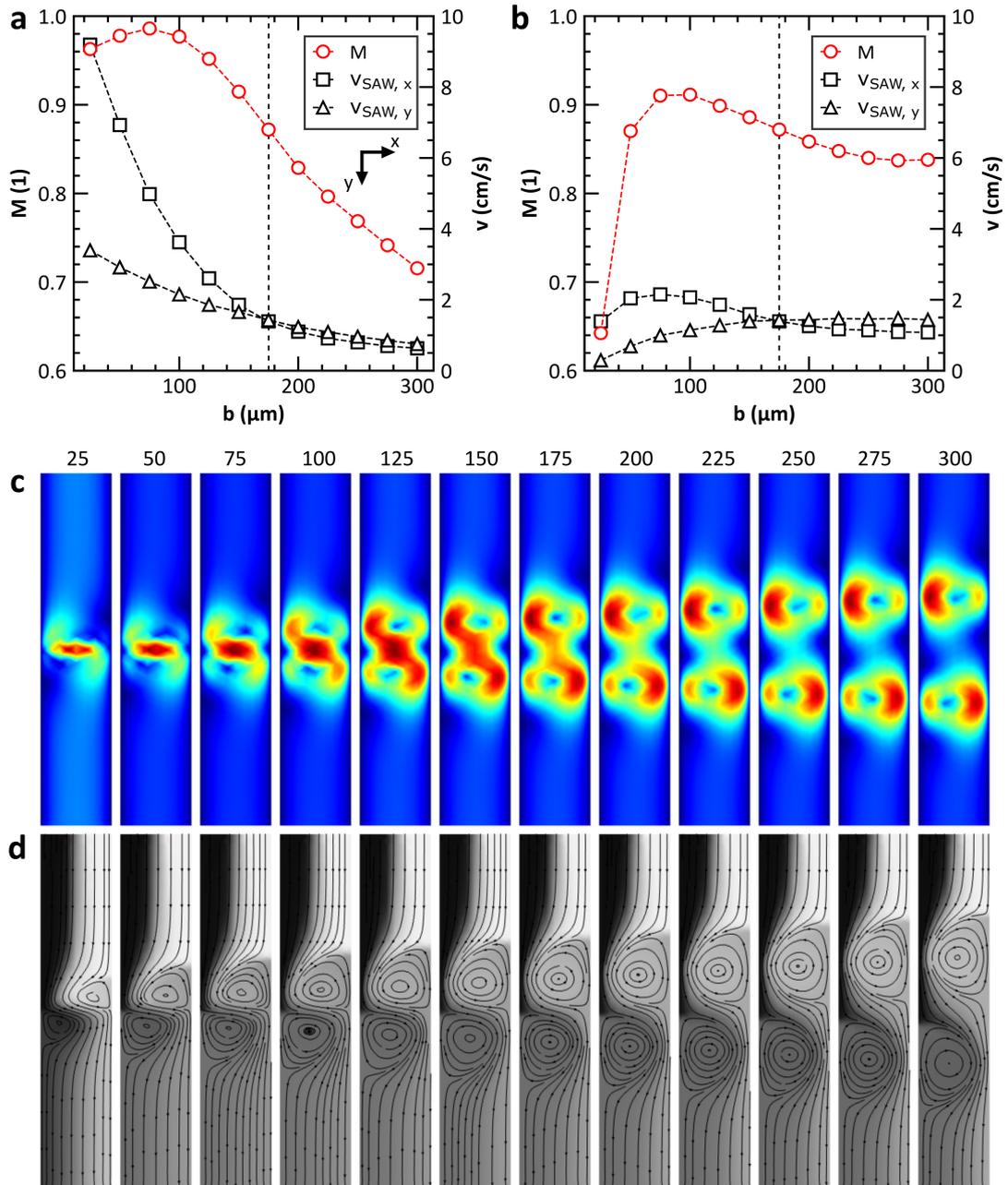


Abb. 1.10: Simulation der Mischung im Kanal für verschiedene Aperturbreiten b_{Apertur} . a) Mischung in Abhängigkeit von der Aperturbreite für eine feste SAW-Leistung. b) Mischung in Abhängigkeit von der Aperturbreite bei fester maximaler Volumenkraft. c) Geschwindigkeitsfeld für die verschiedenen Aperturen für den in (a) gezeigten Fall. d) Farbstoffkonzentration und Stromlinien für die verschiedenen Aperturen.

1.4.3 Zeitliche Modulation der Oberflächenwelle

Die bisher gezeigten Ergebnisse stammen aus stationären Simulationen. *Abb. 1.11 a* zeigt hingegen die zeitabhängige 2D-Simulation der Durchmischung im Mikrokanal durch SAW. Der Grauwert gibt die Farbstoffkonzentration an (schwarz: $c = 0$ mmol, weiß: $c = 1$ mmol). Zum Zeitpunkt $t = 0$ ms ist noch keine SAW vorhanden. Die linke ($c = 0$ mmol) und rechte Phase ($c = 1$ mmol) sind kaum gemischt. An der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen findet nur eine langsame Durchmischung durch Diffusion statt.

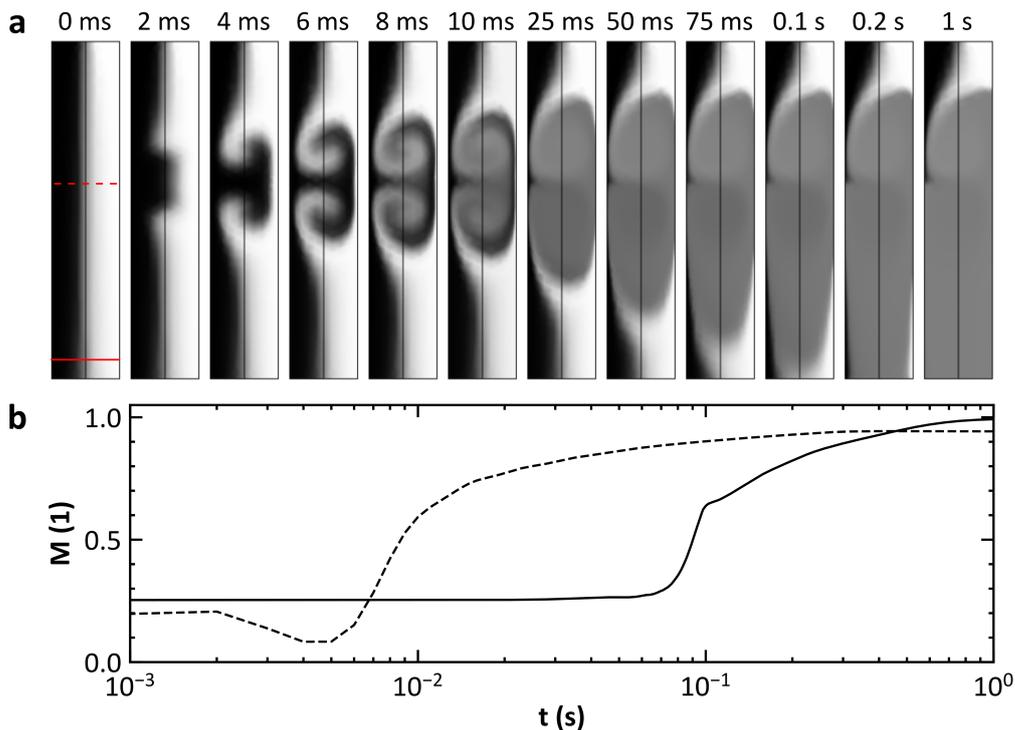


Abb. 1.11: Zeitabhängige 2D-Simulation der Durchmischung im Mikrokanal durch SAW Streaming. a) Zum Zeitpunkt $t = 0$ ms ist noch keine SAW vorhanden. Die linke ($c = 0$ mmol) und rechte Phase ($c = 1$ mmol) sind kaum gemischt. Der Grauwert gibt die Farbstoffkonzentration an (schwarz: $c = 0$ mmol, weiß: $c = 1$ mmol). Im zeitlichen Verlauf wird durch die SAW dann eine Strömung quer zur Flussrichtung im Kanal erzeugt. Dies führt zu einer Wirbelbildung, was eine Mischung der beiden Phasen bewirkt. b) Zeitlicher Verlauf der Mischqualität M am Ort der SAW (gestrichelte Linie) und am Ende des Kanals (durchgezogene Linie).

Bei $t = 2$ ms ist die Auswirkung der SAW zu sehen. Im zeitlichen Verlauf erzeugt die SAW eine Strömung quer zur Flussrichtung im Kanal. Dies führt zu einer Wirbelbildung, was eine Durchmischung der beiden Phasen bewirkt. Erst nach etwa 1 s hat sich

dann ein stationärer Zustand gebildet. Dies lässt sich auch im zeitlichen Verlauf der Mischqualität M erkennen (siehe *Abb. 1.11 b*), wobei für die gestrichelte Linie M am Ort der SAW und die durchgezogene Linie am Ende des Kanals ausgewertet wird.

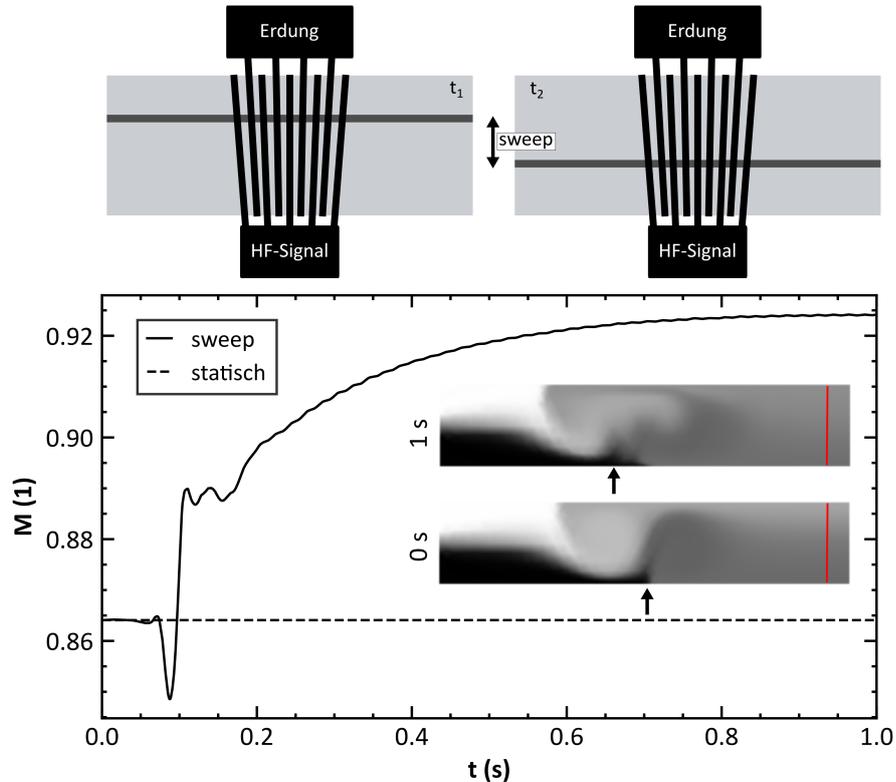


Abb. 1.12: Mischqualität M im Kanal mit zeitlich veränderlicher SAW. Durch einen Frequenz-Sweep wird der Anregungsort der SAW periodisch variiert. Im Vergleich zum statischen Fall bewirkt der Sweep-Modus eine Erhöhung der Durchmischung, wobei sich nach etwa 1 s ein stationärer Zustand eingestellt hat. Die Mischqualität wird wieder am Ende des Kanals ausgewertet (siehe rote Linie).

Die Verwendung von TIDT ermöglicht es den Anregungsort und damit den Ort, an dem die SAW im Kanal einkoppelt, in einem gewissen Bereich durch die Anregungsfrequenz vorzugeben (siehe *Abb. 1.12* oben). Damit liegt ein weiterer Parameter vor, über den sich der Grad der Unordnung im System beeinflussen lässt. Variiert man nämlich die Anregungsfrequenz zeitlich periodisch und damit den Anregungsort, sollte sich dies positiv auf die Mischqualität auswirken, da sich kein statischer Zustand für das Strömungsfeld einstellt. Die These wird anhand einer zeitabhängigen Simulation überprüft. Dazu wird direkt der Ort, an dem die Volumenkraft wirkt, zeitlich periodisch variiert. Dies entspricht der Verschiebung des Anregungsorts, der sich durch einen Frequenz-

Sweep ergeben würde. Der Anregungsort wird mit einer Dreiecksschwingung mit einer Amplitude von $A = 50 \mu\text{m}$ und einer Frequenz von $f = 50 \text{ Hz}$ moduliert. Das Ergebnis dieser Simulation ist in *Abb. 1.12* dargestellt. Als Startzeitpunkt wird das Ergebnis der stationären Simulation vorgegeben. Die gestrichelte Linie entspricht der Durchmischung des statischen Falls. Die durchgezogene Linie gibt die M für den Sweep-Modus an. Nachdem sich zu Beginn die Durchmischung kurz verschlechtert, nimmt diese dann zu und erreicht nach etwa 1 s einen stationären Zustand. Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Orte der SAW zu den Zeiten $t = 0 \text{ s}$ und $t = 1 \text{ s}$.

1.5 Fazit

In diesem Kapitel wurden aufbauend auf Experimenten zum Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen in einem Mikrofluidikkanal FEM Simulationen durchgeführt. Das *SAW Streaming* wurde dabei mit einem phänomenologischen Ansatz, in Form einer Volumenkraft in der Navier-Stokes-Gleichung, modelliert. Anhand eines Vergleichs von 2D- und 3D-Simulationen wurde gezeigt, dass im Wesentlichen, die in der xy-Ebene durch SAW erzeugte Strömung für die Durchmischung verantwortlich ist. Der 2D-Fall ist daher ausreichend, um den Mischprozess in guter Näherung qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Dadurch reduziert sich die Anzahl der Freiheitsgrade und der Rechenaufwand deutlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Mischverhalten stark vom Verhältnis r_M der SAW-Geschwindigkeit zur Flussgeschwindigkeit im Kanal abhängt. Ist dieses Verhältnis größer als $r_M = 10$ nähert sich die Mischqualität in der Simulation dem Wert $M = 1$. Im Vergleich dazu erhält man im Experiment bereits bei $r_M = 2$ ähnlich hohe Werte für die Mischqualität (siehe [6]). Dieser Unterschied könnte möglicherweise in einer Unterschätzung der SAW-Geschwindigkeit im Experiment liegen. Die Geschwindigkeit wurde dort nur grob abgeschätzt. Sowohl in der Simulation als auch im Experiment sättigt die Mischqualität, wenn r_M weiter gesteigert wird, gegen einen Wert von $M = 1$. In den Simulationen konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Mischverhalten durch die Apertur des IDT beeinflusst wird, wobei die optimale Aperturbreite etwa der halben Kanalbreite entspricht. Durch periodische Variation des Einkopplungsortes kann die Mischqualität noch weiter gesteigert werden. Das Simulationsmodell bietet die Möglichkeit einen großen Parameterraum systematisch abzurastern und ein Optimum zu finden ohne aufwendige Experimente durchzuführen. Dies kann genutzt werden, um gezielt die Herstellung therapeutischer Nanopartikel zu beeinflussen.

Neben der Nutzung von akustischen Oberflächenwellen, um passive Moleküle wie DNA oder RNA in einer Lipidhülle zu verpacken, wird im nächsten Kapitel die SAW dazu eingesetzt aktive Moleküle wie Enzyme in der Umgebung von weichen Grenzflächen zu manipulieren.

2 Manipulation aktiver Moleküle

Einfluss statischer und dynamischer Variation der Membranfläche gebundener Enzyme

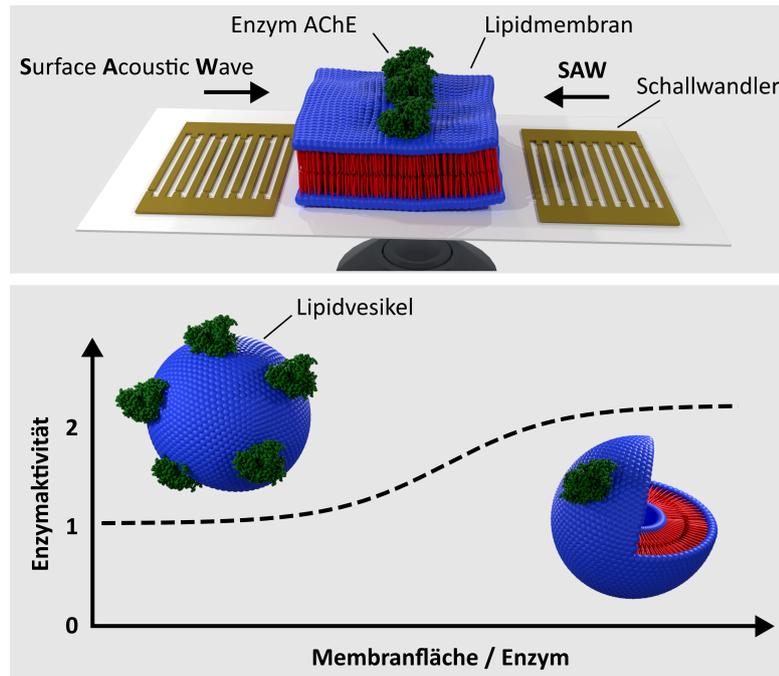


Abb. 2.1: Grundidee der Beeinflussung der Enzymaktivität durch Variation der zur Verfügung stehenden Membranfläche. Mit Hilfe einer stehenden akustischen Oberflächenwelle kann in einem SLB die Dichte moduliert werden. Alternativ werden als Modellsystem Lipidvesikel verwendet und darüber die zur Verfügung stehende Membranfläche reguliert. (Abb. entnommen aus [37])

Neben dem Einsatz der SAW zur Erzeugung von Strömungen in Flüssigkeiten ist eine weitere aktorische Anwendung der SAW die Erzeugung akustischer Stehwellenfelder. Diese Stehwellenfelder können z. B. dazu genutzt werden, um in einem SLB dynamische Dichtemodulationen zu erzeugen und damit künstlich sog. Lipid Rafts nachzuahmen. In der Literatur ist bereits bekannt, dass der Membranzustand Einfluss auf die Enzymaktivität hat. In diesem Kapitel wird daher die Frage untersucht, ob die Aktivität des Enzyms AChE auch künstlich durch Dichtemodulationen im SLB beeinflusst werden kann (siehe *Abb. 2.1*). Nach dem derzeitigen Modell der Nervenenausbreitung be-

steht die Funktion der AChE darin, die synaptische Übertragung von Nervensignalen zu beenden, indem der Neurotransmitter ACh im synaptischen Spalt zu Essigsäure (Acetat) und Cholin hydrolysiert wird. Die außersynaptischen Funktionen, die als *nicht-klassische* Funktionen bezeichnet werden, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Um weitere relevante, physikalische Einflussfaktoren der AChE zu identifizieren, wird hier die AChE-Aktivität mit der Ellmans Reagenz *in vitro* gemessen, wobei das Enzym an eine Lipidmembran gebunden ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym an die Membran anbindet, die Aktivität jedoch nicht durch die Dichtemodulation und damit zur Verfügung stehenden Membranfläche im SLB beeinflusst wird. Jedoch wurde eine doppelt so hohe Aktivität in Anwesenheit von Lipidmembranen in Form von kleinen unilamellaren Vesikeln (Small Unilamellar Vesicle, SUV) im Vergleich zu lipidfreien Proben gefunden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Zunahme der Aktivität mit der verfügbaren Membranfläche pro Enzym skaliert und für große Membranflächen sättigt.

Schlagwörter: Acetylcholinesterase, Enzymaktivität, Ellmans Reagenz, Lipidmembran, SAW

Ein Teil der Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in der Fachzeitschrift *Micromachines* veröffentlicht:

L.G. Schnitzler, K. Baumgartner, A. Kolb, B. Braun and C. Westerhausen, „Acetylcholinesterase Activity Influenced by Lipid Membrane Area and Surface Acoustic Waves,“ *Micromachines*, vol. 13, no. 2, 2022. [37] ¹

¹Internet-Adresse zur Veröffentlichung:
<https://www.mdpi.com/2072-666X/13/2/287>

2.1 Einleitung

Die laterale Organisation der Zellmembran, einschließlich der so genannten Lipid Rafts, ist für die Bildung von funktionalen Einheiten in der Biologie von wesentlicher Bedeutung [38–41]. Obwohl diese Rafts weitgehend unbekannt sind, werden sie in Verbindung gebracht mit der biologischen Signalübertragung, der Katalyse von Enzymen oder der Mobilität von Rezeptoren. Ein einfacher Ansatz zur Nachahmung von Rafts könnte auf der Strukturierung von Membranen beruhen. Es gibt verschiedene Techniken zur Erzeugung von Mustern in SLB. Groves *et al.* haben Gitter aus Fotolack, Aluminiumoxid oder Gold auf oxidierten Siliziumsubstraten lithografisch hergestellt, um Lipiddoppelschichten in mikrometergroße Anordnungen isolierter flüssiger Membrandomänen aufzuteilen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes parallel zur Oberfläche werden stationäre Konzentrationsgradienten geladener Membranbestandteile in den Bereichen erzeugt [42–45]. Hochrein *et al.* untersuchten das Konformationsverhalten von DNA-Molekülen, die an kationischen Lipidmembranen adsorbiert sind, die auf gerillten, eindimensional periodischen, mikrostrukturierten Oberflächen aufgebracht wurden [46]. Eine andere Strukturierungstechnik verwendet Proteine und Polydimethylsiloxan-Stempel (PDMS), um Muster in SLB zu erzeugen [47]. Sanni *et al.* kombinierten die hierarchische Oberflächenfaltung von Elastomeren mit Techniken zur Ablagerung von Lipidmembranen, um komplexe dreidimensionale Topografien dynamisch auf SLB zu übertragen [48]. Techniken zur aktiven Beeinflussung und Kontrolle der lateralen Dynamik der Membran fehlen jedoch noch. Dieser offensichtliche Mangel wurde von Jacobson *et al.* hervorgehoben: „Allerdings befindet sich das Gebiet der Lipid Rafts derzeit in einer technischen Sackgasse, da die physikalischen Werkzeuge zur Untersuchung biologischer Membranen als räumlich und zeitlich geordnete Flüssigkeit noch entwickelt werden.“ [41] Akustische Oberflächenwellen (SAW) mit Amplituden in der Größenordnung von 1 nm und variabler Wellenlänge und Frequenz zwischen etwa 30 μm bei 100 MHz und 3 μm bei 1000 MHz können zur Erzeugung stehender Wellen und damit einer regulierbaren Energielandschaft auf einem Chip verwendet werden. Wie bereits gezeigt, ist es dabei möglich, die räumliche und zeitliche Organisation eines SLB aktiv zu steuern. Darüber hinaus können Moleküle wie Farbstoffe oder Proteine (z. B. Rezeptoren oder Enzyme), die in den SLB eingebaut sind, sowohl selektiv als auch reversibel in streifen- und punktförmigen Clustern organisiert werden [49–52]. Somit bietet die SAW-Technologie die Möglichkeit, Lipid Rafts nachzubilden oder allgemeiner die Koexistenz von Bereichen unterschiedlicher

Lipidordnung und -zusammensetzung, wie sie in der Nähe von Phasenübergängen vorkommen, und somit biologische Prozesse zu imitieren. Um diese Idee zu testen, wurde AChE in Lipiddoppelschichten eingebaut, um den Einfluss solcher durch SAW induzierten Dichtemodulationen zu untersuchen. AChE ist eines der schnellsten Enzyme in biologischen Prozessen. Es wird hauptsächlich in neuromuskulären Verbindungen und in cholinergen Synapsen gefunden. Nach dem gegenwärtigen Modell der Nervenreizleitung besteht seine Funktion darin, die synaptische Übertragung von Nervensignalen zu beenden, indem es den Neurotransmitter ACh im synaptischen Spalt in Essigsäure (Acetat) und Cholin hydrolysiert. So hat sich beispielsweise gezeigt, dass die wichtigste Funktion von AChE, die katalytische Aktivität, eine membranvermittelte Funktion ist. Bereits in den 1970er Jahren berichteten viele Studien über Abweichungen von einem reinen Arrhenius-Verhalten: Knicke und Nichtlinearitäten in der Enzymaktivität als Funktion der Temperatur wurden gezeigt, wie z.B. von Sandermann [53] beschrieben. In den letzten zehn Jahren berichteten Schneider *et al.*, dass die Aktivität von AChE und anderen Enzymen ein ausgeprägtes Maximum in der Nähe des Hauptphasenübergangs von Lipidgrenzflächen aufweist [54, 55]. Dies gilt nicht nur für quasistatische Systeme, sondern auch für dynamische Systeme, z.B. bei Anwendung von pH-Pulsen auf DMPS-Monolagen [56]. Kürzlich wurde gezeigt, dass dies auch für ursprünglich wasserlösliche Enzyme der Fall ist, wenn sie an eine Lipiddoppelschicht gebunden sind [57]. Eine Theorie zur Erklärung dieses Effekts basiert auf höheren Fluktuationen, die im System während des Phasenübergangs auftreten [58], basierend auf der ursprünglichen Theorie von Kaufmann [59]. Diese Ergebnisse lassen es plausibel erscheinen, dass künstliche Veränderungen in der Membrenumgebung, wie z. B. Dichtemodulationen, die Aktivität von AChE beeinflussen. Daher ist AChE ideal geeignet, um den Einfluss künstlicher Veränderungen der Lipidmembran auf die Enzymaktivität zu untersuchen.

2.2 Materialien und Methoden

2.2.1 Herstellung Lipidmembran

Zur Herstellung einer festkörpergestützten Lipidmembran wird die Technik der Vesikelfusion angewendet [60–66]. Im einem ersten Schritt wird 1 mg 1,2-dioleoyl-sn-

glycero-3-phosphocholine (DOPC)² mit 0.25 mol% DiOC₁₄(3) Hydroxyethanesulfonate (DiOC₁₄)³ über Nacht unter Vakuumeinschluss in einem Glasbehälter eingetrocknet. Anschließend werden die Lipide wieder in 1 ml Reinstwasser gelöst und Multilamellare Vesikel (engl. Multilamellar Vesicle, MLV) hergestellt. Dazu wird der Glasbehälter mit den Lipiden in einem Wasserbad für 2 h auf 50 °C erwärmt. Jede halbe Stunde wird der Glasbehälter dem Wasserbad entnommen und geschüttelt. Alternativ kann der Glasbehälter auch für 2 h in ein Ultraschallbad gegeben werden. Die MLV werden in einem weiteren Schritt dann zu SUV weiterverarbeitet. Hierzu wird die Probe mit einem Ultraschall-Homogenisator⁴ für 10 min behandelt (65 % Intensität, 50 % Cycle). Anschließend müssen noch die entstandenen Metallpartikel abzentrifugiert (10 min, 14500 rpm) und der Überstand abgenommen werden. Alternativ können die SUV auch mittels eines Vial Tweeters⁵ hergestellt werden (10 min, 65 % Intensität, 50 % Cycle). Zur Kontrolle wird die Größe der entstandenen SUV mittels DLS⁶ bestimmt. Der hydrodynamische Durchmesser sollte nicht größer als 100 nm sein. Die fertige SUV-Lösung wird dann auf das hydrophilisierte Substrat gegeben. Dieses wurde zuvor intensiv mit Ethanol, Mucosol⁷ und Reinstwasser gereinigt. Zur Hydrophilisierung wird das Substrat einem Sauerstoffplasma⁸ ausgesetzt. Die finale SUV-Lösung wird dann auf ein hydrophilisiertes Substrat in ein PDMS⁹ oder ein Teflon-Reservoir gegeben. Nach 30 min werden die überschüssigen SUV durch mehrmaliges Spülen mit Reinstwasser entfernt.

2.2.2 Ellmans Reagenz

Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) beschleunigt in wässriger Lösung die Spaltung von Acetylthiocholin (ASCh) zu Thiocholin (SCh) und Acetat unter Freisetzung von Protonen (siehe *Abb. 2.2*). AChE fungiert hier als Katalysator. Die Enzymaktivität von AChE kann mit Hilfe der sog. Ellmans Reagenz gemessen werden [67, 68]. Dabei wird der Reaktion der Farbstoff 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), auch Ellmans Reagenz genannt, zugegeben. DTNB reagiert mit dem in der Reaktion gebil-

²Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA

³Biotium Inc, Fremont, CA, USA

⁴Sonoplus UW 2070, BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland

⁵UIS250v, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland

⁶90Plus Particle Size Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation, New York, NY, USA

⁷Merz Consumer Care GmbH, Frankfurt, Deutschland

⁸300 Autoload-PC Plasma Processor, Technics Plasma GmbH, Wettenberg, Deutschland

⁹Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow corning, Midland, MI, USA

deten ASCh zu einem Dianion. Verläuft die Reaktion schnell genug, kann über einen zweiten Reaktionsweg ein weiteres Dianion gebildet werden. Die zweite Reaktion wird dabei erst dann berücksichtigt, wenn die Konzentration des DTNB^{2-} ungefähr zehnmal kleiner ist, als die Konzentration des Thiocholins [69]. Das Dianion zeigt eine starke Absorption von Licht bei etwa 412 nm, erscheint also gelb. Durch Messung der Absorption kann die Zunahme der Farbstoffkonzentration nachgewiesen werden. Diese ist proportional zur Enzymaktivität. Wenn nicht anders angegeben, werden im Experiment die folgenden Endkonzentrationen verwendet: 0.1 mM DTNB^{10} , 1 mM ASCh¹¹ und unterschiedliche Enzymkonzentrationen zwischen 0.05 nM und 0.8 nM. Alle Proben werden in 20 mM HEPES-Pufferlösung¹² bei pH 7 hergestellt. Das Enzym wird immer unmittelbar vor der Messung den Proben zugegeben.

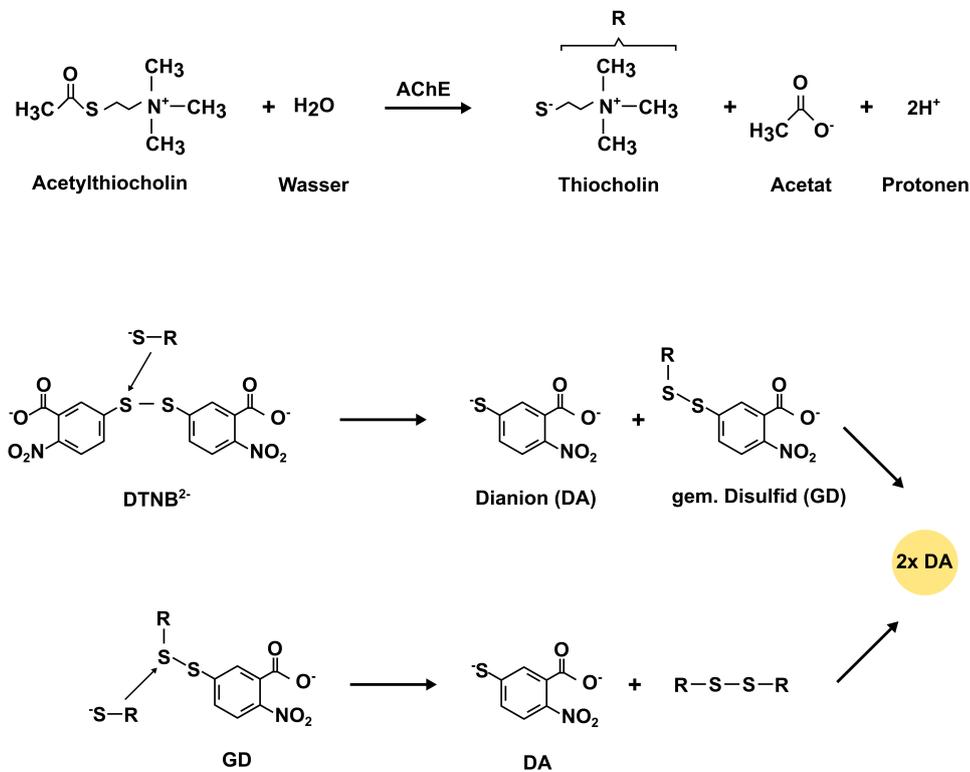


Abb. 2.2: Ellmans Reagenz: Durch AChE wird die Spaltung von ASCh beschleunigt. Das entstehende SCh kann durch Zugabe des Farbstoffs DTNB nachgewiesen werden. Aus einem DTNB^{2-} können über zwei Reaktionswege zwei Dianionen (TNB^{2-}) entstehen. Das Dianion absorbiert Licht der Wellenlänge 412 nm.

¹⁰5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

¹¹Acetylthiocholinjodid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

¹²HEPES, Natriumsalz, EMD Biosciences Inc, La Jolla, CA, USA

Die Grundlage der photometrischen Bestimmung der Absorption stellt das Lambert-Beer'sche Gesetz dar, wobei hier strenggenommen die Extinktion (Absorption und Streuung) E einer Probe bestimmt wird:

$$E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot d \cdot c, \quad (2.1)$$

mit I_0 der eingestrahnten Intensität, I der gemessenen Intensität nach Durchlaufen der Probe, ε dem Extinktionskoeffizient (auch spektraler Absorptionskoeffizient genannt), d der Schichtdicke der durchstrahlten Probe und c der Stoffmengenkonzentration in der Flüssigkeit. Der Unterschied zwischen Extinktion und Absorption wird durch *Abb. 2.3* veranschaulicht. Neben der Absorption treten beim Durchlaufen von Licht durch eine Probe weitere Prozesse auf, die das eingestrahlte Licht I_0 abschwächen. Diese sind Beugung, Streuung und Reflexion. Der Reflexionsanteil kann mittels Leermessungen oder Parallelmessungen von I_0 eliminiert werden. Streuung und Beugung spielen meist eine untergeordnete Rolle. Daher kann die Messung der Extinktion oft mit Absorption gleichgesetzt werden. Da diese Bedingung für die Messungen in dieser Arbeit erfüllt sind, werden die Begriffe Extinktion und Absorption im Folgenden synonym verwendet.

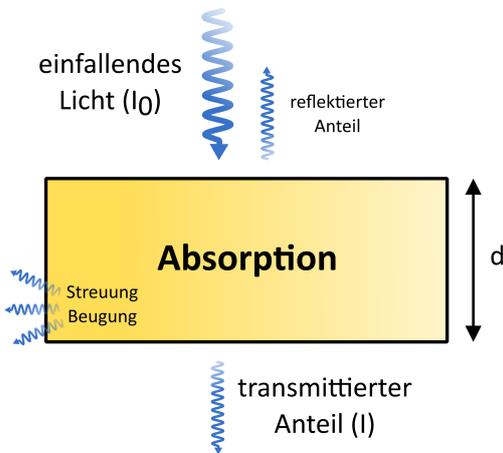


Abb. 2.3: Veranschaulichung einer Absorptionsmessung. Der größte Teil eingestrahlt Lichts mit Wellenlänge λ und Intensität I_0 wird von der Probe absorbiert. Streuung, Beugung und Reflexion spielen eine untergeordnete Rolle. Gemessen wird dann die Intensität I des transmittierten Anteils. Aus I_0 und I lässt sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Extinktion bzw. Absorption bestimmen.

Bei den meisten Experimenten wird die Absorption mit einem Mikroplatten-Reader¹³ gemessen. Mit einem Mikroplatten-Reader lassen sich biologische, chemische oder physikalische Abläufe in Mikrotiterplatten beobachten. Dabei können verschiedene Detektionsmethoden verwendet werden, zu denen unter anderem Absorption, Fluoreszenzintensität und Lumineszenz gehören. In dieser Arbeit werden Absorptionsmessun-

¹³infinite 200 PRO, Tecan, Männedorf, Schweiz

gen bei einer Wellenlänge von 415 nm in transparenten Mikrotiterplatten¹⁴ mit einem Mikroplatten-Reader durchgeführt. Die Messung basiert dabei auf dem in *Abb. 2.3* gezeigten Prinzip. Die Messungen unter dem Einfluss des SAW-Stehwellenfeldes werden mit einem inversen Lichtmikroskop¹⁵ durchgeführt, bei dem ein Bandpassfilter¹⁶ im Strahlengang platziert ist. Die Intensität wird mit einer CCD-Kamera¹⁷ aufgezeichnet. Die Messungen unter Einfluss eines elektrischen Feldes wird mit einem selbstgebauten Aufbau durchgeführt, der aus einer LED¹⁸ als Lichtquelle, oben genanntem Bandpassfilter und einem Photodetektor¹⁹ besteht (siehe *Anhang A.2*). Das elektrische Signal wird mit einem Signalgenerator²⁰ erzeugt. Die Absorption bzw. Extinktion kann wie folgt berechnet werden:

$$E = \log \left(\frac{I_0 - I_b}{I - I_b} \right) \quad (2.2)$$

mit I_0 der eingestrahlten Intensität, I_b der Intensität verursacht durch den Dunkelstrom der Kamera oder Detektor und I der gemessenen Intensität.

2.2.3 Akustische Stehwellenfelder

SAW-Chip

Mit einem IDT-Paar bestehend aus Ti-Au-Ti (5 nm-50 nm-5 nm Schichtdicke), das entlang der Hauptausbreitungsrichtung (X-Richtung) des 36°-Y-Schnitts auf LiTaO₃ ausgerichtet ist, werden SAW erzeugt (siehe *Abb. 2.4*). Die Wellenlänge beträgt $\lambda_{\text{SAW}} = 25 \mu\text{m}$ bei einer Apertur von $W = 1 \text{ mm}$. Beide IDT bestehen aus 27 Fingerpaaren. Die gemessene Resonanzfrequenz der IDT beträgt $f_{\text{res}} = 163.5 \text{ MHz}$ und der Abstand zwischen den IDT ist $l = 3.5 \text{ mm}$. Zum Schutz der Fingerelektroden wurde eine SiO₂-Beschichtung durch thermisches Aufdampfen auf die IDT-Strukturen aufgebracht. Das HF-Signal wird von einem Frequenzgenerator²¹ mit einem Verstärker²² und einem

¹⁴96-well Clear Polystyrene Microplates, Corning, Corning, NY, USA

¹⁵Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

¹⁶FB410 - 10, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

¹⁷ORCA-05G, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan

¹⁸LED405E, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

¹⁹DET100A2, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

²⁰Agilent 33250A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

²¹SML01, Rhode & Schwarz GmbH, München, Deutschland

²²Verstärkungsfaktor $G = 30 \text{ dB}$, AMP590033H-T, Becker Nachrichtentechnik GmbH, Asbach, Deutschland

Leistungssplitter²³ erzeugt und geteilt. Ein PTFE-Ring (Durchmesser: 1 cm, Höhe: 1 cm) wird auf den SAW-Chip aufgesetzt. Um ein Auslaufen zu verhindern, wird die Unterseite des PTFE-Rings mit Silikonpaste²⁴ abgedichtet. Die in dieser Arbeit eingesetzten akustischen Stehwellenfelder werden mit SAW-Chips (LiTaO_3) erzeugt. Dabei befinden sich zwei IDT auf dem Chip.

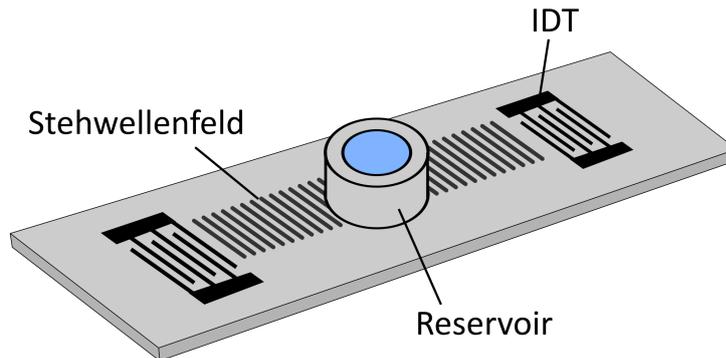


Abb. 2.4: Skizze eines SAW-Chips zur Erzeugung eines akustischen Stehwellenfeldes mit Flüssigkeitsreservoir: Auf dem Substrat LiTaO_3 36°-Y-Schnitt sind zwei gegenüberliegende IDT aufgebracht, mit denen ein Stehwellenfeld erzeugt werden kann. Auf die Substratoberfläche wird ein Flüssigkeitsreservoir gesetzt. Darin lässt sich ein SLB erzeugen.

Abb. 2.5 zeigt die Messung der Streuparameter S_{11} und S_{21} in Abhängigkeit der Frequenz für die in den Experimenten verwendeten SAW-Chips mit einer wasserbedeckten Substratoberfläche. Mit S_{11} wird die Reflexion, mit S_{21} die Transmission beschrieben. Das Reflexionsminimum liegt bei $f = 162.1$ MHz, das Transmissionsmaximum bei $f = 165.3$ MHz. Interessanterweise sind die beiden Frequenzen zueinander verschoben. Das Auftreten eines ausgeprägten Transmissionsmaximums legt nahe, weshalb sich dieser Kristallschnitt neben der Erzeugung von Stehwellenfeldern auch sehr gut für die Flüssigkeitssensorik eignet. Bei dem verwendeten Kristallschnitt LiTaO_3 36° Y ist die Scherwelle nämlich die dominierende Mode. Durch die Beladung mit Wasser wird diese kaum gedämpft.

²³ZFSC-2-4+, Minicircuits, Brooklyn, NY, USA

²⁴KORASILON-Paste, Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Deutschland

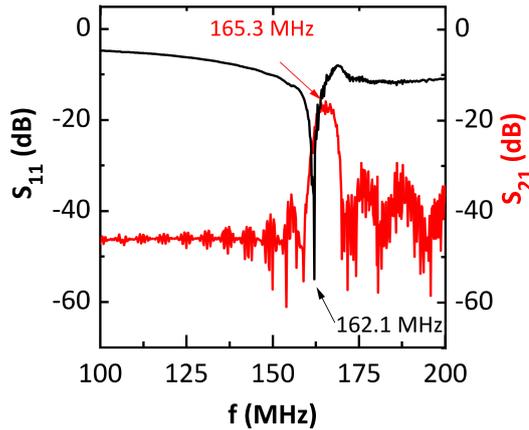


Abb. 2.5: Streuparameter S_{11} und S_{21} eines LiTaO_3 -Chips mit Verzögerungsstrecke 3.5 mm: S_{11} - und S_{21} -Messung bei Beladung mit einer Flüssigkeit. Das Minimum der Reflexion (162.1 MHz und -55 dB) ist wie das Maximum der Transmission (165.3 MHz und -16 dB) stark ausgebildet.

Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) wurde 1985 von Gerd Binnig, Calvin Quate und Christoph Gerber entwickelt [70]. Mit einem AFM können Oberflächen und atomare Kräfte auf der Nanometerskala vermessen werden. Das Funktionsprinzip eines AFM beruht auf der Verbiegung einer Feder (engl. Cantilever) durch die Wechselwirkung, der an der Feder angebrachten Spitze, mit einem Substrat. Bei bekannter Federkonstante kann somit die Kraft, die zwischen der Spitze und den Atomen des Substrats wirken, bestimmt werden. Die Auslenkung der Feder wird gemessen, indem ein Laser auf die Rückseite der Cantilever gerichtet wird. Die Reflexion des Lasers wird dann mittels einer Photodiode detektiert (siehe *Abb. 2.6*). Das AFM kann unter anderem zur Bildgebung, Messung der Oberflächenrauigkeit, aber auch für spektroskopische Verfahren verwendet werden. In dieser Arbeit wird das AFM²⁵ dazu verwendet, das Stehwellenfeld einer SAW nachzuweisen. Dazu wird im sog. Kontaktmodus mit konstanter Kraft gemessen. Damit die Kraft zwischen Spitze und Probe möglichst gleich bleibt, muss die Höhe der Cantilever²⁶ über dem Substrat ständig nachgeregelt werden. Die Megahertz-Oberflächenschwingungen der SAW können als Niederfrequenz-Schwingungen (Kilohertz-Bereich) der Cantilever detektiert werden. Dabei fungiert das nichtlineare Kraft-Abstandsverhalten quasi als mechanischer Mischer [71]. SAW-Stehwellenfelder werden für zwei Substrate nachgewiesen, LiTaO_3 (36° Y-Schnitt) und LiNbO_3 (128° Y-Schnitt) mit einer Wellenlänge $\lambda = 25 \mu\text{m}$ und $\lambda = 50 \mu\text{m}$. Der SAW-Chip wird jeweils so positioniert, dass die Scanrichtung des

²⁵NanoWizard BioAFM, JPK Instruments, Berlin, Deutschland

²⁶CSC37/Al BS, Mikromasch, Wetzlar, Deutschland

AFM nicht parallel zu den Knoten und Bäuchen verläuft. Somit soll ein Ausgleichen des Musters durch die automatische Abstandsregelung und den Hintergrundabzug, der oft linienweise vorgenommen wird, verhindert werden. Nach der Kalibrierung des AFM wird an zwei gegenüberliegende IDT mittels eines Signalgenerators²⁷ ein HF-Signal angelegt. Um ein phasengleiches Signal für beide IDT zu erhalten, wird das Signal mit einem Leistungsteiler²⁸ geteilt. Die Frequenz wird um die jeweilige Resonanzfrequenz leicht variiert. Ein $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ Ausschnitt der aktiven Fläche wird mit einer Auflösung von $512\ \text{Px} \times 512\ \text{Px}$ und einer Scanrate von 1 Hz vermessen.

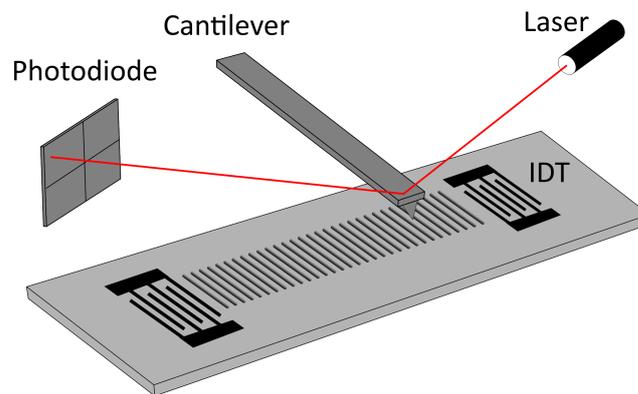


Abb. 2.6: Messprinzip eines Rasterkraftmikroskops (AFM): Mit einer Cantilever wird die Probenoberfläche abgetastet. Die Auslenkung der Cantilever, die durch atomare Wechselwirkungen der Cantilever-Spitze mit dem Substrat zustande kommt, kann mittels eines Lasers detektiert werden. Dieser wird von der Rückseite der Cantilever auf eine Photodiode reflektiert. Im Kontaktmodus bei konstanter Kraft lässt sich damit ein SAW-Stehwellenfeld nachweisen.

2.3 Manipulation Lipidmembran mittels akustischer Oberflächenwellen

Mit den SAW-Chips lassen sich, wie schon erwähnt, Stehwellenfelder erzeugen. Die Stehwellenfelder lassen sich mit AFM-Messungen nachweisen und können genutzt werden, um SLB zu manipulieren.

²⁷SML01, Rhode & Schwarz GmbH & Co. KG, München, Deutschland

²⁸ZFSC-2-4+, mini-circuits, Brooklynn, NY, USA

2.3.1 Akustische Stehwellenfelder

Theoretisch ergeben sich Stehwellenfelder durch Überlagerung einzelner Wellen. Laufen zwei Wellen mit gleicher Frequenz f , Wellenlänge λ und Amplitude A in entgegengesetzter Richtung, so ergibt die Überlagerung eine stehende Welle. Für eine von links kommende Welle ϕ_1 und eine von rechts kommende Welle ϕ_2 gilt:

$$\phi_1(t, x) = A \cdot \sin(\omega \cdot t + k \cdot x), \quad (2.3)$$

$$\phi_2(t, x) = A \cdot \sin(\omega \cdot t - k \cdot x + \delta), \quad (2.4)$$

mit der Phasenverschiebung δ , der Kreisfrequenz ω und der Wellenzahl k . Unter Verwendung des Additionstheorems $\sin(a) + \sin(b) = 2 \sin\left(\frac{a+b}{2}\right) \cos\left(\frac{a-b}{2}\right)$ können die beiden Wellen addiert werden. Dann ergibt sich die Gleichung einer stehenden Welle mit ortsfesten Knoten und Bäuchen:

$$\phi_g(t, x) = 2 \cdot A \cdot \sin\left(\omega \cdot t + \frac{\delta}{2}\right) \cdot \cos\left(k \cdot x - \frac{\delta}{2}\right). \quad (2.5)$$

Mit AFM-Messungen lassen sich akustische Stehwellenfelder nachweisen. *Abb. 2.7* zeigt eine solche Messung für die Kristallschnitte LiTaO₃ 36° Y und LiNbO₃ 128° Y (verwendete AFM-Parameter siehe *Kapitel 2.2*).

Für LiTaO₃ 36° Y wird die HF-Leistung $P_{\text{IDT}} = 27$ dBm bei $f = 165$ MHz und für LiNbO₃ 128° Y $P_{\text{IDT}} = 20$ dBm bei $f = 71$ MHz eingestellt. Für die Auslenkung der AFM-Spitze in lateraler Richtung ist das Streifenmuster aus Knoten und Bäuchen deutlich zu erkennen. Die hellen Streifen repräsentieren die Bäuche und die dunklen Streifen die Knoten. Aus dem Abstand der Knoten oder Bäuche lassen sich die unterschiedlichen verwendeten Wellenlängen ermitteln (LiTaO₃: 25 μm und LiNbO₃: 50 μm). Für die Auslenkung in vertikaler Richtung zeigt sich das Streifenmuster nur für das Substrat LiNbO₃ 128° Y. Dieses Ergebnis ist wenig überraschend, da auf LiTaO₃ 36° Y Scherwellen erzeugt werden, die keine Vertikalkomponente besitzen. Über die genaue Amplitude der SAW lässt sich mit dieser Messmethode allerdings keine Aussage treffen, da die AFM-Spitze der hohen Frequenz der SAW nicht folgen kann. Die Information, die man erhält, ist eine Einhüllende der eigentlichen Auslenkungen an der Oberfläche. Trotzdem lässt sich eine Abhängigkeit von der verwendeten Frequenz und HF-Leistungen ermitteln.

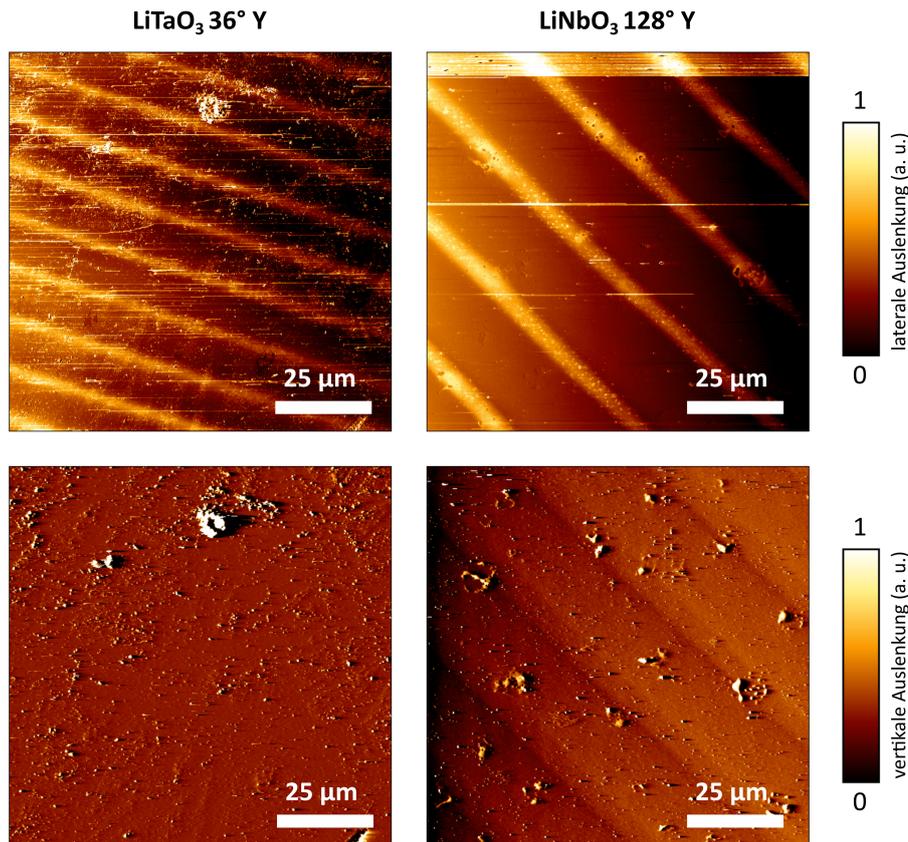


Abb. 2.7: Rasterkraftmikroskopaufnahme eines SAW-Stehwellenfeldes: In der lateralen Ablenkung sind sowohl für LiTaO₃ als auch LiNbO₃ deutlich die Knoten und Bäuche der stehenden Welle zu erkennen. In der vertikalen Ablenkung ist das Muster allerdings nur für LiNbO₃ zu sehen.

Abb. 2.8 a zeigt die laterale Auslenkung für verschiedene SAW-Leistungen entlang eines Linienprofils quer zum Streifenmuster bei fester Frequenz (165.5 MHz) für LiTaO₃. Deutlich zu erkennen ist die abnehmende Amplitude mit abnehmender SAW-Leistung. Die Verkipfung des Profils kann vermutlich durch eine leichte Verkipfung der Probe erklärt werden. Abb. 2.8 b zeigt die laterale Auslenkung für verschiedene Frequenzen um die mit dem Netzwerkanalysator (NWA) bestimmte Resonanzfrequenz bei fester SAW-Leistung ($P_{\text{IDT}} = 27$ dBm). Die größte Auslenkung ergibt sich im Bereich des mit dem NWA bestimmten Transmissionsmaximums (165.5 MHz). Geht man zu niedrigeren Frequenzen, nimmt die Amplitude ab. Wie anhand von AFM-Messungen gezeigt werden konnte, lassen sich sowohl auf LiNbO₃ als auch auf LiTaO₃ Stehwellenfelder erzeugen. Mit einem SAW-Chip aus LiTaO₃ werden solche Stehwellenfelder im Folgenden auf SLB angewendet.

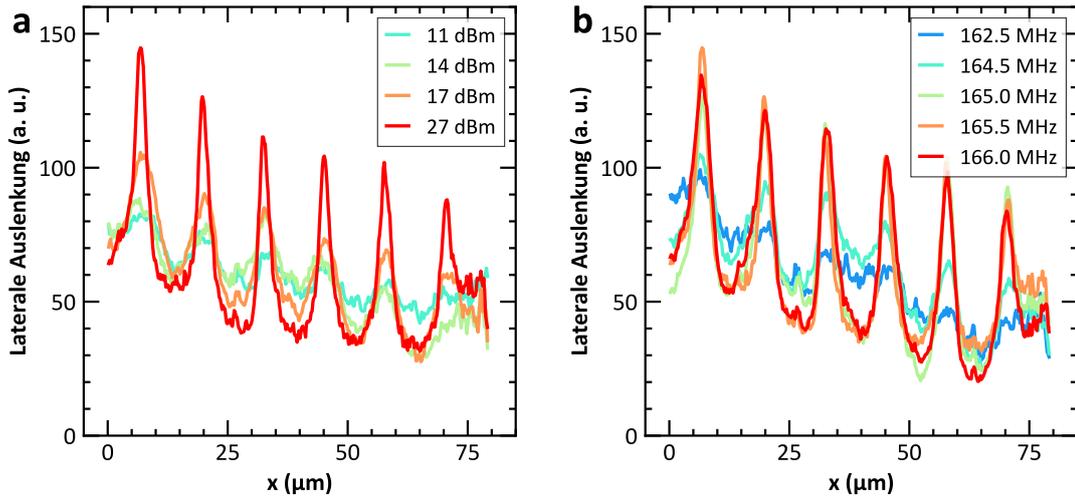


Abb. 2.8: Linienprofil der lateralen Auslenkung der AFM-Spitze senkrecht zum Streifenmuster für LiTaO_3 . a) Abhängigkeit der Auslenkung von der HF-Leistung. b) Abhängigkeit der Auslenkung von der Frequenz. Der Abstand der Knoten oder Bäuche entspricht dabei der halben Wellenlänge.

2.3.2 Nachweis Lipidmembran

Zunächst wird sichergestellt, dass SLB reproduzierbar auf SAW-Chips erzeugt werden kann. SLB werden mit der sogenannten Vesikel-Fusionsmethode hergestellt (siehe Kapitel 2.2). Bei dieser Methode werden SUV in wässriger Lösung auf ein hydrophiliertes Substrat gegeben. An der Substratoberfläche platzen die SUV und bilden nach kurzer Zeit einen geschlossenen SLB. Das Vorhandensein eines SLB kann z. B. mit der Methode des kontinuierlichen Bleichens (engl. *Continuous Bleaching*) nachgewiesen werden [72–75]. Dazu wird dem SLB eine kleine Menge fluoreszierender Farbstoffmoleküle zugesetzt. Die kontinuierliche Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs führt zu einem Intensitätsgradienten aufgrund von Ausbleichen und Diffusion der Lipide im SLB. Um einen definierten Bleichbereich zu erhalten, wird der Beleuchtungsbereich mit einer kreisförmigen Blende begrenzt (siehe Abb. 2.9 a und b).

Das zeitliche Ausbleichen des Farbstoffs erfolgt exponentiell und kann in der Mitte des Bildes ermittelt werden (siehe Abb. 2.9 c):

$$I(t) = I_0 \exp(-B_0 t) + c_1, \quad (2.6)$$

mit I_0 der anfänglichen Intensität, B_0 der Ausbleichkonstanten und c_1 einer Fitkonstanten. Weiterhin gilt für den Intensitätsverlauf (siehe Abb. 2.9 d) entlang der in Abb. 2.9 a

gezeigten Linie:

$$I(x) = I_{x0} \exp(-(B_0/D)^{-1/2}x) + c_2 \quad (2.7)$$

mit I_{x0} der Intensität am Rand, D der Diffusionskonstanten und c_2 einer Fitkonstanten.

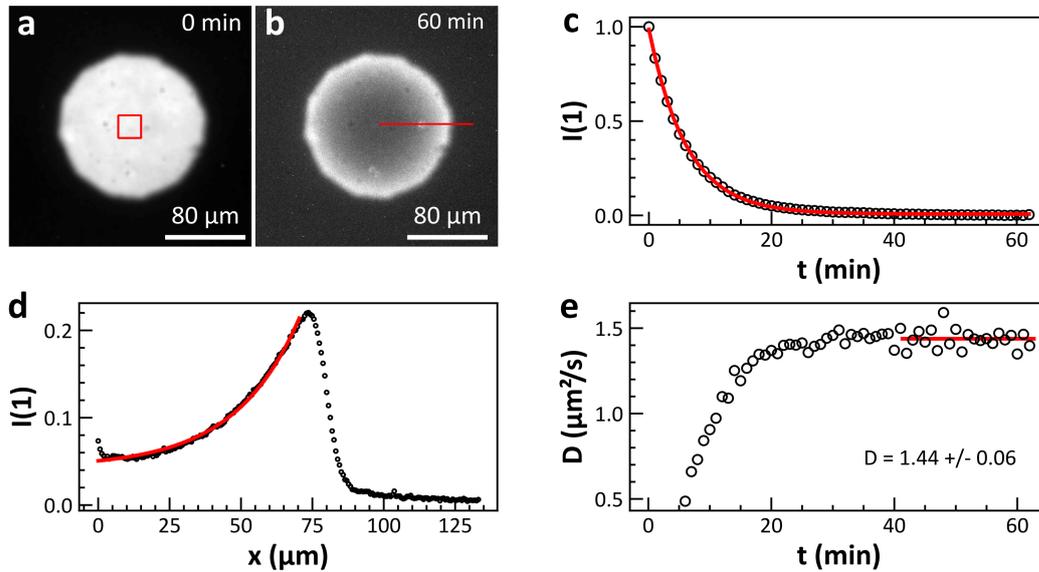


Abb. 2.9: Nachweis eines SLB durch kontinuierliches Ausbleichen. a) und b) Durch kontinuierliche Anregung des in die Lipidmembran eingebauten Fluoreszenzfarbstoffs erhält man einen Helligkeitsgradienten über die Zeit, der auf das Ausbleichen und die laterale Diffusion der einzelnen Lipide zurückzuführen ist. Aus der Bleichkonstanten des Farbstoffs (c) und der Abklingkonstanten des Intensitätsprofils (d) entlang radialer Richtungen (Mittelwertbildung der Intensität durch Drehen der in b gezeigten Linie) lässt sich die Diffusionskonstante bestimmen. e) Zeitliche Entwicklung der Diffusionskonstanten. Nach dem vollständigen Bleichen in der Mitte wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, der zu einem konstanten Wert für die Diffusionskonstante führt. (Abb. entnommen aus [37])

Aus der Ausbleichkonstanten des Farbstoffs und der Abklingkonstanten des Intensitätsprofils, kann dann die Diffusionskonstante bestimmt werden. *Abb. 2.9 e* zeigt die Entwicklung der Diffusionskonstante für jeden Zeitschritt. Nach einer gewissen Zeit sättigt $D(t)$ gegen einen festen Wert. Dieser Wert entspricht dann der Diffusionskonstante im SLB. Für ein Glassubstrat wird eine Diffusionskonstante von etwa $D = 1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 3$, Fehler entspricht Standardabweichung) bei 25°C gemessen. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturwerten für typische Diffusionskonstanten überein [76]. Für die Diffusionskonstante auf einem SAW-Chip werden deutlich niedrigere Werte von $D = 0.18 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 3$, Fehler entspricht Standardabweichung) bei 25°C ge-

messen. Diese Verringerung könnte auf die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zurückzuführen sein oder auf die Tatsache, dass die SAW-Chips im Experiment wiederverwendet werden.

2.3.3 Domänenbildung Lipidmembran

Nachdem die Existenz eines SLB nachgewiesen und D charakterisiert wurde, wird hier gezeigt, dass akustische Oberflächenwellen dazu genutzt werden können, um Dichteänderungen in der Lipidmembran zu bewirken. Diese Dichtemodulationen werden später genutzt, um die verfügbare Membranfläche pro Enzym zu kontrollieren. Wie Neumann und Hennig *et al.* bereits gezeigt haben, moduliert ein SAW-Stehwellenfeld die laterale Dichte in einem SLB [49–52]. Mit einem vergleichbaren Aufbau (siehe Abb. 2.10 a) können diese Ergebnisse hier reproduziert werden.

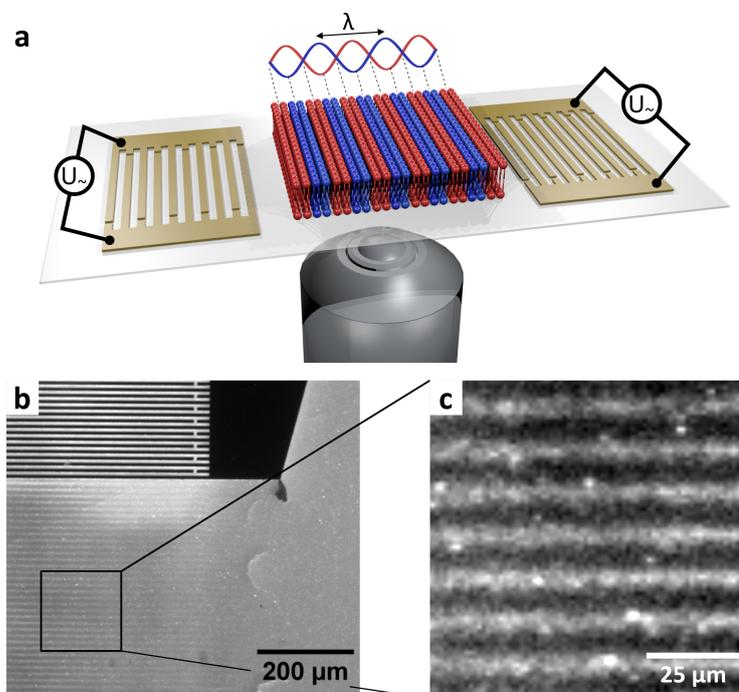


Abb. 2.10: Bildung von Domänen in einem SLB aus DOPC-Lipiden mit 0.25 mol% Fluoreszenzfarbstoff DiOC₁₄ durch Anwendung eines SAW-Stehwellenfeldes. a) Skizze des Versuchsaufbaus. Durch Anlegen eines HF-Signals an zwei IDT wird eine stehende Welle erzeugt, die zu einer Dichtemodulation in einem SLB führt. b) Die Domänen sind räumlich auf die Apertur des IDT beschränkt. Außerhalb des Anregungsbereichs treten noch Ausläufer der Domänen auf. c) Vergrößerte Ansicht des deutlich sichtbaren Streifenmusters, das durch das SAW-Stehwellenfeld erzeugt wird. (Abb. entnommen aus [37])

Abb. 2.10 b zeigt die Bildung von Domänen in einem SLB aus DOPC-Lipiden mit 0.25 mol % DiOC14 auf einem LiTaO₃-Chip. Durch Anlegen eines SAW-Signals an zwei gegenüberliegende IDT wird eine stehende Welle erzeugt. Dadurch ändert sich in den Knoten und Bäuchen lokal die Dichte in der Lipidmembran, was durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs nachgewiesen wird. Wie in Abb. 2.10 c zu sehen ist, sind die Domänen räumlich auf die Apertur des IDT begrenzt. Der Abstand zwischen zwei benachbarten Knoten oder Bäuchen entspricht dem erwarteten Wert einer halben Wellenlänge.

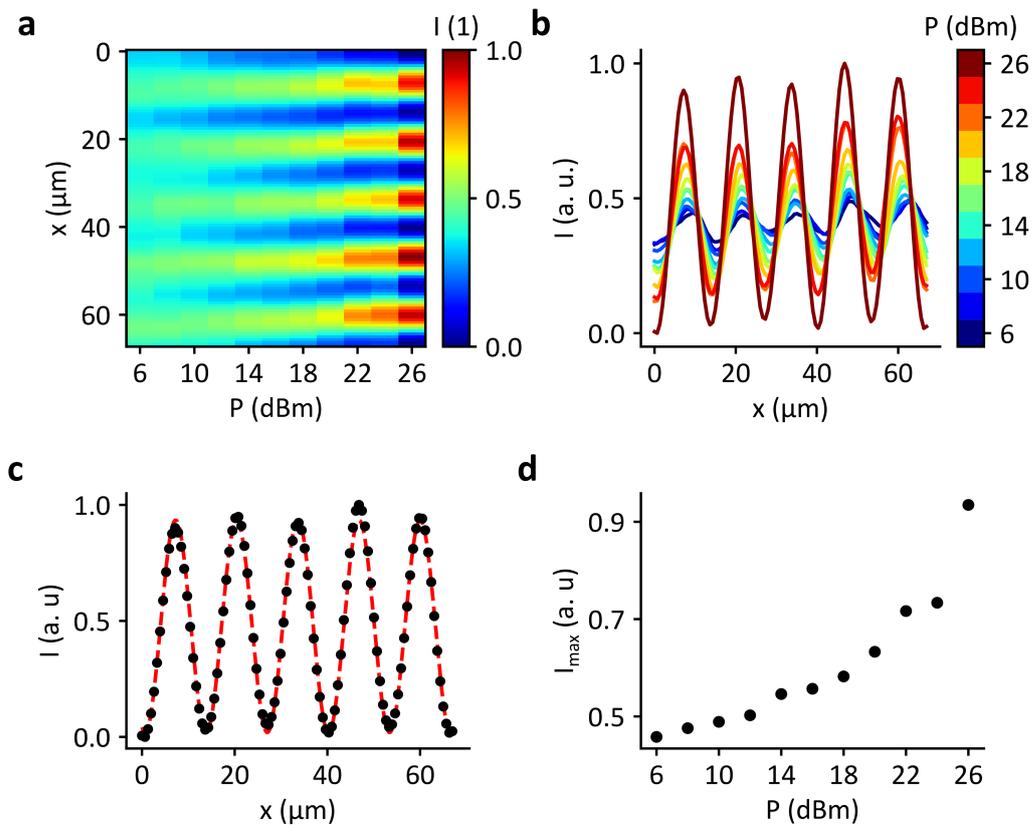


Abb. 2.11: Leistungsveränderung eines SAW-Stehwellenfelds mit SLB: a) Normierte Helligkeitsintensität bei $f = 163.5$ MHz im Leistungsbereich von $P_{\text{IDT}} = 6$ bis 26 dBm. b) Intensitätsverlauf quer zum Streifenmuster. c) Intensitätsverlauf für 26 dBm mit Fitfunktion nach Gl. 2.8. d) Abhängigkeit des Intensitätsmaximums von der Leistung. (Abb. entnommen aus [37])

Der Einfluss der Leistung des HF-Signals ist in Abb. 2.11 dargestellt. Die Leistung wird hier in 2 dBm-Schritten erhöht und jeweils ein Fluoreszenzbild aufgenommen.

Abb. 2.11 a zeigt die auf 1 normierte Helligkeitsintensität im Bild für jede Leistung. Um Helligkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Bildern auszugleichen wird jedes Bild durch den Mittelwert der Intensität geteilt. Mit zunehmender Leistung ist das Streifenmuster stärker ausgeprägt. Das heißt, der Helligkeitsunterschied zwischen Knoten und Bäuchen nimmt zu. Dies zeigt sich noch deutlicher in Abb. 2.11 b. Hier ist die Intensität quer zum Streifenmuster dargestellt. Dieser Intensitätsverlauf lässt sich nach Neumann *et al.* [50] mit folgender Funktion beschreiben:

$$y = a + b \exp[-c \sin^2(k(x - d))]. \quad (2.8)$$

a , b , c und d sind dabei Fitparameter und k entspricht der Wellenzahl. Abb. 2.11 c zeigt den experimentell bestimmten Intensitätsverlauf für $P_{\text{DT}} = 26$ dBm mit Fit. Dieser stimmt sehr gut mit den gemessenen Daten überein. Abb. 2.11 d zeigt das aus den Fits bestimmte Intensitätsmaximum in Abhängigkeit der Leistung. Der Verlauf der Kurve bestätigt den Eindruck, dass mit zunehmender Leistung die Helligkeit bzw. Intensität der Streifen zunimmt. Erklären lässt sich dieses Ergebnis damit, dass bei höherer Leistung mehr Farbstoff in den Knoten konzentriert wird.

2.4 Enzymaktivität

Das Enzym AChE beschleunigt in wässriger Lösung die Spaltung von ASCh zu SCh und Acetat unter Freisetzung von Protonen (siehe *Abb. 2.2*). AChE fungiert hier als Katalysator. Die Enzymaktivität von AChE kann mit Hilfe der sog. Ellmans Reagenz gemessen werden [67, 68]. Bei bekannter Anfangskonzentration des Farbstoffs DTNB kann mit Hilfe einer gesättigten Lösung der Extinktionskoeffizient bestimmt werden. Wichtig dabei ist, dass die anfängliche Stoffmenge des Substrats die Stoffmenge des Farbstoffs übersteigt. Verdünnt man die gesättigte Lösung, kann aus der Steigung der gemessenen Konzentrationsabhängigkeit der Extinktions- bzw. Absorptionskoeffizient mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz $E = \epsilon dc$ (siehe *Gl. 2.1*) bestimmt werden. Dafür muss zusätzlich noch die Höhe des Probenvolumens (Schichtdicke d) bekannt sein. Diese lässt sich aus der Geometrie der Vertiefung der Mikrotiterplatte berechnen (siehe *Anhang A.2*). Durch Normierung der Absorption mit der Schichtdicke d ergibt die Steigung der Regressionsgeraden direkt den Extinktionskoeffizient ϵ . Im Experiment erhält man einen Wert von $\epsilon = 26667 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. In der Literatur findet man für den Extinktionskoeffizienten von TNB^{2-} bei einer Wellenlänge von 412 nm in wässriger Lösung (pH-Wert = 7.4 und $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) $\epsilon = 14150 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [77].

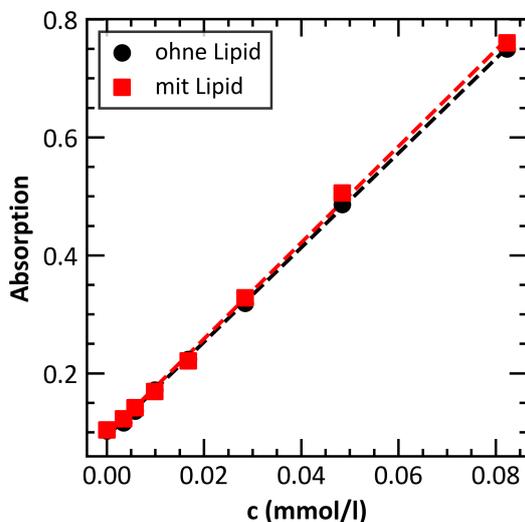


Abb. 2.12: Experimentelle Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von TNB^{2-} : Die Extinktion ist linear von der ursprünglichen Konzentration von DTNB abhängig. Bei bekannter Höhe des Volumens kann aus der Steigung der Extinktionskoeffizient bestimmt werden. Zwischen der Probe ohne und mit Lipid ($c = 0.3 \text{ mmol/l}$ DOPC) ist quasi kein Unterschied feststellbar.

Der gemessene Wert weicht etwa um einen Faktor 2 vom Literaturwert ab. Eine Erklärung liefert der zweite Reaktionsweg, über den ein weiteres Dianion gebildet werden kann (siehe *Kapitel 2.2.2*). Zwischen der Probe mit und ohne Lipid lässt sich quasi kein Unterschied feststellen (siehe *Abb. 2.12*). Die Zugabe von Lipid hat somit keinen

Einfluss auf die Absorption des Farbstoffs. Dies ist relevant, da später Absorptionsmessungen mit und ohne Lipid durchgeführt und verglichen werden.

Neben der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten anhand einer gesättigten Probe, lässt sich mittels Messung einer Kinetik mit der Ellmans Reagenz die Aktivität des Enzyms AChE bestimmen. *Abb. 2.13 a* zeigt die gemessene Absorption über 5 h beispielhaft für verschiedene Enzymkonzentrationen ($c_0 = 0.2 \text{ nmol/l}$).

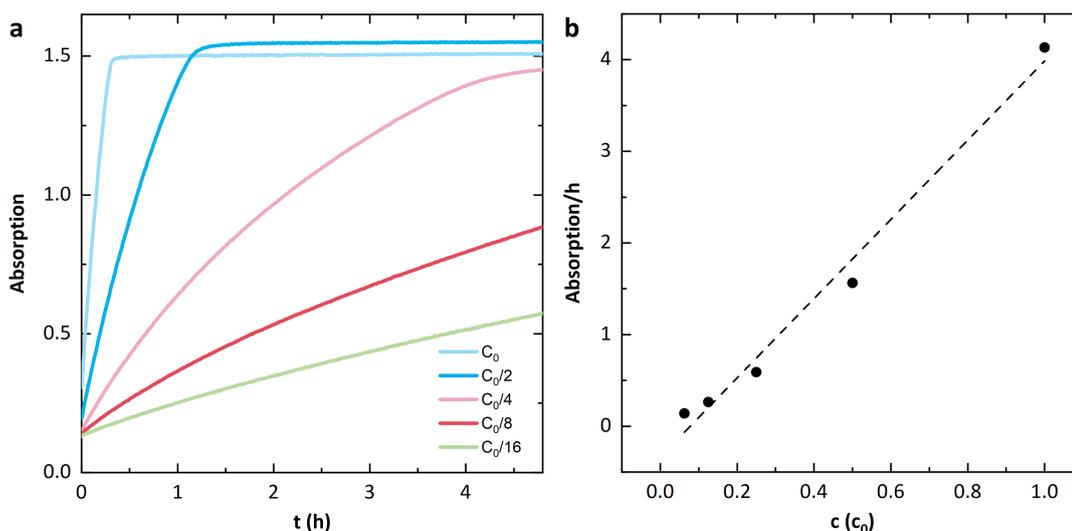


Abb. 2.13: Reaktionskinetik für verschiedene Enzymkonzentrationen: a) Je höher die Konzentration desto schneller geht die Reaktion in Sättigung. Der Farbstoff, der zum Nachweis der Reaktion verwendet wird, ist komplett umgesetzt. b) Steigung der Absorption in Abhängigkeit der Konzentration für die ersten 15 min. Die Steigung ist proportional zur Enzymaktivität ($c_0 = 0.2 \text{ nmol/l}$).

Zu Beginn weisen alle Kurven einen relativ linearen Verlauf auf. Die Steigung nimmt dabei mit abnehmender Enzymkonzentration ab. Die Probe mit der höchsten Enzymkonzentration sättigt bereits nach wenigen Minuten gegen einen Wert von etwa 1.5. Die Sättigung lässt sich damit erklären, dass der gesamte in der Probe befindliche Farbstoff umgesetzt ist. Da dieser als Nachweis für die Reaktion dient, kann ab diesem Punkt keine Umsetzung von ASCh mehr nachgewiesen werden, auch wenn die Reaktion noch weiter abläuft. Für die Bestimmung der Aktivität eignet sich nur der Bereich in dem die Reaktion linear verläuft. *Abb. 2.13 b* zeigt die Steigung der Absorption in Abhängigkeit der Enzymkonzentration für die ersten 15 min. In diesem Bereich zeigen alle Kurven einen linearen Verlauf. Wie ersichtlich ist, erhält man einen linearen Zusam-

menhang zwischen der Steigung und der Konzentration. Da die Aktivität proportional zur Steigung ist, gilt dies ebenso für die Aktivität.

2.4.1 Dynamische Variation der Membranfläche

In einem nächsten Schritt wird AChE in den SLB eingebettet. Mit Endpunktmessungen wird die Anbindung des Enzyms an den SLB sowie der Einfluss eines SAW-Stehwellenfeldes auf die Aktivität des gebundenen Enzyms untersucht. Zu diesem Zweck werden jeweils vier Proben hergestellt. Probe 1 enthält nur Farbstoff und Substrat und dient als Kontrolle für den thermischen Zerfall des Substrats. Probe 2 enthält keinen SLB und dient als Kontrolle, ob das Enzym nach dem Spülen auch ohne SLB in der Probe verbleibt. Probe 3 enthält einen SLB, wird aber nicht mit SAW behandelt. Probe 4 enthält einen SLB und wird mit SAW behandelt ($f = 163.5 \text{ MHz}$, $P = 12 \text{ dBm}$, $t = 1 \text{ h}$). Um zu prüfen, ob das Enzym an den SLB bindet, wird den Proben 2, 3 und 4 die gleiche Menge Enzym ($V = 10 \mu\text{l}$, $c = 4 \text{ nM}$) zugesetzt. Nach etwa 30 Minuten werden die Proben dann mit Puffer gespült. Idealerweise sollte Probe 2 nur Puffer enthalten. Die Proben 3 und 4 sollten nur an den SLB gebundenes Enzym enthalten. Substrat und Farbstoff werden jeweils zuletzt zugegeben (siehe *Abb. 2.14 a*). Nach $t = 1 \text{ h}$ werden von jeder Probe $V = 50 \mu\text{l}$ entnommen und die Absorption mit einem Mikroplatten-Reader gemessen. *Abb. 2.14 b* zeigt die gemessene Absorption der vier Proben. Wie erwartet, zeigt der Vergleich zwischen der Probe ohne Enzym (Probe 1) und der Probe ohne SLB (Probe 2) fast die gleiche Absorption. Die etwas höhere Absorption von Probe 2 lässt sich dadurch erklären, dass nach dem Spülschritt eine kleine Menge Enzym in der Probe verbleibt. Der Großteil wird jedoch entfernt. Im Vergleich dazu zeigt die Probe mit SLB (Probe 3) eine deutlich höhere Extinktion. Es wird also in der gleichen Zeit wesentlich mehr Reaktionsprodukt gebildet, das durch den Farbstoff nachgewiesen wird. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym an das SLB gebunden ist und durch den Spülschritt nicht entfernt wird. Die Auswertung der Extinktion der SAW-behandelten Probe (Probe 4) zeigt, dass sie mit der von Probe 3 vergleichbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die SAW-Behandlung innerhalb des Unsicherheitsbereichs keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität bei diesen Endpunktmessungen hat. Als nächstes wird daher die Enzymkinetik mit und ohne SAW-Behandlung genauer betrachtet.

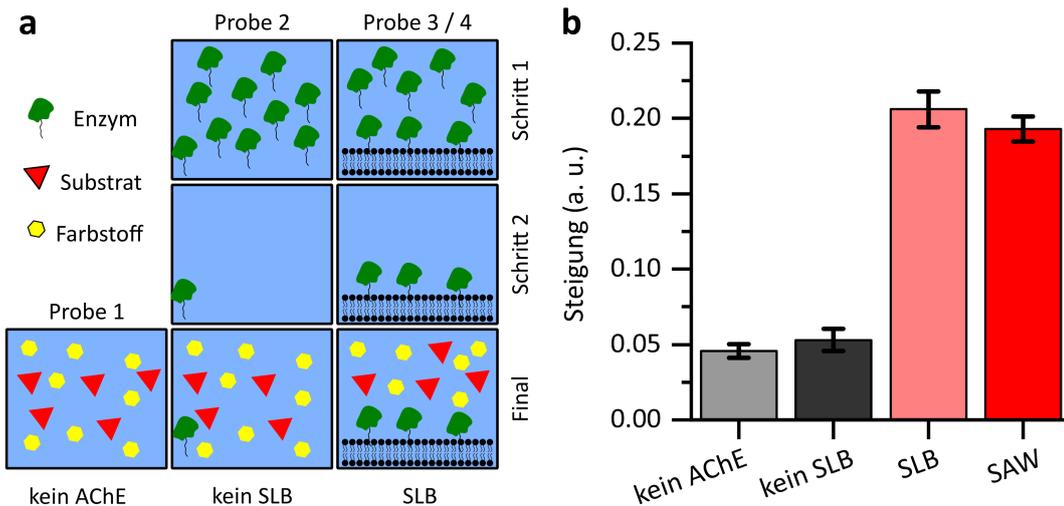


Abb. 2.14: Bestimmung der Enzymbindung an einen SLB und Einfluss eines SAW-Stehwellenfeldes auf die Enzymaktivität. a) Vorbereitungsschritte der verschiedenen Proben. b) Messung der Absorption nach 1 h durch Entnahme von $V = 50 \mu\text{l}$. Probe 2 (ohne SLB) zeigt fast die gleiche Absorption wie Probe 1 (ohne AChE). Probe 3 (SLB) hingegen zeigt eine viel höhere Absorption. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym an den SLB gebunden ist. Probe 4 (SAW) zeigt fast die gleiche Absorption wie Probe 3 (SLB). Es kann kein signifikanter Unterschied aufgrund der SAW-Behandlung festgestellt werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. (Abb. entnommen aus [37])

Zusätzlich zu den Endpunktmessungen unter dem Einfluss von SAW wird auch der Einfluss von SAW auf die Enzymkinetik untersucht. Die Proben werden auf die gleiche Weise, wie oben beschrieben, vorbereitet. Um den Wärmeeintrag durch die SAW so gering wie möglich zu halten, wird ein gepulstes HF-Signal verwendet ($f = 163.5 \text{ MHz}$, $P = 20 \text{ dBm}$, Zyklus 50 %, Dauer 30 min). Die Absorption wird dann mit einem Mikroskop gemessen (siehe Kapitel 2.2). Abb. 2.15 a zeigt den zeitlichen Verlauf der gemessenen Absorption und deren erste Ableitung nach der Zeit für drei separate Proben mit SAW-Behandlung und einer Probe als Kontrolle, die identisch ist mit Probe 1 (siehe Abb. 2.14 b). Gleich zu Beginn verläuft die Kinetik noch nicht linear. Dieses Verhalten lässt sich wahrscheinlich auf Inhomogenitäten in der Probe zurückführen, da die Substanzen bei der Herstellung der Lösungen ohne ausgiebiges Mischen zusammengegeben werden, um ein Wegspülen des Enzyms aus der Membran zu verhindern. Anschließend verläuft die Reaktion dann linear. Die grauen Intervalle zeigen an, wann eine gepulste SAW angeregt wurde. In den anderen Intervallen war das HF-Signal abgeschaltet. Die erhöhte Steigung in den Bereichen mit SAW-Anwendung ist deutlich sichtbar. Dies ist besonders gut in der ersten Ableitung des Signals nach der Zeit zu

erkennen. Ungewöhnlich ist der kurze Abfall des Signals unmittelbar nach dem Einschalten des HF-Signals. In *Abb. 2.15 b* sind die zeitlich gemittelten Steigungen über die Behandlungsregionen aufgetragen. Es ist offensichtlich, dass die Steigung in den Bereichen mit SAW immer höher ist als in den Bereichen ohne SAW. Dieser Unterschied zwischen den beiden Bereichen wird jedoch mit der Zeit kleiner. Unerwartet ist auch, dass die Steigung in den Bereichen ohne SAW zu Beginn negativ ist.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die SAW-Behandlung einen deutlichen Einfluss auf die gemessene Absorption hat. Es ist jedoch nicht klar, ob dieser Effekt auf eine Veränderung der Enzymaktivität zurückzuführen ist. Es ist wahrscheinlicher, dass das gezeigte Verhalten auf störende Effekte der Absorption des an das Produkt gebundenen Farbstoffs zurückzuführen ist, die durch die SAW induziert werden. Diese Effekte könnten mögliche Auswirkungen der SAW-induzierten Fluktuationen der Membranfläche auf die Enzymaktivität überlagern.

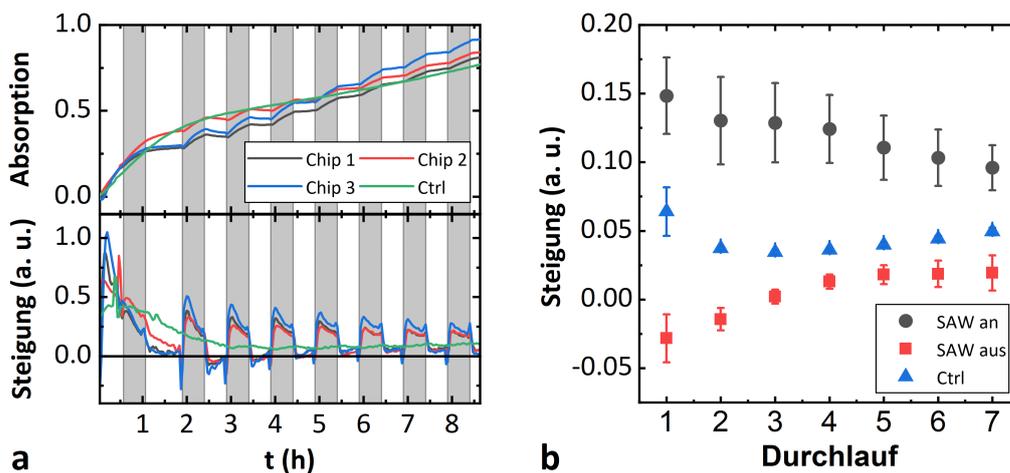


Abb. 2.15: Beeinflussung der Enzymaktivität durch ein SAW-Stehwellenfeld: a) Zeitliche Entwicklung der Absorption und deren erste Ableitung. In den grauen Bereichen findet eine SAW-Behandlung statt. b) Zeitlich gemittelte Steigung für die Bereiche mit und ohne SAW-Behandlung. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei Proben dar. (Abb. entnommen aus [37])

Einfluss eines elektrischen Feldes auf die Enzymaktivität

Ein möglicher Störeffekt der SAW auf das Absorptionsverhalten könnte von dem die SAW begleitenden elektrischen Feld herrühren. Um den Einfluss eines elektrischen Wechselfeldes auf die Absorption separat zu testen, wird eine Probenkammer beste-

hend aus einem PTFE-Ring verwendet. Der PTFE-Ring ist beidseitig mit zwei ITO-beschichteten Glasplättchen abgedichtet (siehe *Anhang A.2*). An die leitenden Glasplättchen wird eine hochfrequente Wechselspannung angelegt. Das erzeugte elektrische Feld beträgt $E = 8 \text{ V/cm}$. *Abb. 2.16 a* zeigt ein Beispiel für eine Absorptionsmessung mit eingeschaltetem HF-Signal.

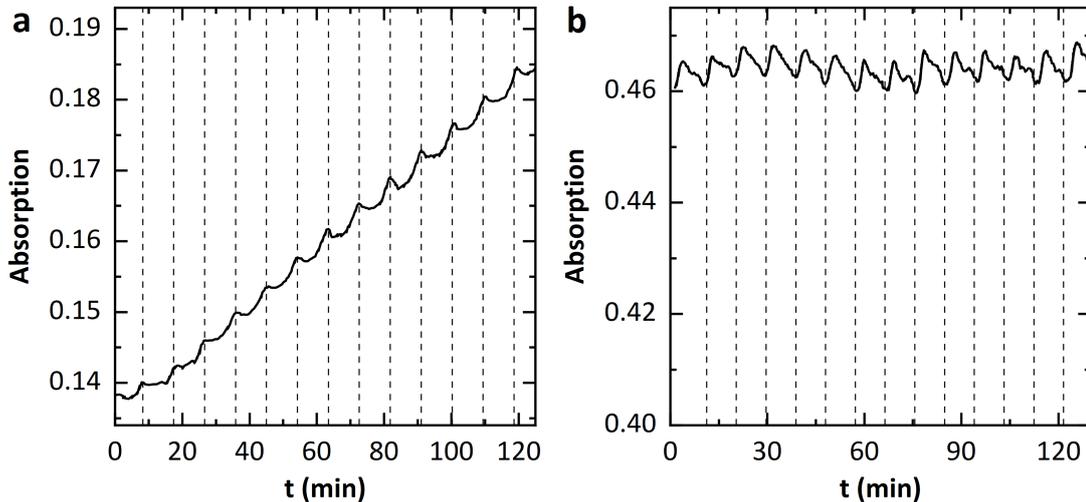


Abb. 2.16: Einfluss eines elektrischen Wechselfeldes auf die Absorption von TNB^{2-} . a) Messung der Absorption während der Kinetik von AChE unter dem Einfluss eines oszillierenden Feldes ($E = 8 \text{ V/cm}$) mit Frequenzdurchlauf von 1 MHz bis 80 MHz. b) Messung der Absorption für eine gesättigte Lösung der Ellmans Reagenz mit denselben elektrischen Feldparametern (Abstand der gestrichelten Linien entspricht der Periodendauer von 500 s). (Abb. entnommen aus [37])

Das Signal wird zwischen 1 - 80 MHz mit einer Periode von 500 s variiert. Insgesamt steigt die Absorption linear mit der Zeit. Auffällig sind die periodischen Schwankungen der Absorption. Die Zeit zwischen zwei dieser Peaks entspricht der Periode eines Frequenz-Sweeps (Abstand der gestrichelten Linien entspricht der Periodendauer von 500 s). Es ist fraglich, ob diese Schwankungen auf Veränderungen der Enzymaktivität zurückzuführen sind, da die Absorption nach jedem der Peaks zunächst kurzzeitig abnimmt. Dies bedeutet, dass die Farbstoffkonzentration in der Probe aufgrund einer Rückreaktion kurzzeitig abnehmen müsste. Alternativ dazu könnte der Extinktionskoeffizient auch durch das elektrische Feld beeinflusst werden. Um zu prüfen, ob es sich bei diesem Ergebnis um ein Artefakt handelt, wird eine gesättigte Probe unter Einfluss desselben elektrischen Wechselfeldes untersucht. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in *Abb. 2.16 b* dargestellt. Auch bei der gesättigten Probe tritt eine periodische Schwan-

kung der Extinktion auf. Auch hier entspricht das Zeitintervall zwischen zwei Maxima gleich der Dauer des Sweeps. Diese Ähnlichkeiten mit der Messung der Kinetik legen nahe, dass ein Artefakt die Ursache für die Schwankungen ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Artefakt eine tatsächliche geringe Änderung der Enzymaktivität überlagert.

Domänenzerfall Lipidmembran

Ein weiterer Aspekt, der beim Einfluss des stehenden elektrischen Feldes auf die Enzymaktivität eine Rolle spielen könnte, ist die Frage, ob der SLB intakt ist. Daher wird als Kontrolle der Zerfall der Domänen nach Abschalten des HF-Signals und des damit verbundenen Kraftfelds untersucht. *Abb. 2.17 a* zeigt die normierte und geglättete Helligkeitsintensität, nachdem das HF-Signal ($f = 163.5$ MHz und $P_{\text{IDT}} = 27$ dBm) abgeschaltet wurde. Nach 60 Minuten ist das Streifenmuster immer noch deutlich sichtbar. *Abb. 2.17 b* zeigt das Intensitätsprofil senkrecht zum Streifenmuster. Der Farbcode entspricht dem Zeitverlauf. Nach 60 Minuten ist die sinusförmige Intensität zwischen den hellen und dunklen Bereichen ebenfalls noch vorhanden. *Abb. 2.17 d* zeigt den zeitlichen Verlauf des Intensitätsmaximums (extrahiert aus dem angefitzten Profil in *Abb. 2.17 c*) und damit den Zerfall der Domänen. Es können zwei Zeitkonstanten beobachtet werden ($t_1 = 1.2$ min und $t_2 = 30.3$ min). Hennig *et al.* berichteten ebenfalls, dass der Domänenzerfall mit zwei Zeitkonstanten erfolgt, was zu $t_1 = 9$ s und $t_2 = 90$ s führt. Sie führen dieses Phänomen auf starke Unterschiede in der Viskosität von Wasser im Bulk und an der Substratoberfläche gebundene nanoskopische Wasserschichten oder auf potenziell induzierte nanoskopische Membrandefekte zurück, die nach dem Abschalten der SAW ausheilen [49]. Die Zerfallszeiten in den Experimenten hier sind jedoch viel höher. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass die von Hennig *et al.* verwendeten SLB sich aus anderen, als in dieser Arbeit verwendeten, Substanzen zusammensetzen. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass die Reversibilität der Bildung und des Zerfalls der Domänen in den Experimenten hier stark eingeschränkt ist. Dies könnte eine Erklärung für die Tatsache sein, dass das Enzym durch das Stehwellenfeld nicht beeinflusst wird.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Neumann und Hennig *et al.* und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wird anhand einer Simulation des Domänenzerfalls genauer untersucht. Um das kontinuierliche Bleichen und den Zerfall des Musters in ei-

nem SLB zu simulieren, wird ein Random-Walk-Algorithmus mit festen Gitterpunkten verwendet. Bei jedem Zeitschritt kann sich jedes Teilchen zufällig zu einem benachbarten Gitterpunkt bewegen und die Position mit diesem Nachbarpartikel wechseln. Dies ist jedoch nur zulässig, wenn das benachbarte Teilchen oder das Teilchen selbst seine Position in diesem Zeitschritt noch nicht verändert hat. An den Rändern des Gitters wird eine periodische Randbedingung angewendet. Der Zeitschritt dt ist definiert durch $dt = dx^2/4D$, wobei D die Diffusionskonstante und dx die Schrittweite des Gitters ist. Bei $t = 0$ wird das folgende Intensitätsprofil vorgegeben, welches das im Experiment beobachtete Streifenmuster darstellt:

$$y = a + b \exp[-c \sin^2(k(x-d))]. \quad (2.9)$$

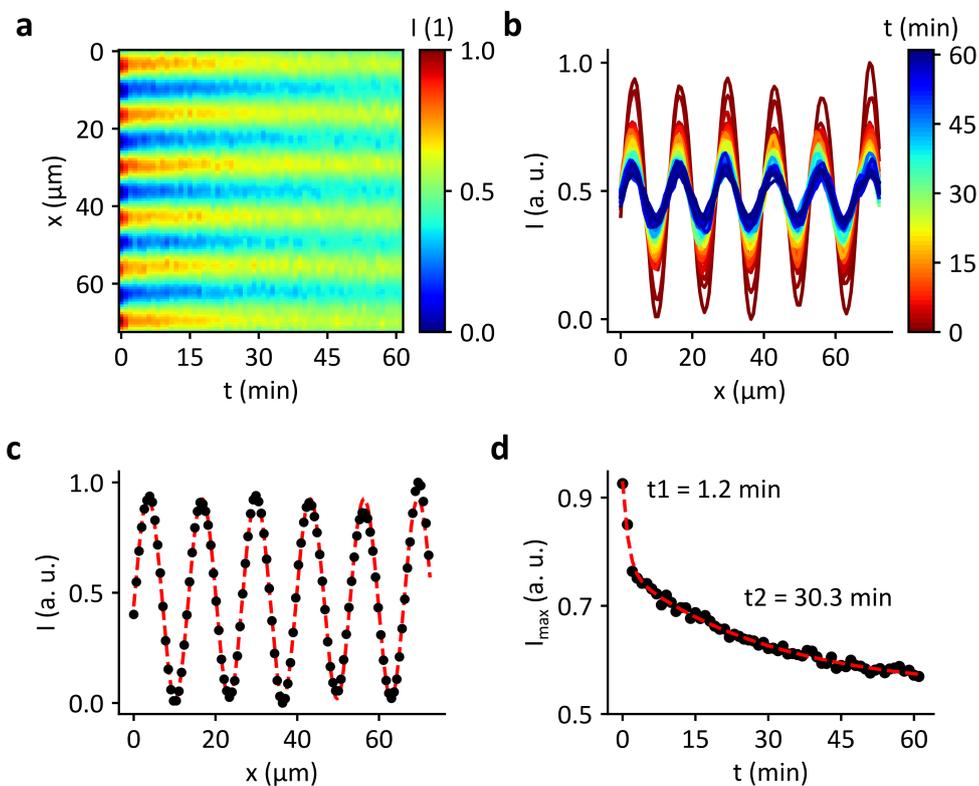


Abb. 2.17: Domänenzerfall nach Ausschalten eines SAW-Stehwellenfelds mit SLB: a) Normierte und geglättete Helligkeitsintensität bei $f = 163.5$ MHz über einen Zeitraum von 60 min. b) Intensitätsverlauf senkrecht zum Streifenmuster. c) Intensitätsverlauf für $t = 0$ min mit Fitfunktion nach Gleichung 2.8. d) Abhängigkeit des Intensitätsmaximums im zeitlichen Verlauf. Die Intensität nimmt ab. Das Streifenmuster ist nach einer Stunde immer noch sichtbar. (Abb. entnommen aus [37])

Abb. 2.18 a zeigt die normierte Helligkeitsintensität über 300 s als Heatmap für eine Simulation mit 100×100 Gitterpunkten und einer Diffusionskonstanten von $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, die in dem in Abb. 2.17 dargestellten Experiment beobachtet wurde. Zu Beginn ist das vorgegebene sinusförmige Streifenmuster deutlich sichtbar. Mit zunehmender Zeit verschwindet das Muster vollständig. Dies ist auch in Abb. 2.18 b zu sehen. Hier ist die Intensitätskurve senkrecht zu den Streifen dargestellt. Nach etwa 100 s ist das Muster kaum noch zu sehen. Das Abklingen des Musters kann auch durch Auftragen des Intensitätsmaximums (extrahiert aus den Fits in Abb. 2.18 b) als Funktion der Zeit veranschaulicht werden. Hier ist nur ein exponentieller Zerfall zu erkennen. Dies ist nicht verwunderlich, da nur eine Lipidmonolage simuliert wird.

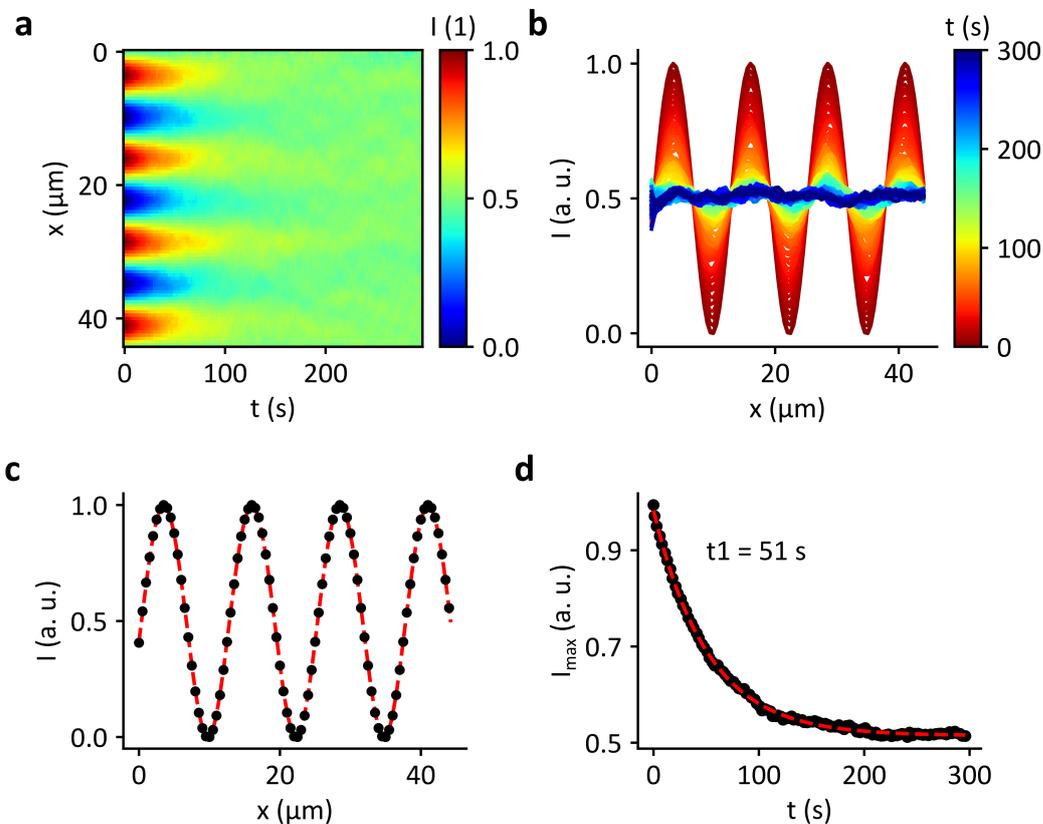


Abb. 2.18: Simulation des Domänenzerfalls in einem SLB. a) Normierte Helligkeitsintensität über 300 Sekunden als Heatmap. b) Intensitätsverlauf senkrecht zum Streifenmuster. c) Angefitteter Intensitätsverlauf für $t = 0$ s. d) Zeitlicher Verlauf des Intensitätsmaximums der Fitkurven. Nach etwa 100 Sekunden ist das Streifenmuster fast komplett verschwunden. (Abb. entnommen aus [37])

Der erste Teil der hier präsentierten Ergebnisse zeigt, dass es eine technische Herausforderung ist, Membrandichtefluktuationen in einer Lipidmembran mit akustischen Oberflächenwellen zu induzieren und gleichzeitig die Aktivität der eingebetteten Enzyme zu messen. Dennoch kann ein Einfluss der dynamischen Flächenfluktuationen auf die AChE-Aktivität nicht völlig ausgeschlossen werden, da diese durch die Artefaktsignale des elektrischen Feldes überlagert werden könnte. Im Folgenden wird daher zu einem vereinfachten, eher statischen Versuchsaufbau übergegangen, bei dem die verfügbare Membranfläche pro Enzym auf kleinen unilamellaren Vesikeln verändert wird. Wie im nächsten Abschnitt ausführlich dargestellt, wird dies helfen zu verstehen, ob die künstliche Verringerung der Membranfläche einen Einfluss auf die Aktivität der eingebetteten Enzyme hat, wie in früheren Arbeiten vermutet [57–59].

2.4.2 Statische Variation der Membranfläche

Wie gezeigt wurde, wird die Aktivität des membrangebundenen Enzyms durch die SAW im Vergleich zu den elektrisch induzierten Artefakten nicht wesentlich beeinflusst. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die durch die SAW verursachte Veränderung der Membranfläche in den Experimenten eher begrenzt und zudem aufgrund der beobachteten langen Zeitkonstanten beim Zerfall der Domänen nicht reversibel ist. Es schließt jedoch nicht aus, dass es eine Beziehung zwischen der Enzymaktivität und der verfügbaren Membranfläche gibt. Daher werden zusätzlich Messungen der AChE-Aktivität mit und ohne Lipid durchgeführt. Hier werden SUV als Modellsystem verwendet, da sie deutlich einfacher zu handhaben sind als ein SLB.

Abb. 2.19 zeigt eine repräsentative Studie, die verdeutlichen soll, wie die Ergebnisse in *Abb. 2.20* zustande kommen. *Abb. 2.19 a* zeigt die Messung der Absorption mit der Ellmans Reagenz für eine Probe mit und ohne DOPC-SUV ($c_{0,\text{AChE}} = 0.2 \text{ nM}$, $c_{0,\text{DOPC}} = 0.2 \text{ mM}$). Während des betrachteten Zeitraums zeigen beide Proben einen linearen Trend. Die Absorption für die Probe mit Lipid ist deutlich erhöht. Die Kontrollen enthalten kein Enzym und stellen somit den thermischen Zerfall von ASCh dar, der für beide Proben vergleichbar ist. Um die Aktivität aus der Absorptionskinetik zu bestimmen, wird zunächst die Steigung durch eine lineare Anpassung ermittelt (siehe *Abb. 2.19 b*). Die Aktivität ergibt sich dann aus der Differenz zwischen den Steigungen der Probe und der Kontrolle, da diese proportional zu dem von den Enzymen gebildeten Produkt ist. *Abb. 2.19 c* zeigt die Aktivität der beiden Proben im Vergleich. Sie ist bei

der Probe mit Lipid deutlich erhöht. *Abb. 2.19 d* zeigt die Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymkonzentration. Diese wird in Einheiten von $c_{0,AChE}$ angegeben. Sowohl für die Proben mit als auch ohne Lipid ist eine lineare Abhängigkeit zu erkennen.

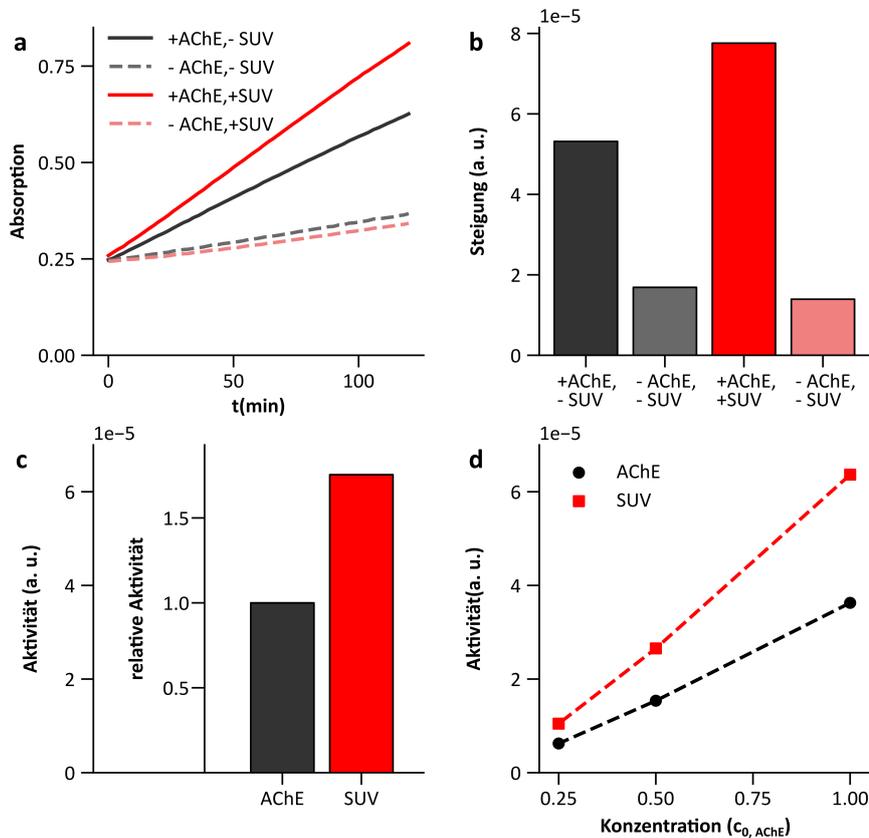


Abb. 2.19: Enzymaktivität von AChE mit und ohne Lipidvesikel. a) Absorptionsmessung für eine Probe mittels der Ellmans Reagenz. b) Steigung der Absorptionskinetiken ermittelt durch linearen Fit. c) Die Aktivität ergibt sich aus der Differenz der Steigungen der Proben mit und ohne Enzyme. d) Aktivität in Abhängigkeit der Enzymkonzentration mit und ohne SUV ($c_{0,AChE}$). (Abb. entnommen aus [37])

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein einer Lipidmembran einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität von AChE hat. Der Zusammenhang lässt sich weiter aufklären, indem die verfügbare Membranfläche pro Enzym variiert wird. Dies kann durch Variation der Enzymkonzentration geschehen. *Abb. 2.20 a* zeigt die relative Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Für die drei betrachteten Konzentrationen liegt die relative Aktivität annähernd konstant bei etwa 1.9. Somit ist die Aktivität des lipidgebundenen Enzyms fast doppelt so hoch wie die Aktivität des freien

Enzyms. Eine Verringerung der Enzymkonzentration erhöht das Verhältnis von Lipiden zu Enzymen. Da der Aktivitätsanstieg jedoch nicht weiter zunimmt, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt in der Sättigung liegt. Es wäre noch interessant zu untersuchen, was passiert, wenn das Verhältnis von Lipiden zu Enzymen verringert wird. Die Enzymkonzentration kann jedoch nur in einem begrenzten Bereich variiert werden. Zu hohe Konzentrationen führen dazu, dass die Reaktion sehr schnell abläuft, was es schwierig macht, sicherzustellen, dass das Experiment im linearen Bereich der Kinetik stattfindet. Eine Verringerung der Konzentration führt dagegen dazu, dass die Reaktion langsamer abläuft und man sich dem Wert nähert, den man durch den thermischen Zerfall von ASCh erhält. Daher wird in einem weiteren Schritt die Lipidkonzentration verringert, was zu einer Verringerung des Verhältnisses von Lipid zu Enzym führte. *Abb. 2.20 b* zeigt, dass mit steigender Lipidkonzentration auch die relative Aktivität zunimmt. Bei der niedrigsten Konzentration beträgt die relative Aktivität 1, was der Aktivität des freien Enzyms entspricht. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass das Verhältnis von Lipid zu Enzym hier entscheidend ist. Der potenziell konzentrationsabhängige Verteilungskoeffizient des Enzyms zwischen Membran und Masse könnte zusätzlich zu den hier beobachteten Effekten beitragen. Ein Erklärungsansatz bietet die Betrachtung der verfügbaren Membranfläche pro Enzym. Diese kann aus der Lipid- und Enzymkonzentration berechnet werden. Je größer die zur Verfügung stehende Membranfläche pro Enzym ist, desto größer ist die relative Aktivität (siehe *Abb. 2.20 c*).

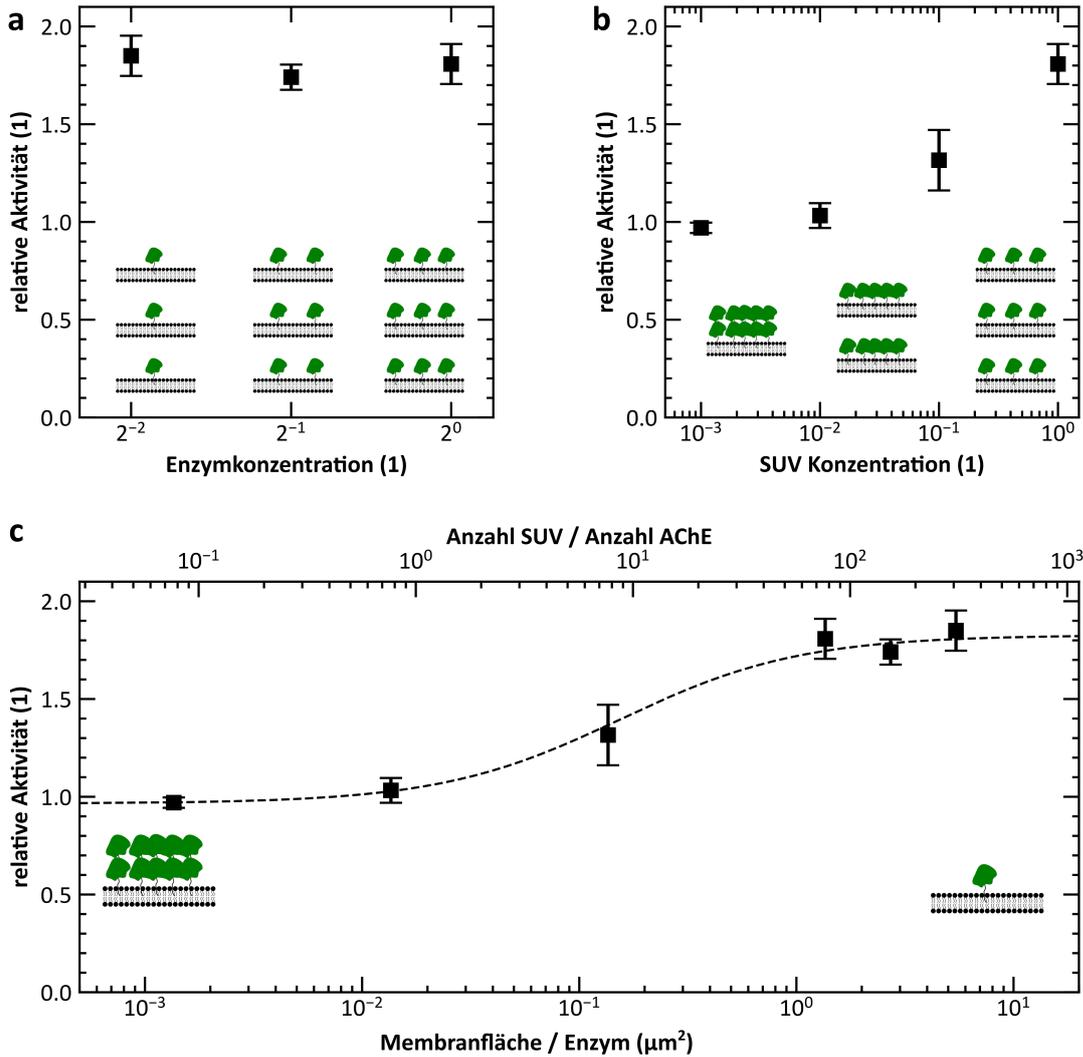


Abb. 2.20: Einfluss der verfügbaren Lipidmembranfläche auf die Enzymaktivität. a) Abhängigkeit der relativen Aktivität (Aktivität mit Lipid / Aktivität freies Enzym) von der Enzymkonzentration ($c_{0,\text{AChE}} = 0.2 \text{ nM}$). Bei einer Lipidkonzentration von 1 mg/ml kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Enzymaktivität im Vergleich zum freien Enzym. Dieser Effekt ist unabhängig von der Enzymkonzentration. b) Wird die Lipidkonzentration verringert, nimmt der Effekt ab. Bei einer 1000-fachen Verringerung der Lipidkonzentration wird keine erhöhte Enzymaktivität mehr beobachtet. c) Relative Aktivität als Funktion der verfügbaren Membranfläche pro Enzym, berechnet aus (a) und (b). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar ($n = 3$). (Abb. entnommen aus [37])

2.5 Fazit

In diesem Kapitel stellte sich die Frage, wie sich Enzyme in der Umgebung von Lipidmembranen verhalten. Insbesondere wurde dazu die verfügbare Grenzfläche dynamisch und statisch variiert. Zunächst wurde der Einfluss eines akustischen Stehwellenfelds auf die Aktivität von AChE, das an einen SLB gebunden ist, untersucht. Damit lässt sich dynamisch eine phasenseparierte Membran erzeugen. Es konnte kein Einfluss auf die Enzymaktivität festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das akustische Stehwellenfeld nur eine geringe Veränderung der verfügbaren Membranfläche bewirkt. Außerdem war die Dichtemodulation der SLB in den Experimenten im Gegensatz zu früheren Studien nicht reversibel. Durch statische Variation der verfügbaren Membranfläche konnte anhand von DOPC-SUV als Modellsystem gezeigt werden, dass Lipidmembranen jedoch einen starken Einfluss auf die Aktivität von AChE haben. Es wurde auch gezeigt, dass dieser Effekt mit der verfügbaren Membranfläche pro Enzym skaliert. Wenn die Membranfläche pro Enzym weniger als $10^{-3} \mu\text{m}^2$ beträgt, entspricht die Aktivität der lipidhaltigen Probe der Aktivität der lipidfreien Probe. Bei Werten der Membranfläche pro Enzym von mehr als $10 \mu\text{m}^2$ ist der Effekt gesättigt und die Aktivität ist doppelt so hoch wie die Aktivität der lipidfreien Probe. Wie gezeigt wurde, hängt die Aktivität von AChE bereits stark alleine von der verfügbaren Membranfläche ab. Diese Erkenntnis legt nahe, die Rolle heterogener Zellmembranen mit der Koexistenz von Phasen unterschiedlicher Ordnung und Zusammensetzung und deren Einfluss auf die Aktivität von Enzymen weiter zu erörtern, insbesondere im Hinblick auf Übergänge zwischen Ordnung und Unordnung in biologischen Membranen [78] oder der Signalausbreitung an biologischen Grenzflächen [79].

Neben der aktiven Beeinflussung von weichen Grenzflächen oder Zellen wird die akustische Oberflächenwelle im nächsten Kapitel zur Detektion der Aktivität von Zellen eingesetzt. Dies ist mit niedrigen Amplituden der Oberflächenwelle möglich, wodurch das Verhalten der Zellen nicht beeinflusst wird.

3 Verfolgung lebender Zellen

Akustische Detektion migrierender Zellen bei *in vitro* Wundheilungsexperimenten

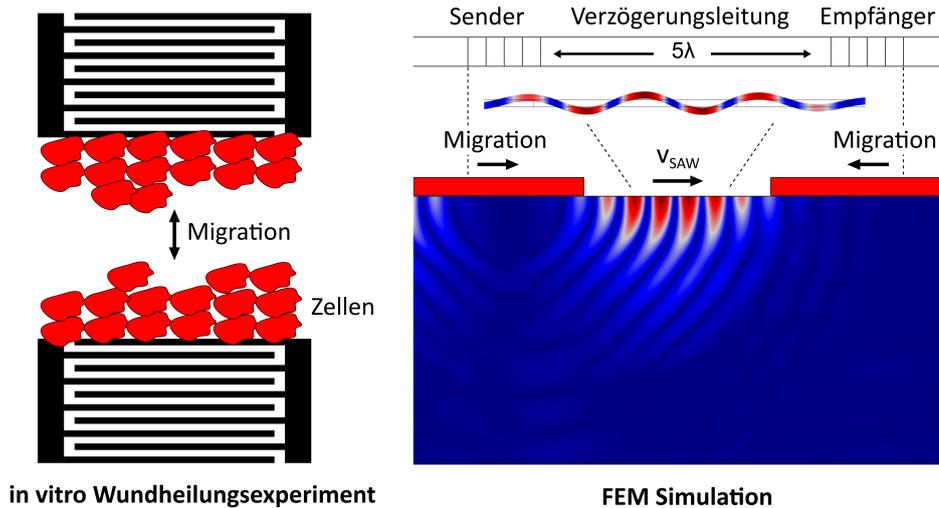


Abb. 3.1: Grundprinzip der akustischen Detektion von Zellen: Bei einem Wundheilungsexperiment schließen Zellen durch Migration eine künstlich eingefügte Wunde auf der Oberfläche einer Verzögerungsleitung. Der Einfluss einer Zellschicht auf das detektierte SAW-Signal wird mit Simulationen untersucht.

In den ersten beiden Kapiteln wird die SAW als aktorisches Werkzeug eingesetzt, darüber hinaus kann diese aber auch zur Sensorik verwendet werden, um beispielsweise Änderungen der Materialeigenschaften einer bedeckenden Schicht zu untersuchen. In dieser Arbeit wird die akustische Detektion von Zellen mit Scherwellen aufbauend auf Experimenten, mittels FEM Simulationen untersucht. Das Experiment beruht dabei auf einem *in vitro* Wundheilungsexperiment, bei dem Zellen durch Migration auf einem Substrat eine künstlich eingefügte Wunde - dargestellt durch einen initial zellfreien Bereich - schließen (siehe *Abb. 3.1*). Erkenntnisse aus solchen Experimenten sind z. B. relevant für die Materialforschung für Implantate oder den Einfluss chemischer Substanzen auf das Migrationsverhalten. In den Experimenten wurde festgestellt, dass das gemessene Phasensignal der SAW zunimmt, wenn die Wunde geschlossen wird. Dies ist gleichbedeutend mit einer Zunahme der SAW-Geschwindigkeit. Anhand von Eigen-

frequenzstudien, als auch zeitabhängigen Simulationen konnte gezeigt werden, dass die elektrischen Eigenschaften der adhären Zellschicht für die Zunahme des gemessenen Phasensignals verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine Abhängigkeit des Signals vom Abstand der Zellschicht zur Substratoberfläche festgestellt, der die Abnahme des Signals nach vollständigem Wundschluss zugeschrieben wird.

Schlagwörter: Sensorik, SAW, Scherwellen, *in vitro* Wundheilungsexperiment, Zellen, FEM Simulation

Ein Teil der Ergebnisse dieses Kapitels wurde bereits in der Fachzeitschrift *Biosensors and Bioelectronics* veröffentlicht. Der Beitrag des Autors dieser Arbeit in der Veröffentlichung sind die Simulationen:

M.S. Brugger, L.G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth and C. Westerhausen, „Shear-horizontal surface acoustic wave sensor for non-invasive monitoring of dynamic cell spreading and attachment in wound healing assays,“ *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 173, 2021. [80] ¹

Das experimentelle Setup auf dem die Simulationen basieren, stammt von Manuel Brugger. Zum besseren Verständnis wird kurz auf die wichtigsten Aspekte dieser Experimente, die für diese Arbeit relevant sind eingegangen. Eine ausführliche Beschreibung des Versuchsaufbaus und den damit erzielten Ergebnissen finden sich in der Doktorarbeit von Manuel Brugger [33].

3.1 Einleitung

Zelladhäsion und Zellmigration spielen eine wichtige Rolle in der Biotechnologie. Erkenntnisse auf diesem Themengebiet können dazu beitragen die Entwicklung von Biomaterialien, künstlichem Gewebe, Zellkulturen und von Medikamenten voranzutreiben. In multizellulären Organismen stehen Zellen im Kontakt zu benachbarten Zellen der extrazellulären Matrix (EZM). Hierbei finden verschiedene zelluläre Prozesse statt. Wichtig ist, dass diese Prozesse möglichst störungsfrei vermessen werden können

¹Internet-Adresse zur Veröffentlichung:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566320307946>

[81]. Hier kommt die Sensorik ins Spiel. In der Literatur lassen sich im Wesentlichen drei Messprinzipien finden. Diese basieren auf optischen, elektrischen oder akustischen Sensoren [81–84]. Akustische Sensoren verwenden entweder akustische Volumenwellen (engl. Bulk Acoustic Wave - BAW) oder akustische Oberflächenwellen (engl. Surface Acoustic Wave – SAW). Eine prominente Methode, die hier zu nennen ist, basiert auf der Quarzkristall-Mikrowaage (engl. Quartz Crystal Microbalance – QCM). Mit Hilfe eines dünnen Schwingquarzes können hier geringe Änderungen der Massenbelegung und Viskosität detektiert werden. Hierbei wird eine Änderung der Resonanzfrequenz oder Einfügedämpfung beobachtet. QCM sind daher geeignet Adsorptionsvorgänge von biologischen Materialien in Lösung zu detektieren [85–88]. Eine andere Möglichkeit bildet die Verwendung von SAW-Sensoren. Sie bieten den Vorteil, dass sich damit zusätzlich zu mechanischen Eigenschaften auch andere physikalische Parameter, wie z. B. elektrische Eigenschaften detektieren lassen. Die Simulationen in dieser Arbeit basieren auf einem solchen SAW-Sensor.

Sensorik mit akustischen Oberflächenwellen

Zunächst wird hier auf einige Grundprinzipien der Sensorik mit SAW eingegangen. Bei der SAW-Sensorik wird ausgenutzt, dass sich Änderungen in der Nähe der Substratoberfläche auf das Ausbreitungsverhalten der Welle auswirken. Allgemein kann die kontinuierliche Ausbreitung einer Welle entlang der x-Richtung beschrieben werden als [82]:

$$u(x, y, z, t) = u_0(y, z)e^{i\omega t - \gamma x}, \quad (3.1)$$

mit γ dem komplexen Ausbreitungsfaktor, der sowohl die Dämpfung α als auch die Wellenzahl k repräsentiert:

$$\gamma = \alpha + ik = \alpha + i\frac{\omega}{v} \quad (3.2)$$

Bei konstanter Frequenz können die Änderungen von γ und somit der Welle folgendermaßen beschrieben werden:

$$\Delta\gamma = \Delta\alpha - ik_0\frac{\Delta v}{v_0}, \quad (3.3)$$

bzw. in normierter Form [89]:

$$\frac{\Delta\gamma}{k_0} = \frac{\Delta\alpha}{k_0} - i\frac{\Delta v}{v_0}, \quad (3.4)$$

mit k_0 der Wellenzahl und v_0 der Ausbreitungsgeschwindigkeit der ungestörten Welle. Damit lässt sich folgern, dass für die SAW-Sensorik maßgeblich die Dämpfung und die Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle sind. Der komplexe Ausbreitungsfaktor wird u.a. durch Änderung des Massenbelags m , der Dichte ρ , der Viskosität η , dem Schermodul G , der Leitfähigkeit σ , der Permittivität ε und der Temperatur T beeinflusst. Die nachfolgende Gleichung fasst diese Einflüsse für Variationen Δc_i zusammen:

$$\begin{aligned} \frac{\gamma}{k_0} &= \frac{1}{k_0} \sum \frac{\partial\gamma}{\partial c_i} \Delta c_i \\ &= \frac{1}{k_0} \left(\frac{\partial\gamma}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial\gamma}{\partial \rho} \Delta \rho + \frac{\partial\gamma}{\partial \eta} \Delta \eta + \frac{\partial\gamma}{\partial G} \Delta G + \frac{\partial\gamma}{\partial \sigma} \Delta \sigma + \frac{\partial\gamma}{\partial \varepsilon} \Delta \varepsilon + \frac{\partial\gamma}{\partial T} \Delta T \right) \end{aligned} \quad (3.5)$$

Die Änderung des Signals wird also in der Regel durch die Überlagerung verschiedener Effekte bewirkt.

Ein Messprinzip, welches in der Praxis angewendet wird, ist die Messung des Streuparameters S_{21} mit Hilfe eines NWA. Damit wird die Transmission eines Signals gemessen. Für einen SAW-Chip, der aus einem Sender- und einem Empfänger-IDT besteht, lassen sich aus der Amplitude die Dämpfung und aus der Lage des Transmissionsmaximums die Änderung der Geschwindigkeit extrahieren. Die Lage des Transmissionsmaximums im Vergleich zu einem Referenzsignal wird auch als Phasensignal bezeichnet.

Versuchsaufbau und experimentelle Ergebnisse

Der von Manuel Brugger entwickelte Versuchsaufbau, auf dem die Simulationen aufbauen, basiert auf *in vitro* Wundheilungsexperimenten (engl. *Wound Healing Assay*) (siehe Abb. 3.2). Dabei handelt es sich um ein Verfahren, um das Migrationsverhalten adhärenter Zellen zu untersuchen. Adhärente Zellen sind Zellen, die auf einem Substrat anwachsen. In den Experimenten werden HeLa-Zellen verwendet. Die Bezeichnung HeLa leitet sich aus den Anfangsbuchstaben des Namens der Zellspenderin

Henrietta Lacks ab. Es handelt sich hierbei um eine leicht zu kultivierende, robuste, adhärenz- und langzeitstabile permanente Zelllinie [33]. Wird beim Anwachsen der Zellen ein Kultureinsatz (engl. *Culture Inset*) verwendet, kann eine künstliche Wunde erzeugt werden. Wird nach Erreichen der Konfluenz, also nach komplettem Anwachsen der Zellen dieser Kultureinsatz entfernt, kann das Migrationsverhalten der Zellen quantitativ untersucht werden. Nach ca. 14 h hat sich die Wunde komplett geschlossen (siehe Abb. 3.2 A-3). Neben der optischen Detektion, die beispielhaft hier gezeigt ist, konnte Manuel Brugger experimentell zeigen, dass der Wundschluss auch mit Hilfe eines akustischen Sensors detektierbar ist. Wie in Abb. 3.2 A-2 zu sehen ist, besteht dieser aus zwei gegenüberliegenden IDT. In den Simulationen wird nur Konfiguration 2 betrachtet. Hier befindet sich die Wunde zu Beginn der Messung genau zwischen den beiden IDT. Mit diesem Setup lassen sich verschiedene Streuparameter messen. Manuel Brugger konnte zeigen, dass die Phasenverschiebung des Streuparameters S_{21} zeitlich exakt mit der zellfreien Fläche korreliert. Diese nimmt mit der Zeit zu und erreicht ihr Maximum, wenn die Wunde komplett geschlossen ist. Interessanterweise bleibt die Phasenverschiebung nach Wundschluss nicht konstant, sondern nimmt wieder ab [80].

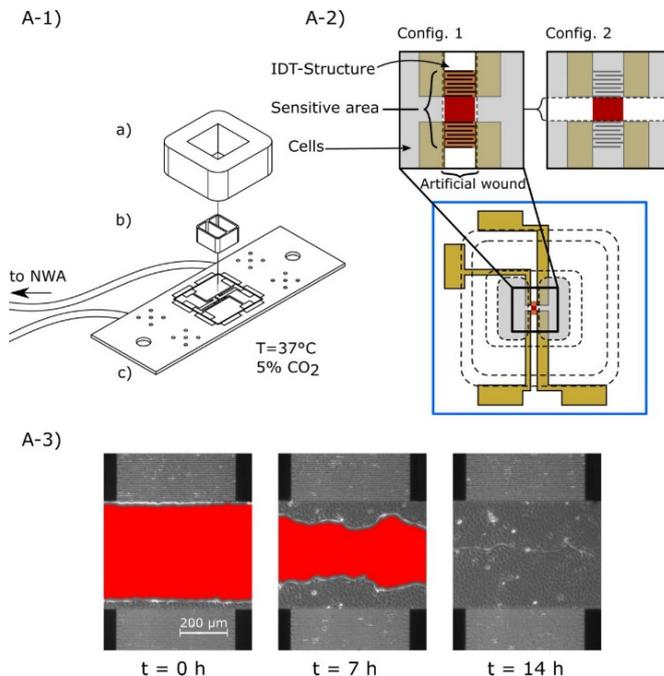


Abb. 3.2: Experimenteller Aufbau eines Wundheilungsexperiments: A-1) Skizze der Hauptkomponenten bestehend aus a) PDMS-Kammer, b) Kultureinsatz und c) Platine mit SAW-Chip. A-2) Draufsicht des SAW-Chips mit vergrößerten Bereichen der Verzögerungsleitung. A-3) Zeitlicher Ablauf des Wundschlusses (rot: zellfreie Fläche). (Abb. entnommen aus [80])

In dieser Arbeit werden daher unter anderem zwei wichtige Fragen mit Hilfe von theoretischen Überlegungen und FEM Simulationen untersucht:

- Wie lässt sich die Zunahme des Phasensignals während *in vitro* Wundheilungsexperimenten erklären?
- Warum nimmt das Phasensignal nach vollständigem Wundschluss wieder ab?

3.2 Simulation akustischer Oberflächenwellen

In *Kapitel 1.2.2* wurde bereits ausführlich auf die theoretische Beschreibung von Oberflächenwellen eingegangen. In diesem Abschnitt soll nun zum einen anhand von FEM Simulationen die Eigenschaften der oben genannten Wellentypen untersucht werden. Zum anderen bilden die Simulationen die Grundlage für die Detektion von Zellen mittels SAW.

3.2.1 Eigenfrequenzstudie

Eigenfrequenzstudien eignen sich, um sowohl die Wellenmode als auch die Resonanzfrequenz eines Kristallschnitts zu identifizieren. Da die Frequenz einer freilaufenden Welle genau der Resonanzfrequenz der Eigenmode entspricht, kann über den einfachen Zusammenhang:

$$v_{\text{SAW}} = \lambda f_0, \quad (3.6)$$

mit λ der Wellenlänge und f_0 der Resonanzfrequenz, die Ausbreitungsgeschwindigkeit v_{SAW} bestimmt werden. Dies kann von Nutzen sein, wenn die SAW als Sensor verwendet wird. Hier wird in der Regel die Phasenverschiebung, die sich aus einer Geschwindigkeitsänderung durch äußere Störung ergibt, gemessen. Mit Hilfe von Eigenfrequenzstudien kann dies, im Vergleich zu zeitabhängigen Studien mit wenig Rechenaufwand simuliert werden. Zusätzlich können die physikalischen Eigenschaften der Eigenmode extrahiert werden. Das Grundprinzip von Eigenfrequenzstudien soll an einem einfachen Beispiel veranschaulicht werden, einem System mit nur einem Freiheitsgrad. Hierzu wird eine an einer Feder befestigte Masse ohne Einwirkung der Schwerkraft betrachtet.

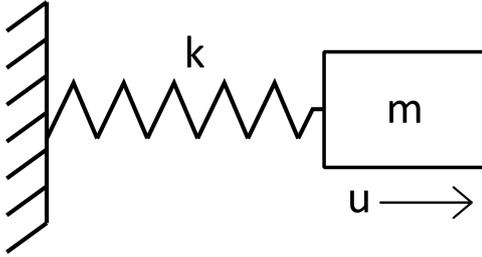


Abb. 3.3: Veranschaulichung von Eigenfrequenzstudien an einem einfachen System mit nur einem Freiheitsgrad. Eine einseitig befestigte Feder verbunden mit einer Masse bildet ein einfaches schwingfähiges System. Die Eigenfrequenz lässt sich einfach bestimmen.

Für dieses Problem lässt sich die folgende Bewegungsgleichung nach dem zweiten Newton'schen Gesetz aufstellen:

$$m\ddot{u} + ku = 0, \quad (3.7)$$

mit m der Masse, u der Auslenkung und k der Federkonstanten. Durch einfache Rechnung lässt sich zeigen, dass folgender Ansatz:

$$u = A \sin(\omega_0 t) + B \cos(\omega_0 t) \quad (3.8)$$

eine Lösung darstellt, wenn $\omega_0 = \sqrt{k/m}$ ist. ω_0 ist die Eigenkreisfrequenz, die über $\omega_0 = 2\pi f_0$ mit der Eigenfrequenz f_0 verknüpft ist. Das Ergebnis lässt sich so interpretieren, dass dieses System nach äußerer Anregung unendlich lange eine harmonische Schwingung mit seiner Eigenfrequenz vollführt. Aus der Lösung dieses einfachen Beispiels lässt sich bereits ein Grundprinzip, wie sich Masse und Steifigkeit auf die Eigenfrequenz auswirken, ableiten:

$$f_0 \propto \sqrt{\text{Steifigkeit/Trägheit}}. \quad (3.9)$$

Höhere Steifigkeit bewirkt eine höhere Eigenfrequenz, wohingegen eine größere Masse eine größere Trägheit und somit eine niedrigere Eigenfrequenz bewirkt. Dieses System lässt sich nun beliebig erweitern, indem z. B. weitere über Federn gekoppelte Massen eingefügt werden. Dadurch erhöht sich die Anzahl der Freiheitsgrade und somit die Komplexität des Problems. Für reale Systeme kann die Anzahl der Freiheitsgrade schnell sehr große Werte annehmen. Eine analytische Lösung lässt sich dafür meist nicht so leicht finden. Hier kommt die FEM Simulation ins Spiel. Für den hier betrachteten Fall der SAW ergibt sich das Eigenwertproblem, das gelöst werden muss folgendermaßen:

$$-\rho\omega^2\mathbf{u} - \nabla\sigma = 0, -i\omega = \lambda \quad (3.10)$$

mit ρ der Dichte, ω der Eigenkreisfrequenz, u der Verformung, σ dem Spannungstensor und λ dem Eigenwert. Wobei der Spannungstensor σ wiederum über den piezoelektrischen Tensor mit der dielektrischen Verschiebung verknüpft ist (siehe Gl. 1.12 und Gl. 1.13). Hat man das Eigenwertproblem gelöst, kann die Eigenfrequenz f aus dem Zusammenhang

$$f = \left| \frac{\text{Im}(i\omega)}{2\pi} \right| \quad (3.11)$$

berechnet werden. Als Ansatz zur Lösung des Eigenwertproblems werden, ähnlich wie im oben aufgeführten Beispiel, harmonische Auslenkungen angenommen.

Eigenfrequenzstudie LiNbO₃

Um nun die Resonanzfrequenz und die dazugehörige Oberflächenwellenmode eines Kristallschnitts in COMSOL Multiphysics zu simulieren, kann folgendermaßen vorgegangen werden. Als Modellgeometrie wird eine Einheitszelle betrachtet, deren Breite genau einer Wellenlänge λ entspricht. Um Oberflächenwellen zu erhalten sollte die Höhe der Geometrie hingegen einige Wellenlängen und die Tiefe deutlich kleiner als eine Wellenlänge sein. Als geeignete Werte konnte eine Höhe $h = 4\lambda$ und eine Tiefe $d = \lambda/4$ identifiziert werden. Die gegenüberliegenden Seiten der Geometrie werden mit einer periodischen Randbedingung belegt. Die Unterseite des Substrats wird als fest gewählt. Die Materialparameter werden aus Kovacs *et al.* [90] übernommen und finden sich im Anhang A.3. Um die richtige Orientierung des Kristalls zu erhalten, wird ein rotiertes Koordinatensystem gewählt. Für den LiNbO₃ 128° Y-Schnitt betragen die Euler-Winkel (0, 38, 0) und für den LiTaO₃ 36° Y-Schnitt (0, -54, 0) [29].

Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis einer Eigenfrequenzstudie für den LiNbO₃ 128° Y-Schnitt. Die Auslenkung entlang der x-Richtung an der Substratoberfläche ist in Abb. 3.4 a aufgetragen. Die größte Auslenkung ergibt sich in z-Richtung, knapp gefolgt von der Auslenkung in x-Richtung. Die Eigenmode hat somit sowohl longitudinale als auch transversale Anteile. Dies ist typisch für die Rayleighwelle, die für diesen Kristallschnitt dominierend ist. In y-Richtung ist nur eine geringe Auslenkung zu beobachten. x- und z-Auslenkung sind um eine Viertel Wellenlänge zueinander phasenverschoben.

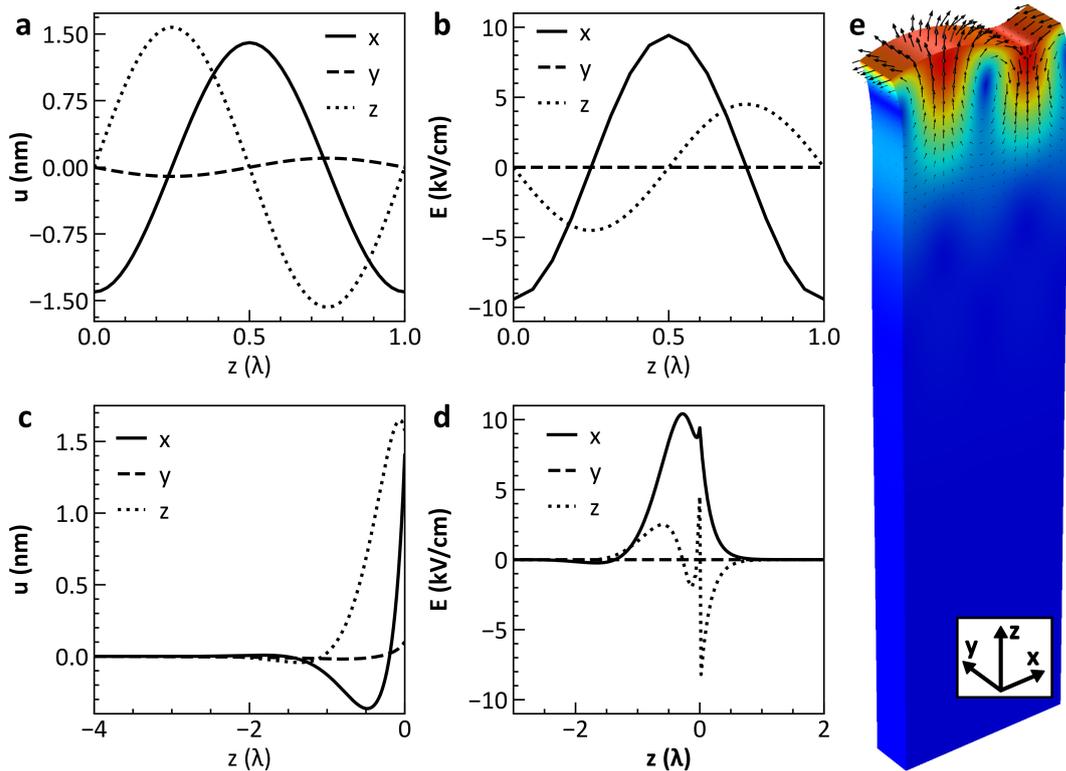


Abb. 3.4: Simulation der Eigenmode für den LiNbO₃ 128° Y-Schnitt mittels einer Eigenfrequenzstudie. a) und b) Auslenkung u und elektrisches Feld E an der Oberfläche des Substrats in x -Richtung (Ausbreitungsrichtung). c) und d) Maximum der Auslenkung u und des elektrischen Feldes E entlang der z -Achse. e) Farbkodierte Darstellung der Auslenkung des Substrats für die Einheitszelle (blau < grün < rot).

Abb. 3.4 b zeigt das elektrische Feld ebenfalls an der Oberfläche des Substrates entlang der x -Richtung. Hier zeigt nun die x -Komponente die größte Auslenkung, gefolgt von der z -Komponente. Die y -Komponente ist vernachlässigbar gering. Die x -Komponente des elektrischen Feldes ist in Phase mit der Auslenkung. Die z -Komponente verläuft hingegen genau gegenphasig zur Auslenkung. In Abb. 3.4 c und d wird die Auslenkung u und das elektrische Feld E entlang der z -Richtung dargestellt, wobei jeweils die Maxima der jeweiligen Komponente zu sehen sind. Für $z < 0$ befindet man sich innerhalb des Kristalls, für $z > 0$ außerhalb (Luft). $z = 0$ repräsentiert die Oberkante des Kristalls. An der Oberfläche zeigen alle Komponenten die größte Auslenkung. In das Substratinnere fallen alle Komponenten dann schnell auf null ab. Die Eindringtiefe entspricht in etwa einer Wellenlänge. Oberhalb von $z = 0$ können logischerweise keine Auslenkungen beobachtet werden. Das elektrische Feld zeigt einen etwas anderen Verlauf. An der

Luft-Festkörper-Grenzfläche kommt es zu einem Sprung, da sich hier die elektrischen Eigenschaften schlagartig ändern. Entfernt man sich von der Oberfläche des Substrats, fallen die E-Felder in beide Richtungen auf null ab. *Abb. 3.4 e* zeigt die farbkodierte Auslenkung der Einheitszelle (blau < grün < rot). Als Eigenfrequenz erhält man in der Simulation $f_0 = 79.582$ MHz. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieser Wellenmode berechnet sich dann zu $v_{\text{SAW}} = 3979.1$ m/s. Dies stimmt sehr gut mit experimentell bestimmten Werten überein ($v_{\text{SAW}} = 3978.2$ m/s [90]). Das Ergebnis zeigt, dass die Simulation realistische Ergebnisse liefert und damit für weitere Untersuchungen geeignet erscheint.

Eigenfrequenzstudie LiTaO_3

Abb. 3.5 zeigt das Ergebnis einer Eigenfrequenzstudie für den LiTaO_3 36° Y-Schnitt. Die Auslenkung entlang der x-Richtung an der Substratoberfläche ist in *Abb. 3.5 a* aufgetragen. Die größte Auslenkung ergibt sich in y-Richtung. In x- und z-Richtung sind nur geringe Auslenkungen zu beobachten. Die dominierende Eigenmode ist hier eine Scherwelle, was typisch für diesen Kristallschnitt ist. *Abb. 3.5 b* zeigt das elektrische Feld ebenfalls an der Oberfläche des Substrates entlang der x-Richtung. Hier zeigt nun die x-Komponente die größte Auslenkung. Die y- und z-Komponente sind vernachlässigbar gering. In *Abb. 3.5 c* und *d* wird die Auslenkung u und das elektrische Feld E entlang der z-Richtung dargestellt, wobei jeweils die Maxima der jeweiligen Komponente zu sehen sind. An der Oberfläche zeigt die y-Komponente die größte Auslenkung und fällt dann in das Substratinnere ab. Die x- und z-Komponente zeigen hingegen an der Oberfläche fast keine Auslenkung. In das Substratinnere sind hingegen harmonische Auslenkungen zu beobachten. Oberhalb von $z = 0$ können logischerweise keine Auslenkungen beobachtet werden. Das elektrische Feld zeigt einen etwas anderen Verlauf. An der Substratoberfläche haben die x- und z-Komponente ein Maximum. In positiver z-Richtung, also an Luft, fallen beide dann sehr schnell auf null ab. In negativer z-Richtung fällt die x-Komponente langsam ab. Die z-Komponente hingegen wechselt das Vorzeichen und steigt dann sogar ganz leicht an. *Abb. 3.5 e* zeigt die farbkodierte Auslenkung der Einheitszelle (blau < grün < rot). Als Eigenfrequenz erhält man in der Simulation $f_0 = 84.584$ MHz. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieser Wellenmode berechnet sich dann zu $v_{\text{SAW}} = 4229.2$ m/s. Dies stimmt sehr gut mit experimentell bestimmten Werten überein ($v_{\text{SAW}} = 4212$ m/s [29]).

Auch hier zeigt das Ergebnis wie im Fall für LiNbO_3 , dass die Simulation realistische Ergebnisse liefert und damit für weitere Untersuchungen geeignet erscheint.

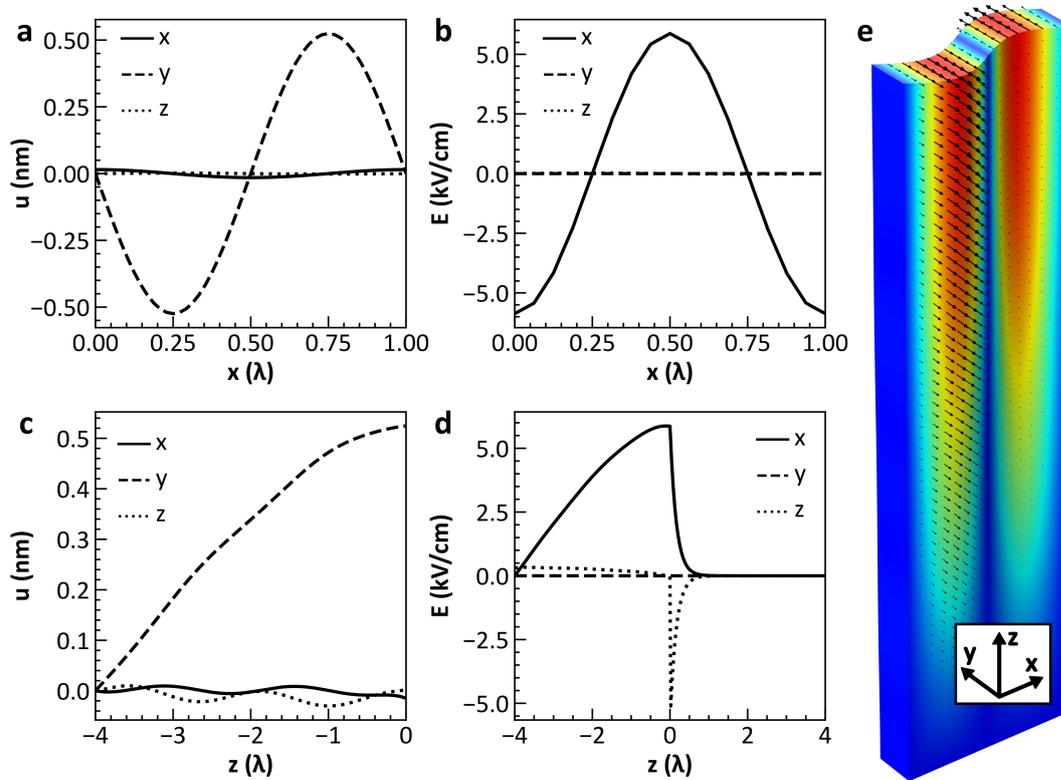


Abb. 3.5: Simulation der Eigenmode für den LiTaO_3 36° Y-Schnitt mittels einer Eigenfrequenzstudie. a) und b) Auslenkung u und elektrisches Feld E an der Oberfläche des Substrats in x -Richtung (Ausbreitungsrichtung). c) und d) Maximum der Auslenkung u und des elektrischen Felds E entlang der z -Achse. e) Farbkodierte Darstellung der Auslenkung des Substrats für die Einheitszelle (blau < grün < rot).

3.2.2 Zeitabhängige Simulation

Neben Eigenfrequenzstudien werden auch zeitabhängige Studien durchgeführt. Bei einer zeitabhängigen Studie wird eine quasi-statische Näherung gemacht. Das heißt, für jeden Zeitschritt wird eine stationäre Lösung bestimmt und als neue Ausgangssituation verwendet. Dies ist zulässig, wenn die Zeitschritte klein genug gewählt werden. Im Vergleich zu den Eigenfrequenzstudien wird eine veränderte Geometrie verwendet. Das Substrat hat nun eine Breite von fünf Wellenlängen. Höhe und Tiefe des Substrats entsprechen den Werten der Eigenfrequenzstudie (Höhe = 4λ , Tiefe = $\lambda/4$). Auf dem Substrat werden drei Elektroden aufgebracht. Die Elektroden haben eine Breite und einen Abstand zueinander von $\lambda/4$ (siehe *Anhang A.3*). An die äußeren beiden Elektroden wird eine sinusförmige Wechselspannung angelegt:

$$U = U_0 \sin(2\pi f_0 t), \quad (3.12)$$

mit $U_0 = 1 \text{ V}$ und $f_0 = 84.584 \text{ MHz}$. Die mittlere Elektrode ist geerdet. Ein wichtiger Aspekt, der bei der transienten Simulation von Wellenphänomenen berücksichtigt werden muss, ist die Courant-Friedrichs-Lewy-Zahl (CFL-Zahl). Die CFL-Zahl wurde 1928 von den Mathematikern Richard Courant, Kurt Friedrichs und Hans Lewy definiert [91]:

$$c = \frac{u\Delta t}{\Delta x}, \quad (3.13)$$

mit u der Ausbreitungsgeschwindigkeit, Δt dem diskreten Zeitschritt und Δx dem diskreten Ortsschritt. Die Courant-Bedingung ist erfüllt, wenn $c < 1$ ist. Nur dann ist das verwendete numerische Verfahren stabil. Anschaulich sagt die Courant-Zahl aus, dass während eines Zeitschritts die Ausbreitung nicht größer als ein Ortsschritt sein darf. In der Simulation wird ein Gitterabstand von $\Delta x = 6.25 \mu\text{m}$ verwendet. Als Zeitschritt wird ein Wert von $\Delta t = 1 \text{ ns}$ verwendet. Damit ist die Courant-Bedingung erfüllt.

Abb. 3.6 zeigt das Ergebnis einer zeitabhängigen Simulation für den LiNbO_3 128° Y-Schnitt zum Zeitpunkt 100 ns . *Abb. 3.6 a* zeigt die totale Auslenkung, *b*, *c* und *d* jeweils die x-, y-, und z-Komponente. Zur besseren Visualisierung wird die Skalierung der Farbcodes unterschiedlich gewählt. Zu erkennen ist eine nach rechts laufende Welle, die sehr stark an die Oberfläche gebunden ist. Die maximale Auslenkung an der Oberfläche ist für die x- und z-Komponente vergleichbar groß. Allerdings hat die z-

Komponente eine größere Eindringtiefe. Die maximale Auslenkung der y-Komponente ist im Vergleich dazu gering. Die Oberflächenwelle zeigt also die typischen Eigenschaften einer Rayleighwelle. Sie hat sowohl longitudinale als auch transversale Anteile. Für die y-Komponente ist ein großer Volumenanteil zu beobachten. Im Vergleich zu den Amplituden der x- und z-Komponente ist die Amplitude aber gering.

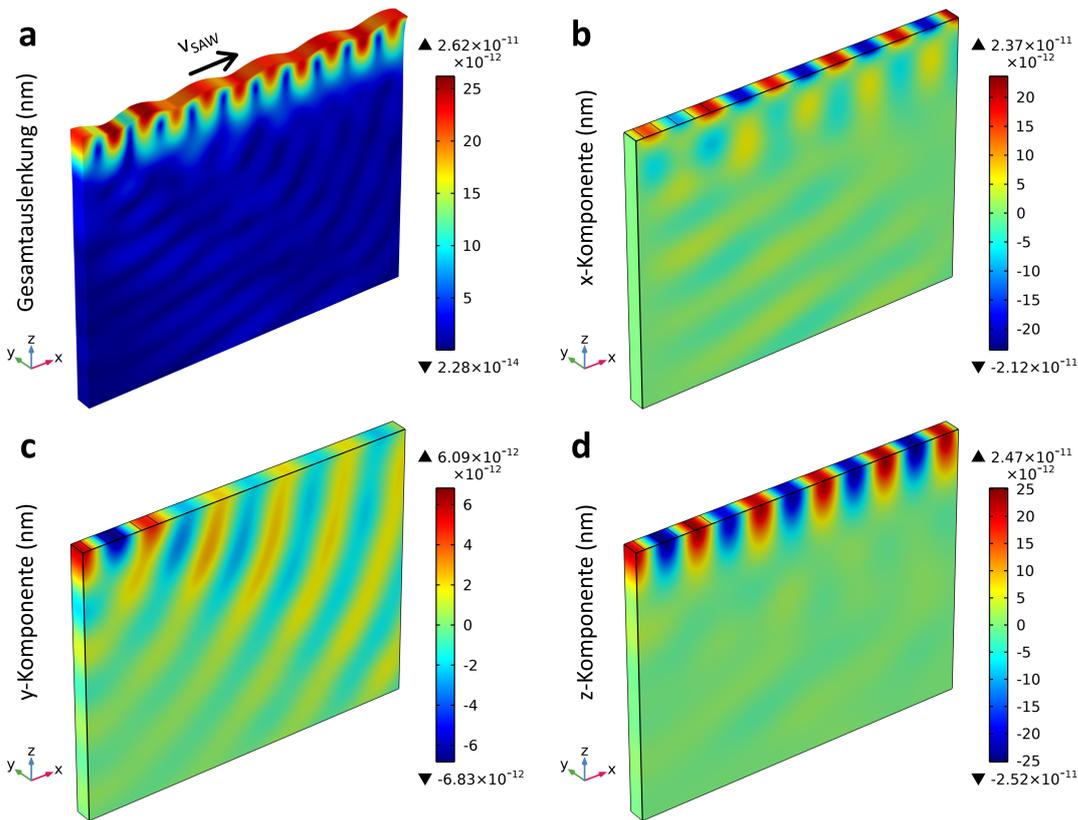


Abb. 3.6: Simulation einer akustischen Oberflächenwelle für den LiNbO_3 128° Y-Schnitt mittels einer zeitabhängigen Studie. a) Gesamtauslenkung des Substrats nach 100 ns. b), c) und d) x-, y- und z-Komponente der Auslenkung ebenfalls zum Zeitpunkt 100 ns. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Farbcodes.

Abb. 3.7 zeigt das Ergebnis einer zeitabhängigen Simulation für den LiTaO_3 36° Y-Schnitt zum Zeitpunkt 100 ns. Abb. 3.7 a zeigt die totale Auslenkung, b, c und d jeweils die x-, y-, und z-Komponente. Zur besseren Visualisierung wird wiederum die Skalierung der Farbcodes unterschiedlich gewählt. Zu erkennen ist auch hier eine nach rechts laufende Welle mit einer dominierenden y-Komponente an der Oberfläche. Es zeigt sich also der erwartete Schercharakter der Oberflächenwellen. Deutlich wird auch, dass

an die Oberflächenwelle eine Volumenwelle gekoppelt ist, die etwa im 45° Winkel zur Substratoberfläche verläuft. Dies ist vor allem in der x- und z-Komponente zu sehen.

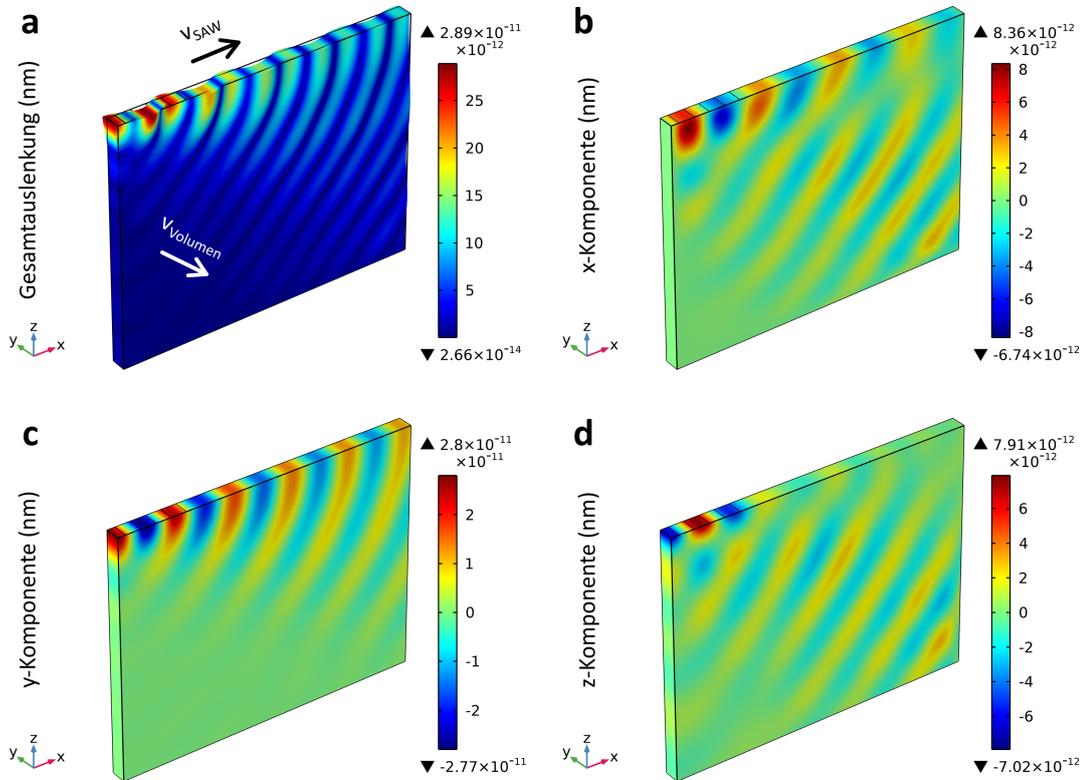


Abb. 3.7: Simulation einer akustischen Oberflächenwelle für den LiTaO_3 36° Y-Schnitt mittels einer zeitabhängigen Studie. a) Gesamtauslenkung des Substrats nach 100 ns. b), c) und d) x-, y- und z-Komponente der Auslenkung ebenfalls zum Zeitpunkt 100 ns. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Farbcodes.

3.3 Simulation von *in vitro* Wundheilungsexperimenten

Im vorigen Abschnitt wurde ausführlich auf die Simulation von SAW eingegangen. Hier soll mit Hilfe von solchen Simulationen nun die Detektion des Ausbreitungsverhaltens von Zellen bei *in vitro* Wundheilungsexperimenten modelliert werden.

3.3.1 Einfluss einer Zellschicht

Um den Effekt von Zellausbreitung und Adhäsion auf die Ausbreitung von SAW zu identifizieren, wird eine Eigenfrequenzstudie sowie eine zeitabhängige Studie mit einem vereinfachten 3D-Modell des in den Experimenten verwendeten akustischen Sensors durchgeführt. Frühere Studien berichteten, dass SAW-Sensoren sowohl auf elektrische als auch auf mechanische Veränderungen empfindlich reagieren, was zu einer Änderung der Phasengeschwindigkeit führt. Kondoh *et al.* wiesen experimentell und theoretisch nach, dass unter dem Einfluss einer Flüssigkeit, die den Chip bedeckt, Änderungen der Dichte ρ und der Viskosität η zu einer Änderung der Geschwindigkeit führen [92]:

$$\frac{\Delta v}{v} \propto -\Delta(\sqrt{\rho\eta}). \quad (3.14)$$

Das Produkt $\sqrt{\rho\eta}$ für die nährstoff- und zellunbedeckte Oberfläche kann mit

$$\sqrt{\rho_l\eta_l} \approx 0.1 \left[\left(\frac{\text{g}^2}{\text{cm}^4\text{s}} \right)^{0.5} \right], \quad (3.15)$$

mit ρ_l der Dichte und η_l der Viskosität von Wasser angenähert werden. Janshoff und Kollegen haben das Produkt $\sqrt{\rho_c\eta_c}$ für MDCK-II-Zellen gemessen [88]:

$$\sqrt{\rho_c\eta_c} \approx 0.386 \left[\left(\frac{\text{g}^2}{\text{cm}^4\text{s}} \right)^{0.5} \right] \quad (3.16)$$

Unter der Annahme, dass sich die Zellschicht wie eine viskose Flüssigkeit verhält, würde eine Zunahme von $\sqrt{\rho\eta}$ zu einer Abnahme der relativen Geschwindigkeitsänderung führen. Die geringen Änderungen in $\sqrt{\rho\eta}$ und der gegenläufige Trend zu den experimentellen Beobachtungen (Phasenverschiebung nimmt zu und daher auch die Geschwindigkeit) schließen Änderungen der mechanischen Eigenschaften als dominierende Ursache für die beobachtete Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$ praktisch aus. In der Simulation wird sich daher auf die elektrischen Eigenschaften der bedeckenden Schicht konzentriert, um das Verhalten von $\Delta\Phi_{21}$ zu erklären. Dieser Ansatz erscheint sinnvoll, da der elektromechanische Kopplungskoeffizient

$$K_s^2 = 2\Delta v/v_0 \quad (3.17)$$

für LiTaO_3 36° YX groß ist. Daher sollten Änderungen der elektrischen Eigenschaf-

ten der bedeckenden Schicht einflussreich sein. Die relative Geschwindigkeitsänderung $\Delta v/v$ entspricht der Frequenzänderung $\Delta f/f$ und kann somit aus der Eigenfrequenzstudie extrahiert werden. Weiterhin ist die Phasenverschiebung abhängig von der Störungslänge, die sich aufteilen lässt in l_1 für die Ausbreitung im unbedeckten und l_c im von Zellen bedeckten Bereich (siehe *Anhang Abb. A.7*). Für die vollständig geschlossene Wunde ist l_d gleich der Länge der Verzögerungsleitung. Unter der Annahme, dass die Gesamtphasenverschiebung für die vollständig geschlossene Wunde proportional zur relativen Geschwindigkeitsänderung und dem Verhältnis der Länge der Verzögerungsleitung zur Wellenlänge λ ist, kann folgender Zusammenhang verwendet werden:

$$\Delta\Phi_{21} = \frac{\Delta v}{v} \cdot \frac{l_d \cdot 360^\circ}{\lambda}. \quad (3.18)$$

Einfluss der elektrischen Eigenschaften der Zellschicht

In einem ersten Schritt wird ein einfaches Modell mit nur einem überlagernden Material, das die Oberfläche bedeckt, betrachtet. Dadurch kann ein erster qualitativer Einblick erhalten werden, wie die elektrischen Eigenschaften eines überlagernden Materials die relative Geschwindigkeitsänderung und damit das Sensorsignal beeinflussen. Die Simulationsergebnisse dieses vereinfachten Modells können darüber hinaus durch den Vergleich mit theoretischen Modellen leicht verifiziert werden. Daher wird die relative Geschwindigkeitsänderung aus der Simulation mit der zuerst von Auld *et al.* [93] eingeführten Störungstheorie verglichen. Die relative Geschwindigkeitsänderung in Abhängigkeit von der relativen Permittivität und der Leitfähigkeit des bedeckenden Materials aufgrund der akustoelektrischen Wechselwirkung kann nach Kondoh *et al.* wie folgt berechnet werden [92, 94]:

$$\frac{\Delta v}{v} = \frac{K_s^2 (\sigma'/\omega)^2 + \epsilon_0 (\epsilon_r' - \epsilon_r) (\epsilon_r' \epsilon_0 + \epsilon_p^T)}{2 (\sigma'/\omega)^2 + (\epsilon_r' \epsilon_0 + \epsilon_p^T)^2}. \quad (3.19)$$

Hierbei ist K_s^2 der Kopplungskoeffizient, σ' die Leitfähigkeit der Probenflüssigkeit, ϵ_0 die Vakuumpermittivität, ϵ_r' die Permittivität der Probenflüssigkeit, ϵ_r die Permittivität von Wasser, ϵ_p^T die effektive Permittivität des piezoelektrischen Kristalls und ω die Resonanzfrequenz.

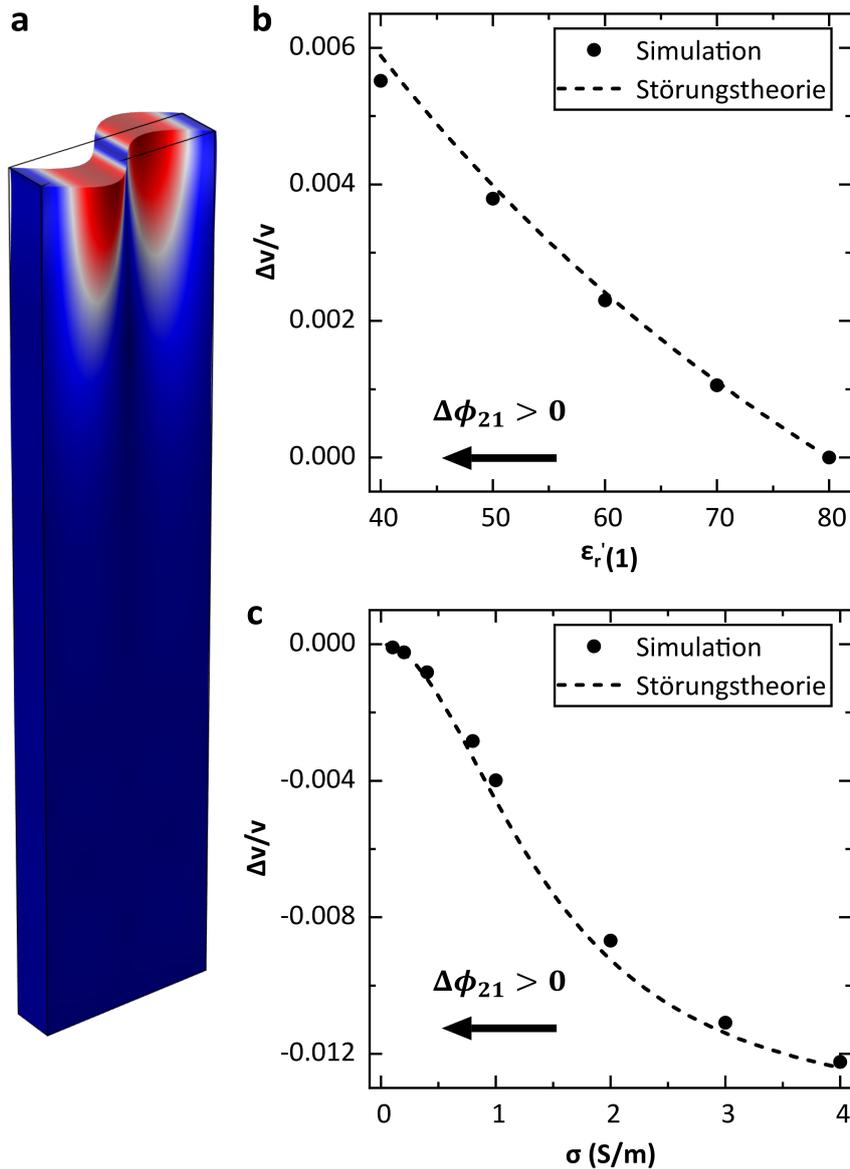


Abb. 3.8: Vergleich der FEM Simulation mit der Störungstheorie von Kondoh *et al.* [92]. a) Typisches Ergebnis der Eigenfrequenzstudie. Der Farbcode zeigt den Betrag der Auslenkung der Oberfläche (blau < rot). Die Eigenmode zeigt deutlich den erwarteten Schercharakter der Welle. Aus den Eigenfrequenzstudien wird die relative Geschwindigkeitsänderung in Abhängigkeit von (b) der relativen Permittivität ϵ_r' und (c) der Leitfähigkeit σ der bedeckenden Substanz (nicht gezeigt) ermittelt. Die Punkte zeigen die Ergebnisse aus der Simulation und die gestrichelte Linie die Ergebnisse der Störungstheorie. (Abb. entnommen aus [80])

Abb. 3.8 a zeigt beispielhaft ein Ergebnis aus der Eigenfrequenzstudie. Der Farbcode zeigt den Betrag der Auslenkung der Oberfläche an (blau < rot). Die Eigenmode zeigt

deutlich den erwarteten Schercharakter der Welle. Aus der Eigenfrequenzstudie kann die relative Geschwindigkeitsänderung ermittelt werden. *Abb. 3.8 b* und *c* zeigen das Ergebnis aus der Simulation (Punkte) und der Theorie (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der relativen Permittivität ϵ_r und Leitfähigkeit σ des bedeckenden Materials. Sowohl bei steigender Permittivität als auch bei steigender Leitfähigkeit nimmt die relative Geschwindigkeitsänderung ab. Die simulierten Daten stimmen sehr gut mit der Theorie überein. Im Experiment sieht man eine Zunahme von $\Delta\Phi_{21}$, während die Wunde in der Zellschicht geschlossen wird. Somit lässt sich mit Hilfe der Ergebnisse der Simulation und der Theorie folgern, dass die Permittivität und Leitfähigkeit der Zellen geringer sein muss als die des Zellkulturmediums. Um die Plausibilität dieser Folgerung zu prüfen, werden zwei theoretische Ansätze zur Bestimmung der Permittivitätswerte verwendet. Nach Li *et al.* [95] kann die Permittivität einer Elektrolytlösung durch Kombination des klassischen Debye- und des Drude-Modells berechnet werden. Für die Zellkulturmedien erhält man so einen Wert von $\epsilon = 80 - 123i$ (ausführliche Herleitung siehe [33]). Für die Beschreibung der Zellen wird das von Pehtig [96] beschriebene Doppelschalenmodell verwendet. Hier erhält man Werte im Bereich von $\epsilon = 50 - 71i$ bis $\epsilon = 55 - 120i$, abhängig vom Volumenanteil der Zelle, der vom Zellkern eingenommen wird (ausführliche Herleitung siehe [33]). Da sowohl der Realteil als auch der Imaginärteil der berechneten Permittivität der Zellen niedriger ist als der Wert des Zellkulturmediums, kann man schließen, dass die Erhöhung von $\Delta\Phi_{21}$ im Experiment mit den Ergebnissen dieses vereinfachten Modells übereinstimmt.

Im nächsten Schritt wird im Modell auch die Höhe und der Abstand zwischen der Zellschicht und der Sensoroberfläche berücksichtigt (siehe *Anhang Abb. A.5*). Diese Konfiguration ist näher am Experiment. Mit diesem realistischeren Modell soll nun auch das Verhalten von $\Delta\Phi_{21}$ quantitativ beschrieben werden. *Abb. 3.9 a* zeigt die Phasenverschiebung in Abhängigkeit vom Real- und Imaginärteil der Permittivität ϵ_r' und ϵ_r'' . Die Phasenverschiebung ist relativ zum Zellkulturmedium ($\hat{\epsilon}_r = 80 - i123$) berechnet. Ausgehend vom Zellkulturmedium führt eine Abnahme von ϵ_r' und ϵ_r'' immer zu einer Zunahme von $\Delta\Phi_{21}$. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen des Schalenmodells. Die gestrichelte Linie zeigt die theoretischen Werte der Dielektrizitätskonstanten für einen zunehmenden Volumenanteil der Zelle, der vom Zellkern eingenommen wird. *Abb. 3.9 b* zeigt die relative Differenz der in der Simulation erhaltenen Phasenverschiebung zu den Werten des Experiments ($\Delta\Phi \approx 10^\circ$). Ein Minimum von

$\Delta\Phi_{21}$ ergibt sich für $r \approx 0.3$. Die Dielektrizitätskonstante der Zellschicht wird folglich bei einem Wert von $\hat{\epsilon}_r = 52 - i84$ durch die Simulation am besten beschrieben. Hier weist die Phasenverschiebung die geringste Abweichung zum Experiment auf (siehe rote Markierung in Abb. 3.9).

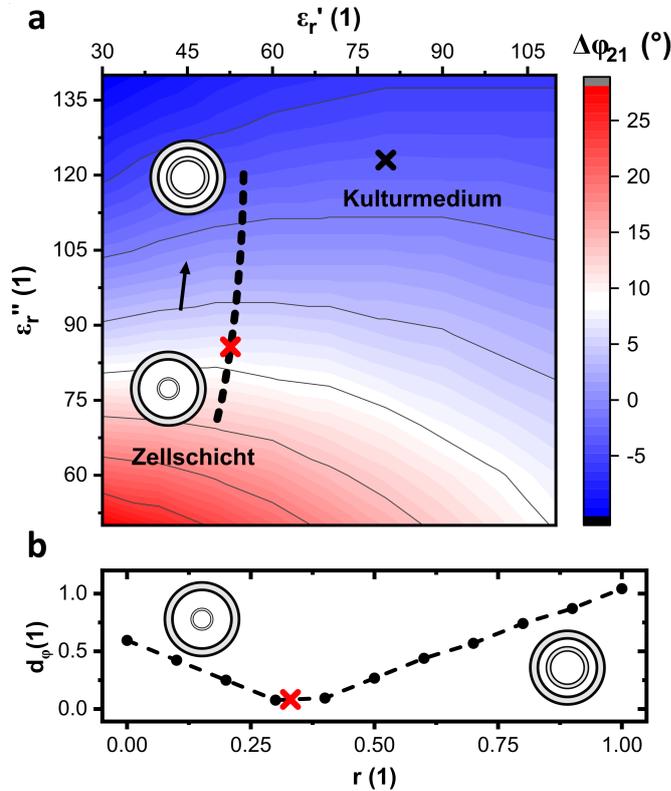


Abb. 3.9: Einfluss der elektrischen Eigenschaften auf die Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$. a) Abhängigkeit der Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$ vom Real- und Imaginärteil der Permittivität. Die Phasenverschiebung ist relativ zum Fall der nur mit Zellkulturmedium bedeckten Verzögerungsleitung berechnet ($\hat{\epsilon}_r = 80 - i123$). Die gestrichelte Linie zeigt die unterschiedlichen Werte der Dielektrizitätskonstante für zunehmenden Volumenanteil r des Zellkerns in der Zelle. b) Relative Differenz d_Φ der Phasenverschiebung von Experiment zur Simulation in Abhängigkeit des Volumenanteils r . Ein Minimum von d_Φ wird für einen Wert von $r \approx 0.3$ beobachtet. (Abb. entnommen aus [80])

Einfluss des Zell-Sensor-Abstands auf die Phasenverschiebung

Nach Erreichen der Konfluenz kann im Experiment eine Abnahme des Phasensignals beobachtet werden. Zur Erklärung dieser Beobachtung lautet eine Hypothese: Der Zell-Substrat-Abstand verändert sich, wenn die Zellen nicht mehr wandern können. Die Zellschichtdicke erhöht sich durch die Zellproliferation, was zu Kuppelbildungen führt. Um diese Hypothese zu belegen, wird in der Simulation auch der Einfluss des Abstands h der Zellschicht von der Substratoberfläche untersucht. Abb. 3.10 zeigt die Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$ für verschiedene Abstände h . Für niedrige Werte von $h < 100$ nm bleibt $\Delta\Phi_{21}$ nahezu konstant. Im Bereich von $100\text{ nm} < h < 10\ \mu\text{m}$ fällt $\Delta\Phi_{21}$ schnell auf Null ab. Für größere Werte von h bleibt $\Delta\Phi_{21}$ auf diesem Niveau. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Sensor oberflächennahe Veränderungen im Bereich bis

zu $h \approx \lambda/2$ detektieren kann. Oberhalb dieses Wertes wird der Sensor nicht mehr signifikant durch Änderungen in der elektrischen Umgebung beeinflusst. Da der Zell-Substrat-Abstand während der Migration typischerweise bei etwa 100 nm liegt, erscheint es zudem plausibel, dass Änderungen von h das Sensorsignal beeinflussen, da der Sensor in diesem Bereich sehr empfindlich ist. Somit ist die Hypothese einer Änderung des Zell-Substrat-Abstandes h nach Erreichen der Konfluenz auch konsistent mit der Beobachtung, dass dieser ab diesem Zeitpunkt im Experiment abnimmt.

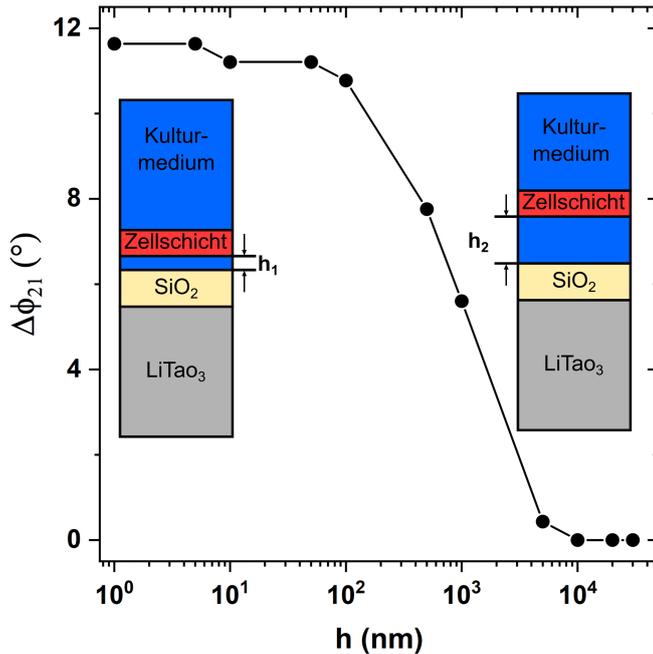


Abb. 3.10: Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$ für verschiedene Abstände h zwischen Zellschicht und Substratoberfläche. Für kleine Werte von h ist $\Delta\Phi_{21}$ nahezu konstant. Im Bereich von $100\text{nm} < h < 10\mu\text{m}$ fällt $\Delta\Phi_{21}$ dann schnell auf 0 ab. In diesem Bereich ist der Sensor somit sensitiv gegenüber Veränderungen von h . (Abb. entnommen aus [80])

3.3.2 Simulation eines Modellsensors

Zusätzlich zur Eigenfrequenzstudie wird auch eine zeitabhängige Studie durchgeführt. Bei den Eigenfrequenzstudien wird lediglich die Eigenfrequenzänderung abhängig von der Bedeckung des Substrats ermittelt, woraus sich dann die Phasenverschiebung berechnen lässt. Im Experiment wird die Phasenverschiebung hingegen anhand einer von einem Sender-IDT zu einem Empfänger-IDT laufenden Welle bestimmt. Mit einer zeitabhängigen Studie lässt sich die Messung des Experiments in vereinfachter Weise nachbilden. Das hier verwendete Modell besteht aus einem Sender-IDT und einem Empfänger-IDT, die durch zwei Fingerelektrodenpaare repräsentiert werden, was die Erzeugung und Detektion von SAW ermöglicht (siehe *Anhang Abb. A.7*). Die Sendeelektroden werden mit einem sinusförmigen Spannungssignal mit einer Amplitude

$U_0 = 1$ V versorgt. Das Signal hat eine Zeitdauer von $t = 14.4$ ns und einer Frequenz von $f = 208$ MHz. Abb. 3.11 a zeigt die Gesamtauslenkung der Oberfläche (xz-Ebene, Farbcode: blau < rot). Es werden zwei Wellen in positiver und negativer x-Richtung erzeugt. Die Draufsicht (xy-Ebene) zeigt wieder deutlich den Quasi-Schercharakter der Welle. Die mechanische Welle führt aufgrund des piezoelektrischen Effekts zu einem Spannungssignal an den Empfängerelektroden (siehe Abb. 3.11 b und c).

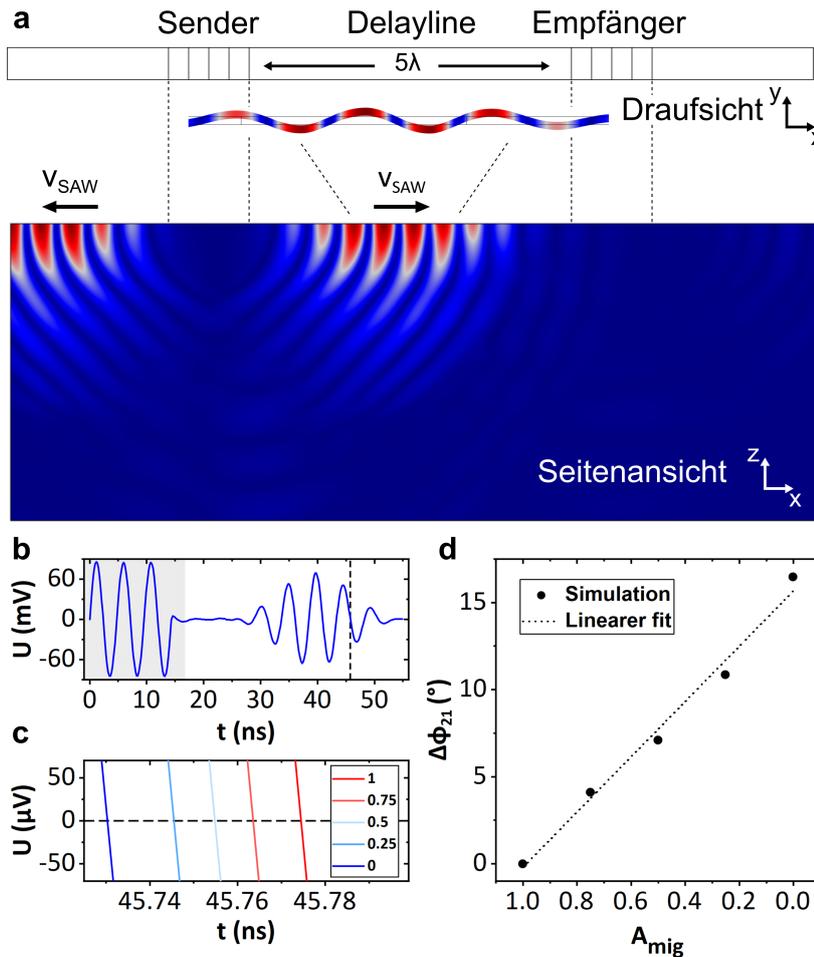


Abb. 3.11: Ergebnisse der zeitabhängigen Simulation. a) Betrag der Auslenkung der Oberfläche (xz-Ebene) des Substrats. Der am Sender erzeugte Impuls läuft von links nach rechts und wird am Empfänger detektiert. Die Draufsicht (xy-Ebene) zeigt deutlich den Quasi-Schercharakter der Welle. b) Detektiertes Spannungssignal U am Empfänger über der Zeit t . c) U für verschiedene Werte der zellfreien Fläche A_{mig} . d) $\Delta\Phi_{21}$ in Abhängigkeit von A_{mig} . Die Phasenverschiebung $\Delta\Phi_{21}$ wird aus dem zeitlichen Abstand der Signale berechnet. Es zeigt sich ein lineares Verhalten ($A_{\text{mig}}(t=0) = 1$). (Abb. entnommen aus [80])

Der grau schattierte Bereich bis $t = 15$ ns ist ein Störsignal, das durch kapazitives Übersprechen zwischen Sender und Empfänger verursacht wird. Da es zeitlich deutlich vom eigentlichen SAW-Signal ($t = 30$ ns bis $t = 50$ ns) getrennt ist, ist es hier irrelevant. Der mit dem Experiment vergleichbare Wert $\Delta\Phi_{21}$ berechnet sich aus dem zeitlichen Abstand der Signale wie folgt:

$$\Delta\Phi_{21} = 5 \cdot \frac{\Delta t}{T} \cdot 360^\circ, \quad (3.20)$$

mit Δt der Zeitdifferenz zwischen den Signalen und T der Periodendauer. Der Vorfaktor 5 berücksichtigt die fünfmal längere Verzögerungsstrecke im Experiment im Vergleich zur Simulation. In *Abb. 3.11 d* wird die Abhängigkeit von der zellfreien Fläche A_{mig} gezeigt. Für eine vollständig bedeckte Oberfläche wird ein Maximalwert von $\Delta\Phi_{21} = 16^\circ$ beobachtet. Die Simulation zeigt darüber hinaus einen linearen Zusammenhang von $\Delta\Phi_{21}$ und A_{mig} . Diese Beobachtung ist ebenfalls konsistent mit den Ergebnissen des Experiments.

3.4 Fazit

In diesem Kapitel stellte sich die Frage wie sich der Verlauf des Sensorsignals während eines *in vitro* Wundheilungsexperiments erklären lässt. Mit Hilfe von theoretischen Überlegungen und FEM Simulationen konnte gezeigt werden, dass die elektrischen Eigenschaften der oberflächenbedeckenden Zellen und des Nährmediums die Phasengeschwindigkeit stark beeinflussen. Eine Eigenfrequenz- sowie eine zeitabhängige Studie mit vereinfachten Modellgeometrien wurde verwendet, um das Verhalten im Experiment zu erklären. Beide Methoden sind in der Lage, die Gesamtphasenverschiebung für eine vollständig geschlossene Wunde vorherzusagen. Allerdings gibt es eine Abweichung von einigen Grad in der Phasenverschiebung zwischen beiden Methoden. Unter Berücksichtigung der Annahmen, die in der Simulation getroffen wurden, insbesondere für die Berechnung der elektrischen Eigenschaften der Zellschicht, liegen beide Methoden jedoch nahe genug an den im Experiment beobachteten Werten. Mit der Eigenfrequenzstudie, die weniger zeitaufwendig ist als die zeitabhängige Studie, ist es somit möglich, die Modelleingabeparameter über einen größeren Bereich zu variieren. Die zeitabhängige Studie ist näher an der Konfiguration im Experiment. Hier konnte das lineare Verhalten während des Wundheilungsprozesses bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Abstandsabhängigkeit zwischen Substrat

und Zellschicht besteht. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz, weshalb nach Wundschluss das gemessene Phasensignal wieder abnimmt. Hier könnte eine Änderung des Zell-Substrat-Abstands verantwortlich sein. Der Verlauf des Sensorsignals im Experiment konnte somit anhand von Simulationen vollständig erklärt werden.

Im menschlichen Körper ist die Ausbreitung von Zellen nicht beschränkt auf die Oberfläche von beispielsweise Knochen. Vielmehr können sich Zellen in Netzwerken, wie durch Kollagen gebildet, ausbreiten. Wie sich die Invasion in solchen weichen Umgebungen verhält und gegebenenfalls sogar steuern lässt, wird im nächsten Kapitel untersucht.

4 Steuerung lebender Zellen

Invasion von Zellaggregaten in mikrofluidisch strukturierten Kollagenetzwerken

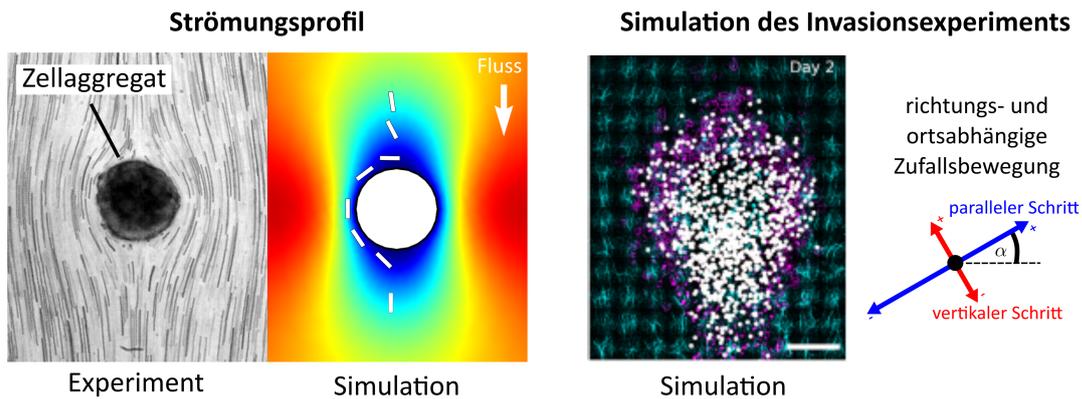


Abb. 4.1: Übersicht über die Invasion von Zellaggregaten in mikrofluidisch strukturierten Kollagenetzen: Zum einen wird das Strömungsprofil vermessen und simuliert. Zum anderen wird die Invasion der Zellen durch eine anisotrope und ortsabhängige 2D-Zufallsbewegung beschrieben und mit entsprechenden Experimenten verglichen.

Bei den im vorigen Kapitel betrachteten *in vitro* Wundheilungsexperimenten wurde die Migration von Zellen auf einem Substrat, also in zwei Dimensionen betrachtet. Dies ist im Körper etwa relevant beim Wachsen von Zellen auf Knochen oder Implantaten. Betrachtet man die Entstehung von Gewebe ist das Wachstum der Zellen aber nicht auf zwei Dimensionen beschränkt. Als Modellsystem für dreidimensionales Wachstum eignen sich künstlich erzeugte Kollagenetzwerke. Unter Fluss können Kollagenfasern zu Kollagenetzwerken polymerisiert werden und lassen sich dabei strukturieren. Hierzu werden Zellaggregate verwendet, die einerseits die Struktur des Kollagenetzwerks beeinflussen und außerdem als Reservoir für die auswandernden Zellen dienen (siehe *Abb. 4.1*). In dieser Arbeit wird sowohl experimentell als auch mit Hilfe von FEM Simulationen gezeigt, dass die dabei beobachtete Asymmetrie der Faserorientierung durch das Strömungsprofil und die daraus resultierende Ausrichtung der Fasern zu erklären ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die anschließende Invasion der Zellen in dieser Matrix von der Faserorientierung abhängt und durch eine anisotrope und ortsabhängige Zufallsbewegung (engl. *Random Walk*) der Zellen beschrieben werden kann.

Schlagwörter: Mikrofluidik, FEM Simulation, Zufallsbewegung, Kollagen, Zellen

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Hanna Engelke vor allem in Zusammenarbeit mit Florian Geiger entstanden. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht [97, 98]:

F. Geiger, L.G. Schnitzler, M.S. Brugger, C. Westerhausen and H. Engelke, „Directed invasion of cancer cell spheroids inside 3D collagen matrices oriented by microfluidic flow in experiment and simulation,“ *Plos one*, vol. 17, no. 3, 2022. [98]¹

Der Beitrag des Autors dieser Arbeit in dieser Veröffentlichung ist die Untersuchung des Strömungsprofils mittels Particle Image Velocimetry (PIV) Messungen und FEM Simulationen, sowie die Simulation der Zellausbreitung mittels eines zweidimensionalen richtungs- und ortsabhängigen Zufallsbewegungs-Algorithmus.

4.1 Einleitung

Die Invasion von Tumor-Sphäroiden wird sowohl durch zelluläre Signalübertragung als auch durch die Eigenschaften der extrazellulären Matrix beeinflusst. Der Start der Invasion kann als Fluidisierung des Sphäroids beschrieben werden, die durch einen Phasenübergang von einem gestauten Zustand zu einem nicht gestautem, flüssigkeitsähnlichen Zustand ausgelöst wird [99]. Nach diesem Übergang und der damit einhergehenden Invasion beginnen oft einzelne Zellen aus dem Kollektiv zu strömen. Dies wurde als Übergang vom flüssigen zum gasförmigen Zustand beschrieben. Die Einzelzellmigration wird dabei stark von Matriceigenschaften wie der Matrixdichte, der Maschengröße sowie der Faserlänge und -dicke beeinflusst [100–105]. Zusätzlich wurde

¹Internet-Adresse zur Veröffentlichung:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0264571>

gezeigt, dass die Ausrichtung und Orientierung der Fasern die Einzelzellmigration beeinflusst, basierend auf der Kontaktführung und den nichtlinearen rheologischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix [106, 107]. Für die Invasion aus einem Zellkollektiv ist ein solcher Einfluss der Faserausrichtung durch theoretische Modellierung vorhergesagt worden [108]. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine kurzreichweitige Ausrichtung die Auswüchse steuert [109]. Darüber hinaus führen radial ausgerichtete Fasern, die aus dem Matrixumbau von Sphäroiden resultieren, zu einer verstärkten Invasion [110, 111] und zu Zellen, die entlang der ausgerichteten Fasern strömen [112]. Somit kann die Faserausrichtung auch ein wichtiger Faktor sein, der die Invasion aus einem Zellkollektiv beeinflusst.

Mit dem von Florian Geiger entwickelten Versuchsaufbau, kann der Einfluss der Orientierung von Fasern auf die Sphäroidinvasion untersucht werden. Während der Kollagenpolymerisation wird durch Scherströmung in einem Mikrofluidikkanal, eine aus Kollagenfasern bestehende Matrix um ein Krebszell-Sphäroide erzeugt. Nach der Polymerisation des Gels wird der externe Fluss gestoppt. Mit der Zeit breiten sich die Sphäroide in das Kollagengel aus. Die beobachtete Invasion zeigt eine klare Richtungsabhängigkeit entlang der radial ausgerichteten Fasern. Basierend auf dem Versuchsaufbau von Florian Geiger werden in dieser Arbeit das Strömungsprofil während der Polymerisation eines Kollagengels experimentell mittels PIV-Messungen, sowie numerisch mittels FEM Simulationen charakterisiert. Weiterhin wird ein numerisches Modell, basierend auf einem Zufallsbewegungs-Algorithmus, das die Invasion von Zellen innerhalb dieses Gels beschreibt, entwickelt. Wichtige Fragestellungen in diesem Kapitel sind:

- Wie lässt sich die mikrofluidische Ausrichtung von Kollagenfasern um ein Zellaggregat erklären?
- Wie kommt die Asymmetrie der Kollagenfasermatrix in der Umgebung eines Zellaggregats zustande?
- Kann die anschließende Ausbreitung der Zellen in diesem Kollagenetzwerk als ein diffusionsartiger Prozess verstanden werden?

4.2 Vermessung und Simulation des Strömungsfeldes

In einem ersten Schritt wird das Strömungsfeld mittels Experimenten und Simulationen untersucht. Anhand der Ergebnisse lässt sich möglicherweise die beobachtete Faserorientierung erklären.

Experimenteller Aufbau und Vermessung des Strömungsfeldes

Zur Erzeugung der strukturierten Kollagengele wird ein mikrofluidisches Setup verwendet. HeLa-Zellaggregate werden zusammen mit einer Kollagen-Mischung mit einer hohen Flussrate (90.2 $\mu\text{l}/\text{min}$) in einen Mikrofluidikkanal² mit einer Höhe von 400 μm und einer Breite von 3.8 mm gesaugt. Sobald sich das Aggregat im Kanal befindet, wird die Flussrate deutlich reduziert (0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Durch Kühlung mit Eis wird dabei eine schnelle Polymerisation des Kollagens verhindert. Gleichzeitig wird dabei das Strömungsfeld vermessen. Die Zusammensetzung der Kollagenmischung findet sich im *Anhang A.4*. Für die Vermessung des Strömungsfeldes wird PIV angewendet. Dabei handelt es sich um ein optisches Verfahren, bei dem in kurzen zeitlichen Abständen Bilder von sich in der Flüssigkeit mitbewegten Teilchen gemacht werden. Aus diesen Bildsequenzen kann dann anhand der Teilchenpositionen die Geschwindigkeit und Richtung ermittelt werden. Die Bewegung der Teilchen wird mit einer an ein Lichtmikroskop³ angeschlossenen CCD-Kamera⁴ mit einer Bildrate von 1 Bild pro Sekunde bei einer konstanten Flussrate von 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgenommen. Ein MATLAB-Skript⁵, das auf dem Open-Source-Toolkit PIVlab (Version 2.37) [113, 114] basiert, wird anschließend zur Extraktion des zweidimensionalen Geschwindigkeitsprofils verwendet.

4.2.1 Numerische Berechnung des Strömungsfeldes

Die mathematische Beschreibung der Strömung von linear-viskosen Newton'schen Flüssigkeiten und Gasen liefern die Navier-Stokes-Gleichungen (siehe *Kapitel 1.2.1*). Bis

² μ -Slide VI 0.4 ibiTreat, IbiTreat, Gräfelung, Deutschland

³ Axiovert 200M, Zeiss, Jena, Deutschland

⁴ FASTCAM 1024PCI, Photron, Ottobrunn, Deutschland

⁵ MATLAB R2017b, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA

heute ist im allgemeinen Fall die Existenz und Eindeutigkeit einer analytischen Lösung noch nicht bewiesen. In den meisten Fällen werden daher zur Lösung numerische Verfahren angewendet. Für die Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit in einem rechteckigen Kanal (siehe *Abb. 4.2*) existiert ebenfalls keine analytische Lösung. Allerdings kann die analytische Lösung durch eine Fourier-Reihenentwicklung genähert werden. Eine ausführliche Herleitung kann aus [20, 115] entnommen werden. Man erhält bei Entwicklung entlang der y -Achse mit den Randbedingungen

$$u\left(y = \pm \frac{w}{2}, z\right) = 0 \text{ und } u\left(y, z = \pm \frac{b}{2}\right) = 0, \quad (4.1)$$

den folgenden Ausdruck für die Geschwindigkeit $u(y, z)$:

$$u(y, z) = \frac{4\Delta p}{\mu w l} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{\beta_n^3} \left(1 - \frac{\cosh(\beta_n z)}{\cosh(\beta_n \frac{b}{2})}\right) \cos(\beta_n y), \quad (4.2)$$

wobei β_n definiert ist durch:

$$\beta_n = (2n - 1) \frac{\pi}{w}, \quad (4.3)$$

mit w der Breite des Kanals, b der Höhe des Kanals, l der Länge des Kanals, Δp der Druckdifferenz und μ der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit. In der experimentellen Praxis werden oft Spritzenpumpen eingesetzt, um eine Strömung zu erzeugen. Diese geben nicht die Druckdifferenz Δp sondern den Volumenfluss Q vor. Es lohnt sich daher, einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen herzustellen. Aus der Definition des Volumenflusses Q :

$$Q = \int_{-w/2}^{w/2} \int_{-b/2}^{b/2} u(y, z) dy dz \quad (4.4)$$

ergibt sich die Gleichung:

$$Q = \frac{8\Delta p b}{\mu w l} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left(1 - \frac{2}{\beta_n b} \tanh \beta_n \frac{b}{2}\right) \quad (4.5)$$

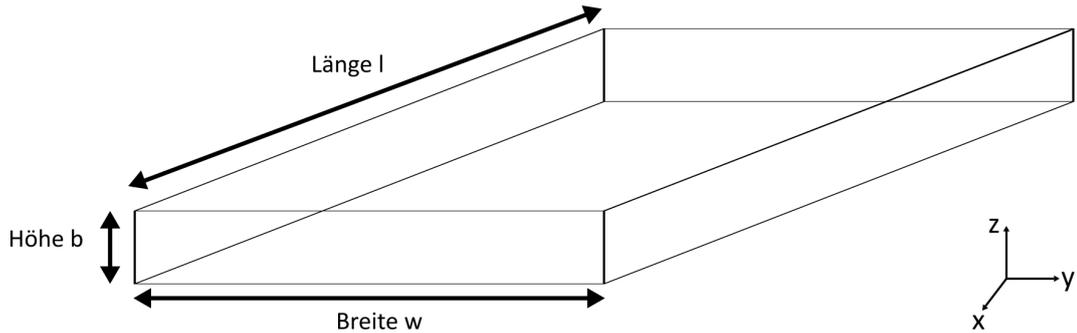


Abb. 4.2: Skizze der Kanalgeometrie für das gegebene Problem: w entspricht der Breite, b der Höhe und l der Länge des Kanals.

Durch Auflösen von Gl. 4.5 nach Δp und Einsetzen in Gl. 4.2 kann somit das Geschwindigkeitsfeld bei bekannter Flussrate und Kanalgeometrie berechnet werden.

Die auf Gl. 4.2 basierenden numerischen Berechnungen werden in der Programmiersprache Python⁶ durchgeführt. Für die Berechnungen werden die Kanalabmessungen und die Flussrate aus dem Experiment verwendet ($w = 3.8 \text{ mm}$, $b = 0.4 \text{ mm}$, $l = 17.0 \text{ mm}$, $Q = 0.2 \mu\text{l}/\text{min}$).

Finite-Elemente-Methode Simulation

Die FEM Simulationen werden mit der Software COMSOL Multiphysics⁷ durchgeführt. Die Navier-Stokes-Gleichung wird zusammen mit der Kontinuitätsgleichung für ein stationäres 2D- und 3D-Modell gelöst. Dazu wird der Bereich *Laminare Strömung* gewählt. Die Breite, Länge und Höhe des Kanals betragen $w = 3.8 \text{ mm}$, $l = 17.0 \text{ mm}$ und $h = 0.4 \text{ mm}$. Am Einlass des Kanals wird als Randbedingung eine *Voll ausgebildete Strömung* mit einer Flussrate von $F = 0.2 \mu\text{l}/\text{min}$ und am Auslass als Randbedingung *Druck* mit $p_0 = 0 \text{ Pa}$ angewendet. Die Größe und Lage des HeLa-Zellaggregats (Durchmesser $d = 208 \mu\text{m}$) im Kanal wird aus dem Experiment übernommen. Es wird ein *Physik-gesteuertes Netz* mit der Elementgröße *Normal* verwendet. Durch die Kopplung des Moduls *Laminare Strömung* mit dem Modul *Festkörpermechanik* über eine *Fluid-Festkörper-Wechselwirkung* wird die zeitabhängige Trajektorie einer Faser im Strömungsfeld simuliert. Die Faser wird als starr angenommen und hat eine Länge von $l_{\text{Faser}} = 47.5 \mu\text{m}$ und eine Breite von $b_{\text{Faser}} = 5.0 \mu\text{m}$. Es wird ebenfalls ein *Physik-*

⁶ Python 3.8.3, Python Software Foundation

⁷ COMSOL Multiphysics 5.6, Comsol Inc., Burlington, MA, USA

gesteuertes Netz mit der Elementgröße *Normal* verwendet. Dieses ist allerdings beweglich, um sich an die bewegte Faser anzupassen zu können. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich im *Anhang A.4*.

4.2.2 Laminare Strömung im Kanal

Abb. 4.3 zeigt das Geschwindigkeitsfeld berechnet mit Hilfe der numerischen Näherung aus Kapitel 4.2.1 in Abhängigkeit der Iterationsschritte n . Links ist jeweils das Geschwindigkeitsprofil entlang der Breite des Kanals aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt das Profil in der Mitte des Kanals. Die gestrichelte Linie zeigt das über alle Höhen gemittelte Profil. Rechts ist die Geschwindigkeit in der xz -Ebene, also dem vertikalen Querschnitt des Kanals, als Farbcode für die entsprechenden Iterationsschritte dargestellt. Für das Resultat mit Iterationsschritten $n = 5$ ist noch deutlich die Überlagerung der einzelnen Hyperbelfunktionen zu erkennen. Für die Lösung mit $n = 20$ ist mit dem Auge hingegen kein Unterschied mehr erkennbar. Für einen qualitativen Vergleich mit der FEM Simulation scheint daher ein Wert von $n = 20$ als vollkommen ausreichend.

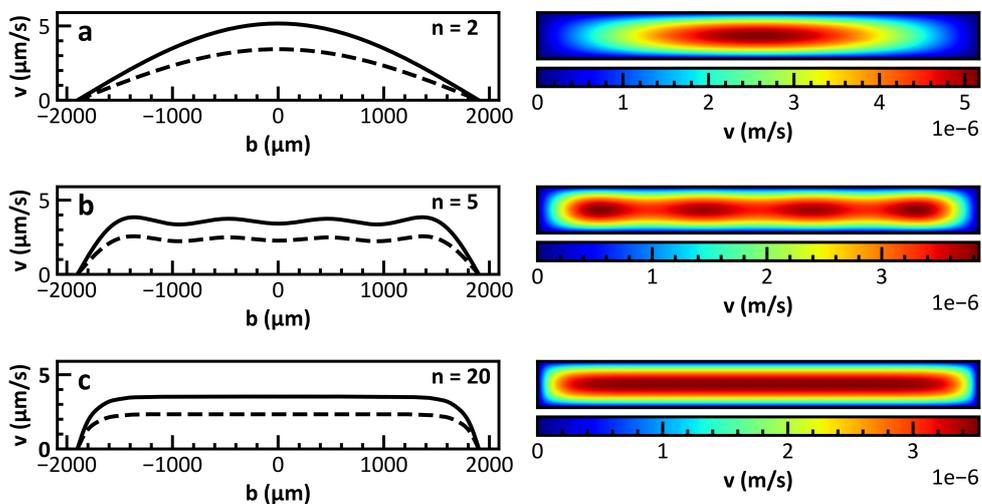


Abb. 4.3: Numerische Berechnung des Strömungsprofils eines rechteckigen Kanals in Abhängigkeit der Anzahl der Iterationsschritte n . Für kleine Werte von $n = 5$ ist die Überlagerung der einzelnen Hyperbelfunktionen deutlich zu sehen. Für die Lösung mit $n = 20$ ist mit dem Auge kein Unterschied mehr erkennbar.

Abb. 4.4 zeigt den Vergleich der numerischen Lösung mit der Lösung der FEM Simulation mit Comsol Multiphysics, bei der drei verschiedene Fälle betrachtet werden (3D, 2D und 2D mit flacher Kanalnäherung). Bei den Simulationen werden dieselben Kanalabmessungen und Flussraten wie für die numerische Berechnung verwendet. Das Ergebnis der 3D-Simulation zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die analytische Lösung. Im Vergleich zur FEM Simulation weist die numerischen Lösung allerdings einen deutlich glatteren Verlauf auf. Dies lässt sich vermutlich auf numerische Fehler bei der FEM Simulation zurückführen. Die 2D-Simulation weicht stärker von der numerischen Lösung ab, da die Höhe des Kanals nicht berücksichtigt wird. Die Form des Geschwindigkeitsprofils entspricht daher dem Geschwindigkeitsprofil eines Kanals mit quadratischer Querschnittsfläche. Durch eine sog. *flache Kanalnäherung* kann dies behoben werden. Das Resultat entspricht dann dem über alle Höhen gemittelten Profil der numerischen Lösung.

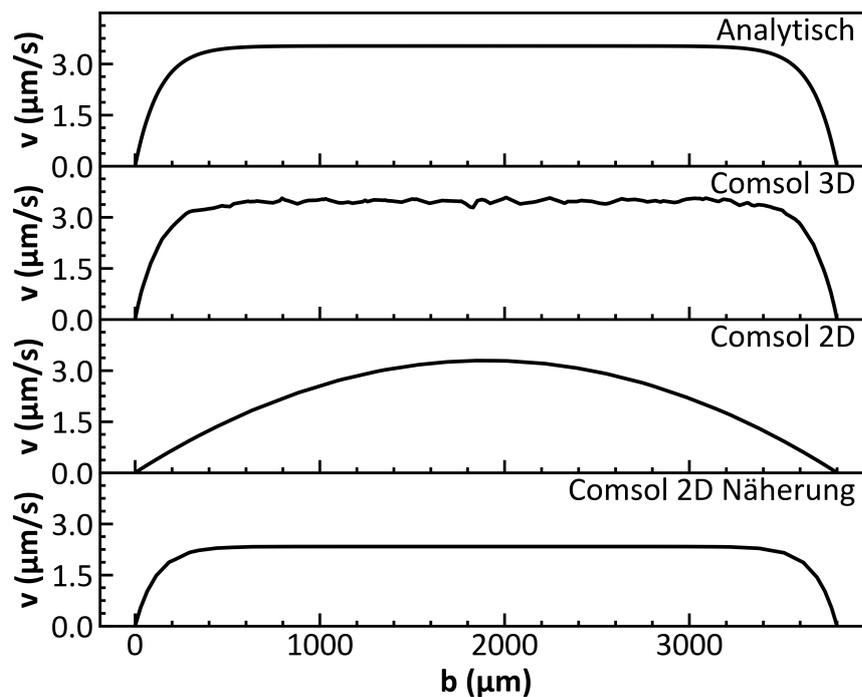


Abb. 4.4: Vergleich der numerischen Lösung mit FEM Simulationen in Comsol Multiphysics. Das Ergebnis der 3D-Simulation zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die analytische Lösung. Die 2D-Simulation weicht hingegen relativ stark von der numerischen Lösung ab, da die Höhe des Kanals nicht berücksichtigt wird. Durch eine sog. flache Kanalnäherung kann dies behoben werden. Allerdings wird dabei die Maximalgeschwindigkeit unterschätzt.

4.2.3 Laminare Umströmung eines Zellaggregats

In diesem Abschnitt wird nun die Umströmung eines Zellaggregats, das sich in einem rechteckigen Kanal befindet, näher untersucht. Für dieses Problem existiert keine vergleichbar einfache numerische Näherung wie für den rechteckigen Kanal. Daher wird zur theoretischen Beschreibung ausschließlich die FEM Simulation angewendet. Zusätzlich wird das Strömungsprofil mittels PIV vermessen. *Abb. 4.5 a* zeigt die durch einen mikrofluidischen Fluss ausgerichteten Fasern (cyan) um ein Zellaggregat (magenta) nach Polymerisation des Kollagen-Netzwerkes.

Die mittlere Faserorientierung in einem Teilbild ($103\ \mu\text{m} \times 103\ \mu\text{m}$) wird durch die weißen Pfeile dargestellt. Weit weg vom Aggregat sind die Fasern im Mittel nach unten ausgerichtet, was der Flussrichtung im Experiment entspricht. In der Nähe des Aggregats sind die Fasern hingegen tangential zum Aggregat orientiert. Eine Ausnahme bildet der Bereich unterhalb des Aggregats. Hier zeigen die Fasern ebenfalls nach unten. *Abb. 4.5 b* zeigt das experimentell bestimmte Strömungsprofil. Aus einer Überlagerung von zeitlich versetzten Einzelbildern wird für jeden Pixel der kleinste Wert der überlagerten Bilder gewählt. Als Resultat erhält man die Trajektorien der einzelnen Teilchen. Der Effekt ist vergleichbar mit der Aufnahme eines einzelnen Bildes mit langer Belichtungszeit. Weit weg vom Aggregat verlaufen die Trajektorien parallel zur Hauptflussrichtung. Umso näher man dem Aggregat kommt, umso stärker sind die Trajektorien in tangentialer Richtung relativ zum Aggregat gekrümmt. *Abb. 4.5 c* und *d* geben das aus der PIV-Messung und aus der FEM Simulation resultierende Geschwindigkeitsfeld wieder. Der Farbcode entspricht dabei dem Geschwindigkeitsbetrag. Qualitativ zeigen beide einen ähnlichen Verlauf. In der Simulation erreicht die Geschwindigkeit an der Oberfläche allerdings den Wert $v = 0\ \mu\text{m/s}$. Dies kann im Experiment nicht aufgelöst werden. Die minimale Geschwindigkeit, die im Experiment beobachtet wird, ist $v = 1.0\ \mu\text{m/s}$. Auch in der Maximalgeschwindigkeit unterscheiden sich Simulation und Experiment leicht. Für das Experiment ergibt sich eine maximale Geschwindigkeit von $v = 3.1\ \mu\text{m/s}$ und für die Simulation von $v = 2.8\ \mu\text{m/s}$. Vergleicht man die Ausrichtung der Fasern mit dem Geschwindigkeitsfeld, so liegt der Schluss nahe, dass die Fasern im Wesentlichen entlang der Stromlinien ausgerichtet sind. Das heißt, weit weg vom Aggregat parallel nach unten und in der Nähe des Aggregats tangential im Bezug auf das Aggregat. Eine Abweichung davon zeigt jedoch der Bereich unterhalb des Aggregats. In diesem Bereich zeigen die Fasern ebenfalls parallel nach unten, was nicht mit dem Geschwindigkeitsfeld zusammenpasst. Dieses würde eine tangentiale Orien-

tierung der Fasern vermuten lassen. Hier stellt sich die Frage, wie dieser Unterschied erklärt werden kann. Im Experiment werden kugelförmige Objekte verwendet, um das Strömungsfeld zu vermessen. Diese folgen den Stromlinien. Das Geschwindigkeitsfeld, was sich daraus bestimmen lässt, entspricht somit dem der Simulation und somit dem tatsächlich vorliegenden Feld. Die einzelnen Fasern haben allerdings keine kugelförmige Form, sondern entsprechen länglichen Zylindern.

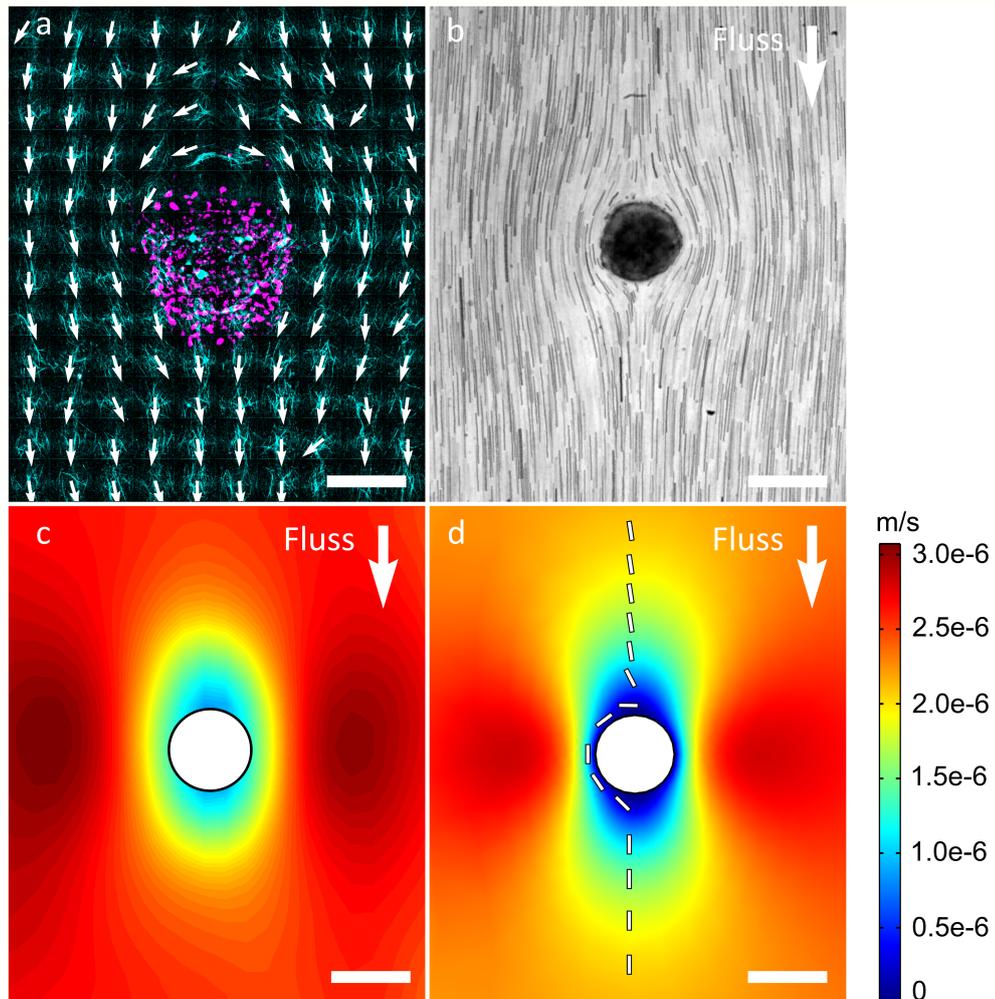


Abb. 4.5: Charakterisierung des Strömungsprofils und der Faserorientierung um das HeLa-Aggregat mit Flussrichtung von oben nach unten. a) Aggregat (magenta) und ausgerichtete Fasern (cyan) mit mittlerer Faserausrichtung (weiße Pfeile) um das Aggregat nach der Polymerisation des Kollagenetzwerks. b) Trajektorien um das Aggregat während der Polymerisation durch Überlagerung von Einzelbildern. c) Geschwindigkeitsbetrag bestimmt durch PIV-Messung mit Geschwindigkeitsvektoren. d) Geschwindigkeitsbetrag bestimmt durch FEM Simulation mit der Trajektorie einer einzelnen Faser. Maßstab: 200 μm . (Abb. entnommen aus [98])

Von den Trajektorien kugelförmiger Objekte lassen sich also nicht direkt Rückschlüsse auf die Trajektorie der Fasern und ihrer Ausrichtung ziehen. In einer weiteren FEM Simulation wird daher das Verhalten einer mitbewegten Kollagenfaser zeitaufgelöst betrachtet. Dazu wird ein sog. *Bewegliches Netz* verwendet. Dabei wird für jeden Zeitschritt ein neues Gitternetz berechnet, das sich an die Bewegung der Faser anpasst. Die Faser wird zur Vereinfachung als längliches Rechteck angenommen. *Abb. 4.5 d* zeigt die Trajektorie einer Faser, die in der Mitte des Kanals startet. Zunächst ist die Ausrichtung der Faser parallel zur Flussrichtung. Nähert sich die Faser dem Aggregat, erfährt die Faser eine Kraft, die zu einer Drehung führt. Die Faser richtet sich tangential zum Aggregat aus und umwandert dieses. Hinter dem Aggregat richtet sich die Faser dann wieder parallel zum Fluss bzw. radial zum Aggregat aus. Dies entspricht sehr gut der Faserorientierung, die um das Sphäroid herum beobachtet wurde (siehe *Abb. 4.5 a*), was darauf hindeutet, dass die Kräfte der Strömung für die erhaltene Orientierung der Kollagenfasern verantwortlich sind. Somit zeigen die Ergebnisse, dass die Kollagenorientierung das während der Polymerisation angelegte Kraftfeld beibehält.

4.3 Simulation der Invasion im Kollagennetzwerk

Nachdem gezeigt werden konnte, welche Rolle die mikrofluidische Strömung auf die Ausrichtung der Kollagenfaser hat, soll nun eine Erklärung für das Migrationsverhalten der Zellen gefunden werden. Dazu wird der Ansatz verwendet, dass die Migration im Wesentlichen als Diffusion von Teilchen aufgefasst werden kann.

4.3.1 Einfache 2D-Zufallsbewegung

Um die Invasion von HeLa-Zellen in einem mikrofluidisch ausgerichteten Kollagengel besser verstehen zu können, wird ein numerisches Modell entwickelt, das auf einem einfachem 2D-Zufallsbewegungs-Algorithmus basiert. Die Simulationen werden in der Programmiersprache Python⁸ durchgeführt. Bei einer einfachen 2D-Zufallsbewegung wird angenommen, dass ein Teilchen bei jedem Zeitschritt vier gleich wahrscheinliche Möglichkeiten hat zu wandern.

⁸ Python 3.8.3, Python Software Foundation

Die vier Schrittmöglichkeiten, die zu einer Verschiebung in x- bzw. y-Richtung führen, sind (siehe Abb. 4.6 a):

$$\Delta x = \pm k \text{ und } \Delta y = \pm k, \quad (4.6)$$

wobei k die Schrittweite ist.

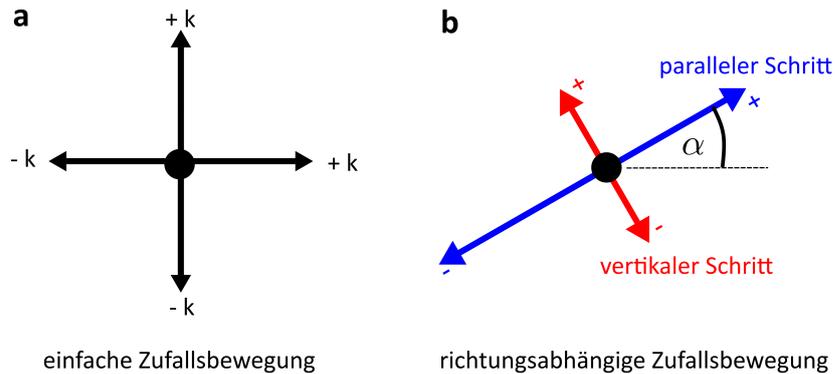


Abb. 4.6: Veranschaulichung der Schrittmöglichkeiten bei einer Zufallsbewegung. a) Bei der einfachen Zufallsbewegung erfolgt an jedem Ort die Bewegung eines Teilchens mit der gleichen Schrittweite in allen vier Raumrichtungen. b) Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zufallsbewegung ist die Schrittweite davon abhängig, ob diese parallel oder quer zu Faser erfolgt. Zusätzlich wird die Richtung α am jeweiligen Ort durch die Faserorientierung vorgegeben.

Abb. 4.7 a zeigt das Ergebnis einer Simulation einer einfachen 2D-Zufallsbewegung für zehn Partikel. Die Trajektorien der verschiedenen Partikel sind ausgehend vom Ursprung nach 500 Zeitschritten aufgetragen. Wie zu erkennen ist, gibt es keine Vorzugsrichtung. Ein Maß dafür, wie weit sich ein Teilchen in einer gewissen Zeit im Mittel von seinem ursprünglichen Ort entfernt hat, ist die mittlere quadratische Verschiebung $\langle r^2(\tau) \rangle$. Die mittlere quadratische Verschiebung ist folgendermaßen mit der Schrittweite k der Zufallsbewegung verknüpft:

$$\langle r^2(\tau) \rangle = k^2 N, \quad (4.7)$$

wobei N die Anzahl der in der Zeit τ gemachten Schritte ist. Der Radius des gestrichelten Kreises entspricht der Wurzel von $\langle r^2(\tau) \rangle$. Abb. 4.7 b zeigt, dass die in der Simulation berechnete mittlere quadratische Verschiebung $\langle r^2(\tau) \rangle$ (schwarz) dem theoretischen Verlauf (rot) folgt.

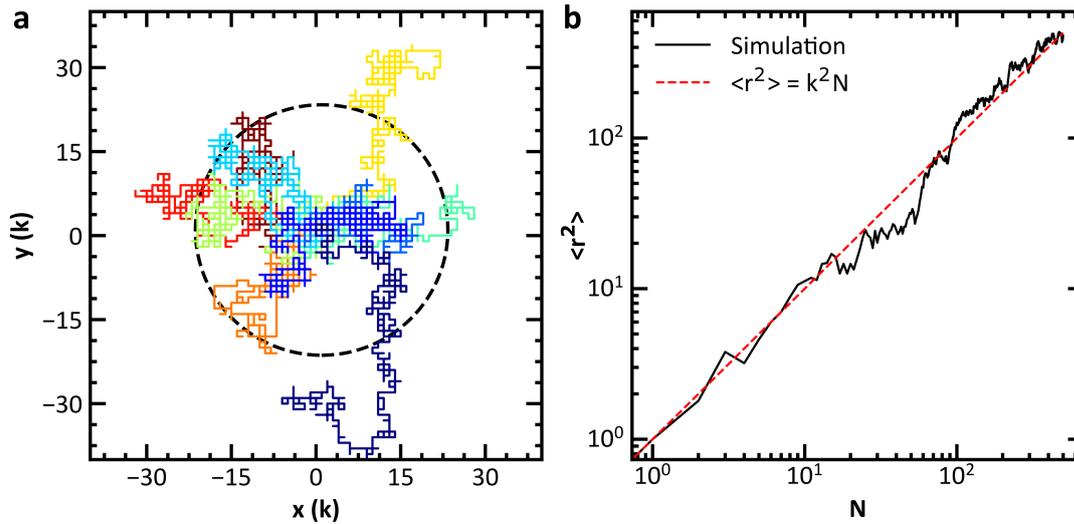


Abb. 4.7: Simulation einer ungerichteten 2D-Zufallsbewegung. a) Trajektorien für zehn Partikel ausgehend vom Ursprung nach 500 Zeitschritten. Der gestrichelte Kreis hat einen Durchmesser von $\langle r^2 \rangle$. b) Vergleich der aus der Simulation berechneten mittleren quadratischen Verschiebung für die zehn Partikel (schwarz) mit dem theoretischen Wert (gestrichelt rot) in Abhängigkeit von der Zeit.

4.3.2 Richtungs- und ortsabhängige 2D-Zufallsbewegung

In dieser Arbeit wird die Zufallsbewegung durch Berücksichtigung einer Richtungs- und Ortsabhängigkeit erweitert. Diese Abhängigkeit ist durch die Faserorientierung vorgegeben, die aus dem Experiment bestimmt werden kann. Bei jedem Zeitschritt gibt es vier gleich wahrscheinliche Möglichkeiten, wie eine einzelne Zelle wandern kann: Parallel oder senkrecht zur Faserorientierung und für beide Optionen in entgegengesetzte Richtungen (siehe *Abb. 4.6*). Ein Schritt parallel zur Faserorientierung führt dann zu einer Verschiebung der Zelle um:

$$\Delta x = \pm k_p \cos(\alpha) \quad \text{und} \quad \Delta y = \pm k_p \sin(\alpha), \quad (4.8)$$

mit k_p der Schrittweite parallel zur Faserorientierung und α der Faserorientierung am aktuellen Ort. Das positive und negative Vorzeichen gibt an, in welche Richtung relativ zur Faser der Schritt erfolgt. Ein Schritt senkrecht zur Faserorientierung führt dann analog zu einer Verschiebung der Zelle um:

$$\Delta x = \pm k_v \cos(\alpha + 90) \quad \text{und} \quad \Delta y = \pm k_v \sin(\alpha + 90). \quad (4.9)$$

mit k_v der Schrittweite senkrecht zur Faserorientierung. Aus den Daten des Experiments kann anhand von Gl. 4.7 die Schrittweite k_p und k_v grob abgeschätzt werden:

$$k_p = r_p/\sqrt{N} \text{ und } r_v = k_v/\sqrt{N}. \quad (4.10)$$

Dabei ist r_p die Entfernung, die die Zellen innerhalb eines Tages stromabwärts zurückgelegt haben im Bereich paralleler Faserorientierung, r_v ist die Entfernung, die die Zellen innerhalb eines Tages stromaufwärts zurückgelegt haben im Bereich senkrechter Faserorientierung und N ist die Anzahl der Zeitschritte. Beim Übergang von der einfachen 2D-Zufallsbewegung zur Situation im Experiment wird zunächst angenommen, dass die Zellen auf einer Kugel von der Größe eines Sphäroids verteilt sind (siehe Abb. 4.8 a). Das Sphäroid besteht in der Simulation aus 150 Zellen und hat einen Durchmesser von ca. 300 μm . Dies ist der Ausgangszustand, der in allen weiteren Simulationen verwendet wird. Zunächst wird der Fall mit gleichen Schrittweiten in paralleler und vertikaler Richtung betrachtet ($k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 24 \mu\text{m}$). Abb. 4.8 b zeigt wie sich nach 100 Zeitschritten die Zellen gleichmäßig in alle Raumrichtungen ausgebreitet haben. Dies entspricht der Erwartung, da keine Richtungs- und Ortsabhängigkeit vorgegeben wird.

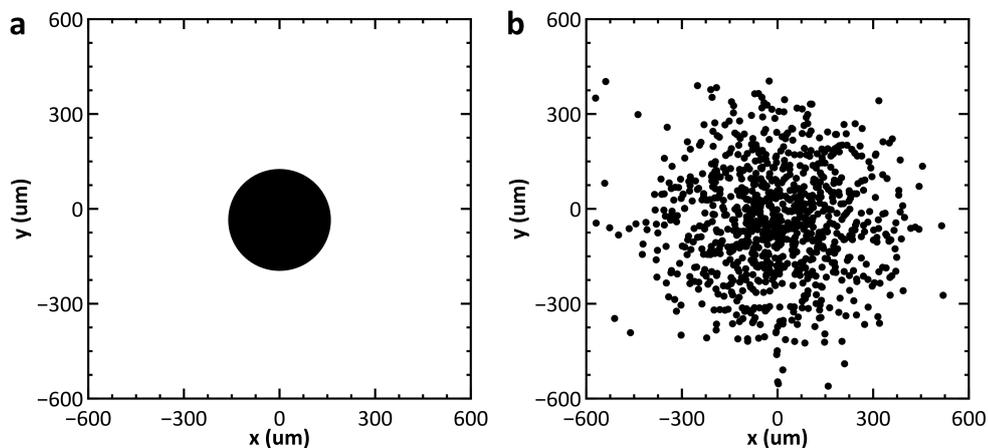


Abb. 4.8: Simulation der Zellausbreitung ausgehend von einem kugelförmigen Sphäroid mittels eines Zufallsbewegungs-Algorithmus ohne Richtungs- und Ortsabhängigkeit. a) Zu Beginn sind die Zellen kugelförmig auf dem Sphäroid angeordnet. b) Ausbreitung der Zellen ausgehend vom Sphäroid nach 100 Zeitschritten. Die Zellen breiten sich gleichmäßig in alle Raumrichtungen aus.

Ausgehend von dieser Situation wird das Modell nun erweitert, indem eine richtungs- und ortsabhängige Zufallsbewegung eingeführt wird. Im Wesentlichen wird diese durch

die Ausrichtung der Fasern vorgegeben. Zum einen wird dafür eine richtungsabhängige Schrittweite vorgegeben ($k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 0 \mu\text{m}$). Parallel zu den Fasern können Zellen schneller wandern als quer dazu. Zum anderen wird die Richtung einzelner Schritte aus der mittleren Orientierung der Fasern in einem Gebiet abgeleitet (siehe *Kapitel 4.3.1*). Um zu untersuchen wie sich diese Erweiterung des Modells grundsätzlich auswirkt, werden zunächst homogene Faserorientierungen in verschiedenen Raumrichtungen vorgegeben.

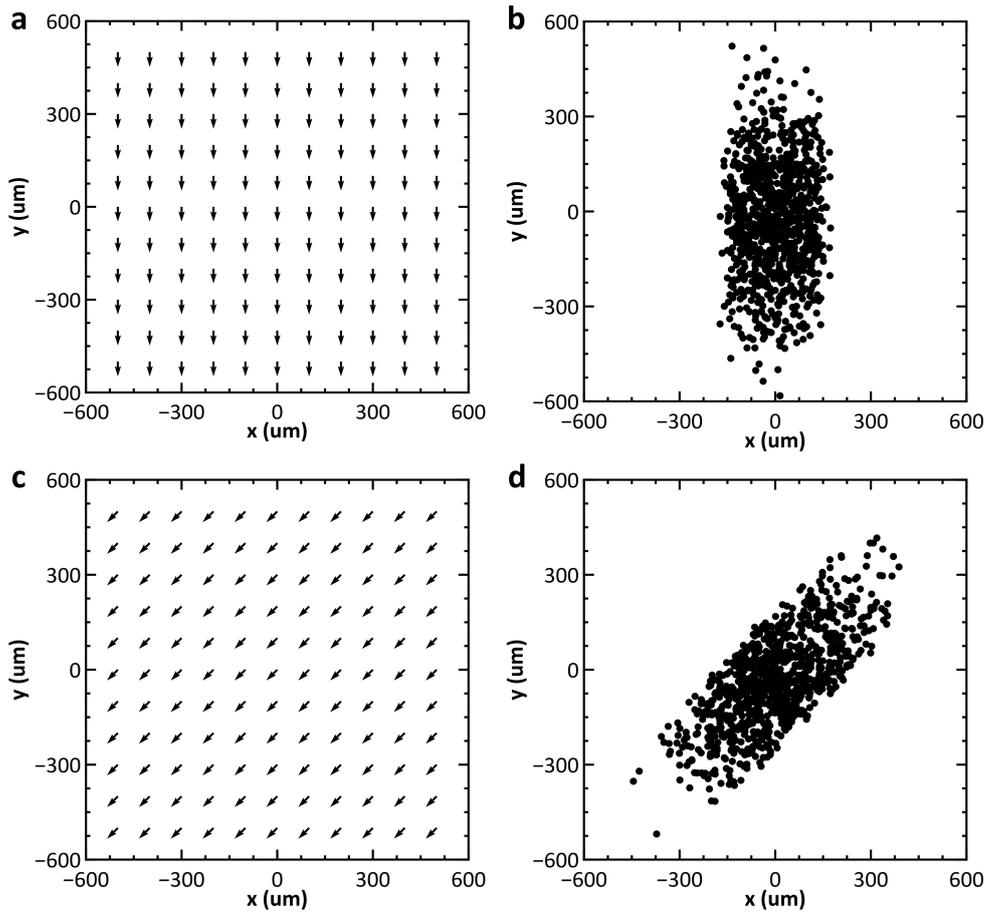


Abb. 4.9: Simulation der Ausbreitung von Zellen mittels eines Zufallsbewegungs-Algorithmus mit vorgegebener Richtungs- und Ortsabhängigkeit a) und c) Vorgegebene homogene Faserorientierung in senkrechter und diagonaler Richtung. b) und d) Ausbreitung der Zellen nach 100 Zeitschritten. Die Zellen breiten sich praktisch nur entlang der Fasern aus (Schrittweite in paralleler Richtung $k_p = 24 \mu\text{m}$ und in senkrechter Richtung $k_v = 0 \mu\text{m}$).

Abb. 4.9 a und c zeigen die gleichmäßige Orientierung der Fasern in senkrechter und diagonaler Richtung. Abb. 4.9 b und d zeigen die entsprechenden Ausbreitungen der Zellen nach 100 Zeitschritten. Wie zu erkennen ist, ergibt sich eine deutliche Richtungsabhängigkeit. Die Zellen breiten sich praktisch nur entlang der vorgegebenen Faserorientierung aus.

4.3.3 Simulation der Invasion von Zellen im Kollagennetzwerk

Nachdem das Ausbreitungsverhalten der Zellen mit vorgegebenen Faserorientierungen betrachtet wurde, wird nun die Situation des Experiments untersucht. Im Experiment konnte festgestellt werden, dass die ausgerichteten Kollagenfasern und speziell ihre Orientierung die Invasion der Sphäroide beeinflussen. Daher stellt sich die Frage, ob der beobachtete Invasionsprozess durch das Modell beschrieben werden kann. Das heißt im Wesentlichen, ob die Annahme zutreffend ist, dass Zellen entlang der Fasern schneller eindringen können als im Vergleich zur Invasion senkrecht zu den Fasern. Zellüberlappung, Zell-Zell-Kontakte und daraus resultierende Staueffekte werden im Modell vernachlässigt. Außerdem wird die Proliferation nicht berücksichtigt, da diese in Sphäroiden in 3D-Umgebungen langsam sein dürfte, was lediglich zu einer geschätzten Zunahme des Radius etwa um den Faktor 1.2 über die drei Tage (entspricht der Beobachtungszeit im Experiment) führt. Die Faserorientierung wird aus den in Abb. 4.5 a dargestellten experimentellen Daten bestimmt und interpoliert. Wird die Schrittweite für beide Richtungen gleich gewählt, erhält man, wie zu erwarten, keine Richtungsabhängigkeit (siehe Abb. 4.10 A1). Das Achsenverhältnis entspricht etwa 1 und es kann kein Unterschied in der Invasionstrecke zwischen stromaufwärts und stromabwärts festgestellt werden. Die Schrittweite parallel und quer zu den Fasern kann grob aus der zurückgelegten Strecke der Zellen der stromabwärts bzw. stromaufwärts gelegenen Front am ersten Tag abgeschätzt werden (siehe Anhang Abb. A.10). Dabei erhält man für $r_p = 220 \mu\text{m}$ und $r_v = 120 \mu\text{m}$. Nach Gl. 4.7 ergeben sich dann die Schrittweiten zu $k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 13 \mu\text{m}$. Die Form, die sich aus der Simulation mit den initialen Schrittweitenparametern ergibt, stimmt nicht sehr gut mit der im Experiment gemessenen Formentwicklung überein (siehe Abb. 4.10 A2 und Anhang Abb. A.10). Die Simulationsdaten zeigen nur wenig Asymmetrie in der Form und der Unterschied zwischen der Invasion stromabwärts und stromaufwärts ist viel kleiner als im Experiment. Das Achsenverhältnis und dessen Entwicklung über die Zeit stimmen bis zu einem gewissen Grad mit den experimentellen Daten überein.

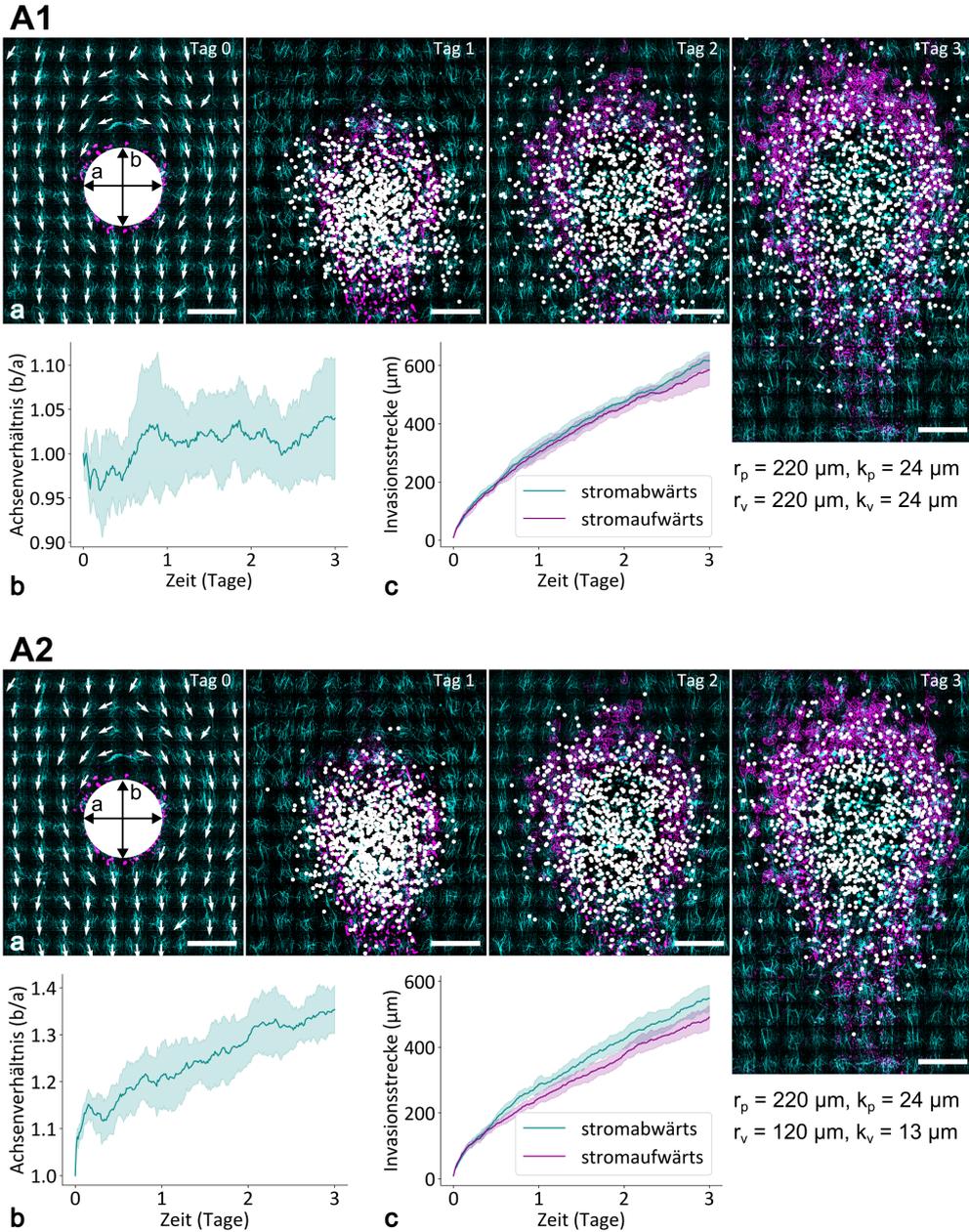


Abb. 4.10: Simulation der Invasion von HeLa-Zellen in ein mikrofluidisch strukturiertes Kollagenetzwerk. A1) Schrittweiten $k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 24 \mu\text{m}$. A2) Schrittweiten $k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 13 \mu\text{m}$. a) Überlagerung der Zellinvasion im Kollagenetzwerk (cyan) während des Experiments (magenta) und der simulierten Invasion der Zellen (weiß) im Verlauf von 3 Tagen. Die weißen Pfeile an Tag 0 geben die gemittelte Faserorientierung an (Maßstab: $200 \mu\text{m}$). b) Achsenverhältnis b/a im Verlauf von drei Tagen der Simulation (cyan: Mittelwert, helles cyan: Standardabweichung ($n = 10$)). c) Position der simulierten Invasionsfront in Bezug auf die anfängliche Sphäroidoberfläche (Tag 0) im Verlauf von drei Tagen auf der stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Seite des Sphäroids.

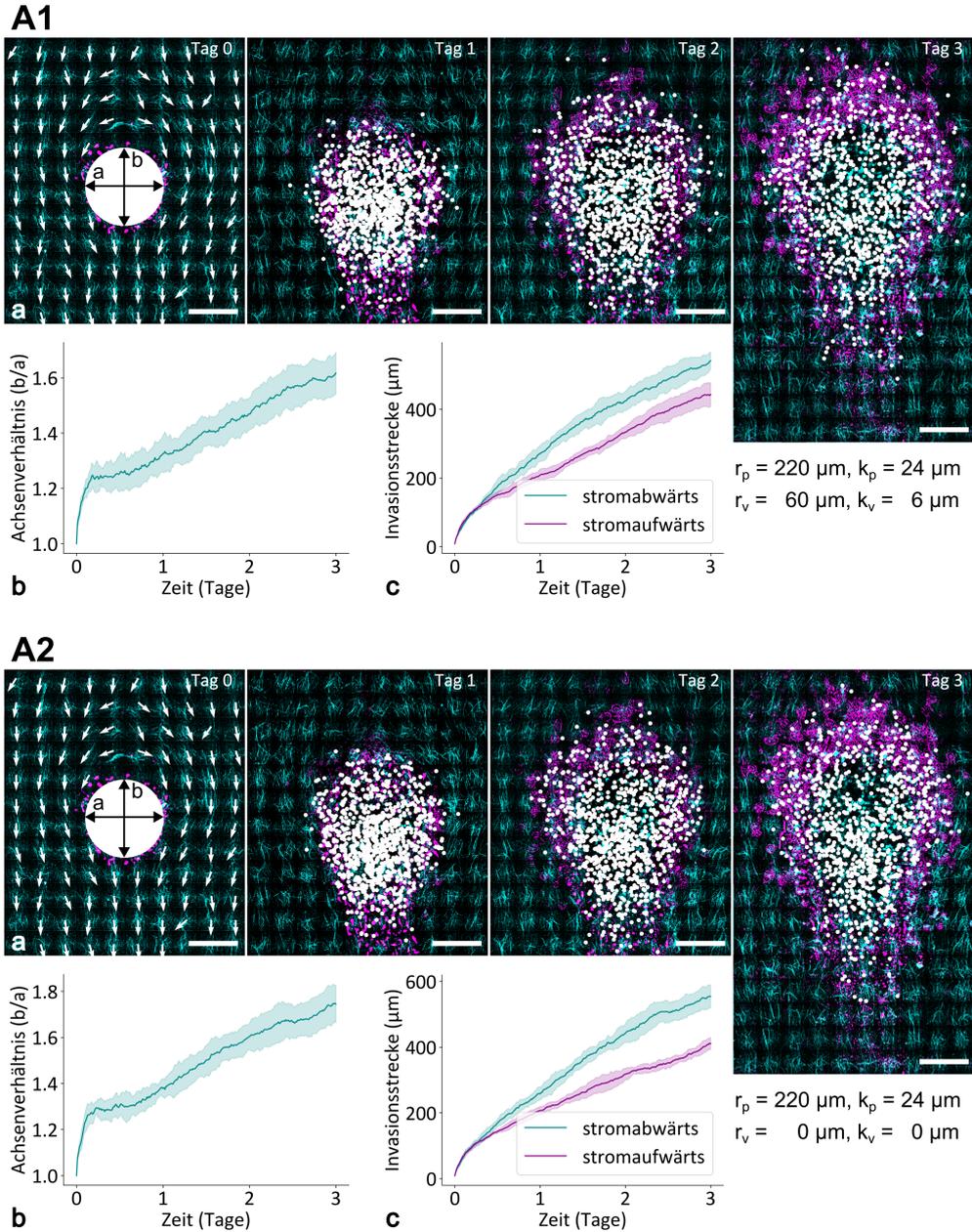


Abb. 4.11: Simulation der Invasion von HeLa-Zellen in ein mikrofluidisch strukturiertes Kollagenetzwerk. A1) Schrittweiten $k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 6 \mu\text{m}$. A2) Schrittweiten $k_p = 24 \mu\text{m}$ und $k_v = 0 \mu\text{m}$. a) Überlagerung der Zellinvasion im Kollagen (cyan) während des Experiments (magenta) und der simulierten Invasion der Zellen (weiß) im Verlauf von 3 Tagen. Die weißen Pfeile an Tag 0 geben die gemittelte Faserorientierung an (Maßstab: $200 \mu\text{m}$). b) Achsenverhältnis b/a im Verlauf von drei Tagen der Simulation (cyan: Mittelwert, helles cyan: Standardabweichung ($n = 10$)). c) Position der simulierten Invasionsfront in Bezug auf die anfängliche Sphäroidoberfläche (Tag 0) im Verlauf von drei Tagen auf der stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Seite des Sphäroids.

Um die Asymmetrie und damit den Unterschied zwischen auf- und abwärts gerichteter Invasion zu erhöhen, wird als nächstes die Schrittweite senkrecht zur Faserorientierung verringert, während die aus dem Experiment abgeleitete Schrittgröße für die Bewegung parallel zu den Fasern beibehalten wird. Erwartungsgemäß wird durch die Verringerung der senkrechten Schrittgröße die Asymmetrie in der Form und der Unterschied in der Wegstrecke der Invasionsfronten stromaufwärts und stromabwärts vergrößert (siehe *Abb. 4.11 A1*). Mit zunehmender Asymmetrie erhöht sich auch das gesamte b/a -Verhältnis. Auffallend ist, dass die beste Übereinstimmung in der Sphäroidform zwischen Experiment und Simulation mit einer senkrechten Schrittweite von $k_p = 0 \mu\text{m}$, d. h. einer vollständigen Blockierung der Migration senkrecht zu den Fasern, erzielt wird (siehe *Abb. 4.11 A2*). Unter der Annahme einer vollständigen Blockierung der senkrechten Migration beschreibt die Simulation die experimentell erhaltenen Formen bemerkenswert gut, einschließlich der Invasion in Bereiche mit tangential zum Sphäroid orientierten Fasern. Auch die Unterschiede in der zurückgelegten Strecke der stromaufwärts und stromabwärts gerichteten Front werden mit diesem im Modell gewählten Parameter bestätigt. Da die Schrittweite für die Bewegung entlang der Fasern am ersten Tag aus der zurückgelegten Strecke berechnet wird, passen die Zahlen zu diesem Zeitpunkt sehr gut. Die Distanzen nach drei Tagen sind im Modell etwas größer als im Experiment. Dies könnte auf eine Überschätzung der Schrittweite zurückzuführen sein, die auf Effekten des Kollektivs beruht, wie z. B. Stauungen. Die Unterschiede sind jedoch angesichts der Fehlerbalken nicht groß. Insgesamt deutet das Modell auf eine Zunahme der zurückgelegten Strecke mit der Quadratwurzel der Zeit hin, was in Einklang steht mit dem angenommenen diffusiven Charakter. Die in den Experimenten gemessenen Werte stimmen mit dieser Zunahme überein, da die Werte an Tag 3 um weniger als einen Faktor 2 größer sind als an Tag 1. Die Analyse des Verhältnisses der Achsen längs und senkrecht zur Hauptströmungsrichtung (b/a) zeigt in der Simulation ein interessantes Verhalten, das im Experiment nicht zu sehen ist: In der Simulation steigt das Verhältnis stark an, dann bleibt es für kurze Zeit konstant, bis es wieder stetig ansteigt (siehe *Abb. 4.11 A4 b*). Dieser zweite Anstieg wird beobachtet, wenn die Zellen auf der stromaufwärtigen Front die senkrechten Fasern passiert haben und beginnen, entlang der Fasern in Hauptströmungsrichtung zu wandern. Dies steht im Gegensatz zu den Seiten entlang der a -Achse senkrecht zur Strömung, die nur den tangentialen Fasern zugewandt sind, so dass die Zellen keine Bereiche mit Fasern entlang dieser Achse erreichen. Somit trägt nun auch die stromaufwärts liegende Front

zu einem Anstieg des b/a -Verhältnisses bei, was zu dem beobachteten zweiten Anstieg des b/a -Verhältnisses führt. Der Grund dafür, dass dies nicht in den experimentellen Daten zu finden ist, könnte die große Varianz der Daten sein, die aus der Variabilität der Matrixorientierung und der Zellen resultiert. Darüber hinaus kann es von den Annahmen des Modells herrühren, die Zellüberlappung, kollektive Effekte, Proliferation und Umbau der Matrix vernachlässigen. Dieses Zeitintervall, das ein Plateau mit konstantem b/a -Verhältnis zeigt, verringert sich, wenn die Schrittweite senkrecht zu den Fasern erhöht wird, da die Zellen auf der stromaufwärts gelegenen Front den Bereich der in Hauptströmungsrichtung orientierten Fasern schneller erreichen.

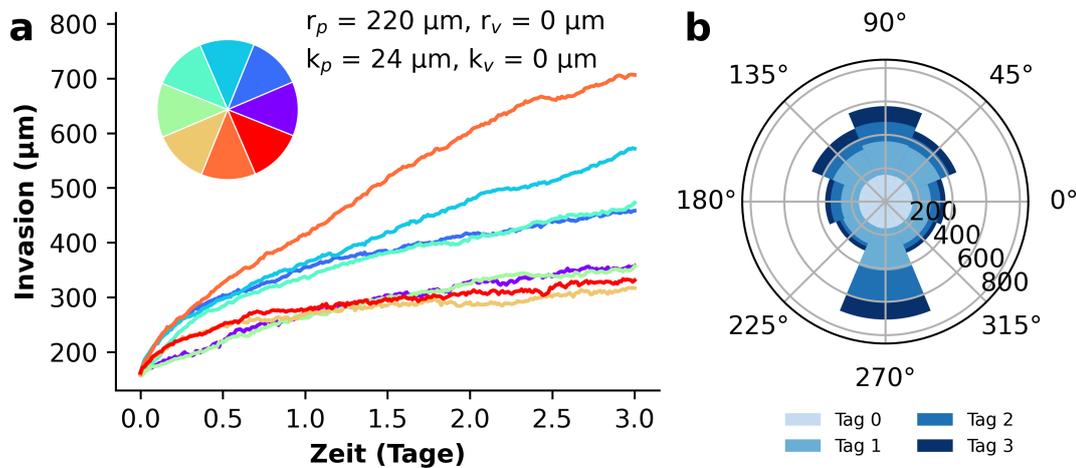


Abb. 4.12: Auswertung der Simulation der Invasion von Zellaggregaten in einem Kollagenetzwerk aufgeteilt in acht Sektoren. a) Zeitliche Ausbreitung der Zellfronten in den verschiedenen Sektoren. b) Winkeldiagramm der verschiedenen Zellfronten. Anhand dieser Auswertung lässt sich schnell erfassen, was die Vorzugsrichtungen der Zellfronten sind. (Abb. entnommen aus [98])

Eine alternative Möglichkeit der Auswertung der Simulation der Invasion ist in *Abb. 4.12* gezeigt. Hier werden acht Sektoren für die verschiedenen Richtungen definiert (siehe *Abb. 4.12 a* und *b*). Die Invasion gibt an, wie weit sich die Zellfront im jeweiligen Sektor ausgebreitet hat. Die Zellfront ergibt sich aus dem Mittelwert der zehn am weitesten ausgebreiteten Zellen. Zu erkennen ist, dass die Invasion für alle Richtungen mit der Zeit zunimmt. Die größte Invasion zeigt die Zellfront im Bereich des stromabwärts (270°) gerichteten Sektors, gefolgt vom Sektor der stromaufwärts (90°) zeigt. Interessant ist aber auch, dass die beiden schräg nach oben zeigenden Sektoren (45° und 135°) eine höhere Invasion als die übrigen Sektoren zeigen. Anhand dieser Auswertung lässt sich schnell erfassen, was die Vorzugsrichtungen der Zellfronten sind. Es

zeigt sich auch deutlich der Einfluss der senkrechten Schrittweite k_v auf die Winkelverteilung der Zellfronten (siehe *Anhang Abb. A.9*).

Vergleicht man die Winkelverteilung der Invasion in Experiment und Simulation (siehe *Abb. 4.12 b* und *Anhang Abb. A.11 c*), so stimmen die Verteilungen recht gut überein, mit Ausnahme der Richtungen, die an die Stromabwärtsrichtung angrenzen (225° und 315°). Vermutlich sind die Vernachlässigung des Zellvolumens und Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich für die Unterschiede zwischen Simulation und Experiment. Verdrängungseffekte an der Engstelle unterhalb des Sphäroids, den die Zellen passieren müssen, um die Region der migrationsfördernden Fasern zu erreichen, könnten zu der experimentell beobachteten verstärkten Migration in den Abschnitten neben der Stromabwärtsrichtung im Vergleich zu den Simulationsergebnissen führen.

4.4 Fazit

In diesem Kapitel wurde die mikrofluidische Strukturierung von Kollagenetzwerken, sowie das Invasionsverhalten von HeLa-Zellen innerhalb dieses Netzwerkes untersucht. Es stellte sich die Frage, wie sich die im Experiment beobachtete Ausrichtung der Fasern und die anschließende Invasion der Zellen erklären lässt. Dabei konnte anhand von PIV Messungen und FEM Simulationen gezeigt werden, dass die Ausrichtung der Kollagenfasern durch das Strömungsprofil um das Aggregat erklärt werden kann. Aufgrund der länglichen Form der Fasern ergibt sich eine Asymmetrie vor und hinter dem Aggregat. Vor dem Aggregat ist die Faser tangential zum Aggregat ausgerichtet, dahinter hingegen radial. Die Orientierung der Fasern nach der Polymerisierung kann hier somit quasi als Gedächtnis des Strömungsfeldes interpretiert werden. Die anschließende Ausbreitung der Zellen in diesem Kollagenetzwerk kann als ein diffusionsartiger Prozess verstanden werden. Durch Einführen einer anisotropen und ortsabhängigen Zufallsbewegung wird das Verhalten im Experiment gut beschrieben. Durch Variation der Schrittweite, die zunächst aus dem Experiment abgeschätzt wurde, lässt sich aus den Simulationen schließen, dass die Ausbreitung quer zu den Fasern quasi komplett unterdrückt wird. Abweichungen zu den Experimenten lassen sich vermutlich auf vereinfachende Annahmen in der Simulation, wie Zellüberlappung, Zell-Zell-Kontakte und daraus resultierende Staueffekte, zurückführen. Diese Effekte sollten in weiteren Studien berücksichtigt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse tragen

aber bereits wesentlich zum Verständnis der Invasion von Zellaggregaten in extrazellulären Matrizen bei. Es ist durchaus denkbar in Zukunft mit Hilfe dieser Erkenntnisse die mikrofluidische Strukturierung von Kollagennetzwerken noch gezielter zu beeinflussen und somit das Invasionsverhalten von Zellen gezielt zu steuern.

Noch komplexere Bewegungsmuster als migrierende Zellen weisen mobile Mikroorganismen, wie die Spezies *Paramecium caudatum*, auf. Aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit bedarf es spezieller Techniken, um insbesondere Einzelzellmessungen zu ermöglichen. Ein Schwerpunkt des letzten Kapitels liegt daher auf der Entwicklung einer mikrofluidischen Falle, die Einzelzellmessungen möglich macht.

5 Mobile Mikroorganismen

Einzel- und Ensemblemessungen zur Bewegungs- und Zustandsanalyse

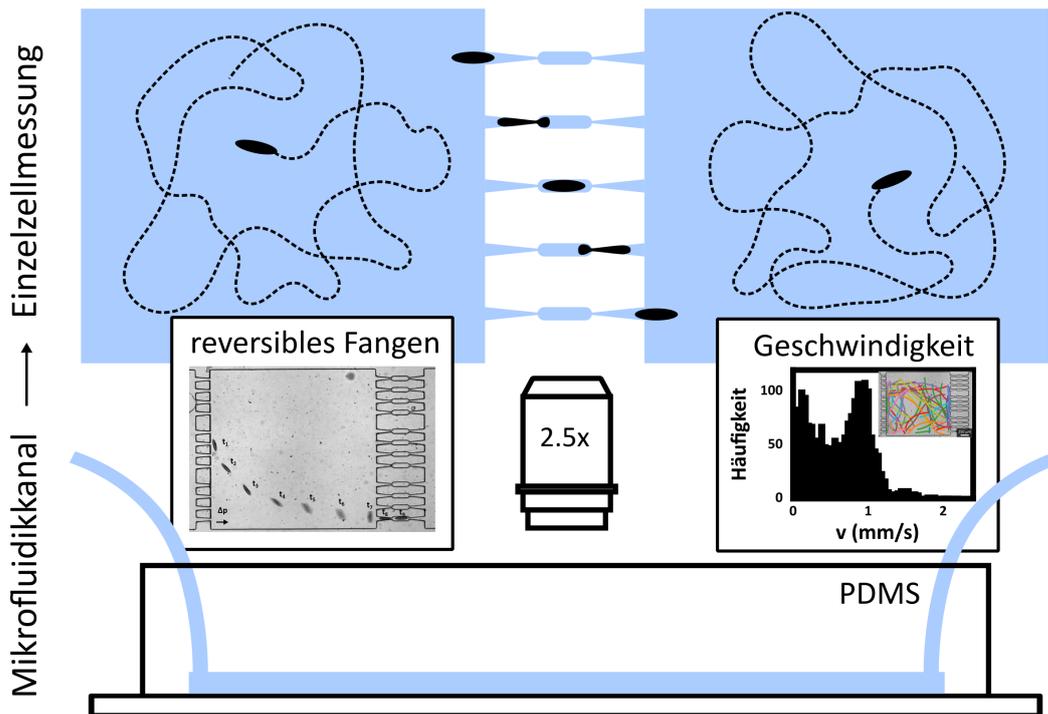


Abb. 5.1: Fangen von Mikroorganismen: In einem mikrofluidischen Kanal kann die Schwimmgeschwindigkeit von einzelnen Paramecien-Zellen anhand von Trajektorien bestimmt werden. Anschließend können diese reversibel gefangen und durch optische Messung der Phasenzustand der Membran der Mikroorganismen bestimmt werden.

Ein noch komplexeres Bewegungsmuster im Vergleich zu Zellen weisen bewegliche Mikroorganismen, wie die Spezies *Paramecium caudatum*, auch als Pantoffeltierchen bekannt, auf. Gerade aufgrund ihrer hohen Agilität erweisen sich Einzelzellmessungen allerdings als äußerst schwierig. In dieser Arbeit wird daher eine mikrofluidische Falle entwickelt, mit der die Beobachtung einzelner Mikroorganismen möglich ist (siehe *Abb. 5.1*). In diesen Fällen können die Mikroorganismen reversibel, ohne dem Einzeller Schaden zuzufügen, eingefangen und wieder freigelassen werden. Die Bewegung wird

räumlich stark eingeschränkt und ermöglicht damit unter anderem optische Messungen des Phasenzustands der Membran der Mikroorganismen. Darüber hinaus lässt sich aber auch das Schwimmverhalten einzelner Mikroorganismen beobachten. Somit wird u.a. die Korrelation von Membranordnung und zellulärer Funktion, hier die Bewegung, auf Einzelzellniveau möglich. Neben diesen Einzelzellmessungen wird eine alternative Technik verwendet, um das Schwimmverhalten des Ensembles zu quantifizieren. Dazu werden Messungen mittels DLS und Mikroskopie durchgeführt. Abweichend zur Analyse von Einzelzelltrajektorien wird bei letzterem jedoch die Korrelation aufeinanderfolgender Mikroskopbilder berechnet, um in Analogie zur Lichtstreuung eine Zeitkonstante zu ermitteln, über deren Dauer das Bild und somit die Positionen der Einzeller im Bildbereich korreliert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Abklingkonstante, mit der das mit sich selbst korrelierte Signal abfällt, direkt proportional zur Schwimmgeschwindigkeit ist. Die beiden verwendeten Techniken bieten den Vorteil gegenüber herkömmlichen Trackingverfahren, dass eine große Anzahl an Mikroorganismen problemlos gleichzeitig beobachtet werden kann.

Schlagwörter: Mikrofluidik, Einzelzellmessung, Ensemblemessung, Mikroorganismen, Paramecium caudatum, DLS, Korrelationsmessungen

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias F. Schneider vor allem in Zusammenarbeit mit Anne Paeger entstanden. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht [116]:

L.G. Schnitzler, A. Paeger, M.S. Brugger, M. F. Schneider and C. Westerhausen
„Reversible single cell trapping of Paramecium caudatum to correlate swimming behavior and membrane state,“ *Biomicrofluidics*, vol. 16, no. 2, 2022. [116] ¹

Der Beitrag des Autors dieser Arbeit in der Veröffentlichung ist die Entwicklung einer mikrofluidischen Falle für Mikroorganismen, um diese reversibel fangen zu können und zusätzlich damit deren Schwimmverhalten beobachten zu können.

¹Internet-Adresse zur Veröffentlichung:

https://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/5.0084084?casa_token=MGQaHxEHnz8AAAAA%3AazXk1k3cN2FeL8knNUGb_jFSUr7w1_eLqvwK8Jbq9wpDdMT62zeINDV0-2Kof0r8af8wA0haF4U

5.1 Einleitung

In den vergangenen 300 Jahren wurden Paramecien-Zellen auf praktisch allen Teilen der Erde beobachtet. Die Süßwasserarten sind häufig in Tümpeln, Teichen, Seen, Aquarien, Reservoirs, stehenden Gewässern, Bächen, Flüssen und gelegentlich auch in Trinkwasser zu finden. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass Paramecien-Zellen zu den am meisten untersuchten Mikroorganismen in der Biologie gehören. Die Auswirkungen verschiedener chemischer und physikalischer Faktoren auf Paramecien-Zellen sind intensiv untersucht worden. Dazu gehören unter anderem Nahrung, pH-Wert, Temperatur, ultraviolettes und sichtbares Licht, Medikamente, verschiedene Chemikalien, elektrischer Strom, Magnetfelder, Schallwellen, bioelektrische Phänomene und sogar Raumflüge [117]. Mechanistische Studien über zelluläre Prozesse werden in der Regel mit großen Zellpopulationen durchgeführt. Parameter, die als Durchschnittswerte großer Populationen gemessen werden, können jedoch irreführend sein. So könnte beispielsweise eine scheinbar lineare Reaktion auf ein Signal in Wirklichkeit eine zunehmende Anzahl von Zellen in der Population widerspiegeln, die von einem Zustand *aus* auf *an* oder umgekehrt geschaltet wurden, und nicht eine abgestufte Zunahme der Reaktion aller Zellen [118]. Darüber hinaus erfordern dynamische Einzelzellmessungen Methoden, die in der Lage sind, eine einzelne Zelle für wiederholte Messungen an Ort und Stelle zu halten. Zudem ist es wichtig, dass das Zellverhalten nicht durch Methoden der Zellbehandlung gestört wird [119]. Die Beobachtung des Verhaltens und die Verfolgung einzelner Paramecien-Zellen ist aufgrund ihrer hohen Mobilität immer noch eine Herausforderung. Unter optimalen Bedingungen können Paramecien-Zellen Schwimgeschwindigkeiten von bis zu mehreren Millimeter pro Sekunde erreichen. Dies macht es schwierig, einzelne Zellen mit einem Mikroskop im freien Raum zu verfolgen, da sich die Zelle quer durch das Sichtfeld und auch außerhalb des Fokus bewegt. Es gibt Tracking-Systeme, um diese Aufgabe zu bewältigen. Hasegawa *et al.* stellten eine Methode zur Verfolgung der Fortbewegung eines isolierten Mikroorganismus in einem begrenzten Raum vor [120]. Es gibt auch fortgeschrittenere Techniken, bei denen einzelne Zellen mit einer motorisierten Stage in 2D [121] und 3D [122] verfolgt werden können. Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung eines Multi-Target-Tracking-Systems, wie es von Huang *et al.* [123] vorgestellt wurde. Mit einem Tracking-System ist es möglich, den Schwimmweg einer einzelnen Paramecien-Zelle zu verfolgen, aber Messungen, die erfordern, dass die Zelle an einem Ort stillgehalten wird, können damit nicht durchgeführt werden. Um einzelne Paramecien-Zellen an ihrem Platz zu halten,

gibt es mehrere Methoden. Erstens gibt es Techniken, die zu einer vorübergehenden oder vollständigen Immobilisierung der Paramecien-Zellen durch Zugabe biochemischer Substanzen führen. Die Zugabe von Ethanol (5 % v/v) führt zu einem vollständigen Verlust der Zilien und damit zu einer vollständigen Immobilisierung [124]. Dies führt jedoch zu einer massiven Störung der Physiologie der Paramecien-Zellen. Eine andere Methode ist die Immobilisierung der Paramecien-Zellen auf einem Substrat, z. B. mit der biochemischen Substanz Cell-Tak [125]. Diese Methode ist weniger schädlich für die Paramecien-Zellen, aber auch nicht reversibel. Die Verwendung elektrischer oder magnetischer Felder ist ein weiterer Ansatz für die kontaktlose Manipulation und das Einfangen von Paramecien-Zellen [126–128]. Es gibt auch mikrofluidische Ansätze. Lutz *et al.* beschrieben eine neue Methode, die einen sanften Sekundärstrom verwendet, um einzelne Paramecien-Zellen, einschließlich beweglicher Paramecien-Zellen, an vorhersehbaren Stellen in 3D zu fangen und freizusetzen [119]. Eine andere Methode verwendet Filter mit Löchern, die kleiner als die Probe sind, um die Paramecien-Zellen durch Unterdruck mechanisch auf den Boden zu befördern [129].

In dieser Arbeit wird ein mikrofluidischer Kanal entwickelt. Dieser ermöglicht es, einzelne Paramecien-Zellen reversibel in kleinen Kompartimenten einzufangen und das Schwimmverhalten über mehrere Minuten zu beobachten und zu analysieren. Vor und nach dem reversiblen Einschluss ist die Schwimmgeschwindigkeit vergleichbar, was darauf hindeutet, dass der Einschluss keine großen Auswirkungen auf das Zellverhalten hat. Weiterhin sind damit optische Messungen der Membranordnung an lebenden Paramecien-Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs 6-Lauryl-2-Dimethylaminonaphthalin (Laurdan) möglich.

5.2 Materialien und Methoden

Kultivierung von Paramecien-Zellen

Paramecien-Zellen werden in einem Heuaufgussmedium mit Reiskörnern bei 23 °C kultiviert. Ungefähr die Hälfte des Mediums wird alle vier Wochen ausgetauscht. Zur Herstellung des Heuaufgussmediums wird ca. 0.5 g Heu in kleinen Stücken in 500 ml Leitungswasser für 20 min gekocht und danach offen auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wird das Heu entfernt und das Medium mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Das fertige Medium wird im Kühlschrank aufbewahrt. Vor den Experimenten werden

die Paramecien-Zellen bei 800 g für zwei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in eine Pufferlösung mit 1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 0.1 mM MgSO₄ und 1.5 mM MOPS² überführt.

Mikrofluidisches Fangen und Zell-Tracking

Die Mikrokanäle bestehen aus einer Schicht Polydimethylsiloxan (PDMS)³ und werden durch Standard-Lithografie-Verfahren hergestellt (siehe *Anhang A.5*). Der PDMS-Block wird mit Hilfe eines Plasmaätzverfahrens dauerhaft auf einen Glasobjektträger geklebt. In den Experimenten werden drei verschiedene Kanaldesigns verwendet. Der Flüssigkeitsstrom wird entweder mit einer Spritzenpumpe⁴ oder mit Höhenreservoirs erzeugt. Ein inverses Lichtmikroskop⁵ wird zur Beobachtung des Schwimmverhaltens und der Einfangvorgänge verwendet. Die Videos werden mit einer CCD-Kamera⁶ oder einer Hochgeschwindigkeitskamera⁷ aufgenommen. Videos vom Schwimmverhalten der Paramecien-Zellen werden mit dem Public-Domain-Softwarepaket ImageJ⁸ analysiert [130]. Mit Hilfe eines Makroskripts kann die Position der Paramecien-Zellen auf jedem Bild vollautomatisch bestimmt werden.

DLS Messungen mit Paramecien-Zellen

Dynamische Lichtstreuung wird in der Regel dazu verwendet den hydrodynamischen Durchmesser von Teilchen zu bestimmen. Dabei wird das Streulicht eines Laserstrahls gemessen und das Signal zeitlich mit sich selbst korreliert. Das Grundprinzip von DLS Messungen beruht auf der Messung von Fluktuationen der Streuintensität von monochromatischem Licht unter einem festen Streuwinkel. Diese Fluktuationen kommen aufgrund der Teilchenbewegung zustande. Zur Auswertung dieser Fluktuationen wird eine Autokorrelationsfunktion aus der Zeitabhängigkeit der Intensitätsschwankungen berechnet. Abhängig von ihrer Größe bewegen sich Teilchen in Lösung aufgrund von Diffusion unterschiedlich schnell. Dadurch erhält man für verschiedene Partikelgrößen unterschiedliche Abfallzeiten der Autokorrelationsfunktion. Aus diesen Abfallzei-

² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

³ Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, Midland, MI, USA

⁴ PHD ULTRA, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA

⁵ Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

⁶ ORCA-05G, Hamamatsu, Hamamatsu, Japan

⁷ FASTCAM Mini UX50, Photron, Ottobrunn, Deutschland

⁸ 2.1.0, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

ten lässt sich dann die Größe der Teilchen ermitteln. In dieser Arbeit wird das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung dazu verwendet, um die Schwimmggeschwindigkeit des Mikroorganismus *Paramecium caudatum* im Ensemble zu untersuchen. Dazu wird 100 µl Probenvolumen mit Paramecien-Zellen (siehe oben) in entsprechende DLS-Küvetten überführt. Bei einer Messreihe werden mehrere Temperaturrampen durchlaufen, wobei die Temperatur in Schritten von $\Delta T = 5\text{ °C}$ erhöht bzw. erniedrigt wird. Die Temperaturrampe wird dabei für jede Probe in beiden Richtungen durchlaufen ($T_1 \rightarrow T_2 \rightarrow T_1$). Die genauen Messparameter finden sich in *Anhang A.5*.

Korrelationsmessungen mit Paramecien-Zellen

Das Konzept der dynamischen Lichtstreuung lässt sich auch in der Mikroskopie anwenden. Hier ist es bekannt als Differentielle Dynamische Mikroskopie (DDM). DDM eignet sich dazu die Geschwindigkeit von Teilchen oder Organismen, die sich schwer nachverfolgen lassen, zu bestimmen [131–135]. Dabei muss die Zeitskala, mit der Bilder aufgenommen werden, deutlich geringer sein, als die Zeitskala, auf der die Bewegung, die man beobachten möchte, abläuft. Angelehnt an Techniken die DLS und DDM verwenden, wird hier die Schwimmggeschwindigkeit von Mikroorganismen im Ensemble mit Korrelationsmessungen untersucht. Dazu werden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera Videos mit einer Bildrate von 250 Bildern pro Sekunde aufgenommen. Die einzelnen Bilder werden dann miteinander korreliert. Im Vergleich zu DLS, bei der nur eine Zelle zu einem Zeitpunkt zum Signal beiträgt, tragen hier alle im Ausschnitt befindlichen Paramecien-Zellen bei. Man erhält also direkt eine Mittelung über das Ensemble von Paramecien-Zellen. In dieser Arbeit wird eine Autokorrelationsfunktion unter der Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten berechnet:

$$\text{Autokor}(t) = \text{Cor}(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (5.1)$$

wobei x und y eindimensionale Vektoren sind, die die Intensität aller Pixel im Bild zum Zeitpunkt t_0 bzw. $t_0 + \Delta t$ repräsentieren.

5.3 Mikrofluidische Einzelzellmessungen

In Anlehnung an bestehende mikrofluidische Fallen für Lipidvesikel und Zellen [136] wird ein Setup entwickelt, mit dem Paramecien-Zellen reversibel in kleinen Kompartimenten eingefangen werden können. Damit lassen sich Zellfunktionen beobachten, wie z. B. das Schwimmverhalten. Es werden aber auch Messungen möglich, bei denen die Paramecien-Zellen relativ starr an einer Position gehalten werden müssen, wie es oft bei Fluoreszenzmessungen der Fall ist.

5.3.1 Fallenentwicklung

Abb. 5.2 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Entwicklungsstadien des Aufbaus. Begonnen wird mit einem Aufbau mit einer Reihe von Fallen und einem freien Raum, in dem das Schwimmverhalten der Mikroorganismen beobachtet werden kann (siehe *Abb. 5.2 a*). Die Fallen selbst haben an der engsten Stelle einen Durchmesser von 10 μm . Durch Anlegen eines Druckgradienten werden die Paramecien-Zellen in die Fallen gedrückt. Nach Ablassen des Drucks können die Paramecien-Zellen die Fallen wieder verlassen. Allerdings ist die Fangeffizienz hier sehr gering. Die meisten Paramecien-Zellen können die Fallen umgehen. *Abb. 5.2 b* zeigt die zweite Version der Fangvorrichtung, bei der es keine Lücken zwischen den Fallen gibt. Dadurch wird verhindert, dass die Paramecien-Zellen eine Falle umgehen, was zu einer höheren Fangeffizienz führt. Außerdem ist der Schwimmbereich mit einer Barriere versehen, sodass die Paramecien-Zellen nicht einfach aus dem Sichtfeld entkommen können. *Abb. 5.2 c* zeigt das endgültige Design der Fangvorrichtung. Die Falle hat nun auf beiden Seiten eine Barriere und ist symmetrisch. Wenn ein kurzer Druckgradient erzeugt wird, werden die Paramecien-Zellen in die Falle gezwungen und können so auch wieder freigesetzt werden. Ein großer Vorteil ist, dass die Paramecien-Zellen nicht von selbst aus der Falle entkommen können, wenn der Druckgradient verringert wird. Außerdem kann die Vorrichtung von beiden Seiten genutzt werden. Der Druckgradient wird auf zwei Arten erzeugt. Im ersten Fall wird eine Spritzenpumpe eingesetzt, im zweiten Fall werden Höhenreservoirs verwendet. Bei Verwendung der Spritzenpumpe wird eine Flussrate von etwa 1 ml/h verwendet. Sobald die Zelle in eine Falle eintritt, wird der Fluss gestoppt, um zu verhindern, dass die Zelle durch die Falle geschoben wird. Sehr schnelle Änderungen sind jedoch experimentell schwierig zu bewerkstelligen. Mit dem Höhenreservoir ergeben sich mehrere Vorteile. Erstens können Druckän-

derungen kontinuierlich und sehr schnell durch einfache Änderung der Höhe erreicht werden. Außerdem ist es möglich, sowohl negative als auch positive Druckgradienten in beide Richtungen anzuwenden. Dies ermöglicht ein gleichzeitiges Drücken und Ziehen an den Paramecien-Zellen. Nach Tsai *et al.* [137] kann dies die Verformung der Paramecien-Zellen beeinflussen. In den Experimenten stellte sich heraus, dass eine Kombination aus Drücken und Ziehen am besten funktioniert.

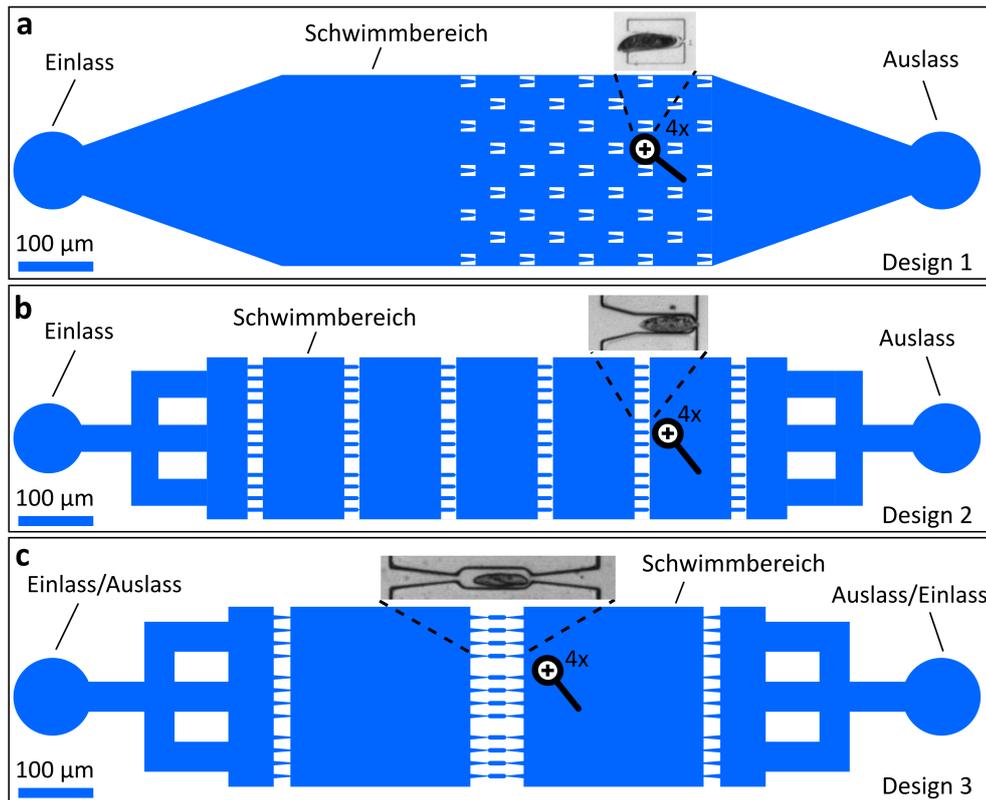


Abb. 5.2: Entwicklung einer mikrofluidischen Fangvorrichtung für den mobilen Mikroorganismus *Paramecium caudatum*. a) Erster Entwurf mit einer Anordnung von Fallen und freiem Raum, in dem das Schwimmverhalten des Mikroorganismus verfolgt werden kann. b) Zweite Ausführung der Vorrichtung, bei der es keinen freien Raum zwischen den Fallen gibt. Außerdem ist der Schwimmbereich mit einer Barriere versehen. c) Endgültiges Design der Fallenvorrichtung. Die Falle hat auf beiden Seiten eine Barriere und ist symmetrisch. Die Höhe der Kanäle beträgt jeweils $h = 50 \mu\text{m}$. (Abb. entnommen aus [116])

Abb. 5.2 a zeigt eine Überlagerung verschiedener Zeitschritte während eines Versuchs eine Paramecium-Zelle mit *Design 1* einzufangen. Wenn ein Druckgradient erzeugt wird, bewegen sich die meisten Paramecien-Zellen an den Fallen vorbei, da sie nicht

parallel zur Strömungsrichtung ausgerichtet sind, wenn sie sich einer Falle nähern. Im Folgenden bewegen sich die Paramecien-Zellen mäanderförmig durch den Fallenbereich hindurch. Nur in seltenen Fällen bleibt eine Zelle tatsächlich in einer Falle stecken. *Abb. 5.2 b* und *c* zeigt den Fangprozess für die beiden anderen Designs. Wenn hier ein Druckgradient erzeugt wird, werden die Paramecien-Zellen von ihrem ursprünglichen Schwimmweg abgelenkt und in eine Falle gezwungen. Bevor der Druckgradient erzeugt wird, schwimmt die Zelle seitwärts. Nach Einwirkung des Druckgradienten werden die Paramecien-Zellen nach unten in Richtung der Fallen beschleunigt. Dies ist besonders in *Abb. 5.2 c* an der durch die höhere Geschwindigkeit verursachten Bewegungsunschärfe zu erkennen.

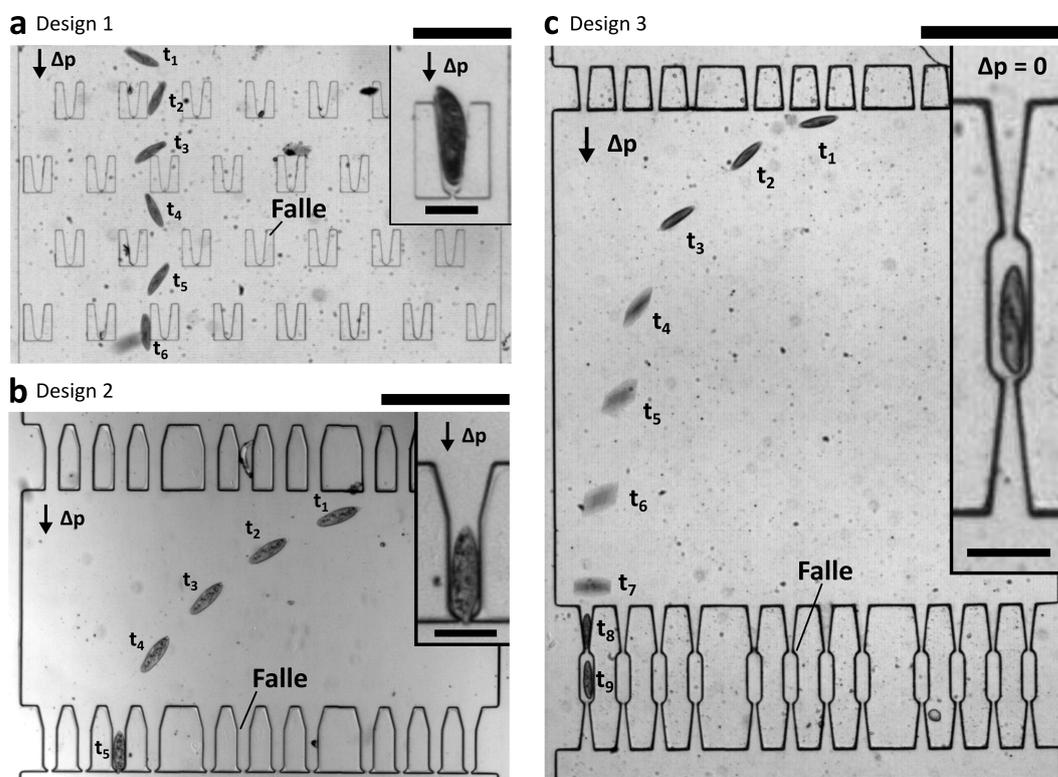


Abb. 5.3: Verschiedene mikrofluidische Fallendesigns für den Mikroorganismus *Paramecium caudatum*: a) Die meisten Zellen können die Fallen passieren. Nur in seltenen Fällen bleibt eine Zelle in einer Falle stecken. b) und c) Wenn ein Druckgradient angelegt wird, werden die Zellen von ihrem ursprünglichen Schwimmweg abgelenkt und in eine Falle gezwungen. Maßstabsbalken: 500 μm und 100 μm (Zoom). (Abb. entnommen aus [116])

Ein wesentlicher Unterschied der in *Abb. 5.2 b* gezeigten Falle zu der in *Abb. 5.2 c* ist, dass sie nicht auf beiden Seiten verengt ist. In diesem Fall muss der Druckgradient konstant gehalten werden, um die Paramecien-Zellen in der Falle zu halten. Bei einer beidseitig verengten Falle bleiben die Paramecien-Zellen auch dann gefangen, wenn der Druck verringert wird. Dieses Verhalten wird in *Abb. 5.3 a* und *b* durch die Verfolgung der Schwimmgeschwindigkeit während eines Fangvorgangs für beide Designs demonstriert. Ohne Druckgradient können die Paramecien-Zellen frei im Kanal schwimmen. Wenn ein Druckgradient erzeugt wird, werden die Paramecien-Zellen in die Fallen gezwungen und die Geschwindigkeit sinkt auf 0 (roter Bereich). Nach Reduzieren des Druckgradienten kann die Zelle für Design 2 aus der Falle entkommen. Dies kann an der Geschwindigkeit abgelesen werden, die nicht mehr 0 beträgt. Bei Design 3 bleibt die Geschwindigkeit bei $v = 0$, obwohl kein Druckgradient mehr besteht. Die Zelle befindet sich also immer noch in der Falle.

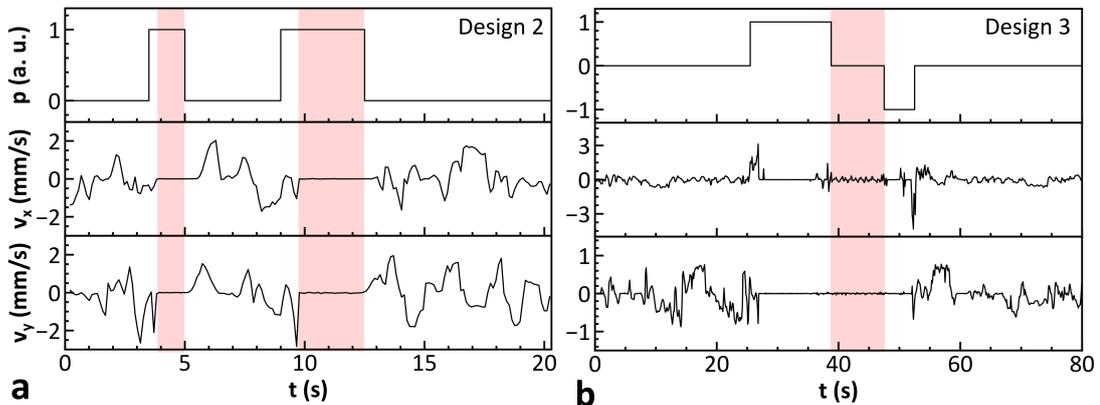


Abb. 5.4: Beobachtung der Schwimmgeschwindigkeit von Paramecien-Zellen in einer mikrofluidischen Fangvorrichtung. a) Ohne Druckgradient können die Zellen frei im Kanal schwimmen. Wenn ein Druckgradient angelegt wird, werden die Zellen in die Fallen gezwungen und die Geschwindigkeit sinkt auf 0 (roter Bereich). Wenn die Falle nur auf einer Seite verengt ist, muss der Druckgradient aufrechterhalten werden, um die Zellen in der Falle zu halten. b) Wenn die Falle auf beiden Seiten verengt ist, bleiben die Zellen auch ohne Druckgradient (roter Bereich) gefangen. (Abb. entnommen aus [116])

Abb. 5.5 zeigt eine Zeitreihe des Mikroorganismus *Paramecium caudatum* beim Durchgang durch eine mikrofluidische Falle. Wenn ein Druckgradient aufrechterhalten wird, kann es passieren, dass eine Zelle durch eine Falle gedrückt wird. Zu Beginn ist nur ein kleiner Teil der Zelle durch die Falle geschoben. Mit fortschreitender Zeit wird immer mehr von der Zelle auf die andere Seite gedrückt. Nach etwa 14 s ist fast die gesamte Zelle durch die Falle gelangt. Im Folgenden kann die Zelle die Falle passieren, was

hier nicht mehr gezeigt ist. Die Falle hat an ihrer engsten Stelle einen Durchmesser von $5\ \mu\text{m}$ und die Zelle an ihrer größten Stelle einen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$. Das heißt, dass die Zelle um den Faktor 10 komprimiert wird, ohne dass eine optisch erkennbare Beschädigung entsteht. Dieser Vorgang demonstriert eindrucksvoll die extrem hohe Verformbarkeit der Zelle. Dies macht es allerdings schwierig, die Paramecien-Zellen über einen längeren Zeitraum in der Falle mit Design 2 zu halten, was ein weiterer Grund ist, warum das Design 3 vorteilhaft ist.

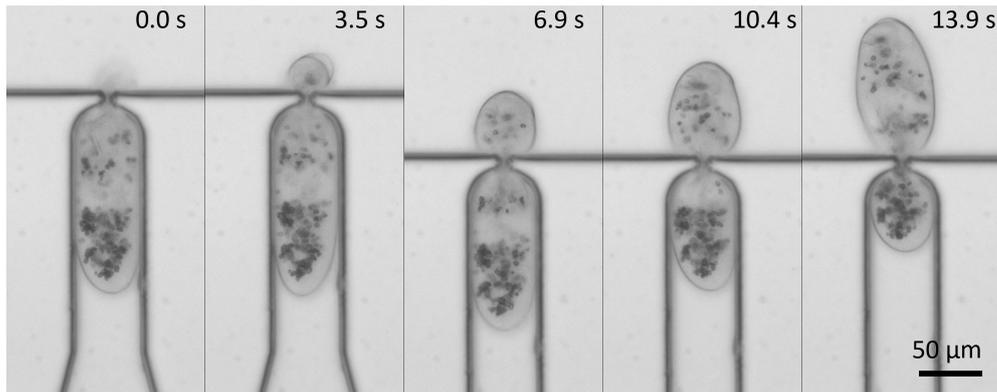


Abb. 5.5: Zeitreihe des Mikroorganismus *Paramecium caudatum* beim Durchgang durch eine mikrofluidische Falle. Wenn ein kontinuierlicher Druckgradient angelegt wird, wird die Zelle durch eine Falle geschoben, die an ihrer kleinsten Stelle einen Durchmesser von $5\ \mu\text{m}$ hat. Dieser Vorgang demonstriert eindrucksvoll die extrem hohe Verformbarkeit der Zelle. (Abb. entnommen aus [116])

Abb. 5.6 a zeigt eine Zeitreihe der Zelle, die in einer Mikrofluidikfalle gefangen ist. Die Zelle kann in der Falle auf und ab schwimmen, auch wenn die Abmessungen der Falle nur geringfügig breiter und höher sind als die Ausdehnung der Zelle selbst. Aufgrund ihrer extrem hohen Verformbarkeit ist die Zelle in der Lage, sich in den Fallenenden zu verbiegen und so die Richtung zu ändern. Genau im Fallenende ist die Zelle vollständig gefaltet. In der Mitte der Falle ist die Zelle wieder gestreckt. Dies ist ein weiteres Beispiel, welches die extrem hohe Verformbarkeit der Paramecien-Zellen demonstriert. *Abb. 5.6 b* zeigt die Position in der Falle und die entsprechende Größe der Zelle. In der Mitte der Falle ist die Zelle gestreckt, dies entspricht ihrer normalen Größe. Am Faltenende ist sie gefaltet, was durch eine verringerte Größe ersichtlich wird. Die Größe der Zelle ist also ein Maß dafür, wie stark die Zelle gekrümmt ist und damit wo sie sich in der Falle befindet. Dieses Telexperiment könnte dazu verwendet werden um reversibel und irreversibel den Einfluss diverser Substanzen oder durch Variation der Umgebungsbedingungen die Verformbarkeit der Paramecien-Zellen zu analysieren.

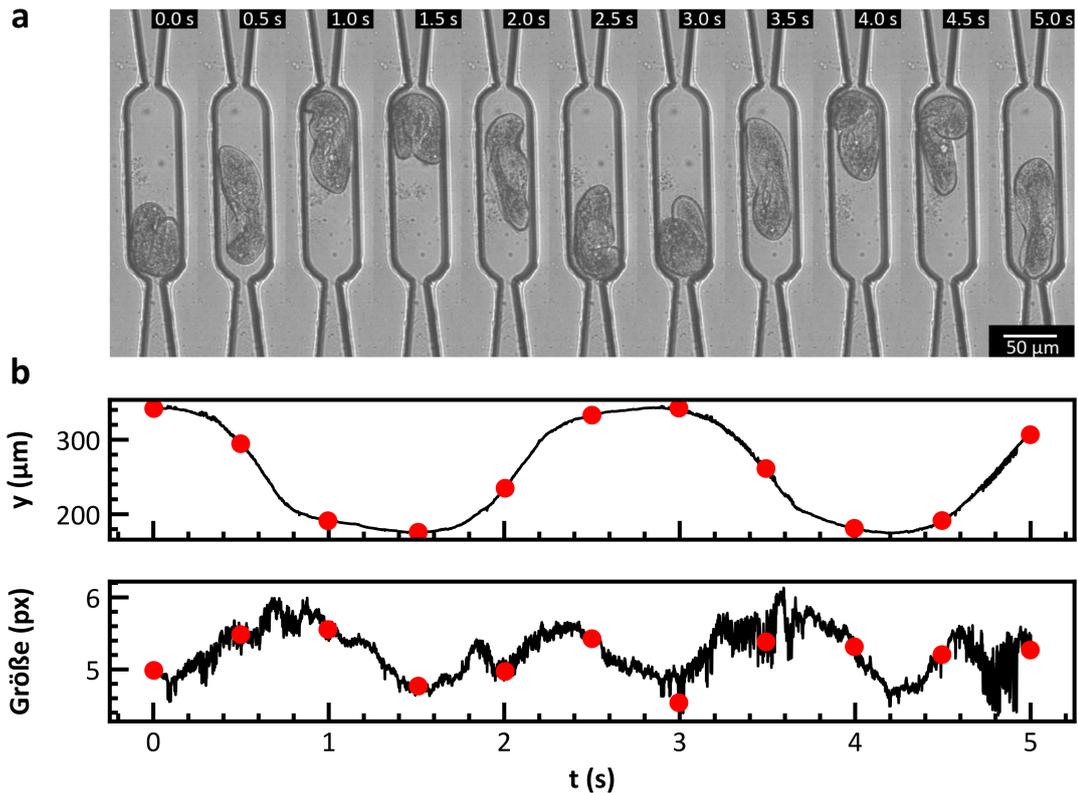


Abb. 5.6: Paramecium-Zelle gefangen in einer Mikrofluidikfalle. a) Zeitreihe der Bewegung der Zelle in einer Mikrofluidikfalle. Die Zelle kann in der Falle auf und ab schwimmen. b) Position und Größe der Paramecium-Zelle in der Falle gemessen als Projektionsfläche in Pixel. (Abb. entnommen aus [116])

5.3.2 Beobachtung des Schwimmverhaltens

In einem nächsten Schritt wird das Schwimmverhalten eines einzelnen Mikroorganismus in der Mikrofluidikvorrichtung beobachtet. *Abb. 5.7 a* zeigt den Schwimmweg eines einzelnen Mikroorganismus, der von einem Objekterkennungsalgorithmus verfolgt wird. Aufgrund der begrenzten Fläche treten viele Richtungsänderungen auf. *Abb. 5.7 b* zeigt die Geschwindigkeitsverteilung der sich bewegenden Zelle mit zwei Peaks. Der linke Peak kann den Richtungswechseln zugeschrieben werden. Der höhere Peak wird dem Geradeaus-Schwimmen zugeschrieben. Da das Geradeaus-Schwimmen von Interesse ist, wird ein Filterschema eingeführt. *Abb. 5.7 c* zeigt die gefilterten Kurven. Hierbei wird die Gesamtrajektorie in mehrere Trajektorien zerlegt. Dies erfolgt an den Punkten der Trajektorie, bei denen die Richtung um 45° oder mehr verändert wird.

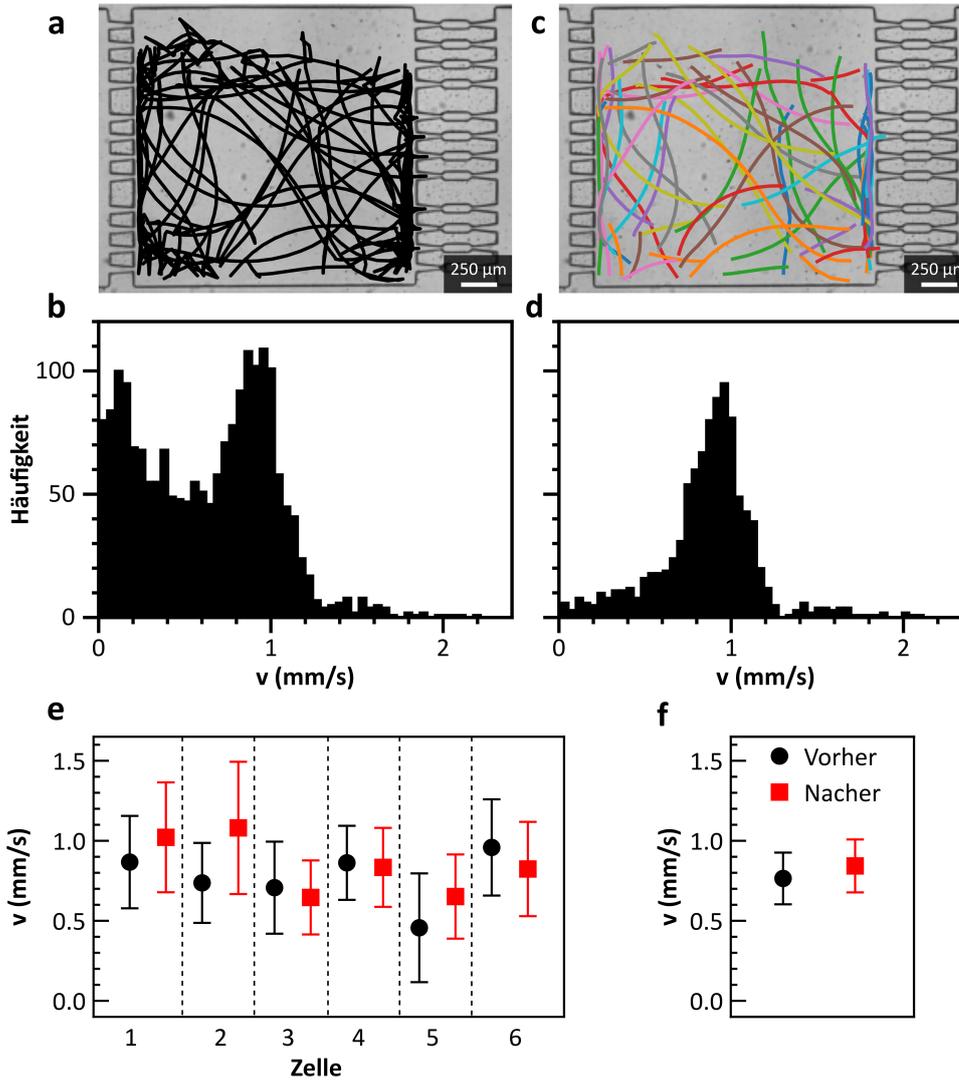


Abb. 5.7: Verfolgung des Schwimmverhaltens einzelner Mikroorganismen und Vergleich des Schwimmverhaltens vor und nach dem Einfangen. a) Der Schwimmweg eines einzelnen Mikroorganismus, der von einem Objekterkennungsalgorithmus verfolgt wird. b) Die Geschwindigkeitsverteilung der sich bewegenden Zelle zeigt zwei Peaks. Der linke Peak kann den Richtungswechseln zugeschrieben werden. c) Um den linken Peak herauszufiltern, wurde ein Filterschema, wie im Text beschrieben, eingeführt. d) Die berechnete Geschwindigkeitsverteilung der gefilterten Trajektorien ist nun nahezu normalverteilt und zeigt ihr Maximum bei etwa 1 mm/s. e) Mittlere Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen, beobachtet über einige Minuten vor (schwarz) und nach (rot) dem Einfangen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. f) Mittlere Geschwindigkeit aller Zellen vor und nach dem Einfangen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ($n = 6$). (Abb. entnommen aus [116])

Darüber hinaus werden nur Trajektorien einer Gesamtlänge von mindestens 200 μm betrachtet. Die berechnete Geschwindigkeitsverteilung der gefilterten Trajektorien ist nun annähernd normalverteilt und zeigt ihr Maximum bei etwa 1 mm/s (siehe *Abb. 5.7 d*).

Voraussetzung für eine weiterführende Interpretation der mittels dieser Fallen erhobenen Daten ist die Reversibilität des Fangprozesses mit Bezug auf das beobachtete Verhalten der Paramecien-Zellen. Daher wird das Schwimmverhalten vor und nach dem Fangen beobachtet. *Abb. 5.7 e* zeigt die mittlere Schwimgeschwindigkeit einzelner Paramecien-Zellen, die über einen Zeitraum von mindestens drei Minuten vor (schwarz) und nach (rot) dem Fangen beobachtet wird. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. In einigen Fällen ist die Geschwindigkeit nach dem Einfangen höher, in anderen niedriger. Es gibt keinen klaren Trend, dass sich die Schwimgeschwindigkeit nach dem Einfangen deutlich ändert. *Abb. 5.7 f* zeigt die mittlere Geschwindigkeit aller Paramecien-Zellen vor und nach dem Einfangen. Die Fehlerbalken zeigen auch hier die Standardabweichung. Innerhalb des Fehlerbereichs ist keine Veränderung der Schwimgeschwindigkeit zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das Einfangen keine großen Auswirkungen auf das Verhalten der Paramecien-Zellen hat.

5.4 Ensemblemessungen

Nachdem im vorigen Abschnitt aufgezeigt wurde, wie mit Hilfe einer mikrofluidischen Falle Einzelzellmessungen mit dem Mikroorganismus *Paramecium caudatum* möglich sind, wird in diesem Abschnitt eine alternative Methode zur Bestimmung von Schwimgeschwindigkeiten von Mikroorganismen im Ensemble vorgestellt. Dazu werden Korrelationsmessungen verwendet, bei denen ein gemessenes Signal zeitlich mit sich selbst korreliert wird.

5.4.1 DLS Messungen mit Paramecien-Zellen

Zunächst werden DLS Messungen mit Paramecien-Zellen durchgeführt. Mittels DLS lässt sich die Größe von Teilchen in einer Suspension bestimmen. Das Grundprinzip bei der dynamischen Lichtstreuung beruht darauf, dass eine Probe mit einem Laserstrahl durchleuchtet wird und der gestreute Anteil des Laserstrahls unter einem bestimmten Winkel gemessen wird. Das Signal des Streulichts wird zu einem Zeitpunkt t mit einem Zeitpunkt $t + \tau$ korreliert. Dadurch erhält man eine Autokorrelationsfunktion, die beispielsweise folgende Form haben kann [138, 139]:

$$\text{Autokor.}(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t) \cdot x(t+\tau) dt, \quad (5.2)$$

wobei $x(t)$ die Intensität zum Zeitpunkt t und $x(t+\tau)$ die Intensität zum Zeitpunkt $t+\tau$ ist. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung findet in einer Flüssigkeit eine ständige Bewegung von Teilchen statt. Aus der ständigen Bewegung der Teilchen resultieren zeitliche Fluktuationen des gemessenen Streulichts. Abhängig von der Zeitskala, auf der diese Fluktuationen ablaufen, fällt die Autokorrelationsfunktion unterschiedlich schnell ab. In vielen Fällen, beispielsweise für eine monodisperse Suspension starrer, kugelförmiger Partikel ergibt sich eine exponentiell abfallende Autokorrelationsfunktion:

$$\text{Autokor}(\tau) = A \cdot e^{-\delta\tau} + B, \quad (5.3)$$

mit A und B Fitkonstanten und δ der Abklingkonstanten bzw. $\tau_r = 1/\delta$ der Relaxationszeit der Fluktuationen. Es lässt sich zeigen, dass $\delta \propto D$ gilt. D ist dabei die Diffusionskonstante, wobei für kugelförmige Teilchen die Stokes-Einstein-Gleichung gilt [140]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (5.4)$$

mit k_B der Boltzmann Konstanten, η der dynamischen Viskosität und r dem Teilchenradius. Der Abfall der Autokorrelationszeiten hängt von D und damit direkt von der Geschwindigkeit der Teilchen ab. Für kleine Teilchen, die sich schneller bewegen als große Teilchen, fällt das Signal schneller ab. Umgekehrt fällt das Signal für große Teilchen langsamer ab. Dieses Prinzip wird zur Messung der Geschwindigkeit von Paramecien-Zellen mittels dynamischer Lichtstreuung genutzt.

Abb. 5.8 a zeigt die Autokorrelationsfunktion gegenüber der Zeit für eine Probe mit Paramecien-Zellen bei zwei Temperaturen. Es lassen sich zwei exponentielle Abfälle der Autokorrelationsfunktion beobachten. Eine obere Schranke, wann das Signal nicht mehr mit sich selbst korreliert sein sollte, kann aus der Länge der Paramecien-Zellen und deren Schwimmggeschwindigkeit abgeschätzt werden ($t = l_{\text{Para}}/v$).

Nimmt man eine Länge von $l_{\text{Para}} = 150 \mu\text{m}$ und eine Geschwindigkeit im Bereich von $v_u = 0.15 \text{ mm/s}$ bis $v_o = 2 \text{ mm/s}$ an, ergibt sich als untere Schranke $t_u = 0.075 \text{ s}$ und als obere Schranke $t_o = 1 \text{ s}$. Dies entspricht dem grau hinterlegten Bereich im Diagramm.

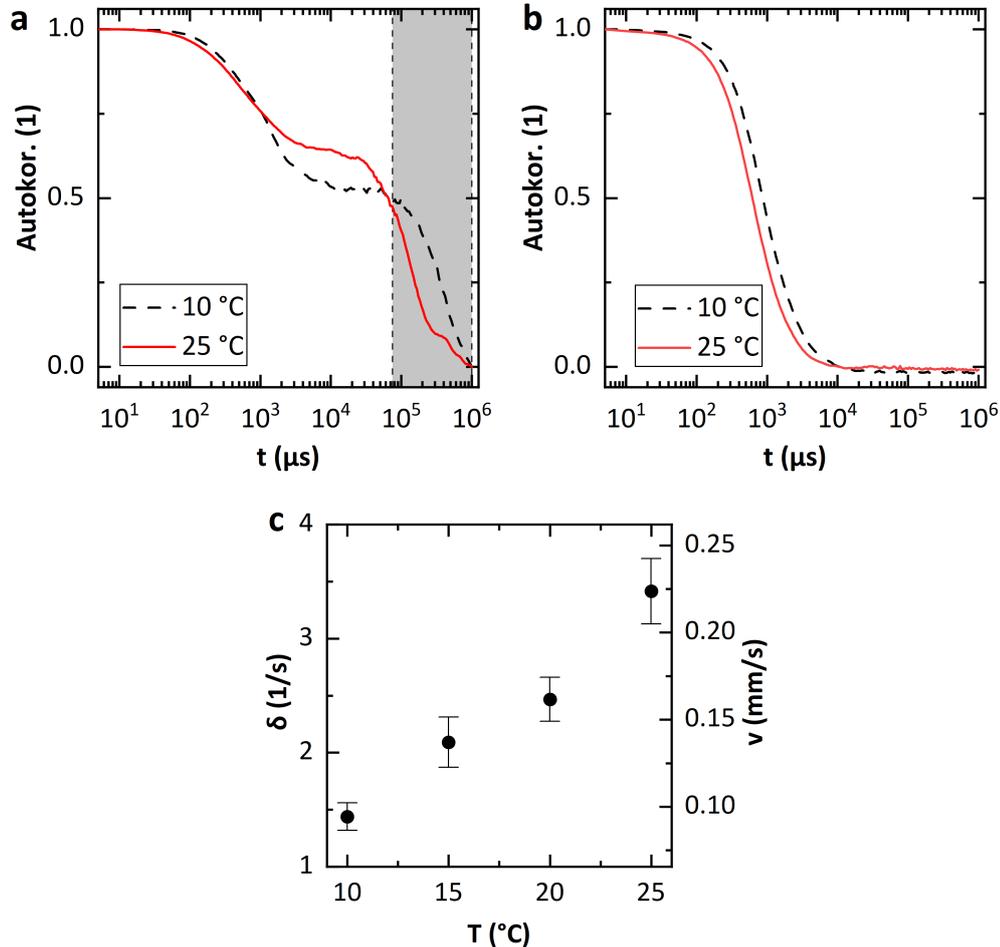


Abb. 5.8: DLS Messung mit Paramecien-Zellen. a) Autokorrelationskurve für eine Probe mit Paramecien-Zellen. Diese zeigt zwei zeitlich getrennte exponentielle Abfälle. b) Autokorrelationskurve für eine Probe ohne Paramecien-Zellen. Diese zeigt hingegen nur einen exponentiellen Abfall. c) Abhängigkeit der Abklingkonstanten δ der angefitzten Autokorrelationskurve von der Temperatur (Fehler entspricht Standardfehler des Mittelwerts, $n = 4$). Mit zunehmender Temperatur nimmt die Abklingkonstante zu. Auf der rechten Y-Achse ist die Geschwindigkeit, die aus Simulationen abgeleitet wird (siehe Gl. 5.5), aufgetragen.

Der erste Abfall kann nicht von den Mikroorganismen verursacht sein, da dieser deutlich zu früh erfolgt. Der zweite Abfall liegt jedoch im zeitlich erwarteten Bereich. Als Kontrolle wird zusätzlich eine Messung durchgeführt, bei der die Probe nur Kulturmedium aber keine Mikroorganismen enthält (siehe *Abb. 5.8 b*). Hier lässt sich nur

ein Abfall beobachten. Dieser entspricht zeitlich dem ersten Abfall. Damit lässt sich schlussfolgern, dass einerseits der erste Abfall auf Teilchen – evtl. Bakterien – im Kulturmedium zurückzuführen ist und andererseits der zweite Abfall den Mikroorganismen zugeordnet werden kann. Weiterhin ist eine zeitliche Verschiebung des Abfalls der Autokorrelationsfunktion zwischen den beiden Temperaturen zu beobachten. Der Abfall der Autokorrelationsfunktion erfolgt bei der niedrigeren Temperatur zu einem späteren Zeitpunkt, was auf eine langsamere Schwimmggeschwindigkeit hindeutet. Das hier gezeigte Ergebnis legt nahe, dass sich mit DLS Messungen die Schwimmggeschwindigkeit der Mikroorganismen bestimmen lässt. Die Temperaturabhängigkeit von der Schwimmggeschwindigkeit wird daher systematisch untersucht. Dazu wird die Autokorrelationsfunktion nur im Bereich von $t = 10^4 \mu\text{s}$ bis $t = 10^6 \mu\text{s}$ betrachtet, da der Abfall, der von den Paramecien-Zellen verursacht wird, in diesem Bereich liegt. Zur quantitativen Auswertung wird die Autokorrelationsfunktion mit einer abfallenden Exponentialfunktion angefitet (siehe 5.3). In *Abb. 5.8 c* ist der Median der Abklingkonstanten δ für vier unabhängige Messreihen gegenüber der Temperatur aufgetragen (Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts, $n = 4$). Bei jeder Messreihe werden mehrere Temperaturrampen durchlaufen, wobei die Temperatur in Schritten von $\Delta T = 5 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht bzw. erniedrigt wird. Die Temperaturrampe wird dabei für jede Probe in beiden Richtungen durchlaufen ($T_1 \rightarrow T_2 \rightarrow T_1$). Wie zu sehen ist, nimmt die Abklingkonstante δ mit zunehmender Temperatur zu. Das heißt, das Signal fällt schneller ab. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Mikroorganismen schneller bewegen. Dies steht im Einklang damit, dass Paramecien-Zellen bei größeren Temperaturen größere Schwimmggeschwindigkeiten erreichen.

5.4.2 Korrelationsmessungen mit Paramecien-Zellen

Das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung lässt sich auch in der Mikroskopie anwenden. Mit Korrelationsmessungen (siehe Kapitel 5.2) lässt sich die Bewegung von Teilchen, die sich schwer nachverfolgen lassen, im Ensemble untersuchen. Die Bewegung von Teilchen oder wie in dieser Arbeit von Paramecien-Zellen wird über einen gewissen Zeitraum beobachtet. Dabei ist zu beachten, dass die Bildaufnahmezeit und die Beobachtungszeit an die Bewegungsgeschwindigkeit angepasst sind. *Abb. 5.9 a* zeigt eine beispielhafte Mikroskopaufnahme aus einer Videosequenz mit einer Aufnahmezeit von 250 fps. Es befinden sich eine Vielzahl von Paramecien-Zellen im Beobachtungsausschnitt. Die Bewegung der Paramecien-Zellen kann veranschaulicht werden, indem für

jedes Pixel des Bildausschnitts die Standardabweichung von einer Vielzahl von Bildern der Videosequenz berechnet und als normierter Helligkeitswert dargestellt wird (siehe *Abb. 5.9 b*). Der Großteil der Paramecien-Zellen bewegt sich geradlinig oder auf leicht gekrümmten Trajektorien. Anhand dieser Videosequenzen wird eine Autokorrelationskurve unter Verwendung von *Gl. 5.1* berechnet (siehe *Abb. 5.9 c*). Im Wesentlichen wird dabei die Korrelation zwischen einem Bild zu einem Zeitpunkt $t_0 = 0$ mit einem Bild zu einem späteren Zeitpunkt $t_1 = t_0 + \Delta t$ berechnet. *Abb. 5.9 d* zeigt die aus den Autokorrelationskurven ermittelte Abklingkonstante δ in Abhängigkeit von der Temperatur durch Anwenden einer Fit-Funktion (siehe *Gl. 5.3*).

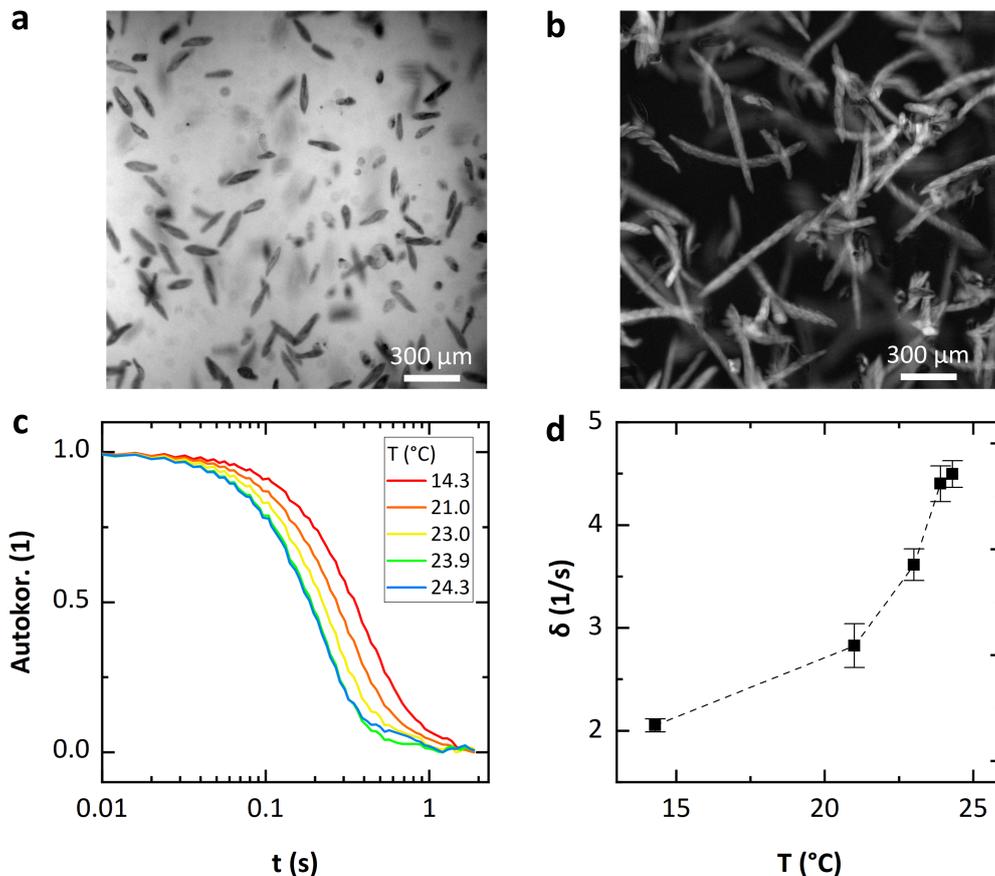


Abb. 5.9: Bestimmung der Abklingkonstanten δ mittels Korrelationsmessungen. a) Beispielhafte Mikroskopaufnahme mit Paramecien aus einer Videosequenz. b) Standardabweichung der Pixel über mehrere Aufnahmen der Videosequenz. Dadurch wird die Bewegung der Paramecien veranschaulicht. c) Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der Temperatur. d) δ in Abhängigkeit von der Temperatur. δ nimmt mit zunehmender Temperatur zu. Das mit sich selbst korrelierte Signal fällt folglich schneller ab, da sich die Zellen schneller bewegen. Auf der rechten Y-Achse ist die Geschwindigkeit, die aus Simulationen abgeleitet wird, aufgetragen (siehe *Gl. 5.5*).

Mit zunehmender Temperatur nimmt δ zu. Da sich die Paramecien-Zellen schneller bewegen, fällt das mit sich selbst korrelierte Signal schneller ab. Die Werte der Abklingkonstanten stimmen gut mit den Werten für die entsprechenden Temperaturen, die mittels DLS bestimmt wurden, überein. Offen bleibt noch, welcher Zusammenhang zwischen der Zeitkonstanten und der Geschwindigkeit besteht. Um diesem Zusammenhang zu beleuchten, wird die Schwimmbewegung der Paramecien-Zellen simuliert und die simulierten Daten analog zu den Messungen ausgewertet. In der Simulation kann die Geschwindigkeit vorgegeben werden und somit der Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit und der Zeitkonstanten extrahiert werden. *Abb. 5.10 a* zeigt beispielhaft ein Bild aus der Simulation. Hier werden die Paramecien-Zellen als Ellipsen mit einer großen Halbachse $a = 150 \mu\text{m}$ und einer kleinen Halbachse $b = 30 \mu\text{m}$ angenommen. Zur Vereinfachung wird die Bewegung als geradlinig angenommen. Die Schwimmrichtung wird zu Beginn zufällig vorgegeben. Dies lässt sich in *Abb. 5.10 b* erkennen. Die Bewegung der Paramecien-Zellen wird hier veranschaulicht, indem für jedes Pixel des Bildausschnitts die Standardabweichung von einer Vielzahl von Bildern der Videosequenz berechnet und als normierter Helligkeitswert dargestellt wird. Verlässt eine Zelle den vorgegebenen Bereich, wird eine neue zufällige Schwimmrichtung vorgegeben. Sonstige Richtungsänderungen, Ruhephasen und Wechselwirkungen zwischen den Paramecien-Zellen werden in der Simulation vernachlässigt. *Abb. 5.10 c* zeigt die aus den Videosequenzen abgeleitete Autokorrelationsfunktion für vorgegebene Schwimmgeschwindigkeiten von $v = 0.2 \text{ mm/s}$ bis $v = 2 \text{ mm/s}$. *Abb. 5.10 d* zeigt δ in Abhängigkeit von der Schwimmgeschwindigkeit v . Die Abklingkonstante δ ist dabei proportional zur Geschwindigkeit v . Aus dem linearen Fit lässt sich folgender Zusammenhang ableiten:

$$\delta(v) = 15253 \cdot v = \frac{2.3}{l_{\text{Para}}} v, \quad (5.5)$$

mit l_{Para} der Länge der Paramecien-Zellen und v ihrer Schwimmgeschwindigkeit. Anhand des aus den Simulationen ermittelten Zusammenhangs wird die Geschwindigkeit in den Experimenten bestimmt (siehe *Abb. 5.8 c* und *Abb. 5.9 c*). Bei der Temperatur $T = 24 \text{ }^\circ\text{C}$ ergibt sich eine Geschwindigkeit $v \approx 0.3 \text{ mm/s}$. Als Vergleich kann *Abb. 5.7 f* herangezogen werden. Hier wird bei gleicher Temperatur eine Geschwindigkeit von $v \approx 0.8 \text{ mm/s}$ der frei schwimmenden Paramecien-Zellen im Mikrokanal beobachtet. Mehrere Faktoren können mögliche Erklärungen für den Unterschied in der Geschwindigkeit liefern. Einmal wird bei den Messungen im Mikrokanal nur das Gera-

deausschwimmen berücksichtigt, wohingegen bei den Korrelationsmessungen jegliche Bewegung beiträgt. Dadurch ergeben sich prinzipbedingt niedrigere Geschwindigkeiten. Auch die Wahl der Größe der Paramecien-Zellen in der Simulation könnte eine Rolle spielen. Zu klein angenommene Paramecien-Zellen sollten zu einer Unterschätzung der Geschwindigkeit führen. Auch die Vernachlässigung von Ruhephasen, Richtungsänderungen und Wechselwirkungen der Paramecien-Zellen könnten das Ergebnis beeinflussen.

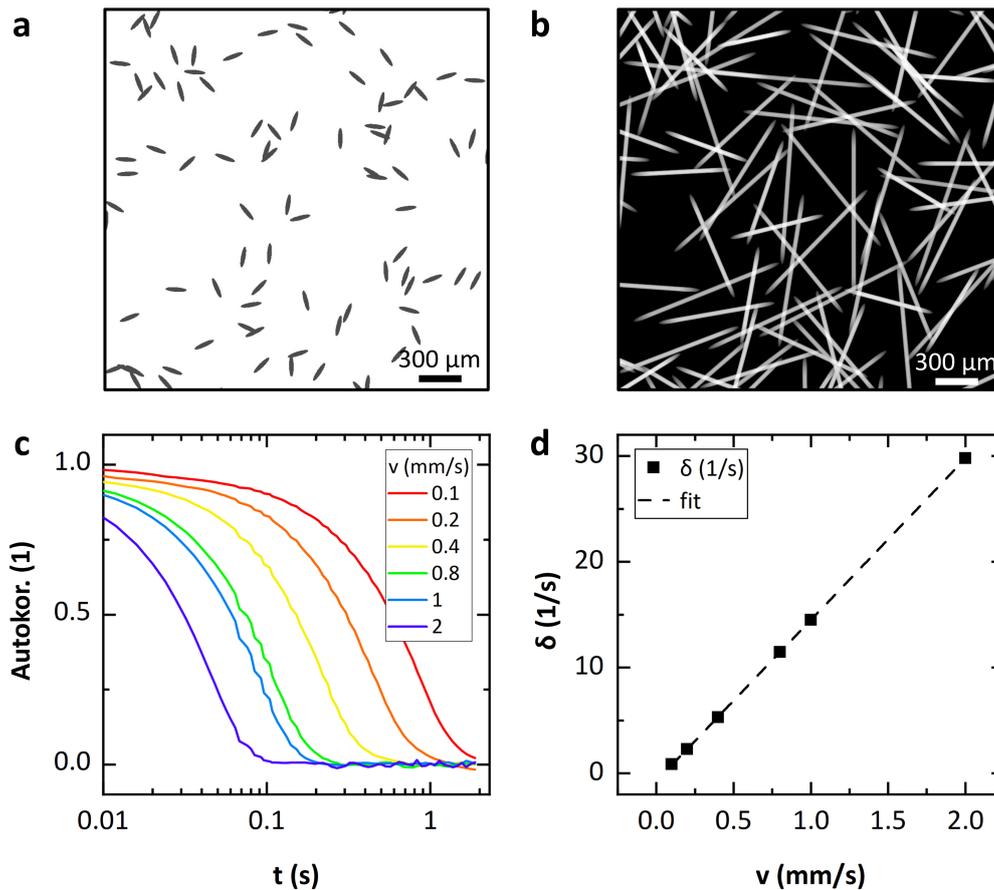


Abb. 5.10: Auswertung der Autokorrelationsfunktion für eine Simulation der Schwimmbewegung von Paramecien-Zellen. a) Beispielhaftes Bild aus der Simulation mit als Ellipsen angenommenen Paramecien. b) Standardabweichung der Pixel über mehrere Aufnahmen der Simulation. Dadurch wird die simulierte Schwimmbewegung der Paramecien veranschaulicht. c) Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der Zeit. Bei niedrigerer Geschwindigkeit fällt die Autokorrelationsfunktion langsamer ab. d) Abklingkonstante δ in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit. δ nimmt mit zunehmender Geschwindigkeit zu.

5.5 Fazit

Ausgehend von der Problemstellung, dass sich statische Messungen an Paramecien-Zellen aufgrund ihrer hohen Agilität in der Regel als schwierig erweisen, wurde in diesem Kapitel ein mikrofluidischer Ansatz zur Immobilisierung der Paramecien-Zellen verwendet. Es wurde ein Fallensystem entwickelt, um die bewegliche Mikroorganismen reversibel einzufangen und wieder schwimmen lassen zu können. Aufgrund ihrer extrem hohen Verformbarkeit erwies sich das Fangen in nur einseitig verengten Fallen, wie beispielsweise für Lipidvesikel eingesetzt, als problematisch. Um die Paramecien-Zellen in den Fallen zu halten, muss ein konstanter Druckgradient aufrechterhalten werden, was dazu führen kann, dass die Paramecien-Zellen durch die Falle gedrückt werden. Dieses Problem konnte gelöst werden durch eine beidseitig verengte Falle, der die Paramecien-Zellen auch ohne äußeren Druckgradienten von selbst nicht entkommen können. Die Technik erlaubt nicht nur das Einfangen von Paramecien-Zellen, sondern auch die Verfolgung ihres Schwimmverhaltens. Wie gezeigt werden konnte, führt der Fangprozess zu keiner physiologischen Störung der Zelle. Daher eignet sich die Technik, um Einzelzellmessungen von schwimmenden aber auch stationären Paramecien-Zellen durchzuführen. Dies wurde für optische Messungen der Membranordnung, bei denen die Zelle an einem Ort gehalten werden muss, bereits von Anne Paeger demonstriert (siehe *Abb. 5.11*) [37].

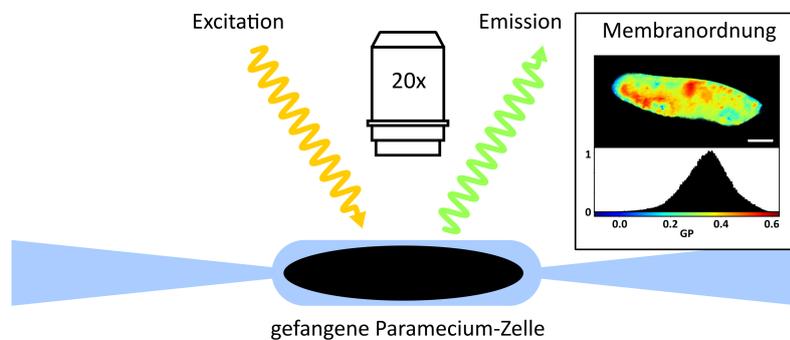


Abb. 5.11: Optische Messung der Membranordnung einer gefangenen Paramecium-Zelle: Eine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Laurdan angefärbte Zelle wird in der mikrofluidischen Falle festgehalten. Dadurch ist es möglich optische Messungen durchzuführen, mit denen sich die Membranordnung bestimmen lässt.

Neben Einzelzellmessungen wurden auch Messungen von Zellensembles durchgeführt. Wie gezeigt werden konnte, eignen sich Korrelationsmessungen dazu die Schwimm-

geschwindigkeit von Paramecien-Zellen zu quantifizieren. Dies wurde sowohl für DLS als auch für eine an DDM angelehnte Technik demonstriert. Anhand von Simulationen der Einzelzelltrajektorien konnte ein linearer Zusammenhang der Abklingkonstanten, mit der die Autokorrelationsfunktion abfällt, mit der Geschwindigkeit ermittelt werden. In den Experimenten konnte bereits eine Abhängigkeit zwischen der Temperatur und Schwimgeschwindigkeit festgestellt werden. Hier wurde allerdings ein relativ begrenzter Temperaturbereich betrachtet. Um eine Korrelation zwischen dem Schwimmverhalten und dem Membranzustand zu untersuchen, sind daher weitere Experimente, bei denen die physikalischen und chemischen Umgebungsbedingungen systematisch variiert werden, notwendig.

Zukünftig eröffnet das entwickelte Fallensystem die Möglichkeit fundamentale Aspekte zellulärer Funktionen, wie die Korrelation von Umgebungsvariablen, dem Membranzustand und zellulärer Fortbewegung an einzelnen Mikroorganismen zu untersuchen. Ein mögliches Experiment könnte dabei wie folgt aussehen: Zunächst wird das Schwimmverhalten einer Zelle beobachtet. Anschließend wird die Zelle in einer Falle festgehalten, um eine optische Messung der Membranordnung durchzuführen. Dann wird die Zelle wieder freigelassen. Dieser Ablauf lässt sich beliebig oft wiederholen, wobei gleichzeitig beispielsweise die Umgebungstemperatur oder das Medium variiert werden. So kann ein möglicher Zusammenhang von Umgebungsvariablen, dem Membranzustand und zellulärer Fortbewegung systematisch anhand einzelner Paramecien-Zellen ermittelt werden. Neben Einzelmessungen kann zur Untersuchung des Schwimmverhaltens im Ensemble die Korrelation von ganzen Bildern genutzt werden, wobei hier eine Vielzahl von Mikroorganismen gleichzeitig beobachtet werden können. Dafür sind keine aufwendigen Tracking-Algorithmen nötig. Ebenfalls lassen sich hier die Umgebungsbedingungen einfach variieren. Die Resultate dieses Kapitels ermöglichen somit Untersuchungen an mobilen Mikroorganismen, die bisher nicht oder nur schwer möglich waren.

Fazit und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich grundsätzlich mit der Anwendung von Mikro- und Akustofluidik in biologischen Systemen in Experiment und Simulation. Ein wichtiges Werkzeug war dabei die akustische Oberflächenwelle. Die SAW wurde in dieser Arbeit sowohl in der Aktorik, als auch für die Sensorik eingesetzt. Ein weiteres wichtiges Werkzeug war die FEM, die zur Simulation von Strömungsproblemen und SAW eingesetzt wurde.

Im ersten Kapitel wurden, aufbauend auf Experimenten zum Mischen mittels akustischer Oberflächenwellen in einem Mikrofluidikkanal, FEM Simulationen durchgeführt. Das SAW Streaming wurde dabei mit einem phänomenologischen Ansatz in Form einer Volumenkraft in der Navier-Stokes-Gleichung modelliert. Anhand eines Vergleichs von 2D- und 3D-Simulationen wurde aufgezeigt, dass im Wesentlichen die in der xy-Ebene durch SAW erzeugte Strömung für die Durchmischung verantwortlich ist. Der 2D-Fall ist daher ausreichend um den Mischprozess in guter Näherung qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Dadurch reduziert sich die Anzahl der Freiheitsgrade und der Rechenaufwand deutlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Mischverhalten vom Verhältnis der Flussgeschwindigkeit im Kanal zu der durch SAW erzeugten Geschwindigkeit abhängt, was im Einklang mit experimentellen Daten steht. Weiterhin wird das Mischverhalten durch die Aperturbreite des IDT beeinflusst, wobei die optimale Breite etwa der halben Kanalbreite entspricht. Durch periodische Variation des Einkopplungsortes kann die Mischqualität noch weiter gesteigert werden. Mit Hilfe dieser Mischtechnik lassen sich beispielsweise Lipidnanopartikel herstellen. Diese können unter anderem in der Krebstherapie oder als Impfstoff eingesetzt werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Mischtechniken kann mit der SAW-Technik deutlich schneller gemischt werden und der Mischprozess aktiv beeinflusst werden. Die Simulationen ermöglichen es, den Parameterraum systematisch abzurastern, ohne aufwendige Messreihen durchzuführen und damit wiederum die Effizienz akustischer Mischverfahren zusätzlich zu optimieren. Dies kann verwendet werden, um die Herstellung therapeutischer Nanopartikel gezielt zu beeinflussen.

Neben der akustisch getriebenen Fluidik bieten SAW die Möglichkeit, dynamisch modulierte Potentiallandschaften zu erzeugen, die zur Strukturierung weicher Materie dienen können. Hierfür wurden niedrigere Amplituden und somit niedrigere Kraftbeträge genutzt. In Kapitel 2 wurde dies benutzt, um den Einfluss eines akustischen Stehwellenfelds auf die Aktivität von AChE, das an ein SLB gebunden ist, zu untersuchen. Durch das akustische Stehwellenfeld lässt sich eine phasenseparierte Membran simulieren und somit die für ein membrangebundenes Enzym zur Verfügung stehende Membranfläche modulieren. Diese akustisch induzierte Variation der Membranfläche zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das akustische Stehwellenfeld nur eine geringe Veränderung der verfügbaren Membranfläche bewirkt. Außerdem war die Dichtemodulation im SLB in den Experimenten im Gegensatz zu früheren Studien nicht reversibel. Durch statische Variation des Verhältnisses der zur Verfügung stehenden weichen Grenzfläche in der Umgebung der Enzyme und der Anzahl der angebotenen Enzyme konnte jedoch eine starke Modulation der Enzymaktivität bewirkt werden. Hierzu wurden DOPC-SUV als Modellsystem verwendet. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt mit der verfügbaren Membranfläche pro Enzym skaliert. Ab einem ausreichend großen Verhältnis zwischen Membranfläche zu Enzym zeigt sich eine doppelt so hohe Aktivität, verglichen mit einer lipidfreien Probe. Diese Ergebnisse legen nahe, die Rolle heterogener Zellmembranen mit der Koexistenz von Phasen unterschiedlicher Ordnung und Zusammensetzung in Zusammenhang mit der Aktivität von AChE weiter zu erörtern, insbesondere im Hinblick auf Übergänge zwischen Ordnung und Unordnung in biologischen Membranen [78] oder die Signalausbreitung an biologischen Grenzflächen [79].

Um weiche Grenzflächen oder Zellen nicht aktiv zu beeinflussen, sondern deren Aktivität zu detektieren, kamen in Kapitel 3 akustische Oberflächenwellen mit nochmals reduzierter Amplitude zum Einsatz. Unter Nutzung von akustischen Scherwellen, welche unterhalb eines Rasens lebender Zellen transmittiert wurden, konnten erfolgreich Veränderungen der an der Chipoberfläche angelagerten Zellen detektiert werden. Ganz konkret wurde hier eine künstliche Wunde, insbesondere deren Verschluss durch Zellmigration untersucht. Mit Hilfe von FEM Simulationen konnte gezeigt werden, dass die elektrischen Eigenschaften der oberflächenbedeckenden Zellen und des Nährmediums die Phasengeschwindigkeit stark beeinflussen und somit den Hauptbeitrag des Sensorsignals ausmachen. Eine Eigenfrequenz-Studie sowie eine zeitabhängige Stu-

die mit einer vereinfachten Modellgeometrie wurden verwendet, um das Verhalten zu erklären, das im Experiment beobachtet wird. Beide Methoden sind in der Lage, die Gesamtphasenverschiebung für eine vollständig geschlossene Wunde vorherzusagen. Allerdings gibt es eine Phasenabweichung von wenigen Grad zwischen beiden Methoden. Unter Berücksichtigung der Annahmen, die in der Simulation getroffen wurden, insbesondere für die Berechnung der elektrischen Eigenschaften der Zellschicht, liegen beide Methoden jedoch nahe genug an den im Experiment beobachteten Werten. Mit der Eigenfrequenzstudie, die weniger zeitaufwendig ist als die zeitabhängige Studie, ist es somit möglich, die Modelleingabeparameter über einen größeren Bereich zu variieren. Die zeitabhängige Studie ist hingegen näher an der Konfiguration des Experiments. Hier konnte das lineare Verhalten während des Wundheilungsprozesses bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Sensorsignal klar vom Abstand zwischen der Sensoroberfläche und den adhärenen Zellen abhängt. Die größte Variation ergibt sich im Bereich von 100 nm bis $\lambda/4$. Hier ist der Sensor besonders empfindlich gegenüber Änderungen. Dies stimmt mit experimentellen Befunden überein, die zeigen, dass nach komplettem Wundschluss der Abstand zwischen Zelle und Substrat variiert. Somit konnte mithilfe der Simulationen der Verlauf des Sensorsignals im Experiment vollständig erklärt werden.

Die in Kapitel 4 untersuchte Migration lebender Zellen in dreidimensionalen weichen Umgebungen geht von der Betrachtung zweidimensionaler Bewegungen adhärenter Zellen an einer Oberfläche einen Schritt weiter auf biologische Systeme zu. Dazu wurde die mikrofluidische Strukturierung von Kollagennetzwerken sowie das Invasionsverhalten von HeLa-Zellen innerhalb dieses Netzwerkes näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die im Experiment beobachtete Ausrichtung der Kollagenfasern durch ihre Form und das Strömungsprofil um das Aggregat erklärt werden kann. Aufgrund der länglichen Form der Fasern ergibt sich eine Asymmetrie vor und hinter dem Aggregat. Die Ausrichtung der Fasern nach der Polymerisierung kann interessanterweise als Gedächtnis des Strömungsfelds, welches die anschließende Invasion der Zellen beeinflusst, verstanden werden. Die Ausbreitung der Zellen in diesem Kollagennetzwerk zeigt einen diffusionsartigen Charakter. Durch Einführen einer anisotropen und ortsabhängigen Zufallsbewegung wird das Verhalten im Experiment sehr gut beschrieben. Die Simulationen erlauben den Schluss, dass die Ausbreitung senkrecht zu den Fasern quasi komplett unterdrückt wird. Die hier gewonnenen Ergebnisse tragen

somit wesentlich zum Verständnis der Invasion von Zellaggregaten in einer extrazellulären Matrix bei. Neben diesem fundamentalen Aspekt ist es durchaus auch denkbar, in Zukunft mit Hilfe dieser Erkenntnisse die mikrofluidische Strukturierung von Kollagengelen noch gezielter zu beeinflussen und somit das Invasionsverhalten von Zellen gezielt zu steuern.

Um weitere fundamentale Aspekte zellulärer Funktionen wie die Korrelation von Umgebungsvariablen, den Membranzustand und zellulärer Fortbewegung zu ermöglichen, wurden im letzten Kapitel Methoden zur Analyse von Einzelzellen und Zellensembles am Beispiel des Einzellers *Paramecium caudatum* entwickelt. Hierzu wurde zunächst das komplexe Bewegungsverhalten von *Paramecium*-Zellen untersucht und eine Methode entwickelt, um diese Mikroorganismen in ihrer Bewegung vorübergehend so einzuschränken, ohne die Physiologie der Zellen zu stören, sodass optische Einzelzellmessungen möglich sind. Dazu wurde ein mikrofluidischer Ansatz verwendet, um diese reversibel einzufangen und wieder schwimmen zu lassen. Aufgrund ihrer extrem hohen Verformbarkeit können die *Paramecium*-Zellen in kleinen Kompartimenten festgehalten werden, ohne dass eine optisch erkennbare Beschädigung auftritt. Außerdem erlaubt die Technik nicht nur das Einfangen von Zellen, sondern auch die quantitative operatorunabhängige Charakterisierung ihres Schwimmverhaltens. Es konnte kein negativer Einfluss des Einfangprozesses auf das Schwimmverhalten der Zellen festgestellt werden. Daher eignet sich die Technik, um Einzelzellmessungen von schwimmenden aber auch stationären Zellen durchzuführen. Somit wurden optische Messungen der Membranordnung, bei denen die Zelle relativ stationär gehalten werden muss, ermöglicht [37]. In einem weiteren Schritt wurde demonstriert, dass sich Korrelationsmessungen dazu eignen, die Schwimmgeschwindigkeit von *Paramecium*-Zellen unter Variation ihrer Umgebungsbedingungen zu quantifizieren. Die Kombination aus konventionellen DLS Messungen, an DMM angelehnte Messungen und simulierten Einzellertrajektorien erlaubte es, die in den Messungen erhaltenen Korrelationszeiten quantitativ mit Schwimmgeschwindigkeiten zu verknüpfen. Die in diesem Kapitel vorgestellten Techniken ermöglichen somit systematische Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen der Membranordnung von Einzelzellen und Zellensembles und deren zellulären Funktionen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen.

Diese Arbeit zeigt eindrucksvoll die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Mikro- und Akustofluidik bzw. SAW in biologischen Systemen in Experiment und Simulation von einfachen nichtlebenden Systemen bestehend aus Lipiden und Enzymen bis hin zu komplexeren lebenden Systemen wie Zellen und Mikroorganismen. Dabei konnten relevante Fragestellungen für die Grundlagenforschung aber auch für medizintechnische Anwendungen beantwortet sowie neue Forschungsfelder eröffnet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Wixforth, “Acoustically driven planar microfluidics,” *Superlattices and Microstructures*, vol. 33, no. 5-6, pp. 389–396, 2003.
- [2] A. Wixforth, C. Strobl, C. Gauer, A. Toegl, J. Scriba, and Z. v. Guttenberg, “Acoustic manipulation of small droplets,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 379, no. 7, pp. 982–991, 2004.
- [3] T. Frommelt, *Mischen und Sortieren mit SAW-Fluidik in Simulation und Experiment*. Diss. Universität Augsburg, 2007.
- [4] T. Frommelt, M. Kostur, M. Wenzel-Schäfer, P. Talkner, P. Hänggi, and A. Wixforth, “Microfluidic mixing via acoustically driven chaotic advection,” *Physical review letters*, vol. 100, no. 3, p. 034502, 2008.
- [5] T. Frommelt, D. Gogel, M. Kostur, P. Talkner, P. Hanggi, and A. Wixforth, “Flow patterns and transport in rayleigh surface acoustic wave streaming: Combined finite element method and raytracing numerics versus experiments,” *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, vol. 55, no. 10, pp. 2298–2305, 2008.
- [6] C. Westerhausen, L. G. Schnitzler, D. Wendel, R. Krzysztoń, U. Lächelt, E. Wagner, J. O. Rädler, and A. Wixforth, “Controllable acoustic mixing of fluids in microchannels for the fabrication of therapeutic nanoparticles,” *Micromachines*, vol. 7, no. 9, p. 150, 2016.
- [7] L. G. Schnitzler, S. Junger, D. M. Loy, E. Wagner, A. Wixforth, A. Hörner, U. Lächelt, and C. Westerhausen, “Size tunable nanoparticle formation employing droplet fusion by acoustic streaming applied to polyplexes,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 52, no. 24, p. 244002, 2019.
- [8] L. G. Schnitzler, *Mikrofluidisches Mischen mit Schallwellen zur Erzeugung therapeutischer Nanopartikel*. Bachelorarbeit Universität Augsburg, 2015.
- [9] L. G. Schnitzler, *Biomedizinische fluidische Anwendungen: Gezielte Manipulation von DNA sowie Simulation von Implantaten in Blutgefäßen*. Masterarbeit Universität Augsburg, 2017.
- [10] N.-T. Nguyen and Z. Wu, “Micromixers - a review,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, no. 2, pp. R1–R16, 2004.

- [11] G. Cai, L. Xue, H. Zhang, and J. Lin, “A review on micromixers,” *Micromachines*, vol. 8, no. 9, p. 274, 2017.
- [12] L. Rayleigh, “On the circulation of air observed in kundt’s tubes, and on some allied acoustical problems,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 175, pp. 1–21, 1884.
- [13] C. Eckart, “Vortices and streams caused by sound waves,” *Physical review*, vol. 73, no. 1, p. 68, 1948.
- [14] W. L. Nyborg, “Acoustic streaming due to attenuated plane waves,” *The journal of the acoustical society of America*, vol. 25, no. 1, pp. 68–75, 1953.
- [15] Z. v. Gutfenberg, A. Rathgeber, S. Keller, J. Rädler, A. Wixforth, M. Kostur, M. Schindler, and P. Talkner, “Flow profiling of a surface-acoustic-wave nano-pump,” *Physical Review E*, vol. 70, no. 5, p. 056311, 2004.
- [16] K. Sritharan, C. Strobl, M. Schneider, A. Wixforth, and Z. v. Gutfenberg, “Acoustic mixing at low reynold’s numbers,” *Applied Physics Letters*, vol. 88, no. 5, p. 054102, 2006.
- [17] M. C. Jo and R. Guldiken, “Dual surface acoustic wave-based active mixing in a microfluidic channel,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 196, pp. 1–7, 2013.
- [18] J. Vanneste and O. Bühler, “Streaming by leaky surface acoustic waves,” *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 467, no. 2130, pp. 1779–1800, 2011.
- [19] C. K. Batchelor and G. Batchelor, *An introduction to fluid dynamics*. Cambridge university press, 2000.
- [20] P. Tabeling, *Introduction to microfluidics*. Oxford university press Oxford, 2005.
- [21] H. Oertel, ed., *Prandtl-Essentials of Fluid Mechanics*. Springer New York, NY, 3 ed., 2010.
- [22] J. A. Carlson, A. Jaffe, and A. Wiles, *The Millennium Prize Problems*. American Mathematical Soc., 2006.
- [23] H. Aref, “Stirring by chaotic advection,” *Journal of fluid mechanics*, vol. 143, pp. 1–21, 1984.
- [24] J. M. Ottino and S. Wiggins, “Introduction: mixing in microfluidics,” 2004.

- [25] L. Rayleigh, "On waves propagated along the plane surface of an elastic solid," *Proceedings of the London mathematical Society*, vol. 1, no. 1, pp. 4–11, 1885.
- [26] A. E. H. Love, *Some Problems of Geodynamics: Being an Essay to which the Adams Prize in the University of Cambridge was Adjudged in 1911*, vol. 911. University Press, 1911.
- [27] A. A. Oliner, "Acoustic surface waves," *Berlin and New York*, vol. 24, 1978.
- [28] D. Royer and E. Dieulesaint, *Elastic waves in solids I: Free and guided propagation*. Springer Science & Business Media, 1999.
- [29] D. Morgan, *Surface acoustic wave filters: With applications to electronic communications and signal processing*. Academic Press, 2010.
- [30] S. Rupp, *Hochempfindliche Oberflächenwellen-Sensoren für die Medizinische Diagnostik*. Diss. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004.
- [31] C. J. Strobl, *Mikro- und Nanofluidik auf piezoelektrischen Substraten*. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
- [32] J. Neumann, *Sensorische und aktorische Anwendungen akustischer Oberflächenwellen*. Diss. Universität Augsburg, 2009.
- [33] M. S. Brugger, *Sensorik, Aktorik und Stimulation vitaler Zellen unter Verwendung akustischer Oberflächenwellen*. Diss. Universität Augsburg, 2021.
- [34] S. Shiokawa, Y. Matsui, and T. Ueda, "Liquid streaming and droplet formation caused by leaky rayleigh waves," in *Proceedings., IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 643–646, IEEE, 1989.
- [35] N. S. Gokhale, *Practical finite element analysis*. Finite to infinite, 2008.
- [36] O. C. Zienkiewicz, R. L. Taylor, and J. Z. Zhu, *The finite element method: its basis and fundamentals*. Elsevier, 2005.
- [37] L. G. Schnitzler, K. Baumgartner, A. Kolb, B. Braun, and C. Westerhausen, "Acetylcholinesterase activity influenced by lipid membrane area and surface acoustic waves," *Micromachines*, vol. 13, no. 2, p. 287, 2022.
- [38] K. Simons and E. Ikonen, "Functional rafts in cell membranes," *nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 569–572, 1997.

- [39] A. Ono and E. O. Freed, "Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 24, pp. 13925–13930, 2001.
- [40] M. Suomalainen, "Lipid rafts and assembly of enveloped viruses," *Traffic*, vol. 3, no. 10, pp. 705–709, 2002.
- [41] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, and R. G. Anderson, "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics," *Nature cell biology*, vol. 9, no. 1, pp. 7–14, 2007.
- [42] J. T. Groves and S. G. Boxer, "Electric field-induced concentration gradients in planar supported bilayers," *Biophysical journal*, vol. 69, no. 5, pp. 1972–1975, 1995.
- [43] J. T. Groves, N. Ulman, and S. G. Boxer, "Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports," *Science*, vol. 275, no. 5300, pp. 651–653, 1997.
- [44] J. T. Groves, S. G. Boxer, and H. M. McConnell, "Electric field-induced reorganization of two-component supported bilayer membranes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 25, pp. 13390–13395, 1997.
- [45] J. T. Groves, S. G. Boxer, and H. M. McConnell, "Electric field-induced critical demixing in lipid bilayer membranes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 3, pp. 935–938, 1998.
- [46] M. B. Hochrein, J. A. Leierseder, L. Golubović, and J. O. Rädler, "DNA localization and stretching on periodically microstructured lipid membranes," *Physical review letters*, vol. 96, no. 3, p. 038103, 2006.
- [47] L. A. Kung, L. Kam, J. S. Hovis, and S. G. Boxer, "Patterning hybrid surfaces of proteins and supported lipid bilayers," *Langmuir*, vol. 16, no. 17, pp. 6773–6776, 2000.
- [48] B. Sanii, A. M. Smith, R. Butti, A. M. Brozell, and A. N. Parikh, "Bending membranes on demand: Fluid phospholipid bilayers on topographically deformable substrates," *Nano letters*, vol. 8, no. 3, pp. 866–871, 2008.
- [49] M. Hennig, J. Neumann, A. Wixforth, J. O. Rädler, and M. F. Schneider, "Dynamic patterns in a supported lipid bilayer driven by standing surface acoustic waves," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3050–3053, 2009.

- [50] J. Neumann, M. Hennig, A. Wixforth, S. Manus, J. O. Rädler, and M. F. Schneider, "Transport, separation, and accumulation of proteins on supported lipid bilayers," *Nano letters*, vol. 10, no. 8, pp. 2903–2908, 2010.
- [51] M. Hennig, *Dynamische Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen und adsorbierten Makromolekülen*. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.
- [52] M. Hennig, M. Wolff, J. Neumann, A. Wixforth, M. F. Schneider, and J. O. Rädler, "DNA concentration modulation on supported lipid bilayers switched by surface acoustic waves," *Langmuir*, vol. 27, no. 24, pp. 14721–14725, 2011.
- [53] H. Sandermann Jr, "Regulation of membrane enzymes by lipids," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, vol. 515, no. 3, pp. 209–237, 1978.
- [54] S. Nuschele, *The Role of Interfaces in Enzyme Activity and Cell Adaptation*. Diss. Universität Augsburg, 2010.
- [55] B. Fichtl, *Integration der Biochemie in die Physik der Grenzflächen*. Diss. Universität Augsburg, 2015.
- [56] B. Fichtl, S. Shrivastava, and M. F. Schneider, "Protons at the speed of sound: Predicting specific biological signaling from physics," *Scientific reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [57] A. Kamenac, T. Obser, A. Wixforth, M. F. Schneider, and C. Westerhausen, "The activity of the intrinsically water-soluble enzyme ADAMTS13 correlates with the membrane state when bound to a phospholipid bilayer," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 24476, 2021.
- [58] M. F. Schneider, S. Nuschele, S. Shrivastava, C. Fillafer, B. Fichtl, I. Silman, and K. Kaufmann, "From thermodynamic states to biological function by Einstein's approach to statistical physics," *Biophysical Journal*, vol. 102, no. 3, p. 292a, 2012.
- [59] K. Kaufmann, "My theory," *Anahit AB publisher*, vol. 2&3, 2009.
- [60] A. A. Brian and H. M. McConnell, "Allogeneic stimulation of cytotoxic t cells by supported planar membranes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 81, no. 19, pp. 6159–6163, 1984.

- [61] T. M. Bayerl and M. Bloom, "Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads. A new vesicular model system studied by ²H-nuclear magnetic resonance," *Biophysical journal*, vol. 58, no. 2, pp. 357–362, 1990.
- [62] E. Kalb, S. Frey, and L. K. Tamm, "Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1103, no. 2, pp. 307–316, 1992.
- [63] C. Keller and B. Kasemo, "Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance," *Biophysical journal*, vol. 75, no. 3, pp. 1397–1402, 1998.
- [64] P. S. Cremer and S. G. Boxer, "Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 13, pp. 2554–2559, 1999.
- [65] C. Keller, K. Glasmästar, V. Zhdanov, and B. Kasemo, "Formation of supported membranes from vesicles," *Physical Review Letters*, vol. 84, no. 23, p. 5443, 2000.
- [66] I. Reviakine and A. Brisson, "Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy," *Langmuir*, vol. 16, no. 4, pp. 1806–1815, 2000.
- [67] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [68] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, 1961.
- [69] G. M. Whitesides, J. E. Lilburn, and R. P. Szajewski, "Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 42, no. 2, pp. 332–338, 1977.
- [70] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic force microscope," *Physical review letters*, vol. 56, no. 9, p. 930, 1986.
- [71] T. Hesjedal and G. Behme, "AFM observation of surface acoustic waves emitted from single symmetric SAW transducers," *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, vol. 48, no. 3, pp. 641–642, 2001.

- [72] C. Dietrich, R. Merkel, and R. Tampe, "Diffusion measurement of fluorescence-labeled amphiphilic molecules with a standard fluorescence microscope," *Biophysical journal*, vol. 72, no. 4, pp. 1701–1710, 1997.
- [73] M. B. Hochrein, C. Reich, B. Krause, J. O. Rädler, and B. Nickel, "Structure and mobility of lipid membranes on a thermoplastic substrate," *Langmuir*, vol. 22, no. 2, pp. 538–545, 2006.
- [74] M. R. Horton, C. Reich, A. P. Gast, J. O. Rädler, and B. Nickel, "Structure and dynamics of crystalline protein layers bound to supported lipid bilayers," *Langmuir*, vol. 23, no. 11, pp. 6263–6269, 2007.
- [75] A. O. Hohner, M. P. C. David, and J. O. Rädler, "Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces," *Biointerphases*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [76] R. Merkel, E. Sackmann, and E. Evans, "Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers," *Journal de Physique*, vol. 50, no. 12, pp. 1535–1555, 1989.
- [77] P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, and E. Reiner, "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment," *Analytical biochemistry*, vol. 312, no. 2, pp. 224–227, 2003.
- [78] N. Färber and C. Westerhausen, "Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by laurdan fluorescence spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1864, p. 183794, feb 2022.
- [79] B. Fichtl, I. Silman, and M. F. Schneider, "On the physical basis of biological signaling by interface pulses," *Langmuir*, vol. 34, no. 16, pp. 4914–4919, 2018.
- [80] M. S. Brugger, L. G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth, and C. Westerhausen, "Shear-horizontal surface acoustic wave sensor for non-invasive monitoring of dynamic cell spreading and attachment in wound healing assays," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 173, p. 112807, 2021.
- [81] M. Saitakis and E. Gizeli, "Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 3, pp. 357–371, 2012.
- [82] D. Ballantine Jr, R. M. White, S. J. Martin, A. J. Ricco, E. Zellers, G. Frye, and H. Wohltjen, *Acoustic wave sensors: theory, design and physico-chemical applications*. Elsevier, 1996.

- [83] T. S. Hug, "Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery," *Assay and drug development technologies*, vol. 1, no. 3, pp. 479–488, 2003.
- [84] Y. Fang, "Label-free and non-invasive biosensor cellular assays for cell adhesion," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 24, no. 5, pp. 1011–1021, 2010.
- [85] D. M. Gryte, M. D. Ward, and W. S. Hu, "Real-time measurement of anchorage-dependent cell adhesion using a quartz crystal microbalance," *Biotechnology progress*, vol. 9, no. 1, pp. 105–108, 1993.
- [86] J. Redepenning, T. Schlesinger, E. J. Mechalke, D. A. Puleo, and R. Bizios, "Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance," *Analytical chemistry*, vol. 65, no. 23, pp. 3378–3381, 1993.
- [87] M. S. Lord, C. Modin, M. Foss, M. Duch, A. Simmons, F. S. Pedersen, B. K. Milthorpe, and F. Besenbacher, "Monitoring cell adhesion on tantalum and oxidised polystyrene using a quartz crystal microbalance with dissipation," *Biomaterials*, vol. 27, no. 26, pp. 4529–4537, 2006.
- [88] A. Janshoff, H.-J. Galla, and C. Steinem, "Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - an alternative to optical biosensors?," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, no. 22, pp. 4004–4032, 2000.
- [89] S. Martin and A. Ricco, "Effective utilization of acoustic wave sensor responses: simultaneous measurement of velocity and attenuation," in *Proceedings., IEEE Ultrasonics Symposium.*, pp. 621–625, IEEE, 1989.
- [90] G. Kovacs, M. Anhorn, H. Engan, G. Visintini, and C. Ruppel, "Improved material constants for LiNbO_3 and LiTaO_3 ," in *IEEE symposium on ultrasonics*, pp. 435–438, IEEE, 1990.
- [91] R. Courant, K. Friedrichs, and H. Lewy, "Über die partiellen Differenzgleichungen der mathematischen Physik," *Mathematische Annalen*, vol. 100, no. 1, pp. 32–74, 1928.
- [92] J. Kondoh, K. Saito, S. Shiokawa, and H. Suzuki, "Simultaneous measurements of liquid properties using multichannel shear horizontal surface acoustic wave microsensor," *Japanese journal of applied physics*, vol. 35, no. 5S, p. 3093, 1996.

- [93] B. Auld, “Acoustic fields and waves in solids,” *Wiley Interscience Pub.*, p. 278, 1973.
- [94] J. Kondoh, “A liquid-phase sensor using shear horizontal surface acoustic wave devices,” *Electronics and Communications in Japan*, vol. 96, no. 2, pp. 41–49, 2013.
- [95] S. Li, S. Li, S. Anwar, F. Tian, W. Lu, and B. Hou, “Determination of microwave conductivity of electrolyte solutions from debye-drude model,” *Progress In Electromagnetics Research*, vol. 671, 2014.
- [96] R. R. Pethig, *Dielectrophoresis: Theory, methodology and biological applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [97] F. Geiger, *Directed invasion and migratory modes of cancer cells in structured 3D collagen matrices*. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2021.
- [98] F. Geiger, L. G. Schnitzler, M. S. Brugger, C. Westerhausen, and H. Engelke, “Directed invasion of cancer cell spheroids inside 3D collagen matrices oriented by microfluidic flow in experiment and simulation,” *Plos one*, vol. 17, no. 3, p. e0264571, 2022.
- [99] L. Oswald, S. Grosser, D. M. Smith, and J. A. Käs, “Jamming transitions in cancer,” *Journal of physics D: Applied physics*, vol. 50, no. 48, p. 483001, 2017.
- [100] B. A. Harley, H.-D. Kim, M. H. Zaman, I. V. Yannas, D. A. Lauffenburger, and L. J. Gibson, “Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions,” *Biophysical journal*, vol. 95, no. 8, pp. 4013–4024, 2008.
- [101] G. Charras and E. Sahai, “Physical influences of the extracellular environment on cell migration,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 15, no. 12, pp. 813–824, 2014.
- [102] P. T. Caswell and T. Zech, “Actin-based cell protrusion in a 3D matrix,” *Trends in cell biology*, vol. 28, no. 10, pp. 823–834, 2018.
- [103] M. Dietrich, H. Le Roy, D. B. Brückner, H. Engelke, R. Zantl, J. O. Rädler, and C. P. Broedersz, “Guiding 3D cell migration in deformed synthetic hydrogel microstructures,” *Soft Matter*, vol. 14, no. 15, pp. 2816–2826, 2018.
- [104] P.-H. Wu, D. M. Gilkes, and D. Wirtz, “The biophysics of 3D cell migration,” *Annual Review of Biophysics*, vol. 47, pp. 549–567, 2018.

- [105] F. Geiger, D. Rüdiger, S. Zahler, and H. Engelke, “Fiber stiffness, pore size and adhesion control migratory phenotype of MDA-MB-231 cells in collagen gels,” *Plos one*, vol. 14, no. 11, p. e0225215, 2019.
- [106] K. M. Riching, B. L. Cox, M. R. Salick, C. Pehlke, A. S. Riching, S. M. Ponik, B. R. Bass, W. C. Crone, Y. Jiang, A. M. Weaver, *et al.*, “3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence,” *Biophysical journal*, vol. 107, no. 11, pp. 2546–2558, 2014.
- [107] W. Han, S. Chen, W. Yuan, Q. Fan, J. Tian, X. Wang, L. Chen, X. Zhang, W. Wei, R. Liu, *et al.*, “Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 40, pp. 11208–11213, 2016.
- [108] B. M. Rubenstein and L. J. Kaufman, “The role of extracellular matrix in glioma invasion: a cellular potts model approach,” *Biophysical journal*, vol. 95, no. 12, pp. 5661–5680, 2008.
- [109] S. P. Carey, Z. E. Goldblatt, K. E. Martin, B. Romero, R. M. Williams, and C. A. Reinhart-King, “Local extracellular matrix alignment directs cellular protrusion dynamics and migration through Rac1 and FAK,” *Integrative Biology*, vol. 8, no. 8, pp. 821–835, 2016.
- [110] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, and P. J. Keely, “Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion,” *BMC medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 1–15, 2006.
- [111] H. Ahmadzadeh, M. R. Webster, R. Behera, A. M. J. Valencia, D. Wirtz, A. T. Weeraratna, and V. B. Shenoy, “Modeling the two-way feedback between contractility and matrix realignment reveals a nonlinear mode of cancer cell invasion,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 9, pp. E1617–E1626, 2017.
- [112] Q. Shi, R. P. Ghosh, H. Engelke, C. H. Rycroft, L. Cassereau, J. A. Sethian, V. M. Weaver, and J. T. Liphardt, “Rapid disorganization of mechanically interacting systems of mammary acini,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 2, pp. 658–663, 2014.
- [113] W. Thielicke, *The flapping flight of birds*. Diss. University of Groningen, 2014.
- [114] W. Thielicke and E. Stamhuis, “Pivlab - towards user-friendly, affordable and accurate digital particle image velocimetry in matlab,” *Journal of open research software*, vol. 2, no. 1, 2014.

- [115] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, vol. 18. Oxford university press Oxford, 2008.
- [116] L. G. Schnitzler, A. Paeger, M. S. Brugger, M. F. Schneider, and C. Westerhausen, “Reversible single cell trapping of paramecium caudatum to correlate swimming behavior and membrane state,” *Biomicrofluidics*, vol. 16, no. 2, p. 024102, 2022.
- [117] R. Wichterman, *The biology of Paramecium*. Springer science & business media, 2012.
- [118] M. E. Lidstrom and D. R. Meldrum, “Life-on-a-chip,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 1, no. 2, pp. 158–164, 2003.
- [119] B. R. Lutz, J. Chen, and D. T. Schwartz, “Hydrodynamic tweezers: 1. noncontact trapping of single cells using steady streaming microeddies,” *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 15, pp. 5429–5435, 2006.
- [120] K. Hasegawa, A. Tanakadate, and H. Ishikawa, “A method for tracking the locomotion of an isolated microorganism in real time,” *Physiology & behavior*, vol. 42, no. 4, pp. 397–400, 1988.
- [121] X. Fei, Y. Igarashi, and K. Hashimoto, “2d tracking of single paramecium by using parallel level set method and visual servoing,” in *2008 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics*, pp. 752–757, IEEE, 2008.
- [122] K. Yamato, H. Chiba, and H. Oku, “High speed three dimensional tracking of swimming cell by synchronous modulation between tece camera and tag lens,” *IEEE Robotics and Automation Letters*, vol. 5, no. 2, pp. 1907–1914, 2020.
- [123] K.-N. Huang, H.-H. Chen, and Y.-S. Yeh, “Development of a multi-target tracking system for paramecia,” in *2011 4th International Conference on Bio-medical Engineering and Informatics (BMEI)*, vol. 1, pp. 259–262, IEEE, 2011.
- [124] H. Machemer and A. Ogura, “Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated paramecium,” *The Journal of Physiology*, vol. 296, no. 1, pp. 49–60, 1979.
- [125] W. E. Bell, R. Hallworth, T. A. Wyatt, and J. H. Sisson, “Use of a novel cell adhesion method and digital measurement to show stimulus-dependent variation in somatic and oral ciliary beat frequency in paramecium,” *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 62, no. 1, pp. 144–148, 2015.

- [126] K. Guevorkian and J. M. Valles Jr, "Aligning paramecium caudatum with static magnetic fields," *Biophysical journal*, vol. 90, no. 8, pp. 3004–3011, 2006.
- [127] R. Venu, B. Lim, X. Hu, I. Jeong, T. Ramulu, and C. Kim, "On-chip manipulation and trapping of microorganisms using a patterned magnetic pathway," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 14, no. 1-2, pp. 277–285, 2013.
- [128] Z. Ye and M. Sitti, "Dynamic trapping and two-dimensional transport of swimming microorganisms using a rotating magnetic microrobot," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 13, pp. 2177–2182, 2014.
- [129] A. Kulkarni, I. Elices, N. Escoubet, L.-L. Pontani, A. M. Prevost, and R. Brette, "A simple device to immobilize protists for electrophysiology and microinjection," *Journal of Experimental Biology*, vol. 223, no. 12, p. jeb219253, 2020.
- [130] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [131] F. Giavazzi, D. Brogioli, V. Trappe, T. Bellini, and R. Cerbino, "Scattering information obtained by optical microscopy: Differential dynamic microscopy and beyond," *Physical Review E*, vol. 80, no. 3, p. 031403, 2009.
- [132] L. G. Wilson, V. A. Martinez, J. Schwarz-Linek, J. Tailleur, G. Bryant, P. Pusey, and W. C. Poon, "Differential dynamic microscopy of bacterial motility," *Physical review letters*, vol. 106, no. 1, p. 018101, 2011.
- [133] V. A. Martinez, R. Besseling, O. A. Croze, J. Tailleur, M. Reufer, J. Schwarz-Linek, L. G. Wilson, M. A. Bees, and W. C. Poon, "Differential dynamic microscopy: A high-throughput method for characterizing the motility of microorganisms," *Biophysical journal*, vol. 103, no. 8, pp. 1637–1647, 2012.
- [134] D. Germain, M. Leocmach, and T. Gibaud, "Differential dynamic microscopy to characterize brownian motion and bacteria motility," *American Journal of Physics*, vol. 84, no. 3, pp. 202–210, 2016.
- [135] L. Feriani, M. Juenet, C. J. Fowler, N. Bruot, M. Chioccioli, S. M. Holland, C. E. Bryant, and P. Cicuta, "Assessing the collective dynamics of motile cilia in cultures of human airway cells by multiscale ddm," *Biophysical journal*, vol. 113, no. 1, pp. 109–119, 2017.
- [136] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 14, pp. 4925–4930, 2006.

- [137] C.-h. D. Tsai, S. Sakuma, F. Arai, and M. Kaneko, “What is the difference of cell deformation between push and pull?,” in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2014*, pp. 793–795, Chemical and Biological Microsystems Society, 2014.
- [138] B. Chu, *Laser light scattering: basic principles and practice*. Academic Press Inc., 1974.
- [139] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation, 2000.
- [140] A. Einstein, “Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen,” *Annalen der Physik*, vol. 4, 1905.
- [141] A. Warner, M. Onoe, and G. Coquin, “Determination of elastic and piezoelectric constants for crystals in class (3 m),” *The journal of the acoustical society of America*, vol. 42, no. 6, pp. 1223–1231, 1967.

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. Atomic Force Microscope)
AChE	Acetylcholinesterase
ACh	Acetylcholin
ASCh	Acetylthiocholin
CFD	Numerische Strömungsmechanik (engl. Computational Fluid Dynamics)
CFL	Courant-Friedrichs-Lewy
DDM	Differentielle Dynamische Mikroskopie
DiOC₁₄	DiOC ₁₄ (3) Hydroxyethanesulfonate
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
FEM	Finite-Elemente-Methode
HeLa	Henrietta Lacks
HF	Hochfrequenz
LiNbO₃	Lithiumniobat
LiTaO₃	Lithiumtantalat
MSD	Mittlere Quadratische Verschiebung (engl. Mean Squared Displacement)
NWA	Netzwerkanalysator
MLV	Multilamellare Vesikel (engl. Multilamellar Vesicle)
IDT	Interdigitaler Schallwandler (engl. Interdigital Transducer)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PIV	Particle Image Velocimetry
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
SAW	Akustische Oberflächenwelle (engl. Surface Acoustic Wave)
SCh	Thiocholin
SLB	Festkörpergestützte Lipidmembran (engl. Supported Lipid Bilayer)

- SUV** Kleine Unilamellare Vesikel (engl. Small Unilamellar Vesicle)
TIDT Verjüngter Interdigitaler Schallwandler (engl. Tapered Interdigital Transducer)
TNP Therapeutische Nanopartikel

Anhang

A.1 Zu Kapitel 1

Akustische Oberflächenwellen

Für die Berechnung der Auslenkung des Substrats in *Abb. 1.3* werden folgende Materialkonstanten für Silica [29] verwendet:

- Dichte $\rho = 2203 \text{ kg/m}^3$
- elastische Konstante $c_{11} = \lambda + 2\mu = 7.85 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$
- elastische Konstante $c_{44} = \mu = 3.12 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$

FEM Simulation zum Mischen im Kanal

Um das Mischverhalten simulieren zu können, wird zum einen das Strömungsfeld im Kanal berechnet, zum anderen wird die Verteilung des Farbstoffs bestimmt. Beide Phänomene können mit dem Modul CFD von Comsol Multiphysics berechnet werden. Für das Strömungsfeld im Kanal wird der Physikbereich *Laminare Strömung*, der ein Spezialfall des *Fluidströmung* ist, verwendet. Die Verteilung des Farbstoffs wird mit dem Physikbereich *Transport verdünnter Spezies*, der ein Spezialfall des *Chemischen Stofftransports* ist, berechnet. Zusätzlich werden im Folgenden wichtige Einstellungen in der Software aufgelistet:

- **Geometrie:** *Abb. A.1* zeigt eine schematische Darstellung des Modells, das für die Simulationen zur Mischung im Kanal verwendet wird. *Tabelle A.1* fasst wichtige Simulationsparameter zusammen.
- **Laminare Strömung:**
 - Für die 2D Simulationen wird die Höhe des Kanals durch eine Näherung für flache Kanäle berücksichtigt (Einstellung in der Software *Näherung des flachen Kanals verwenden*).
 - Bei *Fluideigenschaften* wird die Dichte ρ und dynamische Viskosität μ vorgegeben.

- Als Randbedingung für den *Einlass* wird *Voll ausgebildete Strömung* gewählt und die entsprechende *Flussrate* vorgegeben.
- Als Randbedingung für den *Auslass* wird *Druck* gewählt und auf $p_0 = 0$ Pa gesetzt.
- Die SAW wird durch eine exponentiell abfallende *Volumenkraft* vorgegeben.

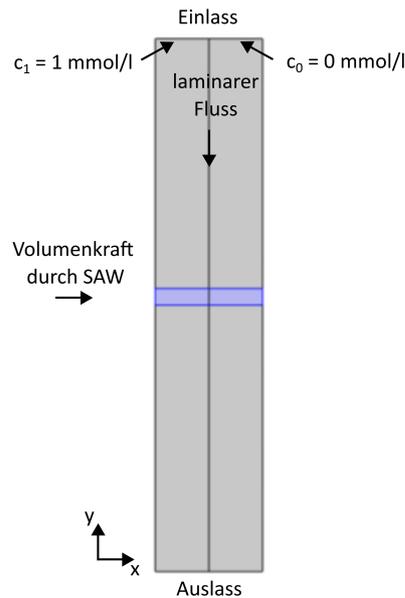


Abb. A.1: Schematische Darstellung des Simulationsmodells für die Mischung im Kanal.

- **Transport verdünnter Spezies:**

- Bei *Transporteigenschaften* wird für *Konvektion* das *Geschwindigkeitsfeld* *spf* der *Laminaren Strömung* verwendet.
- Bei *Diffusion* wird der *Diffusionskoeffizient* D vorgegeben.
- Für den linken *Einlass* wird eine *Konzentration* von $c_1 = 1$ mmol/l vorgegeben.
- Für den rechten *Einlass* wird eine *Konzentration* von $c_0 = 0$ mmol/l vorgegeben.

- **Netz:** Als *Netz* wird ein *Physik-gesteuertes Netz* mit Elementgröße *Gröber* vorgegeben.

Tabelle A.1: Simulationsparameter für die Mischung im Kanal

Parameter	Bezeichnung	Wert	Einheit
l	Länge des Kanals	1	mm
b	Breite des Kanals	200	μm
h	Höhe des Kanals	100	μm
ρ	Dichte Wasser	1000	kg/m^3
η	Viskosität Wasser	1	mPas
D	Diffusionskoeffizient	$1 \cdot 10^{-10}$	m^2/s
b	Schallpfadbreite	175	μm

- **Studie:** Sowohl für die Studie *Stationär* als auch für die Studie *Zeitabhängig* wird der Standard *Löser* verwendet.

Abschätzung Schallpfadbreite

Nach Frommelt [3] lässt sich die Schallpfadbreite eines Tapered IDT (TIDT) folgendermaßen abschätzen, zunächst wird der Verjüngungsfaktor t definiert:

$$t = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_2}, \quad (\text{A.1})$$

mit λ_2 der oberen Grenzwellenlänge und λ_1 der unteren Grenzwellenlänge. Für nicht zu große t gilt die Näherung:

$$f_1 \approx (1+t)f_2, \quad (\text{A.2})$$

mit f_1 und f_2 den Frequenzen der entsprechenden Wellenlängen. Die 3 dB Bandbreite eines TIDT lässt sich abschätzen durch:

$$B_{3\text{dB}}^{\text{TIDT}} \approx t f_2. \quad (\text{A.3})$$

Auch ein Standard IDT weist eine gewisse Bandbreite auf. Diese ergibt sich zu:

$$B_{3\text{dB}} \approx 0.9 \frac{f_2}{N}, \quad (\text{A.4})$$

mit N der Fingeranzahl. Die effektive Schallpfadbreite des TIDT kann dann aus dem Verhältnis der Bandbreiten abgeschätzt werden:

$$b_{\text{eff}} \approx d \frac{B_{3\text{dB}}}{B_{3\text{dB}}^{\text{TIDT}}}. \quad (\text{A.5})$$

Damit ergibt sich mit den Werten aus Tabelle A.2 eine effektive Schallpfadbreite von $b_{\text{eff}} = 175 \mu\text{m}$.

Tabelle A.2: Parameter des in den Experimenten verwendeten TIDT [6]

Parameter	Bezeichnung	Wert	Einheit
b	Apertur	600	μm
λ_1	Wellenlänge	46	μm
λ_2	Wellenlänge	48	μm
f_1	Frequenz	75.7	MHz
f_2	Frequenz	79.9	MHz
N	Fingeranzahl	60	

A.2 Zu Kapitel 2

Herstellung von SAW-Chips

Hier wird das Vorgehen bei der Herstellung der SAW-Chips zusammengefasst. Grundsätzlich werden dabei folgende Techniken eingesetzt:

- Schleuderbeschichtung (engl. *Spin Coating*)
- Fotolithografie
- Plasmaätzen
- Gasphasenabscheidung

Dabei werden folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Schleuderbeschichtung

- Reinigen des Substrats in Aceton im Ultraschallbad
- Spülen des Substrats mit Aceton, Isopropanol
- Trocknen mit Stickstoffpistole

- Auflegen des Substrats (LiNbO_3) auf Drehteller im Spin Coater
- Aufbringen des Lacks¹ mit Pipette
- Spreadcycle: 5s mit 500 rpm (ramp 3)
- Spincycle: 30 s mit 4000 rpm (ramp 1)
- Auf Heizplatte für 60 s bei 90 °C (Prebake)
- Probe einige Minuten abkühlen lassen

2. Belichtung der Probe

- Einbauen der Probe in Maskalinger
- Ausrichten der Chrommaske
- Chrommaske und Probe in Kontakt bringen
- Belichtungsschritt (30 s)
- 60 s auf Heizplatte bei 110 °C (Post Exposure Bake)
- Probe einige Minuten abkühlen lassen

3. Entwickeln der Probe

- Probe für 60 s in Entwickler schwenken²
- Probe für 20 s in destilliertem Wasser schwenken (Entwickeln stoppen)

4. Plasma Reinigen

- Probe in Plasma-Prozessor³ einbauen
- Programm durchführen (Leistung: 800 W, Druck: 1 mbar Zeit: 60 s)
- Ausbauen der Probe

5. Aufdampfen der Metallschicht

- Probe in ESTHER einbauen
- Abpumpen der Kammer auf Arbeitsdruck (10^{-5} mbar)
- Elektronenstrahlverdampfen (siehe Tabelle A.3)

¹AZ MIR 701, Merck, Darmstadt, Deutschland

²AZ 726 MIF, Merck, Darmstadt, Deutschland

³300 Autoload-PC Plasma Processor, PVA TePla, Wetzlar, Deutschland

- Belüften der Kammer
- Ausbauen der Proben

Tabelle A.3: Elektronenstrahlverdampfen

Schritt	Material	Schichtdicke	Rate
1	Titan	10 nm	0,05 nm/s
2	Gold	50 nm	0,05 nm/s
3	Titan	10 nm	0,05 nm/s

6. Lift off

- Einlegen der Probe in Lift off Medium⁴ für ca. 10 h
- 5 min in Ultraschallbad in Lift off Medium
- 5 min in Ultraschallbad in Isopropanol
- Probe mit Isopropanol spülen
- Mit Stickstoffpistole trocken blasen

7. Aufdampfen einer Glasschicht (optional)

- Probe reinigen im Plasma Prozessor (siehe Schritt 4)
- Probe in ESTHER einbauen
- Abpumpen der Kammer auf Arbeitsdruck (10^{-5} mbar)
- Thermisches Verdampfen von SiO (Rate: 0,2 nm/s, Schichtdicke: 200 nm)
- Belüften der Kammer
- Ausbauen der Probe
- Reinigen der Probe mit Isopropanol

8. Einkleben des Chips in Platine

- Etwas Sekundenkleber auf Fassung der Platine geben
- Einlegen des Chips in die Fassung
- Chip leicht andrücken

⁴TechniStrip Micro D350, MicroChemicals, Ulm, Deutschland

- Kleber einige Minuten trocknen lassen
- Kontaktflächen mit Silberleitpaste bestreichen

Berechnung Extinktionskoeffizient

Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten von TNB^{2-} muss die Höhe des Probenvolumens (Schichtdicke d) bekannt sein. Diese lässt sich aus der Geometrie der Vertiefung der Mikrotiterplatte berechnen. Die Vertiefung stellt einen Kegelstumpf dar (siehe Abb. A.2).

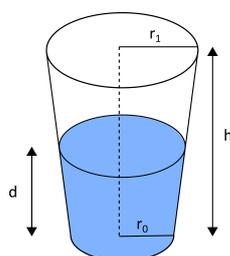


Abb. A.2: Schematische Darstellung der Vertiefung einer Mikrotiterplatte.

Das Volumen V in Abhängigkeit der Schichtdicke d dieses Kegelstumpfs, kann über folgendes Volumenintegral in Zylinderkoordinaten berechnet werden:

$$V = \int_0^{2\pi} \int_0^d \int_0^{r(z)} r(z) dr dz d\varphi = \frac{\pi}{3m} \left[(md + r_0)^3 - r_0^3 \right], \quad (\text{A.6})$$

wobei $r(z) = mz + r_0$ und $m = (r_1 - r_0)/h$ ist. Durch Auflösen nach der Schichtdicke erhält man:

$$d = \frac{\left(\frac{3mV}{\pi} + r_0^3 \right)^{1/3} - r_0}{m}. \quad (\text{A.7})$$

Die Parameter, der in den Experimenten verwendete Mikrotiterplatte⁵, werden in *Tabelle A.4* zusammengefasst.

Damit ergibt sich bei einem Volumen $V = 100 \mu\text{l}$ eine Schichtdicke von $d = 3.04 \text{ mm}$. Mit einer Steigung von $s = 8000 \text{ liter/mol}$ ergibt sich der Extinktionskoeffizient zu $\varepsilon = 26667 \text{ liter}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$.

⁵96-well Clear Polystyrene Microplates, Corning, Corning, NY, USA

Tabelle A.4: Parameter der Mikrotiterplatte

Parameter	Wert
r_0	3.2 mm
r_1	3.45 mm
h	10.7 mm

Aufbau zur Absorptionsmessung

Die Messungen unter Einfluss eines elektrischen Feldes werden mit einem selbstgebauten Aufbau durchgeführt, der aus einer LED⁶ als Lichtquelle, einem Bandpassfilter⁷ und einem Photodetektor⁸ besteht. Das elektrische Signal wird mit einem Signalgenerator⁹ erzeugt (siehe *Abb. A.3*). Die LED und der Photodetektor werden über ein Datenerfassungsgerät¹⁰ betrieben. Die Probenkammer bildet ein Teflonring, der mit zwei Deckgläsern abgedichtet wird. Um ein Auslaufen von Flüssigkeit zu verhindern, wird ein dünner Film Silikonpaste¹¹ zwischen Teflonring und den Deckgläsern aufgebracht. Das elektrische Signal des Signalgenerators wird an zwei mit Fluor dotierten Zinnoxid (FTO) Objektträgern angelegt¹². Diese fungieren als Plattenkondensator und umgeben die Probenkammer. Der Plattenabstand beträgt etwa 6 mm.

⁶LED405E, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

⁷FB410 - 10, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

⁸DET100A2, Thorlabs Inc, Newton, NJ, USA

⁹Agilent 33250A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

¹⁰USB-6009 Multifunktions-I/O-Gerät, National Instruments, Austin, TX, USA)

¹¹KORASILON-Paste, Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Deutschland

¹²FTO Objektträger, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

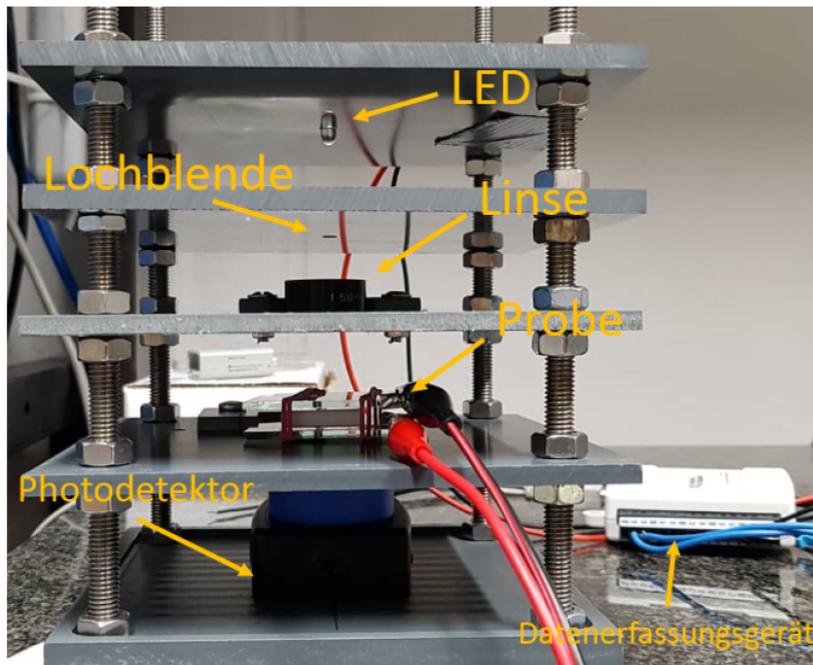


Abb. A.3: Versuchsaufbau zur Absorptionsmessung.

A.3 Zu Kapitel 3

Simulation akustischer Oberflächenwellen

Zur Simulation von Akustischen Oberflächenwellen in Comsol Multiphysics sind die Module *Festkörpermechanik* und *Elektrostatik* notwendig, wobei diese über das Multiphysik Modul *Piezoelektrischer Effekt* gekoppelt werden. Wichtige Einstellungen in der Software werden hier aufgelistet.

Eigenfrequenzstudie

Die folgenden Einstellungen betreffen die Simulationen, deren Ergebnisse in den Abb. 3.4, 3.5 und 3.8 gezeigt werden.

- **Definition:** Es wird als *Koordinatensystem* ein *Rotiertes System* vorgegeben. Anhand der Euler-Winkel erhält man die gewünschte Orientierung des Kristalls.
 - LiTaO₃ 36° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 54^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$

– LiNbO₃ 128° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = -38^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$

- **Geometrie:** *Abb. A.4* zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Geometrie. Diese setzt sich zusammen aus einer unteren Hälfte (piezoelektrisches Material) und einer oberen Hälfte (Luft). Die Abmessung der Geometrie ist in *Tabelle A.6* zusammengefasst.

- **Material:**

- Für die obere Hälfte der Geometrie werden die elektrischen Eigenschaften vorgegeben. Mechanische Eigenschaften werden vernachlässigt. Die elektrischen Eigenschaften werden durch die komplexe Permittivität berücksichtigt:

$$\hat{\epsilon} = \epsilon' + i\epsilon'' = \epsilon_r \epsilon_0 - i \frac{\sigma}{\omega} \quad (\text{A.8})$$

mit ϵ_r der relativen Permittivität, ϵ_0 der elektrische Feldkonstante und ω der Kreisfrequenz.

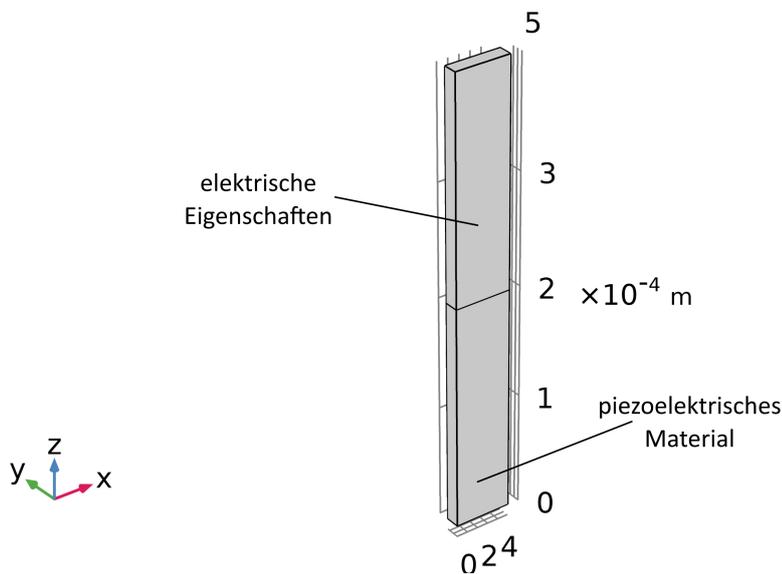


Abb. A.4: Schematische Darstellung der verwendeten Geometrie (betrifft *Abb. 3.4, 3.5* und *3.8*).

Tabelle A.5: Abmessung der Geometrie

Parameter	Bezeichnung	Wert
λ	Wellenlänge	$50 \mu\text{m}$
h_{unten}	Höhe	4λ
b_{unten}	Breite	λ
d_{unten}	Tiefe	$\lambda/4$
h_{oben}	Höhe	4λ
b_{oben}	Breite	λ
d_{oben}	Tiefe	$\lambda/4$

- Für die untere Hälfte der Geometrie wird das piezoelektrische Material vorgegeben.
- Die benötigten Materialparameter für das piezoelektrische Material sind der Elastizitätstensor C , der piezoelektrische Koppeltensor e und der dielektrische Tensor ε . Da es sich bei LiNbO_3 und LiTaO_3 um trigonale Kristalle handelt, haben diese Tensoren folgende Einträge [28, 141]:

Elastizitätstensor C :

$$\begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & -c_{14} & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{13} & -c_{14} & 0 & 0 \\ c_{13} & c_{13} & c_{33} & 0 & 0 & 0 \\ c_{14} & -c_{14} & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & c_{14} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{14} & \frac{c_{11}-c_{12}}{2} \end{pmatrix}$$

Piezoelektrischer Koppeltensor e :

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & e_{15} & -e_{22} \\ -e_{22} & e_{22} & 0 & e_{15} & 0 & 0 \\ e_{31} & e_{31} & e_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Dielektrischer Tensor ϵ :

$$\begin{pmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{pmatrix}$$

Die in der Simulation verwendeten Materialparameter sind der Quelle [90] entnommen.

– **LiTaO₃**

Elastizitätstensor C (10^{10} Pa):

$$\begin{pmatrix} 23.28 & 4.65 & 8.36 & -1.05 & 0 & 0 \\ 4.65 & 23.28 & 8.36 & 1.05 & 0 & 0 \\ 8.36 & 8.36 & 27.5 & 0 & 0 & 0 \\ -1.05 & 1.05 & 0 & 9.49 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 9.49 & -1.05 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1.05 & 9.32 \end{pmatrix}$$

Piezoelektrischer Koppeltensor e (C/m^2):

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 2.64 & -1.86 \\ -1.86 & 1.86 & 0 & 2.64 & 0 & 0 \\ -0.22 & -0.22 & 1.71 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Dielektrischer Tensor $\epsilon_{rs}(1)$:

$$\begin{pmatrix} 40.9 & 0 & 0 \\ 0 & 40.9 & 0 \\ 0 & 0 & 42.5 \end{pmatrix}$$

– **LiNbO₃**

Elastizitätstensor C (10^{10} Pa):

$$\begin{pmatrix} 19.839 & 5.472 & 6.513 & 0.788 & 0 & 0 \\ 5.472 & 19.839 & 6.513 & -0.788 & 0 & 0 \\ 6.513 & 6.513 & 22.790 & 0 & 0 & 0 \\ 0.788 & -0.788 & 0 & 5.965 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 5.965 & 0.788 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0.788 & 7.184 \end{pmatrix}$$

Piezoelektrische Koppeltensor e (C/m²):

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 3.69 & -2.42 \\ -2.42 & 2.42 & 0 & 3.69 & 0 & 0 \\ 0.40 & -0.40 & 1.77 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Dielektrischer Tensor $\epsilon_{rs}(1)$:

$$\begin{pmatrix} 45.6 & 0 & 0 \\ 0 & 45.6 & 0 \\ 0 & 0 & 26.3 \end{pmatrix}$$

• **Festkörpermechanik:**

- Für die untere Hälfte der Geometrie wird ein *Piezoelektrisches Material* gewählt.
- Für gegenüberliegende Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.
- Für die Unterseite wird ein *Festlager* gewählt.

• **Elektrostatik:**

- Für die obere Hälfte der Geometrie wird *Ladungserhaltung* gewählt.
- Für die untere Hälfte der Geometrie wird *Ladungserhaltung, piezoelektrisch* gewählt.
- Für gegenüberliegende Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.
- Für die Unterseite wird *Elektrisches Potential* gewählt mit $V_0 = 0$ V.

- **Netz:**
 - Es wird ein *Benutzerdefiniertes Netz* gewählt.
 - Die minimale und maximale Elementgröße ist $\lambda/16$.
 - Auf einer Seite wird *Strukturiert* gewählt.
 - Das Netz wird zur anderen Seite hin *Extrudiert*.
- **Studie:**
 - Die Auswahl *Nach Eigenfrequenzen durchsuchen* wird gewählt und als Frequenz die theoretisch erwartete Frequenz vorgegeben.
 - Für die *Löserkonfiguration* werden die Standardwerte beibehalten.

Eigenfrequenzstudie mit Zellschicht

Zur Berücksichtigung der Zellschicht in der Simulation wird das oben beschriebene Modell erweitert. Dies betrifft die Simulationen, deren Ergebnisse in den *Abb. 3.9* und *Abb. 3.10* gezeigt werden.

- **Geometrie:** Die Geometrie entspricht im Wesentlichen der oben beschriebenen Geometrie für die Eigenfrequenzstudie ohne Zellschicht. Zur Berücksichtigung der Konfiguration des Experiments werden in die obere Hälfte zusätzlich eingefügt (siehe *Abb. A.5*):
 - eine SiO₂-Schicht ($h = 150$ nm)
 - eine Schicht Kulturmedium ($h = 100$ nm)
 - eine Zellschicht ($h \approx 10$ μ m).
- **Material:**
 - Die SiO₂-Schicht wird als linear elastisches Material angenommen (E-Modul $E = 70.55$ GPa, Poissonzahl $\nu = 0.17$, Dichte $\rho = 2410$ kg/m³ und relative Permittivität $\epsilon = 3.9$).
 - Für die Zellschicht und das Kulturmedium werden nur die elektrischen Eigenschaften berücksichtigt, die durch die komplexe Permittivität $\hat{\epsilon}$ berücksichtigt werden.

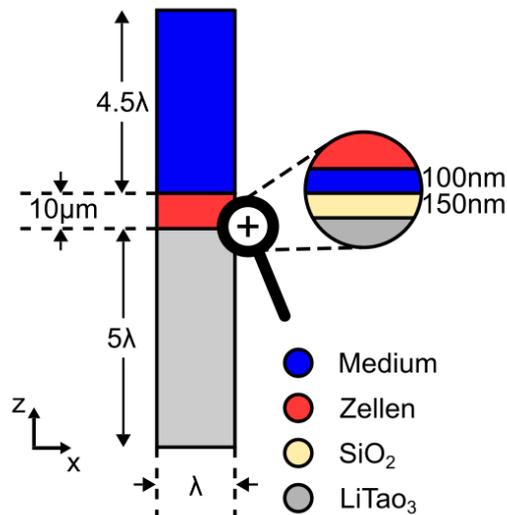


Abb. A.5: Schematische Darstellung der verwendeten Geometrie (betrifft Abb. 3.4, 3.5 und 3.8).

Zeitabhängige Simulation

Die folgenden Einstellungen betreffen die Simulationen, deren Ergebnisse in den Abb. 3.6 und Abb. 3.7 gezeigt werden.

- **Definition:** Es wird als *Koordinatensystem* ein *Rotiertes System* vorgegeben. Anhand der Euler-Winkel erhält man die gewünschte Orientierung des Kristalls.
 - LiTaO_3 36° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 54^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$
 - LiNbO_3 128° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = -38^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$
- **Geometrie:** Abb. A.6 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Geometrie.

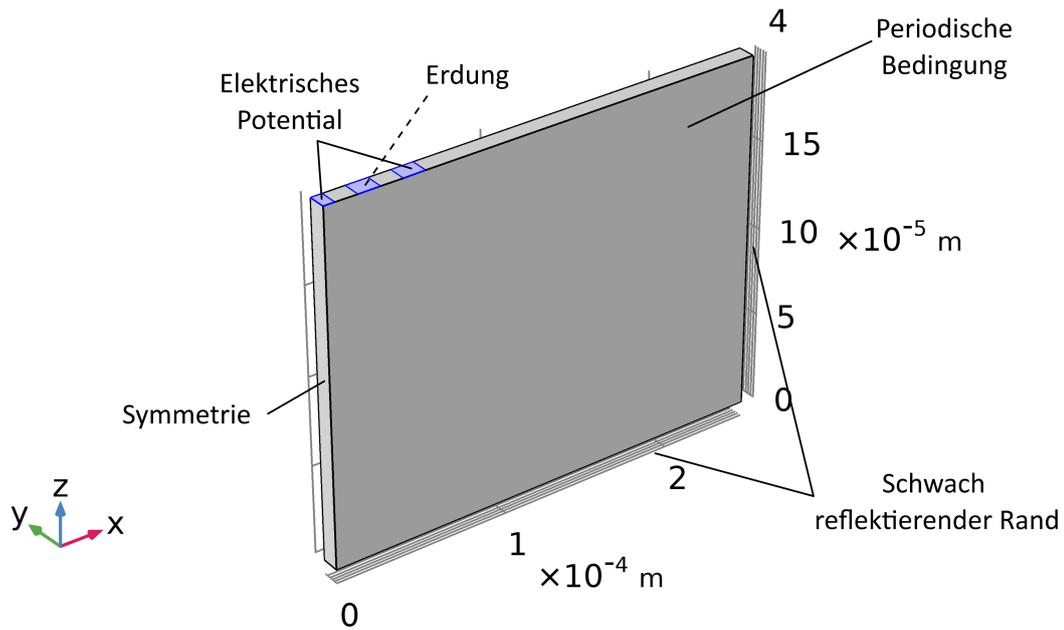


Abb. A.6: Schematische Darstellung der verwendeten Geometrie (betrifft Abb. 3.6 und 3.7).

Tabelle A.6: Abmessung der Geometrie

Bezeichnung	Wert
Wellenlänge λ	$50 \mu\text{m}$
Höhe h_{piezo}	4λ
Breite b_{piezo}	5λ
Tiefe d_{piezo}	$\lambda/5$

- **Material:** Für die gesamte Geometrie wird das jeweilige piezoelektrische Material vorgegeben (Materialparameter siehe oben).
- **Festkörpermechanik:**
 - Für die gesamte Geometrie wird ein *Piezoelektrisches Material* gewählt.
 - Für gegenüberliegende lange Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.
 - Für die Unterseite und den rechten Rand wird ein *Schwach reflektierender Rand* gewählt.

- Für die linke Seite wird *Symmetrie* gewählt.
- **Elektrostatik:**
 - Für die gesamte Geometrie wird *Ladungserhaltung, piezoelektrisch* gewählt.
 - Für gegenüberliegende lange Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.
 - Für die Elektroden wird *Elektrisches Potential* gewählt und eine *Wellenform* mit Frequenz $f = 80$ MHz vorgegeben bzw. *Erdung* gewählt.
- **Netz:**
 - Es wird ein *Benutzerdefiniertes Netz* gewählt.
 - Die minimale und maximale Elementgröße ist $\lambda/5$.
 - Als Netz wird *freies Tetraedernetz* gewählt.
- **Studie:**
 - Für die Studie wird *Zeitabhängig* gewählt.
 - Als Zeitschritt wird $\Delta t = 1$ ns gewählt.

Zeitabhängige Simulation des Modellsensors

Die folgenden Einstellungen betreffen die Simulation, deren Ergebnisse in *Abb. 3.11* gezeigt wird.

- **Definition:** Es wird als *Koordinatensystem* ein *Rotiertes System* vorgegeben. Anhand der Euler-Winkel erhält man die gewünschte Orientierung des Kristalls.
 - LiTaO_3 36° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 54^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$
 - LiNbO_3 128° Y-Schnitt: $\alpha = 0^\circ$, $\beta = -38^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$
- **Geometrie:** *Abb. A.7* zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Geometrie. Die Wellenlänge entspricht hier $\lambda = 20$ μm .

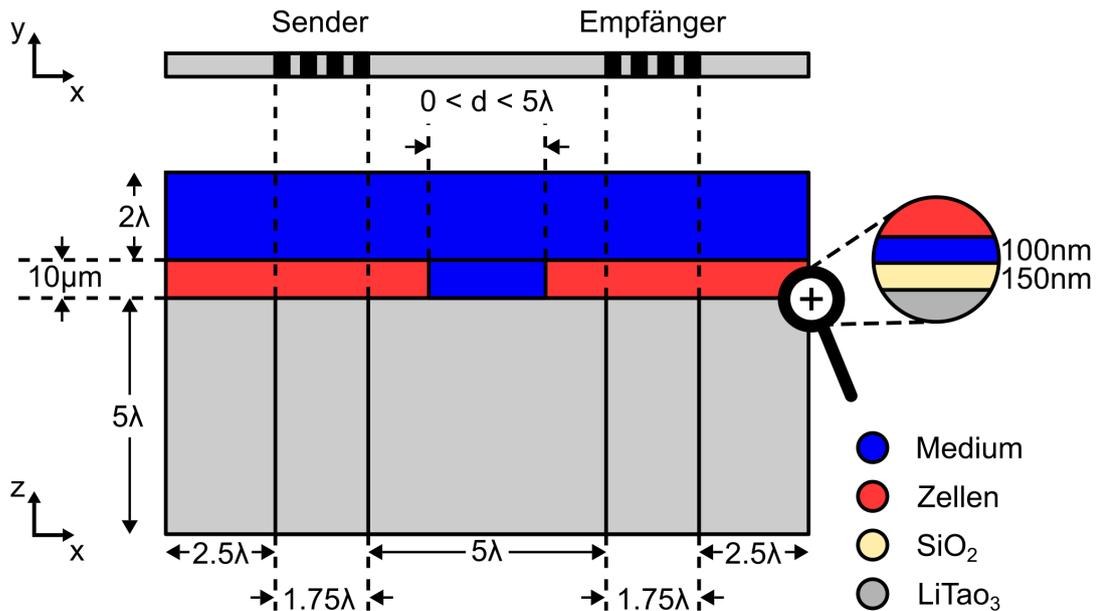


Abb. A.7: Schematische Darstellung der Geometrie (betrifft Abb. 3.11).

- **Material:** Die Materialparameter werden entsprechend der Abb. A.7 zugewiesen. Die Werte entsprechen den bereits oben genannten Werten.
- **Festkörpermechanik:**
 - Für den, Bereich der LiTaO₃ repräsentiert, wird *Piezoelektrisches Material* gewählt.
 - Für die SiO₂-Schicht wird *Linear Elastisches Material* gewählt.
 - Für gegenüberliegende lange Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.
 - Für die Unterseite, den linken und rechten Rand wird ein *Schwach reflektierender Rand* gewählt.
- **Elektrostatik:**
 - Für den Bereich, der LiTaO₃ repräsentiert, wird *Ladungserhaltung, piezoelektrisch* gewählt.
 - Für den Rest wird *Ladungserhaltung* gewählt.
 - Für gegenüberliegende lange Seiten werden *Periodische Bedingungen* gewählt.

- Für die Elektroden des Sender-IDT wird *Elektrisches Potential* gewählt und eine *Wellenform* mit Frequenz $f = 208$ MHz vorgegeben bzw. *Erdung* gewählt.
- Für die Elektroden des Empfänger-IDT wird *Floating Potential* bzw. *Erdung* gewählt.

- **Netz:**
 - Es wird ein *Benutzerdefiniertes Netz* gewählt.
 - Die minimale und maximale Elementgröße ist $\lambda/8$.
 - Auf einer Seite wird *Strukturiert* gewählt.
 - Das Netz wird zur anderen Seite hin *Extrudiert*.

- **Studie:**
 - Für die Studie wird *Zeitabhängig* gewählt.
 - Als Zeitschritt wird $\Delta t = T_0/(8\pi) \approx 0.19$ ns gewählt.

A.4 Zu Kapitel 4

Laminare Umströmung eines Zellaggregats

Zur Simulation der laminaren Umströmung eines Zellaggregats wird der Physikbereich *Laminare Strömung*, der ein Spezialfall des *Fluidströmung* ist, verwendet. Im Folgenden werden wichtige Einstellungen in der Software aufgelistet.

- **Geometrie:** *Abb. A.8* zeigt eine schematische Darstellung des Modells, das für die Simulationen der laminaren Umströmung eines Zellaggregats verwendet wird. *Tabelle A.7* fasst wichtige Simulationsparameter zusammen.

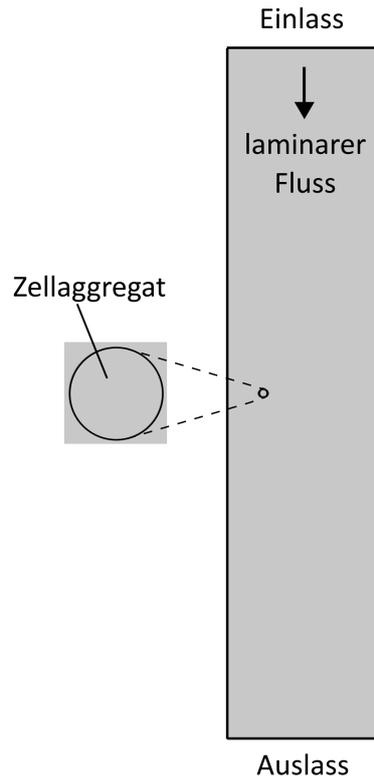


Abb. A.8: Schematische Darstellung des Simulationsmodells für die laminare Umströmung eines Zellaggregats.

- **Laminare Strömung:**

- Für die 2D Simulationen wird die Höhe des Kanals durch eine Näherung für flache Kanäle berücksichtigt (Einstellung in der Software *Näherung des flachen Kanals verwenden*).
- Bei *Fluideigenschaften* wird die Dichte ρ und dynamische Viskosität μ vorgegeben.
- Als Randbedingung für den *Einlass* wird *Voll ausgebildete Strömung* gewählt und die entsprechende *Flussrate* vorgegeben.
- Als Randbedingung für den *Auslass* wird *Druck* gewählt und auf $p_0 = 0$ Pa gesetzt.

- **Netz:** Als *Netz* wird ein *Physik-gesteuertes Netz* mit Elementgröße *Normal* vorgegeben.

- **Studie:** Als Studie wird *Stationär* gewählt.

Tabelle A.7: Simulationsparameter für die laminare Umströmung eines Zellaggregats

Parameter	Bezeichnung	Wert	Einheit
l	Länge des Kanals	17	mm
b	Breite des Kanals	3.8	mm
h	Höhe des Kanals	0.4	μm
ρ	Dichte Flüssigkeit	1000	kg/m^3
η	Viskosität Flüssigkeit	1	mPas
r	Radius Zellaggregat	104	μm
F	Flussrate	0.2	$\mu\text{l/min}$

Simulation der Trajektorie einer Faser

Zur Simulation der Trajektorie einer Faser werden die Physikbereiche *Laminare Strömung* und *Strukturmechanik* verwendet. Diese werden über das Multiphysik-Modul *Fluid-Festkörper-Wechselwirkung* miteinander gekoppelt. Im Folgenden werden wichtige Einstellungen in der Software aufgelistet:

- **Definition:**
 - Bei *Bewegliches Netz* wird *Deformierendes Gebiet* hinzugefügt und die gesamte Geometrie bis auf die Faser und das Zellaggregat ausgewählt.
 - Bei *Bewegliches Netz* wird *Fester Rand* hinzugefügt, wobei die Wand des Kanals und der Rand des Zellaggregats gewählt wird.
- **Geometrie:**
 - Die verwendete Geometrie entspricht der Geometrie, die zur Simulation der laminaren Umströmung eines Zellaggregats verwendet wird.
 - Es wird allerdings nur eine Länge des Kanals von $l = 4.25$ mm vorgegeben.
 - Zusätzlich wird die Faser durch ein Rechteck mit einer Länge $l_{\text{Faser}} = 47.5$ μm und einer Breite von $b_{\text{Faser}} = 5$ μm repräsentiert.
- **Laminare Strömung:**

- Für die 2D Simulationen wird die Höhe des Kanals durch eine Näherung für flache Kanäle berücksichtigt (Einstellung in der Software *Näherung des flachen Kanals verwenden*).
- Bei *Fluideigenschaften* wird die Dichte ρ und dynamische Viskosität μ vorgegeben.
- Als Randbedingung für den *Einlass* wird *Voll ausgebildete Strömung* gewählt und die entsprechende *Flussrate* vorgegeben.
- Als Randbedingung für den *Auslass* wird *Druck* gewählt und auf $p_0 = 0$ Pa gesetzt.
- **Netz:** Als *Netz* wird ein *Physik-gesteuertes Netz* mit Elementgröße *Normal* vorgegeben.
- **Studie:**
 - Als Studie wird *Zeitabhängig* gewählt.
 - Als Zeitschritt wird $\Delta t = 0.1$ s gewählt.
 - Bei *Anpassung* wird *Adaptive Netzverfeinerung* gewählt.

Herstellung Kollagenetzwerk zur Vermessung des Strömungsfelds

Zur Erzeugung des Kollagenetzwerks werden folgende Schritte durchgeführt:

- 31.8 μl Kollagen¹³ (8.7 mg/ml) mit 0.5 μl ATTO-633 (0,4 mg/ml) mischen (Lösung 1)
- 0.74 μl Natriumhydroxid (1M NaOH) mit 49.5 μl DPBS¹⁴ mischen (Lösung 2)
- 1.5 μl Latex-Mikrosphären-Suspension¹⁵ mit 65.2 μl DMEM-Medium mit einem HeLa-Zellaggregat mischen (Lösung 3)
- Überführung der Kollagen-Mischung in Mikrokanal¹⁶

¹³354249, Collagen I, High Concentration, Rat Tail, 100 mg - Corning Incorporated, NY, USA

¹⁴Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS (1x), ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

¹⁵Polybead Carboxylate Microspheres 3.00um, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA

¹⁶ μ -Slide VI 0.4 ibiTreat, Ibi, Gräfelng, Deutschland

- Kollagen-Mischung mit einer hohen Flussrate (90.2 $\mu\text{l}/\text{min}$) in Mikrokanal ziehen bis HeLa-Zellaggregaten sichtbar
- Flussrate auf 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduzieren

Simulation der Invasion von Zellen im Kollagen gel

In *Abb. A.9* sind die Ergebnisse entsprechend zu *Abb. A.11* für weitere Schrittweiten gezeigt.

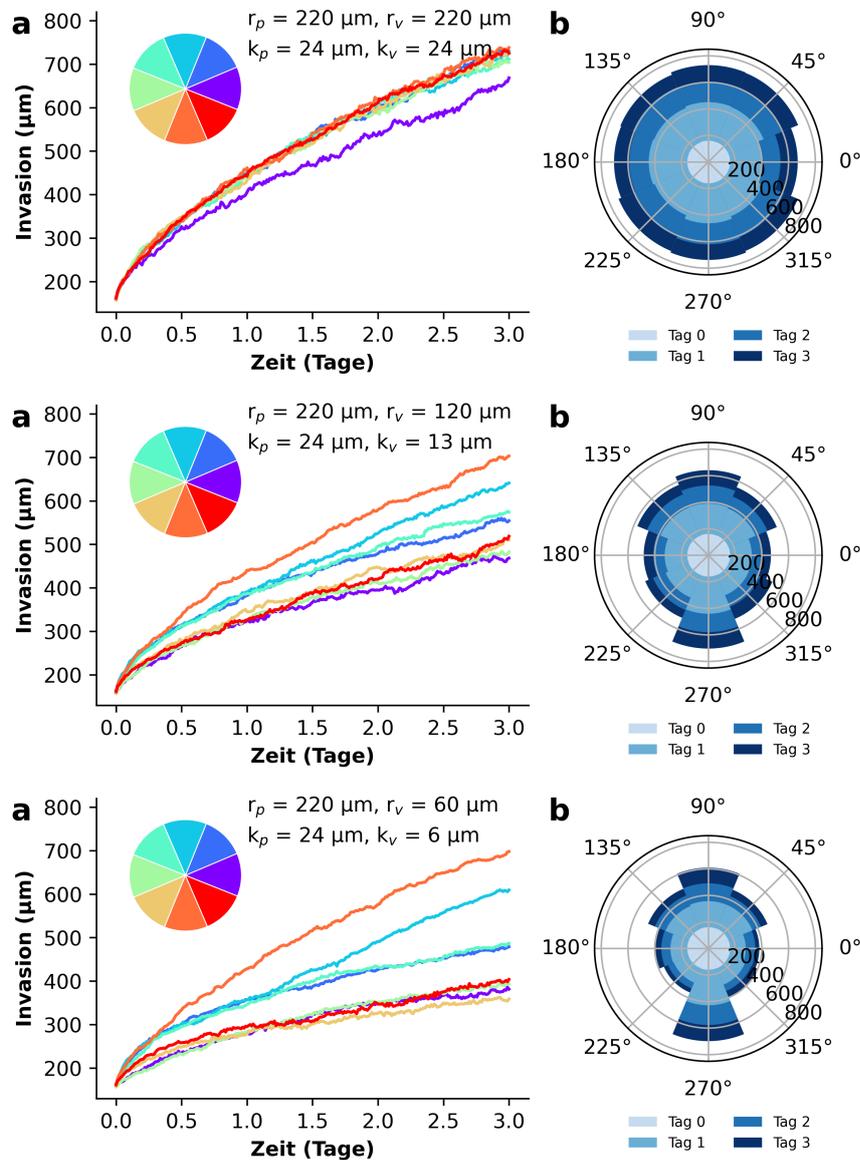


Abb. A.9: Invasion von Zellaggregaten in einem Kollagenetzwerk aufgeteilt in acht Sektoren für verschiedene Schrittweiten k_v . a) Zeitliche Ausbreitung der Zellfronten in den verschiedenen Sektoren. b) Winkeldiagramm der verschiedenen Zellfronten. Anhand dieser Auswertung lässt sich schnell erfassen, was die Vorzugsrichtungen der Zellfronten sind.

Experimentelle Daten

Zum Vergleich mit den Simulationen sind hier die Ergebnisse der Experimente von Florian Geiger gezeigt. Die *Abb. A.10* und *Abb. A.11* sind aus [97] und [98] entnommen.

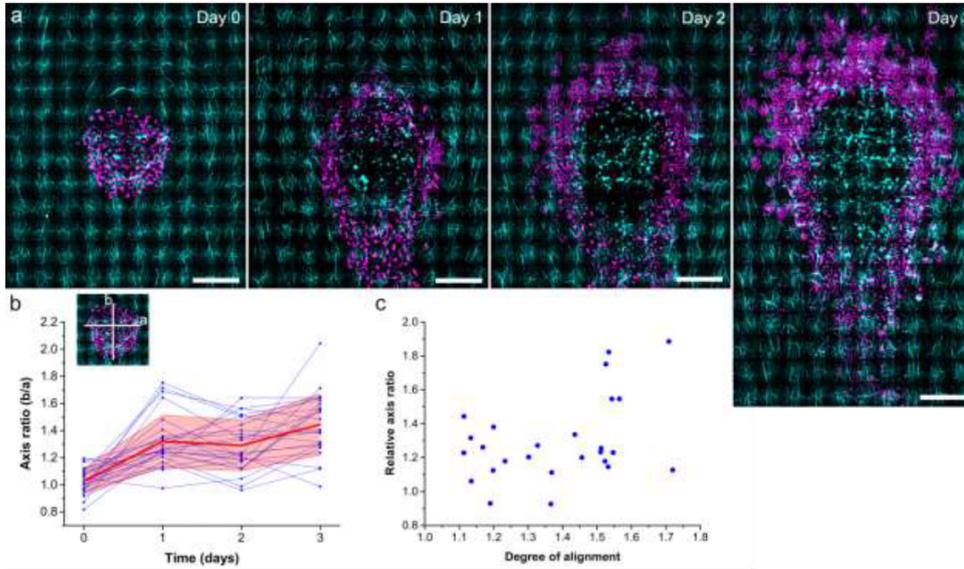


Abb. A.10: Invasion von Zellaggregaten im Experiment (Abbildung aus [97] entnommen). a) Mikroskopische Aufnahmen eines Sphäroids, das im Laufe von drei Tagen in die umgebende ausgerichtete Matrix eindringt. Hinweis: Das Sphäroid bleibt mit Zellen gefüllt, die Lücke in der Mitte des Sphäroids ist das Ergebnis einer Bildbearbeitung, um einen besseren Kontrast im Verbund mit der Matrix zu erzielen. b) Achsenverhältnis entlang der Hauptströmung (b) vs. senkrecht dazu (a) von 26 Aggregaten im Verlauf von drei Tagen (Einzelwerte: blau; Mittelwert \pm Standardfehler: rot und hellrot). c) Relatives Achsenverhältnis (Achsenverhältnis von Tag 1 normiert durch das Verhältnis von Tag 0) als Funktion des Grades der Faserausrichtung. Korrelationskoeffizient: 0,40 (Pearsonsche Korrelation). Skalenbalken = 200 μm .

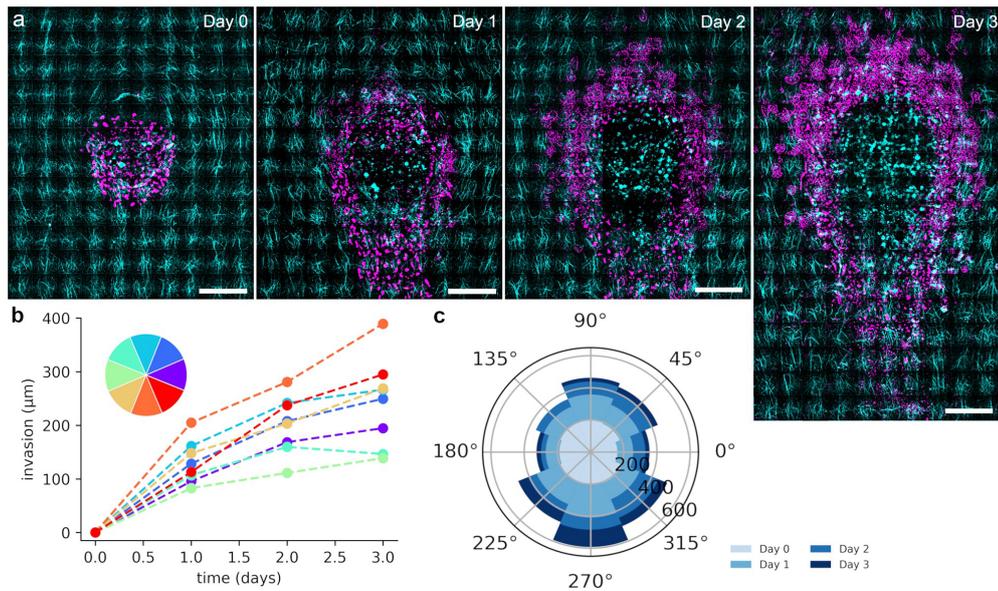


Abb. A.11: Invasion von Zellaggregaten im Experiment (Abbildung aus [98] entnommen). a) Mikroskopische Aufnahmen eines Zellaggregats, das im Laufe von drei Tagen in die umgebende ausgerichtete Matrix eindringt. Hinweis: Das Sphäroid ist weiterhin mit Zellen gefüllt, die Lücke in der Mitte des Sphäroids ist das Ergebnis einer Bildbearbeitung, um einen besseren Kontrast im Verbund mit der Matrix zu erzielen. b) Mittlerer relativer Invasionsdistanz der 10 äußersten Zellen in jeder Richtung (farbkodierte Richtungen). Die Markierungen sind Durchschnittswerte von 20 Aggregaten. c) Mittlere Invasionsdistanz der 10 äußersten Zellen für verschiedene Richtungen. Die pro Tag in jeder Richtung zurückgelegte Strecke ist blau kodiert. Skalenbalken = 200 μm .

A.5 Zu Kapitel 5

Herstellung von Mikrokanälen

Hier werden die durchgeführten Schritte zur Herstellung von Mikrokanälen aufgelistet:

1. Erstellung einer Photomaske

- Zeichnen der gewünschten Geometrie mit CAD-Software¹⁷
- Drucken der Photomaske auf Folie
- Ausschneiden des gewünschten Bereichs

2. Spin Coating

- Si-Wafer in den Spin Coater einlegen

¹⁷AutoCAD, 2017, autodesk, San Rafael, CA, USA

- Mit Vakuum fixieren
- Aufbringen des Lacks¹⁸
- Spread Cycle (siehe Tabelle A.8)
- Spin Cycle (siehe Tabelle A.8)
- Prebake (siehe Tabelle A.9)
- Softbake (siehe Tabelle A.9)
- Probe einige Minuten abkühlen lassen

3. Belichtung der Probe

- Einspannen des Wafers mit Maske in Maskaligner
- Belichtungsschritt (siehe Tabelle A.10)
- Post Exposure Bake 1 (siehe Tabelle A.11)
- Post Exposure Bake 2 (siehe Tabelle A.11)
- Probe einige Minuten abkühlen lassen

4. Entwickeln der Probe

- In Entwickler¹⁹ schwenken
- Abspülen mit Isopropanol
- Trocken blasen mit Stickstoff
- 1 h auf Heizplatte bei 120 °C

5. Aufgießen des PDMS

- Vermischen von Basiskomponente und Vernetzer²⁰ im Verhältnis 10:1 in einem Plastikröhrchen
- Entgasen des PDMS in Vakuumexsikkator
- Gießen des PDMS auf Si-Wafer in Plastikpetrischale
- Aushärten des PDMS für 4 Stunden bei 70 °C im Ofen

¹⁸SU-8-50, MicroChem, Westborough, MA, USA

¹⁹mr-Dev 600, micro resist technology, Berlin, Deutschland

²⁰Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow Corning, Midland, MI, USA

Tabelle A.8: Spin Coater Programm

Schichtdicke	Lack	Spread Cycle	Spin Cycle
10 µm	SU-8-10	500 rpm (100 rpm/s), 5-10 s	3000 rpm (300 rpm/s), 30 s
50 µm	SU-8-50	500 rpm (100 rpm/s), 5-10 s	2000 rpm (300 rpm/s), 30 s
100 µm	SU-8-50	500 rpm (100 rpm/s), 5-10 s	1000 rpm (300 rpm/s), 30 s

Tabelle A.9: Pre- und Softbake

Schichtdicke	Prebake @ 65 °C	Softbake @ 95 °C
10 µm	2 min	5 min
50 µm	6 min	20 min
100 µm	10 min	30 min

Tabelle A.10: Belichtungsschritt

Schichtdicke	Belichtung
10 µm	5 x (15 s Belichten + 45 s Pause)
50 µm	5 x (23 s Belichten + 45 s Pause)
100 µm	5 x (23 s Belichten + 45 s Pause)

Tabelle A.11: Post Exposure Bake

Schichtdicke	PEB 1 @ 65 °C	PEB 2 @ 95 °C
10 µm	2 min	4 min
50 µm	2 min	10 min
100 µm	2 min	20 min

6. Ausschneiden der Kanäle

- Ausschneiden der Kanäle mit Skalpell
- Ausstechen der Zuleitungen mit Stanzer²¹

Dynamische Lichtstreuung

Tabelle A.12 gibt die Einstellungen bei den durchgeführten DLS-Messungen²² mit Paramecien-Zellen an.

Tabelle A.12: Einstellungen bei den DLS-Messungen.

Parameter	Wert
Suspension	Wasser
Viscosity	1.002 cP
Ref. Index Fluid	1.331
Angle	90.00 °
Wavelength	666.0 nm
Runs	5
Run Duration	2 min
Ref. Index Real	1.550

²¹Harris Uni-Core, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

²²90Plus, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA

Publikationsliste

1. C. Westerhausen, L.G. Schnitzler, D. Wendel, R. Krzysztoń, U. Lächelt, E. Wagner, J. O. Rädler, and A. Wixforth. Controllable acoustic mixing of fluids in microchannels for the fabrication of therapeutic nanoparticles,“ *Micromachines*, vol. 7, no. 9, 2016.
2. L.G. Schnitzler, S. Junger, D. M. Loy, E. Wagner, A. Wixforth, A. Hörner, U. Lächelt, and C. Westerhausen, “Size tunable nanoparticle formation employing droplet fusion by acoustic streaming applied to polyplexes,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 52, no. 24, 2019.
3. M.S. Brugger, L.G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth and C. Westerhausen, „Shear-horizontal surface acoustic wave sensor for non-invasive monitoring of dynamic cell spreading and attachment in wound healing assays,“ *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 173, 2021.
4. F. Geiger, L.G. Schnitzler, M.S. Brugger, C. Westerhausen and H. Engelke, „Directed invasion of cancer cell spheroids inside 3D collagen matrices oriented by microfluidic flow in experiment and simulation,“ *Plos one*, vol. 17, no. 3, 2022.
5. L.G. Schnitzler, A. Paeger, M.S. Brugger, M. F. Schneider and C. Westerhausen „Reversible single cell trapping of *Paramecium caudatum* to correlate swimming behavior and membrane state,“ *Biomicrofluidics*, vol. 16, no. 2, 2022.
6. L.G. Schnitzler, K. Baumgartner, A. Kolb, B. Braun and C. Westerhausen, „Acetylcholinesterase Activity Influenced by Lipid Membrane Area and Surface Acoustic Waves,“ *Micromachines*, vol. 13, no. 2, 2022.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und während meiner Zeit am Lehrstuhl für Experimentalphysik I begleitet haben.

Ein großer Dank geht an Christoph Westerhausen, meinen Doktorvater und Mentor während meiner gesamten Zeit am Lehrstuhl für Experimentalphysik I. Danke Chris für deinen unerschöpflichen Einsatz während all unserer gemeinsamen Projekte und für die vielen Möglichkeiten, die du mir eröffnet hast. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an Achim Wixforth, den langjährigen Inhaber des Lehrstuhls Experimentalphysik I. Danke Achim für dein offenes Ohr bei allen Fragen und für deine Begeisterung für die Physik, die du bereits in der Vorlesung Physik I vermittelt hast.

Danke an Prof. Dr. Manfred Albrecht für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke auch an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls Experimentalphysik I. Danke an Funda Cevik, Sidone Lieber, Alexander Hupfer, Andreas Hörner und Andreas Spörhase für eure Unterstützung bei all den kleinen und großen Dingen, die während einer solchen Arbeit anfallen.

Danke an meine Bachelorstudenten, die ich während dieser Arbeit betreuen durfte. Danke an Anna Kolb, Kathrin Baumgartner und Benedikt Braun für euer Engagement.

Danke auch an alle Kollegen, Freunde und Weggefährten am Lehrstuhl für Experimentalphysik I. Mit ihnen verbinde ich viele schöne Erinnerungen an Lehrstuhlseminare, Konferenzreisen und nicht zuletzt an den gemeinsamen Gewinn des Instituts-Cups. Danke dafür insbesondere an Anna Jötten, Andrej Kamenac, Manuel Brugger, Nicolas Färber, Jonas Reitler, Joshua Winkeljann, Max Gnedel, Max Sonner, Matthias Küß, Tobias Petzak.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Frau Julia und meiner Familie bedanken. Danke für die Unterstützung und den Rückhalt bis hierher und in Zukunft.