

**3D-nanostrukturierte Multielektrodenarrays:
Konzeption, Prozessentwicklung und
Untersuchung des Einflusses maßgeschneiderter
Nanostrukturen auf elektrochemische
Eigenschaften, Zelladhäsion und Signalableitung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Ingenieurwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Ingenieur

Dominique Michael Decker

Saarbrücken

2019

Tag des Kolloquiums: 23.10.2019
Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hempelmann
Prof. Dr. Helmut Seidel
Prof. Dr. Monika Saumer

Vorsitz: Prof. Dr. Andreas Schütze
Akad. Mitarbeiter: Dr. Dan Durneata

Kurzfassung

Um das Verhalten von Zellen auf interne oder externe Stimuli zu analysieren, können die von den Zellen abgegebenen Signale mittels sogenannter Multielektrodenarrays (MEAs) detektiert werden. Dreidimensionale Nanostrukturen auf den Elektrodenoberflächen des MEAs können dabei zu einer Verbesserung der Zell-Elektroden-Kopplung beitragen und vergrößern darüber hinaus die elektrochemisch aktive Oberfläche, was zu einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses während der Messung führt. Unterschiedliche Zelltypen verhalten sich bezüglich ihrer Adhäsionscharakteristiken sehr variabel und benötigen deshalb individuell auf sie abgestimmte Nanostrukturdimensionen und -anordnungen. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Prozesslinie zur Fertigung 3D-nanostrukturierter MEA-Chips erarbeitet, die die Herstellung verschiedener MEA-Chips mit unterschiedlichen Nanostrukturlayouts erlaubt. Die Elektrodenoberflächen wurden mittels Rasterkraft- und Rasterelektronenmikroskopie sowie elektrochemischer Methoden untersucht. Beim Vergleich charakteristischer elektrochemischer Werte konnte abhängig vom Design eine signifikante Verbesserung auf Seiten der nanostrukturierten Elektroden festgestellt werden. Während der zellbiologischen Versuchsreihen führten im Besonderen überwachsene Röhrenstrukturen mit einem Durchmesser von 600 nm und einem Strukturabstand von 5 μm zu einer deutlichen Steigerung der Zell-Elektroden-Adhäsion und der gemessenen Signalamplituden.

Abstract

Analyzing the cell behavior upon internal or external stimuli, cell signals can be detected by so called multielectrode arrays (MEAs). Three-dimensional nanostructures on top of the electrodes' surfaces of the MEAs can lead to an improvement of the cell-electrode coupling and enlarge the electrochemical active surface area, thus leading to a crucial increase of the signal-to-noise ratio during the measurement. Obviously, different cells act very variable regarding their adhesion behavior. Therefore, each individual cell type might need specific dimensions and a certain arrangement of nanostructures. In this work, a process line of 3D nanostructured MEA chips is presented which allows the fabrication of a whole set of MEA chips with different nanostructure layouts in one single approach. The surfaces of the electrodes are characterized by using atomic force and scanning electron microscopy as well as electrochemical methods. By comparing characteristic electrochemical values a design-dependent improvement of the nanostructured electrodes could be revealed. Especially, overgrown tube structures with a diameter of 600 nm and a distance of 5 μm showed good characteristics during the cell-biological experiments, resulting in a distinct increase of the cell-electrode adhesion and an improvement of the recorded signal amplitudes.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation und Zielsetzung	1
1.2 Gliederung der Arbeit	2
2 Nanoimprintlithographie	5
2.1 Grundlagen der Nanoimprintlithographie.....	5
2.2 Einflussgrößen bei der Strukturübertragung.....	7
2.2.1 Einfluss der Maschine.....	7
2.2.2 Einfluss des Stempels	8
2.2.3 Einfluss des Lacks.....	10
2.3 Bewertung der Nanoimprintlithographie	13
3 Elektrochemische Abscheidung.....	15
3.1 Grundlagen der elektrochemischen Abscheidung.....	15
3.2 Reaktionskinetik	18
3.3 Einflussgrößen in der Mikrogalvanoformung.....	21
4 Ableitung elektroaktiver Zellen.....	24
4.1 Elektroaktive Zellen.....	24
4.2 Möglichkeiten der Zellsignalableitung	27
4.3 Multielektrodenarrays	29
4.4 Optimierungsmöglichkeiten der MEA-gestützten Signalableitung	31
5 Konzeption 3D-nanostrukturierter MEAs	34
5.1 Materialauswahl.....	34
5.2 Aufbau des MEA-Chips.....	36
5.3 Entwicklung eines Fabrikationsprozesses.....	38
5.4 Auslegung der Mikro- und Nanostrukturen	41

6	Prozessentwicklung zur Herstellung 3D-nanostrukturierter MEAs	46
6.1	Thermische Nanoimprintlithographie	46
6.1.1	Silanisierung des Siliziummasters	46
6.1.2	Herstellung eines Replikats des Siliziummasters	48
6.1.3	Evaluierung geeigneter NIL-Prozessparameter	53
6.1.4	Einsatz des Masters zur Strukturübertragung	58
6.1.5	Bewertung des NIL-Prozesses	62
6.2	Elektrochemische Abscheidung von Gold.....	63
6.2.1	Elektrolytzusammensetzung und Versuchsbeschreibung	63
6.2.2	Vorversuche zur Evaluierung geeigneter Prozessparameter.....	65
6.2.3	Elektrochemische Abscheidung in nanostrukturierte Wafer	67
6.2.4	Bewertung des Prozesses der elektrochemischen Abscheidung.....	71
6.3	Mikrostrukturierung	72
6.3.1	Erste Photolithographie und Ätzen der Metallschichten.....	72
6.3.2	Abscheidung der Isolationsschicht.....	75
6.3.3	Zweite Photolithographie und Ätzen der Isolationsschicht	76
6.3.4	Bewertung des Mikrostrukturierungsprozesses	79
7	Elektrochemische Charakterisierung und Rauschverhalten 3D-nanostrukturierter MEAs	81
7.1	Elektrochemische Methoden.....	81
7.1.1	Cyclovoltammetrie.....	81
7.1.2	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	82
7.2	Versuchsaufbau zur elektrochemischen Charakterisierung	84
7.3	Elektrochemische Charakterisierung von unstrukturierten Makroelektroden	86
7.3.1	Cyclovoltammetrie.....	86
7.3.2	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	88
7.4	Elektrochemische Charakterisierung nano- und unstrukturierter Mikroelektroden der hergestellten MEAs.....	91
7.4.1	Cyclovoltammetrie.....	92
7.4.2	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	98
7.4.3	Bewertung der elektrochemischen Charakterisierung	102
7.5	Charakterisierung des Rauschverhaltens der MEAs.....	104
8	Zellbiologische Untersuchungen mittels 3D-nanostrukturierter MEAs.....	108
8.1	Aufbereitung der MEAs und Zellkultivierung.....	108
8.2	Verifikation der Biokompatibilität der MEAs.....	110
8.3	Charakterisierung der Zell-Elektroden-Kopplung	111
8.3.1	Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie.....	111
8.3.2	Analyse mittels Impedanzmessungen	112

8.4	Einfluss einer adhäsionsvermittelnden Schicht auf die Nanostrukturen.....	116
8.4.1	Analyse mittels Oberflächenprofilometrie und Rasterelektronenmikroskopie.....	117
8.4.2	Analyse mittels Impedanzmessungen	119
8.5	Signalableitung an SVZ-Zellen.....	122
8.6	Möglichkeit der Wiederverwendung der hergestellten MEAs	128
9	Zusammenfassung und Ausblick.....	130
	Anhang	136
A	SOP 3D-nanostrukturierter MEAs	136
B	Simulation zur Bestimmung elektrochemischer Systemparameter	141
C	Modell zur Berechnung der topographischen Oberflächenvergrößerung.....	143
D	Geräteliste	146
E	Chemikalien- und Materialienliste.....	147
	Eidesstattliche Versicherung.....	149
	Danksagung.....	150
	Wissenschaftlicher Lebenslauf und Beiträge.....	151
	Abbildungsverzeichnis	153
	Tabellenverzeichnis	159
	Abkürzungsverzeichnis.....	160
	Symbolverzeichnis	162
	Literaturverzeichnis.....	167

1 Einleitung

1.1 Motivation und Zielsetzung

Die Suche nach neuen Behandlungsmethoden und die stetige Verbesserung bestehender Analysesysteme ist einer der wichtigsten Forschungsschwerpunkte in der Biomedizin, um komplexe Krankheiten wie Herz-Kreislauf- oder neurodegenerative Dysfunktionen verstehen, frühzeitig detektieren und letztendlich behandeln zu können. Elektroaktive Zellen wie beispielsweise Neuronen nutzen zur Informationsweiterleitung Reize in Form von elektrischen Signalen und sind selbst hoch empfindlich in ihrer Reaktion auf externe Stimuli. Die Tatsache, dass bei einer Störung der Reizübertragung künstliche elektrische Impulse eingesetzt werden können, wird in der medizinischen Anwendung bereits genutzt. So werden beispielsweise Stimulationselektroden als Neuroprothesen bei Cochlea- oder Retinaimplantaten¹ verwendet und zur Tiefenhirnstimulation bei der Therapie von behandlungsresistenter Depression² oder schwerem Tremor^{3,4} eingesetzt.

Im Gegensatz zur Stimulation besteht jedoch insbesondere bei der exakten Detektion von Zellsignalen ein erheblicher Optimierungsbedarf, da bei bestimmten Zelltypen die abgegebenen Signale derart klein sind, dass sie im Umgebungsrauschen verschwinden. Des Weiteren bedarf es einer Analyseverfahren, die das komplette Spektrum der Zellsignale eines gesamten Zellnetzwerks in Echtzeit und über einen langen Zeitraum erfassen kann. Heutzutage werden je nach Anwendung entweder intrazelluläre oder extrazelluläre Messmethoden verwendet, die individuelle Vorteile bieten, es jedoch nicht schaffen, die komplette Bandbreite der Anforderungen zu erfüllen. Ein Beispiel zur extrazellulären Sensorik bildet dabei die Gruppe der Multielektrodenarrays (MEAs). Diese Biosensoren koppeln an biologische Einheiten wie Zellen an und erlauben aufgrund ihrer Miniaturisierung das selektive Erfassen der lokalen Signale. Ein maßgebender Parameter einer qualitativ hochwertigen Messung ist hierbei die Empfindlichkeit, die mit dem Signal-Rausch-Verhältnis korreliert und neben einer geringen Eingangsimpedanz des Chips insbesondere durch die bioelektronische Schnittstelle von Zelle und Elektrode bestimmt wird. Jedoch liegt gerade hier ein wesentlicher Schwachpunkt der MEA-gestützten, extrazellulären Sensorik, da die detektierten Aktionspotentiale durch eine schlechte Ankopplung von Zelle und Elektrode von Rauschen überlagert werden und so der Informationsgehalt des Messsignals reduziert wird.

Die gängige Methode, die Ankopplung von Zelle und Elektrode zu verbessern, ist die Modifikation der Elektrodenoberfläche durch eine biologische Adhäsionsschicht. Der Einsatz solcher Schichten kann allerdings dazu führen, dass die aktiven Bereiche der Elektrodenoberfläche belegt werden, sodass trotz einer verbesserten Ankopplung die Signaldetektion verschlechtert wird. Daher steht vor allem die strukturelle Modifikation im Fokus der wissen-

schaftlichen Forschung. Obwohl es bereits eine Vielzahl von Arbeiten gibt, die die Modifikation mit Hilfe von Mikro- oder Nanostrukturen beschreiben, wirkt die Auswahl der eingesetzten Strukturen bei den jeweiligen Versuchsreihen nicht strategisch. Dabei wird vermutet, dass der Erfolg der Oberflächenmodifikation maßgeblich von der Form, Größe und Anordnung der eingesetzten Strukturen abhängt und auf den zu untersuchenden Zelltyp individuell zugeschnitten werden muss. Strukturen, die dabei von einem Zelltyp als attraktiv wahrgenommen werden und eine Verbesserung der Zell-Elektroden-Adhäsion hervorrufen, könnten bei einem anderen Zelltyp abstoßendes Verhalten und somit eine Verschlechterung des Zell-Elektroden-Kontakts auslösen. Daher liegt der Anspruch der vorliegenden, interdisziplinär ausgerichteten Arbeit darin, eine methodische Vorgehensweise zu etablieren, um die bestmöglichen Strukturen für einen gegebenen Zelltyp anhand der Zell-Elektroden-Kopplung zu evaluieren, die Signalqualität entsprechend zu steigern und so eine Verbesserung der bestehenden extrazellulären Sensoren voranzutreiben.

Um unterschiedliche Arten von Nanostrukturen, insbesondere verschiedene Formen, Abmessungen und Anordnungen, untersuchen zu können, ist das erste Ziel der Arbeit die Entwicklung einer speziell für diesen Zweck zugeschnittenen Prozesslinie zur Herstellung der MEA-Chips, welche die Integration von Mikro- und Nanostrukturen vergleichsweise schnell, kostengünstig sowie in einem erhöhten Maßstab erlaubt. Als zweites muss eine Möglichkeit geschaffen werden, etwaige Verbesserungen der Elektrodeneigenschaften (Impedanzerniedrigung, Adhäsionsverbesserung) hinsichtlich der Nanostrukturierung direkt zu detektieren. Dabei ist darauf zu achten, dass der jeweilige Effekt eindeutig auf die Nanostrukturen zurückgeführt werden kann und nicht auf sonstige Einflüsse wie beispielsweise Prozessschwankungen während der Herstellung der MEA-Chips beruht. Zur endgültigen Beurteilung der individuellen Adhäsion der Zellen muss drittens eine Messmethode entwickelt werden, welche eine Analyse der Zelladhäsion im laufenden Experiment erlaubt. Anders als bei einer nachträglichen Untersuchung mit zum Beispiel einem Rasterelektronenmikroskop, bei der die Zellen zunächst fixiert und getrocknet werden müssen und so das Ergebnis durch die Probenpräparation zumindest teilweise verfälscht werden kann, sollte die Untersuchungsmethode nicht-invasiv und an der vitalen Zellkultur möglich sein.

1.2 Gliederung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Konzeption 3D-nanostrukturierter MEAs und der Implementierung eines Nanostrukturierungsprozesses in die Mikrosystemtechnik. Hierzu gehören die Prozessentwicklung und Bewertung einzelner Prozessschritte, die elektrochemische Charakterisierung unterschiedlich nanostrukturierter MEAs und abschließend die konkrete Anwendung in der Zellbiologie zur Bestimmung der Zell-Elektroden-Kopplung und Zellsignalableitung.

Zunächst werden in **Kapitel zwei** die Grundlagen der Nanoimprintlithographie beschrieben, verschiedene Varianten erklärt und auf Vor- und Nachteile eingegangen. Daran anschließend werden die Faktoren diskutiert, welche einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der Strukturierung haben. Dazu gehören unter anderem der eingesetzte Stempel oder der verwendete Lack. Abschließend werden Anwendungsmöglichkeiten beschrieben und ein Ausblick gegeben, die die Chancen der Nanoimprintlithographie als industrielles Fertigungsverfahren einschätzen.

In **Kapitel drei** werden die Grundlagen der elektrochemischen Abscheidung erläutert, wobei vor allem die Reaktionskinetik und das Grenzflächenverhalten behandelt werden. In diesem Zusammenhang werden die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Elektrokristallisation genannt und Besonderheiten im Hinblick auf die Mikrogalvanoformung, also die elektrochemische Abscheidung in Mikrostrukturen, vorgestellt.

Im Anschluss befasst sich **Kapitel vier** mit den Grundlagen der Bioelektronik, insbesondere der Messung von Zellsignalen, welche am Beispiel von Neuronen erklärt werden. Anhand des Zellaufbaus und der Funktionsweise spannungsabhängiger Ionenkanäle wird beschrieben, wie ein elektrisches Signal zustande kommt und wie das entsprechende Signal zellulär weitergeleitet wird. Daran anschließend werden intrazelluläre und extrazelluläre Methoden zur Signaldetektion vorgestellt, wobei der Fokus auf den Multielektrodenarrays liegt. Unter Zuhilfenahme eines elektrochemischen Ersatzschaltbilds wird die Detektion der Zellsignale erläutert, Möglichkeiten der Optimierung erarbeitet und der aktuelle Stand von Wissenschaft und Technik beschrieben.

Die Konzeption der nanostrukturierten MEAs wird im sich anschließenden **Kapitel fünf** präsentiert. Im Fokus stehen die Materialauswahl, der Chipaufbau, die Implementierung eines Fabrikationsprozesses sowie die Auslegung der Mikro- und Nanostrukturen.

In **Kapitel sechs** werden die Resultate hinsichtlich der Prozessentwicklung beschrieben und diskutiert. Im Fokus der Untersuchungen stehen insbesondere die Nanoimprintlithographie, die elektrochemische Abscheidung sowie die Prozesse der Photolithographie, Gasphasenabscheidung und die verschiedenen Ätzverfahren, welche im Hinblick auf die Realisierung der MEAs beleuchtet werden. Zur Überprüfung des Herstellungsprozesses werden im Einzelnen die Aspekte Maßhaltigkeit der Strukturübertragung, Homogenität der Prozesse auf Waferebene sowie Reproduzierbarkeit auf unterschiedlichen Wafern betrachtet. Zusätzlich werden verschiedene Effekte bzw. Fehlerbilder im Zuge der Prozessoptimierung diskutiert und auf entsprechende Lösungen verwiesen.

Kapitel sieben befasst sich zunächst mit den Ergebnissen der elektrochemischen Charakterisierung, welche sich auf die Cyclovoltammetrie und die elektrochemische Impedanzspektroskopie stützen. Im Mittelpunkt steht die Evaluierung der Veränderung der übertragenen Ladungsträger und der Impedanz aufgrund der unterschiedlichen Nanostrukturen auf den Elektroden. An dieser Stelle werden Unterschiede für verschiedene Nanostrukturlayouts auf-

gezeigt und mit unstrukturierten Elektroden verglichen. Darüber hinaus wird anhand eines Modells die effektive Vergrößerung der aktiven Oberfläche den Resultaten der elektrochemischen Charakterisierung gegenübergestellt. Abschließend wird das Rauschverhalten der MEA-Chips untersucht.

In **Kapitel acht** werden anwendungsspezifische Ergebnisse hinsichtlich des Einsatzes der MEAs in der Zellbiologie vorgestellt und diskutiert. Dazu werden die MEA-Chips zuerst mit Hilfe einer beispielhaften Zelllinie (P19) auf ihre Biokompatibilität hin überprüft, was die Grundlage für alle weiteren zellbasierten Versuchsreihen ist. In einem nächsten Schritt werden die Ergebnisse der Messungen bezüglich der Zell-Elektroden-Adhäsion anhand menschlicher embryonaler Nierenzellen (HEK) vorgestellt. Da diese bereits nach wenigen Tagen eine geschlossene adhärenz und in ihrer Impedanz stabile Zellschicht ausbilden, sind diese Zellen prädestiniert für die Adhäsionsuntersuchung mittels Impedanzanalyse. Ferner wird überprüft, inwieweit verschiedene Beschichtungen zur Verbesserung der Zelladhäsion einen Einfluss auf die Elektroden selbst und insbesondere die Nanostrukturierung haben. Auf Basis dieser Ergebnisse werden mit ausgewählten MEA-Chips Messungen zur extrazellulären Signalableitung mit Hilfe von neuronalen Stammzellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) durchgeführt. Die SVZ-Zellen sind deshalb interessant, da diese im Verdacht stehen, bei der Entstehung von Hirntumoren des zentralen Nervensystems entscheidend mitzuwirken. Es wird evaluiert, inwiefern die nanostrukturierten Elektroden zu einer verbesserten Detektion im Vergleich zu den unstrukturierten Elektroden führen. Zum Ende des Kapitels wird kurz auf die Möglichkeit der Wiederverwendbarkeit der MEA-Chips eingegangen.

Abschließend werden in **Kapitel neun** die Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst und auf mögliche Verbesserungen und Weiterentwicklungen hingewiesen, die zukünftig ein Optimieren des Sensors und eine Verbesserung in der Aufnahme von Zellsignalen erlauben.

2 Nanoimprintlithographie

Im folgenden Kapitel wird das Funktionsprinzip der Nanoimprintlithographie (NIL) erläutert, welches im Rahmen dieser Arbeit als Element der Nanostrukturierung verwendet wird. Da die NIL ein vergleichsweise neues Verfahren darstellt, werden zunächst die Grundlagen erörtert, wobei zwischen verschiedenen Arten der NIL unterschieden wird. Anschließend werden die wichtigsten Größen und Parameter, die die Strukturübertragung beeinflussen, diskutiert und verschiedene Anwendungsbeispiele präsentiert.

2.1 Grundlagen der Nanoimprintlithographie

Die Nanoimprintlithographie ist ein Verfahren zur Nanostrukturierung und wurde unabhängig voneinander von Fujimori et al.⁵ bzw. von Chou et al.^{6,7} entwickelt. Im Vergleich zur Röntgenstrahl-, Elektronenstrahl- oder hochauflösenden Photolithographie ist die NIL eine zeitsparende und daher kosteneffiziente Methode zur gleichmäßigen und parallelen Oberflächenstrukturierung im Auflösungsbereich bis etwa 5 nm⁸. Anders als bei den oben genannten Lithographieverfahren, welche fokussierte Röntgen- oder Elektronenstrahlen bzw. UV-Licht zur Strukturierung einer Lackschicht nutzen, wird bei der NIL ein strukturierter Stempel direkt in den Lack gepresst. Daher entfallen Limitierungen, die sich beispielsweise aufgrund von Beugung der eingesetzten Strahlenquelle ergeben können.

Prinzipiell kann zwischen der thermischen Nanoimprintlithographie (T-NIL) und der auf Ultraviolett-Licht basierenden Nanoimprintlithographie (UV-NIL) unterschieden werden. Beide Verfahren grenzen sich im Wesentlichen vom eingesetzten Lack und der Prozessführung voneinander ab. Bei der T-NIL (**Abbildung 2.1**), welche auch als *hot embossing* bezeichnet wird, wird ein thermoplastischer Lack verwendet, der mit Hilfe eines Beschichtungsverfahrens wie Spin- oder Spraycoating auf das Substrat aufgebracht und anschließend in einem Backschritt (Softbake) verfestigt wird. In einer speziellen Maschine, welche den Druck und die Temperatur über einen definierten Bereich und in einem definierten Zeitrahmen variieren kann, werden in einem nächsten Schritt Substrat und Stempel zueinander ausgerichtet platziert und die Temperatur über die Glasübergangstemperatur T_g des Lacks erhöht. Im Zuge des Erwärmungsvorgangs verringert sich dabei die Viskosität des Lacks sehr stark. Anschließend werden Stempel und Substrat einem hohen Druck ausgesetzt, der typischerweise zwischen 10 und 100 bar liegt. Dadurch fließt der Lack in die Kavitäten des Stempels und füllt diese aus. Nachdem für einige Minuten der Druck und die Temperatur des Systems konstant gehalten werden erfolgt ein Abkühlprozess, wobei das System unter die Glasübergangstemperatur des Lacks abgekühlt wird. Durch das Aufrechterhalten des Drucks verfestigt sich der Lack in den ausgefüllten Kavitäten. Nach dem Aushärten kann der angelegte Druck gelöst und der Stempel vom Substrat getrennt werden. Als Resultat wird die invertierte Stempelstruktur im Lack

erhalten. An den Stellen des Substrats, an denen eine Verdrängung des Resists durch die erhabenen Strukturen des Stempels hätte erfolgen sollen, verbleibt auch bei optimaler Prozessführung eine wenige Nanometer dünne Restschicht an Lack. Sofern die strukturierte Lack-schicht als Maskierung für eine nachfolgende Ätzung oder Abscheidung verwendet wird, muss diese als *residual layer* bezeichnete Restschicht in einem weiteren Prozessschritt entfernt werden. Um die Strukturtreue zu gewährleisten, sollte hierfür ein möglichst anisotropes Ätzverfahren wie beispielsweise das reaktive Ionenätzen gewählt werden. Zu beachten ist, dass die Entfernung des *residual layers* eine Reduzierung der Lackdicke auf dem gesamten Substrat zur Folge hat. Erfüllt das Prägematerial im Bauteil eine aktive Funktion, zum Beispiel als optischer Wellenleiter, so kann die Entfernung des *residual layers* hingegen entfallen^{6,7,9}.

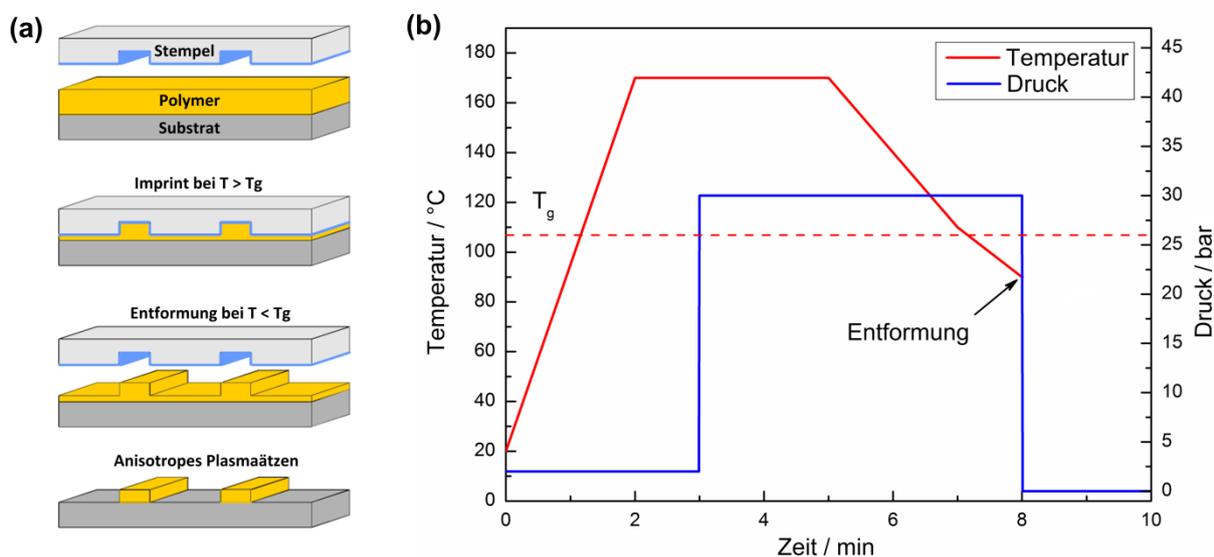


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung (a) des Funktionsprinzips und (b) einer beispielhaften Prozessführung bei der T-NIL (adaptiert von micro resist technology¹⁰).

Bei der UV-NIL (**Abbildung 2.2**) wird anstelle eines thermoplastischen Lacks ein UV-empfindlicher Lack eingesetzt. Nach dem Aufbringen des Lacks und dem Ausrichten von Substrat und Stempel in der Maschine wird ein Druck auf das System vorgegeben, der typischerweise im Bereich zwischen 0 und 5 bar liegt. Der bei Raumtemperatur bereits niederviskose Lack füllt unter diesen Bedingungen die Kavitäten hauptsächlich mit Hilfe der Kapillarkräfte aus. Anschließend wird mit Hilfe des UV-Lichts die Polymerisation und Quervernetzung der Oligomere gestartet, was zu einem Aushärten des Lacks nach wenigen Sekunden führt. Danach kann der angelegte Druck gelöst und das Substrat vom Stempel getrennt werden. Auch bei der UV-NIL muss der *residual layer* entfernt werden, wenn die strukturierte Schicht als Maskierung für Nachfolgeprozesse verwendet werden soll^{11–15}.

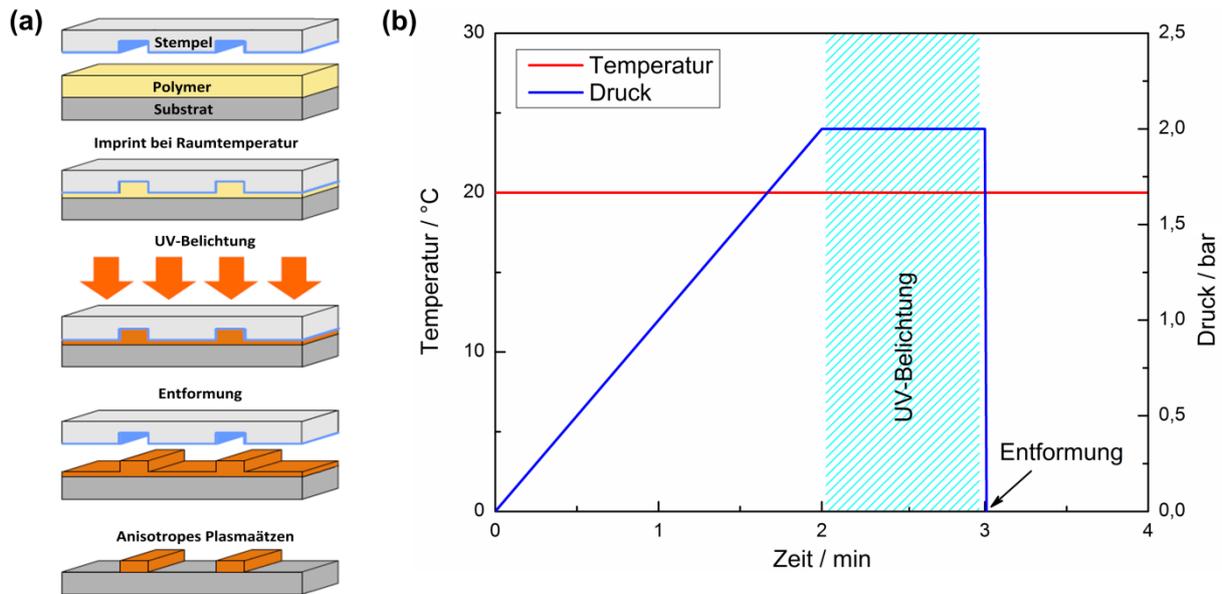


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung (a) des Funktionsprinzips und (b) einer beispielhaften Prozessführung bei der UV-NIL (adaptiert von micro resist technology¹⁶).

Beim Vergleich von T-NIL und UV-NIL kristallisieren sich für beide Varianten sowohl einige Vor- als auch Nachteile heraus. Durch die Möglichkeit der UV-NIL bei Raumtemperatur und niedrigen Drücken zu arbeiten, wirken im Vergleich zur T-NIL auf die Lackschicht kaum Spannungsmomente, die durch Temperatur- oder Druckgradienten induziert werden. Dadurch ist es möglich, dass Strukturen im Bereich von 5 nm hergestellt werden können¹⁷. Der Imprintvorgang ist bei der UV-NIL schneller, da aufwendige Aufwärm- und Abkühlzyklen entfallen. Allerdings ist es zwingend erforderlich einen UV-transparenten Stempel einzusetzen, sodass das UV-Licht durch den Stempel hindurch den Lack polymerisieren kann. Durch die niedrigeren Drücke ist die UV-NIL anfälliger für Keilfehler, sodass diese entweder durch die Maschine selbst kompensiert oder entsprechend in der Fläche kleinere Substrate verwendet werden müssen. Sowohl transparenter Stempel als auch die Kompensation des Keilfehlers sind mit Mehrkosten im Vergleich zur T-NIL verbunden. Auch ist der Durchsatz aufgrund der kleineren Substratfläche bei der UV-NIL deutlich geringer.

2.2 Einflussgrößen bei der Strukturübertragung

Für einen erfolgreichen Strukturübertrag des Masters in den Lack braucht es eine optimale Anpassung von Maschine, Stempel, Lack und den grundlegenden Prozessparametern. Zu Letztgenannten zählen Druck, Zeit und Temperatur bzw. Dosis der UV-Strahlung.

2.2.1 Einfluss der Maschine

Insbesondere im Fall der UV-NIL ist aufgrund des Ausgleichs eines möglichen Keilfehlers eine planparallele Ausrichtung von Substrat und Stempel von hoher Bedeutung. Die gleich-

mäßige Verteilung von hohen Temperaturen und Drücken ist dagegen für die T-NIL ausschlaggebend. Daher werden bei der Nanoimprintlithographie Maschinen verwendet, die eine kontrollierte Prozessführung ermöglichen und Inhomogenitäten von Substrat und Stempel ausgleichen können. Diese nutzen dabei entweder das *single-step*- oder das *step-and-repeat*-Verfahren zur Übertragung der Nanostrukturen. Bei dem *single-step*-Verfahren erfolgt die Übertragung der Strukturen über zwei beheizbare parallele Platten, in deren Zwischenraum Substrat und Stempel platziert werden. Zur gleichmäßigen Verteilung des Drucks wird in der Regel das Luftkissenprinzip angewendet, bei dem je nach Umsetzung bis zu zwei Polymermembranen unter- bzw. oberhalb von Stempel und Substrat aufgelegt werden. Zwischen den Membranen wird mittels Druckluft ein Luftpolster geschaffen, welches zum gleichmäßigen Zusammenpressen von Stempel und Substrat führt. Anders als bei starren Platten können so Partikel im Lack bzw. Unebenheiten des Substrats oder Stempels ausgeglichen werden¹⁸. Das *single-step*-Verfahren wird hauptsächlich bei der T-NIL verwendet, da hier große Substratflächen prozessiert werden. Bei der UV-NIL müssen hingegen kleinere Substrate eingesetzt werden, welche schrittweise mithilfe des *step-and-repeat*-Verfahrens prozessiert werden.

2.2.2 Einfluss des Stempels

Eine weitere wichtige Einflussgröße für einen erfolgreichen Strukturübertrag ist der Stempel. Da die NIL eine Kontaktmethode darstellt, hängt das Ergebnis des Imprints unmittelbar von der Qualität des Stempels ab, d.h. jeder Fehler, der während des Herstellens des Stempels auftritt, wird direkt in den Lack übertragen. Der Stempel wird üblicherweise mittels hochauflösenden Strukturierungsmethoden wie der Elektronenstrahlolithographie hergestellt. Als gängige Stempelmateriale haben sich Silizium, Siliziumdioxid, Siliziumnitrid, aber auch Quarz und Nickel etabliert. Im Gegensatz zur T-NIL, bei der überwiegend harte Stempel verwendet werden, werden vor allem in der UV-NIL weiche Stempelmateriale eingesetzt. Bei dieser auch als Softlithographie bezeichneten Methode werden Elastomere wie Polydimethylsiloxan (PDMS) genutzt, die zugleich (semi-)transparent und flexibel sind^{19,20}. Ein Vorteil der Softlithographie ist, dass auch unebene oder flexible Substrate prozessiert werden können (**Abbildung 2.3**). Auch Partikel haben einen geringeren Einfluss als beim Einsatz eines harten Stempels, da sich der weiche Stempel dem Partikel anpassen kann und dadurch nur der direkte Bereich um den Partikel fehlerhaft ist²¹. Ein wesentlicher Nachteil der Softlithographie ist, dass der Stempel erst aus einem harten Stempelmateriale heraus abgeformt werden muss, so dass während dieses ersten Schritts bereits Defekte auftreten bzw. übertragen werden können. Durch die Flexibilität des weichen Stempelmateriale können sich bei einem zu hohen Aspektverhältnis, also dem Verhältnis der Strukturhöhe zur Strukturbreite, die Nanostrukturen dauerhaft verformen oder kollabieren. Zudem besteht die Gefahr, dass bei einem zu großen Abstand der Strukturfelder die Zwischenstrukturbereiche durchhängen^{22–25}.

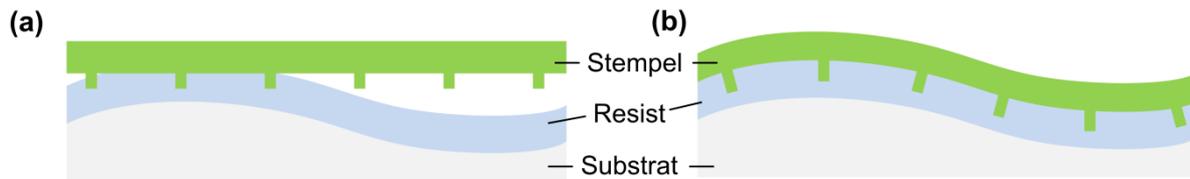


Abbildung 2.3: Einfluss von unebenen Substraten beim Einsatz (a) harter und (b) weicher Stempelmaterialien.

Während des Imprints muss sichergestellt werden, dass der Lack in die Kavitäten der Strukturen fließen kann. Ein gutes Fließverhalten kann durch eine sinnvolle Anordnung der zu übertragenden Strukturen ermöglicht werden. So sollten viele unterschiedliche Strukturen ebenso vermieden werden wie eine ungleichmäßige Verteilung der Strukturen auf dem Stempel. Zur Homogenisierung des Imprintergebnisses können bei ungleichmäßig auftretenden Strukturen deshalb sogenannte Dummystrukturen eingesetzt werden, die für einen gleichmäßigen Resistfluss sorgen, aber sonst keine relevanten Funktionen hinsichtlich der weiteren Anwendung übernehmen und wahlweise in nachfolgenden Prozessschritten wieder entfernt werden können. Nach dem Imprintvorgang müssen Stempel und Substrat zerstörungsfrei entformt werden. Bei der T-NIL erfolgt dieser Vorgang unterhalb der Glasübergangstemperatur des Resists. Dabei sollte die Entformungstemperatur nur wenig unterhalb der Glasübergangstemperatur liegen, um Beschädigungen aufgrund von thermischen Spannungen zu minimieren. Verschiedene Effekte, die beim Imprint und insbesondere bei der Entformung des Stempels im Lack auftreten können, sind in **Abbildung 2.4** zusammengefasst. Vor allem Strukturen mit großem Aspektverhältnis oder Felder mit hoher Strukturichte sind für Beschädigungen anfällig, da hier hohe Reibungskräfte wirken. Ebenso sollte aufgrund der hohen Temperaturen, die während des T-NIL-Prozesses auftreten, die Ausdehnungskoeffizienten von Substrat und Stempel in etwa gleich sein, um Spannungen aufgrund unterschiedlicher lateraler Ausdehnungen während des Prägeprozesses zu minimieren. Bei der UV-NIL ist das Entformen hingegen wesentlich unkritischer, da die Temperatur während des Imprints nicht verändert wird.

Um eine zerstörungsfreie Entformung zu gewährleisten, müssen Stempel und Substrat unterschiedliche Oberflächeneigenschaften haben. Da der Resist auf dem Substrat haften, sich aber vom Stempel lösen soll, muss die Oberflächenenergie des Stempels geringer sein, als die des Substrats. Oftmals bestehen Stempel und Substrat jedoch aus dem gleichen Material. Daher kann der Stempel zusätzlich mit einer Antiadhäsionsbeschichtung versehen werden, um die Oberflächeneigenschaften desselbigen zu verändern. Die Dicke der Beschichtung sollte dabei im Bereich weniger Nanometer liegen, sodass die Beschichtung selbst nicht die Topographie des Stempels verändert. Stempel aus Silizium oder Siliziumdioxid können beispielsweise mit perfluorierten Materialien silanisiert werden. Ein gängiges Silan ist das 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilan (FOTCS), welches neben der geringen Oberflächenenergie und hohen Oberflächenreaktivität auch eine hohe Resistenz gegenüber großen Temperatur- und Druckvariationen aufweist und daher nur selten erneuert werden muss^{26–30}. Das Silan wird

entweder mittels Tauchbeschichtung oder Abscheidung aus der Gasphase auf den Stempel aufgebracht, wobei letzteres die besseren Ergebnisse erzielt³¹. Neben einer optimierten Trennung von Stempel und Substrat, erhöht die Silanisierung auch die Lebensdauer des Stempels, da Strukturen weniger stark beschädigt, Lackabrisse vermieden und Kontaminationen des Stempels minimiert werden.

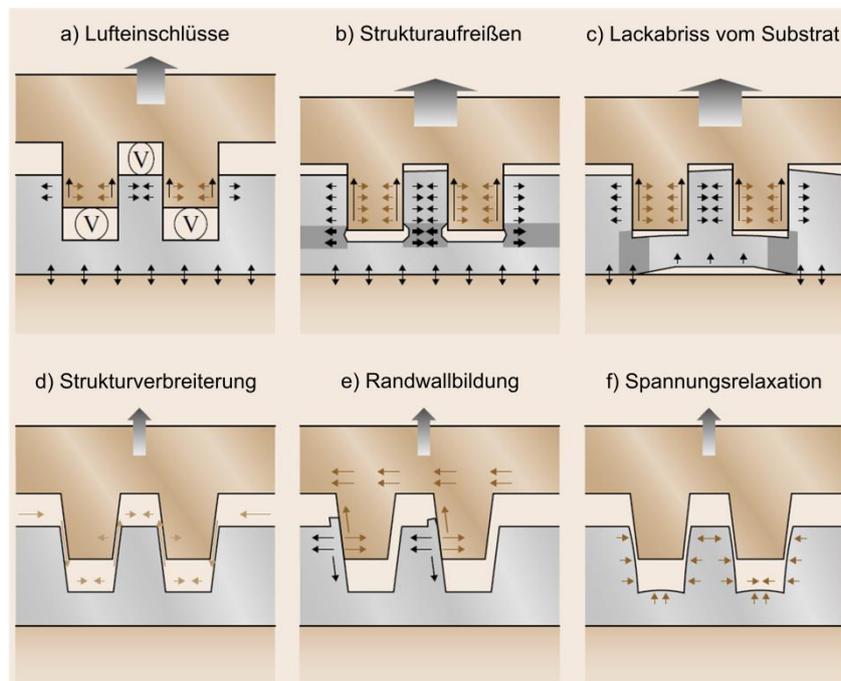


Abbildung 2.4: Mögliche Defekte, die während des Imprints und bei der Entformung auftreten können (adaptiert von Schiff³²).

2.2.3 Einfluss des Lacks

Der Lack, in den während des Prozesses die Strukturen übertragen werden, ist der dritte essentielle Parameter bei der Optimierung des Gesamtprozesses und von zentraler Bedeutung. Dieser sollte eine hohe Uniformität in der Dicke, eine gute Adhäsion zum Substrat und die Möglichkeit einer hohen Strukturtreue aufweisen. Die in der T-NIL eingesetzten Lacke sind überwiegend thermoplastische Polymere wie Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polycarbonate. PMMA ist dabei ein kostengünstiges Material, welches ausreichend charakterisiert sowie mit anderen Reinraumprozessen kompatibel ist und sich homogen mit definierten Schichtdicken zwischen wenigen Nanometern und einigen Mikrometern auf ein Substrat aufbringen lässt. Durch die Veränderung der Zusammensetzung der Polymerketten der Methylmethacrylate lassen sich im Fall von PMMA Lacke mit verschiedenen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Glasübergangstemperatur, Härte oder Viskosität herstellen³³.

Im Fall der T-NIL muss der Lack hohe Anforderungen bezüglich seiner Viskosität erfüllen. Diese darf nicht zu hoch sein, sodass der Resist während des Imprintvorgangs alle Strukturen vollständig füllen kann. Eine zu geringe Viskosität ist jedoch ebenfalls hinderlich, da so Un-

ebenheiten von Stempel oder Substrat nicht mehr ausgeglichen werden können. Eine Viskosität im Bereich von 10^6 Pa·s hat sich hierbei als günstig herausgestellt³⁴. Ein mit der Viskosität korrespondierender Parameter ist das Schubmodul G des Lacks, das eine temperaturabhängige Materialkonstante darstellt und Informationen über die linear-elastische Verformung infolge von Scherkräften enthält. Die Glasübergangstemperatur T_g des thermoplastischen Lacks ist für den Übergang von einem hartelastischen zu einem viskoelastischen bzw. viskosen Zustand entscheidend und grenzt daher die Bereiche ab, bei welchen Temperaturen ein Imprint stattfinden oder der Stempel vom Substrat gelöst werden kann (**Abbildung 2.5**).

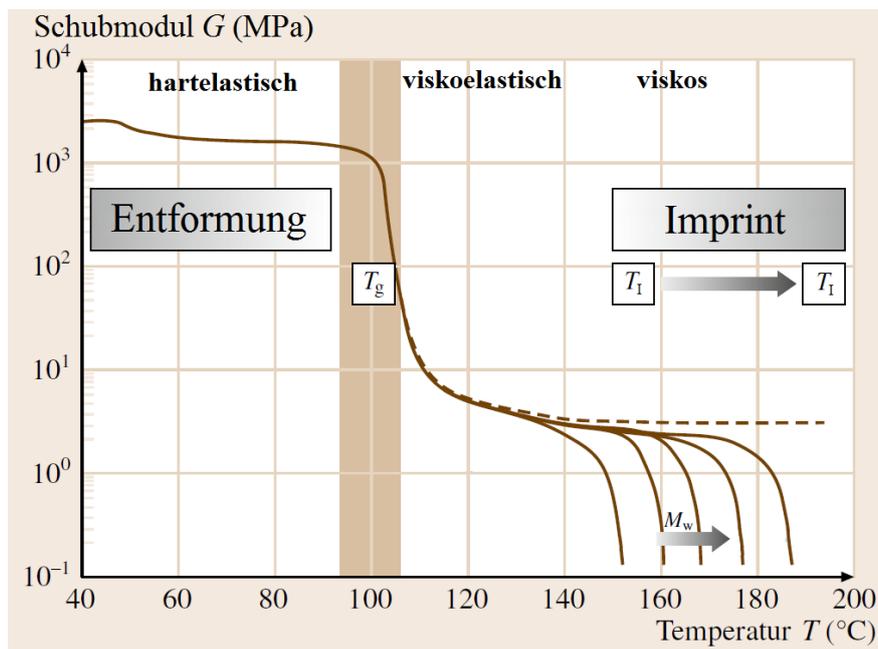


Abbildung 2.5: Veränderung des Schubmoduls in Abhängigkeit von der Temperatur am Beispiel von PMMA mit einer Glasübergangstemperatur von 100 °C und verschiedenen Molekulmassen M_w (adaptiert von Schiff³², Schiff et al.³⁵, Franck³⁶).

Das Schubmodul und somit die Viskosität des Lacks ist unterhalb T_g hoch, wodurch der Lack nur geringfügig verformbar ist. Im Bereich von T_g reduziert sich das Schubmodul um mehrere Größenordnungen und der Lack lässt sich gummielastisch verformen. Die Deformation ist umkehrbar. Um die Fließfähigkeit des Lacks weiter zu erhöhen und dadurch die Strukturen effizient zu füllen, wird die Temperatur über T_g hinaus erhöht. In der Praxis wird eine Imprinttemperatur T_i gewählt, die etwa 50 °C über T_g liegt³². Dort findet dann ein Übergang vom viskoelastischen zum viskosen Bereich statt, wodurch der Lack schlagartig fließfähig wird und die Deformation unumkehrbar ist. Die Imprinttemperatur hängt ferner von der Molekulmasse des Resists ab, wobei mit höheren Molekulmassen höhere Temperaturen benötigt werden, um den viskosen Zustand zu erreichen. Eine weitere Erhöhung der Temperatur führt dann lediglich zum Induzieren temperaturbedingter Spannungen in den Lack, die beim Abkühlvorgang zu Defekten führen können.

Anders als bei der T-NIL werden im Fall der UV-NIL Precursor-Materialien verwendet, die aus Oligomeren und einem Photoinitiator bestehen und bei Belichtung mit UV-Licht polymerisieren. Es handelt sich hierbei um sehr niederviskose Lacke im Bereich 10^{-2} Pa·s³⁵, da hier der von außen angelegte Druck sehr gering ist und die Verteilung des Lacks vor allem über Kapillarkräfte geregelt wird. Die Glasübergangstemperatur spielt daher keine entscheidende Rolle.

Ein weiterer kritischer Punkt, der insbesondere bei der UV-NIL zu beachten ist und auf die Qualität der Strukturübertragung einwirkt, ist das Aushärten des Resists. Die Verfestigung der Strukturen geht dabei immer mit einer Veränderung der chemischen Bindungen einher, welche eine Verringerung des Gesamtvolumens des Polymers und dadurch eine Verkleinerung der Struktur im Lack zur Folge hat. Deshalb kann die Größe oder Form der im Resist übertragenen Struktur im Vergleich zum Stempel leicht verändert sein.

Beim Füllvorgang werden die Ränder der Kavitäten zuerst benetzt. Dabei türmt sich der Lack zunächst wulstartig auf und fließt im weiteren Verlauf in den Kavitäten zusammen³⁷. Das von den Kavitäten aufgenommene Lackvolumen reduziert indes die Lackdicke in den Bereichen, wo keine Kavitäten vorhanden sind. Deshalb werden die Strukturen mit kleineren Abmessungen deutlich schneller übertragen als Strukturen mit größeren Abmessungen. Die Prozesszeit wird damit von der Größe und Dichte der Stempelstrukturen als auch von der Dicke und der Viskosität des Lacks bestimmt. Wird von dem vereinfachten Modell ausgegangen, dass es sich bei dem verwendeten Lack um eine zweidimensionale, inkompressible und viskose Flüssigkeit mit konstanter Viskosität handelt, so kann die Navier-Stokes-Gleichung angewendet und für feste Randbedingungen entsprechend gelöst werden. Daraus ergibt sich ein Ausdruck für die Zeit t_f , die zum Füllen der Strukturen benötigt wird³⁸⁻⁴³. Gleichung (2.1) ist für zylindrische Strukturen gültig und beschreibt den Idealfall eines Imprints mit einer konstanten Druckverteilung:

$$t_f = \frac{3\eta_0 r^2}{4p} \left(\frac{1}{h_{res}^2} - \frac{1}{h_0^2} \right) \quad (2.1)$$

wobei η_0 die Viskosität des Lacks, r der Radius der Struktur, p der Druck beim Imprint, h_0 die Lackdicke vor dem Imprint und h_{res} die Dicke des *residual layers* ist. Die Dicke des *residual layers* h_{res} kann dabei mit Hilfe von Gleichung (2.2) abgeschätzt werden:

$$h_{res} = h_0 - \nu h_r \quad (2.2)$$

wobei h_r die Höhe der Struktur im Resist nach dem Imprint und ν der Füllfaktor, der sich als Verhältnis von strukturierter Fläche zur Gesamtfläche des Stempels berechnet, ist.

Nicht berücksichtigt werden in diesem Modell Lufteinschlüsse, bei denen eine nur teilweise Befüllung der Kavität erfolgt, Defekte/Partikel im Lack, Haftungseffekte von Lack, Substrat und Stempel, Materialdeformation durch mechanischen Stress oder elastisches Verhalten des Lacks. Da Lufteinschlüsse vor allem bei größeren Strukturen auftreten, sind im Allgemeinen kleinere Strukturen nicht nur schneller, sondern auch defektfreier zu erzeugen als große^{44,45}. Auch zeigt sich, dass eine Erhöhung des Drucks und eine Verringerung der Viskosität zu geringeren Prozesszeiten führen. Eine Erniedrigung der Viskosität kann wie bereits gezeigt durch die Erhöhung der Temperatur erreicht werden und hat einen größeren Effekt als eine Erhöhung des Drucks. Weiterhin ist zu beachten, dass unterschiedliche Strukturen und Strukturgrößen lokale Verbiegungen induzieren können, wodurch eine inhomogene Dicke des *residual layers* über den gesamten Wafer entstehen kann. Das Ziel eines homogenen *residual layers* ist insbesondere dann wichtig, wenn die hergestellte Struktur als Maskierung für einen Folgeprozess dienen soll und der *residual layer* entfernt werden muss. Je dünner der *residual layer* im Vergleich zu den Resiststrukturen ist, desto weniger stark ist der Einfluss der Ätzung im Folgeprozess und desto besser die Strukturtreue.

2.3 Bewertung der Nanoimprintlithographie

Die Nanoimprintlithographie ist eine vergleichsweise neue Technologie, die es erlaubt, Strukturen mit kleinsten Abmessungen von bis zu 5 nm zu übertragen. Sie ist im Gegensatz zu anderen Methoden wie der seriell arbeitenden Elektronenstrahlithographie schnell und dadurch kostengünstig. Dies wirkt sich insbesondere dann aus, wenn große Flächen strukturiert werden müssen oder die Strukturdichte hoch ist. Auch die allgemeinen Betriebskosten sind geringer als bei der Elektronenstrahlithographie oder der extremen UV-Lithographie³⁵. Ein weiterer Vorteil liegt in der Tatsache, dass sehr komplexe Geometrien realisierbar sind. So können beispielsweise dreidimensionale Geometrien, Stufen, V-Gräben oder Pyramidenstrukturen prozessiert werden. Beim Übertragen verschiedener Höhengniveaus entfallen im Vergleich zur konventionellen Lithographie zudem Prozessschritte, da das Übertragen bei der NIL in einem einzigen Imprint möglich ist⁴⁶. Durch den Einsatz von *single-step*-Maschinen kann auf Waferebene prozessiert werden, was einen hohen Durchsatz ermöglicht und insbesondere dann sinnvoll ist, wenn viele Wafer mit denselben Strukturen fabriziert werden sollen. Eine Reinigung des Stempels ist nur sehr selten erforderlich, da dieser aufgrund seiner hydrophoben Oberfläche „selbstreinigend“ ist. Vorhandene Partikel oder Lackreste bleiben dadurch am Substrat haften. Das Aspektverhältnis ist hingegen als schlecht zu bewerten. Gerade bei der T-NIL herrschen hohe Kräfte, sodass das Aspektverhältnis in der Praxis deutlich kleiner als 1:10 ist⁴⁶.

Die stetige Weiterentwicklung der NIL zeigt das Potential der Methode: Die sogenannte *substrate conformal imprint lithography* ermöglicht das großflächige Prägen von sub-10 nm Strukturen mittels Softlithographie durch den Einsatz von PDMS-Stempel, die aus einer dün-

nen harten PDMS-Schicht und einer dickeren weichen PDMS-Schicht bestehen⁴⁷⁻⁵⁰. Hierbei wird der Stempel nicht planparallel, sondern seriell mittels ansteuerbarer Vakuumkanäle in den Resist gedrückt, was den Vorteil bietet, dass sich der Stempel den Unebenheiten des Substrats anpasst, Lufteinschlüsse vermieden und laterale Stempelverzerrungen auf ein Minimum reduziert werden. Als weitere Ansätze sind zudem Hybridmethoden wie das *multilevel patterning*^{51,52}, die *reverse NIL*⁵³⁻⁵⁷, die *simultaneous thermal and UV-based NIL*²⁸ und die *combined nanoimprint and photolithography*⁵⁸ zu nennen.

Besonders in der anwendungsorientierten Forschung findet die NIL bereits große Akzeptanz. So werden vor allem in der Biotechnologie *Lab-on-a-Chip* Systeme entwickelt, die mittels NIL hergestellter Nanostrukturen bestimmte Funktionen ausüben. Als Beispiel kann ein Bauteil genannt werden, welches nanofluidische Kanäle im Bereich von 100 nm beinhaltet und zur Separierung bzw. Sequenzierung von DNA eingesetzt wird⁵⁹. Aber auch in der Industrie findet die NIL bereits dort Anwendung, wenn es darum geht, Nanostrukturen im Bereich kleiner 100 nm auf Flächen größer 1 mm² herzustellen. In diesem Zusammenhang kann die Elektronikindustrie genannt werden, in der die NIL genutzt wird, um beispielsweise Magnetstrukturen für Festplatten^{60,61}, akustische Oberflächenwellenfilter für Handys⁶² oder Subwellenlängen-Drahtgitterpolarisatoren für High-Definition-TV-Projektoren⁶³ herzustellen. Die Halbleiterindustrie nutzt die NIL zur Herstellung von Metall-Halbleiter-Metall-Photodetektoren⁶⁴ oder organischen Feldemittern⁶⁵.

Generell ist entscheidend, dass neben dem Auflösen der technologischen Hindernisse es auch gelingen muss, die NIL in bereits bestehende Prozessketten zu integrieren, um sie für industrielle Zwecke interessant zu machen.

3 Elektrochemische Abscheidung

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der elektrochemischen Abscheidung dargestellt, wobei insbesondere auf die Phasengrenze von Elektrode und Elektrolyt eingegangen und die Reaktionskinetik beschrieben werden. Darüber hinaus werden die Einflussfaktoren der elektrochemischen Abscheidung beleuchtet und im Speziellen die Besonderheiten der elektrochemischen Abscheidung in Mikrostrukturen thematisiert.

3.1 Grundlagen der elektrochemischen Abscheidung

Um den Prozess der elektrochemischen Abscheidung zu verstehen, bedarf es zunächst eines tieferen Verständnisses der Gegebenheiten an der Phasengrenze von Elektrode und Elektrolyt. Beim Eintauchen einer Metallelektrode in einen Elektrolyten, also einer zu Ionen dissoziierten Salzlösung, sammeln sich an der Phasengrenze, aufgrund der unterschiedlichen Potentiale von Elektrode und Elektrolyt, Ladungsträger entgegengesetzter Polarität an. Je nach herrschenden energetischen Verhältnissen findet eine Ausgleichsreaktion statt, sprich eine Metallabscheidung oder eine Metallauflösung. Im Gleichgewichtszustand verlassen im zeitlichen Mittel ebenso viele Metallionen den Elektrodenverband wie aufgenommen werden, weswegen von einem dynamischen Gleichgewicht gesprochen wird. Ein Ungleichgewicht dieser beiden Vorgänge schließt ein, dass sich Konzentrationsgradienten und damit auch Potentialgradienten entlang der Phasengrenze ausbilden. Die im Elektrolyt befindlichen Ionen versuchen dabei, sich der entgegengesetzt geladenen Schicht möglichst weit zu nähern, was zu einer parallelen Ausrichtung der Raumladungen und zum Entstehen einer elektrolytischen Doppelschicht führt (**Abbildung 3.1 a**). Dieses Phänomen wurde zunächst 1879 durch das Modell von Helmholtz beschrieben und im Laufe der Jahre durch u. a. Gouy und Chapman sowie Stern und Graham erweitert^{78–80}. Die elektrostatische Nettoladung der Elektrodenoberfläche zieht Überschussionen aus dem Elektrolyten an, welche sich in erster Näherung parallel zur Elektrodenoberfläche anordnen und als äußere Helmholtz-Fläche bezeichnet wird. Zudem können an der Elektrodenoberfläche ausgerichtete Lösungsmitteldipole, Ionen und andere neutrale Moleküle mithilfe der van-der-Waals- oder Coulomb-Kräfte adsorbiert sein. Die Ebene durch die Schwerpunkte adsorbierter Ladungen wird als innere Helmholtz-Fläche bezeichnet. Diese starre Doppelschicht spiegelt die Verhältnisse direkt an der Phasengrenze wider. Mit zunehmendem Abstand von der Elektrodenoberfläche wird aufgrund der Wärmebewegung im Elektrolyt die starre Struktur aufgelöst und eine exponentiell abnehmende ionale Raumladungverteilung entsteht, die als diffuse Doppelschicht bezeichnet wird. Die Dicke der Doppelschicht ist konzentrationsabhängig und liegt im Bereich von wenigen Nanometern^{66,67}. Sie kann in einfacher Näherung als aufgeladener Plattenkondensator mit Dielektrikum behandelt werden. Die daraus resultierende Kapazität wird als (differentielle) Doppelschichtkapazi-

tät C_{dl} bezeichnet und berechnet sich als Quotient der Änderung der Überschussladung dQ und der Änderung des Elektrodenpotentials $d\phi$ zu⁶⁸:

$$C_{dl} = \frac{dQ}{d\phi} \quad (3.1)$$

Der Grund für den Ionenübergang vom Metall in die Lösung und umgekehrt ist dabei das Streben des Systems nach minimaler freier Enthalpie, welche mit einer Minimierung der inneren Energie bzw. Maximierung der Entropie verbunden ist⁶⁹. Beide Mechanismen rufen jeweils einen elektrischen Strom hervor und werden als kathodischer Strom I_k und anodischer Strom I_a definiert. Wird der Strom auf die Elektrodenfläche bezogen, so wird von einer Stromdichte j gesprochen. Im Gleichgewichtszustand sind anodische und kathodische Stromdichte betragsmäßig gleich groß und deren Betrag wird als Austauschstromdichte definiert. Dabei unterliegen die Konzentrationen der oxidierten Spezies c_{ox} und reduzierten Spezies c_{red} keinen zeitlichen Änderungen. Das Gleichgewichtspotential E_{GG} , welches sich an einer Elektrode einstellt, wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben:

$$E_{GG} = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{c_{ox}}{c_{red}} \right) \quad (3.2)$$

E_0 bezeichnet das Standardelektrodenpotential, R die molare Gaskonstante, T die absolute Temperatur, z die Anzahl der ausgetauschten Elektronen und F die Faradaykonstante^{68,70}.

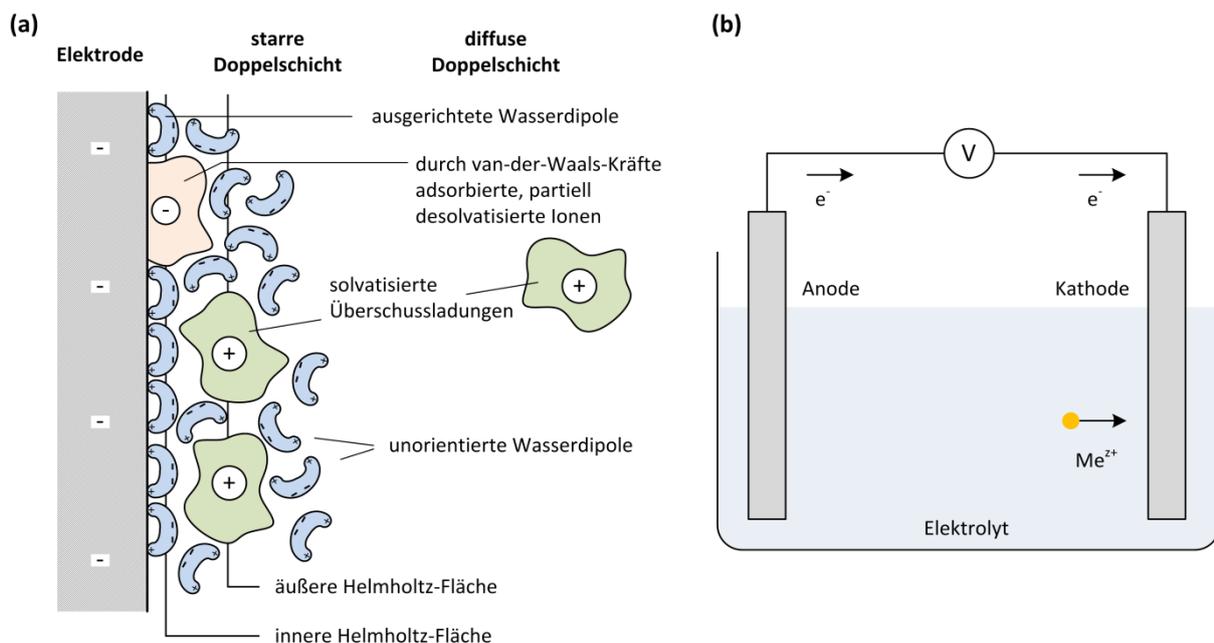


Abbildung 3.1: (a) Schematische Darstellung der elektrolytischen Doppelschicht (adaptiert von Hamann und Vielstich⁶⁸). (b) Metallabscheidung in einer elektrochemischen Zelle.

Wird dieses Gleichgewicht gestört, indem die im Elektrolyt befindlichen Metallionen einem äußeren elektrischen Feld ausgesetzt sind, so findet beim Überwiegen der kathodischen Reaktion eine elektrochemische Metallabscheidung statt. Zur Metallabscheidung wird eine elektrochemische Zelle verwendet, die im einfachsten Fall aus zwei elektrisch leitend verbundenen Elektroden, einer Strom- oder Potentialquelle und einer Elektrolytlösung besteht (**Abbildung 3.1 b**). Die chemische Reaktion ist dabei mit dem Transport und der anschließenden Umwandlung von z Elektronen verknüpft. Für die kathodische Metallabscheidung eines Metalls Me gilt entsprechender Mechanismus:



Mit dem Ladungstransport zwischen Elektrode und Elektrolyt ist auch immer ein Austausch von Ladung Q und ein entsprechender Stoffumsatz m_{theo} verbunden, der durch die Faraday'schen Gesetze beschrieben wird. Es gelten:

$$Q = \int I dt = n z F \quad (3.4)$$

sowie:

$$m_{theo} = M n = \frac{M Q}{z F} = \frac{M I t}{z F} \quad (3.5)$$

I beschreibt hierbei den Stromfluss in einem Zeitintervall dt , n die Stoffmenge eines z -wertigen Ions und M die Molare Masse des umgesetzten Metalls.

Bei der elektrolytischen Abscheidung enthält das im Elektrolyt gelöste Salz das abzuscheidende Metallion. Im Fall einer löslichen Anode werden die Metallionen durch Oxidationsprozesse an der Anode gebildet und liegen im Elektrolyten stets in ausreichend hoher Konzentration vor. Beim Verwenden einer unlöslichen Anode muss hingegen das Metallsalz dem Elektrolyt kontinuierlich hinzugefügt werden.

Aufgrund des wässrigen Lösungsmittels und der im Elektrolyt enthaltenen Zusätze können zusätzlich ungewollte Nebenreaktionen wie die Elektrolyse von Wasser stattfinden. Dabei tritt im Kathodenraum neben der Entladung der Metallionen auch die Entladung von Wasserstoffionen auf. Der Oxidationsprozess der in der Lösung befindlichen Anionen findet derweil im Anodenraum statt, wobei sich im Fall der Elektrolyse von Wasser an der Anode Sauerstoff bildet. Im Fall von Nebenreaktionen wird die Ladungsmenge Q auf die verschiedenen Teilprozesse aufgeteilt und wird nicht vollständig für die Entladung der Metallionen verwendet. Das Verhältnis von der Ladung Q_{ab} , die für die Metallabscheidung genutzt wird, zur Gesamtladung Q_{ges} wird als kathodische Stromausbeute ψ bezeichnet.

Diese kann bestimmt werden, indem die tatsächlich abgeschiedenen Masse m_{tat} mit der theoretisch abzuschheidenden Masse m_{theo} verglichen wird und ist umso geringer, je stärker die Konkurrenzreaktionen ablaufen:

$$\psi = \frac{Q_{\text{ab}}}{Q_{\text{ges}}} = \frac{m_{\text{tat}}}{m_{\text{theo}}} \quad (3.6)$$

3.2 Reaktionskinetik

Die Reduktion eines Metallions lässt sich in mehrere Vorgänge unterteilen (**Abbildung 3.2**): Die Metallionen liegen zunächst homogen verteilt und in komplexierter Form im Elektrolyten vor, wobei der Komplex auch eine Hydrathülle sein kann. Zur Gewährleistung eines gleichmäßigen Schichtaufbaus muss ein stetiger Stofftransport an Metallionen vom Elektrolytinneren zur Elektrodenoberfläche garantiert werden. Der stetige Antransport an Ionen (und auch der Abtransport der Reaktionsprodukte) ist dabei ein entscheidender Faktor bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit und kann durch Migration, Konvektion oder Diffusion erfolgen. Die Migration, die als Stofftransport aufgrund elektrisch geladener Teilchen definiert ist, ist bei den üblichen, relativ hohen Elektrolytkonzentrationen vernachlässigbar, da die Ionen durch Stöße und Reibung entsprechend abgebremst werden. Die Konvektion, also der Stofftransport aufgrund natürlicher oder erzwungener hydrodynamischer Strömungen, ist dominierend für den Großteil des Elektrolytinneren, wird aber mit abnehmendem Abstand zur Elektrode immer geringer und kommt vor der Elektrodenoberfläche praktisch zum Erliegen, da die Konvektionsströmungen durch Reibungskräfte abgebremst werden. Die Diffusion, also die Bewegung von Teilchen infolge eines Konzentrationsgradienten in Richtung abnehmender Konzentration, ist in der Nähe der Elektrodenoberfläche bestimmend, da aufgrund der Entladung der Ionen an der Elektrodenoberfläche eine Verarmung an Metallionen stattfindet. Die Ausbildung dieses Konzentrationsgradienten kann mit Hilfe des Modells der Nernst'schen Diffusionsschicht beschrieben werden. Das Modell besagt, dass eine konstante Konzentration der Spezies im Elektrolytinneren bis zu einem gewissen Abstand vor der Elektrode vorliegt, bevor die Konzentration anschließend abfällt. Wird die Abscheidung in ungerührter Lösung betrachtet, so ist die Konzentration an der Oberfläche solange konstant, wie kein Stromfluss vorhanden ist. Nach dem Einschalten des Stroms sinkt die Konzentration ab und eine Diffusionsschicht bildet sich aus. Sofern kein ausreichend schneller Nachschub an Reaktanden aus dem Elektrolytinnern erfolgt, „wächst“ die Diffusionsschicht ins Elektrolytinnere hinein. Die Diffusionsschicht kann in diesem Fall eine Dicke bis etwa 0,5 mm betragen. Anschließend setzen Mikroströmungen ein, die die Dichteunterschiede ausgleichen. Findet allerdings ein stetiger Nachschub durch beispielsweise Rühren der Lösung statt, so kann die Diffusionsschicht auf eine Dicke von bis zu 1 μm minimiert werden⁶⁸.

Bevor ein Ladungsaustausch an der Kathode stattfindet, muss das komplexierte Ion die elektrolytische Doppelschicht passieren. Bei diesem Vorgang finden vorgelagerte Reaktionen wie

zum Beispiel das (teilweise) Abstreifen der Komplexhülle statt. Im Anschluss erfolgt die Adsorption des Metallions an der Elektrodenoberfläche und die Durchtrittsreaktion (Elektrodenübergang) an der Phasengrenzfläche Elektrode/Elektrolyt, gefolgt von nachgelagerten Reaktionen wie dem Abtransport von (Zwischen-)Produkten zurück ins Elektrolytinnere.

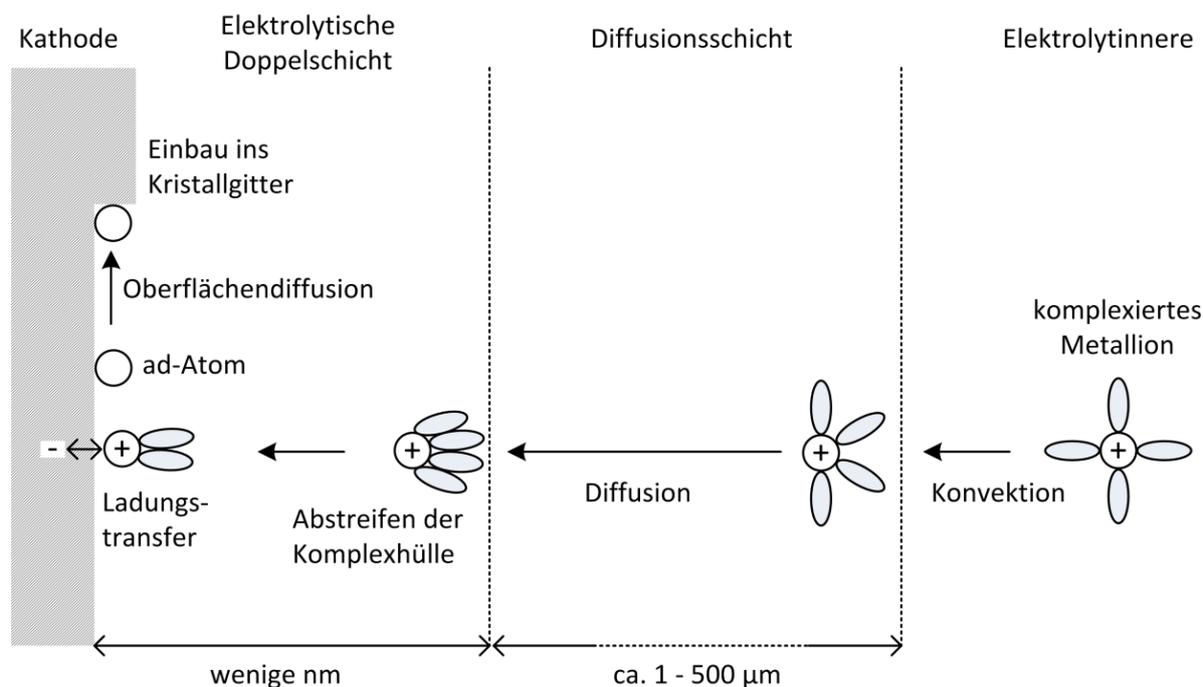


Abbildung 3.2: Darstellung der verschiedenen Reaktionsmechanismen bei der Metallabscheidung (adaptiert von Ghoddsi⁷¹, Arnold et al.⁷²).

Der Aufbau der Metallschicht an der Oberfläche der Elektrode wird Elektrokristallisation genannt. Dabei wird ein Keimbildungs- oder Keimwachstumsprozess gestartet, der mit oder ohne vorangegangener Oberflächendiffusion der ad-Atome an der Elektrodenoberfläche ablaufen kann. Als Keim wird dabei eine Anordnung von ad-Atomen bezeichnet, welcher durch die Aufnahme weiterer Atome wachsen und somit seine freie Enthalpie reduzieren kann. Im Falle des Kristallwachstums können zwei Szenarien unterschieden werden: Im ersten Mechanismus erfolgt der Elektronentransfer an einer energetisch günstigen Stelle (z.B. Stufenkante), die als aktives Zentrum für ein stabiles Kristallwachstum fungiert⁷³. Erfolgt der Adsorptionsvorgang an einer energetisch ungünstigen Stelle, beispielsweise an einer flachen Terrassenregion, so muss das ad-Atom zunächst durch Oberflächendiffusion zu dem aktiven Zentrum transportiert werden, bevor es in den Kristallverbund eingebaut werden kann. Je nach Lage und Gestalt der Kristallkeime können null-, ein-, zwei- oder dreidimensionale Keimtypen entstehen⁷³. Da in der Regel mehrere thermodynamisch stabile Keimzentren für das Kristallwachstum vorliegen, bilden sich bei elektrochemisch abgeschiedenen Schichten polykristalline Strukturen aus. Die Art des Kristallwachstums ist dabei abhängig von den Keimbildungsgeschwindigkeiten. Darum lassen sich anhand der Form, Größe, Verteilung und Orientierung

der Kristallite verschiedene Wachstumstypen unterscheiden⁷⁴⁻⁷⁶. Für die technische Anwendung sind vor allem der basisorientierte Reproduktionstyp und der unorientierte Dispersionstyp von Bedeutung. Erstgenannter stellt eine Fortsetzung der Kristallstruktur der Basiselektrode dar, was zu ähnlichen bzw. gleichen Eigenschaften im Vergleich zum Substratmaterial führt. Der unorientierte Dispersionstyp hingegen zeichnet sich durch sehr kleine Kristallkeime aus, deren eingelagerten Fremdpartikel auf das gesamte Mikrogefüge stabilisierend wirken. Daher besitzt auch dieser Wachstumstyp sehr gute technische Eigenschaften.

An Elektroden stattfindende Reaktionen können nach kapazitiven oder faradayschen Ursprungs unterteilt werden: Kapazitive Reaktionen erfolgen durch ein Laden und Entladen der Doppelschicht, faradaysche Reaktionen infolge eines Stromflusses an der Elektrodenoberfläche. Jede faradaysche Reaktion kann hierbei erst ablaufen, wenn eine bestimmte Energie zur Verfügung steht, welche beispielsweise über ein von außen angelegtes Potential bereitgestellt werden kann. Das Potential E , das sich hierbei an der Elektrode bei Stromfluss einstellt, unterscheidet sich von dem Gleichgewichtspotential E_{GG} aus Gleichung (3.2), d.h. sobald ein Redoxstrom über die Messzelle fließt, ist das elektrochemische Gleichgewicht gestört. Die Differenz dieser Elektrodenpotentiale wird als Überspannung oder Polarisation η bezeichnet:

$$\eta = E - E_{GG} \quad (3.7)$$

Anders ausgedrückt muss eine Überspannung angelegt werden, damit das Ion aus dem Elektrolytinneren mit den Ladungsträgern der Elektrode in Wechselwirkung treten kann. Die Überspannung setzt sich nach ihrer Ursache entsprechend aus mehreren Teilüberspannungen zusammen, wobei jedes dieser Stadien kinetisch gehemmt und somit geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Die wichtigsten Überspannungen sind die Reaktions-, die Diffusions-, die Durchtritts-, die Kristallisations- und die Widerstandsüberspannung^{68,77,78}. Die Diffusionsüberspannung ist ein Resultat aufgrund der Verarmung an Metallionen unmittelbar vor der Kathode, nachdem diese in den Metallverbund aufgenommen wurden und eine Nachlieferung an Ionen nur sehr langsam voran geht. Eine Reaktionsüberspannung wird hervorgerufen, wenn die Metallionen auf dem Weg zur Elektrodenoberfläche chemische Reaktionen eingehen. Dabei handelt es sich meist um den Zerfall von Komplexen. Die Kristallisationsüberspannung resultiert aus dem Einbau von Metallatomen in das Kristallgitter der Metallschicht. Dabei spielen vor allem die Bildung stabiler Kristallkeime und deren Wachstum eine Rolle. Liegt keine Kristallisationsüberspannung vor, so ist das Keimwachstum gegenüber der Keimbildung energetisch bevorzugt⁶⁷. Die Widerstandsüberspannung ist auf Ohm'sche Verluste aufgrund von Kontaktwiderständen, schlecht leitenden Deckschichten auf den Elektroden oder des Potentialabfalls innerhalb des Elektrolyten zurückzuführen. Die Durchtrittsüberspannung bezeichnet die Hemmung in Folge des Ladungstransfers an der Phasengrenze von Elektrode und Elektrolyt. Als Maß für den Ladungsträgerdurchtritt an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt dient dabei der Durchtrittswiderstand R_D . Dieser ist, neben der Doppelschicht-

kapazität C_{dl} , eine wichtige Kenngröße für den Vergleich von elektrochemischen Elektrode/Elektrolyt-Systemen und wird definiert als⁶⁸:

$$R_D = \frac{d\eta_D}{dj_D} \quad (3.8)$$

wobei η_D die Durchtrittsüberspannung und j_D die Gesamtstromdichte ist.

3.3 Einflussgrößen in der Mikrogalvanoformung

Ist das Ziel der elektrolytischen Abscheidung ein Füllen von Mikrostrukturen, so wird auch von Mikrogalvanoformung gesprochen. In der Regel werden hierbei Substrate verwendet, auf denen eine metallische Startschicht abgeschieden ist. Auf dieser Startschicht ist ein nichtleitender, vorstrukturierter Resist aufgebracht, in dessen Kavitäten eine Abscheidung erfolgt. Die Abscheidung kann daher als Abscheidung in zurückgesetzte Mikroelektroden verstanden werden. Gerade in der Mikrogalvanoformung ist die Prozesskompatibilität von enormer Bedeutung. Da die galvanische Abscheidung meist im Anschluss an einen lithographischen Prozessschritt erfolgt, darf der eingesetzte Elektrolyt den als Maskierung verwendeten Resist weder chemisch angreifen noch aufquellen lassen. Ein Quellen tritt beispielsweise bei PMMA-basierten Lacksystemen auch schon weit unterhalb der Glasübergangstemperatur auf⁷⁹. Ebenso ist eine Gasentwicklung zu vermeiden, die ein Ablösen des Resists oder die Bildung von Hohlräumen (sogenannte Lunker) im abgeschiedenen Metall verursachen kann.

Zu den klassischen Einflussgrößen der elektrolytischen Abscheidung gehören, neben den Substrateigenschaften des zu beschichteten Werkstücks (z.B. Oberflächenbeschaffenheit), vor allem die Elektrolytchemie (z.B. pH-Wert, Konzentration an Metallionen, Art und Konzentration der Zusätze) und physikalische Parameter (z.B. Temperatur, Stromdichte, Fluidik). Bei der Beschreibung von zurückgesetzten Mikroelektroden müssen vor allem die Aspekte Stromdichteverteilung und Stofftransport genauer betrachtet werden, da sie einen wesentlichen Einfluss auf die Schichtdicke haben. Hierbei beeinflusst vor allem das Aspektverhältnis der Mikrostrukturen das Ergebnis der Abscheidung.

Bei der Stromdichteverteilung wird in primäre, sekundäre und tertiäre Stromdichteverteilung unterschieden. Die primäre Stromdichteverteilung wird durch das elektrische Feld, also die Feldlinienverteilung bestimmt, was bedeutet, dass ausschließlich geometrische Faktoren berücksichtigt werden, die die lokale Feldstärke an der Kathodenoberfläche beeinflussen. Hierzu zählen unter anderem die Form, Größe und der Abstand der beiden Elektroden. So können beispielsweise Randbereiche oder Oberflächenspitzen eine lokale Bündelung der Feldlinien hervorrufen, sodass an diesen Stellen lokal eine höhere Stromdichte vorliegt, eine größere Ladungsmenge umgesetzt und entsprechend mehr Material abgeschieden wird als in den restlichen Bereichen der Kathodenoberfläche. Die sekundäre Stromdichteverteilung beschreibt

hingegen die Stromverteilung, die von elektrochemischen Eigenschaften wie der Polarisation des Systems bestimmt wird. Sie kann durch die Zusammensetzung, Leitfähigkeit und Bewegung des Elektrolyten beeinflusst werden. Die tertiäre Stromdichteverteilung wird hauptsächlich durch lokale Temperatur-, pH-Wert- und Dichteunterschiede des Elektrolyten beeinflusst und wirkt sich insbesondere auf die Rauigkeit der abgeschiedenen Schicht aus. Insbesondere zur Verbesserung der tertiären Stromdichteverteilung können dem Elektrolyt Zusätze wie Glanzbildner, Tenside oder Einebner zugeführt werden. Glanzbildner erhöhen den Glanz, also das Reflexionsvermögen, einer Schicht. Dieser steht im direkten Zusammenhang mit der Rauigkeit und meist auch mit der Kristallkörnung der Schicht. Das bedeutet, dass glänzende Schichten eine sehr glatte und ebene Oberfläche mit geringer Rauigkeit und definierter kristalliner Struktur haben. Um dies zu erreichen, muss die Keimbildung entsprechend gefördert und das Keimwachstum gehemmt werden. Dies wird durch eine lokal wirksame, selektive Passivierung oder chemische Pufferung unterschiedlicher pH-Werte am Ort der Abscheidung kontrolliert⁶⁹. Tenside sind Substanzen, die die Grenzflächenspannung zwischen Elektrolyt und Werkstück herabsetzen, wodurch die Benetzbarkeit mit dem Elektrolyten verbessert wird, was zu einer homogenen Abscheidung führt. Einebner sind insbesondere dann wichtig, wenn die abgeschiedene Schicht eine glattere Oberfläche haben soll als die Oberfläche des zu beschichtenden Werkstücks.

Ist die primäre Stromdichteverteilung die bestimmende Einflussgröße und befinden sich Strukturen mit großen und kleinen Strukturweiten auf dem Werkstück, so teilen sich die Feldlinien nicht gleichmäßig auf und unterschiedliche Strukturhöhen sind die Folge⁸⁰ (**Abbildung 3.3 a**). Aufgrund der Konzentration der Feldlinien in Randbereichen wächst die Schicht mit kleiner werdender Strukturweite schneller. Dieser Effekt kann durch eine Homogenisierung der Strukturverteilung mittels Dummystrukturen minimiert werden⁸¹. Auch die Anpassung der Anodengröße oder der Einsatz von Blenden ist ein bewährtes Hilfsmittel zur Schichtdickenhomogenisierung⁶⁷.

Wird der Einfluss des Stofftransports betrachtet, so erfolgt bei der klassischen Galvanik der Transport der Ionen bis kurz vor die Elektrode durch Konvektion. Durch die ständige Durchmischung des Elektrolyten wird eine konstante Ionenkonzentration bis nahe der Elektrodenoberfläche garantiert und eine homogene Diffusionsschichtdicke bildet sich aus. Im Falle von Mikrostrukturen ist dieser Sachverhalt für große Strukturweiten, respektive geringe Aspektverhältnisse ebenfalls gegeben. Werden die Strukturen jedoch kleiner und die Aspektverhältnisse höher, so kann der Elektrolyt vor der Elektrodenoberfläche nicht mehr effektiv durchmischt werden, der Einfluss der Konvektion bezogen auf den Stofftransport nimmt ab, die effektive Diffusionslänge wächst an und die Diffusion bestimmt den Stofftransport (**Abbildung 3.3 b**). Weiterhin nimmt mit fortschreitender Abscheidung die Diffusionsstrecke ab, sodass sich unterschiedliche Abscheideraten einstellen^{71,72}.

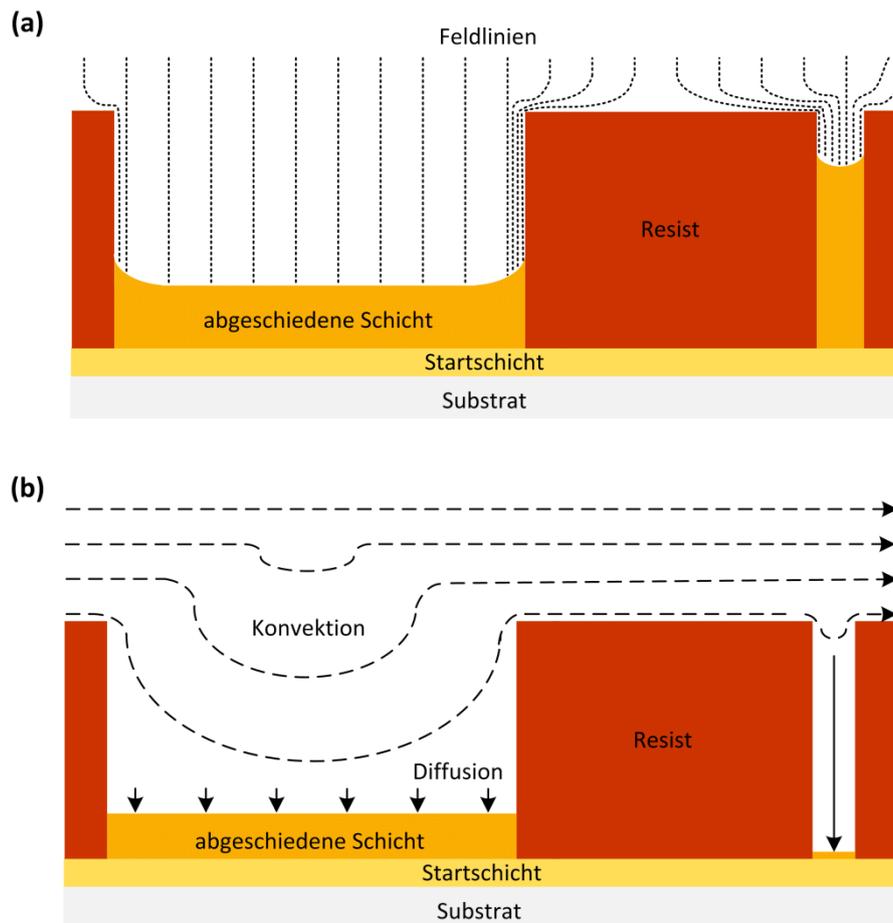


Abbildung 3.3: Einfluss unterschiedlicher Aspektverhältnisse der Mikrostrukturen bei der (a) Feldlinienverteilung und beim (b) Stofftransport (adaptiert von Dambrowski⁶⁷).

Bei geringen Ionenkonzentrationen im Elektrolyt verstärkt sich die diffusionskontrollierte Abscheidung noch zusätzlich. Das Verhältnis von Verbrauch und Nachlieferung der Metallionen ist somit für die Abscheidungsgeschwindigkeit, die Kristallstruktur und für die Eigenschaften der Schicht maßgebend. Um eine gleichmäßige Schichtdickenverteilung zu garantieren, sollte die Galvanik daher durchtrittskontrolliert ablaufen⁸². Bei diffusionskontrollierten Systemen ist die Grenzstromdichte, also die Stromdichte, bei der die Ionenkonzentration vor der Elektrodenoberfläche auf den Wert null absinkt, von Bedeutung. Um die Schichtqualität zu verbessern, wird in der Praxis jedoch meist eine Stromdichte gewählt, die kleiner als 40 % dieser Grenzstromdichte ist⁶⁷. Diese wird weiter herabgesetzt, sobald sich die Ionenkonzentration des Elektrolyten verringert. Eine Erhöhung der Metallionenkonzentration wirkt sich deshalb ebenso positiv auf die Diffusionsgeschwindigkeit aus, wie eine Erhöhung der Elektrolyttemperatur, eine Erhöhung der Leitfähigkeit oder eine Verringerung der Anzahl von Elektrolytzusätzen^{82,83}.

4 Ableitung elektroaktiver Zellen

Um zu verstehen wie Zellsignale erfasst werden können, bedarf es eines grundlegenden Verständnisses vom Aufbau und der Funktionsweise elektroaktiver Zellen, welches im Folgenden am Beispiel neuronaler Zellen verdeutlicht wird. Im Anschluss daran erfolgt eine Beschreibung der Methoden zur Detektion elektroaktiver Zellsignale, die sich in intrazelluläre und extrazelluläre Methoden gliedert. Im weiteren Verlauf liegt der Fokus dann auf dem Messprinzip sogenannter Multielektrodenarrays (MEAs). Von dieser Betrachtung ausgehend werden Methoden zur Verbesserung der Zellsignaldetektion aufgezeigt und der aktuelle Stand von Wissenschaft und Technik wiedergegeben.

4.1 Elektroaktive Zellen

Elektrisch erregbare bzw. elektroaktive Zellen finden sich im menschlichen und tierischen Körper in unterschiedlicher Form und Anzahl wieder. Die bekanntesten Vertreter dieser Zellen sind beispielsweise Kardiomyozyten oder Neurone. Letztere formen die Nervensysteme des Körpers, welche alle Funktionen steuern. Der grundsätzliche Aufbau eines Neurons im zentralen Nervensystem ist schematisch in **Abbildung 4.1** dargestellt.

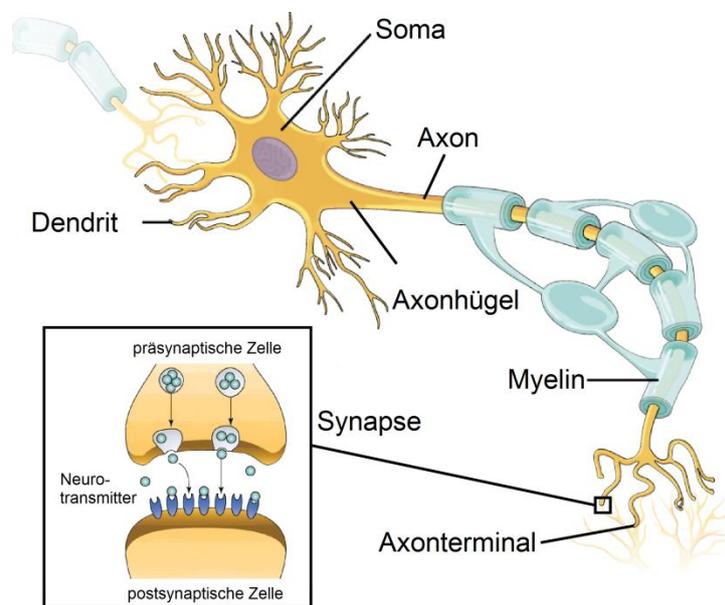


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines Neurons (adaptiert von Kanacademy⁸⁴).

Die Neurone bestehen im Wesentlichen aus dem Zellkörper (Soma) mit dem Zellkern, den Dendriten, dem teilweise vom Myelin umgebenen Axon inklusive Axonhügel und den Axonterminals. Der Zellkörper hat dabei je nach Zelltyp einen Durchmesser von 10-60 μm , wohingegen der Durchmesser des Axons im Bereich von 0,1-1 μm liegt. Die Länge des

Axons hängt ebenfalls vom Zelltyp und der Spezies ab und kann Längen von einigen Millimetern bis über einen Meter erreichen^{85–88}. Ein elektrisches Signal, welches das Neuron über einen Dendrit empfängt, wird zum Soma geleitet, wo es entsprechend mit Signalen anderer Dendriten verarbeitet wird. Die Signalweiterleitung erfolgt anschließend über den Axonhügel entlang des Axons zu den Axonterminals, an dessen Enden sich Kontaktzonen, sogenannte Synapsen, befinden. Ausgehend von den Synapsen der präsynaptischen Zelle werden Neurotransmitter gebildet, welche eine etwa 20 nm große Lücke zur postsynaptischen Zelle mittels Diffusion überwinden und an für den jeweiligen Neurotransmitter spezifische Rezeptoren binden. Die Rezeptoren haben entweder intrinsische Ionenkanäle oder aktivieren indirekt Ionenkanäle in der Postsynapse, so dass dort erneut ein elektrisches Signal generiert wird, welches von den Dendriten des nächsten Neurons aufgenommen wird. Um den Verlauf eines solchen Signals zu verstehen, das zwischen den einzelnen Neuronen weitergeleitet wird, ist es erforderlich, sich die Zellmembran genauer anzuschauen (**Abbildung 4.2 a**).

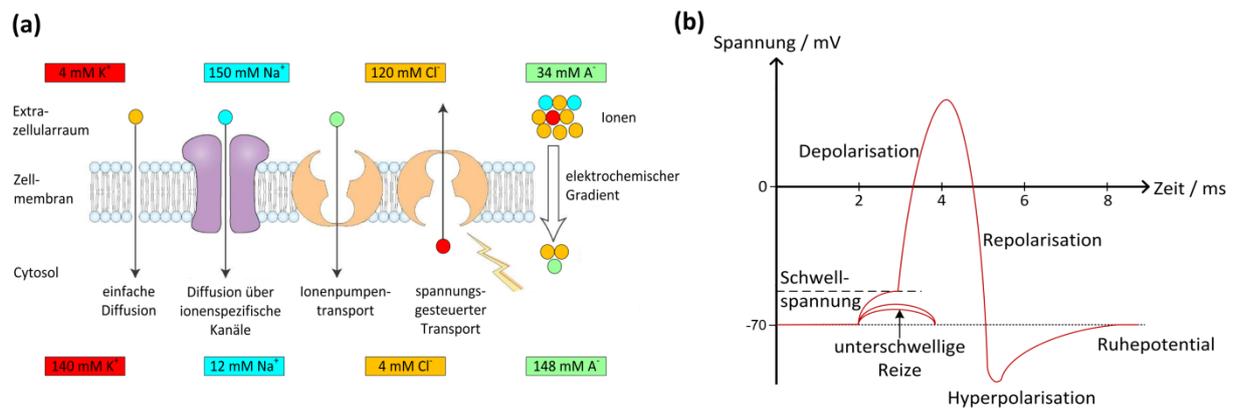


Abbildung 4.2: (a) Transportmechanismen sowie Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zellmembran (adaptiert von Lodish⁸⁵, what-when-how⁸⁹). (b) Schematische Darstellung eines Aktionspotentials eines Neurons (adaptiert von Flexicon⁹⁰).

Die etwa 5-12 nm dünne Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht aus hauptsächlich Phospholipiden, in der diverse Formen unterschiedlicher Membranproteine vorhanden sind⁸⁷. Die Zellmembran grenzt das Zellinnere (Cytosol) vom extrazellulären Raum ab. Das Cytosol ist eine wässrige Substanz, in der sich die meist negativ geladenen Proteine und Aminosäuren befinden sowie darin gelöste metallische Ionen verschiedener Konzentrationen. Die wichtigsten im Cytosol und auch im Extrazellulärraum vorkommenden Ionen sind Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Chlorid (Cl^-) sowie weitere (nicht-chloridhaltige) Anionen (A^-) aus komplexen Molekülen. Die Konzentration an Kaliumionen ist in der Zelle höher, die Konzentration an Natrium- und Chloridionen hingegen außerhalb⁹¹. Die Transmembranproteine der Zellmembran übernehmen indes die Aufgabe des Ionentransports über spezifische Ionenkanäle und Ionenpumpen. Die Natrium-Kalium-Pumpe beispielsweise arbeitet entgegen dem elektrochemischen Gradienten und sorgt für einen Abtransport von drei Na^+ -Ionen aus der Zelle hinaus

und den Antransport von zwei K^+ -Ionen in die Zelle hinein. Der Ionenaustausch zwischen Zellinnerem und -äußerem erfolgt, dem elektrochemischen Gradienten einer Ionenart folgend, in der Regel durch (spannungs-)gesteuerte Ionenkanäle. Eine einfache Diffusion der Ionen durch die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran selbst spielt aufgrund der geringen Permeabilität nur eine untergeordnete Rolle. Diese Konzentrationsgradienten sorgen indes dafür, dass sich ein elektrisches Potential entlang der Zellmembran ausbildet, wobei das Zellinnere im Vergleich zum Extrazellularraum negativ geladen ist. Dieses negative Membranpotential wird auch Ruhepotential genannt. Das elektrische Potential entlang der Zellmembran E_M kann mittels der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschrieben werden, welche die Ionenkonzentrationen innerhalb $[x_i]$ und außerhalb $[x_a]$ mit den jeweiligen Permeabilitäten P_x der Ionensorte x durch die Zellmembran gewichtet:

$$E_M = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{[K_a]P_K + [Na_a]P_{Na} + [Cl_i]P_{Cl}}{[K_i]P_K + [Na_i]P_{Na} + [Cl_a]P_{Cl}} \quad (4.1)$$

Damit lässt sich ein Ruhepotential berechnen, welches in physiologischen Salzlösungen im Bereich von etwa -70 mV liegt. Durch einen internen oder externen Stimulus kann das Neuron aus seinem Ruhepotential depolarisiert und anschließend repolarisiert werden. Ein solcher Potentialverlauf wird Aktionspotential genannt (**Abbildung 4.2 b**). Um ein Aktionspotential hervorzurufen, muss der Reiz zunächst eine Schwellenspannung überschreiten, welche im Bereich von 10-20 mV über dem Ruhepotential liegt. Nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ erfolgt dann die Reizweiterleitung. Dies führt zu einem Öffnen der spannungsgesteuerten Ionenkanäle, wobei sich zunächst die Natriumkanäle öffnen. Die Kaliumkanäle sind derweil geschlossen. Aufgrund des Konzentrationsgradienten fließen Na^+ -Ionen in die Zelle hinein, was zu einem Anstieg des Potentials führt. Dieser Bereich wird Depolarisation genannt. Wegen dieser Potentialverschiebung beginnen sich spannungsaktivierte Kaliumkanäle zu öffnen, was zu einem Ausfluss an K^+ -Ionen aus der Zelle hinaus führt. Gleichzeitig schließen sich aufgrund der Kanalarchitektur die Natriumkanäle nach etwa 2-3 ms wieder, was ein weiteres Ansteigen der Zelldepolarisation verhindert. In der Phase der Repolarisation sind einzig Kaliumkanäle geöffnet, sodass das Membranpotential schnell wieder abfällt. Im weiteren Verlauf schließen auch die Kaliumkanäle. Da dieser Prozess im Vergleich zu den Natriumkanälen allerdings langsamer abläuft, können weiter Kaliumionen nach außen diffundieren, was zu einem Absinken des Potentials unterhalb des Ruhepotentials führt. Dieser Zustand wird Hyperpolarisation genannt. Die gesamte Dauer eines Aktionspotentialzyklus liegt in der Regel im Bereich zwischen 4-6 ms, der Potentialunterschied zwischen Maximum und Minimum beträgt in etwa 100-130 mV. Nach dem Schließen der K^+ -Kanäle bedarf es einer sogenannten Refraktärzeit von etwa 2 ms. Während dieser Zeit ist ein unmittelbares Auftreten eines erneuten Aktionspotentials nicht möglich. Dabei relaxieren alle Ionenkanäle und die Natrium-Kalium-Pumpen regulieren die Spannung auf den Wert des Ruhepotentials. Die Refraktärzeit

limitiert damit nicht nur die Anzahl der auftretenden Aktionspotentiale innerhalb einer definierten Zeitspanne, sondern ist auch dafür verantwortlich, dass die Weiterleitung des Signals in nur eine Richtung entlang des Axons erfolgen kann⁹².

Die bisherigen Erkenntnisse wurden am Beispiel von Neuronen erläutert. Werden hingegen andere Zelltypen untersucht, so müssen die entsprechenden Betrachtungen auf den jeweiligen Zelltyp übertragen werden. Dies betrifft sowohl den Zellaufbau und die Signalpropagation als auch die Konzentrationsverteilung der Ionen, was dazu führt, dass Verlauf (Maxima/Minima) und Dauer der Aktionspotentiale sich von dem des Neurons zum Teil deutlich unterscheiden.

4.2 Möglichkeiten der Zellsignalableitung

Zum Erfassen der koordinierten Zellaktivität von einem beispielsweise neuronalen Netzwerk bedarf es einer hohen räumlichen als auch zeitlichen Auflösung des gemessenen Signals. Um zusätzlich eine hohe Qualität des Messsignals zu garantieren, ist eine möglichst nahtlose Interaktion zwischen Zelle und Detektionseinheit erforderlich. Die Messung der elektrischen Zellaktivität kann sowohl im lebenden Organismus (*in vivo*) als auch in einer künstlich geschaffenen Umgebung (*in vitro*) erfolgen. Bei der hier behandelten (*in vitro*-)Signalmessung kann prinzipiell zwischen zwei Arten unterschieden werden: Bei der intrazellulären Messung wird das Messsignal direkt innerhalb der Zelle gemessen, wohingegen bei extrazellulären Verfahren das Signal außerhalb der Zelle detektiert wird. Der wichtigste Vertreter der intrazellulären Messung ist das von Neher und Sakman entwickelte Patch-Clamp-Verfahren⁹³. Als eine Weiterentwicklung der klassischen Mikronadelelektroden, bei der zwei Elektroden direkt in die Zelle gestochen und die Membranströme gemessen werden, wird bei der Patch-Clamp-Methode eine Glaspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von wenigen Mikrometern verwendet, die lediglich auf die Zellmembran aufgesetzt wird (**Abbildung 4.3 a**). Mit Hilfe eines Unterdrucks wird die Zellmembran angesaugt, wodurch eine starke elektrische Isolation zum Extrazellularraum geschaffen wird. Der Abdichtwiderstand liegt hierbei im Bereich einiger Gigaohm, weshalb die Isolation auch als Giga-Seal bezeichnet wird. Innerhalb der Pipette befindet sich eine Metallelektrode (meist ein chlorierter Silberdraht), die in eine leitfähige Lösung, welche in ihrer Zusammensetzung dem Cytosol nachempfunden ist, eintaucht. Dadurch können Ströme, die den Ionenkanal passieren, detektiert werden. Diese Konfiguration wird als *cell-attached mode* bezeichnet. Um das Potential der gesamten Zelle abzuleiten, muss indes im *whole-cell mode* gearbeitet werden. Dabei wird durch Erhöhen des Unterdrucks oder Anlegen eines Spannungspulses das angesaugte Membranstück (*patch*) geöffnet, wodurch sich das Cytosol mit der Pipettenflüssigkeit mischt und somit die intrazelluläre Messung von Aktionspotentialen möglich ist. Der Vorteil des Patch-Clamp-Verfahrens liegt darin, dass durch das direkte Messen des Ionenstroms über die Ionenkanäle der Membran sehr akkurate Informationen über die elektrophysiologischen Eigenschaften der gesamten Zelle generiert werden können. Neben den Aktionspotentialen mit Frequenzen zwischen 500 und

1000 Hz können auch langsame Membranoszillationen und die etwas schnelleren (post-)synaptischen Potentiale, die im Frequenzbereich von 1 bis 50 Hz respektive 100 Hz liegen, gemessen werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Technik liegt im Ansaugen und Öffnen der Zellmembran, bei der die Zelle dauerhaft geschädigt oder abgetötet werden kann. Aus diesem Grund liegt die Messzeit im Bereich von nur wenigen Minuten bis Stunden, wodurch Aussagen über die Langzeitaktivität nicht möglich sind. Da immer nur eine bis wenige Zellen gleichzeitig untersucht werden können, ist zum anderen nur eine eingeschränkte Aussage über mögliche Netzwerkaktivitäten der Zellen untereinander möglich^{93,94}.

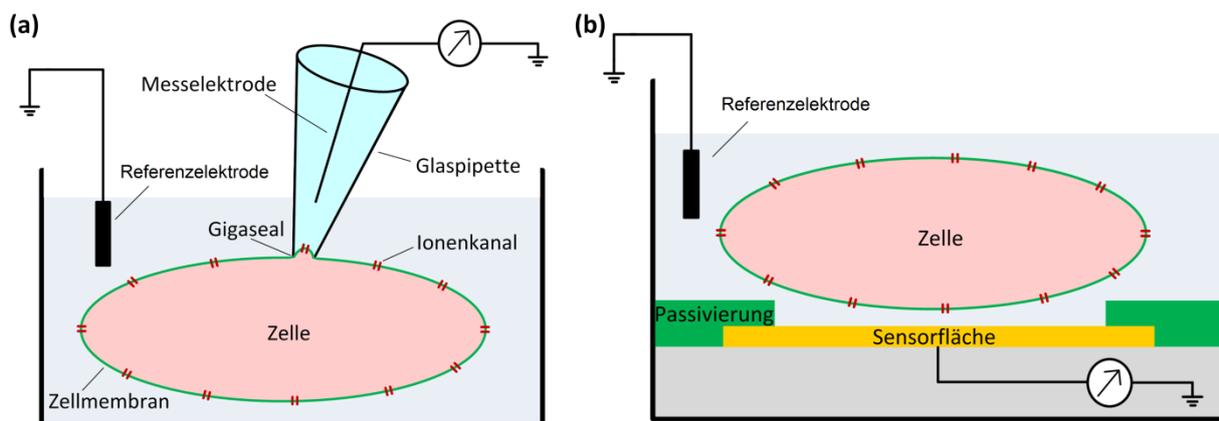


Abbildung 4.3: (a) Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik (adaptiert von Discoverymedicine⁹⁵). (b) Schematische Darstellung der extrazellulären Ableitung mittels Metallelektrode (adaptiert von Hierlemann et al.⁹⁴).

Als Alternative zu den komplexen intrazellulären Verfahren bieten sich daher extrazelluläre Messmethoden an. Dabei werden die Zellen direkt auf den Sensor kultiviert. In der einfachsten Variante ist der Sensor eine Metallelektrode (**Abbildung 4.3 b**). Fließen die Ionenströme durch die Zellmembran, so ändern sich die Ladungsträgerkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle. Die dadurch hervorgerufene Potentialänderung kann von der Metallelektrode erfasst werden. Neben diesen einfachen Metallelektroden existieren auch Messprinzipien, die auf Feldeffekttransistoren (FETs) beruhen, wie zum Beispiel ionensensitive oder Elektrolyt-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistoren⁹⁶. Da die extrazellulären Methoden nicht-invasiv sind, kann eine Messung auch über mehrere Tage und Wochen erfolgen, ohne dass die Zelle von der Messapparatur beschädigt wird. Werden mehrere solcher Transistoren oder Metallelektroden in einem Array angeordnet, so sind Multikanalmessungen und damit Messungen von Zellnetzwerken möglich. Allerdings ist die Qualität des Messsignals im Vergleich zu intrazellulären Messverfahren deutlich schlechter, da in der Regel keine Einzelzellaktionspotentiale, sondern lediglich (lokale) Feldpotentiale detektiert werden. Wegen sogenannter Verlustströme, die aufgrund der mangelhaften Zell-Elektroden-Kopplung über den Elektrolyt abfließen können, ist die gemessene Signalamplitude um etwa einen Faktor 1000 geringer als bei der intrazellulären Messung. Zudem stammt im Fall von dichten Zellpopulationen das gemes-

sene Potential nicht nur von dem Signal einer einzelnen Zelle, sondern kann von Ausläufer-signalen benachbarter Zellen überlagert werden. Da die Messmethode aufgrund des hohen Rauschanteils keine Spannungen unterhalb der Schwellspannung detektieren kann und somit unempfindlich für unterschwellige Ereignisse ist, kann bei extrazellulären Verfahren nur die einfache Aktivität von Spannungsspitzen beobachtet werden.

4.3 Multielektrodenarrays

Als Multielektrodenarray (MEA) wird eine Anordnung mehrerer Elektroden auf einem Chip bezeichnet, die einzeln angesteuert und ausgelesen werden können und daher Langzeitmessungen von Zellnetzwerken erlauben. Die ersten MEAs wurden bereits 1972 von Thomas et al. bzw. 1977 von Gross et al. entwickelt⁹⁷⁻¹⁰⁰. Zur Beschreibung der elektrischen bzw. elektrochemischen Vorgänge wird das Modell nach Hodgkin und Huxley angewendet, was die Gegebenheiten zwischen Zelle und Elektrode anhand eines elektrochemischen Ersatzschaltbilds darstellt (**Abbildung 4.4**)¹⁰¹.

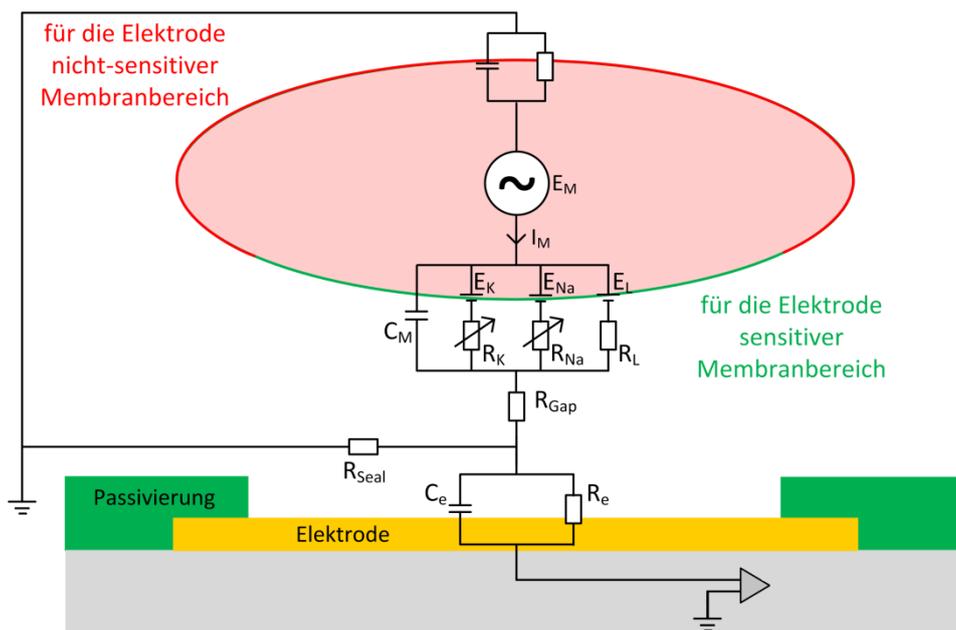


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des elektrochemischen Ersatzschaltbilds nach Hodgkin und Huxley für eine extrazelluläre Messung an einer Zelle.

Die Zelle übernimmt die Aufgabe einer Signal- bzw. Potentialquelle mit dem Membranpotential E_M . Ausgehend von dem für die Elektrode sensitiven Bereich der Zelle teilt sich das Potential aufgrund der unterschiedlichen Ionenarten in einen veränderlichen Anteil kaliumbasierter und natriumbasierter Potentiale E_K und E_{Na} auf. Da der Ionenstromfluss nicht konstant ist, werden als Widerstandselemente veränderliche Widerstände R_K und R_{Na} verwendet. Neben den dominierenden Kalium- und Natriumströmen existieren weitere Ionenströme, die im Ersatzschaltbild als konstanter Leckstrom mit dem Potential E_L und dem Widerstand R_L zu-

sammengefasst werden. Die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran wird durch die Membrankapazität C_M dargestellt. Der Strom I_M , der durch die Zellmembran in den Extrazellulärraum fließt, besteht somit aus kapazitiven und resistiven Komponenten und errechnet sich zu:

$$I_M = C_M \frac{dE_M}{dt} + \sum_x \frac{E_M - E_x}{R_x} \quad (4.2)$$

wobei E_x bzw. R_x die Potentiale bzw. Widerstandelemente der jeweiligen Ionensorte x respektive die des Leckstroms sind. Es ist zu beachten, dass nur der Anteil des von der Zelle ausgehenden Ionenstroms von der Elektrode detektiert werden kann, der direkt über der Messelektrode lokalisiert ist. Der Ionenstrom des nicht-sensitiven Bereichs fließt von dieser Elektrode unbemerkt im Elektrolyten ab und kann sich höchstens aufgrund elektrischer Felder an benachbarten Elektroden widerspiegeln.

Die Elektrode kann vereinfacht durch eine parallele Anordnung einer Kapazität C_e und eines Widerstands R_e dargestellt werden. Da der Zwischenraum von Elektrode und Zelle mit Elektrolyt gefüllt ist, ist ebenso der Widerstand des Elektrolyts R_{Gap} zu berücksichtigen, der unmittelbar von der Lücke zwischen Elektrode und Zelle abhängt und mit größer werdender Lücke ansteigt. Der Abdichtwiderstand R_{Seal} bestimmt hingegen, wie hoch der Signalanteil ist, welcher von der Elektrode erfasst werden kann bzw. welcher Anteil im Elektrolyt „verschwindet“. Dieser ist ebenfalls vom Zell-Elektroden-Abstand und somit von der Zell-Elektroden-Kopplung abhängig. Im Vergleich zu R_{Seal} , welcher im Megaohmbereich angesiedelt ist, liegt R_{Gap} im Bereich weniger Ohm und kann daher für die meisten Anwendungen vernachlässigt werden^{102–104}. Ein Abdichtwiderstand im unteren Megaohmbereich korrespondiert dabei mit einem Zell-Membran-Abstand von etwa 40 bis 100 nm, was typischerweise zu Feldpotentialmessungen von einigen 10 μV führt^{105–109}. Die Elektrode detektiert dabei alle Änderungen des extrazellulären elektrischen Felds, das aufgrund von Ionenströmen nahegelegener Zellen (im Bereich von ca. 100 μm) verursacht wird, wodurch das gemessene Signal von mehreren, sich überlagernden Potentialquellen stammen kann^{110,111}. Das extrazellulär gemessene Potential V_{ex} an einem bestimmten Punkt P ergibt sich nach dem Stromdipol-Modell als¹¹²:

$$V_{\text{ex}}(P) = \frac{1}{4\pi\sigma} + \sum_i \frac{j_i}{r_i} \Delta S_i \quad (4.3)$$

wobei σ die Leitfähigkeit des Mediums, j_i die Stromdichte am i -ten Segment, r_i die Distanz des Messegments i zum Punkt P und ΔS_i die Oberfläche des i -ten Segments ist. Dabei beeinflussen vor allem die Beschaffenheit der Elektrode, die Größe der Zellen und der Abstand von Zelle und Elektrode das von der Elektrode gemessene Potential.

Neben der Aufnahme des (schwachen) Messsignals müssen auch die Verarbeitung und insbesondere die Verstärkung dieses Signals erfolgen. Da das aufgenommene analoge Signal von einem Computer weiterverarbeitet werden soll, muss dieses mittels eines A/D-Wandlers zu einem digitalen Signal umgewandelt werden. Da die meisten Wandler ein Auflösungsvermögen im mV-Bereich haben, das Messsignal aber eher im μV -Bereich liegt, muss das Signal verstärkt werden. Zudem müssen externe technische Störquellen wie Netz- oder Hochfrequenzrauschen herausgefiltert werden. Eine Minimierung des Rauschens führt dabei zu einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis, was die Qualität des Messsignals verbessert. Im Anschluss daran erfolgt die Verarbeitung der Daten in Form des sogenannten *spike sortings*. Dabei werden die Potentiale nach ihrer Wellenform, Amplitude, räumlichen Ausdehnung und anderen Parametern separiert^{113–119}. Danach können die Daten analysiert und interpretiert werden, sodass beispielsweise Aussagen über die Dynamik der Zellsignalausbreitung getroffen werden können.

4.4 Optimierungsmöglichkeiten der MEA-gestützten Signalableitung

Mithilfe des Ersatzschaltbilds aus Abbildung 4.4 lassen sich prinzipiell zwei Möglichkeiten ermitteln, wie die Signaldetektion optimiert und eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses herbeigeführt werden kann: Dabei kann zum einen die Impedanz der Elektrode selbst minimiert werden. Zum anderen kann aber auch die Zell-Elektroden-Ankopplung verbessert werden, was den Abdichtwiderstand R_{Seal} zwischen Zelle und Elektrode erhöht und Verlustströme begrenzt. Gleichzeitig schirmt der Abdichtwiderstand vor Streuströmen im Elektrolyt, die von anderen Signalquellen bzw. Zellen stammen, ab und vermindert das Rauschen.

Die Impedanz der Elektrode kann verringert werden, wenn entweder das Material der Elektrode selbst verändert oder die elektrochemisch aktive Oberfläche der Elektrode vergrößert wird. Die Oberfläche der Elektrode kann vergrößert werden, indem die Elektrode selbst vergrößert wird. Das hat den Nachteil, dass die räumliche Auflösung der Signaldetektion nicht zuletzt wegen elektrischer Felder minimiert wird und das Rauschen zunimmt, was beides im Allgemeinen nicht erwünscht ist. Um eine möglichst hohe räumliche Auflösung zu generieren, sollte daher die Sensorgröße bzw. der Elektrodendurchmesser so klein wie möglich sein. Je kleiner allerdings die Elektrodengröße wird, desto größer wird die Impedanz und desto geringer wird die Sensitivität. Daher ist es notwendig die Elektrodengröße so zu wählen, dass eine Balance aus genügend hoher räumlicher Auflösung bei gleichzeitig geringer Impedanz geschaffen wird, was beispielsweise durch das Verwenden aufgerauter bzw. poröser Materialien möglich ist. Dadurch wird eine effektive Vergrößerung der Elektrodenoberfläche bei gleichbleibenden räumlichen Dimensionen erzielt. Eine Verbesserung der elektrischen Eigenschaften bzw. eine Erhöhung der effektiven Oberfläche kann hierbei durch den Einsatz von

Platinschwarz^{120–127}, Titannidrit^{88,128,129}, Indium-Zinn-Oxid¹³⁰, Iridiumoxid¹³¹, Carbon-Nanotubes^{132–136}, Graphen¹³⁷ oder leitfähigen Polymeren wie Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT)^{138–141} erzielt werden. Auch eine Modifikation der Topographie der Elektrodenoberfläche durch Goldflocken¹⁴² oder Nanowires aus Silizium und Galliumphosphat^{143,144} erhöht die effektive Oberfläche. Die Optimierung der Zell-Elektroden-Kopplung kann mit Hilfe einer adhäsionsvermittelnden Schicht, welche auf die Elektrode aufgebracht wird, erreicht werden. Je nach Zelltyp wird Laminin, Gelatine, Kollagen, Fibronectin, Polylysin oder andere Proteine der Extrazellulärmatrix verwendet^{145–147}. Der Nachteil einer Adhäsionsschicht ist, dass diese die Performance der Elektrode herabsetzt, da sie als zusätzlicher Widerstand auf der Elektrodenoberfläche die Signalqualität mindert. Eine weitere Option ist, das Chipdesign selbst so zu gestalten, dass eine optimierte Haftung bzw. hohe Lokalisierung der Zellen im Bereich der Sensorfläche erreicht wird^{148–157}. So wurde beispielsweise eine Käfigstruktur entwickelt, die das Wachstum des Zellkörpers eines Neurons auf den unmittelbaren Bereich der Elektrode einschränkt und dadurch die Signalqualität der gemessenen Potentiale erhöht¹⁴⁹.

Neben den bereits vorgestellten Möglichkeiten gibt es den Ansatz, die Elektrode mit dreidimensionalen Strukturen zu modifizieren. Die Tatsache, dass die aus der Elektrode hervortretenden Strukturen aus ebenso leitfähigem Material wie die Elektrode selbst hergestellt werden, vergrößert die effektive Oberfläche der Elektrode, was zu einer Verringerung der Eingangsimpedanz führt. Je nach Art und Größe dieser Strukturen können zusätzlich unterschiedliche Effekte im Vergleich zu planaren Elektroden hervorgerufen werden (**Abbildung 4.5**). Pilzförmige Mikrostrukturen fördern beispielsweise die Zell-Elektroden-Kopplung durch ein aktives Wachstum der Zelle um die pilzförmige Elektrode, die ähnlich dem Vorgang der Endozytose/Phagozytose abläuft, bei der sich Zellen aktiv Partikel einverleiben. Im Experiment bildeten die Zellen Aktinringe aus, welche die Ankopplung zur Struktur stabilisierten und einen hohen Abdichtwiderstand generierten. So konnten intrazellulär-ähnliche Aktionspotentiale von mehreren Millivolt sowie Synapsenpotentiale detektiert werden^{158,159}. Neben der Möglichkeit des Umschließens der Struktur durch die Zelle ist auch ein Eindringen der erhabenen Struktur in die Zelle denkbar. Da die erhabene Struktur die nur wenige Nanometer breiten Poren der Zellmembran durchdringen muss, werden hierfür spitzenförmige Nanostrukturen verwendet^{142–144}. Der Penetrierungsprozess kann durch einen kurzen Strom- bzw. Spannungspuls unterstützt werden, der eine Aufweitung der Ionenkanäle bewirkt (Elektroporation). Neben der Größe und Form der Strukturen ist auch die Strukturdichte entscheidend. Eine beliebig hohe Dichte an Mikro- oder Nanostrukturen führt zwar zu einer Reduzierung der Impedanz, jedoch nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung des Zell-Elektroden-Kontakts¹⁶⁰, wodurch insbesondere die Auswahl geeigneter Parameter, wie Strukturform, -größe und -dichte, grundlegend für den Erfolg einer optimierten Signaldetektion sind.

Auch der Einfluss der Zellkultur selbst spielt bei der Optimierung der Zellsignalerfassung eine ebenso entscheidende Rolle wie die bereits diskutierten technischen Aspekte. Die Umgebungsbedingungen, denen die Zellen ausgesetzt sind, sind entscheidend für die Vitalität und

das Wachstum der Zellen und somit auch für das Generieren von Zellsignalen. Die Voraussetzungen für die Zellkultur hängen dabei insbesondere von der Art, der Anzahl und dem Alter der Zellen ab. Eine Zellkultur kann über mehrere Wochen aufrechterhalten werden, sofern die richtigen Umgebungsbedingungen vorliegen. Hierzu zählen beispielsweise eine konstante Temperatur und CO₂-Atmosphäre im Inkubator sowie die regelmäßige Erneuerung des Zellkulturmediums, welches in der Regel verschiedene Zusätze wie Penicillin, Streptomycin oder L-Glutamin enthält, zur Nahrungsmittelversorgung beiträgt und vor bakteriellen Kontaminationen schützt.

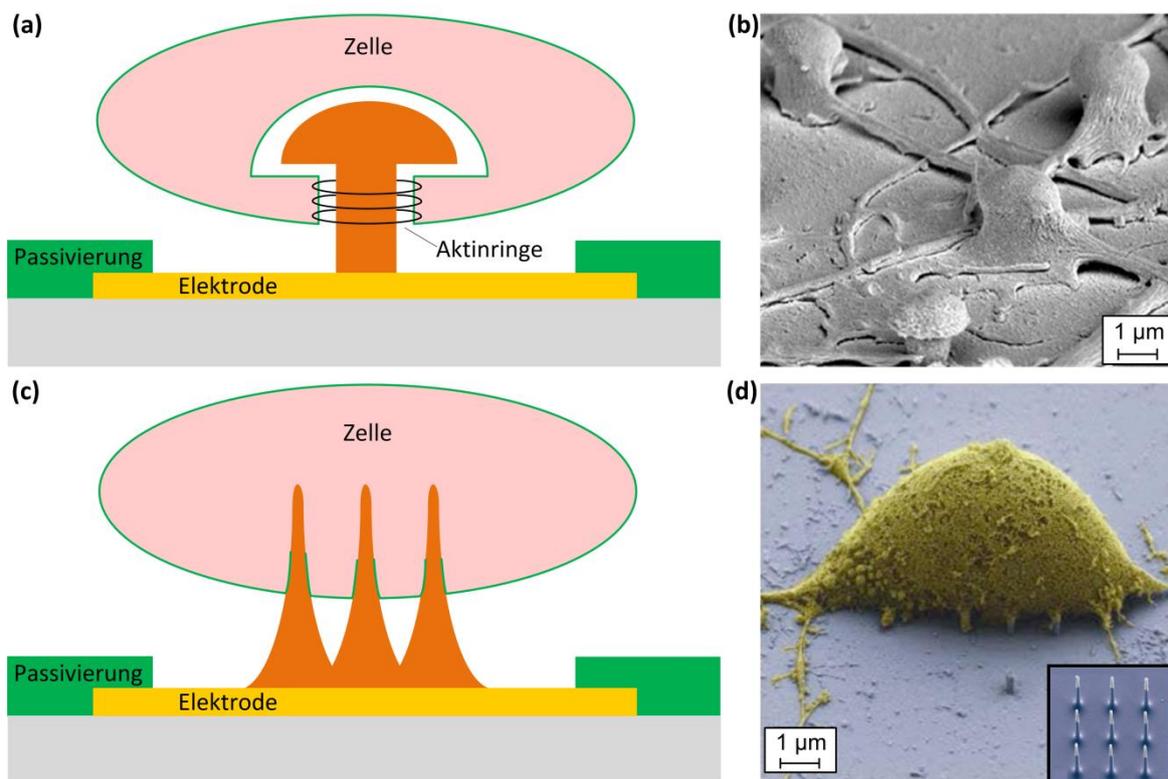


Abbildung 4.5: (a) Schematische Darstellung und (b) Anwendungsbeispiel eines Umschlins einer pilzförmigen Elektrodenstruktur (adaptiert von Spira et al.¹⁵⁸, Fendyur et al.¹⁵⁹). (c) Schematische Darstellung und (d) Anwendungsbeispiel der Penetration der Zelle durch die spitzenförmigen Elektroden (Abstand: 1 µm) (adaptiert von Spira et al.¹⁵⁸, Robinson et al.¹⁴⁴).

5 Konzeption 3D-nanostrukturierter MEAs

Eine optimale Messapparatur muss die Vorteile der extrazellulären und intrazellulären Messmethoden vereinen können, sodass der Sensor Langzeitmessungen von Zellnetzwerken ermöglichen kann und gleichzeitig in der Lage ist, das komplette elektrophysiologische Spektrum des Zellsignals zu erfassen. Um letzteres zu ermöglichen, liegt ein Ziel der Arbeit in der Optimierung bestehender Multielektrodenarrays hinsichtlich der Reduzierung der Eingangsimpedanz der MEA-Chips sowie der Herstellung eines stabilen und elektrisch isolierenden Zell-Elektroden-Kontakts durch die Modifikation der Elektrodenoberfläche mit unterschiedlichen Nanostrukturen.

In Anbetracht der Aufgabenstellung befasst sich dieses Kapitel zunächst mit der Konzeption der nanostrukturierten MEAs. Der Grundgedanke des vorgestellten Layouts besteht darin, dass lediglich die Hälfte aller Elektroden nanostrukturiert werden und somit eine interne Kontrolle geschaffen wird, die es ermöglicht, eine direkte Aussage über die Effizienz der Nanostrukturen während der verschiedenen Versuchsreihen zu treffen. Weiterhin ist das Layout der MEA-Chips so gestaltet, dass dem Experimentator ein hohes Maß an Flexibilität hinsichtlich der verwendeten Mikro- und Nanostrukturen zugesprochen werden kann. Dadurch ist eine Untersuchung unterschiedlich nanostrukturierter MEAs gegeben und gleichzeitig eine Vergleichbarkeit untereinander als auch mit unstrukturierten Elektroden möglich. Damit die Zellen wachsen und über einen langen Zeitraum überleben können sowie eine Signalerfassung von möglichst vielen Elektroden mit einer hohen Signalqualität erfolgen kann, sind weiterhin die eingesetzten Materialien und Prozesse aufeinander abgestimmt. Hierbei steht vor allem die Integration des Nanostrukturierungsprozesses in bereits vorhandene mikrosystemtechnische Verfahren im Vordergrund. Neben den technischen Aspekten soll in der Anwendung ein einfaches Handling ermöglicht werden und vorhandene Messsysteme genutzt werden können.

5.1 Materialauswahl

Bei der Auswahl der eingesetzten Materialien müssen generell mehrere Anforderungen berücksichtigt werden: Die Materialien, die verwendet werden und in direktem Kontakt mit den Zellen stehen, müssen zwingend biokompatibel und nicht-toxisch sein, sodass das Material den Zellen keinen Schaden zufügt und sowohl die Adhäsion als auch das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigt wird. Zum anderen dürfen aber auch die Substanzen, wie zum Beispiel das Zellkulturmedium, denen die eingesetzten Materialien ausgesetzt sind, diese weder chemisch noch mechanisch angreifen. Da der MEA-Chip wiederverwendet werden soll, müssen die Materialien zudem einer Reinigungsprozedur standhalten, sodass der Chip nach der Reinigung dieselben Eigenschaften aufweist wie zuvor. Damit die Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden können, sollten die eingesetzten Materialien möglichst transparent sein. Diesbezüglich wird Glas als Substratmaterial gewählt, da es isolierend, biokompatibel und als

transparentes Medium für die Mikroskopie geeignet ist. Als Elektrodenmaterial wird Gold eingesetzt. Allgemein haben metallische Elektroden, insbesondere Elektroden aus Gold, eine höhere Langzeitstabilität im Hinblick auf mechanische und chemische Belastungen als beispielsweise poröse Schichten aus Platinschwarz oder Titanitrid¹⁶⁰. So wird ein Abplatzen der Schichten während den Reinigungsprozeduren, welche im Rahmen des Fabrikationsprozesses mit verschiedenen Chemikalien und im Ultraschallbad durchgeführt werden, vermieden. Weiterhin hat Gold als Elektrodenmaterial gute elektrische Eigenschaften und ist im Rahmen des Reinraumprozesses mittels thermischer Verdampfung oder elektrochemischer Abscheidung herzustellen. Auch in der Anwendung ist Gold als Elektrodenmaterial von Vorteil. Als elektrochemisch inertes Material ist Gold nicht-toxisch und neigt nicht zur Korrosion, wenn es beispielsweise während der Zellkultivierungsphase mit dem Kulturmedium in Kontakt kommt. Eine zusätzliche Beschichtung zur verbesserten Zellhaftung ist bei Gold ebenfalls nicht zwingend notwendig¹⁶⁰. Zwar weisen Goldoberflächen im Vergleich zu porösen Schichten aufgrund der geringen elektrochemisch aktiven Oberfläche höhere Impedanzen auf, da allerdings der Effekt der Nanostrukturierung bzw. die Veränderung der Eigenschaften durch die Nanostrukturen untersucht wird, sind die absolut gemessenen Impedanzwerte zunächst von untergeordneter Bedeutung. Zudem können poröse Schichten durch beispielsweise Proteine verstopfen, was den positiven Effekt der Oberflächenvergrößerung wieder aufhebt.

Als Material zur elektrischen Isolation der Elektroden und Zuleitungen kommen grundsätzlich verschiedene organische oder anorganische Materialien wie beispielsweise Polyimid, Siliziumdioxid, Siliziumnitrid oder Siliziumkarbid in Frage. Bei rein elektrischen Bauelementen werden zur Isolation häufig im Plasma erzeugte Schichten aus Siliziumdioxid oder -nitrid verwendet^{161,162}. Im Fall der MEAs ist allerdings neben der elektrischen Isolation vor allem eine möglichst geringe Durchlässigkeit an (Alkali-)Ionen gefordert, da die Chips während der Anwendung einem wässrigen Milieu, meist einer Saline oder Zellkulturlösung, ausgesetzt sind. Daher sind organische Materialien meist nicht zur Passivierung geeignet, da diese Schichten in Anwesenheit von Wasser schnell degradieren bzw. quellen und somit zu einem Ablösen der Schicht führen. Im Gegensatz dazu ermöglichen anorganische Schichten eine stabilere Isolation. Dabei sind Einzelschichten aus Siliziumnitrid oder -dioxid jedoch teilweise durchlässig für Ionen, was durch eine elektrische Beaufschlagung zusätzlich verstärkt wird. Sogenannte *pinholes*, also lokale Öffnungen der Isolationsschicht, vergrößern die Angriffsfläche des Mediums und führen zu einem schnelleren Versagen der Isolationsschicht¹⁶³. Bei der Schichtabscheidung ist vor allem darauf zu achten, dass Schichtspannungen minimal gehalten werden. Druckspannungen führen zu rissigen Schichten, wobei Zugspannungen zu einer Schichtablösung führen. Die Anfälligkeit für Spannungsschäden steigt dabei mit wachsender Schichtdicke an¹⁶⁴. Zur Erzeugung spannungsarmer Schichten können zum einen die Abscheideparameter wie beispielsweise die Frequenz des im Prozess verwendeten Hochfrequenzgenerators optimiert werden. Zum anderen kann auch die Abscheidung einer Oxid-Nitrid-Mischphase bzw. die Abscheidung alternierender Schichten aus Oxid (O) und Nit-

rid (N) zu Verbesserungen der Spannungseigenschaften der Schicht führen^{161,162}. Durch den Einsatz einer ONO-Schichtstapelfolge kann zusätzlich eine deutliche Verbesserung der Dichtheit erreicht werden, welche die Versagenszeit der Schicht deutlich erhöht¹⁶⁴. Um die Dichtheit weiter zu steigern, die Anzahl an Spannungsrissen und *pinholes* zu minimieren sowie kapazitive Streueffekte, welche zu einem erhöhten Rauschen des Bauteils führen, zu begrenzen, wird als Isolatormaterial ein optisch transparenter ONONO-Schichtstapel verwendet. Dabei dient die untere Oxidschicht der besseren Haftung des Schichtstapels auf dem Glaswafer. Die obere Oxidschicht ist hingegen mit der verbesserten Biokompatibilität des Siliziumdioxids begründet¹⁶⁶.

5.2 Aufbau des MEA-Chips

Im Folgenden werden zwei Möglichkeiten vorgestellt, wie der MEA-Chip aufgebaut werden kann (**Abbildung 5.1**): Bei der als monolithisch bezeichneten Variante wird der komplette Chip aus einem Stück geformt und besitzt nach der Reinraumprozessierung bereits die entsprechende Größe, um in die Messvorrichtung platziert werden zu können. Diese Herstellungsart wird unter anderem von den gängigen kommerziellen Produzenten für MEAs angewendet. Bei der zweiten Variante wird zunächst ein Chip geringerer Größe hergestellt. Damit der Chip in die Messvorrichtung eingesetzt werden kann, muss dieser im Anschluss an die Reinraumprozessierung zusätzlich auf ein Trägersubstrat bzw. eine Leiterplatte (*printed circuit board*, PCB) aufgebracht werden^{167–170}. Im Vergleich zum monolithisch hergestellten MEA-Chip besitzt der Chip, der auf das Trägersubstrat montiert wird, kürzere Leitungen von den Messelektroden zu den Kontaktpads und ist daher in der Fläche minimiert.

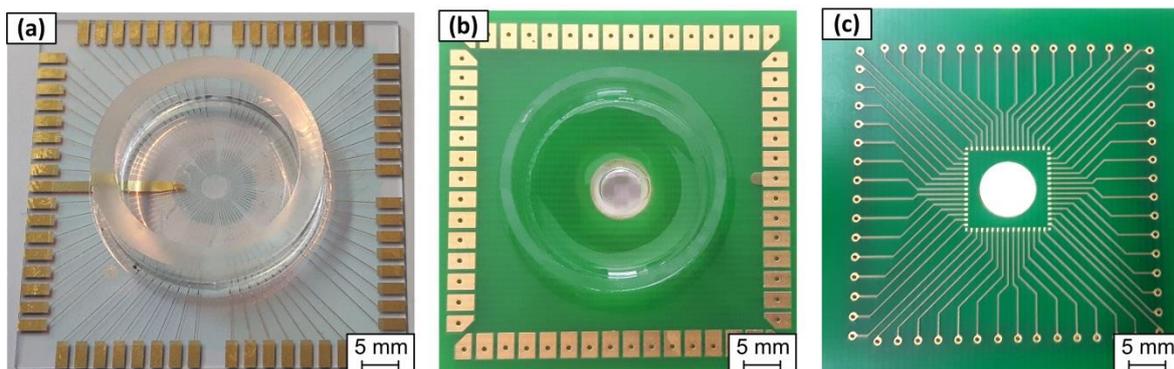


Abbildung 5.1: (a) Monolithisch aufgebauter, kommerziell erhältlicher MEA-Chip (Multi Channel Systems) mit einer Kammer. (b) Individuell hergestellter MEA-Chip auf PCB-Trägersubstrat mit Zwei-Kammer-Prinzip. (c) Rückseite des PCB (ohne Chip).

Sowohl die monolithische als auch die PCB-Variante haben Vor- und Nachteile. Der große Vorteil der monolithischen Version ist das Einsparen eines Prozessschritts, da ein Aufbringen auf ein Trägersubstrat entfällt. Auch zusätzliche Kontaktwiderstände zwischen Chip und Trä-

gersubstrat werden dadurch verhindert. Allerdings können aufgrund der erhöhten Chipgröße nur jeweils zwei Chips pro 4''-Wafer gefertigt werden, was wiederum den Prozessaufwand bei höheren Stückzahlen deutlich erhöht. Aufgrund der aufeinander abgestimmten Masken für die Mikro- und Nanostrukturierung werden zudem die Möglichkeiten hinsichtlich verschiedener Strukturvarianten stark eingeschränkt. Bei der PCB-Version muss zwar ein weiterer Prozessschritt zur Montage von Chip und Trägersubstrat hinzugefügt werden, allerdings können aufgrund der geringeren Chipgröße sehr viel mehr Variationen hinsichtlich der Mikro- und Nanostrukturen getestet werden, da sich pro Wafer mehrere Chips gleichzeitig prozessieren lassen (**Abbildung 5.2**). Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die PCB-Variante eingesetzt. Das Trägersubstrat ist so aufgebaut, dass die Kontaktflächen im Inneren im selben Raster angeordnet sind wie die Kontaktpads auf dem Chip. Die Kontaktierungsflächen an der Außenseite hingegen sind so gestaltet, dass das Trägersubstrat in eine kommerziell erhältliche MEA-Vorverstärkereinheit eingesetzt werden kann. Dadurch können individuell hergestellte MEAs mit einem kommerziellen Messsystem verbunden werden. In der Mitte des Trägersubstrats befindet sich zudem eine Öffnung, wodurch sich der Chip nach der Montage mittels Durchlichtmikroskop betrachten lässt.

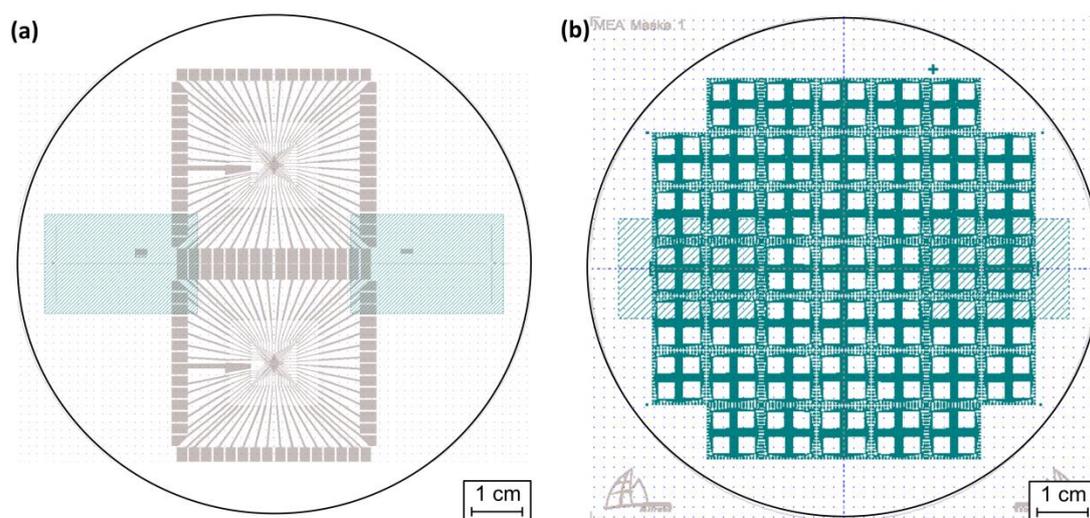


Abbildung 5.2: Möglichkeiten des Maskenlayouts für die MEA-Herstellung (a) der monolithischen Variante und (b) der Variante mit PCB-Trägersubstrat.

Die kommerziell erhältlichen MEAs bestehen in der Regel aus einer einzigen Kammer, die durch einen Glasring begrenzt ist. Bei diesem Aufbau besteht im Verlauf der Zellkultivierung jedoch die Gefahr, dass sich die Zellen vermehrt am Rand der Kammer anlagern. Da sich am Kammerrand allerdings keine Messelektroden befinden, können dort auch keine Signale detektiert werden. Im Gegensatz dazu wird bei den in dieser Arbeit hergestellten MEAs ein Zwei-Kammer-Prinzip angewendet^{167–170}. Hierfür wird auf dem Chip zunächst ein kleiner Glasring von 6 mm Innendurchmesser und einer Höhe von 2 mm platziert, der genau in die Öffnung des PCBs passt. Dieses kleinere Kammervolumen dient in der Anwendung als Re-

servoir für die Zellsuspension. Dabei ist der Ring so ausgelegt, dass dieser gerade die Mikroelektroden des Chips umschließt. Durch die begrenzte Fläche wird die Zellkultivierung auf den sensitiven Bereich des Chips beschränkt. Um dennoch ein genügend großes Volumen für das Zellkulturmedium bereitzustellen, wird ein zweiter, größerer Glasring mit 23 mm Innendurchmesser und einer Höhe von 12 mm auf das Trägersubstrat aufgebracht. Generell gilt, dass größere Volumina ein Aufrechterhalten der Zellkultur erleichtern, da Stoffwechselprozesse die Zellkulturlösung langsamer sättigen und ein Mediumwechsel seltener erfolgen muss. Ein häufiges Wechseln des Mediums versetzt die Zellen unter Stress und beeinflusst deren Vitalität negativ. Das Reservoir des zweiten Glasrings ist zudem groß genug, um als Reservoir für die Elektrolytlösung während der elektrochemischen Charakterisierung eingesetzt zu werden, ohne dass Verdunstungseffekte das Messergebnis signifikant beeinflussen.

5.3 Entwicklung eines Fabrikationsprozesses

Der Fabrikationsprozess gliedert sich in drei Teile: Zu Beginn wird die Herstellung der Nanostrukturen mittels Nanoimprintlithographie (NIL) und elektrochemischer Goldabscheidung realisiert. Diesbezüglich wird zunächst eine Vorstruktur in einem Resist mittels NIL erzeugt, welche anschließend mit elektrochemisch abgeschiedenem Gold aufgefüllt wird. An die Nanostrukturierung anschließend werden die Mikrostrukturen mittels Photolithographie und nasschemischen Ätzverfahren implementiert. Abschließend werden die fertig prozessierten Chips vereinzelt und auf die Trägersubstrate aufgebracht. Im Folgenden werden die Hauptprozessschritte dieses Fabrikationsprozesses beschrieben. Der komplette Fabrikationsablauf inklusive aller Prozessparameter, welche im Laufe der Arbeit evaluiert und optimiert wurden (Kapitel 6), sind in Anhang A in einer gesonderten *standard operating procedure* (SOP) aufgeführt.

Zu Beginn der Prozesskette steht die Realisierung der Nanostrukturen (**Abbildung 5.3**). Dazu muss auf das gereinigte Glassubstrat zunächst die für die Galvanik notwendige Startschicht aus Gold aufgebracht werden, welche gleichzeitig auch die Schicht ist, aus der die Mikrostrukturen gefertigt werden. Zur Verbesserung der Haftung der Goldschicht auf dem Glas wird eine Zwischenschicht aus Titan aufgebracht. Sowohl die Abscheidung der Titan- als auch die der Goldschicht werden mit einem Verfahren der physikalischen Gasphasenabscheidung (thermisches Verdampfen) realisiert. Hierbei erfolgt der Schichtaufbau durch Kondensation des thermisch verdampften Materials auf dem Substrat unter Hochvakuum¹⁷¹. Im Anschluss daran erfolgt das Aufbringen eines NIL-Resists mittels Rotationsbeschichtung (Spincoating) und anschließender thermischer Verfestigung (Abbildung 5.3, Prozessschritt A). Bei der folgenden T-NIL (B, C) werden die Nanostrukturen des Stempels (Master) unter Zuhilfenahme einer Temperatur- und Druckerhöhung in den Resist übertragen. Die Entfernung des *residual layers* wird indes mittels reaktivem Ionenätzen (*reactive ion etching*, RIE) mit Sauerstoff durchgeführt (D). Bei diesem Ätzverfahren wird ein Niederdruckplasma

erzeugt, welches aus reaktionsträgen Gasen hochreaktive Radikale oder Ionen generiert. Diese wiederum reagieren mit der zu ätzenden Schicht zu flüchtigen Verbindungen oder tragen das Material durch Sputterprozesse ab¹⁷¹. Im Anschluss daran erfolgt die Herstellung der Gold-Nanostrukturen mittels elektrochemischer Abscheidung, wobei der NIL-Resist als Maskierung dient (E). Durch Variation der Prozessparameter während der elektrochemischen Abscheidung kann die Höhe der Strukturen eingestellt und ein Überwachungsprozess initiiert werden. Nach der Abscheidung wird der NIL-Resist entfernt (F).

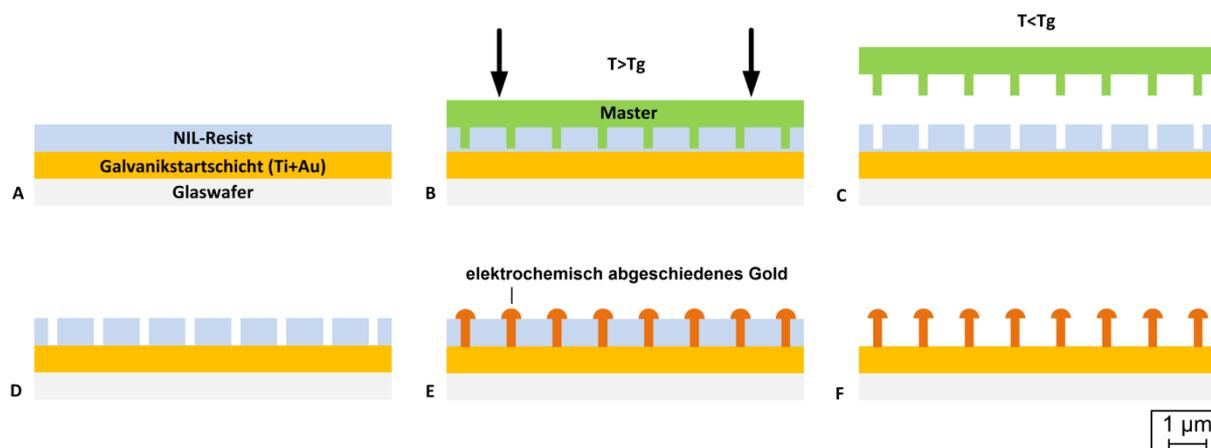


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung des Nanostrukturierungsprozesses der MEA Chips (Erläuterungen siehe Text).

Nach der Herstellung der Nanostrukturen erfolgt die Herstellung der Mikrostrukturen (**Abbildung 5.4**). Diese Prozessabfolge beginnt mit der Photolithographie, die zur Herstellung einer vorstrukturierten Maskierungsschicht eingesetzt wird. Dabei wird nach der Reinigung des Substrats zunächst eine photosensitive Resistschicht gleichmäßig mittels Spincoating aufgebracht und thermisch verfestigt (G). In einem sogenannten Mask-Aligner werden die Elektrodenflächen, Zuleitungen und Kontaktierungspads, deren Layout sich auf einer mit einer lichtabsorbierenden Chromschicht strukturierten Glasmaske befindet, über ein Schattenwurfverfahren in den UV-sensitiven Resist übertragen. Dabei werden die Mikrostrukturen der chrombeschichteten Maske mit Hilfe von Justagemarkierungen an den Nanostrukturen des Substrats ausgerichtet. Durch die UV-Belichtung werden im Fall des verwendeten Positivresists die belichteten Bereiche chemisch verändert, sodass diese in einem Entwickler löslich sind¹⁷¹ und ein exaktes Abbild der Maske im Resist erzeugt wird (H). Nach einem erneuten Backschritt, der zur chemischen Stabilisierung des Resists dient, kann die strukturierte Resistschicht als Maskierung und somit als Schutz für den nachfolgenden Ätzprozess der Gold- und Titanschicht eingesetzt werden. Die Goldschicht wird mit Hilfe einer Iod-Kaliumiodid-Lösung und die Titanschicht mittels Flußsäure geätzt (I). Im Anschluss an den Ätzvorgang wird der Resist mit einem Lösemittel (Aceton) entfernt (J).

Zur elektrischen Isolation der Elektroden, Kontaktpads und Zuleitungen wird ganzflächig ein Schichtstapel aus einer alternierenden Oxid- und Nitridschicht (ONONO) mittels plasma-unterstützter chemischer Gasphasenabscheidung (*plasma enhanced chemical vapour deposition*, PECVD) abgeschieden (K). Anders als bei der physikalischen Gasphasenabscheidung, wozu beispielsweise das thermische Verdampfen zählt, findet bei den CVD-Prozessen eine chemische Reaktion der gasförmigen Ausgangsverbindung statt, wodurch sich die nichtflüchtigen Reaktionsprodukte auf dem Substrat niederschlagen. Um die Isolationsschicht an den Kontaktpads sowie an den Elektrodenflächen gezielt zu öffnen, wird ein zweiter Photolithographieschritt benötigt, welcher analog zum ersten durchgeführt wird (L, M). Das Isolatormaterial wird anschließend an den freigelegten Resistbereichen der Elektroden und Kontaktpads durch Ätzprozesse entfernt. Dafür wird zunächst das reaktive Ionenätzen mit einem Gasgemisch aus Tetrafluormethan und Sauerstoff verwendet. Um sicherzustellen, dass das Isolatormaterial auch um die Nanostrukturen effizient entfernt wird, schließt sich ein Ätzschritt mit Flußsäure an (N). Nach der Entfernung des Resists (O) ist der Herstellungsprozess auf WaferEbene beendet und die Chips können vereinzelt werden.

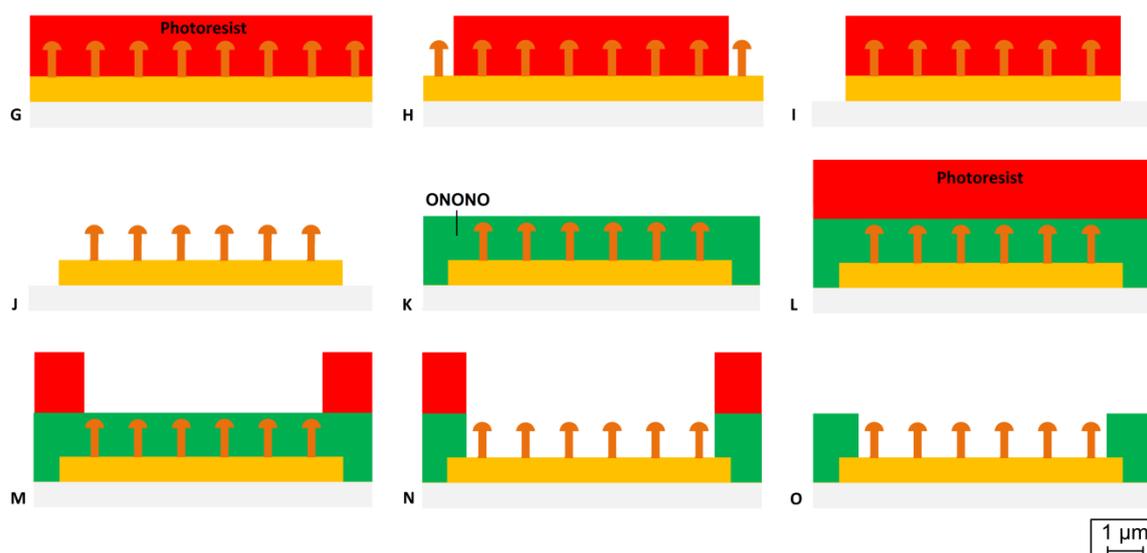


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung des Mikrostrukturierungsprozesses der MEA-Chips - als Fortsetzung zu Abbildung 5.3 (Erläuterungen siehe Text).

Das Vereinzeln der Chips erfolgt mittels Trennsägen. Zum Schutz der Strukturen vor Sägespänen während des Sägeprozesses wird der Wafer zuvor mit einem Schutzlack beschichtet und auf eine Adhäsionsfolie aufgeklebt, welche zur Fixierung der gesägten Chips dient. Nach dem Ablösen und Reinigen der Chips werden diese mittels Flip-Chip-Technik auf das Trägersubstrat aufgebracht. Bei der Flip-Chip-Technik werden alle elektrischen Verbindungen von Chip und Trägersubstrat gleichzeitig hergestellt. Hierfür wird eine leitfähige Silberpaste auf die Kontaktpads des PCBs gerakelt, der Chip kopfüber zu dem Trägersubstrat ausgerichtet aufgelegt und anschließend thermisch ausgehärtet. Zur elektrischen Isolation der

Kontaktstellen wird ein sogenannter Underfill verwendet, der über Kapillarkräfte in die Zwischenräume der Kontaktstellen fließt. Der Vorteil dieser Technik gegenüber dem separaten Chip- und Drahtbonden ist zum einen die Zeitersparnis aufgrund des gleichzeitigen Herstellens aller leitenden und physischen Verbindungen von Chip und Trägersubstrat. Zum anderen sind parasitäre Induktivitäten wesentlich geringer als bei einer Drahtverbindung¹⁷¹. Zuletzt werden die beiden Glasringe mittels PDMS auf den Chip montiert und der Raum zwischen den Ringen ebenfalls mit PDMS ausgefüllt. Letzteres soll eine Ausbildung von Senken im Zwischenraum der Glasringe verhindern und ein Kontakt der Zellkulturlösung mit dem bioinkompatiblen Material des PCBs vermeiden (**Abbildung 5.5**).

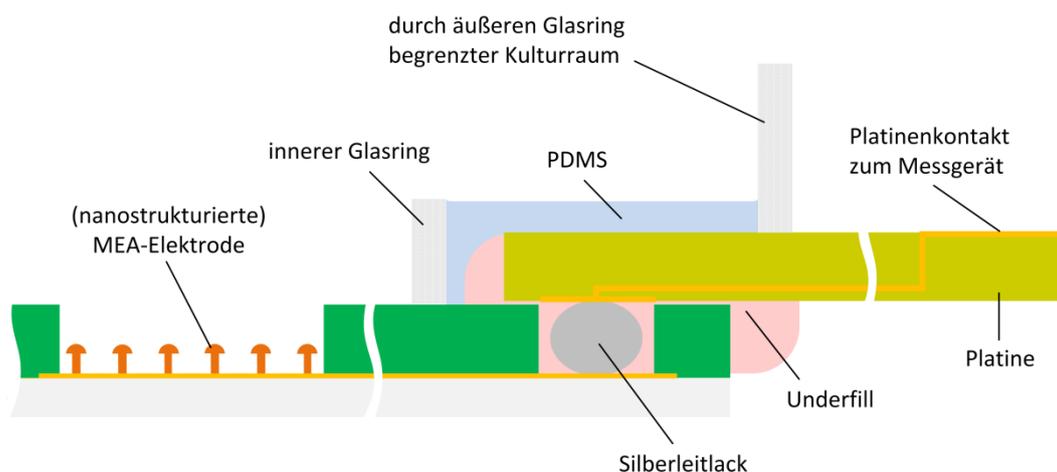


Abbildung 5.5: Schematischer Querschnitt eines fertig prozessierten Chips auf der Trägerplatine inklusive Glasringbegrenzung (adaptiert von Sørensen¹⁷²).

5.4 Auslegung der Mikro- und Nanostrukturen

Hinsichtlich der Auslegung der Mikrostrukturen sind vor allem die Größe und der Abstand der Mikroelektroden zueinander entscheidend. Die Größe der Elektroden bestimmt neben der Impedanz und Ortsauflösung auch die Wahrscheinlichkeit zur Detektion einer Zelle. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit der Detektion mit der Elektrodengröße. Der Abstand der Mikroelektroden kann hingegen das Einstreuen weiterer Signaleffekte benachbarter Elektroden beeinflussen. Ein solches elektrisches Übersprechen (*crosstalk*) findet insbesondere im Hochfrequenzbereich statt, welcher u.a. während der elektrochemischen Impedanzspektroskopie genutzt wird. Dieser Effekt kann mit größerem Elektrodenabstand minimiert werden. Zum Prozessieren der für diese Arbeit konzipierten MEAs werden zwei Masken benötigt. Auf der ersten Maske befinden sich die Mikroelektroden, die Zuleitungen und die Kontaktpads. Auf der zweiten Maske sind die Öffnungen für die Elektroden und Kontaktpads angeordnet. Insgesamt lassen sich 45 Chips pro 4''-Wafer herstellen, wobei jeder Chip eine Größe von 11x11 mm² hat und aus einem 8x8 Array, also insgesamt 64 Elektroden, besteht (**Abbildung 5.6**). Die Chips können mit einem Elektrodenabstand von entweder 100 µm oder

200 μm und einer Elektrodenfläche von entweder $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ (bzw. einem Kontaktlochdurchmesser von 20 μm) oder $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ (bzw. einem Kontaktlochdurchmesser von 30 μm) gefertigt werden, wodurch sich insgesamt vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von Elektrodenabstand und Elektrodengröße ergeben^{167–170}.

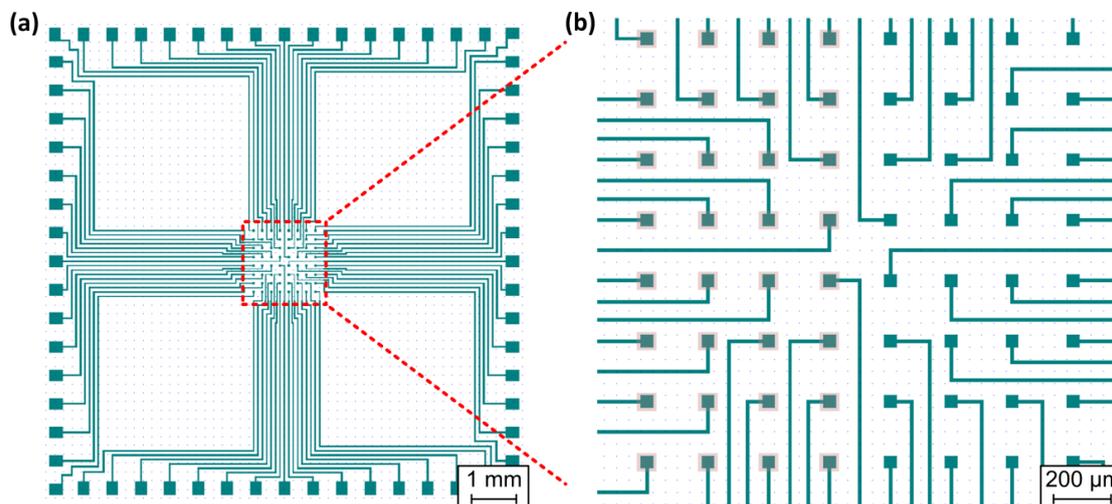


Abbildung 5.6: (a) Schematische Darstellung des MEA-Layouts inklusive Elektroden (Mitte), Zuleitungen und Kontaktpads (außen). (b) Elektrodenbereich: Die rot schraffierten Flächen kennzeichnen die nanostrukturierten Areale.

Bei der Wahl eines Layouts für die Nanostrukturen sind vor allem die Aspekte Strukturform, -durchmesser, -abstand und -höhe von zentraler Bedeutung. Bereits in Kapitel 4 ist der positive Einfluss von Pilzstrukturen im Mikrometermaßstab erläutert worden. Aus diesem Grund werden diese Pilzstrukturen auch im Nanometermaßstab realisiert und getestet. Als Grundform des Pilzes liegt zunächst eine Säule vor, die während der Goldgalvanik durch Überwachsen zu einer Pilzform transferiert wird. Daher wird als erste Grundstruktur die Säule auf der NIL-Maske implementiert. In der Literatur wird ebenso ein möglicherweise positiver Einfluss von Röhrenstrukturen auf die Zelladhäsion bzw. Zell-Elektroden-Kopplung beschrieben¹⁷³. Allerdings sind in der zitierten Arbeit Säulenstrukturen aus Gold mit Röhrenstrukturen aus Iridiumoxid verglichen worden, sodass nicht zweifelsfrei hervorgeht, ob die beobachtete Erhöhung der Signalamplitude aufgrund der Änderung des Materials oder der Form einhergeht. Um dies zu untersuchen, wird als zweite Grundstruktur die Röhre auf der Maske realisiert. Insbesondere werden überwachsene Röhrenstrukturen in der Anwendung getestet (**Abbildung 5.7 a**). Diese könnten, ähnlich wie die Pilzstrukturen, die Zelle zu phagozytotischem Verhalten animieren. Neben der Form der Nanostruktur ist auch der Durchmesser der Struktur Teil der Untersuchung. Bei den Säulen werden Strukturdurchmesser von 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 nm verwendet, bei den Röhren werden Außendurchmesser von 200, 300, 400, 500 und 600 nm eingesetzt. Da die Röhrenstrukturen eine Wandstärke von 50 nm aufweisen, ist die kleinste sinnvolle Struktur erst mit 200 nm anzusetzen. Die Höhe der Nano-

strukturen wird im Allgemeinen aufgrund des begrenzten Aspektverhältnisses von der kleinsten Struktur bestimmt. Da verschiedene Höhen der Nanostrukturen auf dem NIL-Master in der Regel nicht möglich sind, wird die Höhe der Nanostrukturen auf 150 nm festgesetzt. Zusätzlich werden auf der Maske zwei verschiedene Strukturabstände von 1 μm und 5 μm implementiert. Ein geringerer Strukturabstand als 1 μm ist nicht empfehlenswert, da die Zellen die Nanostrukturen dann nicht mehr als einzelne Strukturen, sondern lediglich als raue Oberfläche wahrnehmen. Dies würde zwar die effektive Oberfläche der Elektroden erhöhen, aber nicht zu Zell-Elektroden-Kopplung anregen¹⁶⁰. Weiter voneinander entfernte Nanostrukturen erschweren indes das Prozessieren, da diese unter dem Mikroskop nur äußerst schwierig zu lokalisieren sind. Neben den eigentlichen Nanostrukturen befinden sich auf dem NIL-Master auch Justagemarkierungen, um eine Ausrichtung der Mikrostrukturen an den Nanostrukturen während der Photolithographie zu ermöglichen.

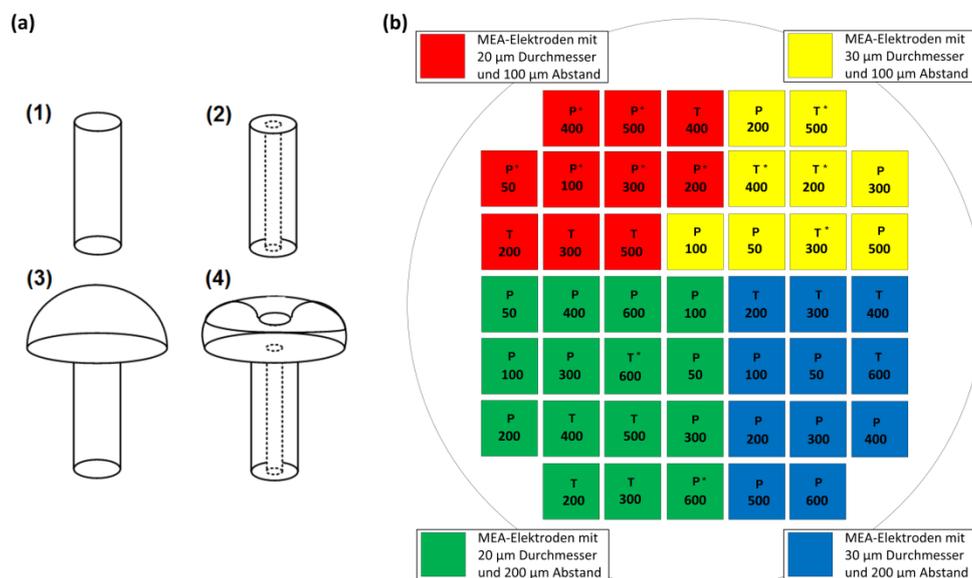


Abbildung 5.7: (a) Darstellung der vier verschiedenen Strukturformen: Säule (1), Röhre (2), überwachsene Säule (3) und überwachsene Röhre (4). (b) Layout der Nanostrukturen (P: Säule, T: Röhre, Zahl: Außendurchmesser in nm, *: Strukturfeld mit 500x500 μm^2 nanostrukturierter Fläche) und Mikrostrukturierung (siehe Farbkodierung).

Wie in Kapitel 2 gezeigt ist eine gleichmäßige Anordnung der Nanostrukturen auf dem NIL-Master sinnvoll. Allerdings steigt mit der Strukturichte auch der Preis für die Herstellung des Stempels an, weswegen abzuwägen ist, in welchen Bereichen eine Nanostrukturierung zweckmäßig ist. Da die Nanostrukturen nur auf den späteren Elektroden von Bedeutung sind, werden auch nur die Bereiche auf dem Master strukturiert, in denen sich später die Elektroden auf dem Wafer befinden. Um Justagefehler ausgleichen zu können bzw. Randeffekte auszuschließen, wird ein zusätzlicher Bereich von 10 μm bei der Strukturierung einberechnet. Bei insgesamt zwölf Chips werden zudem vergrößerte nanostrukturierte Flächen von

500x500 μm^2 implementiert. Diese Chips werden primär für Experimente zur Zelladhäsion eingesetzt, da die Wahrscheinlichkeit der Beobachtung von Kopplungseffekten bei größeren Nanostrukturfeldern ansteigt.

Die Vielzahl an Variationsmöglichkeiten bezüglich der Form, des Durchmessers und des Abstands der Nanostrukturen wird ebenfalls bei dem Layout des NIL-Masters berücksichtigt (**Abbildung 5.7 b**). Begründet durch die vier verschiedenen Möglichkeiten der Mikrostrukturierungen der Elektrodenabstände und -größen werden folgerichtig alle geplanten, verschiedenen Nanostrukturformen und -durchmesser in jedem der vier Bereiche abgebildet. Durch eine Gleichverteilung der Strukturen besteht zudem die Möglichkeit, im weiteren Verlauf eventuelle Prozessschwankungen zu erkennen bzw. auszuschließen.

Die Implementierung der beiden Nanostrukturabstände wird hingegen derart gelöst, dass sich pro MEA-Chip nicht nur ein 4x8 Array aus Nanostrukturen, sondern zwei solcher Arrays zueinander versetzt befinden (**Abbildung 5.8**). Die beiden Arrays beinhalten jeweils die gleiche Nanostruktur (Form und Durchmesser), unterscheiden sich jedoch in den jeweiligen Strukturabständen (1 bzw. 5 μm). Insgesamt werden somit doppelt so viele Nanostrukturen bei der NIL und anschließenden Goldgalvanik hergestellt, wie letztendlich benötigt werden. Während der ersten Photolithographie wird mit Hilfe der Justagemarkierungen eines der beiden 4x8 Arrays ausgewählt und zu den Mikroelektroden ausgerichtet. Die Strukturen des jeweils anderen werden nicht vom Photoresist geschützt und dadurch bei dem sich anschließenden Ätzvorgang entfernt.

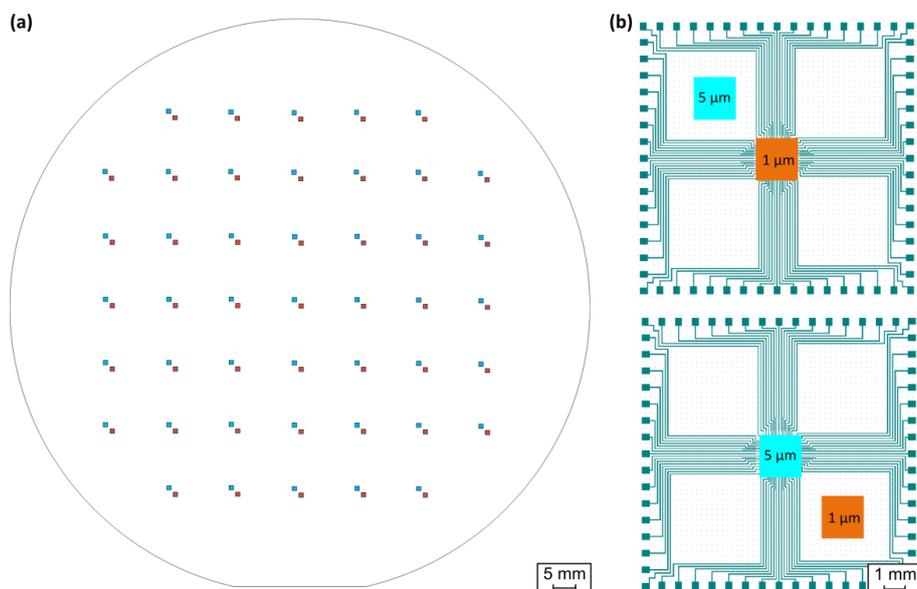


Abbildung 5.8: (a) Schematische Darstellung der Nanostrukturfelder auf dem NIL-Stempel. (b) Schematische Darstellung der Auswahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Nanostrukturabständen.

Zuletzt wird nochmal die zentrale Besonderheit des Layouts hervorgehoben: Im Laufe des Prozessierens werden nicht alle 8x8 Mikroelektroden eines Chips, sondern lediglich ein 4x8 großes Array mit Nanostrukturen modifiziert. Aufgrund der Tatsache, dass nur die Hälfte des Chips nanostrukturiert ist, lassen sich direkte Aussagen über den Einfluss der Nanostrukturen hinsichtlich der Performance des Chips bzw. der Zellsignalableitung tätigen. Gerade in nicht-industriellen Fertigungsprozessen treten prozess- und anlagenbedingte Schwankungen während der Produktion auf. Diese können sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit unterschiedlicher Wafer auswirken, aber auch die Homogenität der Strukturübertragung verschiedener Chips auf demselben Wafer negativ beeinflussen (Kapitel 6). Durch die Implementierung eines unstrukturierten Bereichs wird eine interne Kontrolle geschaffen, die eine Bewertung der Effizienz der Nanostrukturen zulässt, ohne einen zweiten Chip als Kontrolle verwenden zu müssen, der möglicherweise aufgrund von Schwankungen in der Homogenität der Mikrostrukturierung das Ergebnis beeinflussen könnte. Anhand der unstrukturierten Elektroden, die auf allen hergestellten Chips desselben Mikrostrukturlayouts gleich sind, lässt sich bei der elektrochemischen Charakterisierung (Kapitel 7) eine Aussage über insbesondere die Homogenität der (Mikro-)Strukturierung und die Reproduzierbarkeit der Chips treffen. Gerade bei zellbiologischen Experimenten (Kapitel 8) ist eine Vergleichbarkeit von Zellkulturen auf verschiedenen Chips schwierig, da die Qualität der Kultur von diversen Faktoren abhängt. Bei diesen Messreihen kann durch die Implementierung einer internen Kontrolle dem Problem ungleichmäßiger Zellkultivierung entgegengesteuert werden, was die Interpretierbarkeit der Messergebnisse steigert.

6 Prozessentwicklung zur Herstellung 3D-nanostrukturierter MEAs

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zur Prozessentwicklung nanostrukturierter MEA-Chips beschrieben sowie Methoden zur Überprüfung des Herstellungsprozesses präsentiert und diskutiert. Da ein Ziel dieser Arbeit die Herstellung der MEA-Chips auf Waferebene ist, muss im Besonderen auf die Homogenität der Teilprozesse sowie deren Reproduzierbarkeit Wert gelegt werden. Dies schließt beispielsweise das gleichmäßige Abscheiden bzw. Ätzen verschiedener Schichten sowie die Maßhaltigkeit der prozessierten Strukturen ein. Der Fokus liegt vor allem auf der Prozessentwicklung für die Herstellung der Nanostrukturen. Daher werden die Teilprozesse, die die Nanostrukturierung betreffen, also insbesondere die Nanoimprintlithographie und Goldgalvanik, ausführlicher dargestellt als die Ergebnisse der Mikrostrukturierung. Neben der Parameterentwicklung werden verschiedene Fehlerbilder diskutiert und Lösungen zur Fehlerbehebung bzw. -minimierung aufgezeigt.

6.1 Thermische Nanoimprintlithographie

Im folgenden Teilkapitel wird beschrieben, inwiefern sich die thermische Nanoimprintlithographie als Nanostrukturierungsmethode zum gleichzeitigen Prozessieren verschiedener Strukturformen, -durchmesser und -abstände auf Waferebene eignet. Dabei besteht die Schwierigkeit in der Strukturierung des NIL-Resists auf einer Edelmetalloberfläche. Bisweilen wird in der Literatur die NIL lediglich in Kombination mit einem sich anschließenden Lift-Off-Prozess als Nanostrukturierungsmethode verwendet^{174,175}. Herstellungsverfahren auf Grundlage eines direkten Imprints auf einer ganzflächig abgeschiedenen Goldoberfläche und eine sich anschließende elektrochemische Abscheidung in diese Vorstrukturen sind dagegen nicht bekannt.

6.1.1 Silanisierung des Siliziummasters

Zur besseren Entformbarkeit von Stempel (Master) und Substrat muss der Master vor Prozessbeginn silanisiert werden. Für die Silanisierung des Stempels wird dieser zunächst für 5 min bei 120 °C in Caro'scher Säure gereinigt und anschließend für eine Minute bei 300 W mittels Sauerstoffplasma aktiviert, wodurch eine hydrophile Oberfläche geschaffen wird. Die eigentliche Silanisierung findet im Exsikkator einer Glovebox statt. Nach mehrmaligem Fluten der Glovebox mit Stickstoff und anschließendem Einschleusen des Stempels in den Exsikkator werden etwa 100 µl des Silans (FOTCS) in eine Schale pipettiert. Direkt im Anschluss wird mit einer Pumpe ein Vakuum im Exsikkator erzeugt, wobei der Druck auf einen Wert von etwa 70 mbar absinkt. Innerhalb von etwa zwei Stunden verdampft das Silan und

schlägt sich als Kondensat auf dem Stempel nieder. Nach der Silanisierung wird der Stempel ausgeschleust und überschüssiges Silan mit deionisiertem Wasser (DI-Wasser) abgespült. Zur Überprüfung des Silanisierungsvorgangs wird der Kontaktwinkel des Masters vor und nach der Aktivierung sowie nach dem Silanisierungsprozess gemessen. Die Messung des Kontaktwinkels gibt Aufschluss über die Oberflächenspannung der gemessenen Substratoberfläche. Er ist ein Maß für die Benetzbarkeit, also ob eine Oberfläche hydrophile oder hydrophobe Eigenschaften hat. Der Kontaktwinkel θ ist dabei abhängig von den Grenzflächenspannungen zwischen der festen und gasförmigen Phase γ_{SG} , der festen und flüssigen Phase γ_{SL} sowie der flüssigen und gasförmigen Phase γ_{LG} und berechnet sich nach Young zu:¹⁷⁶

$$\cos(\theta) = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (6.1)$$

Für die Messung wird ein Tropfen DI-Wasser mit einem Volumen von ca. 4 μl als Testflüssigkeit verwendet, der direkt auf den Master appliziert wird. Mit dem Kontaktwinkelmessgerät wird nach korrekter Fokussierung und Einstellung der Kamera ein Bild des Tropfens aufgenommen, wobei mit Hilfe einer Software die Tropfenkontur auf der Oberfläche nachgezeichnet und so der Kontaktwinkel berechnet wird (**Abbildung 6.1**). Zur Bestimmung des Kontaktwinkels werden fünf Messungen an unterschiedlichen Stellen des Masters getätigt und der Mittelwert gebildet.

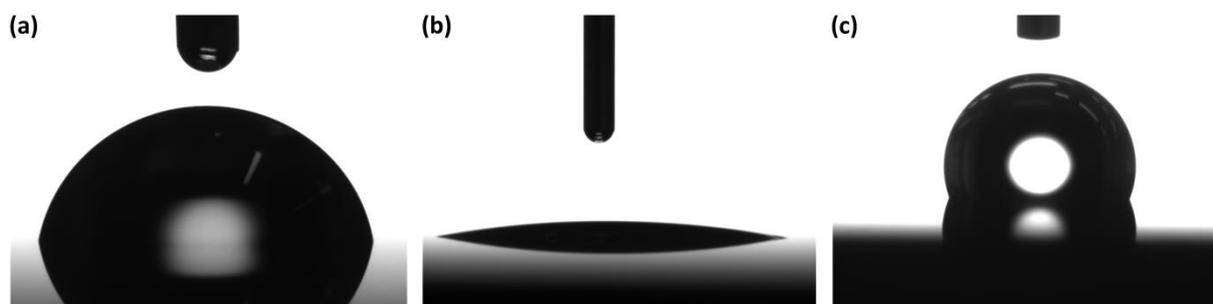


Abbildung 6.1: Vergleich der Kontaktwinkelmessungen (a) vor der Aktivierung, (b) nach der Aktivierung sowie (c) nach der Silanisierung des Si-Masters.

Durch die Plasmaaktivierung reduziert sich der Kontaktwinkel von anfänglich $80,2 \pm 1,3^\circ$ auf einen Kontaktwinkel von $9,8 \pm 0,5^\circ$, was einer starken Hydrophilisierung der Oberfläche infolge einer hohen Oberflächenenergie entspricht. Die Hydrophilisierung ist notwendig, damit sich das Kondensat gleichmäßig auf dem Wafer verteilen kann und die Haftung der Fluorsilanketten an der Siliziumoberfläche verbessert wird. Nach der Silanisierung beträgt der Kontaktwinkel $111,7 \pm 0,3^\circ$ und liegt somit im stark hydrophoben Bereich. Die geringe Standardabweichung lässt derweil auf eine sehr gleichmäßige Silanisierung über den gesamten Wafer schließen. Bei einer Silanisierung mit FOTCS laufen vereinfacht dargestellt folgende

Vorgänge ab: Durch die Reaktion der Si-O-Bindungen mit dem Wasser, welches sich in der Atmosphäre befindet, wird die Oberfläche hydroxiliert. Die Bindungen der Chloratome des Silans brechen auf und bilden Chlorwasserstoff. In Selbstorganisation bilden sich Si-O-Si-Bindungen zwischen den Silanmolekülen untereinander und der Oberfläche. Dabei lagern sich die Silanmoleküle infolge von Wasserstoffbrückenbindungen in einer Monolage an und binden kovalent an die Si-Bindungen der nativen SiO₂-Oberfläche. Infolge dessen entsteht eine unpolare Oberfläche, deren freie Energie im Vergleich zur nativen Oberfläche erniedrigt ist.

6.1.2 Herstellung eines Replikats des Siliziummasters

Zur Ausarbeitung geeigneter Prozessparameter sind erfahrungsgemäß viele Versuchsreihen notwendig. Um die empfindlichen Nanostrukturen des Masters zu schützen und diesen somit möglichst lange nutzen zu können, werden insgesamt drei unterschiedliche Möglichkeiten getestet, um ein Replikat des Masters herzustellen.

Replikation mittels metallischer Zwischenschicht

Die Idee der ersten Methode ist die Herstellung eines Siliziumreplikats mittels metallischer Zwischenschicht (Hartmaske) (**Abbildung 6.2**). Dabei wird auf einen Siliziumwafer zunächst der NIL-Resist aufgetragen (A). Danach werden die zu replizierenden Strukturen des Masters mittels NIL in den NIL-Resist übertragen und der *residual layer* mittels reaktiven Sauerstoffätzen geöffnet (B). Im Anschluss wird eine etwa 50 nm dünne metallische Zwischenschicht (z.B. Chrom oder Titan) aufgedampft, sodass sich das Material in die Vertiefungen der Nanostrukturen abscheidet (C). Das überschüssige Material, welches sich auf dem NIL-Resist befindet, kann im Anschluss daran mittels Lift-Off entfernt werden (D). Die hergestellte Hartmaske dient zum Schutz des Siliziums für den sich anschließenden Trockenätzprozess mittels reaktiven Ionenätzens mit SF₆, der das Silizium anisotrop ätzt (E). Nach dem Ätzvorgang wird die Hartmaske nasschemisch entfernt, sodass eine Replikation des Masters in positiver Orientierung der Nanostrukturen im Siliziumsubstrat erfolgt (F).

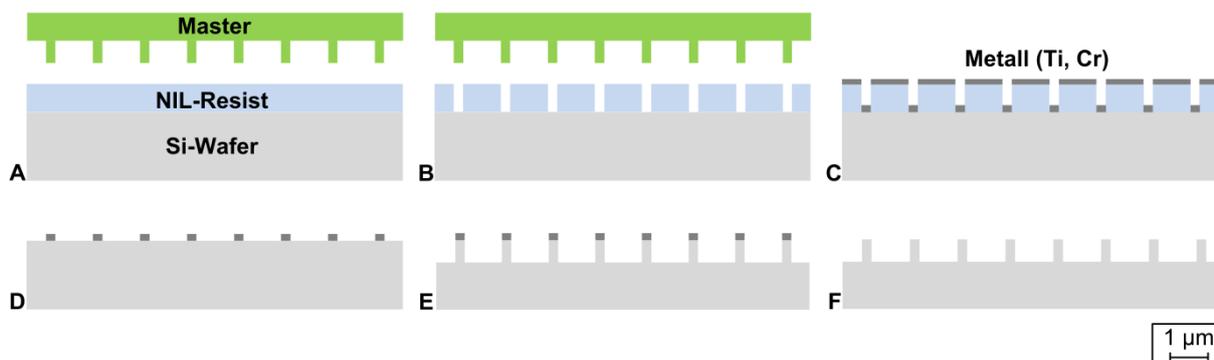


Abbildung 6.2: Prinzipskizze zur Herstellung eines Siliziumreplikats mittels Hartmaske.

Die Ergebnisse der Replikation mittels Hartmaske sind in **Abbildung 6.3** dargestellt. Die Strukturübertragung ist dabei nur in wenigen Fällen zufriedenstellend erfolgt. Häufig erfolgt kein Strukturübertrag bzw. die Übertragung ist stark fehlerbehaftet. Als eine Fehlerquelle ist die Durchlässigkeit des NIL-Resists bei Kontakt mit dem heißen Kondensat des aufgedampften Schichtmaterials zu nennen, wodurch das Metall teilweise durch die Maskierung abgeschieden wird. Um diesem Problem entgegenzusteuern kann entweder ein NIL-Resist mit einer höheren Glasübergangstemperatur, ein alternatives Material mit geringerer Verdampfungswärme oder eine andere Abscheidungsmethode eingesetzt werden. Zudem ist der NIL-Resist aufgrund der sich rechtwinklig ausbildenden Flanken nicht für einen Lift-Off-Prozess geeignet. Dies hat zur Folge, dass sich das Metall zum Teil auch an den Kanten und Seitenwänden des Resists abscheidet. Da das Lösemittel zum Entfernen des Resists diese Metallschicht nicht durchdringen kann und somit nicht an die Resistschicht gelangt, kann infolgedessen auch kein Lift-Off der Strukturen erfolgen. Dieses Problem kann mit einem Zweilagigen-Resist-System gelöst werden, wobei ein spezieller Lift-Off-Resist die untere und der NIL-Resist die obere Lage bilden. Bei diesem Verfahren werden die im NIL-Resist hergestellten Strukturen zunächst in den Lift-Off-Resist übertragen, der NIL-Resist selektiv entfernt und anschließend die metallische Zwischenschicht aufgebracht. Ein drittes Problem stellt der RIE-Prozess dar. Aufgrund des teilweisen isotropen Abtrags des Siliziums ist es nicht möglich, die Strukturtreue exakt zu gewährleisten, sodass Durchmesser und Form der replizierten Nanostruktur vom Original abweichen. Teilweise werden die Strukturen auch komplett durch den Ätzvorgang entfernt. Dieses Problem kann durch den Einsatz einer Tiefenätzung (*deep reactive ion etching*) gelöst werden. Da jedoch weder eine Tiefenätzanlage noch alternative Beschichtungsverfahren zu diesem Zeitpunkt verfügbar waren, ist diesbezüglich keine weitere Optimierung betrieben und eine zweite Replikationsmethode entwickelt worden.

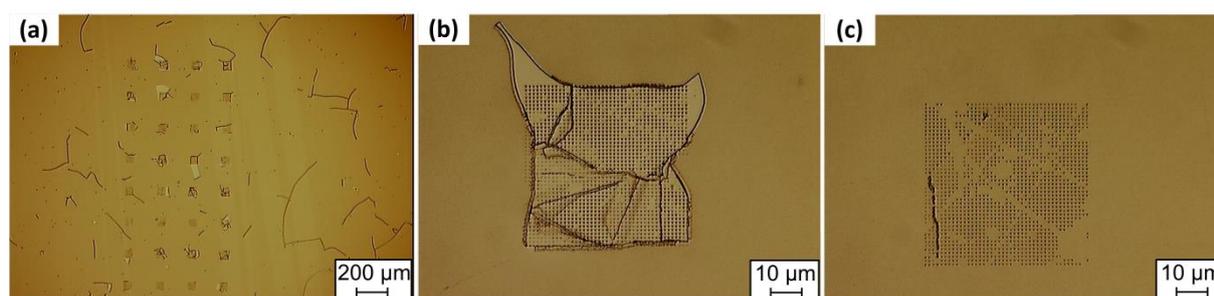


Abbildung 6.3: Fehlerbild bei dem Replikationsverfahren mittels Hartmaske: (a) Darstellung eines gesamten Strukturfelds mit (b) schlechter und (c) guter Strukturübertragung.

Replikation mittels IPS[®]-Folie und OrmoStamp[®]

Das zweite Verfahren besteht aus einer Kombination aus zwei unterschiedlichen Replikationsmethoden (**Abbildung 6.4**). Hierbei wird zunächst eine strukturierbare Polymerfolie, die sogenannte IPS[®]-Folie (*intermediate polymer stamp*), verwendet, die einen direkten Imprint

in die Folie (ohne Resist) erlaubt (A). Da der resultierende Imprint jedoch die invertierte Polarität der Nanostrukturen aufweist, muss ein zweites Verfahren angewendet werden, um die ursprüngliche Polarität wieder herzustellen. Bei dem sogenannten OrmoStamp[®]-Verfahren wird zunächst ein zähflüssiger Tropfen eines UV-aushärtbaren Polymers (OrmoStamp[®]) auf die silanisierte und zu replizierende Struktur (Master oder in diesem Fall die IPS[®]-Folie) gegeben und ein lichtdurchlässiges Substrat (Glaswafer) auf den Tropfen gelegt (B). Durch die Kapillarkräfte und das Gewicht des Substrats fließt das flüssige Polymer gleichmäßig in die Kavitäten des Stempels bzw. der IPS[®]-Folie, wobei überschüssiges Polymer am Rand austritt. Unter Zuhilfenahme einer UV-Lichtquelle wird der OrmoStamp[®] bestrahlt und eine Quervernetzung der Polymerketten wird initiiert (C). Nach dem Vernetzen und dem sich anschließenden Hardbake, der zur Erhöhung der chemischen und thermischen Stabilität des Polymers eingesetzt wird, kann die ursprüngliche Form abgelöst werden und das ausgehärtete Polymer bleibt auf dem Glassubstrat zurück (D).

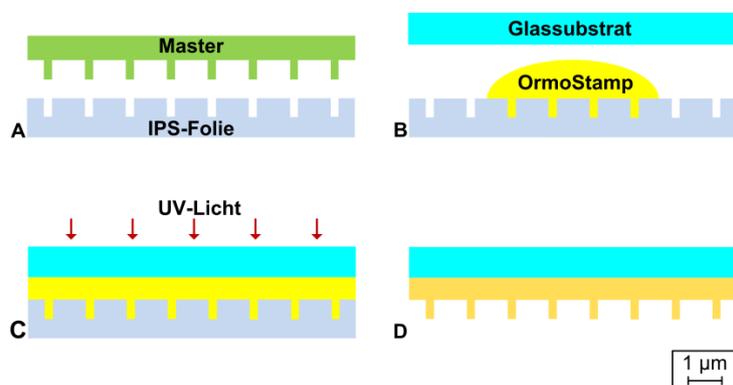


Abbildung 6.4: Prinzipskizze zur Herstellung eines Polymerreplikats mittels IPS[®]-Folie und OrmoStamp[®]-Verfahren (adaptiert von micro resist technology¹⁷⁷).

Die eingesetzte Polymerfolie hat den Vorteil, dass sie sich aufgrund ihrer Verformbarkeit an die Nanostrukturen des Masters anpassen kann und dadurch eine nahezu defektfreie Übertragung der Nanostrukturen möglich ist. Durch die Flexibilität der IPS[®]-Folie ist sie auch beim OrmoStamp[®]-Prozess von Vorteil, wodurch sich eine nahezu blasenfreie Übertragung der Nanostrukturen bei sehr guter Strukturtreue ergibt (siehe auch Abschnitt zur Bewertung der Maßhaltigkeit der Replikat). Allerdings kann beim Entfernen der IPS-Folie ein teilweiser Abriss der Strukturen im Randbereich erfolgen (**Abbildung 6.5 a**). Da die nanostrukturierten Flächen in der Breite eine Toleranz von 10 µm aufweisen, stellt ein Abriss der Strukturen im Randbereich ein tolerierbarer Defekt dar, da diese Randstrukturen keinen Einfluss auf das Endergebnis der nanostrukturierten MEAs haben. Ein gravierendes und letztendlich nicht zu lösendes Problem dieser Methode hat sich hingegen erst im weiteren Prozessverlauf gezeigt: Beim Versuch des Alignments eines mit dem Replikat hergestellten Substrats und der Chrommaske des ersten Photolithographieschritts ist ein Versatz der Strukturen von mehreren 10 µm zu den Strukturen des benachbarten Chips zu verzeichnen (**Abbildung 6.5 b**). Die Ur-

sache dieses Versatzes liegt in der IPS[®]-Folie begründet, welche sich nach dem NIL-Prozess infolge der Replikation der Masterstrukturen durch die angelegte Temperatur und den angelegten Druck um mehrere 100 μm verzieht. Dieser Verzug kann auch nicht durch eine Optimierung der Prozessparameter vermieden werden. Da somit ein Alignment auf die Folgemasken unmöglich ist, kann auch dieses Replikationsverfahren nicht für diese Anwendung eingesetzt werden.

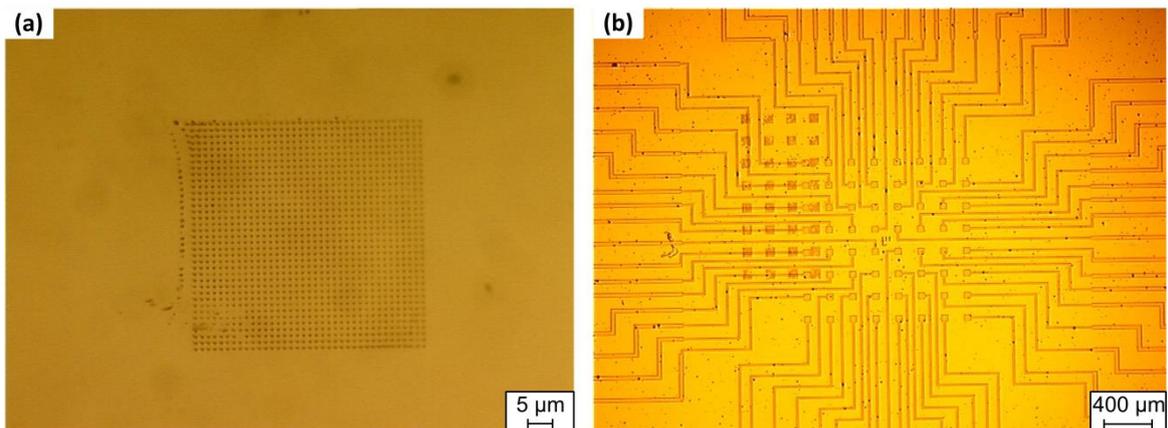


Abbildung 6.5: Fehlerbilder bei dem Replikationsverfahren mittels IPS[®]-Folie und OrmoStamp[®]: (a) Teilweiser Abriss der Nanostrukturen im Randbereich und (b) Versatz der Strukturfelder aufgrund eines intrinsischen Verzugs der Folie.

Replikation mittels doppeltem OrmoStamp[®]-Verfahren

Bei dem letzten Verfahren wird die Methode der OrmoStamp[®]-Replikation zweimal nacheinander eingesetzt (**Abbildung 6.6**). Dabei wird die oben beschriebene Methode zunächst auf dem Master selbst angewendet (A-C) und nach der Silanisierung des Replikats wiederholt, um die korrekte Polarität der Nanostrukturen herzustellen (D-F).

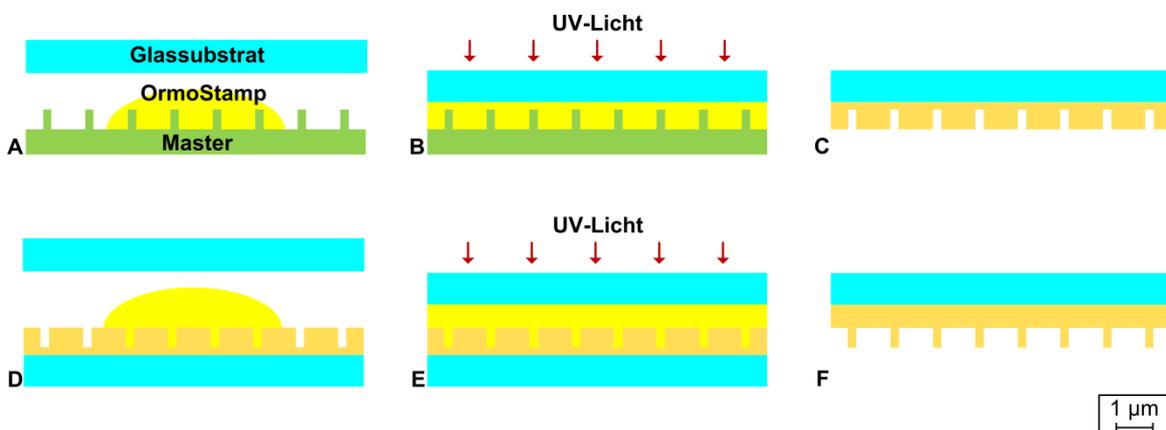


Abbildung 6.6: Prinzipskizze zur Herstellung eines Polymerreplikats mittels zweifachem OrmoStamp[®]-Verfahren (adaptiert von micro resist technology¹⁷⁷).

Im Vergleich zum Replikationsverfahren mit der IPS[®]-Folie ergibt sich eine verstärkte Blasenbildung, da zwei starre Materialien für das gleichmäßige Verteilen des flüssigen Polymers verantwortlich sind (**Abbildung 6.7**). Diese Blasen sind aber nur dann hinderlich für den Prozess, wenn sie sich direkt auf den nanostrukturierten Bereichen befinden. Im Vergleich zum IPS[®]-OrmoStamp[®]-Replikate sind weder abgerissene Strukturen noch ein Versatz erkennbar. Auch die Strukturtreue und Maßhaltigkeit bleibt im Vergleich zum Master erhalten (siehe auch Abschnitt zur Bewertung der Maßhaltigkeit der Replikate). Da nur wenige Strukturbereiche von Blasen überlagert werden, können die hergestellten Replikate für die Parameterausarbeitung verwendet werden.

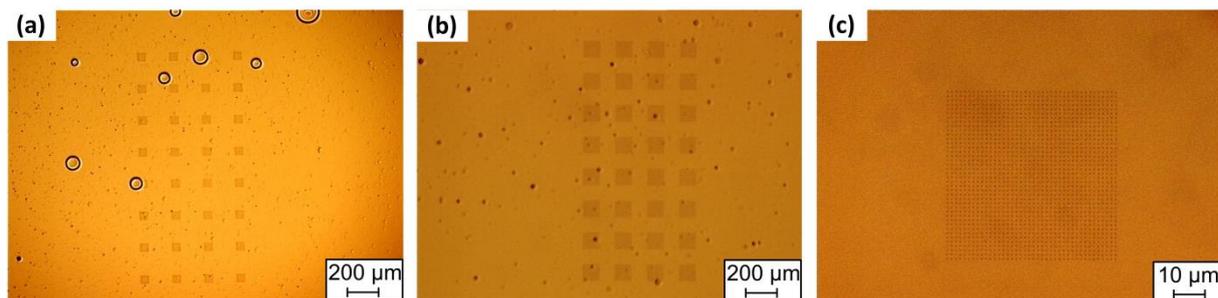


Abbildung 6.7: (a) Fehlerbild bei dem Replikationsverfahren mittels doppeltem OrmoStamp[®]-Verfahren zeigt eine vermehrte Blasenbildung. Der Großteil des (b) gesamten Arrays sowie (c) des einzelnen Strukturfelds sind jedoch meist defektarm.

Bewertung der Maßhaltigkeit der Replikate

Um die Replikate neben ihrer Oberflächenbeschaffenheit auch auf Maßhaltigkeit zu bewerten, werden die Strukturhöhe und der Strukturdurchmesser in insgesamt fünf verschiedenen Strukturfeldern mittels Rasterkraftmikroskop (AFM) bestimmt. In jedem Strukturfeld werden insgesamt sechs Messungen vorgenommen und der Mittelwert gebildet. Die Messungen erfolgen sowohl am Master als auch an den Replikaten und werden mit den Soll-Werten verglichen (**Abbildung 6.8**). Aufgrund der sehr schlechten Strukturübertragung ist eine Messung bzw. Bewertung der Maßhaltigkeit bei dem Hartmaskenreplikate nicht möglich.

Bei der Auswertung zeigt sich, dass die gemessenen Werte beim Master sehr gut mit den Soll-Werten übereinstimmen. Bei der Betrachtung des IPS[®]-OrmoStamp[®]-Replikats wird festgestellt, dass die Höhe der Strukturen im Mittel zwischen 1 und 11 nm kleiner sind als die des Masters. Der Durchmesser reduziert sich ebenfalls, wobei die Abnahme im Mittel zwischen 10 und 27 nm liegt. Eine Abnahme der gemessenen Höhe und des Durchmessers findet sich auch bei dem zweifachen OrmoStamp[®]-Replikate wieder. Die Reduzierung in der Höhe liegt im Mittel zwischen 10 und 17 nm und die im Durchmesser zwischen 2 und 46 nm.

Im Allgemeinen liegt eine geringere Schrumpfung in der Höhe als in der Breite der Strukturen vor. Dies kann damit begründet werden, dass die Minimierung in der Höhe eindimensional, in

der Breite hingegen zweidimensional stattfindet. Das Schrumpfen der Strukturen ist beim zweifachen OrmoStamp[®]-Replikant stärker ausgeprägt als beim IPS[®]-OrmoStamp[®]-Replikant, sodass als Ursache der Schrumpfung in erster Linie das OrmoStamp[®]-Polymer angesehen werden kann. Durch die UV-Bestrahlung initiierte Quervernetzung der Polymerketten und dem sich anschließenden Hardbake verringert sich das Volumen des Polymers, was den Strukturschwund verursacht. Zur Evaluierung der Prozessparameter ist diese geringe Abweichung in den Abmessungen der Nanostrukturen im Vergleich zu den Strukturen des Masters allerdings nicht relevant, sodass das Replikant, welches mittels doppeltem OrmoStamp[®]-Verfahren hergestellt wird, uneingeschränkt genutzt werden kann.

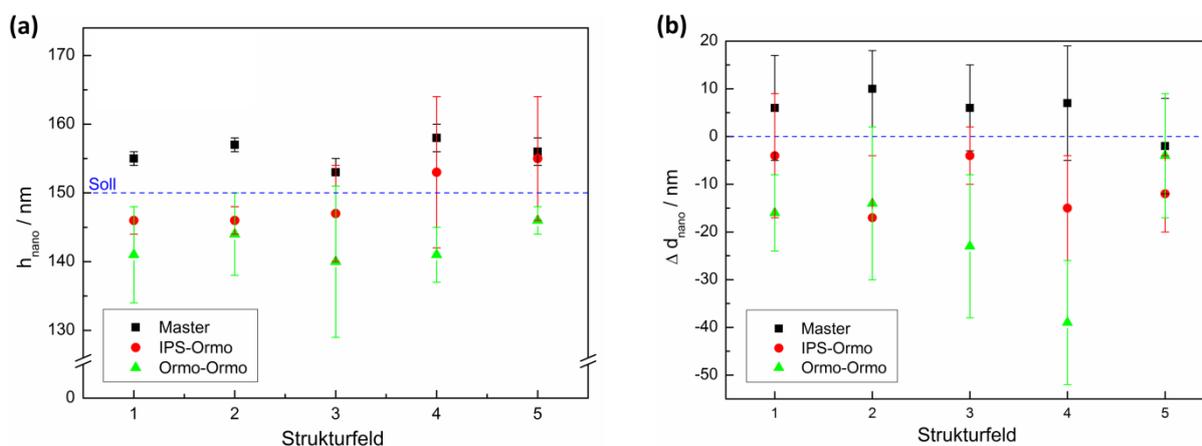


Abbildung 6.8: Vergleich der (a) Strukturhöhe h_{nano} und der (b) Abweichung des Durchmessers der Nanostrukturen Δd_{nano} vom Sollwert verschiedener Strukturfelder von Master und den hergestellten Replikaten ($n=6$).

6.1.3 Evaluierung geeigneter NIL-Prozessparameter

Die Ausarbeitung der NIL-Prozessparameter unterteilt sich in den Spincoating-Prozess, die eigentliche Nanoimprintlithographie und das reaktive Ionenätzen. Alle drei Teilprozesse müssen optimiert werden, damit die Nanostrukturen im Resist als Templat für die nachfolgende elektrochemische Abscheidung genutzt werden können. Eine gleichmäßige Verteilung des Resists ist wichtig, damit während der NIL eine homogene Druckverteilung, ein ebenso homogenes Fließen des Resists und ein adäquates Füllen der Stempelstrukturen gewährleistet ist (siehe Kapitel 2). Die Entfernung des *residual layers* mittels RIE darf hingegen die erzeugten Nanostrukturen in ihren Abmessungen nicht wesentlich beeinflussen.

Spincoating

Als NIL-Lack wird der thermische Resist mR-8020R (micro resist technology) eingesetzt, der Lackdicken im Bereich von 200 nm ermöglicht und eine Glasübergangstemperatur von 105 °C besitzt. Eine ausreichend hohe Glasübergangstemperatur ist insofern von Bedeutung,

da die elektrochemische Abscheidung bei einer Temperatur von ca. 60 °C durchgeführt wird und ein erneutes Erweichen der Resiststrukturen vermieden werden muss. Zur Minimierung des Partikeleinflusses wird der Resist mittels einer Spritze durch einen Filter mittig auf den Wafer appliziert. Da die Dicke der Resistschicht primär von der Viskosität des Resists und der Umdrehungsgeschwindigkeit des Belackers abhängt, werden verschiedene Rotationsgeschwindigkeiten bei einer konstanten Rotationszeit von 30 s getestet. Nach einem anschließenden einminütigen Backschritt bei 100 °C, bei dem der Großteil des sich im Resist befindlichen Lösemittels verdampft, wird sowohl die Schichtqualität unter dem Mikroskop beurteilt (**Abbildung 6.9**) als auch die Schichtdicke des Lacks an insgesamt fünf Stellen auf dem Wafer mittels Weißlichtinterferometer (*film thickness probe*, FTP) bestimmt. Bei der FTP-Messung wird die Probe mit weißem Licht bestrahlt. Die an den Grenzflächen von Schicht und Substrat reflektierten Strahlenteile interferieren und werden in einem Detektor analysiert. In Abhängigkeit der optischen Eigenschaften wie Brechungsindex und Absorptionskoeffizient von Schicht und Substrat wird mit Hilfe einer Spektralanalyse die Schichtdicke ermittelt.

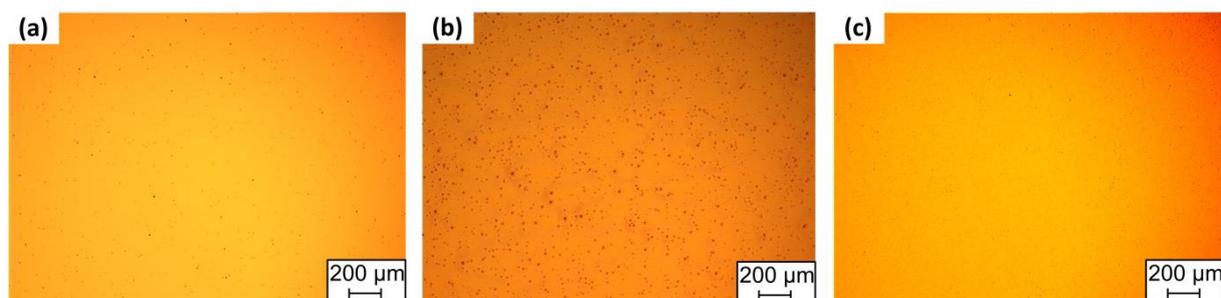


Abbildung 6.9: Vergleich der Partikelbelastung der Goldoberfläche des Wafers (a) ohne Resist, nach Auftragen des Resists (b) ohne Filter und (c) mit Filter.

Anhand einer Schleuderkurve wird die optimale Umdrehungszahl zu 1000 U/min bestimmt. Bei den im Prozessverlauf prozessierten Wafern ($n=20$) ergibt sich im Mittel eine Schichtdicke von $207,0 \pm 4,7$ nm, was einer ausgezeichneten Schichtdickenhomogenität und sehr guten Reproduzierbarkeit entspricht und die Grundlage für einen homogenen Transfer der Nanostrukturen bildet.

Nanoimprintlithographie

Um den Master, der zur Herstellung nanostrukturierter MEAs eingesetzt wird, vor Verschleiß zu schützen, wird zur Evaluierung geeigneter Prozessparameter das vier Zoll große OrmoStamp[®]-Replikat sowie ein zwei Zoll großer Teststempel aus Silizium, auf dem sich Areale mit 300 nm breiten Mäanderstrukturen befinden, verwendet. Wie in Kapitel 2 erläutert, wirken sich insbesondere die Temperatur, der Druck und die Zeit auf das Ergebnis einer gleichmäßigen Strukturübertragung aus. Laut Herstellerangaben soll während des Imprints eine Temperatur zwischen 150 und 190 °C und ein Druck zwischen 20 und 40 bar eingesetzt

werden. Die Zeit bei maximalem Druck und Temperatur soll zwischen 1 und 4 min und die Entformungstemperatur zwischen 85 und 105 °C liegen. Im Folgenden werden insbesondere die Auswirkungen von Druck und Temperaturänderungen überprüft, wobei die Zeit und Entformungstemperatur konstant bei 4 min bzw. 95 °C gehalten werden. Als Substrate werden sowohl Siliziumwafer als auch mit Titan und Gold bedampfte Glaswafer (im Folgenden Goldwafer genannt) mit einem Durchmesser von jeweils vier Zoll verwendet.

Zunächst wird der Effekt der Druckvariation bei einer konstanten Temperatur von 180 °C untersucht. Der Druck wird dabei im Intervallfenster von 20 bis 40 bar in jeweils 10 bar-Schritten erhöht und das Ergebnis der Nanostrukturübertragung mittels optischen Mikroskops beobachtet. Bei den eingesetzten Drücken kann kein Unterschied hinsichtlich der Strukturübertragung festgestellt werden. Allerdings wird bei Verwendung eines Drucks von 40 bar das Substrat vereinzelt beschädigt. Da der Stempel ebenfalls Gefahr läuft im höheren Drucksegment zu zerbrechen, wird ein Maximaldruck von 30 bar festgelegt.

Als nächstes wird der Temperatureinfluss bei einem konstanten Druck von 20 bar überprüft. Die Temperatur wird in 10 °C-Schritten von 160 auf 190 °C erhöht. In diesem Zusammenhang wird festgestellt, dass sich mit steigender Temperatur die Strukturtreue verbessert (**Abbildung 6.10**): Bei einer Temperatur von 160 °C sind die herzustellenden Mäanderstrukturen lediglich im Ansatz zu erkennen. Durch die stetige Erhöhung der Temperatur auf 190 °C kann das Imprintergebnis kontinuierlich verbessert werden.

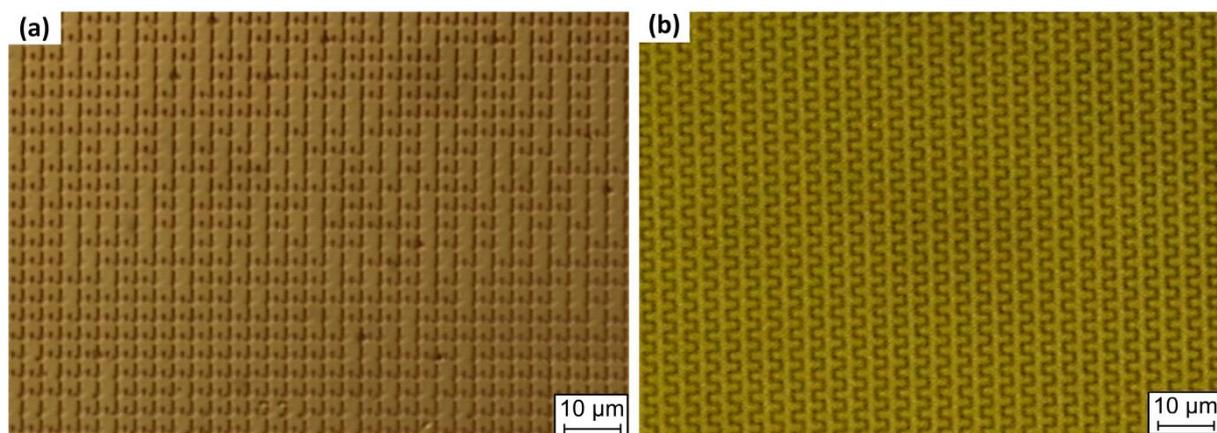


Abbildung 6.10: Vergleich der Mäanderstrukturen nach einem Imprint mit dem Teststempel bei einem Druck von 20 bar, einer Zeit von 4 min und einer Temperatur von (a) 160 °C und (b) 190 °C.

Die nur bedingt erfolgreiche Strukturübertragung bei geringen Temperaturen lässt sich mit der höheren Viskosität ($\eta_0 \sim \exp(\text{const}/T)$) des Resists erklären, wodurch der Resist die Nanostrukturen nicht adäquat ausfüllt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Temperaturveränderung einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Fließverhalten des Resists und damit die Qualität der Strukturübertragung hat, als eine Variation des Drucks.

Bei der makroskopischen Betrachtung des Wafers ist allerdings zu erkennen, dass sich Unebenheiten im Resist ausbilden, die umso stärker sind, je höher die Temperatur beim Imprint ist (**Abbildung 6.11**). Aufgrund der durch die hohen Temperaturen bedingten Verringerung der Viskosität tritt eine lokale Ausdünnung des Resists ein. Dem Ausdünnen kann auch nicht durch das Anpassen der anderen Prozessparameter wie Zeit, Druck, Abkühlrate oder Entformungstemperatur entgegengewirkt werden. Zwar haben diese ausgedünnten Bereiche im vorliegenden Fall keine Auswirkung auf die zu übertragene Nanostrukturen, allerdings treten Probleme bei den Folgeprozessen auf: Resultierend aus dem Ätzprozess zur Entfernung der *residual layers* ergeben sich lokale Öffnungen der Maskierungsschicht, in denen sich während der Galvanik ungewollt Material abscheidet, was wiederum die Abscheidung in die Nanostrukturen erschwert. Aus diesem Grund muss ein Temperaturbereich gefunden werden, bei dem einerseits die Nanostrukturen adäquat in den Resist übertragen werden und andererseits die Maskierung im restlichen Bereich erhalten bleibt. Eine Temperaturerniedrigung kann dabei zum einen durch die Erhöhung des Drucks oder durch eine Erhöhung der Imprintzeit kompensiert werden (Gleichung 2.1). In diesem Zusammenhang werden die besten Ergebnisse bei einem Druck von 30 bar, einer Temperatur von 170 °C und einer Zeit von 10 min ermittelt.

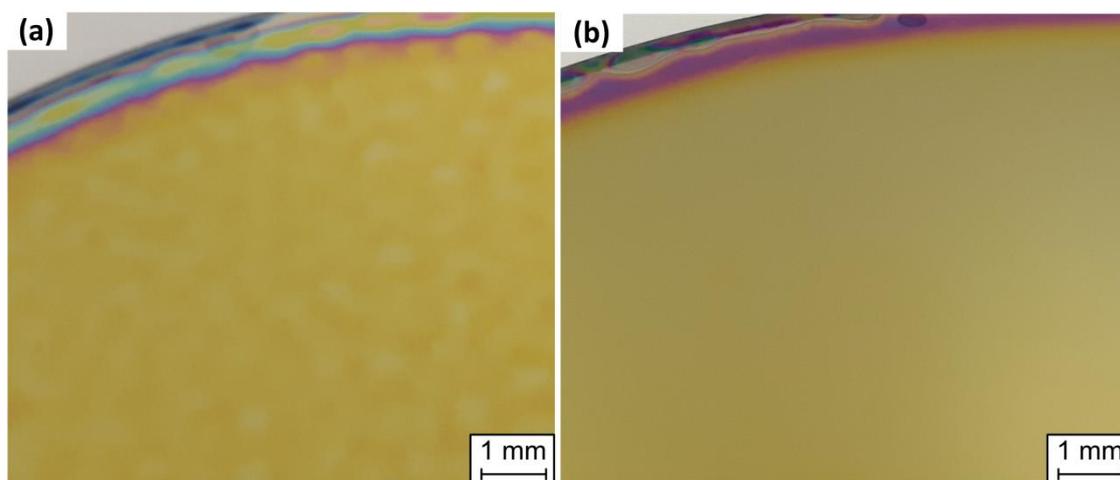


Abbildung 6.11: Vergleich der Waferoberfläche nach einem Imprint bei einer Temperatur von (a) 190 °C und (b) 160 °C.

Reaktives Ionenätzen

Um die elektrochemische Abscheidung des Golds durchführen zu können, muss der *residual layer* entfernt werden. Bei einer durchschnittlichen Lackdicke von 207 nm und einer strukturierten Gesamtfläche von ca. 0,4 mm² ergibt sich nach Gleichung 2.2 eine Dicke des *residual layers* von ca. 57 nm. Zur Entfernung des *residual layers* wird reaktives Ionenätzen mit Sauerstoff eingesetzt. Bei diesem Prozess sind vor allem die Parameter Gasfluss, Kammerdruck, Generatorleistung und Ätzzeit von Bedeutung, wobei die drei Erstgenannten maßgeb-

lich das Ätzprofil, die Zeit hingegen die Ätztiefe beeinflussen. Mit der Annahme, dass die Dicke des *residual layers* genauso schnell abnimmt wie die Schicht in den umgebenden Bereichen, kann mit einer Messung der Resistschichtdicke die Ätzrate bestimmt werden. Die Messung der Schichtdicke wird erneut mit dem FTP an fünf verschiedenen Stellen des Wafers durchgeführt. Die Veränderung der Strukturen in lateraler Richtung wird hingegen mit dem AFM untersucht, indem die Breite der Strukturen vor und nach dem reaktiven Ionenätzen gemessen wird. Untersucht werden fünf Strukturfelder des Wafers, in denen jeweils sechs Strukturen vermessen werden. Zur zusätzlichen Kontrolle wird das Rasterelektronenmikroskop (REM) verwendet (**Abbildung 6.12 a**).

Bei den anfänglich gewählten Parametern von einem Gasfluss von 20 sccm, einer Leistung von 50 W und einem Druck von 13,3 Pa wird der *residual layer* innerhalb von 45 s entfernt. Die mittlere entfernte Lackschichtdicke beträgt hierbei etwa $57,2 \pm 3,1$ nm, was einer sehr guten Homogenität über den gesamten Wafer entspricht. Die Messung der Strukturbreite ergibt eine durchschnittliche Unterätzung von $42,5 \pm 2,8$ nm, was demnach etwa 77 % der entfernten Dicke in lateraler Richtung entspricht. Anhand dieser Daten kann die Ätzung als verstärkt isotrop bezeichnet werden, wodurch die Maßhaltigkeit der Strukturen nicht mehr gegeben ist (**Abbildung 6.12 b**).

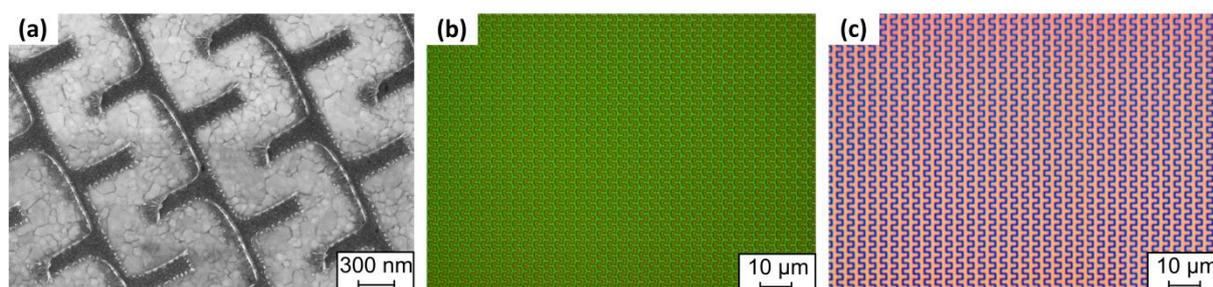


Abbildung 6.12: (a) Die REM-Aufnahme zeigt die nach dem RIE Prozess geöffneten Strukturen zur Galvanikstartschicht. Vergleich der Nanostrukturübertragung bei unterschiedlichen RIE-Parametern zeigen (b) eine überwiegend isotrope und (c) überwiegend anisotrope Ätzung.

Die Parameter müssen dahingehend optimiert werden, dass die zu ätzende Schicht größtenteils durch Sputterprozesse anisotrop abgetragen wird und so die Strukturverbreiterung auf ein Minimum begrenzt wird. Dazu werden die Leistung und der Gasfluss schrittweise auf 100 W bzw. 30 sccm erhöht und der Kammerdruck wird sukzessive auf 1,33 Pa gesenkt. Mit diesen optimierten Parametern kann innerhalb von 33 s eine homogene Entfernung des Lacks mit $58,1 \pm 4,1$ nm erzielt werden (**Abbildung 6.13**). Die Messung der lateralen Unterätzung ergibt einen Wert von $5,8 \pm 0,9$ nm, was etwa 10 % der vertikalen Ätzrate entspricht. Das aus den optimierten Prozessparametern resultierende Ätzprofil ist im Vergleich zu dem ursprünglichen Ätzprofil deutlich anisotroper (**Abbildung 6.12 c**). Erneut wird anhand der geringen

Standardabweichung eine gute Homogenität auf Waferebene und aufgrund der nur geringen Schwankungen bei den während der kompletten Versuchsreihe hergestellten Wafern eine gute Reproduzierbarkeit konstatiert. Die Verbesserung der Anisotropie ergibt sich demnach durch die Parameteränderung des Ätzvorgangs: Eine Erhöhung der Leistung bewirkt dabei eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Sauerstoffionen, die auf das Substrat auftreffen und damit eine Erhöhung der kinetischen Energie, die zum Herausschlagen der Substratome benötigt wird, sodass diese für einen verstärkt physikalischen Abtrag sorgen. Die Erhöhung des Gasflusses bewirkt derweil einen stetigen Nachschub an Sauerstoffionen und gleichzeitigen Abtransport der herausgeschlagenen Resistionen. Dadurch wird der Anteil an chemischen Reaktionen minimiert. Ein Herabsetzen des Kammerdrucks erhöht indes die mittlere freie Weglänge der Ionen, sodass Stoßprozesse der Ionen untereinander verringert bzw. vermieden können und somit die Ionen senkrecht auf das Substrat auftreffen. Beim Vergleich der Schichtdicken vor und nach dem Imprint ist hervorzuheben, dass sich der Imprint selbst nicht auf die Schichtdicke des Lacks auswirkt. Weiterhin ist kein Unterschied im Imprintverhalten bei Verwendung unterschiedlicher Substratmaterialien (Glas oder Silizium) erkennbar.

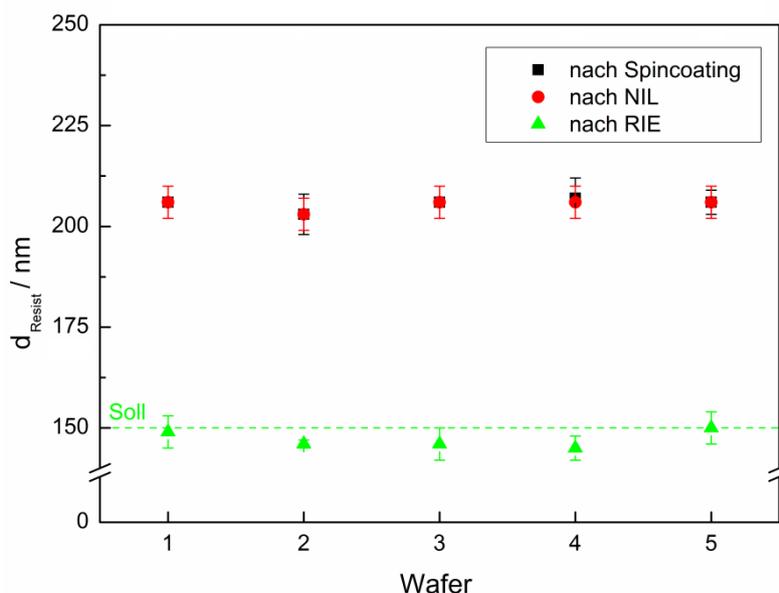


Abbildung 6.13: Vergleich der Resistschichtdicken d_{Resist} der prozessierten Wafer nach verschiedenen Prozessschritten ($n=5$).

6.1.4 Einsatz des Masters zur Strukturübertragung

Nachdem die Parameter für eine gleichmäßige und maßhaltige Übertragung der Nanostrukturen ermittelt sind, wird für eine defektarme Übertragung der Master anstelle des Replikats eingesetzt. Dabei werden die im vorherigen Kapitel beschriebenen, optimierten Parameter verwendet. **Abbildung 6.14** zeigt einen Vergleich der Ergebnisse für den Strukturübertrag mittels Replikat und Master auf einem Silizium- respektive Goldwafer: Bei Verwendung des

Masters als Stempel und eines Siliziumwafers als Substrat sowie beim Einsatz des OrmoStamp®-Replikats als Stempel und einem Goldwafer als Substrat erfolgt eine nahezu defektfreie Übertragung der Nanostrukturen in den Resist. Wird hingegen der Master als Stempel und ein Goldwafer als Substrat eingesetzt, findet keine Übertragung der Nanostrukturen statt.

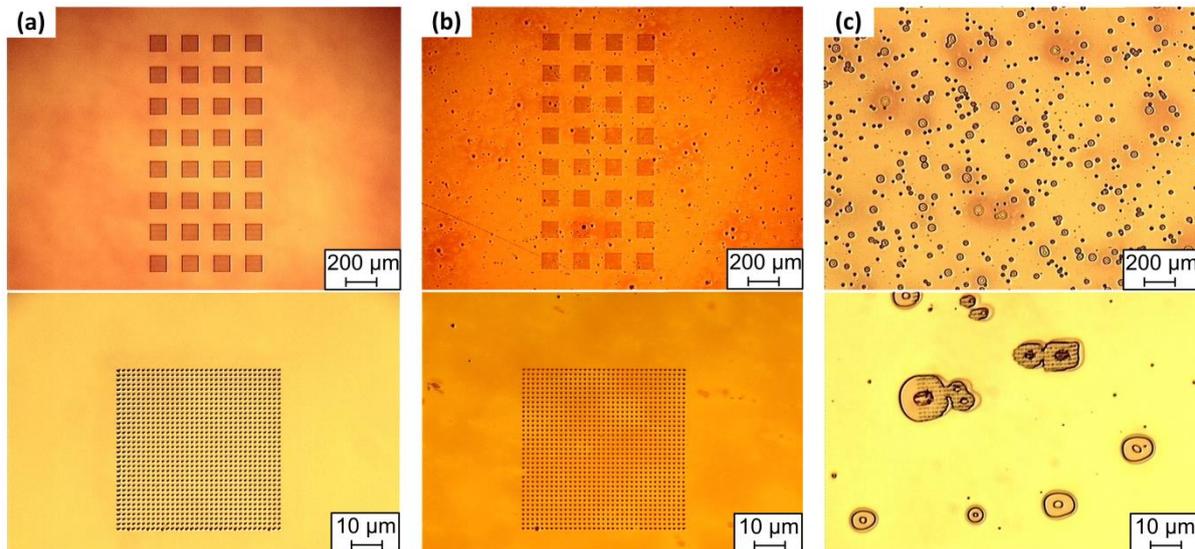


Abbildung 6.14: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei der Kombination aus (a) Master und Siliziumwafer, (b) OrmoStamp®-Replikat und Goldwafer und (c) Master und Goldwafer.

Um das Problem zunächst interpretieren und anschließend lösen zu können und dadurch eine Verbesserung der Strukturübertragung zu erzielen, werden verschiedene Möglichkeiten zur Prozessoptimierung getestet, beginnend bei einer systematischen Variation der Standard-Prozessparameter der NIL wie Druck, Temperatur, Zeit, Abkühlrate und Entformungstemperatur. Zudem wird nach dem Belackern des Wafers eine Randentlackung durchgeführt, um zu verhindern, dass durch eine Resistansammlung am Waferrand der Imprint behindert wird. Diese Veränderungen haben zu keiner Verbesserung in der Strukturübertragung geführt. Daher wird in einer nächsten Versuchsreihe der Stempel selbst ausgetauscht, wobei verschiedene Stempelgrößen getestet werden. Da der ursprünglich eingesetzte Master einen Durchmesser von sechs Zoll, der Wafer jedoch einen Durchmesser von vier Zoll hat, wird vermutet, dass eine intrinsische Verbiegung des Masters während des Imprints der Grund für die mangelhafte Strukturübertragung sein könnte. Allerdings führt auch eine Reduzierung der Stempelgröße von sechs auf vier Zoll zu demselben Fehlerbild aus Abbildung 6.14 (c). Bei genauer Betrachtung liegt die Vermutung nahe, dass die Füllfähigkeit der Strukturen aufgrund einer unzureichenden Haftung des Resists auf dem Goldwafer während des Imprints negativ beeinflusst wird. Diesbezüglich wird zur Verbesserung der mechanischen Haftung vor der Belackung die Oberfläche des Goldwafers entweder durch einen kurzen Ätzschritt mit einer Iod-

Kaliumiodid-Lösung oder durch die elektrochemische Abscheidung einer wenigen Mikrometer dünnen Goldschicht aufgeraut. Alternativ wird zur Verbesserung der chemischen Haftungseigenschaften ein in der Photolithographie gängiger Haftvermittler für Resiste verwendet. Als zweite Maßnahme der chemischen Oberflächenmodifikation wird eine Silanisierung mit 4-Aminothiophenol durchgeführt. Die Thiolgruppe besitzt eine hohe Affinität zu Gold, bildet spontane Au-S-Bindungen aus und die Aminogruppen binden gleichzeitig an die Moleküle des Resists an¹⁷⁸. Allerdings führen sowohl die chemischen als auch die physikalischen Modifikationen der Substratoberfläche ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Nanostrukturübertragung. Daher wird in einer weiteren Versuchsreihe versucht, eine Verbesserung der Strukturierung durch eine Zwischenschicht herbeizuführen, die zwischen Goldoberfläche des Wafers und Resist aufgebracht wird. Hierfür wird entweder eine 50 nm dünne Titanschicht aufgedampft oder ein 100 nm dünner Lift-Off-Resist mittels Spincoating auf die Goldoberfläche aufgetragen (**Abbildung 6.15**).

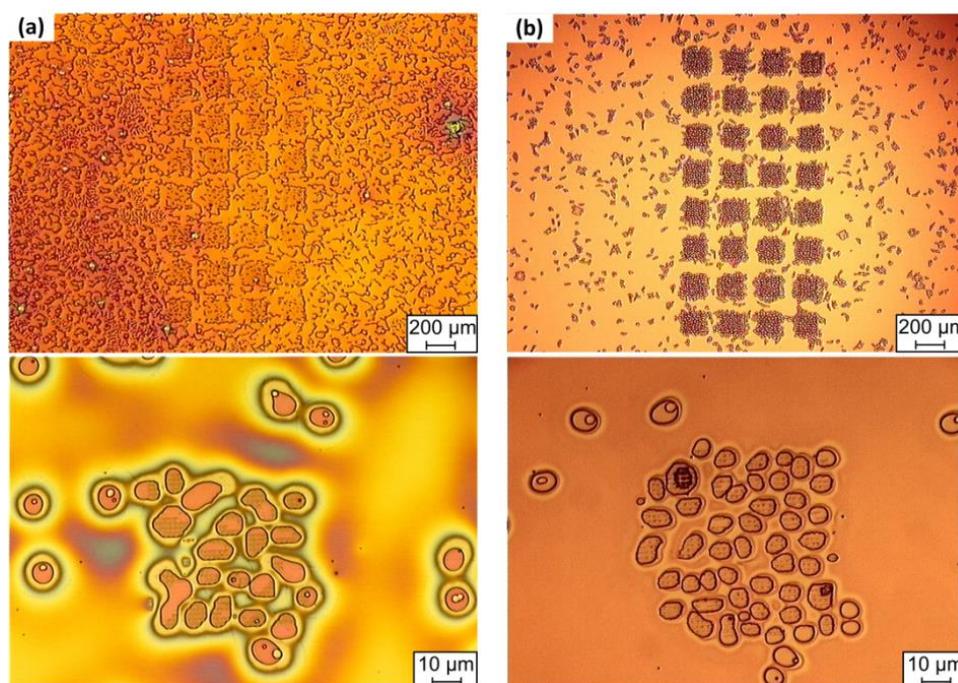


Abbildung 6.15: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei **(a)** Verwendung einer Titanzwischenschicht und **(b)** Verwendung eines Lift-Off-Resists als Zwischenschicht.

Mittels Lichtmikroskopie sind bei der Analyse der Nanostrukturübertragung im Vergleich zu den davor durchgeführten Modifikationen erste Anzeichen für eine Verbesserung zu erkennen. Daraufhin wird anstatt der Verwendung einer Zwischenschicht die Resistdicke selbst sukzessive von anfänglich 200 auf 300, 400 und schließlich 450 nm erhöht. Hierfür wird der Resist mr-I8030R (micro resist technology) eingesetzt, der die gleichen Eigenschaften wie der vorherige Resist besitzt, allerdings eine höhere Viskosität aufweist. Damit wird bei gleichen

Parametern des Spincoating-Prozesses eine höhere Schichtdicke erzielt. Nach der Erhöhung der Schichtdicke und gleichzeitigen Anpassung der NIL-Prozessparameter (Imprinttemperatur: 180 °C, Druck: 25 bar, Zeit: 900 s, Entformungstemperatur: 90 °C) wird eine deutliche Verbesserung bis hin zu einem sehr guten Ergebnis bei der Nanostrukturübertragung erzielt (**Abbildung 6.16**). Die Defekte, die teilweise in den einzelnen Strukturbereichen zu sehen sind, resultieren von Defekten des Stempels, welche aufgrund der starken Beanspruchung während dieser Versuchsreihen herrühren.

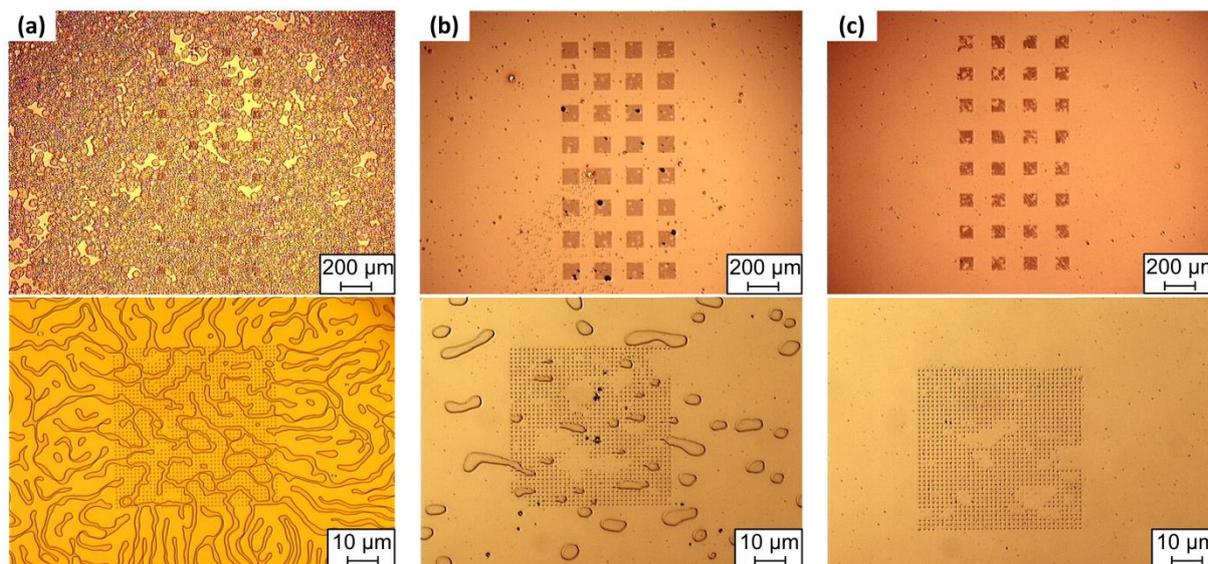


Abbildung 6.16: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei sukzessiver Erhöhung der NIL-Lackschichtdicke auf (a) 300 nm, (b) 400 nm und (c) 450 nm.

Da mit steigender Resistschichtdicke die Nanostrukturübertragung verbessert wird, kann die Annahme einer ungenügenden Füllfähigkeit bestätigt werden. Je mehr Material auf dem Substrat vorhanden ist, desto mehr Material kann verschoben werden, um die Kavitäten zu füllen. Die Frage, warum dieses Verhalten nur bei der Kombination Master und Goldwafer auftritt, kann jedoch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Eine mögliche Ursache liegt in der Haftung des Resists auf der Goldoberfläche. Als Edelmetall hat Gold ein nur sehr geringes Bestreben mit anderen Elementen eine Verbindung einzugehen. Durch die mangelhafte Bindung des Resists an den Goldwafer kann dieser, anders als bei der Siliziumoberfläche, leichter entfernt werden, sobald er durch hohe Temperaturen verflüssigt und durch hohe Drücke verschoben wird. Die Tatsache, dass allerdings eine Strukturübertragung mit dem OrmoStamp[®]-Replikant möglich ist, muss daher auch mit der Elastizität des Polymerstempels zusammenhängen. Vermutlich wird während des Imprints aufgrund des inelastischen Siliziummasters und der ebenfalls inelastischen Substratoberfläche der nur schwach gebundene Resist zu einem Großteil herausgedrückt, bevor die Strukturen effizient gefüllt werden können.

6.1.5 Bewertung des NIL-Prozesses

Nach der Optimierung des NIL-Prozesses ist ein nahezu defektfreier Imprint mit wenigen prozessbedingten Fehlstellen reproduzierbar möglich. Neben der Oberflächenbeschaffenheit ist wiederum die Maßhaltigkeit der Nanostrukturen eine wichtige Größe zur Bewertung des Prozesses. **Abbildung 6.17** zeigt die Höhe sowie die Abweichung des Durchmessers vom Soll-Wert von verschiedenen Strukturen nach der NIL und dem anschließendem reaktiven Ionenätzen sowie einen Vergleich mit den Originalstrukturen des Masters.

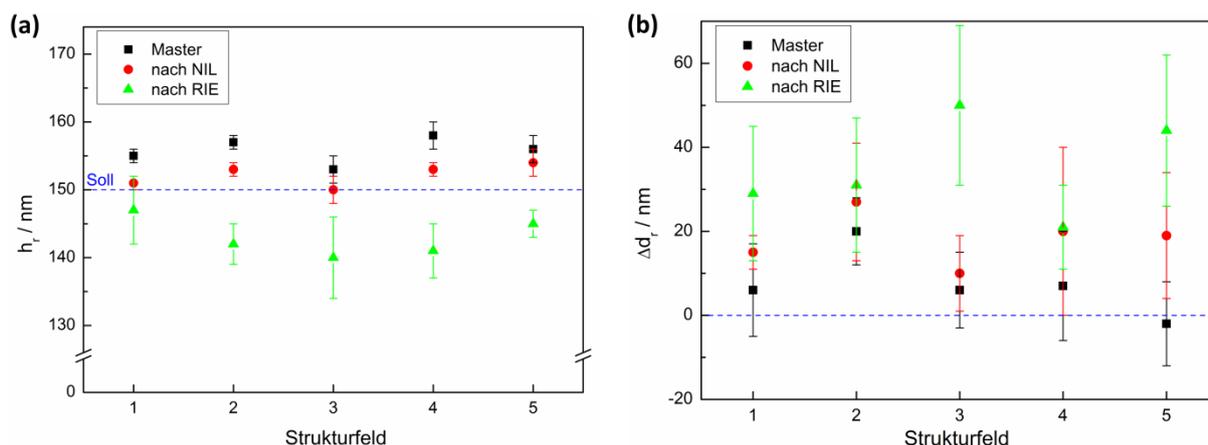


Abbildung 6.17: Vergleich von (a) Höhe der Resiststruktur h_r und (b) Abweichung des Nanostrukturdurchmessers Δd_r vom Sollwert verschiedener Strukturfelder nach NIL und RIE im Vergleich zum Master ($n=6$).

Dabei ist zu erkennen, dass die Höhe der nach der NIL prozessierten Strukturen lediglich ein paar Nanometer geringer als die der Strukturen des Masters ist. Bei den Durchmessern ist wiederum zu erkennen, dass die nach der NIL prozessierten Strukturen bis etwa 20 nm breiter sind als die Originalstrukturen des Masters. Die Verbreiterung der Strukturen ist dabei mit einer geringfügigen Schrumpfung des Resists verknüpft, der während der Abkühlung und Aushärtung erfolgt. Durch den Übergang vom viskosen in den hartelastischen Bereich ändern sich die chemischen Bindungen, was mit einer Verringerung des Gesamtvolumens einhergeht. Diese Verringerung erfolgt dabei in den Kavitäten, also in den Zwischenräumen der erhobenen Strukturen, was zu einer geringfügigen Verbreiterung der übertragenen Nanostrukturen führt und entspricht der Beobachtung im Experiment.

Aufgrund der erhöhten Resistschichtdicke im Vergleich zu den Vorversuchen wird auch die Dicke des *residual layers* erhöht. Zur Entfernung des *residual layers* wird daher die Zeit beim reaktiven Ionenätzen auf 120 s erhöht. Dadurch wird die Maskierungsschicht im Mittel auf eine Dicke zwischen 140 und 150 nm reduziert. Mit der Erhöhung der Prozesszeit geht auch eine Vergrößerung des lateralen Abtrags während des Ätzprozesses einher, was in einer mittleren Verbreiterung der Nanostrukturen um maximal 40 nm resultiert. Trotz dieser Verbreiterung des Strukturdurchmessers ist der NIL-Prozess reproduzierbar und erlaubt die Herstellung

einer nanostrukturierten Vorstruktur, die in einem nächsten Prozess dazu genutzt werden kann, Nanostrukturen auf dem Substrat mittels elektrochemischer Abscheidung herzustellen.

6.2 Elektrochemische Abscheidung von Gold

Die elektrochemische Abscheidung von Gold in das nanostrukturierte Templat ist der zweite wichtige Prozessschritt zur Herstellung einer nanostrukturierten Substratoberfläche. Bei der elektrochemischen Abscheidung ist wie bei der Herstellung der Vorstruktur mittels NIL auf Homogenität und Reproduzierbarkeit des Prozesses zu achten.

6.2.1 Elektrolytzusammensetzung und Versuchsbeschreibung

Für die elektrochemische Abscheidung wird ein kommerzielles, sulfithaltiges und cyanidfreies Goldbad (Metakem) verwendet. Neben der hohen Toxizität schließt vor allem ein möglicher Angriff der Resiststruktur einen Einsatz von cyanidhaltigen Elektrolyten in der Mikro-technik aus^{179,180}. Anstelle von Cyano-Verbindungen werden bei dem sulfithaltigen Bad Ammoniumdisulfitaurat(I)-Komplexe $(\text{NH}_4)_3[\text{Au}(\text{SO}_3)_2]$ verwendet, wobei die $[\text{Au}(\text{SO}_3)_2]$ -Ionen nahe der Kathode in Au^+ - und $(\text{SO}_3)^{2-}$ -Ionen dekomplexieren und die Goldionen kathodisch abgeschieden werden. Sulfithaltige Goldelektrolyte haben in der Regel eine geringe Komplex- und somit Badstabilität sowie einen begrenzteren Raum zur Variation von Prozessparametern, was eine sorgfältige Prozessführung voraussetzt^{67,181}. Das verwendete Bad besitzt eine Goldionenkonzentration von anfänglich 8 g/l und wird bei einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 7,5 betrieben. Da bei sulfithaltigen Goldelektrolyten die Elektrolytüberwachung und -konditionierung essentiell sind, muss vor jeder Abscheidung die Temperatur, der Füllstand sowie der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls korrigiert sowie ca. 5 ml Glanzzusatz dem Bad beigefügt werden. Letztgenannter katalysiert die Keimbildung vor dem Keimwachstum und fördert die Ausbildung homogener und glänzender Schichten. Zusätzlich werden regelmäßig sowohl Sulfit- als auch Goldgehalt überprüft und gegebenenfalls korrigiert, das Bad von Fremdpartikel gefiltert und die optimale Stromdichte bestimmt. Insbesondere ein Mangel an Sulfit, der als Komplexbildner fungiert und über die Grenzfläche zur Luft als SO_2 ausgetragen wird, fördert das Ausfallen von Gold, was mit einer Potentialverschiebung und einer Verminderung der Stromausbeute einhergeht.

Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 6.18** dargestellt: Der Elektrolyt befindet sich in einem Becherglasaufbau mit einem Fassungsvermögen von 3 L. Das Becherglas mit dem Elektrolyten ist wiederum in einem zweiten, größeren Becherglas platziert, das mit Wasser gefüllt ist und auf einer Heizplatte steht. Die Temperatur des Wasserbads wird mit Hilfe eines Thermofühlers auf 60 °C geregelt. Mit Hilfe von zwei Magnetrührern wird sowohl das Wasserbad als auch der Goldelektrolyt mit einer Geschwindigkeit von ca. 120 U/min bewegt, wodurch eine Homogenisierung der Temperatur und im Fall des Elektrolyts eine stetige Ionenbewegung in Form von Konvektion stattfindet. Die Abscheidung erfolgt mittels einer Zwei-Elektroden-

Anordnung. Das Substrat wird dabei als Kathode und ein etwa $16 \times 16 \text{ cm}^2$ großes, platinisiertes Titanstreckmetallgitter als Anode geschaltet. Die Anode ist in etwa 10 cm von der Kathode entfernt. Die Abscheidung wird mit Hilfe eines Stromgebers (Potentiostat SP-200, Biologic) geregelt, der das System mit einem konstanten Gleichstrom versorgt. Der einzustellende Stromfluss richtet sich nach der optimalen Stromdichte, welche in Vorversuchen ermittelt werden muss. Die Dauer der Abscheidung wird indes nach der angelegten Stromdichte und der gewünschten Schichtdicke entsprechend angepasst.

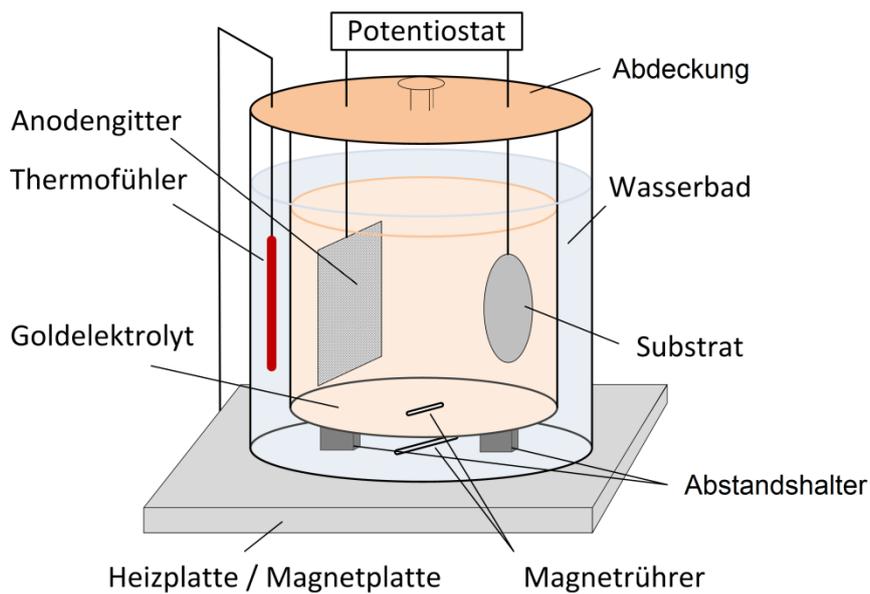


Abbildung 6.18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur elektrochemischen Abscheidung.

In Vorversuchen werden zunächst die Prozessparameter, insbesondere die optimale Stromdichte, herausgearbeitet. Mit diesen Parametern erfolgt dann die Abscheidung in den Nanostrukturen. Hierbei wird der vorstrukturierte Wafer als Substrat mittels eines elektrisch leitfähigen Halters verwendet (**Abbildung 6.19**).

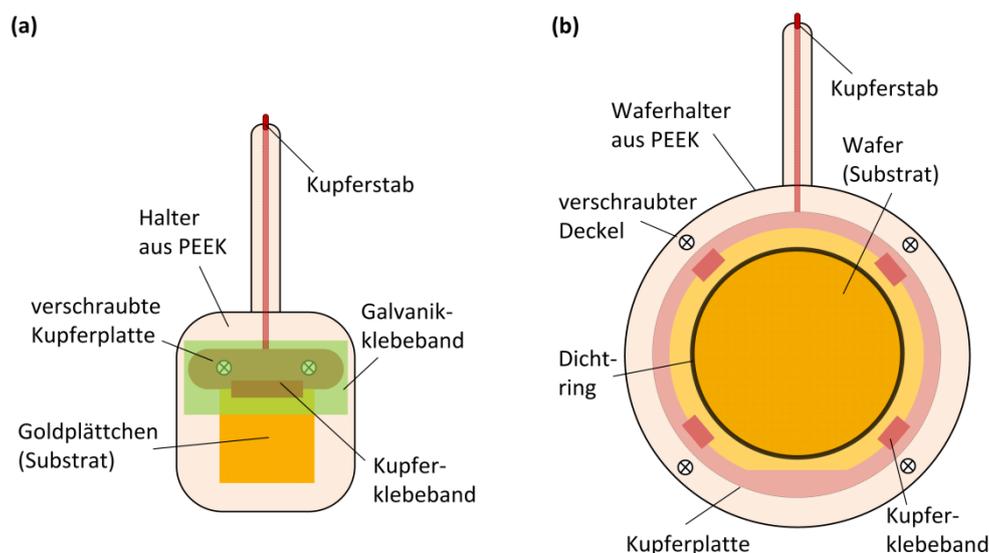


Abbildung 6.19: Substrathalter für (a) den Einsatz von Goldplättchen während den Vorversuchen und (b) den Einsatz von Wafer zur Herstellung der Nanostrukturen.

6.2.2 Vorversuche zur Evaluierung geeigneter Prozessparameter

Zur Evaluation der optimalen Stromdichte werden aus einem mit Titan und Gold bedampften Siliziumwafer 15x15 mm² große Plättchen herausgesägt, auf einem Substrathalter fixiert, mit selbigem kontaktiert und anschließend ganzflächig elektrochemisch mit Gold beschichtet. Die Stromdichte wird im Bereich zwischen 0,20 und 0,75 A/dm² variiert, wobei ein konstanter Gleichstrom zwischen den Elektroden eingestellt wird. Das Ziel der Versuche ist die Herstellung einer 5 µm dicken, duktilen und goldglänzenden Schicht, wobei die Schichtdicke über die Zeit eingestellt und mit Hilfe des Faraday'schen Gesetzes (Gleichung 3.5) berechnet wird. Zur Bewertung der Ergebnisse werden die Stromausbeute, die mittlere Rauigkeit und der Glanz der Schicht herangezogen. Die Bestimmung der Stromausbeute erfolgt mittels Gleichung 3.6, indem die Probe vor und nach der elektrochemischen Abscheidung gewogen und die tatsächlich abgeschiedene Masse mit der theoretisch abzuschheidenden Masse verglichen wird. Die mittlere Rauigkeit R_a wird mittels mechanischem Oberflächenprofilometer bestimmt. Bei diesem Messverfahren wird eine sehr feine Diamantspitze mit einer definierten Auflagekraft über die Oberfläche der Probe geführt. Die Spitze folgt dabei der Topographie der Oberfläche und kann die Höhenunterschiede als vertikale Bewegung induktiv erfassen. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in **Abbildung 6.20** zusammengefasst.

Abbildung 6.20 zeigt, dass die Stromausbeute bei einer Stromdichte von 0,40 A/dm² mit 99,6 % am größten ist. Das bedeutet, dass nur ein minimaler Anteil des Stroms in Nebenreaktionen fließt. Mit geringer oder größer werdender Stromdichte nimmt die Stromausbeute hingegen stetig ab. So beträgt diese bei 0,20 A/dm² lediglich 84,9 % und bei 0,75 A/dm² nur noch 58,1 %. Der theoretisch erreichbare Wert der Stromausbeute von nahezu 100 % kann mit dem positiven Standardpotential des Elektrolyts von $E_0 = 0,06 - 1,02$ V begründet werden, wodurch eine Wasserstoffabscheidung als parasitäre Reaktion vermieden werden kann¹⁸².

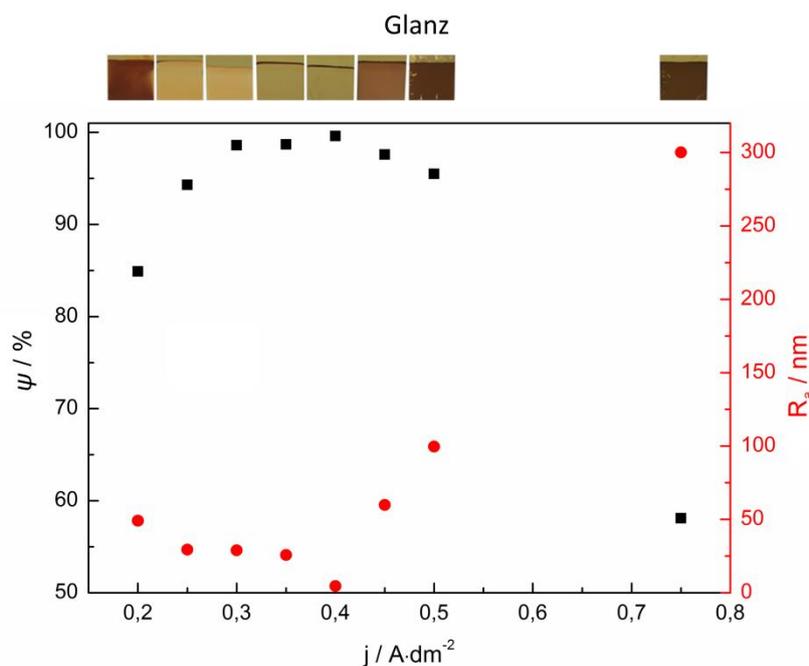


Abbildung 6.20: Abhängigkeit der Stromausbeute ψ , mittleren Rauigkeit R_a und des Glanzes der abgeschiedenen Schicht von der Stromdichte j .

Wird die mittlere Rauigkeit als Bewertungskriterium festgelegt, so ist diese ebenfalls bei einer Stromdichte von $0,40 \text{ A/dm}^2$ mit einem Wert von $4,6 \text{ nm}$ am geringsten. Da keine Wasserstoffabscheidung stattfindet, bilden sich auch keine für eine Wasserstoffabscheidung charakteristische Poren in der Schicht, was die sehr niedrige Rauigkeit erklärt. Bei einer Stromdichte von $0,20 \text{ A/dm}^2$ steigt der Rauigkeitswert auf $49,1 \text{ nm}$ an. Bei größeren Stromdichten als $0,40 \text{ A/dm}^2$ ist der Anstieg der Rauigkeit deutlich größer, sodass bei $0,75 \text{ A/dm}^2$ eine mittlere Rauigkeit von $300,1 \text{ nm}$ gemessen wird. Dieser deutliche Anstieg ist das Resultat einer veränderten Oberflächenmorphologie, die durch größere Körner bzw. Korncluster der abgeschiedenen Goldschicht, welche sich bei größeren Stromdichten einstellen, hervorgerufen werden. Als weiterer Bewertungsmaßstab für die Qualität der Abscheidung kann auch das Reflexionsvermögen der Schicht herangezogen werden. Je kleiner die abgeschiedenen Körner bzw. Korncluster sind, desto geringer ist die Streuung des reflektierten Lichts und desto höher der Glanz. Die Plättchen, die mit einer Stromdichte von $0,35$ und $0,40 \text{ A/dm}^2$ beschichtet sind, zeigen hierbei eine sehr glänzende Schicht. Bei Verwendung einer kleineren oder größeren Stromdichte verändert sich die Schicht derart, dass sie zunächst milchig und anschließend braun wird. Dies hängt ebenfalls mit der Veränderung der Oberflächenmorphologie der abgeschiedenen Goldschicht zusammen und stimmt mit den Ergebnissen der Rauigkeitsmessung überein, wonach die milchigen bzw. braunen Schichten eine größere Rauigkeit aufweisen als die glänzenden Schichten. Zusammenfassend kann anhand obiger Ergebnisse gezeigt werden, dass aufgrund der Stromausbeute, der mittleren Rauigkeit und des Glanzes eine optimale Stromdichte bei $0,40 \text{ A/dm}^2$ gegeben ist, welche zu den besten Schichtergebnissen führt. Allerdings muss beachtet werden, dass die optimale Stromdichte mit fortschreitendem Goldaus-

trag absinkt, wodurch der optimale Stromdichtebereich regelmäßig neu bestimmt werden muss.

6.2.3 Elektrochemische Abscheidung in nanostrukturierte Wafer

Mit der Kenntnis der optimalen Stromdichte erfolgt die Abscheidung in vorstrukturierte Wafer. Dabei wird zunächst ein vorstrukturierter Wafer mit einer Zeit von 600 s galvanisiert (**Abbildung 6.21 a**). Da die hergestellten Goldnanostrukturen in ihren lateralen Abmessungen durch den NIL-Resist begrenzt sind, muss zur Bestimmung der Homogenität der Abscheidung lediglich die Höhe der Strukturen überprüft werden. Dazu wird die Strukturhöhe an sechs Stellen jedes Array des Wafers mit dem AFM gemessen (**Abbildung 6.21 b**).

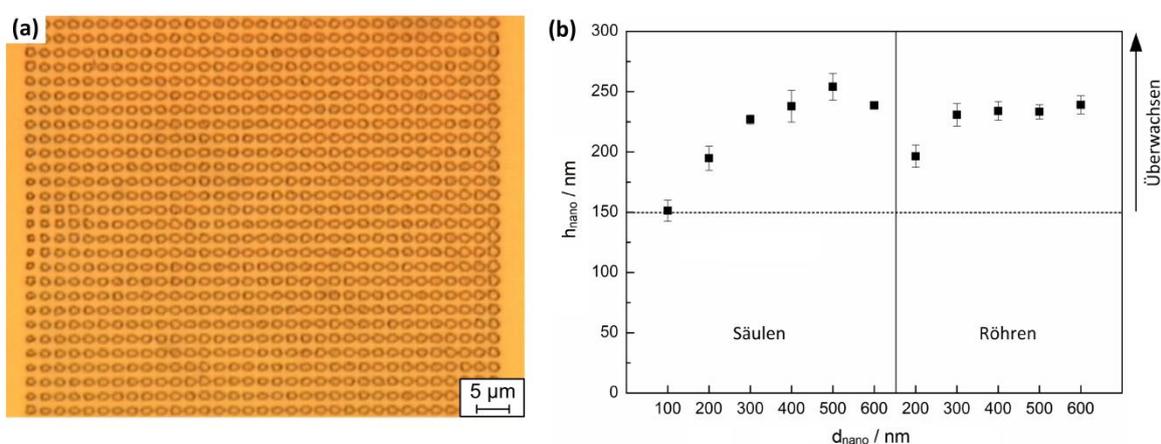


Abbildung 6.21: (a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines nanostrukturierten Arrays nach der elektrochemischen Abscheidung. (b) Abhängigkeit der Strukturhöhe h_{nano} der Säulen- und Röhrenstrukturen vom Strukturdurchmesser d_{nano} ($n=6$).

Hierbei zeigt sich, dass die Höhe der abgeschiedenen Struktur direkt vom Durchmesser des jeweiligen Strukturtyps abhängig ist. Die kleinen Strukturdurchmesser weisen im Allgemeinen geringere Höhen als große Strukturdurchmesser auf. Die kleinsten Strukturhöhen mit 151 ± 9 nm werden bei einem Durchmesser von 100 nm gemessen. Bei Strukturdurchmessern zwischen 300 und 600 nm beträgt die Höhe der Strukturen im Mittel zwischen 227 ± 4 nm und 254 ± 11 nm. Zwischen den Säulen- oder Röhrenstrukturen sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch kann kein nennenswerter Unterschied in der Höhe der Strukturen mit unterschiedlichem Nanostrukturabstand detektiert werden (hier nicht dargestellt). Die elektrochemische Abscheidung in die 50 nm breiten Strukturen ist jedoch sehr stark fehlerbehaftet, sodass nur einige wenige Strukturen überhaupt zufriedenstellend gefüllt werden konnten. In Bezug zu den sich anschließenden Versuchsreihen wird allerdings eine minimale Defektstellenanzahl zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse vorausgesetzt. Daher werden die 50 nm Strukturen nicht weiter betrachtet.

Wie in Kapitel 3 beschrieben kann mittels der Faraday'schen Gesetze die abgeschiedene Höhe einer Struktur berechnet werden. Wird dabei eine Stromausbeute von 100 % angenommen, ist die Höhe der abgeschiedenen Struktur direkt proportional zur Zeit der elektrochemischen Abscheidung und zur Stromdichte, welche wiederum umgekehrt proportional zur abgeschiedenen Fläche ist. Die primäre Stromdichteverteilung ist direkt mit der Feldliniendichteverteilung zu korrelieren. Die Feldliniendichte ist hierbei in engen Strukturen vergleichsweise größer als in breiten Strukturen. Aus diesen Überlegungen heraus ergibt sich, dass Strukturen mit geringem Strukturdurchmesser im Vergleich zu Strukturen mit großem Strukturdurchmesser größere Höhen aufweisen müssen. Diese Annahmen stehen jedoch im Widerspruch zu den oben gezeigten Messergebnissen, wonach kleinere Strukturdurchmesser auch zu kleineren Strukturhöhen führen. **Abbildung 6.22 a** zeigt ein Mapping der gemittelten Messwerte für jedes der 4x8 Arrays. Aufgrund der gleichmäßig gewählten Verteilung der Strukturen auf dem NIL-Master und des resultierenden Imprints auf dem Substrat würde eine Vorzugsrichtung bei der elektrochemischen Abscheidung auffallen: Eine Verkipfung des Wafers innerhalb des Becherglasaufbaus könnte daran erkannt werden, dass die Strukturhöhen von rechts nach links bzw. von oben nach unten kontinuierlich zu- bzw. abnehmen. Ähnliche Tendenzen ließen sich auch bei einer schlechten Kontaktierung beobachten: Da die Kontaktierung an vier Stellen im Randbereich des Wafers aufgebracht ist, müssten die Strukturhöhen in radialer Richtung abnehmen, wenn eine schlechte Kontaktierung vorliegen würde. Da die genannten Effekte allerdings nicht auftreten, können die erhaltenen Messwerte nicht auf Fehler im Versuchsaufbau zurückgeführt werden. Auch der Bedeckungsgrad, der als Verhältnis von zu galvanisierender Fläche zur Gesamtfläche definiert ist und die lokale Stromdichte- bzw. Stromlinienverteilung beeinflusst, entfällt als Ursache für die unterschiedlichen Strukturhöhen: Beim Vergleich des Bedeckungsgrads eines Arrays von Nanostrukturen mit kleinem und großem Strukturdurchmesser wird festgestellt, dass die Gesamtanzahl der Strukturen bei den kleinen Strukturdurchmessern zwar größer, der Bedeckungsgrad hingegen kleiner ist. So reduziert sich beispielsweise im Fall der Säulenstrukturen die Gesamtanzahl der Strukturen von 1296 bei einem Strukturdurchmesser von 100 nm auf 625 bei einem Strukturdurchmesser von 600 nm, der Bedeckungsgrad erhöht sich jedoch von 0,6 auf 11 % (Berechnungen basieren auf einer Elektrodenfläche von 40x40 μm^2 und einem Nanostrukturabstand von 1 μm). Ein geringerer Bedeckungsgrad bedeutet im Allgemeinen eine höhere Feldliniendichte und führt zu höheren Strukturen, was den Messungen widerspricht.

Eine mögliche Ursache des beschriebenen Effekts könnte ein unzureichender Transport der Goldionen zur Substratoberfläche aufgrund von den teilweise sehr kleinen Strukturdurchmessern von bis zu 100 nm sein. Wie in Kapitel 3 erläutert, besteht der Prozess der Elektrokristallisation hauptsächlich aus den Teilprozessen des Antransports der komplexierten Ionen aus dem Elektrolytinneren an die Substratoberfläche, dem Einsetzen von chemischen Reaktionen zur Dekomplexierung, der Adsorption an der Substratoberfläche sowie des sich anschließenden Ladungstransfers, dem Einbau des Atoms in den Materialverbund sowie dem Abtransport

chemischer Nebenprodukte zurück in das Elektrolytinnere. Im Beispiel obiger Messdaten könnten vor allem die Prozesse An- und Abtransport im Falle der Nanostrukturen mit kleinen Strukturdurchmessern von 100 und 200 nm im Vergleich zu den Strukturen mit größerem Durchmesser gehemmt sein. Bei diesen kleinen Durchmessern gelangen vergleichsweise weniger Goldionen zur Substratoberfläche, was sich hemmend auf die Abscheiderate und somit auf die Schichthöhe auswirkt. Bei Strukturdurchmessern ab 300 nm ist hingegen der An- und Abtransport ungehemmt, wodurch sich die Schichthöhe in einen Bereich zwischen etwa 230 und 240 nm Schichtdicke einpendelt. Beim Vergleich von Röhren- und Säulenstrukturen kann kein signifikanter Unterschied in den Strukturhöhen festgestellt werden. Generell wäre zu erwarten gewesen, dass die Strukturhöhe der Röhrenstrukturen aufgrund der Röhrenwanddicke von 50 nm und der damit verbundenen geringeren abzuschneidenden Grundfläche, tendenziell etwas größer ist als bei den Säulenstrukturen gleichen Durchmessers. Allerdings kann dieser Effekt im Experiment nicht bestätigt werden, was vermutlich an dem sehr geringen Flächenunterschied liegt.

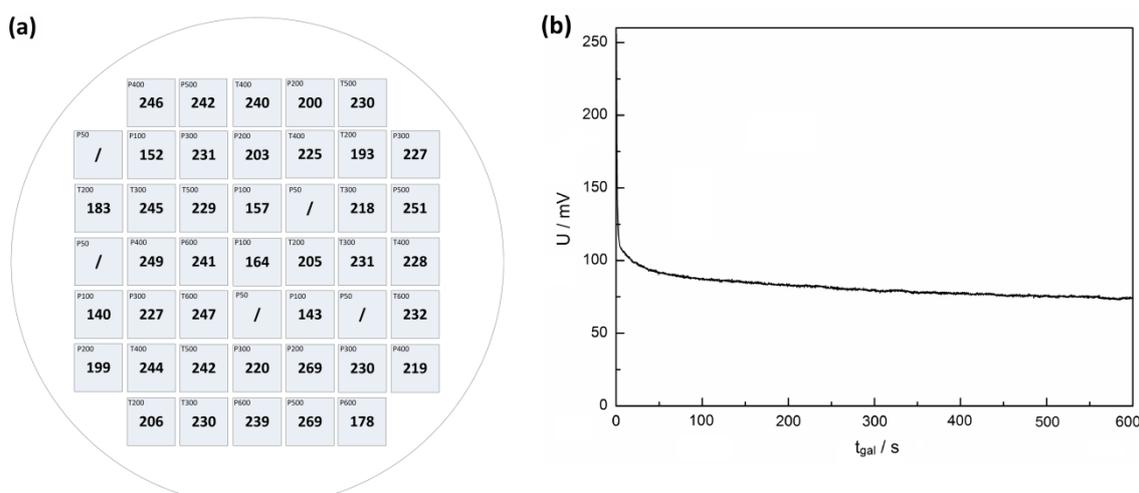


Abbildung 6.22: (a) Korrelation der gemessenen mittleren Strukturhöhen (in nm) zu den dazugehörigen Strukturfeldern. (b) Entwicklung der Spannung U während einer Zeit t_{gal} bei konstantem Stromfluss.

Zusätzlich sei angemerkt, dass eine Spannungsüberwachung des Überwachungsprozesses im Allgemeinen nicht möglich ist: In **Abbildung 6.22 b** ist ein typischer Spannungsverlauf dieser Gleichstromabscheidung dargestellt. Diese zeigt, dass zunächst (für wenige Sekunden) eine hohe Spannung im Bereich zwischen 150 und 250 mV anliegt bis der Abscheideprozess initialisiert ist. Anschließend fällt die Spannung unter einen Wert von 100 mV. Aufgrund der Überwachung der Strukturen wird die Abscheidefläche kontinuierlich vergrößert, was zu einem sinkenden Widerstand führt. Dies hat zur Folge, dass bei konstantem Stromfluss auch die Spannung abfällt. Der stetige Spannungsabfall ist ein Hinweis darauf, dass die Nanostrukturen zeitlich versetzt mit dem Überwachungsprozess beginnen.

In einer zweiten Versuchsreihe wird der zeitliche Einfluss auf die Strukturhöhe untersucht. Zu diesem Zweck werden vier Zeiten der elektrochemischen Abscheidung von 100, 200, 400 und 600 s gewählt und deren Einfluss auf verschiedene Strukturdurchmesser untersucht, wobei sowohl Röhren- als auch Säulenstrukturen betrachtet werden. **Abbildung 6.23 a** zeigt die Abhängigkeit der Strukturhöhe von der Zeit der elektrochemischen Abscheidung für die verschiedenen Strukturdurchmesser und -typen. Deutlich zu erkennen ist die durch das Faraday-Gesetz antizipierte lineare Abhängigkeit der Strukturhöhe von der Zeit. Aus der Abbildung gehen ebenfalls die zum Teil deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturdurchmessern hervor. Hierbei weisen kleinere Strukturdurchmesser kleinere Strukturhöhen auf, was mit den Beobachtungen aus dem ersten Versuchsteil konsistent ist. Der Unterschied wird dabei umso größer, je länger elektrochemisch abgeschieden wird.

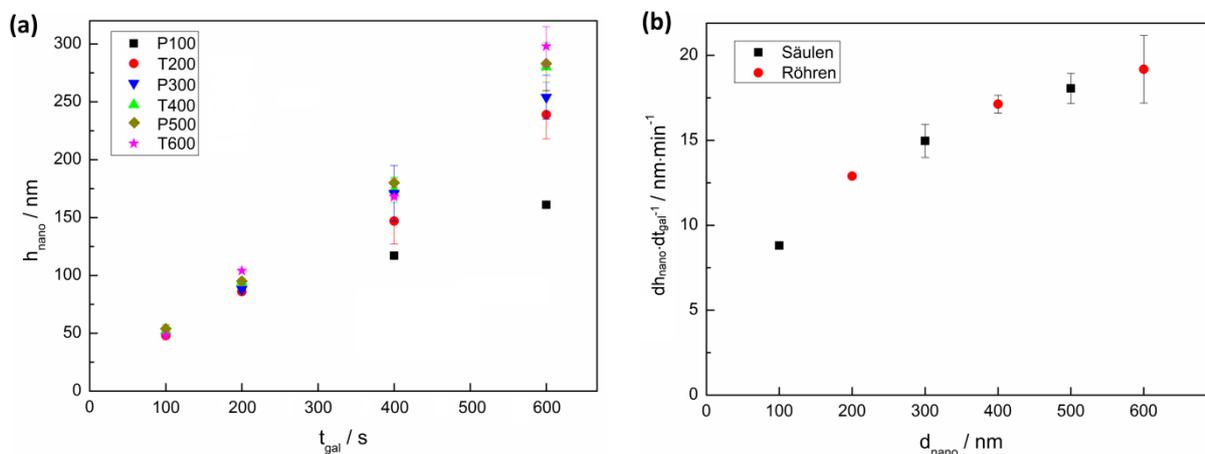


Abbildung 6.23: (a) Abhängigkeit der Strukturhöhe h_{nano} der Säulen- und Röhrenstrukturen von der Zeit t_{gal} der elektrochemischen Abscheidung ($n=12$). (b) Abhängigkeit der Abscheiderate $dh_{\text{nano}}/dt_{\text{gal}}$ vom Strukturdurchmesser d_{nano} ($n=12$).

Wird die Steigung des linearen Verlaufs eines bestimmten Strukturdurchmessers ermittelt, so ist diese mit der Abscheiderate gleichzusetzen. **Abbildung 6.23 b** zeigt die Abhängigkeit der Abscheiderate für den jeweiligen Strukturdurchmesser. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich die Abscheiderate mit Zunahme des Durchmessers erhöht. So steigt die Rate von $8,8 \pm 0,1$ nm/min bei Strukturen mit einem Durchmesser von 100 nm auf $19,2 \pm 2,0$ nm/min bei Strukturen mit einem Durchmesser von 600 nm an. Auch dieses Verhalten kann mithilfe des oben beschriebenen Modells des eingeschränkten Ionentransports bei kleinen Strukturdurchmessern erklärt werden. Im Allgemeinen wird das Schichtwachstum vom Überwachsen der Strukturen nicht signifikant beeinflusst. Zu vermuten wäre, dass aufgrund der größer werdenden zu galvanisierenden Fläche in Folge des Überwachsungsvorgangs das Schichtwachstum bzw. die Abscheiderate ab einer Schichthöhe von 150 nm abnimmt. Dies kann im Experiment jedoch nicht beobachtet werden.

6.2.4 Bewertung des Prozesses der elektrochemischen Abscheidung

Nachweislich konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Nanostrukturen mittels elektrochemischer Abscheidung auf dem gesamten Wafer möglich ist (**Abbildung 6.24 a/b**). Dabei ist die Höhe der Strukturen direkt proportional zu der Zeit der elektrochemischen Abscheidung, wobei die Abscheiderate insbesondere vom Strukturdurchmesser bestimmt wird. Dadurch kann die gewünschte Höhe der Nanostrukturen sowie eine mögliche Überwachung anhand der Zeit eingestellt werden.

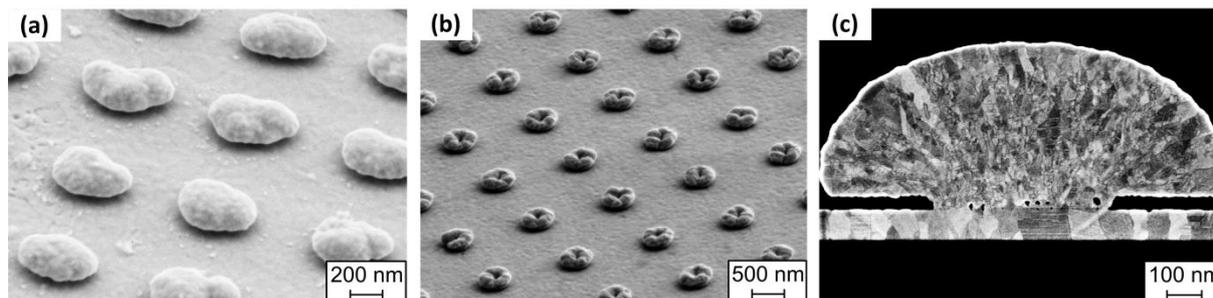


Abbildung 6.24: REM-Aufnahmen von (a) überwachsenen Säulenstrukturen und (b) überwachsenen Röhrenstrukturen. (c) REM-Aufnahme eines Querschnitts einer einzelnen überwachsenen Säulenstruktur.

Soll die Abscheidung einer einzelnen Nanostruktur bewertet werden, so muss ein Querschnitt der Struktur erzeugt werden. Aus diesem Grund wird mittels *ion beam milling* ein Querschnitt einer überwachsenen Säulenstruktur generiert und mit Hilfe des REM analysiert (**Abbildung 6.24 c**). Deutlich zu erkennen sind die Pilzform und die abgeschiedenen Kristallkörner. Anhand des Kristallgefüges wird der Wachstumstyp als unorientierter Dispersionstyp bestimmt, welcher typisch für die Goldabscheidung aus einem komplexierten sulfithaltigen Elektrolyt ist⁶⁷. Dieser, in der technischen Anwendung bevorzugte Typ, ist die Grundlage für eine gute elektrische Leitfähigkeit, da er die Eigenschaften des Substratmaterials übernimmt. Dadurch wird ermöglicht, die Basiselektrode und die darauf wachsenden Nanostrukturen als eine Elektrode zu beschreiben, was eine wichtige Voraussetzung für die Optimierung der Signalstärke in der späteren Anwendung darstellt. Anhand des Kristallgefüges kann ebenfalls der Einfluss der Stromdichte verdeutlicht werden. Zu Beginn der Abscheidung ist die lokale Stromdichte hoch, wodurch sich kleine Kristallite ausbilden. Im Verlauf der Abscheidung erfolgt ein Überwachsen der Struktur, was zu einer Vergrößerung der Abscheidefläche und zu einer stetigen Verringerung der lokalen Stromdichte führt. Bei Verkleinerung der Stromdichte werden die Kristalle größer. Bedingt durch den angesprochenen Wachstumstyp erhält die Nanostruktur auch eine genügend hohe Stabilität, was insbesondere durch die Entstehung kleiner Kristallite am Übergang von Substrat zu Nanostruktur gegeben ist. Zwar sind gelegentlich Fehlstellen zu Beginn der Abscheidung zu erkennen, diese wirken sich jedoch nicht merklich auf die Stabilität oder elektrische Leitfähigkeit aus. So werden die Nanostrukturen im weite-

ren Prozessverlauf weder durch Reinigungsschritte im Ultraschallbad, noch durch andere, sich anschließende Prozessschritte oder durch die Kultivierung mit Zellen beschädigt.

6.3 Mikrostrukturierung

In diesem Kapitel werden die Prozessschritte der Mikrostrukturierung insbesondere die Photolithographie, das nasschemische Ätzen, die Abscheidung der Isolationsschicht und die erneute Öffnung der Isolationsschicht anhand der Homogenität auf Waferebene und der Reproduzierbarkeit bewertet.

6.3.1 Erste Photolithographie und Ätzen der Metallschichten

Der Prozess der Photolithographie dient zur Erzeugung einer vorstrukturierten Maskierungsschicht für die Herstellung der Mikrostrukturen des MEAs und gliedert sich in das Auftragen des Resists mittels Spincoating, Belichten des Resists im Mask-Aligner und Entwickeln des Resists in einer Entwicklerlösung. Für die Photolithographie wird ein ätzstabiler Positivresist (AR-P 5910, Allresist) eingesetzt, wobei in diesem ersten Schritt die Strukturen für die Elektroden- und Kontaktierungspads sowie deren Zuleitungen hergestellt werden. Um eine ausreichend dicke Maskierungsschicht zu generieren, welche während der nasschemischen Ätzung die nanostrukturierten Bereiche effektiv schützt, wird im Spincoating-Prozess eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 2000 U/min bei einer Dauer von 60 s gewählt. Nach einem zweiminütigen Softbake bei 90 °C, der zur Verdampfung des Lösemittels des Resists dient, wird die resultierende Schichtdicke an fünf Stellen auf dem Wafer mit der *film thickness probe* (FTP) gemessen. Bei den im Prozessverlauf prozessierten Wafern ($n=20$) ergibt sich im Mittel eine Schichtdicke von 1207 ± 56 nm, was einer guten Schichtdickenhomogenität und Reproduzierbarkeit entspricht. Die optimalen Parameter der Belichtung werden im *hard contact mode* bei einer mittleren Leistungsdichte von 6 mW/cm^2 und einer Belichtungsdauer von insgesamt 8 s ermittelt. Der sich anschließende Entwicklungsvorgang wird in unverdünnter Entwicklerlösung für 60 s durchgeführt. Zur Bewertung der Strukturübertragung werden sowohl die Breite der Elektroden als auch die Breite der Zuleitungen mit dem Mikroskop auf Maßhaltigkeit überprüft und die Messwerte mit denen der Maske verglichen. Im Anschluss an die Photolithographie erfolgt das Ätzen der Goldschicht in einer verdünnten Iod-Kaliumiodid-Wasser-Lösung im Verhältnis 1:4:20. Die Titanschicht wird mittels fünfprozentiger Flußsäure geätzt. Da die Ätzung bei Raumtemperatur erfolgt und die Konzentration der Lösung konstant gehalten wird, erfolgt die Regulierung der Ätzung über die Zeit, wobei darauf zu achten ist, dass diese ausreichend groß ist, damit sämtliches Material von der Oberfläche gelöst wird und gleichzeitig so gering wie möglich ist, um eine Unterätzung der Maskierung weitestgehend zu minimieren. Zur Bewertung der Prozesshomogenität werden erneut an insgesamt fünf verschiedenen Stellen des Wafers jeweils fünf Messungen pro Array durchgeführt und die

Breite der Elektrode und Zuleitung gemessen und mit dem vorherigen Prozessschritt sowie der Maske verglichen (**Abbildung 6.25**).

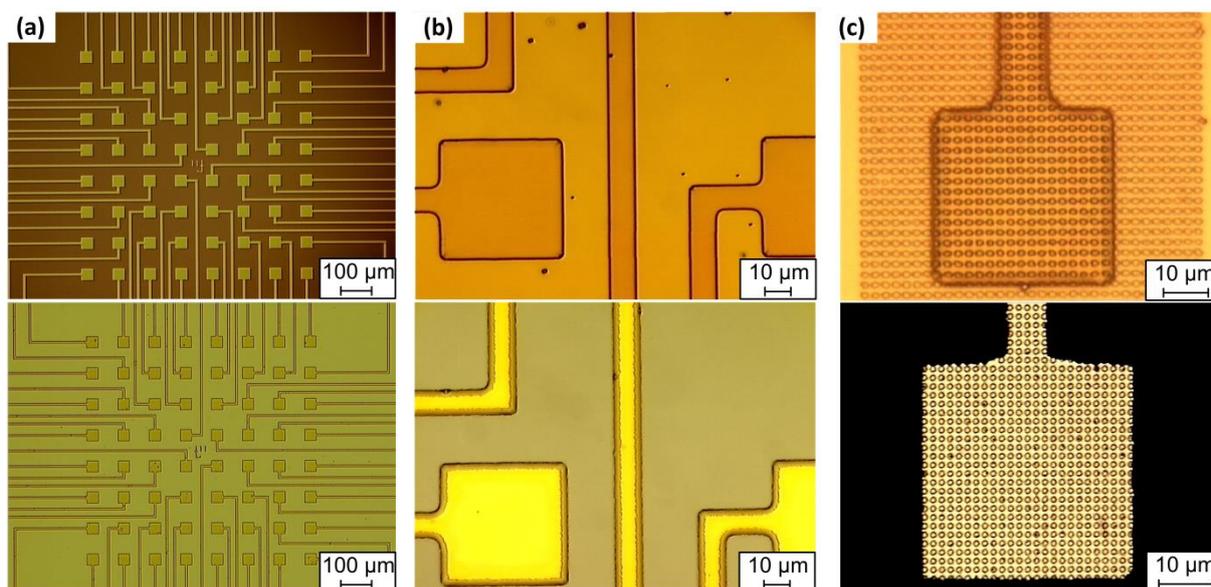


Abbildung 6.25: (a) Vergleich der Mikrostrukturen der Maske (oben) mit den durch Photolithographie prozessierten Strukturen im Resist (unten). (b) Vergleich der Mikroelektroden vor (oben) und nach dem Ätzen (unten) der Gold- und Titanschicht und resultierender Unterätzung an unstrukturierten Elektroden. (c) Nanostrukturierte Mikroelektrode nach der Lithographie (oben) und nach dem nasschemischen Ätzen (unten).

Bei der Optimierung der Prozessparameter wird deutlich, dass eine starke Unterätzung aufgrund zu langer Ätzzeiten bei der Ätzung des Goldes auftreten kann (**Abbildung 6.26 a**). Dabei nimmt mit steigender Ätzdauer die Unterätzung der Strukturen zu. Ab einer Ätzdauer von 40 s ist die Unterätzung bereits so groß, dass die Zuleitungen teilweise unterbrochen bzw. gänzlich verschwunden sind. Bei Ätzzeiten kleiner 30 s bleiben hingegen massive Rückstände des zu ätzenden Goldes auf der Waferoberfläche zurück. Diese bewirken, dass die anschließende Titanätzung nicht homogen über den gesamten Wafer erfolgen kann und dadurch metallische Bereiche auf der Oberfläche zurückbleiben. Die optimierte Ätzzeit bei Gold beträgt 30 s. Die optische Bestimmung der Unterätzung der Titanschicht ist dagegen mit dem Mikroskop nicht möglich, da das darüber befindliche Gold die Titanschicht verdeckt. Anders als bei der undurchsichtigen Iod-Iodkalium-Ätzlösung ist die Flußsäure allerdings durchsichtig und ein Auflösen der Schicht wird durch eine Gasentwicklung angezeigt. Nach Beendigung der Gasentwicklung kann daher der Wafer der Ätzlösung entnommen werden. Eine vorzeitige Entnahme führt hingegen zu Rückständen der Titanschicht auf der Substratoberfläche. Die optimierte Ätzzeit bei Titan beträgt 35 s.

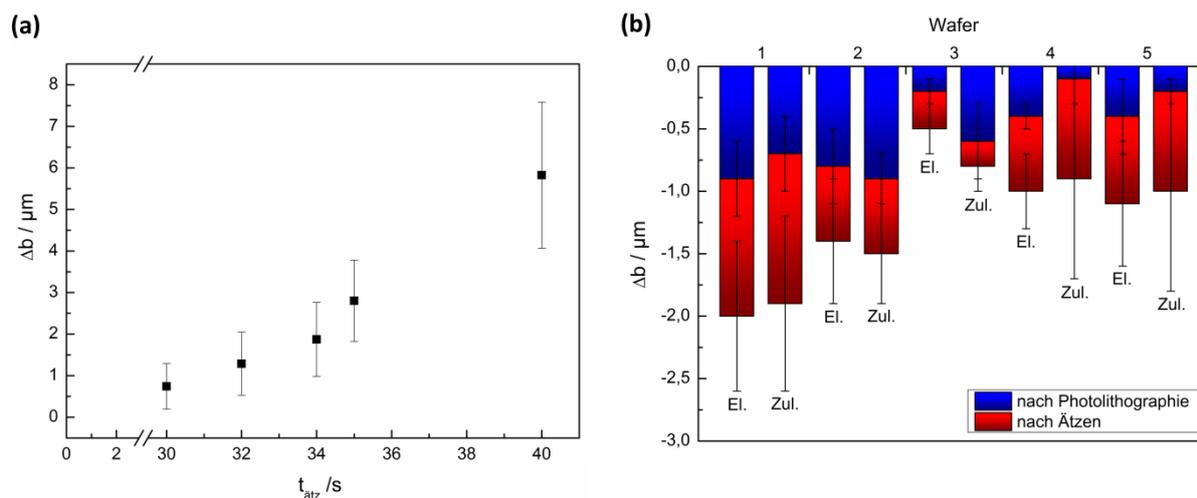


Abbildung 6.26: (a) Abhängigkeit der Strukturweitenänderung Δb von der Ätzzeit $t_{\text{ätz}}$ beim Ätzen der Goldschicht ($n=6$). (b) Änderung der Strukturweite Δb von Elektrode (El.) und Zuleitung (Zul.) nach der Photolithographie und dem Ätzen ($n=6$).

Abbildung 6.26 b zeigt die Veränderung der Strukturweiten von Elektrode und Zuleitung nach der Lithographie und den beiden Ätzprozessen im Vergleich zur Maske. Resultierend zeigt sich, dass die Strukturen im Vergleich zur Maske nach dem Prozess der Photolithographie im Mittel zwischen 0,1 und 0,9 μm verkleinert sind. Dabei sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Elektroden und Zuleitungen bzw. innerhalb den verschiedenen Bereichen eines Wafers erkennbar, was eine gute Homogenität bedeutet. Die Schwankungen in der Strukturweite, die bei den verschiedenen Wafers beobachtet werden können, sind ebenfalls gering, was für eine gute Reproduzierbarkeit des Prozesses spricht. Allgemein rührt die Verkleinerung der Strukturen von einer geringen Überbelichtung und/oder Überentwicklung her. Bei kürzeren Belichtungs- bzw. Entwicklungszeiten besteht allerdings die Gefahr einer nicht ausreichenden Belichtung/Entwicklung, was den sich anschließenden Ätzschritt behindern kann, sofern der Resist nicht aus allen Bereichen herausgelöst wird. Die Schwankungen im Prozess sind dabei dem Alter der eingesetzten Anlagen geschuldet und nicht dem Prozess an sich. So variiert beispielsweise die Leistungsdichte der Lichtquelle des Mask-Aligners um mehrere 10 % an verschiedenen Stellen des Wafers.

Nach dem Ätzprozess tritt auch bei optimierter Prozessführung eine weitere Verkleinerung der Strukturen auf. Diese beträgt im Mittel zwischen 0,2 und 1,2 μm . Die Verkleinerung durch den Ätzvorgang ist ebenfalls unabhängig davon, ob Elektrode oder Zuleitung betrachtet wird und fällt im Vergleich zum Lithographieprozess etwas größer aus. Dennoch bleiben auch im Fall des Ätzvorgangs die Homogenität und Reproduzierbarkeit gewahrt.

Die Gesamtverkleinerung der Mikrostrukturen durch den Lithographie- und Ätzprozess kann in Summe und im Mittel mit weniger als 2 μm angegeben werden. Insgesamt ist die Verkleinerung der Struktur als unproblematisch hinsichtlich ihrer Anwendung zu bewerten. Im Fall der Elektrode ist die effektive Messfläche von der Größe des späteren Kontaktlochs abhängig.

Die Zuleitungen sind mit $10\ \mu\text{m}$ an ihrer dünnsten Stelle ebenfalls so dimensioniert, dass trotz einer Verringerung der Breite die Signale von der Elektrode zum Kontaktpad störungsfrei transportiert werden können.

6.3.2 Abscheidung der Isolationsschicht

Einer der kritischsten Aspekte bei der Herstellung funktionsfähiger und langlebiger MEAs ist, wie in Kapitel 5 bereits angedeutet, die Abscheidung einer homogenen und zugleich dichten, gut isolierenden Schicht. Die Isolationsschicht wird während der Zellkulturphase dauerhaft von dem Kulturmedium angegriffen und solange abgetragen, bis keine isolierende Wirkung mehr von der Schicht ausgeht. Entfällt die Isolation oder ist sie fehlerhaft, so kann dies zu einer Vergrößerung der effektiven Elektrodenbereiche bis hin zum Übersprechen der Elektroden untereinander führen, was eine verlässliche Messung der Zellsignale unmöglich macht.

Zur Herstellung einer möglichst undurchlässigen Isolationsschicht wird mit Hilfe der plasma-unterstützten chemischen Gasphasenabscheidung ein Schichtstapel aus alternierendem Siliziumoxid und Siliziumnitrid mit einer Gesamtdicke von $950\ \text{nm}$ abgeschieden (**Abbildung 6.27 a**). Zur Charakterisierung der Schichtdickenhomogenität wird die Schichtdicke des Isolatorstapels an fünf Stellen mit dem FTP gemessen, nach den einzelnen Schichten aufgeteilt und mit den Soll-Werten verglichen (**Abbildung 6.27 b**).

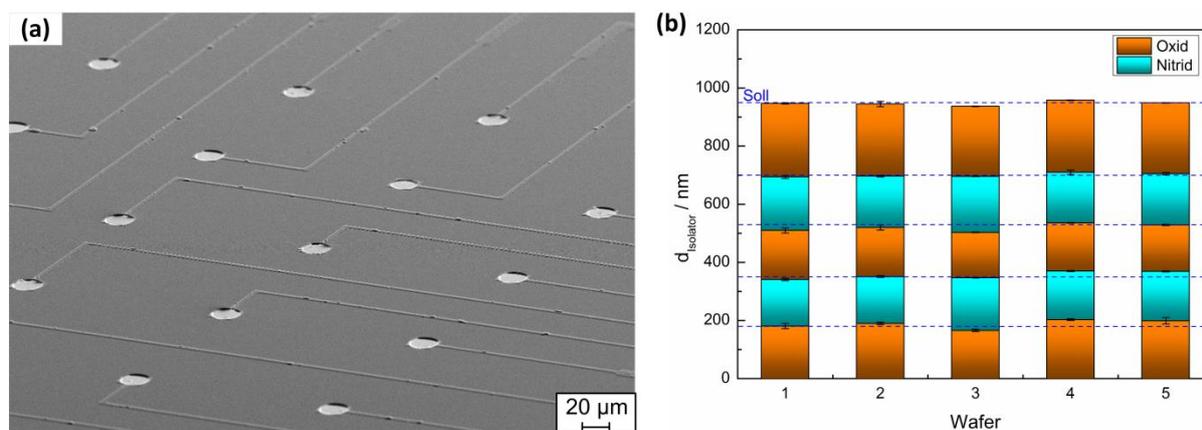


Abbildung 6.27: (a) REM-Aufnahme zeigt die geschlossene Oberfläche der Isolationsschicht (nach Kontaktlochöffnung). (b) Mittelwerte der gemessenen Schichtdicken des Isolatorstapels d_{Isolator} verschiedener Wafer ($n= 5$).

Wird die Homogenität der einzelnen Schichten auf einem Wafer verglichen, so liegt die Standardabweichung der Einzelschicht bei maximal $11\ \text{nm}$ und die der Gesamtschichtdicke bei maximal $15\ \text{nm}$, welches einer prozentualen Abweichung von 6 bzw. 2 % entspricht und eine gute Homogenität bedeutet. Werden die Ist-Werte mit den Soll-Werten der Einzelschichten verglichen, so beträgt die größte Abweichung vom Sollwert $24\ \text{nm}$, was einer prozentualen Abweichung von 13 % entspricht und einen vergleichswisen hohen Wert darstellt. Beim

Vergleich der Einzelschichtdicken verschiedener Wafer untereinander sind deutliche Schwankungen von bis zu 37 nm im Fall der ersten Oxidschicht bzw. 20 nm bei der Gesamtschichtdicke zu erkennen. Wird anhand dieser Daten die Reproduzierbarkeit des Prozesses bewertet, so kann diese als mäßig eingestuft werden, da unterschiedliche Schichtdicken bei den einzelnen Schichtarten die Schichtqualität beeinflussen. Dies betrifft sowohl die intrinsischen Spannungen, als auch die Isolationswirkung an sich, was sich in der Charakterisierung und Anwendung bemerkbar machen kann. Die Variationen bezüglich der Schichtdickenhomogenität sind dabei der Anlage geschuldet und kann nicht durch eine Parameteroptimierung gelöst werden.

6.3.3 Zweite Photolithographie und Ätzen der Isolationsschicht

Um die Kontaktlöcher zu den Elektroden- und Kontaktierungs pads herzustellen, wird im Anschluss an das Abscheiden des Isolatorstapels ein zweiter Photolithographieschritt durchgeführt. Durch diesen Prozess werden die Öffnungen im Resist definiert, welche wiederum im Anschluss durch Ätzprozesse geöffnet werden. Für diese zweite Lithographie werden dieselben Materialien wie bei der ersten Photolithographie und die bereits optimierten Prozessparameter für den Spincoating-, Belichtungs- und Entwicklungsprozess verwendet. Die Vorgehensweise zur Überprüfung der Homogenität und Reproduzierbarkeit ist ebenfalls zu der in Kapitel 6.3.1 beschriebenen Prozedur identisch. Als Bewertungskriterium wird der Durchmesser der Kontaktlochöffnung gewählt (**Abbildung 6.28 a**).

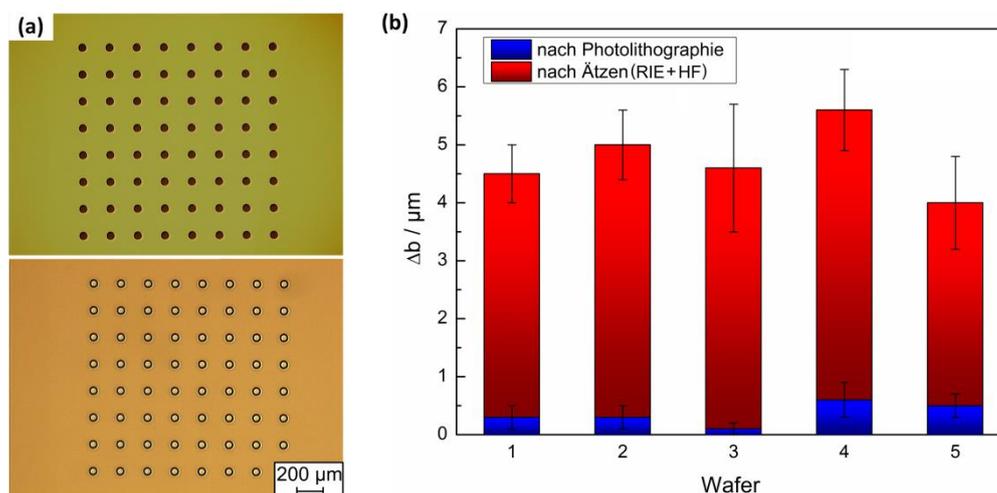


Abbildung 6.28: (a) Vergleich der Kontaktlochöffnungen der Maske (oben) mit den durch Photolithographie prozessierten Strukturen im Resist (unten). (b) Mittelwerte der Vergrößerung des Kontaktlochdurchmessers Δb nach der Photolithographie und dem Ätzen ($n=6$).

Im Vergleich zur Maske sind die Strukturen auf dem Substrat im Mittel zwischen 0,1 und 0,6 µm verbreitert. Die Verbreiterung der Strukturen resultiert aus der Tatsache, dass nicht wie in der ersten Photolithographie eine Hellfeldmaske (Strukturen sind lichtundurchlässig),

sondern eine Dunkelfeldmaske (Strukturen sind lichtdurchlässig) verwendet wird. Die relative Strukturveränderung ist allerdings mit jener nach der ersten Lithographie zu vergleichen und kann ebenfalls mit einer geringfügigen Überbelichtung und/oder Überentwicklung erklärt werden. Die Homogenität der Strukturübertragung auf einem Wafer ist gut, was anhand der niedrigen Standardabweichung zu erkennen ist. Aufgrund der nur geringen Unterschiede, die von Wafer zu Wafer detektiert werden und erneut prozessbedingten Schwankungen unterliegen, kann wieder von einer guten Reproduzierbarkeit gesprochen werden.

Das Ätzen der Kontaktlöcher wird mittels reaktivem Ionenätzen durchgeführt. Um ein möglichst anisotropes Ätzprofil zu generieren wird als Reaktordruck 1,33 Pa und als Leistung des Hochfrequenzgenerators 100 W eingestellt. Als Ätzmedien werden Tetrafluormethan mit einem Teilchenstrom von 25 sccm und Sauerstoff mit einem Teilchenstrom von 3,1 sccm eingesetzt, wobei primär das Tetrafluormethan für den Abtrag der Nitrid- und Oxidschicht verantwortlich ist und der Sauerstoff zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit eingesetzt wird. Zur Bestimmung der optimalen Ätzdauer wird mit Hilfe des mechanischen Oberflächenprofilometers die Ätztiefe überprüft (**Abbildung 6.29 a**).

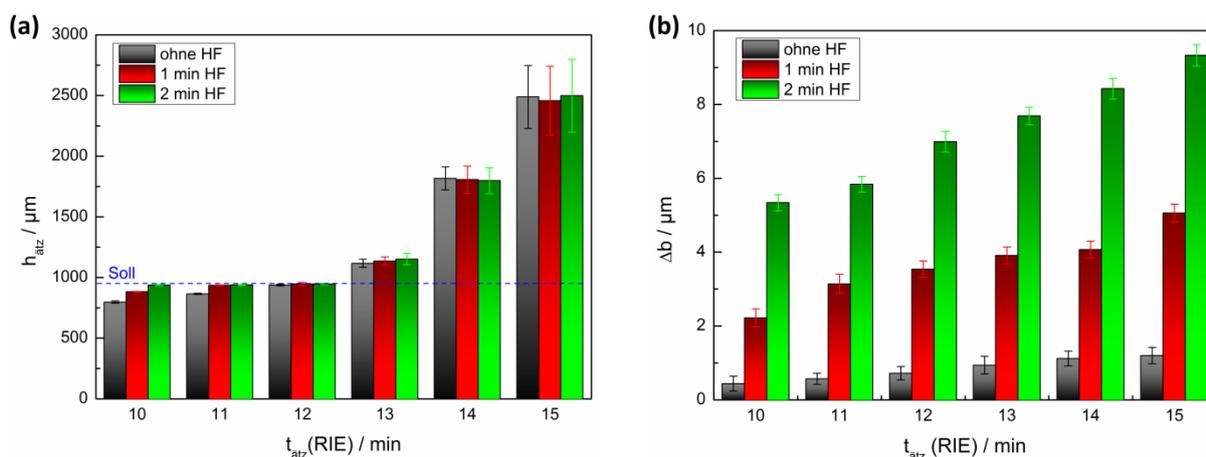


Abbildung 6.29: Vergleich von (a) Abtrag $h_{\text{ätz}}$ und (b) Änderung der Strukturbreite Δb bei verschiedenen Ätzzeiten der RIE $t_{\text{ätz}}(\text{RIE})$ und Verwendung einer HF-Ätzung ($n=5$).

Nach Auswertung der Ergebnisse beträgt die optimierte Ätzzeit 12 min. Beim Überschreiten dieser Ätzzeit kann infolge des Ionenbombardements neben einer Verbreiterung der Strukturen auch ein starkes Aufrauen bis hin zu einer Ätzung der Goldoberfläche und des darunter befindlichen Substratmaterials auftreten, was die teilweise oder komplette Zerstörung der Nanostrukturen zur Folge hat (**Abbildung 6.30 a**).

Des Weiteren wird festgestellt, dass das reaktive Ionenätzen allein nicht ausreicht, die Isolationsschicht um die Nanostrukturen herum effizient abzutragen (**Abbildung 6.30 b**). Da der PECVD-Prozess im Allgemeinen eine sehr gute Kantenbedeckung auch bei unterschrittenen Strukturen aufweist, muss die Isolationsschicht, welche sich unterhalb der überwachsenen

Strukturen befindet, mit einem isotropen Ätzprozess entfernt werden. Aus diesem Grund wird dem Prozess ein Ätzschritt in Flußsäure (HF) angehängt, der sowohl die Oxid- als auch die Nitridschicht um die Nanostrukturen herum isotrop entfernt. Allerdings werden durch den Ätzschritt mit Flußsäure auch die Kontaktlochöffnungen in die Breite geätzt (**Abbildung 6.30 c**). Daher werden verschiedene Zeiten der Flußsäureätzung getestet und im Anschluss die Breite der Kontaktlöcher mit dem Mikroskop gemessen. Diese werden mit den Ergebnissen der Photolithographie verglichen. **Abbildung 6.28 b** und **Abbildung 6.29 b** belegen, dass die optimale Ätzzeit bei etwa 1 min liegt. Bei Zeiten kleiner 1 min wird die ONONO-Schicht um die Nanostrukturen hingegen nicht vollständig entfernt. Bei einer Erhöhung der Ätzzeit werden lediglich die Kontaktlöcher verbreitert. Ab einer Ätzzeit von 2 min sind die Kontaktlochöffnungen bereits so groß, dass diese breiter als die darunterliegende Elektrode selbst sind.

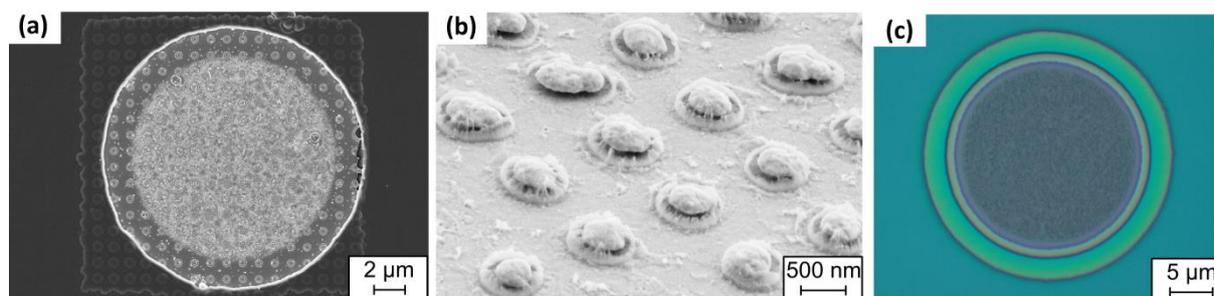


Abbildung 6.30: (a) Ätzangriff auf die Elektrodenoberfläche bei verlängerter Trockenätzung. (b) Isolationsschichtreste um die Nanostrukturen bei nicht durchgeführter Flußsäure-Ätzung. (c) Effekt einer 1 min Flußsäure-Ätzung auf die Strukturbreite (grüner Ring).

Die Strukturverbreiterung beträgt mit den optimierten Ätzzeiten (RIE: 12 min, HF: 1 min) im Mittel zwischen 3,5 und 5,0 μm , wobei die Standardabweichung zwischen 0,5 und 1,0 μm liegt (Abbildung 6.28 b). Im Vergleich zur Photolithographie ist die Verbreiterung infolge des Ätzangriffs sehr stark und führt zu einer Verringerung der Homogenität und Reproduzierbarkeit. Bei der getrennten Betrachtung der beiden Ätzverfahren lässt sich erkennen, dass vor allem die HF-Ätzung infolge des isotropen Ätzabtrags zu einer wesentlichen Verbreiterung der Struktur führt. Durch die verbreiterte Elektrodenöffnung ergeben sich zunächst keine weiteren Probleme bezüglich der Anwendung, da die Elektrode in ihrer Breite um 10 μm größer dimensioniert ist als der Kontaktlochdurchmesser. Mit den optimierten Parametern kann eine erfolgreiche Mikrostrukturübertragung erfolgen (**Abbildung 6.31**).

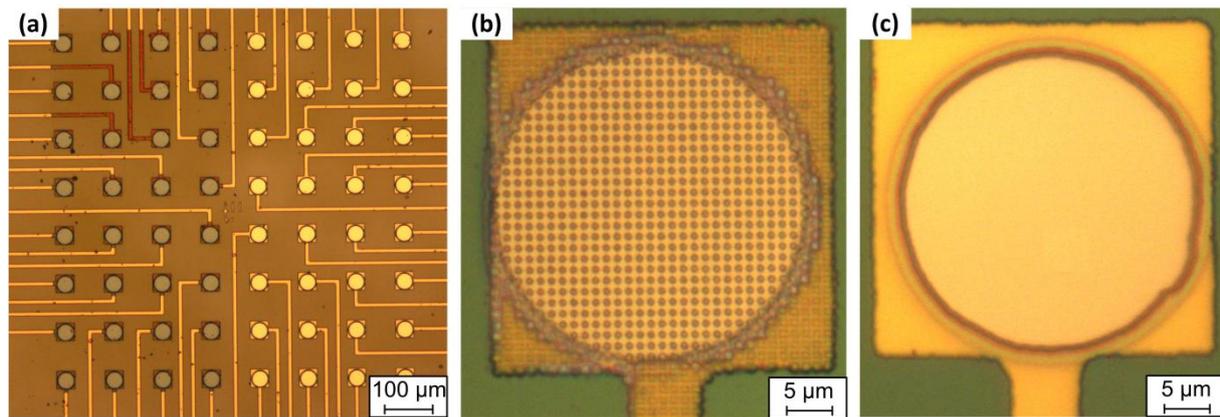


Abbildung 6.31: Mikroskopaufnahmen nach der Kontaktlochöffnung bei optimierten Prozessparametern zeigen (a) ein gesamtes Strukturarray, (b) eine nanostrukturierte und (c) unstrukturierte Elektrode.

6.3.4 Bewertung des Mikrostrukturierungsprozesses

Der Mikrostrukturierungsprozess umfasst die Prozessschritte der Photolithographie, der plasmaunterstützten chemischen Gasphasenabscheidung sowie nasschemische und Trockenätzprozesse. Die zur Mikrostrukturierung erforderliche Grundlage zur Strukturübertragung erfüllt dabei die Photolithographie. Diese ist im Spincoating- als auch im eigentlichen Belichtungs- und Entwicklungsprozess sehr homogen und reproduzierbar. Dies wird zum einen durch die geringe Standardabweichung von maximal $0,3\ \mu\text{m}$ belegt. Zum anderen beschränken sich Veränderungen im Vergleich zur Originalstruktur (durch Verbreitern oder Verkleinern) hierbei im Mittel auf Werte zwischen $0,1$ und $0,9\ \mu\text{m}$. Im Gegensatz dazu weist die Abscheidung des Isolatorstapels größere Varianzen auf. Dies betrifft sowohl die Gesamtschichtdicke der abgeschiedenen Schicht, als auch die Einzelschichten selbst, die in ihrer Schichtdicke zwar auf dem jeweiligen Wafer homogen, allerdings weniger gut reproduzierbar sind. So werden beispielsweise Schichtdickenunterschiede bis zu $24\ \text{nm}$ innerhalb einer Schicht detektiert, welches gemessen am Sollwert einer Abweichung von $13,3\ \%$ entspricht. Durch diese Unterschiede in der Schicht- und Schichtdickenzusammensetzung können beim Vergleich der Chips sowohl lokal auf einem Wafer als auch bei Chips verschiedener Wafer entsprechende Variationen in der Charakterisierung und Zellsignalerfassung auftreten.

Ein wesentlicher Faktor, der die Maßhaltigkeit bzw. die Geometrie der Strukturen beeinflusst, ist der nasschemische, isotrope Ätzprozess. Die Veränderung der Strukturbreite liegt beim Ätzen von Gold und Titan im Mittel bei maximal $1,3\ \mu\text{m}$, die mittlere Veränderung der Strukturbreite beim Öffnen der Isolationsschicht bei maximal $5,0\ \mu\text{m}$. Die Strukturveränderung durch das Ätzen kann sich ebenfalls auf die Resultate der elektrochemischen Charakterisierung auswirken, da beispielsweise die Elektrodenöffnung maßgeblich auch die Größe der gemessenen Impedanz, des Rauschens und schließlich der Signalqualität bestimmt. Da allerdings diese Prozessschwankungen auf ein und demselben Chip nicht zum Tragen kommen, wird im Hinblick auf die initiale Aufgabenstellung, also den direkten Vergleich von nano-

und unstrukturierten Elektroden in ein und demselben Versuch, keine Beeinträchtigung erwartet.

Mit den während des Herstellungsprozesses ermittelten Parametern können nanostrukturierte MEA-Chips gefertigt werden, die eine gute Homogenität und Reproduzierbarkeit aufweisen, welche lediglich anlagenbedingte Prozessschwankungen unterliegen. Mit den hergestellten MEA-Chips und ihren unterschiedlichen Nanostrukturlayouts (**Abbildung 6.32**) kann im Folgenden eine Charakterisierung hinsichtlich der elektrochemischen Eigenschaften durchgeführt und Effekte der Nanostrukturierung detektiert werden.

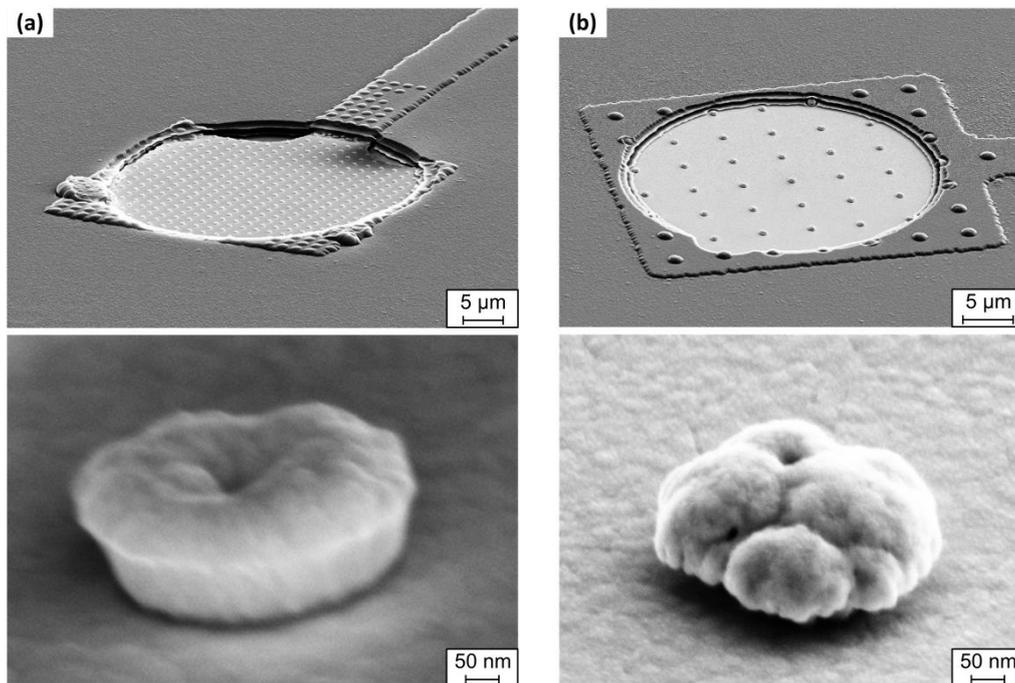


Abbildung 6.32: REM-Aufnahmen nanostrukturierter Mikroelektroden nach Prozessende. Repräsentativ dargestellt sind (a) überwachsene Röhrenstrukturen mit 300 nm Stildurchmesser und 1 µm Abstand und (b) überwachsene Säulenstrukturen mit 300 nm Stildurchmesser und 5 µm Abstand.

7 Elektrochemische Charakterisierung und Rauschverhalten 3D-nanostrukturierter MEAs

In diesem Kapitel werden zunächst kurz die Methoden der Cyclovoltammetrie sowie der elektrochemischen Impedanzspektroskopie vorgestellt, bevor im Anschluss die Messergebnisse präsentiert werden. Zur Überprüfung des Messaufbaus und der Evaluierungsmethoden selbst werden dabei zunächst Vorversuche mit makroskopischen Goldplättchen als Elektroden durchgeführt. Daran anschließend werden mit demselben Messaufbau die hergestellten nanostrukturierten MEA Chips untersucht. In diesem Zusammenhang wird überprüft, inwiefern sich das Verhalten der Mikroelektroden von den Makroelektroden unterscheidet und ob die nanostrukturierten Mikroelektroden bessere Eigenschaften gegenüber den unstrukturierten Mikroelektroden haben. Im Fokus der Auswertung stehen die Bestimmung des Ladungstransfers und der Impedanz. Aus diesen Informationen lassen sich dann Rückschlüsse auf die tatsächliche, elektrochemisch aktive Oberfläche der Elektroden ziehen. Insbesondere die Impedanz der Elektroden beeinflusst das Rauschen während der zellbiologischen Messungen, sodass dieses Kapitel abschließend die Bestimmung des Rauschverhaltens präsentiert. Dadurch wird eine Brücke von den elektrochemischen Messungen zu den Messungen der Zellsignale, welche in Kapitel 8 vorgestellt werden, geschlagen.

7.1 Elektrochemische Methoden

7.1.1 Cyclovoltammetrie

Bei der Cyclovoltammetrie (CV) wird eine Dreielektrodenanordnung gewählt, bestehend aus einer Arbeitselektrode (*working electrode*, WE), einer Referenzelektrode (*reference electrode*, RE) und einer Gegenelektrode (*counter electrode*, CE). Zwischen WE und RE wird ein sich zeitlich ändernder, dreieckförmiger Potentialverlauf vorgegeben, welcher nach Erreichen eines Umkehrpotentials wieder zu dem Ausgangspotential zurückgeführt wird (**Abbildung 7.1**). Die Umkehrpotentiale werden dabei so gesetzt, dass das Potential der WE zwischen Wasserstoff- und Sauerstoffentwicklung pendelt. Dies hat den Vorteil, dass die Elektroden während der Messung automatisch aktiviert werden, da adsorbierte Verunreinigungen aus dem Elektrolyten entfernt werden und somit eine Blockade aktiver Oberflächenzentren unterbunden wird. Neben der Einstellung der Umkehrpotentiale hat auch die Geschwindigkeit der Potentialänderung (Vorschubgeschwindigkeit) einen Einfluss auf die Messung, da sie die Kinetik der Vorgänge beeinflusst. Der Stromfluss wird zwischen WE und CE detektiert und das Ergebnis in einem Strom-Potential-Diagramm dargestellt. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit und zur Vermeidung von Migrationsströmen wird der elektrochemisch aktiven Spezies ein Grund- bzw. Leitelektrolyt hinzugesetzt. Da sich die Elektroden in ruhender, relativ konzentrierter Lösung befinden, ist die entscheidende Stofftransportgröße die Diffusion. Die Cyclovoltammetrie

zeigt also vor allem die Präsenz elektrochemischer Reaktionen, wobei das Potential als treibende Kraft für die Reaktionen angesehen werden kann und der Strom als Maß der Reaktionsrate zu betrachten ist. Dadurch können beispielsweise Informationen über thermodynamische Daten und Kinetiken elektrochemischer Reaktionen, die Reversibilität dieser Reaktionen, die Stabilität der Elektrode und des Elektrolyten gewonnen werden. Die Messergebnisse sind dabei abhängig vom Elektrodenmaterial, der Elektrodengröße und der Elektrodenbeschaffenheit, vom Elektrolyt, den Umkehrpotentialen sowie der Vorschubgeschwindigkeit⁶⁸.

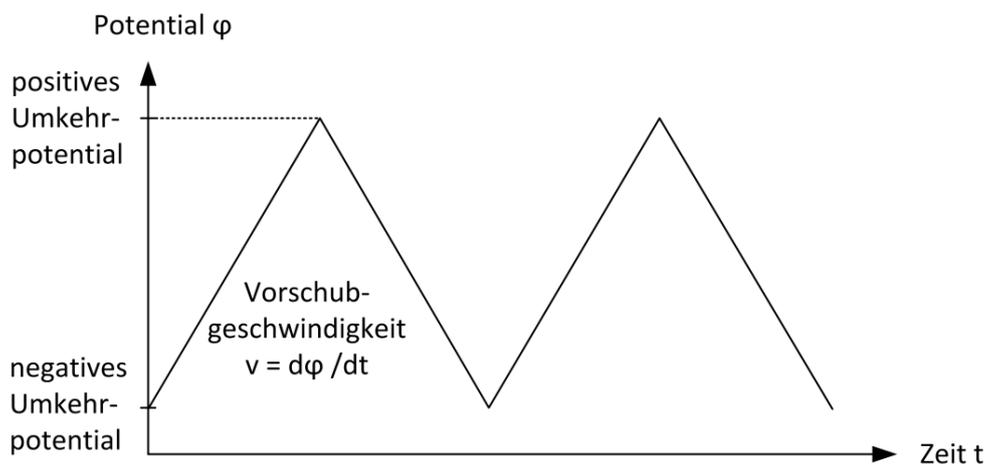


Abbildung 7.1: Potential-Zeit-Verlauf bei der Cyclovoltammetrie.

7.1.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Im Gegensatz zur CV-Messung, bei der ein Gleichstrom das System durchfließt, wird bei der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) ein, um einen Arbeitspunkt (Gleichgewichtspotential/Biasspannung) oszillierender, Wechselstrom konstanter Amplitude aber variierender Frequenz zur Charakterisierung des Systems verwendet (**Abbildung 7.2**). Dadurch besteht die Möglichkeit die Frequenzabhängigkeit der betrachteten Widerstände und Kapazitäten zu bestimmen. Lediglich der Elektrolytwiderstand R_E und der Durchtrittswiderstand R_D hängen nicht von der Frequenz ab. Anders als bei der CV-Messung, bei der große Signalauslenkungen bei niedrigen Frequenzen genutzt werden, werden bei der EIS geringe Signalamplituden und mitunter sehr hohe Frequenzen verwendet. Daher ist auch der Informationsgehalt unterschiedlich. Wie bereits beschrieben werden bei CV-Messungen Informationen über chemische Reaktionen oder den Massetransfer generiert, bei EIS-Messungen hingegen steht das elektrische Verhalten im Vordergrund. Bei der Messung wird ebenfalls eine Dreielektrodenanordnung verwendet, wobei eine sinusförmige Wechselspannung zwischen WE und RE angelegt und so das System aus seiner Gleichgewichtslage gebracht wird. Die korrespondierende Wechselstromantwort wird zwischen AE und CE gemessen. Dabei kann der Strom um eine Phase φ zur Spannung verschoben sein. Aus den Daten der Spannung und des

Stroms wird die (komplexe) Impedanz Z berechnet. Diese besteht aus einem Realteil $\Re(Z)$ sowie einem Imaginärteil $\Im(Z)$ und ist allgemein definiert über:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_m \sin(\omega t + \varphi_u)}{I_m \sin(\omega t + \varphi_i)} = \Re(Z) + i\Im(Z) = |Z|e^{i\varphi} \quad (7.1)$$

wobei $U(t)$ die angelegte Spannung, $I(t)$ der detektierte Strom, U_m die Spannungsamplitude und I_m die Stromamplitude, ω die Frequenz, φ_u und φ_i die Phase von Spannung respektive Strom (mit $\varphi = \varphi_u - \varphi_i$) und i die imaginäre Zahl ist⁶⁸.

Die wesentlichen Parameter während der Messung sind das Arbeitspotential sowie der Frequenzbereich, der während der Messung untersucht wird. Letzterer liegt typischerweise zwischen einigen mHz und wenigen MHz. Da ein lineares Antwortverhalten des Systems impliziert wird, darf die Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand nicht allzu groß sein. Daher liegt die Amplitude der sinusförmigen Wechselspannung in einem Größenordnungsbereich bis zu etwa 25 mV¹⁸³.

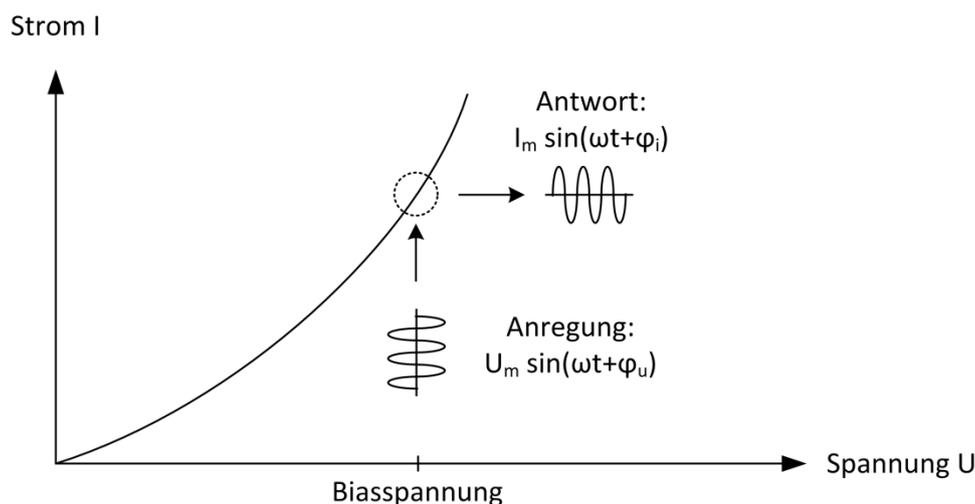


Abbildung 7.2: Prinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie, bei der eine Wechselspannung angelegt und der sich ausbildende Wechselstrom detektiert wird (adaptiert von Moosbauer¹⁸⁴).

Bei der Auswertung wird versucht, das elektrochemische System mit konzentrierten elektrischen Bauelementen zu modellieren. Dabei sind den einzelnen Elementen elektrochemische oder physikalische Eigenschaften des Systems zugeordnet (**Abbildung 7.3**). Dieses sogenannte elektrochemische Ersatzschaltbild enthält im Fall einer Metallelektrode, welche in Kontakt mit dem Elektrolyt steht, die Doppelschichtkapazität C_{dl} (repräsentiert Ladungsaufbau an der Grenzfläche Elektrolyt/Elektrode), den Elektrolytwiderstand R_E sowie den Durchtrittswiderstand R_D (als lineare Modellierung des Ladungsdurchtritts). Wird die Reaktionskinetik durch Diffusion beeinflusst, so wird ein weiterer komplexer Konzentrationswiderstand, die so-

nannte Warburgimpedanz Z_W , hinzugefügt. Diese kann als Reihenschaltung eines frequenzabhängigen Widerstands und einer frequenzabhängigen Kapazität aufgefasst werden⁶⁸.

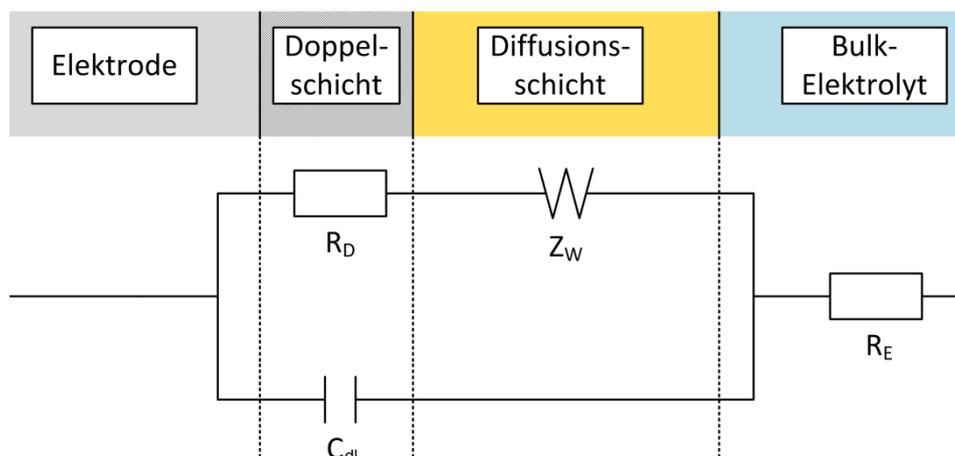


Abbildung 7.3: Elektrochemisches Ersatzschaltbild einer Halbzelle (adaptiert von Buitenweg et al.¹⁶⁶).

Die Auftragung der Impedanz kann grundsätzlich in zwei Varianten erfolgen: Im sogenannten Nyquist-Diagramm wird der negative Imaginärteil des Impedanzbetrags gegen den Realteil des Impedanzbetrags aufgetragen. Für kinetisch kontrollierte Systeme liefert diese Darstellung einen Halbkreis. Aus dieser lassen sich direkt Informationen bezüglich des Elektrolytwiderstands, des Durchtrittswiderstands und der Doppelschichtkapazität ableiten. Bei diffusionskontrolliertem Stofftransport führt die Warburgimpedanz indes dazu, dass im Nyquist-Diagramm bei geringen Frequenzen der Halbkreis in eine Gerade mit einer Steigung von 45° übergeht. Aus diesem Grund kann anhand der Kurvenform des Nyquist-Diagramms eine schnelle Aussage über diffusions- oder durchtrittskontrolliertes Verhalten getroffen werden. Die Darstellung der Frequenz ist hingegen nur implizit enthalten. Im Bode-Diagramm wird hingegen der Logarithmus des Impedanzbetrags sowie der Phasenwinkel gegen den Logarithmus der Frequenz aufgetragen. Neben einer detaillierten Aufteilung nach Frequenzen lassen sich dieselben Informationen über Doppelschichtkapazität, Elektrolytwiderstand, etc. extrahieren. Das Bode-Diagramm eignet sich jedoch besser, um die Frequenzabhängigkeiten von Impedanzbetrag und Phasenwinkel ersichtlich zu machen⁶⁸.

7.2 Versuchsaufbau zur elektrochemischen Charakterisierung

Die vorliegenden Versuchsreihen gliedern sich in Vorversuche zur Evaluierung der Versuchsmethoden und der eigentlichen Charakterisierung der nanostrukturierten MEAs, wobei ein und derselbe Versuchsaufbau genutzt wird. Zur Durchführung der CV und EIS wird eine Dreielektrodenanordnung verwendet (**Abbildung 7.4**). Bei den Vorversuchen werden einfache, unstrukturierte und makroskopische Goldplättchen verschiedener Flächen als Makro-

elektroden eingesetzt, welche als Arbeitselektrode kontaktiert werden. Dazu wird derselbe Halter wie für die elektrochemische Abscheidung verwendet (Kapitel 6.2), auf dem die Goldplättchen elektrisch leitfähig mit einem Kupferklebeband an ein Kupferplättchen kontaktiert werden können. Bei den Messungen der MEA-Chips wird die zu untersuchende Mikroelektrode als Arbeitselektrode geschaltet und über einen vergoldeten Anschlusspin am Trägersubstrat kontaktiert. Als Referenzelektrode wird eine Silber-Silberchlorid-Elektrode und als Gegenelektrode eine Platinelektrode verwendet. Sowohl Spannungsregelung als auch Stromdetektion werden von einem Potentiostaten (SP-200, Biologic) übernommen. Für die Auswertung der CV-Messungen und EIS-Spektren wird die zum Potentiostat korrespondierende Software (EC-Lab v.10.37) genutzt. Im Fall der EIS können die Daten zusätzlich mit verschiedenen Ersatzschaltbildern analysiert und mit simulierten Werten verglichen werden.

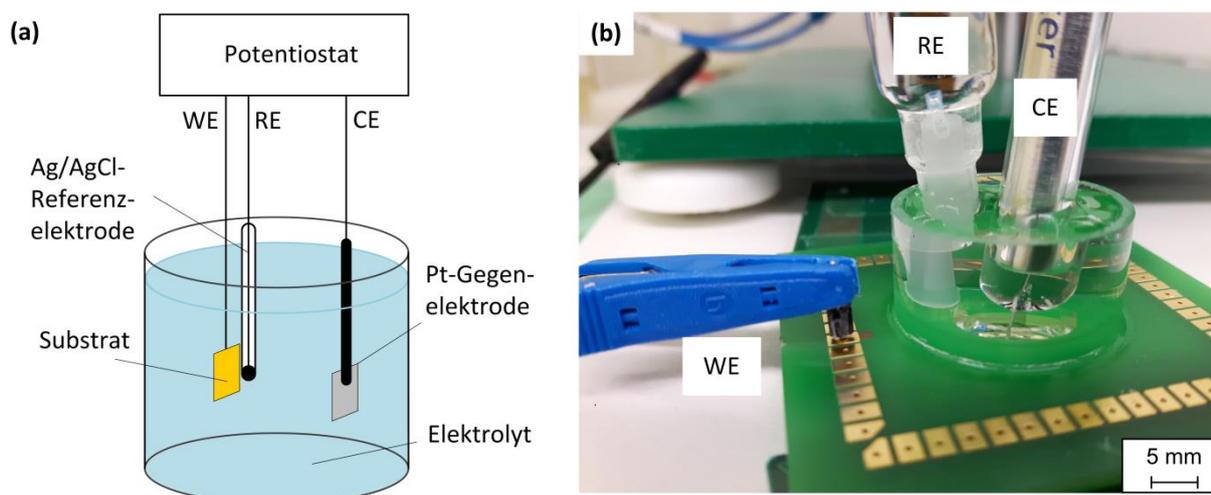


Abbildung 7.4: (a) Schematische Darstellung des Messaufbaus bezüglich der elektrochemischen Charakterisierung an Makroelektroden und (b) Messaufbau zur elektrochemischen Charakterisierung an nanostrukturierten MEAs.

Bei den CV-Messungen werden als Elektrolyte je nach Versuchsziel zum einen 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) in 0,5 M Natriumsulfat (Na_2SO_4) und zum anderen 3 M Kaliumchlorid (KCl) verwendet. Um Oxidationseffekte zu verhindern, wird die Lösung vor jeder Messung einige Minuten lang mit Stickstoff gespült. Die Kaliumhexacyanoferratlösung dient dabei zur Untersuchung der Umsetzung einer elektrochemisch aktiven Spezies. Die Kaliumchloridlösung beinhaltet hingegen keine elektrochemisch aktive Komponente und wird zur Ermittlung eines Deckschichtdiagramms eingesetzt, womit sich der Ladungstransfer bestimmen lässt. Eingesetzt werden Vorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 100 V/s, die sich dabei nach der Fläche der zu untersuchenden Elektrode und dem Versuchsziel richten. Die Spannungsumkehrpunkte werden so gewählt, dass eine Wasserstoff- bzw. Sauerstoffentwicklung gerade nicht erreicht wird. Diese werden für die beiden eingesetzten Elektrolyte getrennt evaluiert und betragen sowohl für die KCl-Lösung als auch für die Kali-

umhexacyanoferrat-Lösung -0,4 und 0,8 V. Für die Messungen der EIS wird die Kaliumhexacyanoferrat-Lösung als Elektrolyt verwendet. Dabei werden Frequenzen zwischen 100 mHz und 100 kHz analysiert. Die Amplitude der sinusförmigen Spannung beträgt 10 mV, die Biasspannung selbst 0 V. Zunächst werden die CV-Messungen und anschließend die EIS-Messungen durchgeführt, bevor die Messelektrode gewechselt und frischer Elektrolyt eingefüllt wird. Sowohl die CV- als auch die EIS-Messung werden zwischen drei und zehn Mal wiederholt, um mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklen zu detektieren.

7.3 Elektrochemische Charakterisierung von unstrukturierten Makroelektroden

7.3.1 Cyclovoltammetrie

Zur Evaluierung der Cyclovoltammetrie an Goldplättchen wird zunächst die Reversibilität des Systems Kaliumhexacyanoferrat untersucht. Dafür wird ein Goldplättchen mit einer Fläche von 600 mm^2 verwendet und CV-Kurven mit verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten von 10, 30, 50 und 100 mV/s aufgenommen. Zur Überprüfung der Stabilität der Redoxreaktion werden insgesamt zehn Zyklen durchgeführt. **Abbildung 7.5 a** zeigt das CV-Diagramm des Goldplättchens bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten v .

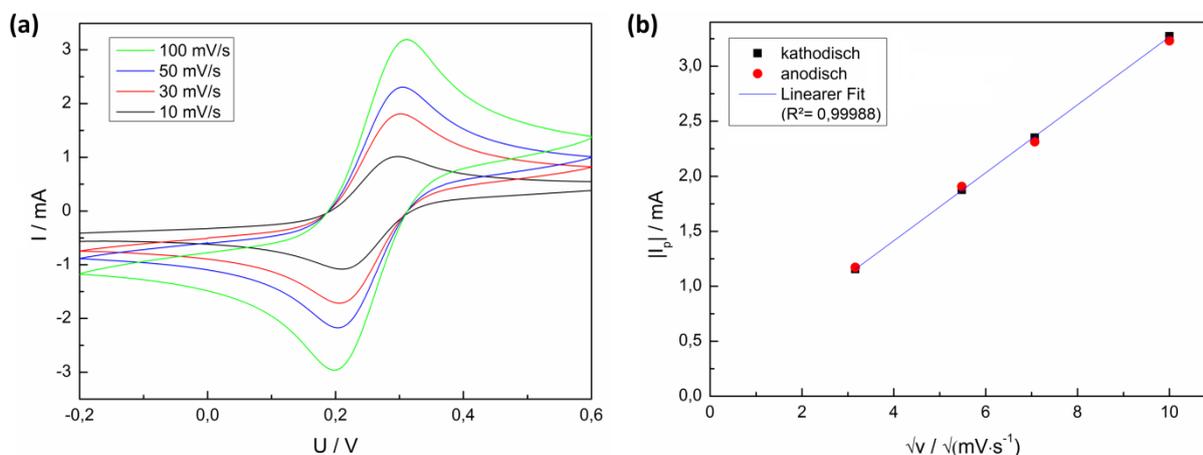


Abbildung 7.5: (a) CV-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen mit verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten. (b) Das Auftragen des Betrags des anodischen und kathodischen Spitzenstroms $|I_p|$ gegenüber der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit v zeigt ein lineares Verhalten.

Die CV-Messung zeigt den für das betrachtete System (Goldelektrode, Kaliumhexacyanoferrat) typischen Verlauf der CV-Kurve mit anodischem Oxidations- und kathodischem Reduktionspeak. Des Weiteren ist ein deutlicher Anstieg der kathodischen und anodischen Peakströme $I_{p,k}$ und $I_{p,a}$ mit steigender Vorschubgeschwindigkeit feststellbar. Die Potentiallagen E_a

und E_k der Peaks ändern sich nur unwesentlich und liegen zwischen 0,20 und 0,21 V auf kathodischer und zwischen 0,30 und 0,31 V auf anodischer Seite. Das Verhältnis von kathodischem und anodischem Spitzenstrom liegt zwischen 0,98 und 1,02. Beim Vergleich der verschiedenen Zyklen untereinander (hier nicht dargestellt) werden keine signifikanten Veränderungen im CV-Diagramm festgestellt, sodass von stabilen Redox-Reaktionen auszugehen ist.

Befinden sich im Elektrolyt elektrochemisch aktive Substanzen (hier: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ bzw. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$), so überlagert sich deren Strom-Spannungs-Charakteristik den Deckschichtströmen. Die zu beobachtenden Strommaxima stammen im Allgemeinen von Redox-Reaktionen der elektrochemisch aktiven Substanzen, können aber auch aufgrund der Tatsache resultieren, dass die elektroaktiven Spezies während des Durchlaufs des Elektrodenpotentials in der Diffusionsschicht verarmen: In ruhender Lösung fällt die Oberflächenkonzentration der reagierenden Spezies nach dem Erreichen des Reaktionspotentials bei weiterem Potentialanstieg rasch von der Anfangskonzentration auf den Wert null ab. Für den Verlauf des Stroms bzw. der Stromdichte bedeutet dies ein Anstieg der Kurve bis ein Strommaximum erreicht ist. Durch das simultane „Wachstum“ der Diffusionsschicht in das Elektrolyttinnere hinein, fällt dann im weiteren Verlauf die Stromdichte wieder ab, bis die (hier natürliche) Konvektion das weitere Wachstum der Diffusionsschicht unterbindet und sich die Stromdichte auf einen konstanten Wert einstellt⁶⁸. Der Anstieg der Peakströme mit wachsender Vorschubgeschwindigkeit lässt sich damit erklären, dass im gleichen Zeitraum die Konzentration an elektroaktiven Substanzen schneller auf null absinkt und dadurch das Wandern der Diffusionsschicht ins Elektrolyttinnere noch nicht so weit fortgeschritten ist, als wenn geringere Vorschubgeschwindigkeiten eingestellt werden. Wird der kathodische bzw. anodische Peakstrom gegen die Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit aufgetragen, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang (**Abbildung 7.5 b**). Zudem fällt auf, dass sich die Potentiallage des Peakstroms abhängig von der Geschwindigkeit des Potentialdurchlaufs leicht in Richtung des Potentialanstiegs verschiebt. Ausgehend von diesen beiden Erkenntnissen muss von einem zumindest teilweise gehemmten Ladungsdurchtritt ausgegangen werden, sodass sich die Elektrodenkonzentrationen langsamer einstellen und im Vergleich zum vollständig ungehemmten Ladungsdurchtritt auch das Strommaximum entsprechend später erreicht wird. Beim Vergleich der anodischen und kathodischen Peakströme ist zu erkennen, dass diese in etwa betragsgleich sind. Daher kann die vorliegende Reaktion als reversibel angesehen werden. Das bedeutet, dass die elektrochemischen Reaktionen im Potentialbereich der Strommaxima durch den Massetransport kontrolliert werden. Da keine Rührung des Elektrolyts erfolgt, ist im speziellen die Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Faktor.

In einem zweiten Versuch wird der Einfluss der Elektrodengröße auf das Messergebnis untersucht. Dazu werden vier Goldplättchen mit den Flächen 144, 52, 22 und 4 mm² bei einer konstanten Vorschubgeschwindigkeit von 30 mV/s untersucht und ausgewertet. **Abbildung 7.6 a** zeigt das Ergebnis der Messungen bei variierender Fläche der Goldplättchen. Auch hier ist zunächst der typische Kurvenverlauf erkennbar. Erwartungsgemäß ist zudem ein Anstieg der

Spitzenströme mit steigender Fläche zu beobachten. Da die Vorschubgeschwindigkeit konstant gehalten und nur die Fläche der Elektroden variiert wird, bleibt die Potentiallage der Peakströme nahezu gleich. Wird der kathodische bzw. anodische Spitzenstrom gegen die Fläche der Goldplättchen aufgetragen, so ist auch hier ein linearer Zusammenhang festzustellen (**Abbildung 7.6 b**). Diese Erkenntnis lässt sich auch auf die späteren Messungen mit nanostrukturierten Mikroelektroden übertragen: Werden die Peakströme von nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden miteinander verglichen, so kann bei sonst gleichen Versuchsbedingungen ein Anstieg des Peakstroms direkt auf die vergrößerte Fläche durch die Nanostrukturen zurückgeführt werden.

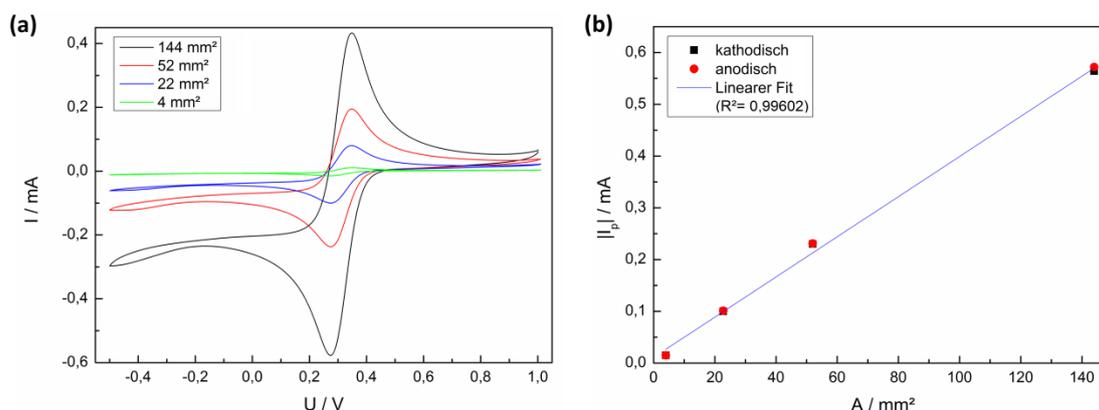


Abbildung 7.6: (a) CV-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen unterschiedlicher Fläche bei konstanter Vorschubgeschwindigkeit. (b) Das Auftragen des kathodischen bzw. anodischen Spitzenstroms $|I_p|$ gegenüber der Fläche A der Goldplättchen zeigt ein lineares Verhalten.

7.3.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Zur Evaluierung der EIS werden erneut die bereits in den Versuchen zur CV-Messung charakterisierten Goldplättchen untersucht und die Impedanz im Frequenzbereich von 100 mHz bis 100 kHz bestimmt. Das Ziel der Versuche ist die Generierung eines typischen Signalverlaufs und die Ermittlung der Doppelschichtkapazität, des Elektrolyt- sowie des Durchtrittswiderstands. Dafür wird die Messkurve mittels des in Abbildung 7.3 dargestellten elektrochemischen Ersatzschaltbilds analysiert und die Parameter ermittelt. Daneben wird die Auswirkung der Elektrodenoberfläche auf das Messergebnis untersucht. Die Ergebnisse der Messreihen sind in **Abbildung 7.7** zusammengefasst. Die Abbildungen 7.7 a und b zeigen das Nyquist-Diagramm der Messungen der unterschiedlichen Goldplättchen. Bei hohen Frequenzen kann durchtrittskontrolliertes Verhalten beobachtet werden, was sich im Nyquist-Diagramm in der Ausbildung eines Halbkreises äußert. Mit kleiner werdenden Frequenzen dominiert hingegen der Anteil der Diffusion als geschwindigkeitsbestimmender Prozess, was zu der Ausbildung einer Geraden mit einem Winkel von 45° führt. Das beschriebene Verhalten kann für alle Flächen gleichermaßen beobachtet werden und hängt direkt mit der eingesetzten Frequenz zu-

sammen. Aufgrund des angelegten Wechselstroms kann sich an der Elektrode nur ein quasi-stationärer Zustand einstellen. Dieser führt außerdem zu einer Ausbildung von Konzentrations-schwingungen, die sich in Form einer gedämpften Welle in das Elektrolyttinnere ausbilden. Insbesondere bei kleinen Frequenzen wird die Reaktionsrichtung (von Oxidation zu Reduktion und umgekehrt) nur langsam geändert, was den Einfluss der Diffusion als geschwindigkeitsdominierenden Faktor fördert. Werden indes hohe Frequenzen eingestellt, so erfolgt der Wechsel der Reaktionsrichtung an der Elektrodenoberfläche derart schnell, dass in der Lösung keine merklichen Konzentrationsänderung mehr auftreten, die Diffusionsüberspannung verschwindet und der Einfluss des Ladungsdurchtritts entsprechend überwiegt^{68,76}.

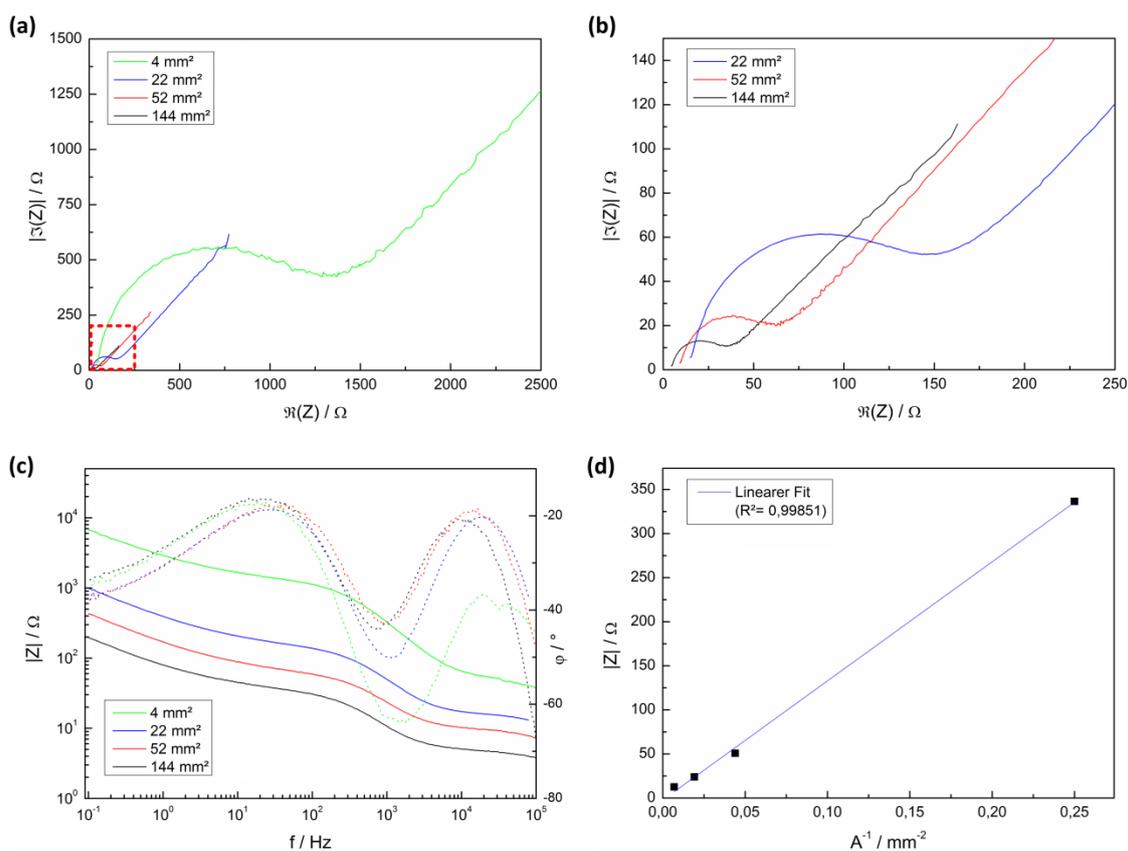


Abbildung 7.7: (a) Nyquist-Diagramm der EIS-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen unterschiedlicher Fläche. (b) Vergrößerung des Ausschnitts aus (a) (ohne 4 mm²-Fläche). (c) Darstellung derselben Messergebnisse im Bode-Diagramm ($|Z|$: durchgezogene Linie, φ : gestrichelte Linie). (d) Das Auftragen des Impedanzbetrags $|Z|$ gegenüber dem Kehrwert der Fläche A^{-1} der Goldplättchen zeigt ein lineares Verhalten.

Des Weiteren lässt sich erkennen, dass die „Größe“ der Kurve und damit die Impedanz im gesamten Untersuchungsspektrum erwartungsgemäß ansteigt, je kleiner die Fläche des Substrats ist. Diese Tatsache lässt sich im Bode-Diagramm genauer veranschaulichen (Abbildung 7.7 c). Ersichtlich ist eine deutliche und gleichmäßige Steigerung des Impedanzbetrags bei allen Frequenzen hinsichtlich der kleiner werdenden Fläche. Beim Auftragen des Impe-

danzbetrags einer Frequenz gegen den Kehrwert der Fläche ist ein lineares Verhalten zu erkennen (Abbildung 7.7 d). Die Impedanz ist flächenabhängig, wobei mit größer werdender Fläche die Impedanz absinkt. Da bis auf die Elektrodengröße keine Änderung am System vorgenommen wird, kann die Änderung der Impedanz direkt auf die Flächenänderung zurückgeführt werden. Aufgrund der umgekehrten Proportionalität von Impedanz und Elektrodenfläche kann anhand der Impedanzmessung auf die effektive Oberfläche einer Elektrode geschlossen werden. Die Impedanz ist somit auch als Messmethode geeignet, um eine Aussage über die Vergrößerung der elektrochemisch aktiven Oberfläche von nanomodifizierten Mikroelektroden zu treffen. Wird hingegen die Phase betrachtet, so kann bei kleineren Frequenzen kein wesentlicher Unterschied in den untersuchten Flächen erkannt werden. Ab einem Frequenzbereich größer 100 Hz verstärkt sich mit zunehmender Frequenz allerdings das kapazitive Verhalten der Proben mit abnehmender Fläche.

Mit Hilfe des elektrochemischen Ersatzschaltbilds können zudem die Parameter für die Doppelschichtkapazität, den Elektrolyt- und Durchtrittswiderstand sowie der Warburgimpedanz ermittelt werden (Abbildung 7.8).

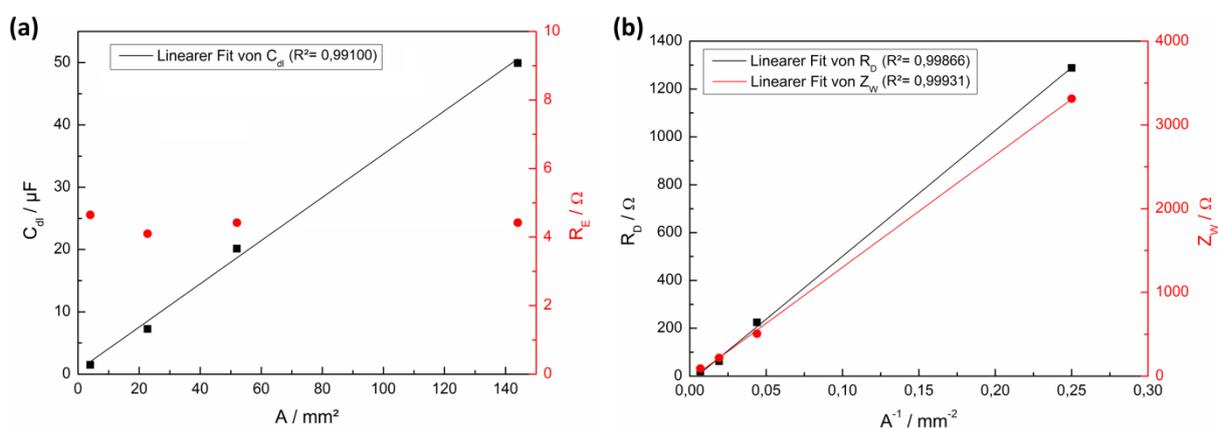


Abbildung 7.8: Ergebnisse der mittels elektrochemischen Ersatzschaltbilds simulierten Parameter für (a) die Doppelschichtkapazität C_{dl} und Elektrolytwiderstand R_E sowie (b) Durchtrittswiderstand R_D und Warburgimpedanz Z_W in Abhängigkeit der Fläche A der Elektroden.

Zu erkennen ist, dass der Elektrolytwiderstand als einziger Parameter keine Variation aufgrund der Fläche aufweist und konstant zwischen einem Wert von 4,1 und 4,6 Ω liegt. Da der Elektrolytabstand allerdings vom Abstand der Elektroden abhängt, kann dieser während den Messungen leicht variieren, wenn sich die Anordnung der Elektroden zueinander ändert. Aufgrund des sogenannten IR-Abfalls vergrößert sich der Elektrolytwiderstand, je größer der Abstand zwischen Arbeits- und Referenzelektrode ist. Werden die anderen Parameter betrachtet, so steigt die Doppelschichtkapazität linear mit wachsender Elektrodenfläche an, der Durchtrittswiderstand und die Warburgimpedanz nehmen hingegen mit wachsender Fläche ab und zeigen erwartungsgemäß eine umgekehrte Proportionalität zur Fläche der Elektroden.

7.4 Elektrochemische Charakterisierung nano- und unstrukturierter Mikroelektroden der hergestellten MEAs

Für die Untersuchungen der elektrochemischen Eigenschaften (und auch der in Kapitel 8 beschriebenen Zellversuche) werden insgesamt zehn MEA Chips verwendet (**Tabelle 7.1**).

Tabelle 7.1: Liste aller zur Charakterisierung verwendeter MEA Chips und deren Eigenschaften, Durchmesser d_{nano} , Strukturabstände l_{nano} und Strukturhöhen.

MEA	Eigenschaften	Nanostrukturhöhe [nm]
P100_1	überwachsene Säulen, d_{nano} : 100 nm, l_{nano} : 1 μm	328 ± 23
P300_1	überwachsene Säulen, d_{nano} : 300 nm, l_{nano} : 1 μm	326 ± 12
P500_1	überwachsene Säulen, d_{nano} : 500 nm, l_{nano} : 1 μm	358 ± 14
T200_1	überwachsene Röhren, d_{nano} : 200 nm, l_{nano} : 1 μm	349 ± 9
T300_1	überwachsene Röhren, d_{nano} : 300 nm, l_{nano} : 1 μm	354 ± 6
T600_1	überwachsene Röhren, d_{nano} : 600 nm, l_{nano} : 1 μm	346 ± 5
P100_5	überwachsene Säulen, d_{nano} : 100 nm, l_{nano} : 5 μm	321 ± 16
P500_5	überwachsene Säulen, d_{nano} : 500 nm, l_{nano} : 5 μm	323 ± 25
T200_5	überwachsene Röhren, d_{nano} : 200 nm, l_{nano} : 5 μm	320 ± 16
T600_5	überwachsene Röhren, d_{nano} : 600 nm, l_{nano} : 5 μm	347 ± 11

Alle Chips weisen einen Mikroelektroden Durchmesser von 30 μm auf (entspricht einer Fläche von etwa 707 μm^2), wobei der Abstand der Einzelelektroden zueinander 200 μm beträgt. Da die Nanostrukturdichte bei Elektroden mit einem Durchmesser von 20 μm oder 30 μm exakt gleich ist, sind auch keine Unterschiede in der elektrochemischen Charakterisierung zu erwarten. In der Anwendung erhöht der größere Elektrodendurchmesser allerdings die Wahrscheinlichkeit der Signaldetektion, da sich die Sensorfläche für die zu detektierenden Zellen vergrößert. Bei Verwendung größerer Elektrodenabstände kann im Vergleich zu den MEAs mit geringem Elektrodenabstand ein *crossstalk* weitestgehend ausgeschlossen werden. Somit unterscheiden sich die Chips lediglich in der Art und Anordnung der Nanostrukturen. Dabei ist anzumerken, dass die Chips mit den Nanostrukturabständen von 1 μm und die Chips mit Abständen von 5 μm von unterschiedlichen Wafern stammen. Beim Vergleich der nanostrukturierten mit den unstrukturierten Elektroden wird zur Bestimmung der Signifikanz der T-Test¹⁸⁵ eingesetzt, wobei ein Signifikanzniveau von 5 % angelegt und im jeweiligen Graph mit einem (*) markiert wird.

7.4.1 Cyclovoltammetrie

Cyclovoltammetrie in Kaliumhexacyanoferrat

Zuerst wird untersucht, ob sich auch mit (nanostrukturierten) Mikroelektroden reversibles Verhalten beobachten lässt und ob entscheidende Unterschiede im Vergleich zu den Makroelektroden erkennbar sind. **Abbildung 7.9** zeigt die Ergebnisse der CV-Messung einer nanostrukturierten Mikroelektrode am Beispiel des MEA-Chips T600_1 bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten v zwischen 20 mV/s und 10 V/s.

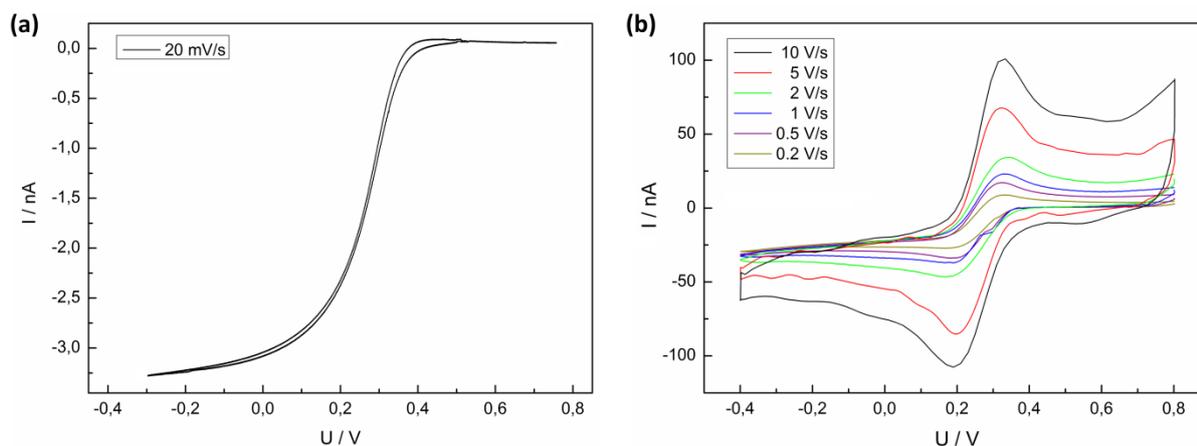


Abbildung 7.9: CV-Messungen an einer nanostrukturierten MEA-Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) mit (a) geringer Vorschubgeschwindigkeit und (b) hohen Vorschubgeschwindigkeiten.

Werden bei den Mikroelektroden Vorschubgeschwindigkeiten in derselben Größenordnung wie bei den Makroelektroden verwendet, so ist im CV-Diagramm zu erkennen, dass der typische Kurvenverlauf verschwindet. Erst ab einer Geschwindigkeit von etwa 200 mV/s entsteht der für dieses System typische Kurvenverlauf mit Reduktions- und Oxidationspeak. Der Grund für die höheren Vorschubgeschwindigkeiten, die bei Mikroelektroden benötigt werden, um das typische CV-Profil inklusive der Oxidations- bzw. Reduktionspeaks zu erhalten, liegt in den sich ändernden Stofftransportmechanismen. Wird der Massetransport an die Elektrodenoberfläche betrachtet, so ist die Diffusion der entscheidende Transportmechanismus. Im Fall der Makroelektroden kann die Diffusion mittels der Bedingung der unendlich ausgedehnten Elektrodenoberfläche bestimmt werden, bei der Randeffekte keine signifikante Rolle spielen. Nehmen die lateralen Abmessungen hingegen ab, sprich wird die Größe der Elektrodenoberfläche auf einen Wert verkleinert, der geringer als die Diffusionslänge ist, so können die Randeffekte nicht mehr vernachlässigt werden. Die bei Makroelektroden beobachtete planare Diffusion ändert sich bei Mikroelektroden zu einer semi-hemisphärischen Diffusion (**Abbildung 7.10**). Diesbezüglich erfolgt ein Stofftransport radial zur Elektrodenoberfläche. Die Ausdehnung der Diffusionsschicht ist zeitlich konstant, wodurch sich ein stationärer Zu-

stand einstellen kann. Durch das veränderte Diffusionsprofil ist der Stofftransport zur Mikroelektrode relativ vergrößert. Unmittelbar mit der Erhöhung des Massetransports ist auch ein schnelleres Erreichen des Gleichgewichtszustandes verbunden. Die vergleichsweise langsamen Vorschubgeschwindigkeiten von 10-100 mV/s, die bei Makroelektroden zur Untersuchung von Elektrodenvorgängen eingesetzt werden, sind also in der Tatsache begründet, dass das System zunächst eine gewisse Zeit benötigt, bis sich ein stationärer Strom einstellen kann. Werden hingegen Mikroelektroden betrachtet, so stellen sich aufgrund der geänderten Diffusionsverhältnisse schon nach relativ kurzen Zeitspannen stationäre Ströme ein. Die weitere Ausbreitung der Diffusionsfelder führt somit zu relativ hohen Diffusionsgeschwindigkeiten. Deshalb bilden sich die typischen Redox-Peaks erst bei höheren Vorschubgeschwindigkeiten zwischen 0,1-10 V/s aus. Bei geringeren Vorschubgeschwindigkeiten bilden sich aufgrund des stationären Zustands hingegen keine Peaks aus und der Verlauf des CV-Diagramms nimmt eine sigmoide Gestalt an. Zudem sind die Kapazitäten, die an Mikroelektroden auftreten vergleichsweise klein und Ladeströme entsprechend weniger relevant, sodass transiente elektrochemische Prozesse beobachtet werden können.

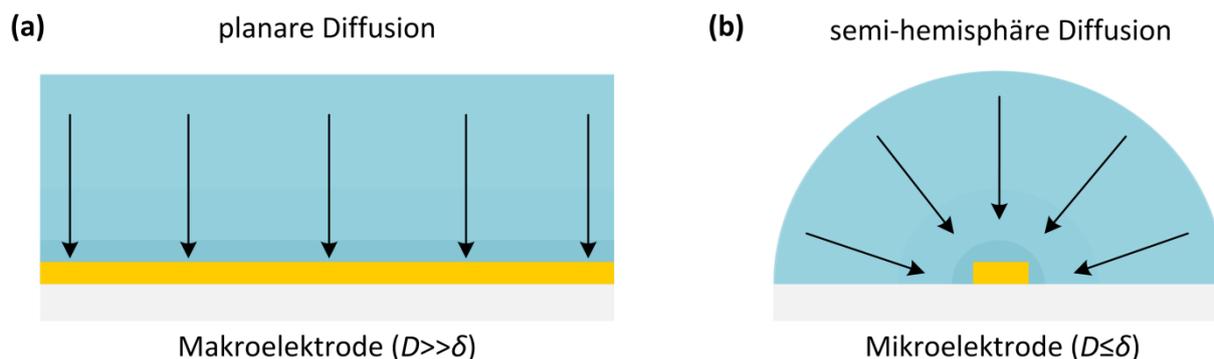


Abbildung 7.10: Schematische Darstellung der (a) planaren Diffusion an Makroelektroden und der (b) semi-hemisphären Diffusion an Mikroelektroden in Abhängigkeit von dem Elektrodenradius D und der Diffusionslänge δ .

Im Unterschied zu den Makroelektroden ist bei den Mikroelektroden ein deutlich niedrigerer Stromfluss im Nanoamperebereich zu detektieren. Beim Vergleich der Messungen bzgl. der Potentiallage der Oxidationspeaks kann festgestellt werden, dass diese im Fall des Reduktionspeaks zwischen 0,16 und 0,18 V und im Fall des Oxidationspeaks zwischen 0,33 und 0,35 V liegen. Im Gegensatz zu den Makroelektroden sind die Intervalle, in dem sich die Potentiallagen bewegen, ein wenig größer und beide Potentialintervalle liegen etwas weiter auseinander. Dies ist ein Indikator dafür, dass der Ladungsträgeraustausch zwar weiterhin reversibel, aber insgesamt etwas stärker gehemmt ist als bei den Makroelektroden. Da der Aufbau und die Durchführung der Versuchsreihe identisch zu den vorhergehenden Versuchen sind, sind sowohl der stärker gehemmte Ladungsdurchtritt als auch die geringeren Spitzenströme auf die Größe der Elektroden selbst zurückzuführen.

Werden im weiteren Verlauf nanostrukturierte mit unstrukturierten Mikroelektroden verglichen (**Abbildung 7.11 a**), finden sich gleiche Verhältnisse bezüglich Kurvenform und Potentiallage wieder. Allerdings ist im Allgemeinen der Spitzenstrom bei unstrukturierten Mikroelektroden geringer, was sich mit der geringeren Fläche erklären lässt. Wie bereits bei den Vorversuchen ermittelt, ist der kathodische bzw. anodische Spitzenstrom proportional zur Fläche.

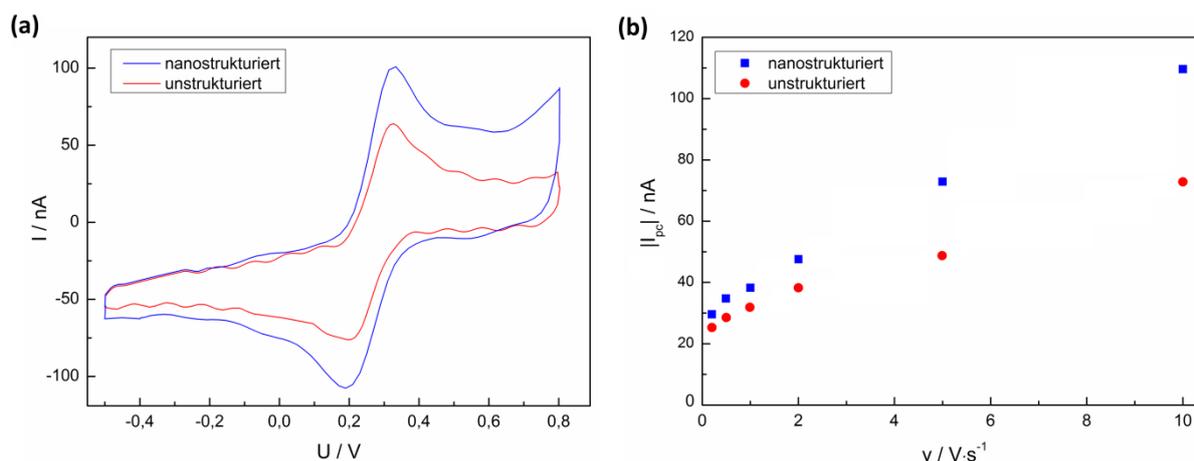


Abbildung 7.11: (a) Vergleich des CV-Diagramms einer nano- und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 V/s. (b) Betrag der kathodischen Spitzenströme $|I_{pc}|$ in Abhängigkeit der Vorschubgeschwindigkeit v einer nano- und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1).

Wird der kathodische (oder anodische) Spitzenstrom der nanostrukturierten und unstrukturierten Mikroelektroden gegenüber verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten aufgetragen, so entsteht ein Kurvenverlauf, deren Steigung die Einheit einer Kapazität besitzt (**Abbildung 7.11 b**). Für den Vergleich der Kapazitäten werden pro untersuchtem MEA-Chip je acht nanostrukturierte und acht unstrukturierte Elektroden charakterisiert, entsprechend die Mittelwerte gebildet und auf eine standardisierte Grundfläche von 1 mm^2 normiert (**Abbildung 7.12**). Die Messergebnisse der Chips mit $1 \mu\text{m}$ Nanostrukturabstand zeigen eine zum Teil deutliche Erhöhung der Kapazität. Die geringste Erhöhung ist bei dem Chip P100_1 festzustellen, bei dem die Kapazität infolge der Nanostrukturierung von $6,71 \pm 0,48$ auf einen Wert von $7,55 \pm 0,90 \mu\text{F}/\text{mm}^2$ ansteigt. Die größte Steigerung ist demnach bei dem Chip T600_1 zu erkennen, dessen Kapazität sich von $6,46 \pm 0,41$ auf $11,61 \pm 1,10 \mu\text{F}/\text{mm}^2$ erhöht. Bei genauer Betrachtung ist erkennbar, dass die relative Erhöhung der Kapazität mit der Zunahme der Nanostrukturdurchmesser einhergeht. Zudem ist die Zunahme der Kapazität bei überwachsenen Röhrenstrukturen stärker ausgeprägt als bei überwachsenen Säulenstrukturen. Aus den Vorversuchen zu den CV-Messungen wurde ersichtlich, dass eine Erhöhung des Spitzenstroms bei gleichbleibender Vorschubgeschwindigkeit direkt mit einer Erhöhung der elektrochemisch aktiven Oberfläche gleichgesetzt werden kann. Daher ist es auch möglich die

Erhöhung der Kapazität direkt in Korrelation mit einer Erhöhung der effektiven Oberfläche infolge der Nanostrukturen zu bringen (siehe Kapitel 7.4.3).

Beim Vergleich nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden der Chips mit 5 μm Nanostrukturabstand ist hingegen zu erkennen, dass die Werte der Kapazität nahezu identisch sind. Das bedeutet auch, dass die effektive Oberflächenvergrößerung bei diesen Nanostrukturabständen sehr gering ist. Variationen liegen hierbei im Bereich des Messfehlers bzw. der Standardabweichung. Daher ist eine Aussage über den Einfluss des Strukturtyps oder des Strukturdurchmessers bezüglich einer Erhöhung der Kapazität bei diesen Strukturen nicht möglich.

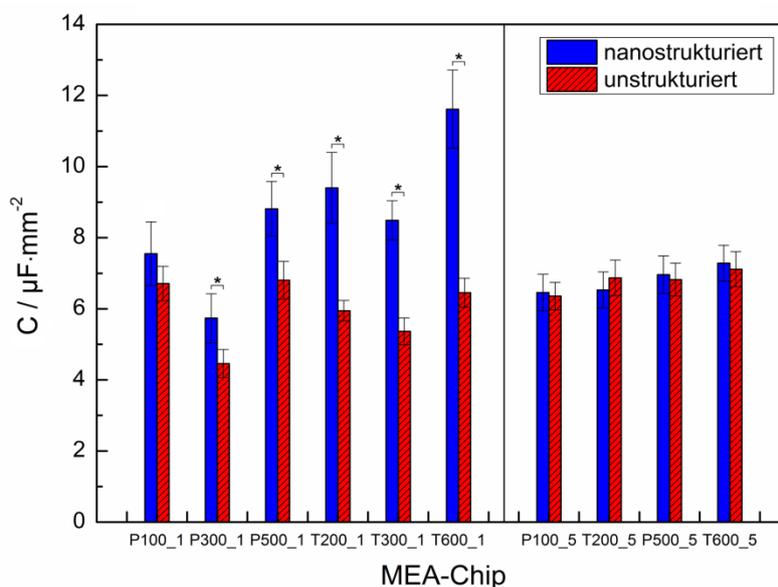


Abbildung 7.12: Mittelwert der normierten Kapazität nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden der untersuchten MEA-Chips ($n=8$).

Generell liegt die Standardabweichung der Kapazität für alle untersuchten Chips zwischen 4,9 und 12,0 % des Absolutwerts. Diese kann sich durch Fehler beim Messen und Auswerten der Daten oder durch geringfügige lokale Unterschiede in der Elektrodenbeschaffenheit, zum Beispiel durch Verunreinigungen oder blockierte Zentren der elektrochemisch aktiven Oberfläche infolge des Elektrolyts, ergeben. Bei optimaler Prozessführung und perfekter Homogenität aller Chips sowie dem Ausschluss von Defekten müssten die Werte der Kapazität der unstrukturierten Mikroelektroden gleich sein, da sich die unstrukturierten Mikroelektroden theoretisch von Chip zu Chip nicht unterscheiden. Aus Abbildung 7.12 ist jedoch ersichtlich, dass dies nicht der Fall ist. Dies kann damit begründet werden, dass die Chips mit den unterschiedlichen Nanostrukturabständen von 1 und 5 μm auf zwei unterschiedlichen Wafern gefertigt wurden und die Chips desselben Wafers aufgrund der unterschiedlichen Positionen auf dem Wafer selbst prozessbedingten Schwankungen unterliegen, welche sich aus den in Kapitel 6 diskutierten Ergebnissen ergeben. Beispielweise können beim Ätzen der Elektrodenöffnungen

lokale Unterschiede in der tatsächlichen Fläche der freigelegten Elektrode entstehen, die wiederum zu unterschiedlichen Ergebnissen in den CV-Messungen und somit der Kapazität führen. Weiterhin sind Defekte der Isolationsschicht auf den Elektroden denkbar. Letztendlich sind die Chips jedoch so konzipiert, dass sowohl nanostrukturierte als auch unstrukturierte Elektroden direkt auf einem Chip untersucht werden können. Deshalb sind die ermittelten absoluten Werte von zunächst untergeordneter Bedeutung als die relativen Werte, die die direkte Änderung des Messwerts beim Vergleich von nanostrukturierten und unstrukturierten Mikroelektroden angeben.

Cyclovoltammetrie in Kaliumchlorid

In einer zweiten Messreihe zur Cyclovoltammetrie wird Kaliumchlorid als Elektrolyt gewählt, welcher keine elektrochemisch umsetzbaren Stoffe beinhaltet. **Abbildung 7.13 a** zeigt beispielhaft das an MEA T600_1 aufgenommene Deckschichtdiagramm einer nanostrukturierten und einer unstrukturierten Elektrode bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 V/s.

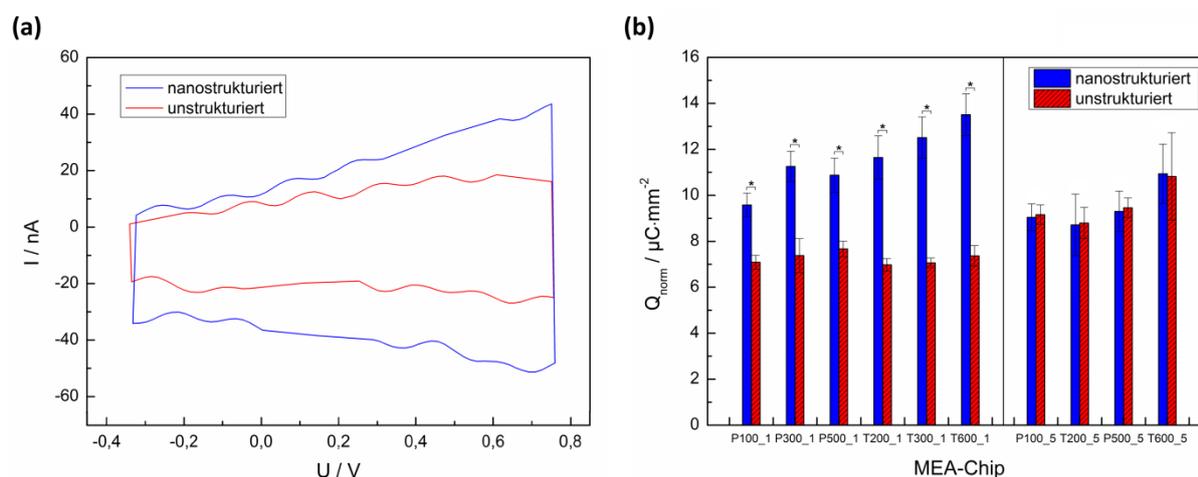


Abbildung 7.13: (a) Deckschichtdiagramm einer nanostrukturierten und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) in 3 M KCL bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 V/s. (b) Mittelwert der normierten umgesetzten Ladungsmenge Q_{norm} nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden der untersuchten MEA-Chips ($n= 8$).

Im Vergleich zu den CV-Diagrammen der Kaliumhexacyanoferratlösung verschwinden die typischen Reduktions- bzw. Oxidationspeaks vollständig. Weiterhin ist die vergrößerte Kurvenform des CV-Diagramms der nanostrukturierten Elektrode im Vergleich zu der unstrukturierten Elektrode zu erkennen. Befinden sich im Elektrolyt keine Substanzen, die im ausgewählten Potentialbereich elektrochemisch umgesetzt werden, so resultieren die Änderungen des gemessenen Stroms lediglich aus dem Auf- und Abbau von Wasserstoff- und Sauerstoff-Chemiesorptionsschichten, sogenannter Deckschichten. Die erforderliche Ladungsmenge Q_B für den Auf- bzw. Abbau dieser Deckschichten kann dementsprechend im Experiment durch

Integration der Stromdichte j im Spannungsintervall $d\phi$ erhalten werden und ist proportional zur elektrochemisch aktiven Oberfläche^{68,186}:

$$Q_B = \int \frac{j}{v} d\phi \quad (7.2)$$

wobei j die Stromdichte und v die Vorschubgeschwindigkeit ist. Die Potentialgrenzen müssen derweil so gesetzt werden, dass keine Zersetzung des Elektrolyts stattfindet. Da bei CV-Messungen nur flache Spannungsrampen gefahren werden und dadurch Diffusionsprozesse im Elektrolyten keinen Einfluss auf das Messergebnis haben, ist eine Charakterisierung von Elektroden mit unterschiedlicher aktiver Oberfläche bei gleicher geometrischer Größe der Basiselektrode möglich.

Abbildung 7.13 b zeigt die ermittelten Werte für die umgesetzte Ladungsmenge der nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden aller untersuchten MEAs, wobei auch in dieser Messreihe der Mittelwert aus acht nanostrukturierten bzw. acht unstrukturierten Elektroden gebildet und der Wert auf eine Grundfläche von 1 mm^2 normiert wird. Im Fall der MEAs mit $1 \text{ }\mu\text{m}$ Nanostrukturabstand ergeben sich Werte zwischen $9,58$ und $13,51 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$ für die nanostrukturierten Elektroden und Werte zwischen $6,98$ und $7,67 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$ für die unstrukturierten Elektroden. Beim Vergleich der nanostrukturierten mit den unstrukturierten Elektroden desselben MEAs zeigt sich zudem, dass die umgesetzte Ladung der nanostrukturierten Elektroden stets höher ist. Die geringste Steigerung zeigt demnach der Chip P100_1 mit einer Erhöhung von $7,09 \pm 0,30$ auf $9,58 \pm 0,52 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$. Der Chip T600_1 hingegen hat die größte Steigerung von $7,37 \pm 0,45$ auf $13,51 \pm 0,91 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$ vorzuweisen. Auch hier lassen sich wieder zwei Tendenzen klar feststellen: Die relative Steigerung der übertragenen Ladungsmenge ist bei Strukturen mit großem Durchmesser höher als bei Strukturen mit kleinem Durchmesser und überwachsene Röhrenstrukturen weisen höhere Messwerte auf als überwachsene Säulenstrukturen. Ein Vergleich der unstrukturierten Elektroden aller untersuchten MEA-Chips zeigt weiterhin, dass die Werte nur wenig voneinander abweichen. Werden die MEAs mit einem Nanostrukturabstand von $5 \text{ }\mu\text{m}$ betrachtet, so kann hingegen keine signifikante Erhöhung der übertragenen Ladung festgestellt werden. Bei nanostrukturierten Elektroden ergeben sich Werte zwischen $8,72$ und $10,94 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$ und für unstrukturierte Elektroden ergeben sich Werte zwischen $8,79$ und $10,82 \text{ }\mu\text{C}/\text{mm}^2$. Eine Aussage über eine etwaige Verbesserung hinsichtlich der Variation der Struktur Durchmesser oder Strukturformen ist daher nicht möglich.

Beim Vergleich der Messwerte der unstrukturierten Elektroden aller MEA-Chips fällt auf, dass diese bei den Chips mit einem Nanostrukturabstand von $5 \text{ }\mu\text{m}$ etwas größer sind als bei den Chips mit einem Nanostrukturabstand von $1 \text{ }\mu\text{m}$. Da die Chips auf unterschiedlichen Wafern gefertigt wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Elektrodenfläche der Basiselekt-

rode aufgrund von Prozessschwankungen im Fall der Chips mit einem Nanostrukturabstand von 5 μm etwas größer ist.

Die Standardabweichung liegt bei den Chips mit 1 μm Nanostrukturabstand zwischen 3,0 und 10,0 % und bei den Chips mit 5 μm Abstand zwischen 4,6 und 17,6 %. Diese kann analog zur ersten Messreihe durch geringfügige Unterschiede in der Elektrodenbeschaffenheit, blockierte Zentren der elektrochemisch aktiven Oberfläche sowie durch Fehler beim Messen und Auswerten der Daten begründet werden.

Aufgrund der Proportionalität der übertragenen Ladungsmenge und der Größe der Oberfläche kann auch im Fall der CV-Messungen mit Kaliumchlorid sowohl der erhöhte Stromfluss als auch die Verbesserung des Ladungstransfers bei den nanostrukturierten Elektroden direkt mit der vergrößerten elektrochemisch aktiven Oberfläche aufgrund der Nanostrukturen in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 7.4.3). Werden die Messreihen der Cyclovoltammetrie von Kaliumhexacyanoferrat und Kaliumchlorid miteinander verglichen, so ist zu erkennen, dass die Ergebnisse beider Messreihen qualitativ identisch sind: Im Fall des 1 μm Abstands ergibt sich bei beiden Messreihen eine ansteigende Verbesserung mit größerem Strukturdurchmesser und beim Einsatz von überwachsenen Röhrenstrukturen im Vergleich zu den überwachsenen Säulenstrukturen. Bei den Strukturabständen von 5 μm sind aufgrund der nur geringen Vergrößerung der effektiven Oberfläche bei beiden eingesetzten Verfahren keine signifikanten Unterschiede zwischen nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden zu erkennen.

7.4.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Das Ziel der EIS-Messungen an nano- und unstrukturierten Elektroden ist die Evaluierung der Impedanz hinsichtlich des Absolutbetrags und der Phase für verschiedene Frequenzbereiche. Der Absolutbetrag der Impedanz dient dabei als wesentlicher Vergleichswert zwischen den verschiedenen MEAs untereinander und wird üblicherweise bei einer Frequenz von 1 kHz angegeben. Diese spezifische Frequenz von 1 kHz korreliert dabei mit der Bandbreite des Messsystems. Diese gibt die Breite in einem Frequenzspektrum an, in dem die zu übertragenden Frequenzanteile liegen und ist ein Maß, ob das gemessene Signal den Messkanal ungehemmt passiert oder aufgrund von Dämpfung an Qualität verliert. Wird das Aktionspotential eines Neurons betrachtet, das eine Dauer von wenigen Millisekunden hat, so korreliert dies mit einer Frequenz von mehreren hundert Hertz. Nach dem Nyquist'schen Abtasttheorem muss das zu messende Signal mit zumindest der doppelten Frequenz wie der zu erwartenden Messfrequenz abgetastet werden, sodass eine Bandbreite von 1 kHz die Anforderung an eine erfolgreiche Detektion von Aktionspotentialen von Neuronen ist¹⁸⁷. Die Phase der Impedanz kann indes eine Aussage über ohmsches oder kapazitives Verhalten der Elektrode liefern.

Auch bei den EIS-Messungen werden verschiedene Layouts der nanostrukturierten Elektroden miteinander und mit unstrukturierten Elektroden desselben MEAs verglichen. **Abbil-**

Abbildung 7.14 a zeigt das Nyquist-Diagramm einer nano- und unmodifizierten Mikroelektrode. Neben den höheren Impedanzwerten, die im Megaohmbereich liegen, fällt vor allem auf, dass die Form sich im Vergleich zu den makroskopischen Goldplättchen verändert hat. Zu sehen ist ein gestauchter Halbkreis, an dem sich keine Warburggerade anschließt. Das Fehlen dieser Gerade weist darauf hin, dass im gesamten Frequenzspektrum die Reaktionskinetik der geschwindigkeitsbestimmende Faktor ist und nicht, wie bei den Makroelektroden beobachtet, bei kleinen Frequenzen die Diffusion die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Diese Beobachtung kann erneut auf die Größe der Elektroden zurückgeführt werden. Wie schon bei der Cyclovoltammetrie festgestellt, ändert sich das Diffusionsprofil von einer planaren Diffusion bei Makroelektroden hin zu einer semi-hemisphärischen Diffusion bei Mikroelektroden. Dadurch dass der relative Stofftransport durch die Diffusion vergrößert ist, stellt sich insbesondere auch bei niedrigen Frequenzen ein Gleichgewichtszustand bereits nach sehr kurzer Zeit ein. Auch die Stauchung des Halbkreises hängt mit dem Einsatz der Mikroelektrode zusammen. Im Allgemeinen verhalten sich die untersuchten Systeme nicht ideal. Um das reale Verhalten des Systems zu beschreiben, werden die einzelnen Elemente wie die Doppelschichtkapazität häufig als konstante Phasenelemente (*constant phase element*, kurz: CPE) dargestellt, dessen Impedanz sich wie folgt darstellt⁶⁸:

$$Z_{CPE} = \frac{a_{CPE}}{(j\omega)^{b_{CPE}}} \quad (7.3)$$

Dabei ist a_{CPE} eine frequenzunabhängige, reelle Konstante und ein Maß für den Betrag von Z_{CPE} , wohingegen b_{CPE} die Phase repräsentiert und Werte zwischen null und eins annehmen kann. Ist $a_{CPE} = 1/C$ und $b_{CPE} = 1$ beschreibt das CPE ein rein kapazitives Element. Für $a_{CPE} = R$ und $b_{CPE} = 0$ wird ein rein ohmscher Widerstand beschrieben. Das CPE berücksichtigt Inhomogenitäten der Oberfläche bzw. mikroskopische Materialeigenschaften der Elektrode und kann daher als Maß für die Elektrodenqualität herangezogen werden. Bei idealer Oberflächenbeschaffenheit wird $b_{CPE} = 1$. Bei der Modellierung der Doppelschichtkapazität mit einem CPE erfolgt eine Stauchung der Halbkugel im Nyquistdiagramm. Zu den Inhomogenitäten zählen vor allem eine nicht-konforme Stromverteilung und Oberflächenrauigkeiten der Elektrode. Durch den Einsatz einer Mikroelektrode steigt das Verhältnis der Rauigkeit zur Gesamtfläche deutlich und führt daher auch zu einer verstärkten Stauchung der Kurvenform. Verstärkt wird der Effekt durch die Nanostrukturen selbst, die ebenfalls als Inhomogenitäten im Vergleich zur flachen Elektrode angesehen werden können.

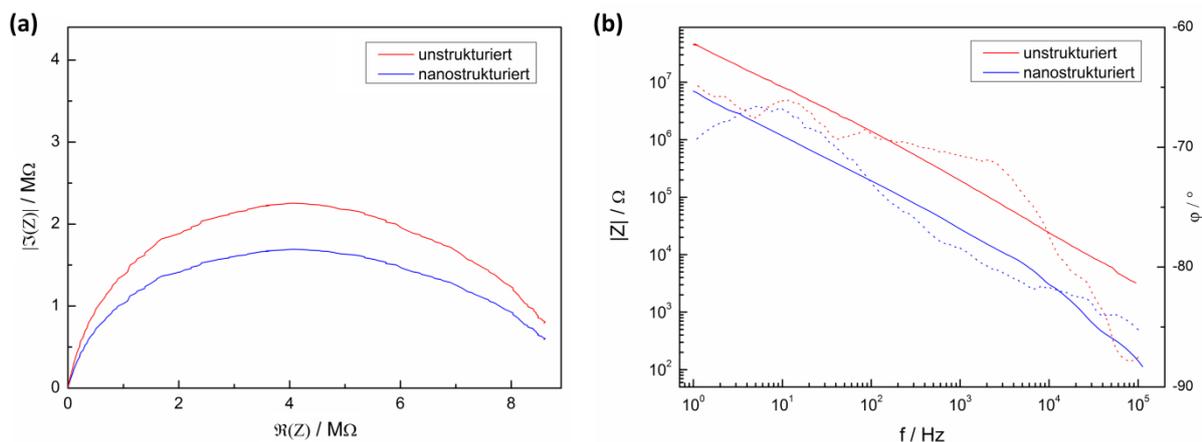


Abbildung 7.14: Elektrochemische Impedanzspektroskopie in Kaliumhexacyanoferrat-Lösung einer nanostrukturierten und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) dargestellt im **(a)** Nyquist-Diagramm und **(b)** im Bode-Diagramm ($|Z|$: durchgezogene Linie, φ : gestrichelte Linie).

In **Abbildung 7.14 b** ist das Bode-Diagramm der EIS Messung dargestellt. Auch in dieser Darstellung ist der stark erhöhte Impedanzbetrag aufgrund der geringeren Elektrodenfläche im Vergleich zu den Makroelektroden ersichtlich. Beim Vergleich der nano- und unstrukturierten Mikroelektroden untereinander wird derweil deutlich, dass der Betrag der Impedanz bei der nanostrukturierten Elektrode im gesamten Frequenzbereich um etwa denselben Anteil geringer ist als bei der unstrukturierten Elektrode. Werden die Phasen von nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden verglichen, so ist ersichtlich, dass diese im gemessenen Frequenzbereich generell keine größeren Werte als -60° annehmen und für Frequenzen unterhalb etwa 50 Hz und oberhalb etwa 20 kHz in etwa ähnlich sind. Im dazwischenliegenden Frequenzbereich ist die Phase der nanostrukturierten Elektrode um bis zu 10° kleiner als die der unstrukturierten Elektrode und weist somit ein stärkeres kapazitives Verhalten auf. Diese Verschiebung der Phase hin zu einem verstärkten kapazitiven Verhalten kann demnach ebenfalls auf die Nanostrukturen zurückgeführt werden. Durch die Nanostrukturierung bedingt steigt die Doppelschichtkapazität im Vergleich zur unstrukturierten Oberfläche an, womit auch die Phase der Impedanz in Richtung kapazitives Verhalten verschoben wird.

Wie bereits bei den Makroelektroden gezeigt, erlaubt die elektrochemische Impedanzspektroskopie nicht nur eine Aussage über die Impedanz und das Elektrodenverhalten, sondern mit Hilfe des elektrochemischen Ersatzschaltbilds auch eine Aussage über die Doppelschichtkapazität und andere Systemparameter zu treffen. Die Modellierung einer MEA-Elektrode mit Hilfe eines Ersatzschaltbilds ist im Allgemeinen schwieriger als die Modellierung einer Makroelektrode, da ebenso parasitäre Bauelemente aufgrund von Kopplungseffekten oder fehlerbehafteter Elemente des MEA-Chips hinzugefügt werden müssen. Zu letzteren können Zuleitungswiderstände oder Kapazitäten aufgrund der Isolationsschicht gezählt werden. Da diese im Vergleich zum Durchtrittswiderstand und der Doppelschichtkapazität allerdings sehr viel

kleiner sind, können diese in der Regel vernachlässigt werden, sodass für die Simulation das in Abbildung 7.3 gezeigte elektrochemische Ersatzschaltbild herangezogen werden kann. Nach Auswertung der Simulation für eine unstrukturierte MEA-Elektrode ergeben sich für den Elektrolytwiderstand $6,3 \Omega$, für die Doppelschichtkapazität $2,2 \text{ nF}$ und für den Durchtrittswiderstand $8,9 \text{ M}\Omega$ (**Anhang B**). Die simulierten Werte der unstrukturierten Mikroelektrode stimmen trotz der getätigten Vereinfachungen gut mit den simulierten Werten der Makroelektrode überein, wodurch die Messungen als zuverlässig einzustufen sind.

Abbildung 7.15 zeigt die Messungen zur Impedanz an nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden aller untersuchten MEAs. Dargestellt ist sowohl der Betrag als auch die Phase bei einer Frequenz von 1 kHz als Mittelwert von jeweils acht untersuchten Mikroelektroden.

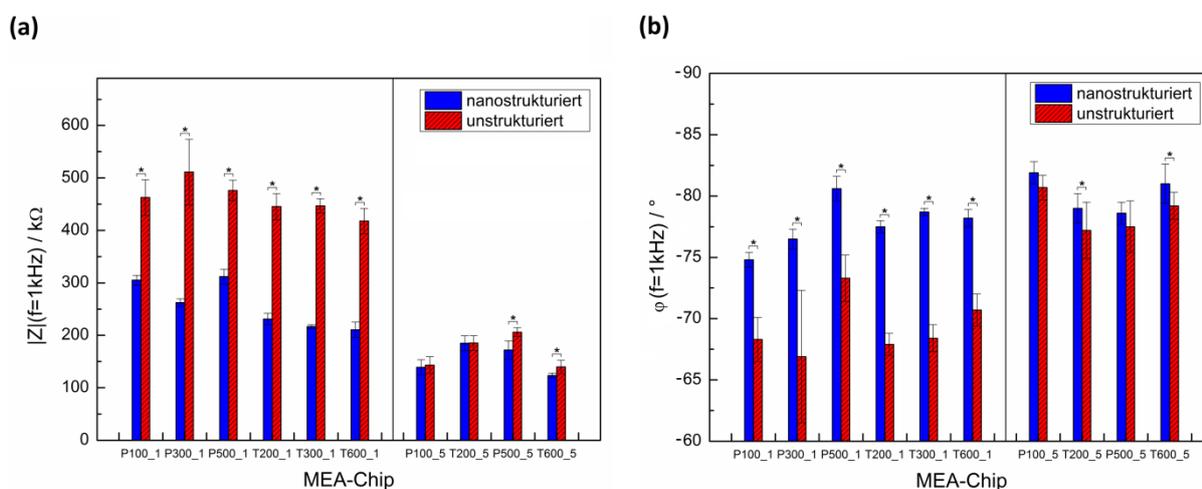


Abbildung 7.15: Mittelwert (a) des Impedanzbetrags $|Z|$ und (b) der Phase φ nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden aller untersuchten MEA-Chips bei einer Frequenz von 1 kHz ($n=8$).

Für die Mikroelektroden mit $1 \mu\text{m}$ Nanostrukturabstand ergibt sich bei allen MEA-Chips eine deutliche Minimierung der Impedanz. Die Werte des Impedanzbetrags bei den unstrukturierten Elektroden liegen dabei zwischen 418 und $511 \text{ k}\Omega$, die Werte der nanostrukturierten Elektroden zwischen 211 und $312 \text{ k}\Omega$. Dabei ist der minimale Rückgang beim Chip P100_1 von 463 ± 34 auf $305 \pm 9 \text{ k}\Omega$ und der maximale Rückgang beim Chip T300_1 von 446 ± 13 auf $216 \pm 3 \text{ k}\Omega$ festzustellen. Generell kann auch bei der Evaluation der Impedanz beobachtet werden, dass bei überwachsenen Röhrenstrukturen ein stärkerer Effekt bzgl. der Minimierung der Impedanz als bei überwachsenen Säulenstrukturen zu erkennen ist. Der Effekt bei Variation des Durchmessers zeigt sich bei der Messung der Impedanz weniger deutlich als zum Beispiel bei den vorhergehenden CV-Messungen. Wie auch schon in den Vorversuchen gezeigt, kann bei sonst gleichen Versuchsbedingungen eine Änderung in der Impedanz mit einer veränderten Elektrodenfläche korreliert werden. Daher können auch im Fall der Impedanzspektroskopie die reduzierten Impedanzwerte direkt mit der vergrößerten Oberfläche aufgrund der

Nanostrukturierung in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 7.4.3). Bei der Betrachtung der Impedanzbeträge bei den Chips mit dem größeren Nanostrukturdurchmesser von 5 μm sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden ersichtlich. Diese liegen im Bereich zwischen 123 und 206 $\text{k}\Omega$. Die Standardabweichung liegt bei allen Chips zwischen 1,6 und 12,2 %.

Werden die Phasen der Mikroelektroden mit 1 μm Nanostrukturabstand verglichen, so ergeben sich für die nanostrukturierten Elektroden im Mittel Werte zwischen $-74,8$ und $-80,6^\circ$, für unstrukturierte Elektroden hingegen Mittelwerte zwischen $-66,9$ und $-73,3^\circ$. Im Allgemeinen ist festzustellen, dass die Phase der nanostrukturierten Elektroden im Mittel zwischen $6,5$ und $10,3^\circ$ kleiner ist als die Phase der unstrukturierten Elektroden. Hierbei ist weder eine Tendenz bei Variation des Strukturdurchmessers noch des Strukturtyps feststellbar. Die Phasen von nano- und unstrukturierten Elektroden der MEA-Chips mit einem Nanostrukturabstand von 5 μm sind nahezu identisch und liegen zwischen $77,2$ und $81,1^\circ$. Die Standardabweichung liegt bei allen Chips zwischen 0,4 und 8,0 %. Die kleineren Phasen der nanostrukturierten Elektroden weisen auf stärkere kapazitive Eigenschaften der Elektroden hin, was mit der bereits detektierten Erhöhung der Doppelschichtkapazität aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch die Nanostrukturen korreliert.

Erneut sind die Impedanzen und Phasen der beiden Strukturabstände von 1 und 5 μm aufgrund der Herstellung auf unterschiedlichen Wafern nicht direkt miteinander vergleichbar. So sind in diesem Fall die Messwerte der Impedanz der unstrukturierten Elektroden bei einem Nanostrukturabstand von 5 μm etwas geringer als die Messwerte bei einem Abstand von 1 μm . Dies spricht ebenfalls, wie schon in Kapitel 7.4.1 festgestellt, für eine etwas größere Elektrodenfläche im Fall der Elektroden mit einem Abstand von 5 μm . Insbesondere anhand dieser Messung zeigt sich erneut der Vorteil der Implementierung eines nano- und unstrukturierten Bereichs innerhalb eines MEAs. Da die Fabrikation von Wafer zu Wafer aber auch von Chip zu Chip mitunter erheblich schwanken kann, wäre eine Aussage einer Messreihe, die verschiedene Chips miteinander direkt vergleicht, nur wenig aussagekräftig, da Prozessschwankungen das Ergebnis stark verfälschen bzw. beeinflussen können. Durch das Verwenden einer internen Vergleichsmethode wird dieses Problem jedoch umgangen.

7.4.3 Bewertung der elektrochemischen Charakterisierung

Sowohl bei der Bestimmung der Kapazität als auch bei der Ermittlung des Ladungstransfers und der Impedanz der einzelnen MEA-Chips kann festgestellt werden, dass abhängig vom Layout der Nanostrukturierung zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den nanostrukturierten Elektroden untereinander und zwischen den nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden desselben Chips erkennbar sind. Beim Vergleich der verschiedenen Messmethoden zeigt sich jedoch, dass vergleichbare Resultate erzielt werden: Beim direkten Vergleich von nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden haben überwachsene Röhrenstrukturen und Strukturen mit großem Durchmesser einen größeren Effekt als überwachsene Säulen-

strukturen oder Strukturen mit kleinem Durchmesser. Die Resultate können dabei auf die, je nach Layout unterschiedlich ausgeprägte, Vergrößerung der effektiven Oberfläche zurückgeführt werden, die sich durch die Nanostrukturierung ergibt. Da sich die Kapazität und der Ladungstransfer proportional zur Elektrodenfläche und die Impedanz umgekehrt proportional zur Elektrodenfläche verhalten, besteht zudem die Möglichkeit eine quantitative Aussage über die effektive Vergrößerung der elektrochemisch aktiven Oberfläche durch die Nanostrukturen zu treffen (**Tabelle 7.2**). Dabei zeigt sich, dass sich die Werte der einzelnen Messverfahren bzw. Evaluierungsmethoden quantitativ unterscheiden. Die geringsten Werte hinsichtlich der Oberflächenvergrößerung lassen sich bei der Evaluationsmethode über die Kapazität ermitteln. Die höchsten Werte werden hingegen bei der Impedanzmessung generiert. Um zu evaluieren, welche der drei Methoden die zuverlässigsten Werte liefert, muss die tatsächliche Vergrößerung der Oberfläche über die Topographie bestimmt werden. Da es im Verlauf der Arbeit nicht möglich war, diese messtechnisch zu ermitteln, wird ein Modell zur theoretischen Bestimmung der Oberflächentopographie durch Abschätzung der idealen Geometrie angewendet (**Anhang C**). Ausgehend von diesen Berechnungen kann die topographische Oberflächenvergrößerung kalkuliert werden (Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2: Vergleich der abgeschätzten Oberflächenvergrößerung aufgrund der Topographie mit der in den Experimenten ermittelten Vergrößerung. Die hervorgehobenen Werte zeigen die größte Übereinstimmung der Messwerte mit dem abgeschätzten Wert.

Layout	Bestimmung der Vergrößerung (%) der aktiven Oberfläche über			
	Topographie	Kapazität	Ladungstransfer	Impedanz
P100_1	25,8	12,5	35,1	51,6
P300_1	34,1	28,7	52,6	94,7
P500_1	44,1	29,5	41,8	52,6
T200_1	74,2	58,1	66,8	92,9
T300_1	83,8	58,3	77,1	106,4
T600_1	109,3	79,9	83,4	98,5
P100_5	0,4	1,5	-1,3	3,0
T200_5	2,3	-4,9	-0,9	0,2
P500_5	4,8	2,0	-2,7	19,7
T600_5	11,0	2,4	1,1	13,3

Wird zunächst die Vergrößerung durch die Topographie herangezogen, so wird deutlich, dass mit steigendem Durchmesser der Nanostrukturen die Vergrößerung der Oberfläche zunimmt. Dies gilt sowohl bei den überwachsenen Säulen- als auch bei den überwachsenen Röhrenstrukturen und im Fall beider Nanostrukturabstände von 1 und 5 μm . Bemerkenswert ist die deutliche Vergrößerung durch eine veränderte Strukturform. So tragen überwachsene Röhrenstrukturen im Vergleich zu den überwachsenen Säulenstrukturen zu einer sehr viel stärkeren Vergrößerung der effektiven Oberfläche bei. Dabei erhöht sich beispielsweise bei den Nanostrukturen mit einem Durchmesser von 300 nm und einem Strukturabstand von 1 μm die effektive Oberfläche um mehr als das Doppelte von 34,1 auf 83,8 %. Wird weiterhin die effektive Vergrößerung von Nanostrukturen von 1 μm Abstand zu Strukturen mit 5 μm Abstand verglichen, so wird deutlich, dass der Effekt der topographischen Oberflächenvergrößerung bei Strukturen mit 5 μm Abstand sehr viel geringer ist und im Fall der Strukturen mit kleinen Durchmessern quasi vernachlässigbar klein ist. Zum Beispiel verringert sich die effektive Vergrößerung beim Chip T200 von 74,2 auf 2,3 %.

Werden die durch die Messwerte und durch die Topographie abgeschätzten Tendenzen der Oberflächenvergrößerung gegenübergestellt, so sind diese qualitativ gleich. Dennoch ergeben sich quantitativ betrachtet deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Messmethoden. Die im Fall der Strukturabstände von 5 μm teilweise zu beobachteten negativen Werte sind den Messfehlern geschuldet und spiegeln nicht die Realität wider. Als Fehlerquelle kann zunächst das Modell selbst genannt werden, das mit mehreren Annahmen, wie beispielsweise einer idealen Strukturform oder einem Abscheideratenverhältnis von vertikaler zu lateraler Richtung von 3:2 arbeitet und somit die tatsächlichen Gegebenheiten nicht exakt abbildet. Neben technologisch bedingten Fehlerquellen, wie defekte Nanostrukturen sind auch Messfehler wie beispielsweise leichte Verschiebungen in der Elektrodenanordnung oder blockierte Zentren bestimmter Bereiche der Elektrodenoberfläche durch den Elektrolyten zu nennen. Als letztes müssen auch die jeweiligen Evaluierungsmethoden betrachtet werden: So werden sowohl bei der EIS als auch bei der CV-Messung zur Bestimmung der Kapazität nur einzelne Messwerte für die Evaluation herangezogen (Impedanzbetrag bei einer Frequenz von 1 kHz bzw. kathodischer Peakstrom). Dadurch sind diese Messungen und deren anschließenden Auswertung zur Bestimmung der effektiven Oberflächenvergrößerung ungenauer als die CV-Messung zur Bestimmung des Ladungstransfers, welche den gesamten Messbereich verwendet und dadurch die realen Gegebenheiten am realistischsten widerspiegelt.

7.5 Charakterisierung des Rauschverhaltens der MEAs

Eine Größe, die zum einen eine direkte Verbindung zwischen elektrochemischen Größen (Impedanz) und der Aufnahme elektrischer Signale herstellt und zum anderen für die technische Qualität der hergestellten Chips ausschlaggebend ist, ist das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR). Dieses ist definiert als das Verhältnis der mittleren Leistung des

Nutzsignals zur mittleren (Rausch-)Leistung des Störsignals und gibt somit an, ob und wie stark das Messsignal vom Systemrauschen zu unterscheiden ist. Dies bedeutet, dass die Qualität des Nutzsigsals umso besser ist, je geringer das Rauschen ist. Als Rauschen wird jede ungewollte Störung oder Überlagerung des Messsignals verstanden und unterteilt sich in mehrere Quellen, wie Netz- und Hochfrequenzrauschen, Kontaktrauschen aufgrund von Kontaktstellen zwischen elektrischen Leitern oder Rauschen, das von der reinen Zellaktivität um die Messelektrode herum stammt. Ein weiterer, wesentlicher Anteil am Rauschsignal besitzt auch das thermische Rauschen, das durch die Brown'sche Molekularbewegung der Ladungsträger hervorgerufen wird und wie folgt definiert ist:

$$v_{\text{noise,therm.}} = \sqrt{4k_{\text{B}}T\Delta fZ} \quad (7.4)$$

wobei k_{B} die Boltzmannkonstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K), T die absolute Temperatur, Δf die Bandbreite und Z die Impedanz ist.

Die Amplitude eines neuronalen Aktionspotentials liegt bei mehreren Millivolt. Aufgrund des Zell-Elektroden-Abstands und des damit verbundenen Signalverlusts ist hingegen nur ein Messsignal von mehreren Mikrovolt zu erwarten. Bei der Forderung, dass das Messsignal die doppelte Amplitude wie das Rauschsignal besitzen soll und damit eindeutig von diesem zu unterscheiden ist, ergibt sich eine maximale Impedanz für das System, bei der das Rauschen das Messsignal noch nicht unterdrückt¹⁸⁸: Elektroden mit einer Impedanz kleiner $3 \text{ M}\Omega$ ($f = 1 \text{ kHz}$) sind somit im Allgemeinen geeignet für Messungen der Signalaktivität, was im Fall der getesteten MEAs zutrifft (siehe Kapitel 7.4.2).

Zur Bestimmung des Rauschens werden die resultierenden Potentiale der MEA-Chips ohne Zellen in einer phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) für einen Zeitraum von 90 s mit Hilfe des kommerziellen Vorverstärkers MEA 1060-Inv (Multi Channel Systems) gemessen (**Abbildung 7.16 a**). Der Vorverstärker, der im weiteren Verlauf auch zur Detektion der Zellsignale genutzt wird, besitzt eine Bandbreite von 1 kHz und verstärkt das Signal um einen Faktor von 1200, bevor dieses weiterverarbeitet wird. Zusätzlich wird eine Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode zur Messung verwendet. Ein Temperaturregler (TC-02) stellt zudem eine integrierte Heizplatte auf einen konstanten Wert von $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ während der Messung ein. Die Aufzeichnung der Daten wird mit der zugehörigen Software (MC Rack) und einer Abtastrate von 10 kHz durchgeführt. **Abbildung 7.16 b** zeigt beispielhaft das Rauschen einer nanostrukturierten und einer unstrukturierten Elektrode des MEA-Chips T600_1 für einen Zeitraum von 400 ms.

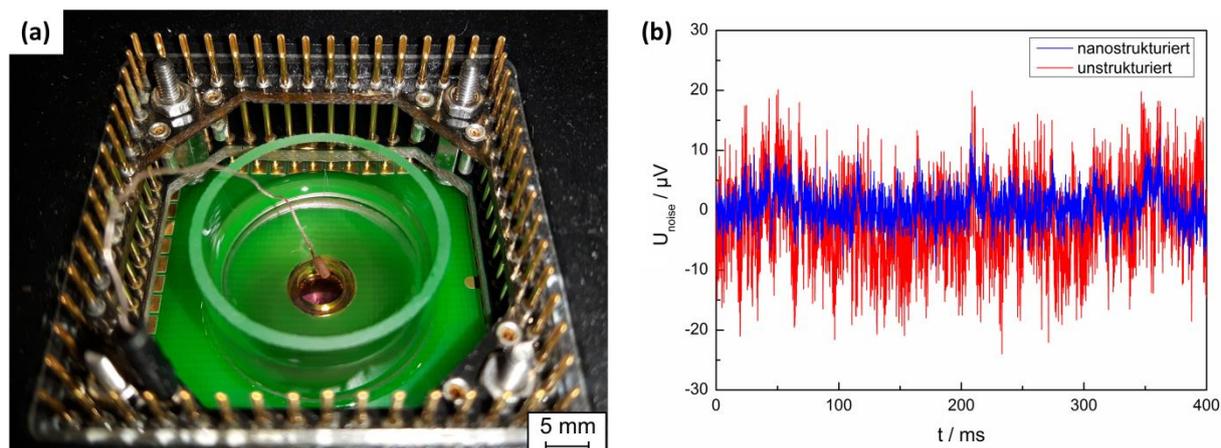


Abbildung 7.16: (a) Messaufbau zur Bestimmung des Rauschens und zur Zellpotentialmessung. (b) Zeitlicher Verlauf des Rauschens U_{noise} einer nanostrukturierten und unstrukturierten Mikroelektrode des MEA-Chips T600_1.

Bei der Darstellung des Rauschens kann zwischen dem Spitzen-Spitzen-Rauschen U_{pp} (*peak-to-peak*) und dem RMS-Rauschen U_{rms} (*root mean square*) unterschieden werden. In **Abbildung 7.17** sind sowohl Spitzen-Spitzen- als auch RMS-Rauschen für die nanostrukturierten und unstrukturierten Mikroelektroden verschiedener MEA-Layouts dargestellt. Beide Darstellungsarten des Rauschens ergeben qualitativ ähnliche Ergebnisse, wonach bei nahezu allen MEA-Chips eine Erniedrigung des Rauschens erzielt wird. Bei nanostrukturierten Mikroelektroden mit Nanostrukturabständen von $1\ \mu\text{m}$ variiert das RMS-Rauschen bei den nanostrukturierten Elektroden zwischen $4,6 \pm 0,9$ und $9,4 \pm 4,5\ \mu\text{V}$ (U_{pp} : $26,8 \pm 3,6$ bis $64,7 \pm 19,5\ \mu\text{V}$) und bei unstrukturierten Elektroden zwischen $5,7 \pm 0,9$ und $14,3 \pm 5,2\ \mu\text{V}$ (U_{pp} : $38,8 \pm 4,8$ bis $84,6 \pm 14,5\ \mu\text{V}$). Tendenziell kann im Rauschspektrum eine größere Verbesserung hinsichtlich der Minimierung des Rauschens erzielt werden, wenn überwachsenen Röhrenstrukturen bzw. Strukturen mit größerem Durchmesser verwendet werden. Der größte Rückgang im RMS-Rauschen wird bei dem Chip T600_1 erzielt. Die einzige Ausnahme stellt der Chip P300_1 dar, der generell eine sehr hohe Rauschcharakteristik mit großen Unterschieden innerhalb der Mikroelektroden aufweist.

Werden die Mikroelektroden mit Nanostrukturabständen von $5\ \mu\text{m}$ herangezogen, so variiert das RMS-Rauschen bei den nanostrukturierten Elektroden zwischen $3,8 \pm 0,6$ und $6,0 \pm 2,2\ \mu\text{V}$ (U_{pp} : $26,8 \pm 5,1$ bis $40,4 \pm 12,1\ \mu\text{V}$) und bei unstrukturierten Elektroden zwischen $4,6 \pm 1,0$ und $6,3 \pm 1,6\ \mu\text{V}$ (U_{pp} : $31,0 \pm 6,4$ bis $44,5 \pm 10,2\ \mu\text{V}$). Der Unterschied zwischen den nano- und unstrukturierten Mikroelektroden ist im Vergleich zu den Mikroelektroden mit einem Nanostrukturabstand von $1\ \mu\text{m}$ deutlich geringer.

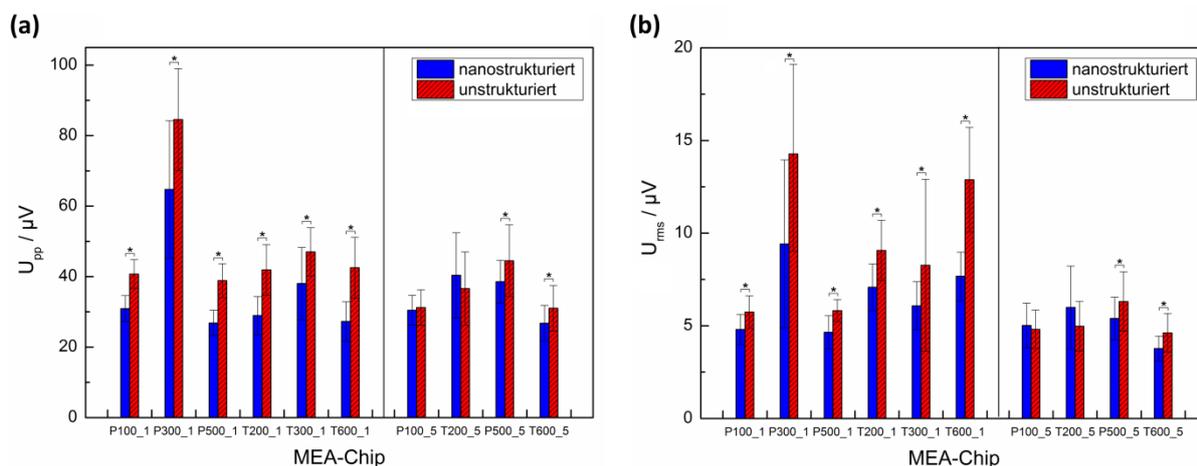


Abbildung 7.17: (a) Vergleich des Spitzen-Spitzen-Rauschens U_{pp} und (b) Vergleich des RMS-Rauschens U_{rms} nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden verschiedener Layouts. Dargestellt ist der Mittelwert aller Elektroden für einen Zeitraum von 30 s sowie die prozentuale Veränderung aufgrund der Nanostrukturen ($n = 30$).

Beim Vergleich der Ergebnisse der Rauschcharakteristik mit den Ergebnissen der elektrochemischen Messreihen (Kapitel 7.4) ist eine qualitative Übereinstimmung zu erkennen, wonach Röhrenstrukturen mit großem Nanostrukturdurchmesser und geringem Nanostrukturabstand eine bessere Charakteristik haben als andere Nanostrukturlayouts. Die Verbesserung des Rauschverhaltens korreliert dabei direkt mit der Verbesserung der Impedanz. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass die Verringerung der Impedanz nicht in demselben Maß zur Verringerung des Rauschens führt. Der Anteil der Impedanzverringerung ist im Allgemeinen höher. Dies ist damit zu erklären, dass das detektierte Rauschen ungefiltert ist und sich somit im Signal neben dem thermischen Rauschen auch andere Rauschanteile befinden. Lediglich der Anteil des thermischen Rauschens korreliert jedoch direkt mit der Impedanz (Gleichung 7.4). Wird zur Berechnung eine Bandbreite von 1 kHz und eine Temperatur von 310 K angesetzt und die Messergebnisse der Impedanz aus Kapitel 7 verwendet, so liegt der Anteil des thermischen Rauschens am Gesamtrauschen je nach Chip zwischen 20,7 und 49,7 %. Andere Rauschquellen, wie etwa Netzrauschen oder Hochfrequenzrauschen addieren sich zur Rauschcharakteristik hinzu und müssen demnach herausgefiltert bzw. durch eine Entkopplung des Systems mit der Umgebung minimiert werden.

Insgesamt kann für nahezu alle Chips eine zum Teil deutliche Reduzierung des Rauschens aufgrund der Nanostrukturierung festgestellt werden. Durch geeignete Filter kann dieses weiter minimiert werden. Ein geringes Rauschen bedeutet im Fall der Signaldetektion von Zellen, dass insbesondere kleine Signalamplituden nicht vom Rauschen überlagert werden, dadurch vom Chip erfasst werden können und letztendlich zu einem höheren Informationsgehalt des Messsignals beitragen.

8 Zellbiologische Untersuchungen mittels 3D-nanostrukturierter MEAs

In diesem Kapitel werden unterschiedliche Aspekte hinsichtlich der zellbiologischen Anwendung nanostrukturierter MEAs vorgestellt. Dabei wird zunächst kurz die Probenaufbereitung beschrieben. Im weiteren Verlauf werden dann die Ergebnisse hinsichtlich der Biokompatibilität der MEAs präsentiert. Anschließend wird diskutiert, inwiefern mithilfe einer Impedanzanalyse eine Aussage getroffen werden kann, ob bestimmte Nanostrukturen eine Ankopplung von Zelle und Elektrode begünstigen oder hemmen. Da bestimmte Zellen zusätzlich eine Adhäsionsschicht zur Verbesserung der Zellhaftung benötigen, wird eine Versuchsreihe vorgestellt, die den Einfluss solcher Schichten auf die Impedanz der Elektrode untersucht. In einem letzten Experiment werden schließlich die MEA-Chips für die Signalableitung an neuronalen Zellen eingesetzt. Dabei wird evaluiert, ob der Einsatz von nanostrukturierten Mikroelektroden einen Vorteil gegenüber unstrukturierten Mikroelektroden im Hinblick auf die Signaldetektion bietet.

8.1 Aufbereitung der MEAs und Zellkultivierung

Reinigung und Sterilisation der MEAs

Bevor die MEAs für die Beschichtung mit einer Adhäsionsschicht vorbereitet oder mit Zellen kultiviert werden, müssen sie einem Reinigungs- und Sterilisationsprozess unterzogen werden. Für die Reinigung wird zunächst eine enzymatische Reinigungslösung (1 % Terg-A-Zym) in den äußeren und inneren Ring des MEAs pipettiert, welche für 24 Stunden auf einer Rüttelplatte zur Einwirkung verbleibt. Hierdurch lassen sich sowohl Zell- als auch Beschichtungsreste aus vorangegangenen Versuchen entfernen. Nach dem Absaugen der Lösung und Spülung mit DI-Wasser wird eine 20 % H_2SO_4 -Lösung in den inneren Ring pipettiert. Diese bewirkt neben der Entfernung organischer Verbindungen auch eine Hydrophilisierung der Oberfläche, wodurch sich die Adhäsion der sich anschließenden Beschichtung verbessert. Nach einer halbstündigen Einwirkzeit wird der MEA-Chip mit DI-Wasser gereinigt und anschließend im Umluftofen getrocknet. Die anschließende Sterilisation erfolgt mit UV-Licht für 30 Minuten.

Beschichtungsverfahren

Zur Verbesserung der Zelladhäsion können je nach Zelltyp verschiedene Beschichtungen wie Gelatine, Poly-D-Lysin (PDL), Gele mit verschiedenen Proteinen der Extrazellulärmatrix (ECM) o.ä. verwendet werden. Bei der Beschichtung mit Gelatine wird eine 0,1 % wässrige

Lösung angesetzt, auf das MEA appliziert und für vier Stunden inkubiert. Bei der Beschichtung mit dem ECM-Gel wird 0,1 % des Gels mit Zellkulturmedium angesetzt und für eine Stunde im Inkubator einwirken gelassen. Das Poly-D-Lysin wird je nach Anwendung mit einer Konzentration von wahlweise 50 oder 100 µg/ml mit destilliertem Wasser angesetzt und ebenfalls für eine Stunde auf dem MEA im Inkubator einwirken gelassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Suspension abgesaugt und überschüssiges Material mit PBS entfernt.

Zellkultivierung

Im Verlauf der Experimente werden den Versuchszielen entsprechend unterschiedliche Zelltypen verwendet. Als Beispielzelllinie zur Untersuchung der Biokompatibilität wird die P19-Zelllinie eingesetzt. Diese ist eine epitheliale, adhärente und pluripotente Zelllinie, welche ursprünglich von embryonalen Karzinomzellen der C3H/He Maus stammt. Die Zellen der P19-Zellen können mit Hilfe von Dimethylsulfoxid zu herz- und skelettmuskelähnlichen Zellen oder bei der Zugabe von Retinolsäure zu neuronal- bzw. gliaähnlichen Zellen differenziert werden. Die Zelllinie ist vergleichsweise einfach zu kultivieren, bildet ein Zellnetzwerk aus und ist im Gegensatz zu den SVZ-Zellen, welche frisch isoliert werden, einfach verfügbar, weshalb sie effektiv für einfache Biokompatibilitätstests eingesetzt werden kann.

Zur Untersuchung der Zelladhäsion werden Zellen der HEK 293-Zelllinie verwendet, welche aus humanen Nierenepithelzellen gewonnen werden. Der Vorteil dieser Zellen ist die ebenfalls vergleichsweise einfache Kultivierung, da sie keine Adhäsionsschicht benötigen und bereits nach wenigen Tagen eine konfluente Schicht ausbilden und untersucht werden können.

Als dritter Zelltyp werden zur Detektion von Aktionspotentialen SVZ-Zellen eingesetzt. Diese sind embryonale und neuronale Stammzellen der subventrikulären Zone (SVZ), welche von postnatalen, weißen Labormäusen entnommen werden. Die subventrikuläre Zone befindet sich zwischen Striatum und den Seitenventrikeln des Gehirns und ist das größte Reservoir an neuronalen Stammzellen. Die Stammzellen entwickeln sich zu Nerven- und Gliazellen und sind in der Forschung deshalb interessant, da sie im Verdacht stehen, bei der Entstehung von Hirntumoren des zentralen Nervensystems eine entscheidende Rolle einzunehmen.

Für die Kultivierung der Zellen werden die tiefgefrorenen Zellen zunächst aufgetaut (P19 und HEK 293) bzw. direkt aus embryonalen oder postnatalem Hirngewebe isoliert (SVZ), in ein mit Nährstoffen und Zusätzen (u.a. Penicillin/Streptomycin) angereichertes Zellkulturmedium gegeben, zentrifugiert, resuspendiert und im Inkubator bei konstanten Umgebungsbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) aufbewahrt. In regelmäßigen Abständen wird das Medium ausgetauscht, die Zellen passagiert, gezählt und im Fall der P19-Zellen differenziert, bevor etwa 10.000 Zellen auf die sterilisierten MEA-Chips ausgesät werden. Zur Unterstützung der Zelladhäsion kann im Fall der P19-Zellen der Chip mit Gelatine und im Fall der SVZ-Zellen mit ECM-Gel oder PDL beschichtet werden. Die Chips werden anschließend solange im Inkubator gelagert, bis die Zellen stabil adhärert sind und für die Messungen zur Verfügung

stehen. In dieser Zeit wird in regelmäßigen Abständen (etwa alle drei Tage) das Zellkulturmedium gewechselt. Detaillierte Protokolle zu den Beschichtungs- und Kultivierungsverfahren sowie zu den verwendeten Medien und Zusätzen finden sich in der Literatur^{189–191}.

8.2 Verifikation der Biokompatibilität der MEAs

In einem ersten Experiment wird die Biokompatibilität der MEAs qualitativ überprüft. Dabei wird getestet, inwiefern die eingesetzten Materialien oder Methoden das Wachstum und Überleben von Zellen auf den Chips beeinträchtigen. Hierfür wird beispielhaft die P19-Zelllinie verwendet (**Abbildung 8.1 a**).

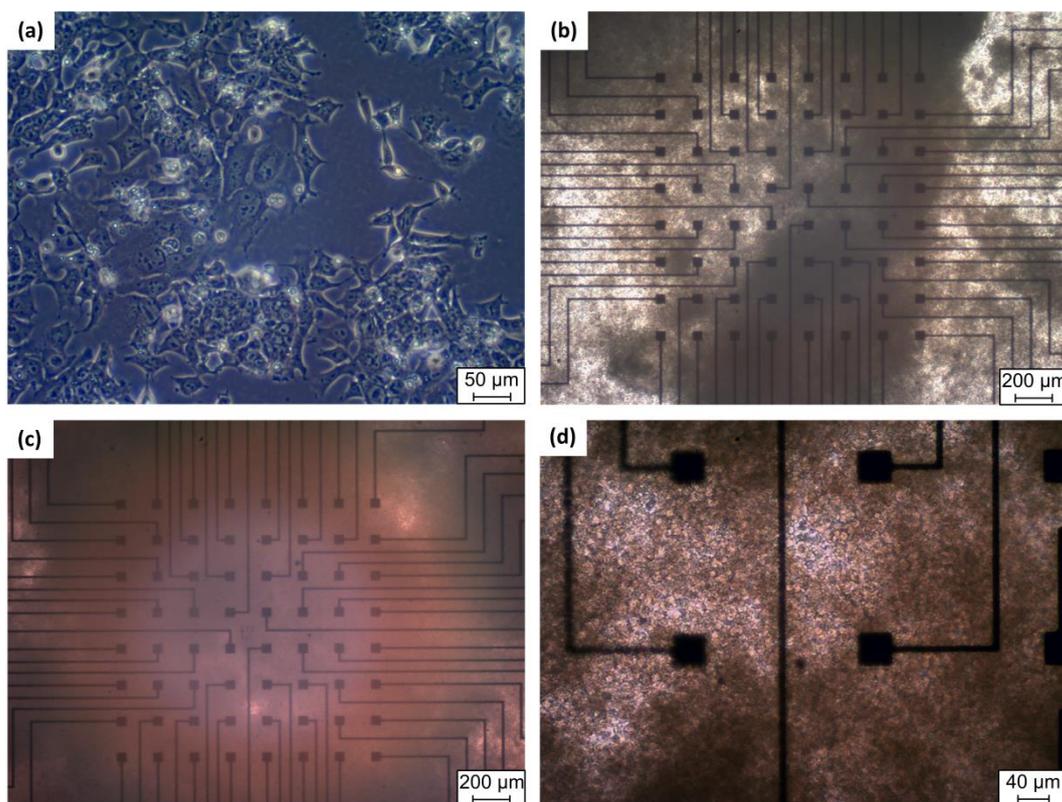


Abbildung 8.1: Qualitative Überprüfung der Biokompatibilität von P19 Zellen mit den nanostrukturierten MEAs. Aufnahmen an **(a)** Tag 0 vor der Aussaat, **(b)** Tag 1 und **(c)/(d)** Tag 23.

Die zu Kardiomyozyten differenzierten Zellen werden auf dem MEA ausgesät und für 23 Tage in Kultur gehalten. Dabei wird beobachtet, ob sich eine konfluente und adhärente Zellschicht ausbildet und ob diese über den Beobachtungszeitraum stabil bleibt. Da abgestorbene Zellen sich vom Substrat lösen, werden tote Zellen bei einem Mediumwechsel abgesaugt. Dadurch verbleiben lediglich vitale Zellen auf dem Substrat zurück, weswegen anhand der Zelldichte eine Aussage über die Biokompatibilität getroffen werden kann. Die Aufnahmen des Lichtmikroskops machen deutlich, dass die Zellen bereits am ersten Tag nach der Aussaat eine konfluente Schicht ausgebildet haben. Diese Schicht kann über den gesamten

Beobachtungszeitraum erhalten werden (**Abbildung 8.1 b-d**). In diesem Zeitraum kann kein massives Zellsterben durch Ablösen beobachtet werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wird gefolgert, dass sowohl die Herstellungsmethoden als auch die verwendeten Materialien zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums führen.

8.3 Charakterisierung der Zell-Elektroden-Kopplung

In diesem Abschnitt wird dargelegt, inwiefern die nanostrukturierten Elektrodenarrays geeignet sind, die Adhärenz der Zelle an die Elektrode durch eine Ankopplung an die Nanostrukturen zu verbessern. Dabei werden zwei verschiedene Verfahren präsentiert, um eine Aussage über die Zell-Elektroden-Kopplung zu treffen.

8.3.1 Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie

In einer ersten Versuchsreihe erfolgt die Untersuchung der Zell-Elektroden-Kopplung mittels REM. Zu diesem Zweck werden SVZ-Zellen auf nanostrukturierte Goldplättchen ohne Adhäsionsbeschichtung kultiviert. Als Nanostrukturen werden überwachsene Säulenstrukturen mit einem Durchmesser von 500 nm und je einem Abstand von 1 und 5 μm untersucht. Um die Wahrscheinlichkeit einer Ankopplung von der Zelle mit der Elektrode zu erhöhen, ist die Fläche des nanostrukturierten Bereichs vergrößert und beträgt $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. Nach einer siebentägigen Kultivierungsphase und der damit verbundenen Ausbildung eines stabilen Zellnetzwerks wird eine enzymatische Reinigung durchgeführt, die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und in einer Ethanolreihe mit ansteigender Ethanolkonzentration getrocknet. Daran anschließend wird die Probe für die REM-Messung vorbereitet und untersucht (**Abbildung 8.2**).

Bei dem Einsatz von SVZ-Zellen zeigt sich in der REM-Aufnahme keine negative Beeinflussung der Nanostrukturen hinsichtlich des Zellwachstums, weder in Form eines Meidens der Nanostrukturen noch in einem Absterben der Zellen. Die Zellen wachsen sowohl im nanostrukturierten als auch im unstrukturierten Bereich gleichermaßen. Bei den Nanostrukturen mit einem Abstand von 1 μm wachsen die Zellen über die Nanostrukturen. Ein ankoppelndes oder umschlingendes Verhalten ist nicht erkennbar. Bei den Nanostrukturen mit einem Abstand von 5 μm ist zu beobachten, dass die Nanostrukturen teilweise als Art Ankerpunkte für die Zellen fungieren. Allerdings ist auch bei dieser Anordnung von Nanostrukturen kein umschlingendes Verhalten zu erkennen.

Die Beobachtungen der REM-Analyse geben einen ersten Hinweis darauf, dass beim Verändern der Nanostrukturierung ein unterschiedliches Adhäsions- bzw. Kopplungsverhalten der Zelle zur Nanostruktur besteht. So sind die dichtgepackten Strukturen für die Zellen weniger attraktiv als die Strukturen, die weiter auseinander liegen. Alles in allem lässt sich in der REM-Aufnahme allerdings nur bedingt eine Aussage tätigen, ob eine bestimmte Nanostruktur ein attraktives oder repulsives (abstoßendes) Verhalten der Zelle gegenüber

verursacht. Um diesbezüglich eine bessere Aussage treffen zu können ist es notwendig, einen Querschnitt der Probe zu erzeugen, was ohne die Einsatzmöglichkeit eines fokussierten Ionenstrahls einen erheblichen Aufwand darstellt und daher bei mehreren zu untersuchenden Proben aktuell nicht möglich ist. Ein weiterer Schwachpunkt der REM-Analyse ist die Präparation der Probe selbst. Um eine REM-Aufnahme zu tätigen, muss die Zelle zunächst fixiert und im Anschluss getrocknet werden. Damit ein kontrastreiches Bild erzeugt werden kann, muss die Probe des Weiteren mit einer wenigen Nanometer dünnen, leitfähigen Metallschicht besputtert werden. Aus diesen Prozessen ergibt sich zwangsläufig eine Veränderung des Zustands im Vergleich zu dem, wie er in der Kultur vorliegt. Insbesondere das Trocknen stellt eine direkte Manipulation dar, da eine Schrumpfung der Zelle erfolgt. Dadurch ist eine qualitative Aussage über die Zell-Elektroden-Kopplung nur bedingt möglich. Aus diesen Gründen wird ein alternatives Verfahren zur Überprüfung der Zell-Elektroden-Kopplung entwickelt, das die Frage nach der Adhäsionsverbesserung mittels Impedanzmessungen zu beantworten versucht.

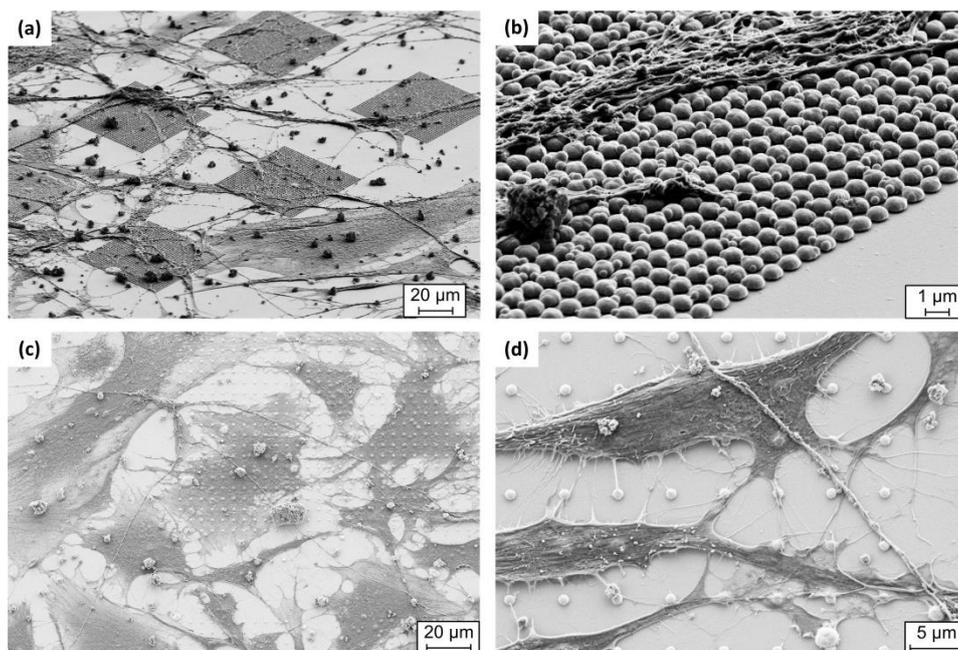


Abbildung 8.2: REM-Aufnahmen von SVZ-Zellen auf nanostrukturierten Goldplättchen mit (a)/(b) P500_1 Nanostrukturen sowie (c)/(d) P500_5 Nanostrukturen.

8.3.2 Analyse mittels Impedanzmessungen

In diesem Abschnitt wird die Untersuchung der Zell-Elektroden-Kopplung mittels Impedanzanalyse vorgestellt. Der Unterschied der einfachen Impedanzanalyse zur Impedanzspektroskopie ist der, dass nur eine Frequenz (hier: 1 kHz) bei der Messung berücksichtigt wird. Durch die Möglichkeit der gleichzeitigen und daher schnellen Messung aller Elektroden können jedoch zeitlich bedingte Elektrodenbelegungen durch den Elektrolyten ausgeschlossen werden. Zur Messung der Impedanz wird das Gerät MEA-IT (Multi Channel Systems) ver-

wendet, dessen Messprinzip auf einer Zwei-Elektroden-Anordnung basiert und aufgrund der nur sehr geringen Ströme, die durch die Messzelle fließen, ausreichend ist. Neben der Mikroelektrode wird als zweite Elektrode ein Silber-Silberchlorid-Draht eingesetzt. Aufgrund der erhöhten Anzahl an Versuchen und der Tatsache, dass die SVZ-Zellen frisch von den Tieren isoliert werden müssen, werden anders als bei der vorherigen Versuchsreihe HEK-Zellen zur Analyse verwendet. Der wesentliche Vorteil von HEK-Zellen ist, dass sie bereits nach wenigen Tagen eine konfluente Schicht ausbilden und anders als beispielsweise P19- oder SVZ-Zellen keine zusätzliche Adhäsionsschicht benötigen, um adhärent auf dem Chip zu wachsen. Der Einsatz einer solchen Adhäsionsschicht kann zum einen die Impedanzmessung an sich beeinflussen (siehe auch Kapitel 8.4). Zum anderen erschwert diese auch die Interpretation des Messergebnisses, da nicht unterschieden werden kann, ob die Zelle aufgrund der Adhäsionsschicht oder aufgrund der Nanostrukturen andere Adhäsionseigenschaften zeigt. Durch eine weitestgehende Abwesenheit von Leitfähigkeiten weisen die eingesetzten HEK-Zellen zusätzlich stabile Zellimpedanzen auf, was die Grundlage der vorliegenden Messung darstellt.

Zunächst wird eine Referenzmessung der Impedanz an den MEAs ohne Zellen mit Zellkulturmedium vorgenommen. Im Anschluss daran erfolgt die Kultivierung der MEAs mit HEK-Zellen, wobei die MEAs nach Aussaat für etwa drei bis fünf Tage inkubiert werden, sodass sich eine konfluente Zellschicht ausbilden kann (**Abbildung 8.3 a**). Eine Erhöhung der Inkubationszeit wirkt sich indes kontraproduktiv aus und führt zu einem erneuten Ablösen der Zellen. Im Anschluss wird die Impedanz der MEAs mit den HEK-Zellen (und Medium) gemessen. Ein gezieltes Absterben und somit Ablösen der Zellen wird nach der Messung herbeigeführt, indem 1 ng/µl Calcium-Ionophor-Ionomycin appliziert wird. Die Messergebnisse des kultivierten Zustands werden mit den zuvor getätigten Messungen im unkultivierten Zustand desselben MEAs verglichen. Diese Prozedur wird insgesamt fünfmal pro MEA wiederholt.

Abbildung 8.3 b zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Messung für den MEA-Chip P500_1. Dargestellt ist der Betrag der Impedanz bei einer Frequenz von 1 kHz als Mittelwert und Standardabweichung der fünf Einzelmessungen für die nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden im unkultivierten (Kontrolle) und mit HEK-Zellen kultivierten Zustand. Zunächst fällt auf, dass sowohl für nanostrukturierte als auch für unstrukturierte Elektroden der Kontrollwert kleiner ist als der Messwert mit Zellen. Dies ist insofern plausibel, da die Zellen, welche die Elektroden belegen, als zusätzlicher Widerstand eine Erhöhung der Impedanz zur Folge haben. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass beim Vergleich der nanostrukturierten Elektroden mit den unstrukturierten Elektroden, sowohl bei der Referenzmessung als auch bei der Messung mit Zellen, die Impedanz der nanostrukturierten Elektroden geringer ist als die der unstrukturierten Elektroden. Dies ist ein Effekt der Oberflächenvergrößerung durch die Nanostrukturen und ist mit den Beobachtungen der elektrochemischen Charakterisierung (Kapitel 7) konsistent. Die Applikation des Ionomycins führt indes zu einem Absterben der

Zellen und einem Abfall der Impedanz in den Bereich des Kontrollwerts (hier nicht dargestellt).

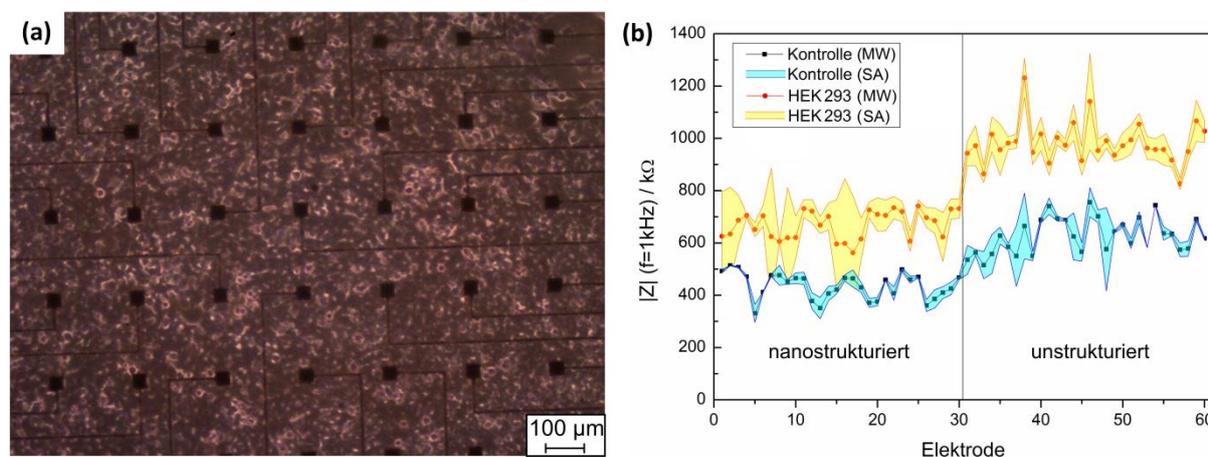


Abbildung 8.3: (a) Konfluente Zellschicht der HEK 293 Zellen am Tag 3 nach der Aussaat. (b) Darstellung des Impedanzbetrags $|Z|$ (bei $f=1 \text{ kHz}$) nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden (am Beispiel P500_1). Der Mittelwert (MW) inklusive Standardabweichung (SA) sind sowohl für Messungen ohne Zellkultivierung (schwarz/blau) als auch mit Kultivierung mit HEK 293 Zellen (rot/gelb) dargestellt ($n=5$).

Bei der Bewertung der Messergebnisse kann generell von drei möglichen Szenarien ausgegangen werden, wie die Nanostrukturen die Zell-Elektroden-Adhäsion beeinflussen können (**Abbildung 8.4 a**): Im Vergleich zu einer unstrukturierten Elektrode (1) verschlechtern (2) oder begünstigen (3) die Nanostrukturen die Zell-Elektroden-Kopplung oder haben keinen signifikanten Einfluss darauf (4). Um eine solche Aussage aus den Messdaten ableiten zu können, muss die Impedanzerhöhung ΔZ von nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden verglichen werden. Im Fall einer konfluente Zellschicht auf den Elektroden ist die Differenz des Impedanzbetrags direkt abhängig von dem Abstand der Zellen zu den Elektroden. Da die Zellen einen zusätzlichen Widerstand im Gesamtsystem darstellen, steigt die Impedanz im Fall der Kultivierung mit HEK 293 Zellen an. Das bedeutet, dass mit kleiner werdendem Abstand von Zelle zur Elektrode der Widerstand und somit die gemessene Impedanz größer werden. Wird das elektrochemische Ersatzschaltbild aus Kapitel 4 betrachtet (Abbildung 4.4), so ändern sich bei variabler Zelladhäsion lediglich der Abdichtwiderstand R_{Seal} und der Widerstand aufgrund des Elektrolyts im Zwischenraum von Zelle und Elektrode R_{Gap} , wobei letztgenannter erneut vernachlässigt werden kann ($R_{\text{Seal}} \gg R_{\text{Gap}}$). Aufgrund der Tatsache, dass auf einem MEA sowohl nanostrukturierte als auch unstrukturierte Elektroden vorhanden sind, kann der Impedanzunterschied der nanostrukturierten Elektroden ΔZ_{nano} direkt mit dem Impedanzunterschied der unstrukturierten Elektroden ΔZ_{unstr} verglichen werden. Da die Messergebnisse mit derselben Zellkultur generiert werden, kann ein Unterschied in der Impedanzerhöhung daher ausschließlich von unterschiedlichen Abdichtwider-

ständen herrühren. Dieser kann sich aufgrund der Gegebenheiten nur ändern, wenn sich der Abstand zwischen Zelle und Elektrode ändert und somit eine stärkere Kopplung bzw. Isolationswirkung vorliegt. Das bedeutet, dass gemessene Unterschiede in der Impedanzerhöhung direkt gleichzusetzen sind mit Unterschieden im Zell-Elektroden-Abstand und damit der Zell-Elektroden-Adhäsion infolge einer sich ändernden Zell-Nanostruktur-Kopplung. Im Beispiel aus Abbildung 8.3 b liegt die mittlere Impedanzerhöhung der nanostrukturierten Elektroden ΔZ_{nano} bei $228 \pm 47 \text{ k}\Omega$ und die Impedanzerhöhung der unstrukturierten Elektroden ΔZ_{unstr} im Mittel bei $347 \pm 28 \text{ k}\Omega$. Da die Impedanzerhöhung im Fall der unstrukturierten Elektroden größer ist als die der nanostrukturierten Elektroden, bedeutet dies, dass die Nanostrukturen eine hemmende Wirkung bezüglich einer Zell-Elektroden-Kopplung aufweisen. Im konkreten Fall liegt eine Verringerung der Adhärenz um durchschnittlich 52 % vor. Auffällig ist auch die zum Teil hohe Standardabweichung im Fall der Impedanzmessung mit kultivierten HEK-Zellen. Diese kann auf die unterschiedlichen Zellkulturen selbst zurückgeführt werden. Zudem ist nicht davon auszugehen, dass der spezifische Widerstand der Zelle im kompletten MEA als homogen anzunehmen ist, wodurch sich lokale Unterschiede ergeben können.

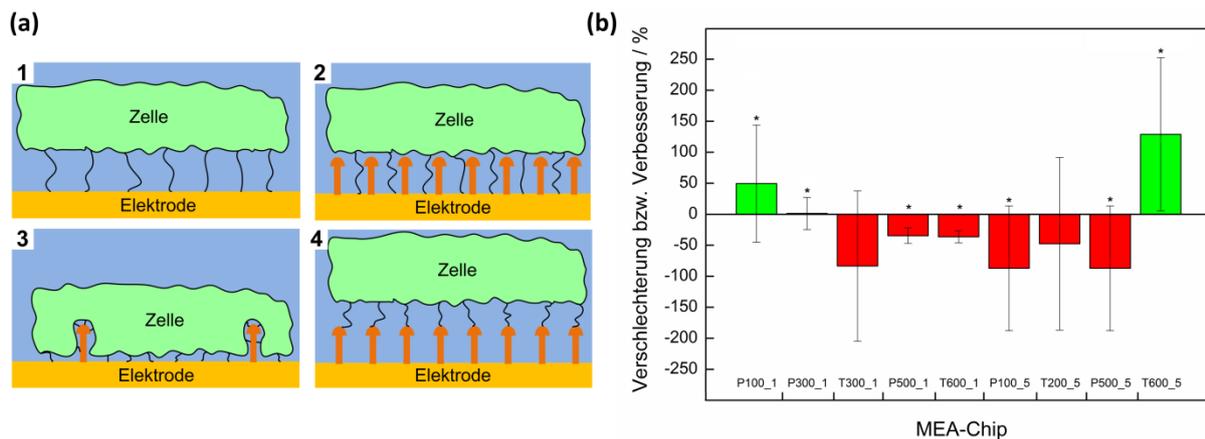


Abbildung 8.4: (a) Schematische Darstellung verschiedener Einflussmöglichkeiten einer nanostrukturierten Elektrode auf die Zell-Elektroden-Kopplung im Vergleich zu einer unstrukturierten Elektrode (links). (b) Vergleich des Einflusses der Nanostrukturen auf die Zelladhäsion unterschiedlicher MEA Chips anhand von Impedanzmessungen ($n= 5$).

Abbildung 8.4 b vergleicht die Mittelwerte der Impedanzerhöhungen nanostrukturierter und unstrukturierter Elektroden für die verschiedenen getesteten MEA-Chips und setzt diese in Relation zueinander. Ein positiver Wert (grüner Balken) stellt dabei eine Adhäsionsverbesserung durch die eingesetzten Nanostrukturen dar, ein negativer Wert (roter Balken) hingegen eine Verschlechterung. Dabei fällt auf, dass der Chip MEA T600_5 mit einer Verbesserung um durchschnittlich 128,9 % und der MEA Chip P100_1 mit einer Verbesserung um durchschnittlich 49,5 % die besten Ergebnisse liefern. Mit einer Impedanzerhöhung um durchschnittlich 1,4 % zeigt der MEA-Chip P300_1 nahezu keine Verbesserung der Adhäsionsei-

enschaften. Die übrigen Chips zeigen eine Impedanzverringering zwischen durchschnittlich 36,3 und 87,7 % und weisen damit auf eine Verschlechterung der Adhäsion im Fall nanostrukturierter Elektroden hin.

Werden die Ergebnisse bezüglich der Strukturform, des Strukturdurchmessers und des Strukturabstands verglichen, so kann kein Trend abgelesen werden. Weder tritt eine Verbesserung noch eine Verschlechterung mit steigendem Strukturabstand, Durchmesser oder beim Verwenden von Säulen- oder Röhrenstrukturen auf. Auch die vergleichsweise hohe Standardabweichung bei einigen MEA-Chips zeigt die Abhängigkeit der jeweiligen Ergebnisse von der jeweiligen Zellkultur. Weiterhin kann gezeigt werden, dass zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Strukturlayouts existieren. Dabei ist ersichtlich, dass eine beliebige Nanostruktur nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Adhäsionseigenschaften, sondern in den meisten Fällen zu einer Verschlechterung der Adhäsion führt. Aus diesem Grund muss das eingesetzte Nanostrukturlayout auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmt werden, zumal per se nicht davon auszugehen ist, dass die Adhäsionseigenschaften verschiedener Zelltypen auf dieselbe Nanostruktur identisch sind.

Anzumerken ist, dass die Messung der Impedanz implizit auch eine Messung der Zellvitalität darstellt. Da abgestorbene Zellen nicht mehr an der Elektrode adhären, kann ein sich fortschreitender Zelltod durch ein Abfallen der Impedanz beobachtet werden. Dadurch ist die Notwendigkeit einer separaten Analyse der Zellvitalität nicht zwangsläufig notwendig. Da eine Verringerung der Impedanz in den vorliegenden Experimenten nicht zu beobachten ist, kann von vitalen Zellen ausgegangen werden, wodurch auch die Biokompatibilität mit HEK-Zellen belegt ist.

Die Versuchsreihe bestätigt somit die zu Beginn dieser Arbeit angestellte Vermutung, dass neben einer Erhöhung der Eingangsimpedanz des MEA-Chips infolge der Nanostrukturen insbesondere auf die Adhäsionseigenschaften Wert gelegt werden muss. Wenn eine Verringerung der Zelladhäsion durch die Nanostrukturen erfolgt, kann diese unter Umständen nicht durch eine Erhöhung der effektiven Oberfläche kompensiert werden, wodurch keine verbesserten Signale während der Aktionspotentialmessungen detektiert werden können.

8.4 Einfluss einer adhäsionsvermittelnden Schicht auf die Nanostrukturen

Anders als die HEK 293 Zellen, die in den vorherigen Experimenten eingesetzt werden, benötigen viele andere Zelltypen, wie P19- oder SVZ-Zellen, eine zusätzliche Beschichtung, um ein konfluentes Wachstum auf nicht-zelltypischen Oberflächen, wie sie beim MEA durch die Metallelektroden und Isolationsschichten gegeben sind, anzuregen. Insbesondere bei Langzeitmessungen ist eine konstante Adhärenz der Zelle aufgrund von Zellmigration von großer Bedeutung. Aus diesem Grund ist die Positionierung der Zellen mittels Zellstrukturierung durch den Einsatz von Adhäsionsschichten (bzw. Anti-Adhäsionsschichten) entschei-

dend¹⁹²⁻¹⁹⁶. Zu diesem Zweck können vor der eigentlichen Zellkultivierung je nach Zelltyp verschiedene Schichten auf das MEA aufgebracht werden, die die Zelladhäsion auf dem MEA-Chip begünstigen. Bestandteil dieser Schichten sind unter anderem Proteine der Extrazellulärmatrix der Zelle. Letztere ist ein Geflecht aus verschiedenen Proteinen, wie Kollagen oder Fibronectin, welches von der Zelle abgesondert wird, die Plasmamembran umgibt und sowohl die Ausrichtung, Fortbewegung und Adhäsion der Zelle beeinflusst¹⁹⁷. Neben einer verbesserten Adhäsion bringen verschiedene Beschichtungen auch noch weitere Vorteile. So verstärkt beispielsweise Poly-D-Lysin die Synapsenausbreitung von Neuronen¹⁹⁸. Im Fall der nanostrukturierten Mikroelektroden kann sich die Adhäsionsschicht allerdings auch nachteilig auswirken, sobald diese die Nanostrukturen überdeckt. Daher ist die Kenntnis der Schichtdicke bzw. des Einflusses der Schicht auf die Nanostrukturen essentiell. Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Schichten werden daher Messungen mit dem Oberflächenprofilometer und mittels Impedanzanalyse getätigt und miteinander verglichen. Dabei werden die Beschichtungen Gelatine, ECM-Gel und PDL untersucht. Da die Dicke der Adhäsionsschicht vom eingesetzten Stoff selbst, der Konzentration der Lösung und der Einwirkzeit abhängig ist, findet die Beschichtung in der Art statt, wie sie auch bei der Zellkultivierung eingesetzt wird. Als Substrate werden sowohl MEAs als auch einfache Goldplättchen verwendet.

8.4.1 Analyse mittels Oberflächenprofilometrie und Rasterelektronenmikroskopie

In einer ersten Versuchsreihe wird der Einfluss der Adhäsionsschicht mittels mechanischem Oberflächenprofilometer und REM bestimmt. Für die Profilometermessung werden zunächst unstrukturierte Goldplättchen beschichtet. Anschließend wird mit Hilfe eines Holzzahnstochers eine Kerbe in die Schicht eingeritzt, ohne dabei das unterliegende Material zu beschädigen. Die Stufenhöhe und somit die Schichtdicke wird im Anschluss an fünf Stellen bestimmt. **Abbildung 8.5** zeigt die Mikroskopaufnahmen der präparierten Proben.

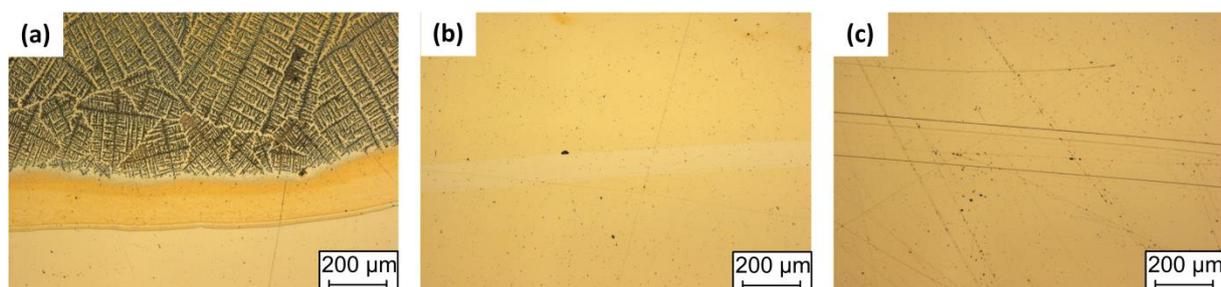


Abbildung 8.5: Mit (a) ECM-Gel, (b) Gelatine und (c) PDL beschichtete Goldplättchen zur Bestimmung der Schichtdicke mittels Oberflächenprofilometrie.

Die Probe, welche mit ECM-Gel beschichtet wird, kristallisiert nach dem Trocknen stark aus, wodurch der beschichtete Bereich deutlich zu erkennen ist. Bei der mit Gelatine beschichteten

Probe ist die Beschichtung lediglich schwach zu erkennen, wohingegen bei der Probe, welche mit PDL beschichtet ist, keine Schicht zu erkennen ist. Beim Vergleich der Profilometer-Messwerte zeigen sich deutliche Unterschiede in den Dicken der Schicht, welche sich mit den Beobachtungen des optischen Mikroskops decken. Die dickste Schicht wird mit $563,5 \pm 17,0$ nm bei der mit ECM-Gel beschichteten Probe gemessen. Die Gelatineschicht weist eine Dicke von $46,5 \pm 7,7$ nm und die PDL-Schicht eine Dicke von $13,0 \pm 3,8$ nm auf.

Um den Einfluss der Schicht auf die Nanostrukturen zu evaluieren, werden im Anschluss MEAs mit denselben Parametern wie die Goldplättchen beschichtet und für REM-Aufnahmen vorbereitet. Als Nanostrukturen werden beispielhaft 600 nm breite Röhren- oder Säulenstrukturen verwendet (**Abbildung 8.6**). Da die MEAs für die Probenaufbereitung zur Untersuchung mittels REM teilweise demontiert werden müssen, sind diese anschließend nicht mehr zu verwenden.

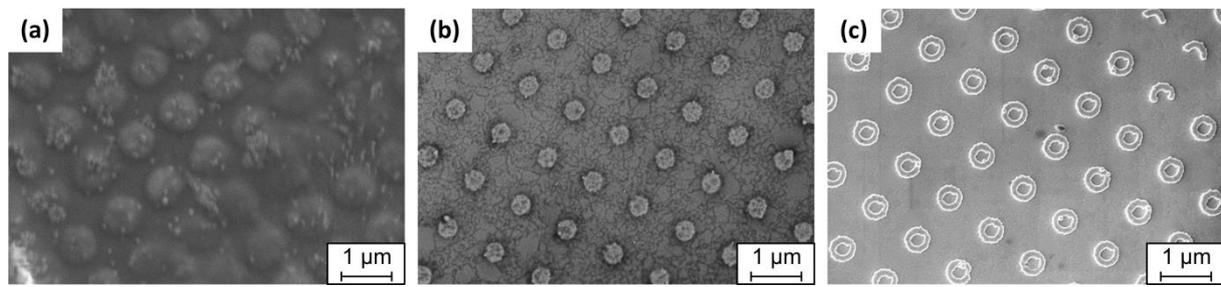


Abbildung 8.6: REM-Aufnahmen nanostrukturierter MEA Elektroden, die mit (a) ECM-Gel, (b) Gelatine und (c) PDL beschichtet sind.

Eine deutliche Überlagerung der Nanostrukturen durch die Schicht ist im Fall des ECM-Gels zu beobachten. Die Nanostrukturen sind zwar noch zu erkennen, allerdings sind die Strukturen aufgrund der dicken Schicht stark verbreitert. Da die gemessene Schichtdicke größer als die Höhe der Nanostrukturen ist, erfolgt eine komplette Überdeckung der Nanostrukturen. Wird das ECM-Gel als Beschichtung für Untersuchungen zur Signalableitung eingesetzt, so können Kopplungseffekte zwischen Zelle und Nanostruktur de facto ausgeschlossen werden. Im Fall der Gelatinebeschichtung ist eine Schicht zu erkennen, die sich vor allem zwischen den Nanostrukturen befindet. Eine Verbreiterung der Strukturen ist, wie vergleichsweise bei der ECM-Gel-Beschichtung, nicht zu erkennen. Der Einfluss der Beschichtung ist zwar durch die teilweise Überdeckung der Elektrode vorhanden, die Auswirkungen in Bezug auf nachfolgende Zellexperimente sind hingegen aufgrund der mitteldicken Schicht als gering einzustufen. Im Kontrast dazu ist die PDL-Beschichtung derart dünn, dass diese mittels REM nicht aufgelöst werden kann. Dies wird deutlich, da bei genauer Betrachtung der REM-Aufnahme die Kristallite/Korncluster der sich unter der PDL-Schicht befindlichen Goldschicht zu erkennen sind. Die nur wenige Nanometer dicke Adhäsionsschicht bildet einen derart dünnen Film um die Elektroden aus, dass der Einfluss der Schicht wahrscheinlich vernachlässigt werden kann.

8.4.2 Analyse mittels Impedanzmessungen

Der Einfluss der Schichtdicke kann ebenfalls mit Hilfe von Impedanzmessungen charakterisiert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, dass der Chip nicht demon­tiert werden muss und somit auch nach der Schichtdickenbestimmung wieder zu gebrauchen ist. Zum anderen muss die Adhäsionsschicht nicht getrocknet werden und kann im feuchten Milieu gemessen werden, was den realen Bedingungen während der Zellableitung entspricht. Aus diesen Gründen werden Impedanzmessungen beispielhaft am MEA-Chip P500_1 durch­geführt. Dabei wird die Impedanz zunächst ohne adhäsionsvermittelnde Schicht gemessen. Im Anschluss daran wird der Chip nacheinander mit Gelatine, ECM-Gel und PDL beschichtet und die Impedanz erneut analysiert. Zwischen den einzelnen Beschichtungen wird der Chip gereinigt und zur Kontrolle erneut die Impedanz untersucht, um Veränderungen nach der Be­schichtung und Reinigung zu detektieren. Die Impedanzen des beschichteten MEAs sind Ein­zelmessungen, die Kontrollmessung ohne haftvermittelnde Schicht ist hingegen als Mittelwert von vier Messungen aufzufassen (**Abbildung 8.7**). Um eine qualitative Aussage über die Schichtdicke zu tätigen, muss wie in Kapitel 8.3.2 ein Vergleich des Impedanzbetrags ohne und mit Beschichtung gezogen werden. Je stärker sich die Impedanz dabei erhöht, desto grö­ßer ist die isolierende Wirkung, die sich in erster Linie durch eine erhöhte Schichtdicke äu­ßert.

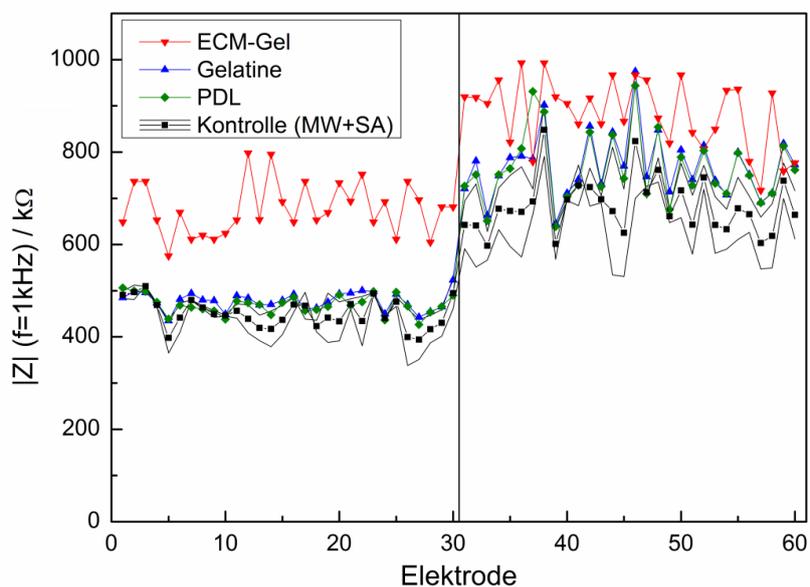


Abbildung 8.7: Darstellung des Impedanzbetrags $|Z|$ (bei $f=1$ kHz) nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden des MEA-Chips P500_1 für verschiedene adhäsionsvermittelnde Schichten in PBS ($n=1$). Als Kontrolle wird derselbe Chip ohne Schicht analysiert (Mittelwert (MW) inklusive Standardabweichung (SA); $n=4$).

Anhand der Messdaten ergibt sich die größte Erhöhung des Impedanzbetrags für das ECM-Gel, welche für nanostrukturierte Elektroden im Mittel $227,6 \pm 64,7$ k Ω und für unstrukturier-

te Elektroden $208,7 \pm 79,1 \text{ k}\Omega$ beträgt. Für Gelatine ergibt sich ein Mittelwert von $32,1 \pm 19,0 \text{ k}\Omega$ für nanostrukturierte Elektroden und ein Mittelwert von $87,2 \pm 38,6 \text{ k}\Omega$ für unstrukturierte Elektroden. Für PDL ergeben sich Impedanzerhöhungen von $30,1 \pm 16,8$ respektive $88,0 \pm 45,9 \text{ k}\Omega$. Die Messungen der Impedanz bestätigen die Ergebnisse der vorhergehenden Untersuchungen, wonach für sowohl nanostrukturierte als auch für unstrukturierte Elektroden das ECM-Gel den größten, für Gelatine einen mittelgroßen und für PDL den geringsten Einfluss aufweist. Werden die Beschichtungen getrennt hinsichtlich der Wirkung auf nanostrukturierte und unstrukturierte Elektroden verglichen, so ist die Impedanzerhöhung im Fall des ECM-Gels bei nanostrukturierten Elektroden höher als bei unstrukturierten Elektroden. Das bedeutet, dass aufgrund der Schichtdicke die nanostrukturierte Oberfläche stärker abgeschirmt wird als die planare Elektrode, was den Effekt der Nanostruktur nivelliert. Im Gegensatz dazu ist bei der Gelatine- und PDL-Beschichtung die Impedanzerhöhung bei den unstrukturierten Elektroden größer. Eine mögliche Erklärung ist, dass aufgrund der vergleichsweise dünneren Schicht eine Bedeckung der Nanostrukturen nur teilweise erfolgt und dadurch die Absolutwerte der Impedanzerhöhung geringer sind.

Um eine quantitative Aussage bezüglich des Schichtdickeneinflusses zu tätigen, müssen folgende Überlegungen angestellt werden: Bei Verwendung des exakt gleichen MEAs für Impedanzmessungen von beschichteten und unbeschichteten Elektroden resultiert eine Veränderung der Impedanz durch die Veränderung des Schichtwiderstands R_s . Dieser ist gegeben durch:

$$R_s = \frac{d}{\sigma A} \quad (8.1)$$

wobei d die Schichtdicke, σ die Leitfähigkeit der Schicht und A die Fläche der Schicht auf der Elektrode darstellt. Die Messungen der Leitfähigkeiten der verschiedenen Lösungen werden mit einem Konduktometer durchgeführt, wobei die Messwerte in **Tabelle 8.1** zusammengefasst sind. Als Referenz wird die Leitfähigkeit von DI-Wasser gemessen. Auffällig ist, dass die Leitfähigkeiten der Adhäsionslösungen im Vergleich zu PBS sehr gering sind, sodass eine Erhöhung der Impedanz maßgeblich durch die Dicke der sich ausbildenden Schicht resultiert.

Mittels Gleichung 8.2 kann nun die Differenz $\Delta|Z|$ ermittelt werden:

$$\Delta|Z| = |Z|_2 - |Z|_1 = \Delta R_s = \left[\frac{d_A}{\sigma_A A} + \frac{d_{\text{res}} - d_A}{\sigma_{\text{PBS}} A} \right] - \frac{d_{\text{res}}}{\sigma_{\text{PBS}} A} \quad (8.2)$$

wobei d_A die Dicke der Adhäsionsschicht, d_{res} die Höhe des Reservoirs, σ_A die Leitfähigkeit der Adhäsionsschicht und σ_{PBS} die Leitfähigkeit von PBS ist.

Unter Verwendung der Messwerte für $|Z|$ kann die Schichtdicke der Adhäsionsschicht wie folgt ermittelt werden:

$$d_A = \frac{\Delta|Z|\sigma_A\sigma_{\text{PBS}}A}{\sigma_{\text{PBS}} - \sigma_A} \quad (8.3)$$

Tabelle 8.2 gibt die berechneten Werte der Schichtdicken aus den gemessenen Impedanzen und Leitfähigkeiten wieder. Als Vergleichswerte werden dabei die Messergebnisse des mechanischen Oberflächenprofilometers hinzugezogen. Werden die Ergebnisse der nanostrukturierten Elektroden mit den Messungen des Oberflächenprofilometers verglichen, so stimmen die Ergebnisse überein. Beim Vergleich der unstrukturierten Elektroden ergeben sich jedoch deutlich größere Abweichungen. Generell kann von mehreren Fehlerquellen bei der Bestimmung der tatsächlichen Schichtdicke ausgegangen werden: Da die Leitfähigkeit von der Temperatur abhängt, können Temperaturschwankungen zu Diskrepanzen bei der Bestimmung der Leitfähigkeit zum einen und bei der Messung der Impedanz zum anderen dazu führen, dass sich die gemessenen von den tatsächlichen Leitfähigkeiten unterscheiden. Die Beschichtung der Mikroelektroden ist mit der Beschichtung makroskopischer Goldplättchen aufgrund der unterschiedlichen Geometrien nicht direkt vergleichbar. Zum einen ist der Durchmesser der Mikroelektroden geringer, zum anderen sind die Mikroelektroden zurückgesetzt. Zudem besteht der größte Anteil der Oberfläche bei den MEA-Chips aus Isolatormaterial. Auch die Tatsache, dass die Schicht auf den Goldplättchen getrocknet und zum Teil stark auskristallisiert ist, im Fall der Impedanzmessung aber stets im feuchten Niveau gelagert ist, erschwert den direkten Vergleich. Dennoch ist eine Messung der Impedanz zur Schichtdickenbestimmung die Methode, die die Gegebenheiten hinsichtlich einer späteren Messung mit Zellen am genauesten widerspiegelt und besitzt daher die größte Aussagekraft.

Tabelle 8.1: Leitfähigkeitsmessungen verschiedener adhäsionsvermittelnder Stoffe beinhalten der Lösungen.

Substanz	Konzentration	Leitfähigkeit bei 20 °C [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]
DI-Wasser	pur	0,1
(1x) PBS	pur	$16,9 \cdot 10^3$
Gelatine in DI-Wasser	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	21,8
PDL in DI-Wasser	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	17,9
ECM in DI-Wasser	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	33,8

Sollen die positiven Effekte der Nanostrukturen hinsichtlich der Impedanzverringering und möglicher Kopplungseffekte erhalten bleiben, ist je nach Zelltyp entweder Gelatine oder PDL als Beschichtung zu empfehlen. Da eine Beschichtung mit ECM-Gel die Nanostrukturen weitestgehend überdeckt, ist bei Verwendung dieser Beschichtung (bei dieser Konzentration und Einwirkzeit) nicht von einer verbesserten Signalerfassung während den Aktionspotentialmessungen auszugehen.

Tabelle 8.2: Vergleich der ermittelten Werte für die Dicke der Adhäsionsschicht d_A aus den Impedanz- und Profilometermessungen für die verschiedenen Beschichtungsarten.

Beschichtung	d_A nanostrukturiert [nm] (aus Impedanz)	d_A unstrukturiert [nm] (aus Impedanz)	d_A Goldplättchen [nm] (aus Profilometer)
ECM	543,9	499,6	563,5
Gelatine	49,5	134,5	46,5
PDL	38,2	112,9	13,0

8.5 Signalableitung an SVZ-Zellen

In einer abschließenden Versuchsreihe wird überprüft, inwiefern die hergestellten MEAs für die Ableitung von Zellsignalen geeignet sind und ob sich eine Veränderung durch die Nanostrukturierung erkennen lässt. Neben Unterschieden in der gemessenen Signalamplitude können sich die Signale bezüglich ihrer Form und Anzahl an Spannungsspitzen unterscheiden. Die gemessenen Signale können dabei positiv oder negativ, als einzelne Spannungsspitzen (Spikes) oder in einer schnellen Abfolge von Spannungsspitzen (Bursts) auftreten. Die Art der gemessenen Signale hängt dabei von verschiedenen Einflussfaktoren ab. Die Größe der Zellen beeinflusst beispielsweise die Signalamplitude, wobei größere Zellen aufgrund ihrer höheren Membrankapazität und der damit verbundenen größeren transmembranen Ionenströme höhere Amplituden generieren als kleinere Zellen. Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, dass auch die Anordnung der Messelektrode einen Einfluss auf das Messsignal hat: Bei zurückgesetzten Elektroden werden mehrheitlich negative Spikes/Bursts detektiert, wohingegen Elektroden mit hervorstehenden Bereichen überwiegend positive Signale detektieren. Auch mit fortschreitender Zeit und Messdauer können sich die Messsignale aufgrund von Zellmigration verändern^{199–202}.

Zur Untersuchung der Zellsignale werden insgesamt vier MEA Chips mit unterschiedlichen Nanostrukturen zunächst gereinigt, sterilisiert, anschließend beschichtet und zuletzt mit SVZ-Zellen kultiviert. Die Auswahl der MEAs richtet sich hierbei nach den bereits gewonnen Erkenntnissen aus den Versuchsreihen bezüglich der elektrochemischen Charakterisierung, den

Experimenten zur Zell-Elektroden-Kopplung und den Beschichtungsversuchen: Der Chip T600_1 wird aufgrund der besten elektrochemischen Eigenschaften und des geringen Rauschspektrums gewählt. Die besten Resultate hinsichtlich der Zell-Elektroden-Kopplung zeigen hingegen die Chips P100_1 und T600_5. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Strukturabstände wird als vierter Chip das MEA P100_5 eingesetzt. Für eine Kultivierung mit SVZ-Zellen eignen sich generell sowohl das ECM-Gel als auch das PDL als Adhäsionsschicht. Aufgrund des geringeren Einflusses der PDL-Schicht auf die Impedanz der Elektroden wird diese als adhäsionsvermittelnde Schicht verwendet. Die Zellen werden für einen Zeitraum von insgesamt 20 Tagen in Kultur gehalten. Eine Potentialmessung erfolgt jeweils an Tag 11, 18 und 20 mit Hilfe des Vorverstärkers MEA-Inv1060, einer Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode und der Software MC Rack für jeweils 180 s. Als Elektrolyt wird das Zellkulturmedium, in der die Zellen in Kultur gehalten werden, benutzt. **Abbildung 8.8** zeigt eine Beispielmessung am MEA-Chip T600_5.

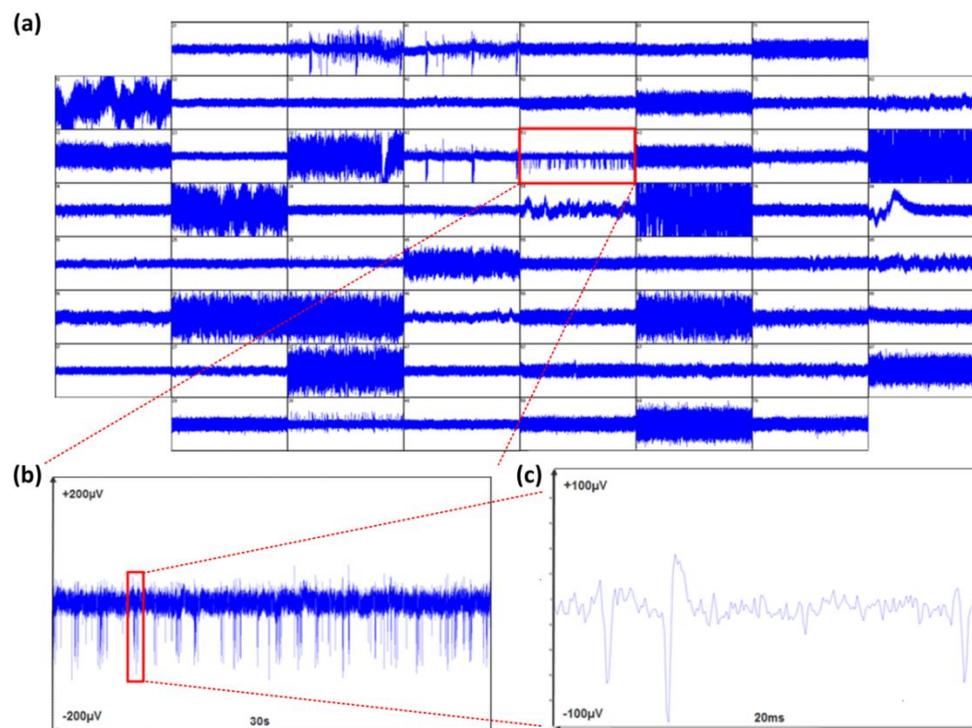


Abbildung 8.8: (a) Beispielmessung zur Detektion von Zellpotentialen am MEA-Chip T600_5. (b) Vergrößerung aus (a) zeigt die Abfolge der Potentialpeaks über einen Zeitraum von 30 s. (c) Vergrößerung aus (b) zeigt die Darstellung einzelner Potentialpeaks.

Deutlich zu erkennen ist, dass die meisten Elektroden lediglich das normale Grundrauschen zeigen. Diese Elektroden detektieren kein Signal, da sich in ihrer näheren Umgebung keine aktiven Zellen befinden. Daneben sind Elektroden vorhanden, die ein sehr starkes Rauschen aufweisen. Dieses kann durch blockierte oder beschädigte Elektroden hervorgerufen werden. Bei anderen Elektroden sind hingegen Zellsignale zu erkennen, die sich als wiederkehrende

Peaks darstellen. Bei Vergrößerung dieser Signalpeaks ist die Form des Aktionspotentials deutlich zu erkennen, welches sich aus Depolarisation, Repolarisation und Hyperpolarisation zusammensetzt und im vorliegenden Beispiel ca. 4-5 ms andauert. Nach der Verifizierung aller Kanäle mit eindeutigem Signalausschlag, werden diese entsprechend den Parametern Anzahl aktiver Elektroden, Signalform, Signalrate und Signalamplitude analysiert, wobei jeweils zwischen nanostrukturierten und unstrukturierten (planaren) Elektroden unterschieden wird (**Tabelle 8.3**).

Tabelle 8.3: Vergleich der Anzahl aktiver Elektroden sowie verschiedener Parameter der Aktionspotentiale der untersuchten MEA-Chips an verschiedenen Tagen der Messung.

	Tag	P100_1		T600_1		P100_5		T600_5	
		nano	planar	nano	planar	nano	planar	nano	planar
Anzahl aktiver Elektroden	11	-	-	4	2	1	1	1	2
	18	2	-	6	2	2	2	1	1
	20	2	-	5	1	4	2	2	1
Signalform (Polarität)	11	-	-	Bursts (-)	Spikes (-)	Spikes (-)	Bursts (-)	Spikes (-)	Spikes (-)
	18	Spikes (o/-)	-	Bursts (+/o/-)	Spikes (+/-)	Spikes (-)	Spikes (-)	Spikes (-)	Spikes (-)
	20	Spikes (o/-)	-	Bursts (+/o/-)	Spikes (-)	Spikes (-)	Spikes (-)	Spikes (o/-)	Spikes (-)
Signalrate [Spikes/s]	11	-	-	0,7	3,0	1,2	8,4	11,0	7,6
	18	3,2	-	7,3	1,8	10,7	2,4	5,2	3,6
	20	4,1	-	11,7	14,8	10,3	3,7	8,2	4,5
Signalamplitude [μV]	11	-	-	62,2 \pm 8,4	56,4 \pm 15,1	50,2 \pm 6,0	93,3 \pm 19,4	49,3 \pm 8,6	54,9 \pm 7,9
	18	43,6 \pm 9,3	-	78,2 \pm 25,4	66,9 \pm 13,8	66,9 \pm 13,8	60,3 \pm 10,9	254,2 \pm 12,8	70,9 \pm 16,2
	20	48,9 \pm 25,4	-	61,7 \pm 27,8	46,7 \pm 18,7	93,0 \pm 13,4	62,3 \pm 5,0	197,7 \pm 11,3	63,7 \pm 14,4

Anzahl aktiver Elektroden

Der Begriff „aktive Elektrode“ steht in diesem Zusammenhang für die Elektroden, bei der die Erfassung von eindeutigen Zellsignalen möglich ist. Generell fällt auf, dass von den insgesamt 60 Elektroden, die potentiell in der Lage sind Zellsignale zu erfassen, nur ein geringer

Anteil tatsächlich Signale liefert. So ist der MEA-Chip T600_1 mit maximal sieben aktiven Elektroden auf der Seite der nanostrukturierten Elektroden bzw. mit zwei auf Seiten der unstrukturierten Elektroden derjenige Chip mit der größten Anzahl aktiver Elektroden. Bei den restlichen Chips schwankt die Anzahl während der gesamten Messdauer zwischen null und vier. Anhand der Daten ist weiterhin zu erkennen, dass die Anzahl aktiver Elektroden an Tag 11 geringer ist als an den darauffolgenden Tagen 18 und 20. Die verminderte Aktivität der Kulturen an Tag 11 kann mit der noch nicht vollständig abgeschlossenen Differenzierung erklärt werden. Zudem kann die Aktivität auf nanostrukturierten mit der Aktivität auf unstrukturierten Elektroden verglichen werden. Hierbei zeigt sich, dass mit einer Ausnahme die Anzahl aktiver Elektroden auf der nanostrukturierten Seite gleich groß oder größer ist als auf Seiten der unstrukturierten Elektroden. Dies weist darauf hin, dass im Fall der SVZ-Zellen die ausgewählten Nanostrukturen zusammen mit der PDL-Beschichtung einen insgesamt eher positiven Einfluss auf die Adhäsion und die Ableitung von Zellpotentialen besitzen. Die vergleichsweise geringe Anzahl an aktiven Elektroden kann mit der Qualität der Kultur bzw. dem Verändern des Mediums im Verlauf der Experimente erklärt werden (**Abbildung 8.9**).

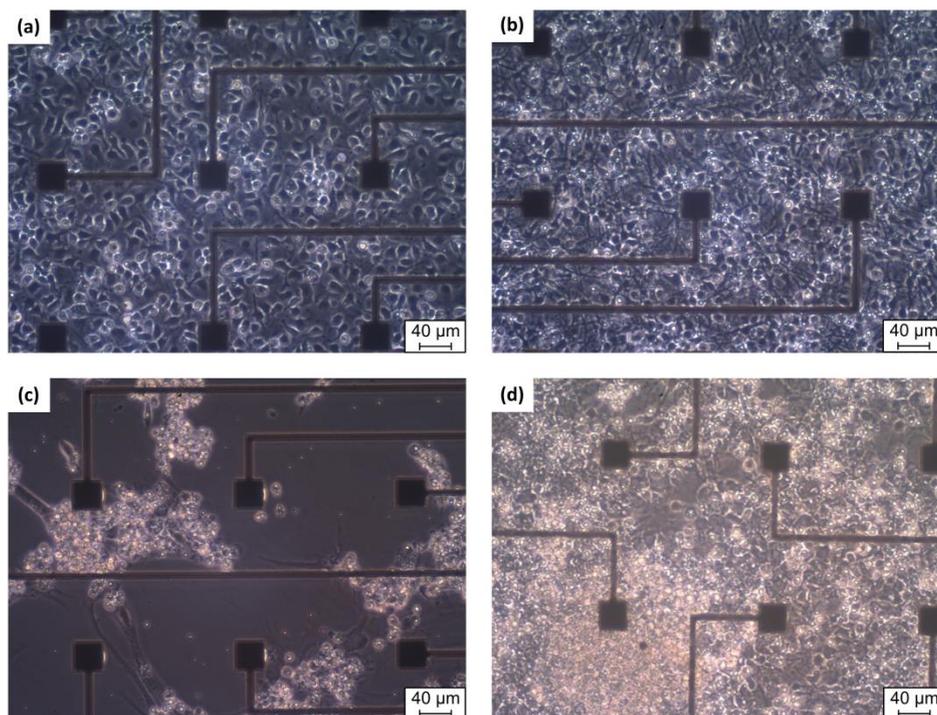


Abbildung 8.9: Aufnahmen der Zellkultur an (a) Tag 0, (b) Tag 1, (c) Tag 11 ohne Membran und (d) Tag 11 mit Membran.

Bei der Betrachtung der Zellkulturqualität direkt nach der Aussaat der Zellsuspension (Tag 0) und anschließender Adhäsion der Zellen auf dem MEA ist ersichtlich, dass die Zelldichte sehr hoch ist (Abbildung 8.9 a). Auch an Tag 1 ist die Zelldichte noch entsprechend hoch und die Differenzierung der Zellen ist bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (Abbildung 8.9 b). Wird die Qualität der Kultur über die weiteren Tage verfolgt, so nimmt die Zelldichte stetig

ab, was mit einem Absterben von Zellen einhergeht (Abbildung 8.9 c). Durch die geringe Zelldichte wird eine effektive Signaldetektion unterbunden. Ein Absterben der Zelle kann dabei generell mit mehreren Effekten zusammenhängen: Darunter fallen beispielsweise eine Biokompatibilität des Chips, Kontaminationen, Schwankungen im pH-Wert des Mediums, Turbulenzen auf dem MEA-Chip oder die Veränderung der Osmolarität des Mediums. Eine Kontamination kann dahingehend ausgeschlossen werden, da dadurch die gesamte Zellpopulation binnen kurzer Zeit absterben würde. Auch eine möglicherweise unzureichende Biokompatibilität kann aufgrund der Beobachtungen und Ergebnisse der vorhergehenden Messreihen als Ursache des Zellsterbens ausgeschlossen werden. Das Problem schwankender pH-Werte und Turbulenzen rührt daher, da das MEA zum Wechsel des Mediums, Überprüfung der Kultur mittels Mikroskop sowie Ableitung der Zellsignale aus dem Inkubator entnommen werden muss. Dadurch ergeben sich vor allem Änderungen in der Temperatur, der Konzentration der Atmosphärgase und somit auch im pH-Wert der Lösung. Insbesondere der Austausch des Mediums führt zu Turbulenzen und erhöht den Stress für die Zellen. Der Mediumwechsel ist jedoch zwingend erforderlich, da sonst wichtige Nährstoffe, die die Zellen zum Überleben benötigen, nicht in ausreichender Menge vorhanden wären. Als größter Einflussfaktor auf den Zustand der Zellkultur ist die Schwankung in der Osmolarität des Mediums zu nennen, welche aufgrund von Verdunstung während der Lagerung im Inkubator auftritt. Beim Wechsel des Mediums hat sich gezeigt, dass etwa ein Drittel bis die Hälfte des Mediums innerhalb von zwei bis drei Tagen verdunstet ist, was zu einem kontinuierlichen Absterben der Zellen und somit zu einem deutlichen Rückgang der Zellpopulation führt. Durch die Verwendung einer Membran, welche direkt über das Reservoir des MEAs gespannt wird und die den Gasaustausch mit der Umgebung zulässt, aber Verdunstungseffekte minimiert, wird die Zelldichte im Vergleich zur Population ohne Membran deutlich erhöht, was eine Detektion von Signalen erst ermöglicht (Abbildung 8.9 d). Eine weitere Erklärung für die geringe Aktivität ist, dass lediglich die Spontanaktivität der Zellen gemessen wird. Beim Versuch die Aktivität durch Hinzugabe von Kaliumchlorid zu erhöhen, lösen sich jedoch die Zellen aufgrund von lokalen, turbulenten Strömungen ab und die Signaldetektion wird komplett unterbunden.

Signalform

Bei den detektierten Signalen können ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der Form und Polarität zwischen den untersuchten MEAs ausgemacht werden. Unterschieden werden Spikes und Bursts in positiver (+), negativer (-) oder in beiden (o) Potentialrichtungen. Dabei fällt auf, dass verschiedene Signalformen von verschiedenen MEAs zu unterschiedlichen Zeiten erfasst werden. Wird die Signalentwicklung an den einzelnen Tagen betrachtet, so kann festgestellt werden, dass an Tag 11 ausschließlich Signale in negativer Potentialrichtung erfasst werden. Ab Tag 18 können hingegen auch Signale in positiver bzw. in beide Potentialrichtungen detektiert werden. Wird die Signalform von nanostrukturierten und unstrukturierten Elektroden miteinander verglichen, so werden bei den unstrukturierten Elektroden überwiegend Spikes in

negativer Potentialrichtung detektiert, wie es auch in der Literatur beschrieben wird²⁰³. Eine verstärkte Burstaktivität wird hingegen bei dem Chip T600_1 festgestellt, wobei verschiedene Elektroden des Chips sowohl Bursts in positiver, negativer als auch in beiden Potentialrichtungen detektieren.

Signalrate

Zur Untersuchung der Zellaktivität ist als weiterer Indikator die Signalrate zu nennen, also wie viele Spikes in einem bestimmten Zeitintervall auftreten. Auch hier muss das Ergebnis differenziert betrachtet werden. Generell zeigt sich, dass die Aktivität vom Tag der Messung selbst abhängt. Bei den meisten Elektroden ist an Tag 11 eine tendenziell geringere Aktivität als an den darauffolgenden Tagen zu beobachten. Die größte Aktivität kann an Tag 18 mit dem Chip T600_1 auf einer unstrukturierten Mikroelektrode mit einer Rate von 14,8 Spikes/s gemessen werden. Die größte gemessene Rate auf einer nanostrukturierten Elektrode wird ebenfalls mit dem Chip T600_1 mit 11,7 Spikes/s an Tag 20 detektiert. Einen klaren Trend, ob die Signalrate bei den nanostrukturierten Elektroden oder bei den unstrukturierten Elektroden größer ist, kann aus den bisherigen Daten allerdings nicht gewonnen werden.

Signalamplitude

Eine der wichtigsten Parameter für die Untersuchung zellbiologischer Proben ist die gemessene Signalamplitude. Werden die Signalamplituden der verschiedenen Tage untereinander verglichen, so fällt auf, dass die Größe der Signalamplituden doch zum Teil sehr stark schwankt. Tendenziell werden größere Amplituden erst ab Tag 18 gemessen, was mit der noch nicht vollständig dissoziierten Kultur erklärt werden kann. Ab Tag 18 ist zu erkennen, dass die nanostrukturierten Elektroden größere Signalamplituden aufweisen als die unstrukturierten Elektroden. Lediglich bei dem Chip P100_5 und T600_5 sind an Tag 11 die Amplituden der unstrukturierten Elektroden größer. Wird der Chip T600_1 betrachtet, so ist eine durchschnittliche Vergrößerung der Signalamplitude zwischen ca. 10 % an Tag 11 und 32 % an Tag 20 zu erkennen. Diese Erhöhung der Signalamplituden liegt im Bereich der Verbesserung, wie sie aufgrund der vergrößerten Oberfläche und der damit verbundenen reduzierten Impedanz zu erwarten ist. Da für den Chip P100_1 lediglich Signale auf nanostrukturierten Elektroden detektiert werden können, ist eine Aussage im Hinblick auf eine Verbesserung entsprechend nicht möglich. Allerdings liegen die Amplituden im Bereich der Amplituden von den MEA-Chips T600_1 und P100_5. Die größten Signalamplituden können bei den nanostrukturierten Mikroelektroden des Chips T600_5 an den Tagen 18 und 20 beobachtet werden. An Tag 18 beträgt diese bei der nanostrukturierten Elektrode $254,2 \pm 12,8 \mu\text{V}$ und bei der unstrukturierten Mikroelektrode $70,9 \pm 16,2 \mu\text{V}$. An Tag 20 können Signalamplituden von im Mittel $197,7 \pm 11,3$ respektive $63,7 \pm 14,4 \mu\text{V}$ detektiert werden. Dies entspricht einer mittleren Erhöhung um das 3,6- bzw. 3,1-fache. Da bei diesem MEA-Chip Elektroden mit einem Nanostrukturabstand von $5 \mu\text{m}$ implementiert sind und die effektive Erhöhung der Oberfläche in-

folge der Nanostrukturen lediglich zwischen 10 und 20 % liegt, muss der gemessenen Erhöhung der Signalamplitude eine andere Ursache zu Grunde liegen. Aus den Versuchen zur Impedanzbestimmung hinsichtlich der Zell-Elektroden-Kopplung ist bekannt, dass der Chip T600_5 sehr attraktiv für HEK 293-Zellen ist. Trotz der Tatsache, dass die Zell-Elektroden-Kopplung vom Zelltyp abhängig ist, ist die Möglichkeit einer aktiven Zell-Elektroden-Kopplung im vorliegenden Fall aber letztendlich der einzig plausible Grund für den immensen Anstieg der Signalamplitude im Vergleich zu den anderen MEAs. Dass die Ergebnisse der Impedanzversuche der HEK 293-Zellen nicht generell auf die SVZ-Zellen übertragbar sind, zeigt sich anhand des Chips P100_1. Auch hier ist eine gute Kopplung anhand der Impedanzen nachgewiesen worden. Allerdings zeigt der Chip keine Signalamplituden in einer ähnlichen Größenordnung wie der Chip T600_5. Dennoch ist naheliegend, dass zwischen den Elektroden des Chips T600_5 und den SVZ-Zellen eine verstärkte Kopplung von Zelle und Elektrode vorliegt, die im Vergleich zu den anderen Chips zu einer deutlichen Verbesserung der Signalamplitude führt. Um die Vermutung jedoch zu bestätigen und eine fundierte Aussage über Kopplungseffekte zu treffen, sind zukünftig weitere Messreihen erforderlich.

8.6 Möglichkeit der Wiederverwendung der hergestellten MEAs

Da die nanostrukturierten MEAs zur mehrmaligen Verwendung gedacht sind, stellt sich abschließend die Frage nach der Wiederverwendbarkeit. Diesbezüglich sind insbesondere zwei Faktoren zu nennen, die ein mehrmaliges Verwenden beeinflussen. Bei der Beschichtung der Elektroden mit einer haftvermittelnden Substanz sowie bei der Kultivierung können Rückstände auf den Elektroden zurückbleiben, die die nachfolgenden Messungen beeinflussen. Daher ist ein restloses Ablösen aller Rückstände von dem MEA durch die eingesetzte Reinigungsprozedur unabdingbar. Der zweite Aspekt, der in Betracht gezogen werden muss, ist die begrenzte Haltbarkeit der Isolationsschicht. Da die MEAs während der Versuchsreihen und während der Reinigung zum Teil aggressiven, flüssigen Medien ausgesetzt sind, ist eine Degradation des isolierenden Materials möglich. Diese findet zum größten Teil im Bereich der Elektrodenöffnung statt, da hier der Schichtstapel aus Siliziumdioxid und -nitrid offen liegt und somit gleichzeitig angegriffen werden kann. Inwiefern Rückstände vorhanden sind oder ein partieller Abbau der Isolationsschicht erfolgt ist, kann mit Hilfe der Impedanzanalyse bestimmt werden. **Abbildung 8.10 a** zeigt die Impedanzmessung am Beispiel des MEA-Chips T600_1. Nach der Reinigung des Chips (mittels ursprünglich verwendetem Reinigungsprotokoll) kann sowohl bei den nano- als auch bei den unstrukturierten Elektroden eine Erhöhung des Impedanzbetrags um im Mittel $176 \pm 110 \text{ k}\Omega$ festgestellt werden. Im Vergleich zu einem unbenutzten MEA führen Rückstände auf den Elektroden zu einer Erhöhung der Impedanz, da sich diese als zusätzlicher Widerstand zum Gesamtsystem addieren. Eine Erhöhung der Impedanz bedeutet bei sich anschließenden Messungen eine schlechtere Signalerfassung durch die Elektroden. Aufgrund dieser Messungen ist gefolgert worden, dass die Reinigung unzureichend gewesen ist. Deshalb ist die ursprüngliche Reinigungsprozedur, welche auf einer

zehnminütigen Reinigung im Ultraschallbad mit einer 2 % Hellmanex-Lösung basiert, durch eine neue Prozedur ersetzt worden, bei der der Chip mittels 1 % Tergazym-Lösung für die Dauer von 24 Stunden gereinigt wird. Dadurch erfolgt das vollständige Entfernen von Zellüberresten und der Adhäsionsschicht, was durch die Messung der ursprünglichen Impedanzwerte belegt wird. Die Messung der Impedanz wird nach jeder Reinigung durchgeführt, um auch Veränderungen hinsichtlich der Isolationsschicht zu detektieren. Im Fall einer Beschädigung bzw. Auflösung der Isolationsschicht erfolgt eine Reduzierung des Impedanzbetrags. Im vorliegenden Beispiel werden Impedanzen von durchschnittlich $26,4 \pm 8,8 \text{ k}\Omega$ detektiert. Der Abbau der Isolationsschicht führt zu einer Vergrößerung der Elektrodenfläche und führt dementsprechend in der Analyse der Impedanz zu einer Reduzierung. Defekte der Isolationsschicht können derweil auch mit dem Mikroskop beobachtet werden und äußern sich in einem kreisrunden Entfernen der Isolationsschicht um die Mikroelektrode herum (**Abbildung 8.10 b**).

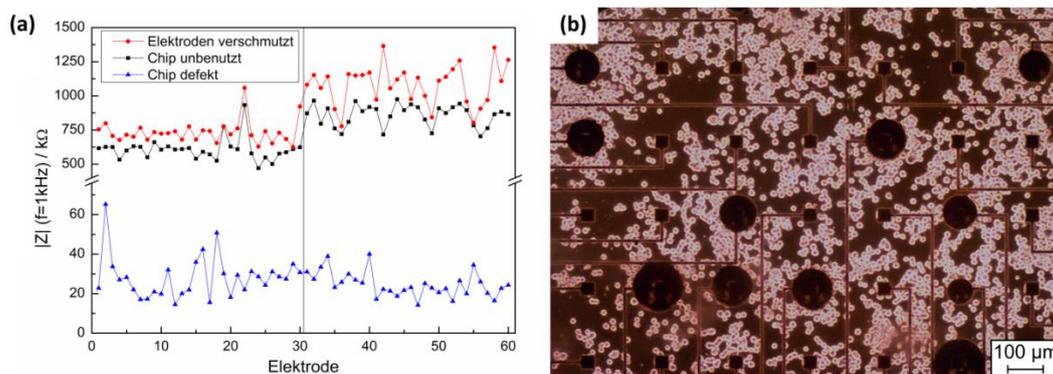


Abbildung 8.10: (a) Impedanzmessungen am Chip T500_1 zur Validierung einer möglichen Chipverschmutzung oder eines Chipdefekts aufgrund des Abbaus der Isolationsschicht. (b) Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die partielle Degradation der Isolationsschicht.

Die während dieser Arbeit untersuchten MEAs sind mehrfach gereinigt und wiederverwendet worden. Die Versuchsreihen konnten belegen, dass die MEAs für den mehrfachen Einsatz verschiedener Zellexperimente geeignet sind und über einen langen Zeitraum zu stabilen Ergebnissen führen. In Addition aller Versuchsreihen und Reinigungszyklen wurde jedes MEA für mindestens 120 Tage dem Medium ausgesetzt und hat mindestens zehn Reinigungszyklen durchlaufen, bevor ein Abbau der Isolationsschicht beobachtet werden konnte. Bei einem MEA löste sich während der Reinigungsphase der Chip von dem Trägersubstrat, sodass davon auszugehen ist, dass das Reinigungsmittel zunächst die PDMS-Schicht durchdrungen und dann den Underfill aufgelöst hat, wodurch keine ausreichende Haftung von Chip und Trägersubstrat mehr gegeben war. Auch ein temporärer Ausfall einzelner Elektroden während der Impedanzmessungen bzw. Aufnahmen der Aktionspotentiale ist festgestellt worden. Dabei lag die Ausbeute funktionierender Elektroden zwischen 26 und 30 auf sowohl nanostrukturierter als auch unstrukturierter Seite.

9 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Konzeption, Prozessentwicklung, Charakterisierung und verschiedene Aspekte der zellbiologischen Anwendung hinsichtlich der Bestimmung der Zell-Elektroden-Adhäsion sowie der Signableitung von individuell-designeten, 3D-nanostrukturierten Multielektrodenarrays (MEAs) präsentiert. Ausgehend von der These, dass neben der Reduzierung der Eingangsimpedanz des Chips insbesondere eine stabile und elektrisch isolierende Zell-Elektroden-Kopplung zu einer Verbesserung der Signalaufnahme führt, wurde eine Optimierung bestehender MEAs durch eine Modifikation der Elektrodenoberflächen mittels verschiedenen Nanostrukturen durchgeführt.

Die Besonderheit des vorgestellten Ansatzes liegt insbesondere im Layout des MEA-Chips, welches eine von durch den Herstellungsprozess oder den Versuchsaufbau verursachten Schwankungen losgelöste Bewertung hinsichtlich der Effizienz der eingesetzten Nanostrukturen ermöglichte. Das Layout der MEA-Chips wurde so ausgelegt, dass verschiedene Aspekte wie Art oder Anordnung der Nanostrukturen untersucht werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass die hergestellten MEA-Chips sowohl Elektroden mit als auch ohne Nanomodifikation implementiert hatten, wurde eine interne Kontrolle mit mehreren Vorteilen geschaffen: Durch den direkten Vergleich von nano- mit unstrukturierten Elektroden in ein und demselben Experiment war es möglich, den Effekt der Nanostrukturen direkt zu evaluieren, ohne eine separate Referenzmessung durchzuführen. Des Weiteren konnte der Einfluss von prozess- bzw. anlagenbedingten Fabrikationsvarianzen sowie von versuchsbedingten, biologischen Variationen wie zum Beispiel der Einfluss unterschiedlicher Zellkulturen, Kultur- oder Präparationsbedingungen ausgeschlossen werden. Zur kostengünstigen und reproduzierbaren Herstellung der Chips auf Wafer Ebene wurde ein neuartiger Prozess basierend auf der Nanoimprintlithographie (NIL), elektrochemischen Abscheidung und verschiedenen Techniken der Mikrostrukturierung entwickelt, dessen Teilprozesse im Verlauf der Arbeit hinsichtlich Homogenität und Reproduzierbarkeit bewertet und verbessert wurden. Eine wesentliche Herausforderung dabei war, die Nanoimprintlithographie in einen Standardprozess zu integrieren und eine gleichbleibende Prozessführung bei gleichzeitig hoher Qualität der hergestellten Chips zu gewährleisten.

Im Allgemeinen kann von einer homogenen und reproduzierbaren Herstellung nanostrukturierter MEA-Chips gesprochen werden. Dennoch muss der Herstellungsprozess aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Prozessschritten zur Realisierung der Mikro- und Nanostrukturen hierbei dezidiert betrachtet werden: Durch die Optimierung der Prozessschritte der Nanoimprintlithographie und Goldgalvanik konnten die Nanostrukturen auf Wafer Ebene mit einer sehr geringen Anzahl an für die Anwendung relevanten Defekten hergestellt werden. Die Maßhaltigkeit der Nanostrukturen auf lateraler Ebene wird dabei maßgeblich von dem reakti-

ven Ionenätzen (RIE) bestimmt, die zur Entfernung des *residual layers* eingesetzt wird. Wird die Höhe der Nanostrukturen betrachtet, so wird diese durch den Prozess der elektrochemischen Abscheidung beeinflusst. Dabei konnte eine direkte Abhängigkeit vom Strukturdurchmesser ermittelt werden, wobei anders als angenommen, die Abscheiderate der Nanostrukturen mit kleinem Durchmesser geringer ist als die von Strukturen mit großem Durchmesser. Durch die Variation der Zeit während der elektrochemischen Abscheidung kann die Höhe der Nanostrukturen angepasst bzw. können überwachsene Strukturen hergestellt werden. Sowohl die Homogenität der Strukturen auf einem Wafer als auch die Reproduzierbarkeit der Strukturen auf verschiedenen Wafern ist bei der Herstellung der Nanostrukturen gegeben. Bei dem Mikrostrukturierungsprozess ist die Strukturübertragung mittels Photolithographie sehr homogen. Insbesondere die nasschemischen Ätzverfahren beeinflussen allerdings die Maßhaltigkeit der Strukturen. Die Abscheidung des Isolatorstapels beeinflusst die Reproduzierbarkeit der MEA-Chips. Daher müssen beim Vergleich von Elektroden verschiedener Chips desselben Wafers als auch beim Vergleich von verschiedenen Chips unterschiedlicher Wafer zum einen immer die Homogenität der Strukturierungsmethode und zum anderen auch prozessbedingte Schwankungen in Betracht gezogen werden. Diese Tatsache erschwerte zwar einen direkten Vergleich der Chips untereinander, hatte aber keine Auswirkungen auf die weiteren Untersuchungen. Dennoch war die Idee wichtig, auf einem Chip sowohl nanostrukturierte als auch unstrukturierte Elektroden zu implementieren, da so diese prozess- und anlagenbedingte Einflüsse minimiert werden konnten.

Die Charakterisierung der Elektroden wurde mittels der Cyclovoltammetrie und der elektrochemischen Impedanzspektroskopie durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Ergebnisse von der Form, Größe und Anordnung der Nanostrukturierung. Die überwachsenen Röhrenstrukturen mit dem größten Durchmesser und dem geringsten Nanostrukturabstand generierten die besten Ergebnisse hinsichtlich der Erhöhung des Ladungstransfers (Erhöhung im Mittel von 7,37 auf 13,51 $\mu\text{C}/\text{mm}^2$) und der Verringerung der Impedanz (Verringerung im Mittel von 418 auf 210 k Ω). Durch einen Vergleich der Messwerte mit einer Modellrechnung, die die topographische Vergrößerung der Elektrodenoberfläche ermittelte, konnte die Verbesserung der elektrochemischen Parameter zweifelsfrei auf die effektive Vergrößerung der elektrochemisch aktiven Oberfläche zurückgeführt werden. Insbesondere die Verringerung der Impedanz führte dann zu einem Verringern des mittleren Rauschens (Verringerung im Mittel von 12,9 auf 7,7 μV). Damit konnte gezeigt werden, dass die Nanomodifikation zu einer Erniedrigung der Eingangsimpedanz führt, was der erste Aspekt hinsichtlich einer Verbesserung der Ableitung elektroaktiver Zellsignale ist.

Der zweite Aspekt zur Verbesserung der Signaldetektion liegt in einer verbesserten Zell-Elektroden-Kopplung begründet. Nachdem die Biokompatibilität der MEA-Chips als Grundlage für alle weitere Messungen überprüft und bestätigt worden ist, konnten ausgehend von REM-Untersuchungen zur Zelladhäsion erste Hinweise erhalten werden, dass die Zellen bestimmte Nanostrukturen als Ankerpunkte für ein adhärentes Wachstum ansehen. Aufgrund

des verwendeten Chiplayouts der halbseitig-nanostrukturierten Elektroden konnten diesbezügliche weitere Untersuchungen mit Hilfe von Impedanzmessungen an HEK-Zellen durchgeführt werden, um die Eigenschaften der Zell-Elektroden-Kopplung zu analysieren, zu quantifizieren sowie mit den anschließenden Messungen zur Ableitung von Zellsignalen zu korrelieren. Die Vermutung, dass die Adhäsion der Zelle an die Elektrode sehr stark von dem Layout der Nanostrukturierung abhängt, konnte bestätigt werden. Die besten Ergebnisse mit einer deutlichen Erhöhung der Adhäsion um 129 % konnten dabei überwachsene Röhrenstrukturen mit einem Durchmesser von 600 nm und einem Abstand von 5 μm erzielen. Um Zellsignale effektiv abzuleiten, wurde anschließend evaluiert, welche Beschichtung den geringsten Einfluss auf die Nanostrukturen hat, wobei die eingesetzte Beschichtung die Nanostrukturen nicht überdecken darf, da sonst ein Kopplungseffekt, wie er in den vorhergehenden Messungen zur Zell-Elektroden-Adhäsion gezeigt wurde, nicht stattfinden kann. Das Ergebnis der Messreihe war, dass eine Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL) den geringsten Einfluss auf die Impedanz der Chips hatte. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden vier MEA-Chips ausgewählt, die für Versuche zur Zellsignalableitung mit SVZ-Zellen eingesetzt wurden. Dabei konnte bei allen Chips eine generelle Verbesserung hinsichtlich der Signalamplitude und der Anzahl der Elektroden, die Signale detektieren, auf Seiten der nanostrukturierten Elektroden ermittelt werden. Insbesondere im Fall der 600 nm breiten, überwachsenen Röhrenstrukturen, die einen Abstand von 5 μm aufweisen, konnte die gemessene Signalamplitude an Tag 18 im Mittel von 70,9 auf 204,2 μV gesteigert werden. Diese im Vergleich zu den anderen Chips gemessene deutliche Maximierung konnte mit der verbesserten Kopplung zwischen Zelle und nanostrukturierter Elektrode erklärt werden und bestätigte die vorangegangenen Experimente bezüglich der Zell-Elektroden-Adhäsion.

Alles in allem konnte somit gezeigt werden, dass eine starke Adhäsion zwischen Zelle und Elektrode ausschlaggebend für eine Erhöhung der Signalamplitude ist – mehr noch als eine Reduzierung der Eingangsimpedanz des Chips. Weiterhin wurde bestätigt, dass zur Adhäsionsverbesserung derweil nicht beliebige Nanostrukturen verwendet werden können, da diese teilweise abstoßendes Verhalten auslösen, sodass eine gezielte Abstimmung der verwendeten Nanostrukturen auf den Zelltyp von Nöten ist. Die vorliegende Arbeit trägt somit zur Schaffung eines tiefergehenden Verständnisses hinsichtlich des Einflusses der Nanostrukturen bei der Zell-Elektroden-Kopplung und der Zellsignalableitung bei und kann mit den vorgestellten Methoden dabei helfen, die zukünftige Ableitung von Zellsignalen zu verbessern.

Trotz der erfolgreichen Durchführung bleibt in den verschiedenen Teildisziplinen ein hohes Maß an Optimierungsbedarf. Um nanostrukturierte Elektroden herzustellen, die neben einer Zell-Elektroden-Kopplung auch ein Penetrieren der Nanostruktur in die Zelle erlauben, muss die Höhe der Nanostruktur um mindestens das Doppelte gesteigert werden. Die Höhe der prozessierten Strukturen ist momentan jedoch an die Höhe der Strukturen des NIL-Stempels gebunden. Das Problem kann jedoch umgangen werden, wenn ein Zwei-Lagen-Resist bei der

NIL eingesetzt wird, wobei beispielsweise die obere Lage der NIL-Resist selbst und die untere Lage ein Lift-Off-Resist ist. So können die Nanostrukturen zunächst im NIL-Resist hergestellt und danach in den Lift-Off-Resist übertragen werden. Um die Resiststrukturen effizient zu füllen, müsste dann auch die sich anschließende elektrochemische Abscheidung optimiert werden, da sich die Aspektverhältnisse aufgrund der gesteigerten Strukturhöhe ebenfalls vergrößern, wodurch der Einfluss der Diffusion am Stofftransport zunimmt. Daher wird angenommen, dass vom bisher eingesetzten Gleichstromverfahren zum Pulsstromverfahren gewechselt werden muss, um eine gleichmäßige Abscheidung zu garantieren. Beim Pulsstromverfahren wird ein zeitlich veränderlicher Gleichstrom in Form von unipolaren oder bipolaren Rechteckpulsen eingesetzt. Durch eine Abfolge von Schichtaufbau und Relaxation wird die Schicht entsprechend periodisch aufgebaut, was insbesondere zu homogen aufgebauten Schichten in Strukturen mit hohem Aspektverhältnis führt^{204–207}. Durch den Einsatz höherer und im Durchmesser kleinerer Nanostrukturen kann dann auch eine Penetration der Nanostruktur in die Zelle angestrebt werden, welche zudem mittels Elektroporation unterstützt werden kann. Dabei wird der Elektrode ein kurzer Strom- oder Spannungspuls auferlegt, was zu einer temporären Weitung der Zellmembrankanäle führt und ein erleichtertes Eindringen der Nanostruktur in die Zelle ermöglicht²⁰⁸. Die Möglichkeit zur Applikation eines Spannungs- oder Strompulses setzt allerdings eine Konzentration des elektrischen Feldes in den Nanostrukturen voraus, sodass die Grundfläche der Elektrode zusätzlich isoliert und so der Herstellungsprozess entsprechend umgestellt werden muss.

Neben einer strukturellen Funktionalisierung durch die Nanostrukturen kann eine zusätzliche Biofunktionalisierung erfolgreich sein. Das Ziel der Funktionalisierung ist dabei die Schaffung von Bereichen auf dem Chip, die für die Zellen attraktiv (Elektroden) oder repulsiv (Isolation) sind^{209–214}. Denkbar ist beispielsweise die Biofunktionalisierung der Isolationsschicht durch das Aufbringen eines Agarosehydrogels über *micro contact printing*-Verfahren. Dies könnte zu einem verstärkten Wachstum der Zellen auf den Elektroden führen. Die Elektroden hingegen sollten nur strukturell funktionalisiert sein, da bestimmte Beschichtungen Biomoleküle blockieren, so den Ladungstransfer zwischen Zelle und Elektrode beeinträchtigen und letztendlich zu einer reduzierten Signalerfassung führen können.

Da in der Zwischenzeit neue Großgeräte angeschafft wurden, können zudem einzelne Teilprozesse optimiert werden: Eine fest installierte Anlage zur Goldgalvanik kann den bisherigen Becherglasaufbau ersetzen und aufgrund definiert einstellbarer Elektrolytumwälzung und Rotation des Wafers während der Abscheidung zu homogeneren Ergebnissen führen. Insbesondere die Abscheidung einer geschlossenen Isolationsschicht kann durch den Einsatz der *atomic layer deposition* optimiert werden, da ein atomarer Schichtaufbau zu hochkonformen und geschlossenen Oberflächen führt. Durch die Anschaffung neuer Precursor-Materialien könnte auch das Abscheiden alternativer Schichten wie Siliziumcarbid ermöglicht werden. Neben einem Wechsel des Isolatormaterials kann auch über einen Wechsel des Elektrodenmaterials nachgedacht werden. Im Vergleich zu anderen beispielsweise porösen Materialien oder

leitfähigen Polymeren ist die Impedanz von Gold relativ hoch. Durch ein Reduzieren der Eingangsimpedanz kann das Signal-Rausch-Verhältnis weiter verbessert werden.

Durch den Einsatz von im Substrat integrierten Schaltungen und einer transistorbasierten Technologie kann das Chiplayout in der Art verändert werden, dass beispielsweise die Zuleitungen direkt durch das Substrat verlaufen und nicht entlang der Oberfläche geführt werden müssen. Der dadurch freiwerdende Platz auf der Chipoberfläche kann für zusätzliche Elektroden genutzt werden, wodurch die Elektrodendichte auf der Oberfläche erhöht und somit die Ortsauflösung weiter gesteigert wird^{215–218}. Ebenso können mit dieser Technologie Filter, Wandler, Multiplexer und Verstärker als Bauteile direkt im Substrat integriert werden und müssen nicht aufwendig nachgeschaltet werden. Durch diese Signalkonditionierung auf dem Chip können parasitäre Kapazitäten weitestgehend vermieden und das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden, was die Signalqualität im Vergleich zu den jetzigen Elektroden ebenfalls erhöht^{219,220}.

Als weiterer Punkt der Optimierung wird die Charakterisierung der MEAs mittels Impedanzanalyse angesprochen. Der Nachteil der einfachen Impedanzanalyse ist, dass die Impedanz bei nur einer festgelegten Frequenz von 1 kHz charakterisiert wird. Beim Einsatz der Impedanzspektroskopie könnten verschiedene Effekte des hoch- und niederfrequenten Bereichs aufgedeckt werden, die zu einer möglichen Beeinträchtigung des MEAs führen und mittels der einfachen Impedanzanalyse nicht erfasst werden können. Zu diesem Zweck muss jedoch ein Multiplexer angeschafft werden, der die Impedanzspektroskopie bei allen Elektroden gleichzeitig durchführt. Dies ist mit dem zurzeit betriebenen Setup nicht möglich, da nur eine Elektrode nach der anderen angesteuert werden kann. Der zeitliche Versatz der Messungen würde allerdings zu Ungenauigkeiten in der Analyse und inkorrekten Schlussfolgerungen führen.

Auch im Zuge der anwendungsorientierten Experimente offenbarte sich die Notwendigkeit zukünftiger Optimierung. So bestand nicht die Möglichkeit, während eines Ableitungsexperiments eine zusätzliche Substanz in das Reservoir des MEAs mit einer Pipette zu applizieren, ohne dabei ein Ablösen der Zelle von der Elektrode zu verhindern und somit das Signal zu unterbinden. Aus diesem Grund sollten die Chips für zukünftige Anwendungen mit integrierten mikrofluidischen Kanälen und Perfusionssystemen konzipiert werden, die eine zielgenaue Applikation einer Substanz ermöglichen, ohne dabei Turbulenzen zu verursachen, die die Zellaktivität beeinträchtigen. Auch die Tatsache, dass der MEA-Chip zur Signalmessung aus dem Inkubator genommen werden muss, beeinträchtigt die Messung, da sowohl die Bewegung als auch die Temperaturveränderungen und das Fehlen einer stabilen CO₂-Atmosphäre zu Schwankungen im pH-Wert führen und die Zellen einem unnötigen Stress aussetzen. Zuletzt ist die Optimierung der Reinigungsprozedur oder alternativ der Aufbau- und Verbindungstechnik empfehlenswert, um ein Ablösen der Chips vom Trägersubstrat zu verhindern. Dabei muss sichergestellt werden, dass keine allzu aggressiven Medien und eine resistenterere Verklebung und Isolation verwendet werden.

Die Weiterentwicklung und Optimierung der hier vorgestellten Messsysteme und deren Einsatz in der Zellbiologie sowie die Verifikation der vorgestellten Experimente, insbesondere hinsichtlich der Zell-Elektroden-Kopplung und der Ableitung der Zellpotentiale, sind dann wesentliche Ziele des Nachfolgeprojekts.

Anhang

A SOP 3D-nanostrukturierter MEAs

Schritt	Prozess	Anlage	Material/ Parameter
Beschichtung			
1	Metallabscheidung Titan & Gold	Aufdampfanlage	Ti: 20 nm; Au: 200 nm; 5 Å/s; P: 51 %
Reinigung			
2	Reinigung Carosche Säure	Reinigungsbank	H ₂ SO ₄ : 95 %; H ₂ O ₂ : 5 % T= 120 °C; t= 10 min
3	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
4	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
Nanoimprintlithographie			
5	Prebake	Hotplate Lanz	T= 200 °C; t= 2 min
6	Spin-On	Spincoater Lanz	Resist: mR-I 8030R v= 1100 U/min; ramp: 6 s; t= 30 s
7	Softbake	Hotplate BLE	T= 100 °C; t= 1 min
8	Schichtdickenkontrolle	FTP	-
9	NIL	NIL-Maschine	T _{max} = 180 °C; p _{max} = 25 bar; t(@T _{max} ,p _{max})= 900 s; T _{demold} = 90 °C
10	Entfernung <i>residual layer</i>	RIE	O ₂ : 30 sccm; P= 100 W; p= 1,33 Pa; t= 120 s
11	Schichtdickenkontrolle	FTP	-
12	Strukturkontrolle	Mikroskop	-

Elektrochemische Abscheidung

13	Abscheidung von Gold	Goldgalvanik	J= 0,4 A/dm ²
14	Resist strippen	Megaschallbecken	Aceton; 2-Propanol P: 40 %; t= 10 min (jeweils)
15	Strukturkontrolle	Mikroskop, AFM	-

Reinigung

16	Reinigung Carosche Säure	Reinigungsbank	H ₂ SO ₄ : 95 %; H ₂ O ₂ : 5 % T= 120 °C; t= 10 min
17	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
18	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
19	Plasmareinigung/ - aktivierung	Plasmaofen	O ₂ ; P= 350 W; t= 5 min

Photolithographie

20	Prebake	Hotplate Lanz	T= 200 °C; t= 2 min
21	Spin-On	Spincoater BLE	Haftvermittler: AR 300-80 v= 3000 U/min; ramp: 6 s; t= 60 s
22	Softbake	Hotplate Lanz	T= 185 °C; t= 2 min
23	Spin-On	Spincoater BLE	Resist: AR-P5910 (100:40) v= 2000 U/min; ramp: 6 s; t= 60 s
24	Softbake	Hotplate BLE	T= 90 °C; t= 2 min
25	Schichtdickenkontrolle	FTP	-
26	Belichten	Mask-Aligner	Chrommaske #1; hard contact; P= 6 mW/cm ² ; t= 8 s
27	Entwickeln	Entwicklerbank	AR 300-26; t= 50 s
28	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
29	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
30	Hardbake	Hotplate BLE	T= 110 °C; t= 2 min

31	Strukturkontrolle	Mikroskop	-
----	-------------------	-----------	---

Metallätzen

32	Goldätzen	Ätzbank	I ₂ :KI:DI-Wasser (1:4:20); t= 30 s
33	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
34	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
35	Titanätzen	HF-Ätzbank	5 % HF; 35 s
36	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
37	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
38	Resist strippen	Megaschallbecken	Aceton; 2-Propanol P: 40 %; t= 10 min (jeweils)
39	Strukturkontrolle	Mikroskop	-

Reinigung

40	Reinigung Carosche Säure	Reinigungsbank	H ₂ SO ₄ : 95 %; H ₂ O ₂ : 5 % T= 120 °C; t= 10 min
41	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
42	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
43	Plasmareinigung/- aktivierung	Plasmaofen	O ₂ ; P= 350 W; t= 5 min

Abscheidung Isolation

44	Abscheidung ONONO	PECVD-Anlage	SiO₂ : HF: 20 W; p= 1000 mTorr; SiH ₄ : 20sccm; N ₂ O: 20sccm; N ₂ : 800sccm; 3min/ 5min (180nm/ 250nm) Si₃N₄ : HF:43W (20s); LF:43W (6s); p=650mTorr; SiH ₄ : 20sccm; NH ₃ : 20sccm; N ₂ : 800sccm; t= 15min (170nm)
----	-------------------	--------------	--

45	Schichtdickenkontrolle	FTP	
----	------------------------	-----	--

Reinigung

46	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
47	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min

Photolithographie

48	Prebake	Hotplate Lanz	T= 200 °C; t= 2 min
49	Spin-On	Spincoater BLE	Haftvermittler: AR 300-80; v= 3000 U/min; ramp: 6 s; t= 60 s
50	Softbake	Hotplate Lanz	T= 185 °C; t= 2 min
51	Spin-On	Spincoater BLE	Resist: AR-P5910 (100:40) v= 2000 U/min; ramp: 6 s; t= 60 s
52	Softbake	Hotplate BLE	T= 90 °C; t= 2 min
53	Schichtdickenkontrolle	FTP	-
54	Belichten	Mask-Aligner	Chrommaske #2; hard contact; P= 6 mW/cm ² ; t= 8 s
55	Entwickeln	Entwicklerbank	AR 300-26; t= 50 s
56	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
57	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
58	Hardbake	Hotplate BLE	T= 110 °C; t= 2 min
59	Strukturkontrolle	Mikroskop	-

Kontaktlochätzen

60	Plasmareinigung	PlasmaStripper	O ₂ ; P= 150 W; t= 18s
61	Trockenätzen	RIE	CF ₄ : 25 sccm, O ₂ : 3,1s ccm; p= 1,33 Pa, P= 100 W, t= 12 min
62	Nasschemisches Ätzen	HF-Ätzbank	5 % HF; 60 s

63	Spülen	Quick Dump Rinser	DI-Wasser; t= 6 min
64	Trocknen	Spin Rinser Dryer	N ₂ ; t= 4 min
65	Resist strippen	Megaschallbecken	Aceton; 2-Propanol P: 40 %; t= 10 min (jeweils)
66	Plasmareinigung	PlasmaStripper	O ₂ ; P= 150 W; t= 18 s
67	Strukturkontrolle	Mikroskop, Dektak	-

Chipvereinzlung

68	Spin-On Schutzlack	Spincoater BLE	Resist: AR-P5910 (100:40) v= 2000 U/min; ramp: 6 s; t= 60 s
69	Softbake	Hotplate BLE	T= 90 °C; t= 2 min
70	Vereinzeln	Wafersäge	v= 5 mm/s
71	Resist strippen	Megaschallbecken	Aceton; 2-Propanol P: 40 %; t= 10 min (jeweils)

Die-Bonding

72	PCB-Kontaktierung	Pick-and-Place	Silberleitlack, Rakel/Schablone
73	Ausheizen	Trockenschrank	T= 120 °C; t= 60 min
74	Kontakte isolieren	-	Underfill
75	Ausheizen	Trockenschrank	T= 120 °C; t= 60 min
76	Glasringe montieren	-	PDMS
77	Ausheizen	Trockenschrank	T= 120°C; t= 60 min
78	Zwischenraum auffüllen	-	PDMS
79	Ausheizen	Trockenschrank	T= 120 °C; t= 60 min

B Simulation zur Bestimmung elektrochemischer Systemparameter

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie ermöglicht neben einer Aussage über die Impedanz und das Elektrodenverhalten zu treffen, mit Hilfe des elektrochemischen Ersatzschaltbilds auch eine Aussage über die Doppelschichtkapazität und andere Systemparameter zu tätigen. Die Modellierung einer MEA-Elektrode mit Hilfe eines Ersatzschaltbilds ist im Allgemeinen schwieriger als die Modellierung einer Makroelektrode, da ebenso parasitäre Bauelemente aufgrund von Kopplungseffekten oder fehlerbehafteter Elemente des MEA-Chips hinzugefügt werden müssen. Zu letzteren können Zuleitungswiderstände oder Kapazitäten aufgrund der Isolationsschicht gezählt werden (**Abbildung B.1**).

Der Widerstand einer Mikroelektrode R_e des MEAs kann mittels:

$$R_e = \rho \frac{d_e}{A_e} \quad (\text{B.1})$$

zu $6,42 \text{ n}\Omega$ berechnet werden. Dabei ist ρ der spezifische Widerstand von Gold mit $2,2 \cdot 10^{-8} \Omega \cdot \text{m}$, d_e die Dicke der Elektrode mit 200 nm und A_e die Fläche der Elektrode mit $707 \mu\text{m}^2$ in die Berechnungen eingeflossen. Der Zuleitungswiderstand ergibt sich aus:

$$R_{\text{Zuleitung}} = \rho \frac{l_{\text{Zuleitung}}}{A_{\text{Zuleitung}}} \quad (\text{B.2})$$

zu einem Wert von $28,3 \Omega$, wobei $l_{\text{Zuleitung}}$ die Länge der Zuleitung mit etwa 5 mm und $A_{\text{Zuleitung}}$ die Querschnittsfläche mit $4 \mu\text{m}^2$ angegeben werden kann.

Die Kapazität des Isolatormaterials C_{Isolator} berechnet sich als Serienschaltung der Einzelkapazitäten:

$$\frac{1}{C_{\text{Isolator}}} = \sum_i \frac{1}{C_i} \quad (\text{B.3})$$

und

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A_{\text{Isolator}}}{d_{\text{Isolator}}} \quad (\text{B.4})$$

wobei ϵ_0 die absolute Permittivität ($\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), ϵ_r die relative Permittivität, A_{Isolator} die Fläche des Isolators und d_{Isolator} die Dicke der jeweiligem Isolationsschicht ist. Die

relative Permittivität des PECVD-Siliziumdioxids liegt bei etwa 3,9 und die des PECVD-Siliziumnitrids bei etwa 7,2. Die Fläche des Isolatormaterials entspricht der Fläche über einer Zuleitung und ergibt sich zu etwa 0,1 mm². Als Schichtdicken werden die Sollwerte aus Kapitel 6.3.2 herangezogen. Mit diesen Berechnungen ergibt eine Kapazität von 1,1 pF.

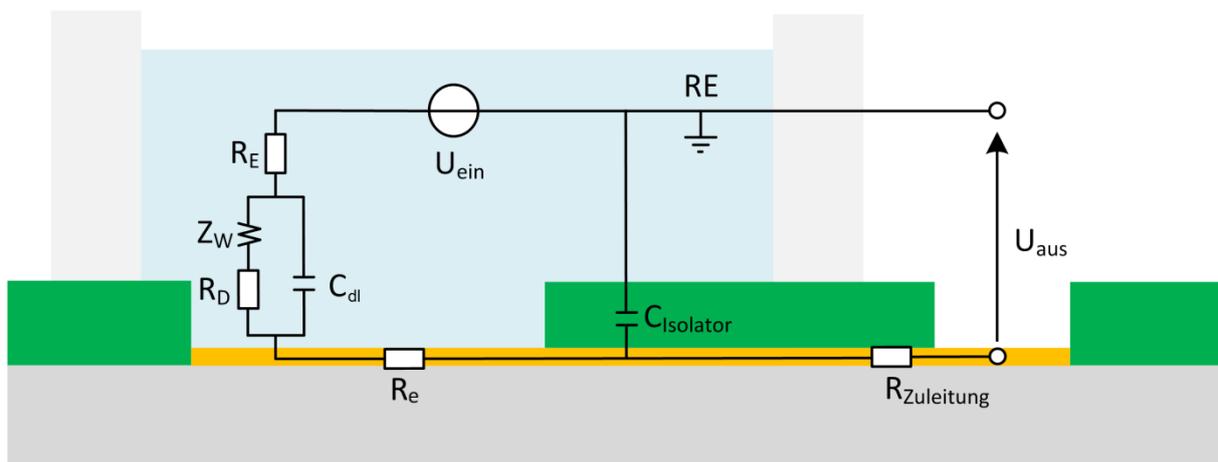


Abbildung B.1: Elektrisches Ersatzschaltbild einer MEA-Elektrode unter Messbedingungen (adaptiert von Buitenweg et al¹⁰³).

C Modell zur Berechnung der topographischen Oberflächenvergrößerung

Im Folgenden wird ein Modell zur theoretischen Bestimmung der Vergrößerung der Oberflächentopographie durch ein Abschätzen der Geometrie der Nanostrukturen vorgestellt. In einem ersten Teil wird dabei die Oberflächenvergrößerung durch überwachsene Säulenstrukturen, in einem zweiten Teil die Oberflächenvergrößerung durch überwachsene Röhrenstrukturen behandelt.

Da die überwachsenen Säulenstrukturen an Pilze erinnern, werden die Strukturen zunächst in Stile und Köpfe gegliedert (**Abbildung C.1 a**). Die Oberfläche des Stils kann demnach sehr einfach als Säule beschrieben werden, welche aufgrund des NIL-Prozesses für alle Strukturdurchmesser eine konstante Höhe von h_{Stil} von 150 nm aufweist und der Dicke des NIL-Resists entspricht. Die Oberfläche des Stils $A_{\text{Stil(P)}}$ ergibt sich somit zu:

$$A_{\text{Stil(P)}} = 2\pi r_{\text{Stil}} h_{\text{Stil}} \quad (\text{C.1})$$

wobei r_{Stil} der Durchmesser des Stils ist. Um den Kopf der Struktur zu bestimmen, werden folgende Annahmen vorangestellt: Der Kopf entspricht einer Hälfte eines Rotationsellipsoids mit einer kreisförmigen Grundfläche. Mit Hilfe von Abbildung 6.24 c wird zudem angenommen, dass das Verhältnis von vertikaler zu lateraler Abscheidung in etwa einem Verhältnis von 3:2 entspricht. Je nach Durchmesser des Pilzes und Gesamthöhe der Nanostruktur kann nun zwischen drei Formen der Pilzkopfstruktur unterschieden werden: Ist der Radius a des Ellipsoids gleich seiner Höhe c , so ist der Ellipsoid kugelförmig. Für den Fall, dass $a < c$ ist, so ist der Ellipsoid gestreckt. Für $a > c$ ist der Ellipsoid hingegen gestaucht:

$$A_{\text{Kopf(P)},a=c} = 2\pi ac + \pi a^2 \quad (\text{C.2a})$$

$$A_{\text{Kopf(P)},a < c} = \pi a \left(a + \frac{c^2}{\sqrt{c^2 - a^2}} \arcsin \left(\frac{\sqrt{c^2 - a^2}}{c} \right) \right) + \pi a^2 \quad (\text{C.2b})$$

$$A_{\text{Kopf(P)},a > c} = \pi a \left(a + \frac{c^2}{\sqrt{a^2 - c^2}} \operatorname{arcsinh} \left(\frac{\sqrt{a^2 - c^2}}{c} \right) \right) + \pi a^2 \quad (\text{C.2c})$$

Die Gesamtfläche, welche somit durch eine überwachsene Säulenstruktur hinzugewonnen wird, berechnet sich demnach zu:

$$A_{\text{ges}}(P) = A_{\text{Stil}}(P) + A_{\text{Kopf}}(P) - 2\pi r_{\text{Stil}}^2 \quad (\text{C.3})$$

Um die gesamte Oberflächenvergrößerung zu berechnen, muss $A_{\text{ges}}(P)$ mit der Gesamtanzahl an Nanostrukturen multipliziert werden. Für Nanostrukturabstände von $1 \mu\text{m}$ sei zudem angemerkt, dass der Radius des Ellipsoiden kleiner als 500 nm sein muss, da sonst die einzelnen Nanostrukturen zusammenwachsen und letztendlich nur einer raue Oberfläche, aber keine nanostrukturierte Oberfläche generiert wird.

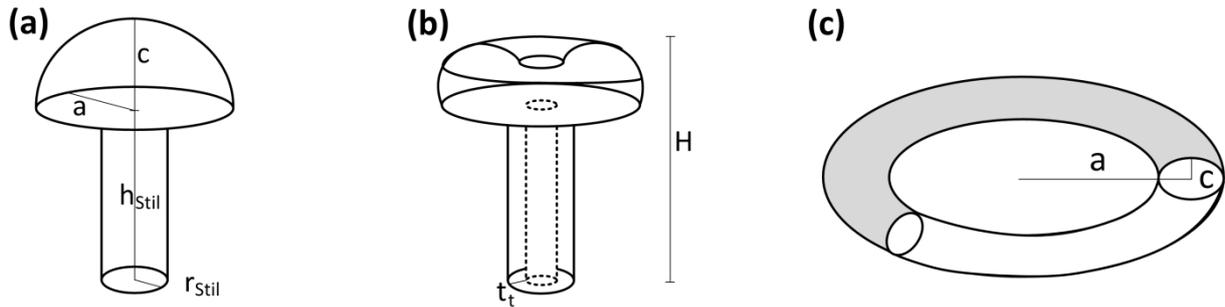


Abbildung C.1: Parameterdarstellung zur Berechnung einer (a) überwachsenen Säulenstruktur, (b) überwachsenen Röhrenstruktur und eines (c) Torus.

Zur Berechnung der Oberflächenvergrößerung der überwachsenen Röhrenstrukturen wird aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auch diese in Stil und Kopf unterteilt (**Abbildung C.1 b**). Die Oberfläche des Stils wird in diesem Fall durch eine Röhre mit einer konstanten Wandstärke t_t von 50 nm , einer konstanten Stilhöhe h_{Stil} von 150 nm und dem entsprechenden Radius r_{Stil} der Nanostruktur beschrieben:

$$A_{\text{Stil}}(T) = 2\pi h_{\text{Stil}}(2r_{\text{Stil}} - t_t) \quad (\text{C.4})$$

Auch im Fall der Röhrenstrukturen wird die Höhe h_{Stil} und die Wandstärke t_t von dem Resist bzw. dem Master während der NIL vorgegeben.

Der Kopf der Struktur wird als eine Hälfte eines elliptisch geformten Torus betrachtet (**Abbildung C.1 c**), wobei erneut eine Abscheiderate von 3:2 von vertikaler zu lateraler Richtung angenommen wird. Im Fall des betrachteten Torus muss ebenfalls zwischen drei Szenarien unterschieden werden: Abhängig vom Radius des Stils r_{Stil} und der Gesamthöhe H der Struktur, ergibt sich eine kritische Höhe H_{krit} , bei der der Torus zusammenwächst. Für den Fall $H < H_{\text{krit}}$ und $H = H_{\text{krit}}$ kann der Kopf folgendermaßen berechnet werden:

$$A_{\text{Kopf}}(T), H < H_{\text{krit}} = 2\pi u \left(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2} \right) + \pi \left[\left(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2} + a \right)^2 - \left(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2} - a \right)^2 \right] \quad (\text{C.5a})$$

$$A_{\text{Kopf(T),H=H}_{\text{krit}}} = 2 \pi u \left(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2} \right) + \pi a^2 \quad (\text{C.5b})$$

wobei a der Radius der Ellipse, c die Ellipsenhöhe und u der Umfang der Ellipse ist und nach der Methode von Ramanujan approximiert werden kann:

$$u \approx \pi \left((a + c) + \frac{3(a - c)^2}{10(a + c) + \sqrt{a^2 + 14ac + c^2}} \right) \quad (\text{C.6})$$

Für den Fall $H > H_{\text{krit}}$, also für den Fall des Zusammenwachsens des Torus, wird zum Berechnen der Oberfläche der Kopfstruktur der elliptisch geformte Torus bis zur Schnittfläche betrachtet, mit der Annahme, dass das Verhältnis von Umfang und Fläche konstant ist, für den Fall, dass auch Radius und Höhe gleich sind. Somit ist also auch das Verhältnis von Umfang zu Fläche eines Ellipsensegmentes konstant und es gilt:

$$A_{\text{Kopf(T),H>H}_{\text{krit}}} = 2 \pi \left(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2} \right) \frac{u(S - \pi a c)}{\pi a c} + \pi a^2 \quad (\text{C.7})$$

wobei S die Fläche eines Segments der Ellipse ist und sich berechnet zu:

$$S = ac \left[\arccos \left(1 - \frac{r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2}}{a} \right) - \left(1 - \frac{r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2}}{a} \right) \sqrt{\frac{2r_{\text{Stil}} - t_t}{a} - \frac{(r_{\text{Stil}} - \frac{t_t}{2})^2}{a^2}} \right] \quad (\text{C.8})$$

Die Gesamtoberfläche, welche somit durch eine überwachsene Röhrenstruktur gewonnen wird, ergibt sich demnach zu:

$$A_{\text{ges(T),H<H}_{\text{krit}}} = A_{\text{Stil (T)}} + A_{\text{Kopf (T),H<H}_{\text{krit}}} - 2\pi(r_{\text{Stil}}^2 - (r_{\text{Stil}} - t_t)^2) \quad (\text{C.9a})$$

$$A_{\text{ges (T),H=H}_{\text{krit}}} = A_{\text{Stil (T)}} + A_{\text{Kopf (T),H=H}_{\text{krit}}} - 2\pi r_{\text{Stil}}^2 \quad (\text{C.9b})$$

$$A_{\text{ges(t),H>H}_{\text{krit}}} = A_{\text{Stil (T)}} + A_{\text{Kopf (T),H>H}_{\text{krit}}} - 2\pi r_{\text{Stil}}^2 \quad (\text{C.9c})$$

Erneut muss dieser Wert mit der Gesamtanzahl an Nanostrukturen multipliziert werden und ins Verhältnis zu den unstrukturierten Mikroelektroden gesetzt werden. Zudem sollte auch ein Zusammenwachsen der Röhrenstrukturen vermieden werden, welches ab einem Torusradius von 500 nm passiert.

D Geräteliste

Geräteart	Hersteller	Typbezeichnung
Aufdampfanlage	Balzers	BAK500
Hotplate	BLE (Süss)	Delta 30 T2
Hotplate	Lanz	HP 150
Impedanzmessgerät	Multi Channel Systems	MEA-IT60
Konduktometer	WTW	Cond 3110
Kontaktwinkelmessgerät	dataphysics	OCA 15
Mask-Aligner	Süss	MA/BA 6
MEA-Verstärker	Multi Channel Systems	MEA 1060-Inv
Megaschallbecken	Ultrasonic Weber	STE28/1-BNC UMS
Mikroskop	Olympus	SZH10
NIL-Maschine	Obducat	Eitre 6
Oberflächenprofilometer	Bruker	Dektak 3XT
PECVD-Anlage	Oxford	Plasmalab System 133
pH-Meter	WTW	pH 3110
Pick-and-Place-Maschine	Tresky	T3002-M
Plasmastripper	Technics Plasma	300-E
Potentiostat	Biologic	SP200
Quick Dump Rinser	arias	PLM 333-1
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss	Supra 40 gemini
Rasterkraftmikroskop	Bruker	Dimension 3100
RIE-Anlage	Sentech	SI 591 M
Schichtdickenmessgerät (FTP)	Filmetrics	F20e-UV
Spincoater	BLE (Süss)	Delta 30 T2
Spincoater	Lanz	EBS 10
Spin Rinser Dryer	Semitool	PSC 102
Trockenschrank	Memmert	UM 400
Wafersäge	Disco	DAD-2H/6T

E Chemikalien- und Materialienliste

Chemikalie/Material	Bezeichnung/CAS	Hersteller
2-Propanol	67-63-0	Carl Roth
Aceton	67-64-1	Carl Roth
AFM-Spitzen	AC160TS	Asylum Research
Ammoniak	7664-41-7	Linde
Ammoniumhydroxid	1336-21-6	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfid-Monohydrat	7783-11-1	Honeywell
Di-Kaliumhydrogenphosphat	7758-11-4	AppliChem
Di-Natriumhydrogenphosphat	7558-79-4	AppliChem
Distickstoffmonoxid	10024-97-2	Linde
DMSO	67-68-5	AppliChem
ECM-Gel	EHS-Matrix	Sigma Aldrich
Entwickler	AR 300-26	All Resist
Flusssäure	7664-39-3	Technic
Fötales Rinderserum	Sera Plus	PAN Biotech
Gegenelektrode	M241 Pt	Radiometer analytical
Gelatine	9000-70-8	Sigma Aldrich
Glanzzusatz	Glanzzusatz Goldbad SF	Metakem
Goldelektrolyt	Goldbad SF	Metakem
Haftvermittler	AR 300-80	All Resist
Haftvermittler	OrmoPrime®	micro resist technology
Iod	7553-56-2	Carl Roth
Kaliumchlorid	7447-40-7	Chemsolute
Kaliumhexacyanoferrat	13746-66-2	Riedel-de Haen
Kaliumiodid	7681-11-0	Carl Roth
Kohlenstoffdioxid	124-38-9	Linde
L-Glutamin	565-85-9	PAN Biotech
Monosilan	7803-62-5	Linde
Natriumchlorid	7647-14-5	Chemsolute
Natriumsulfat	7757-82-6	Riedel-de Haen

NIL-Resist	mR-I 8020 R	micro resist technology
NIL-Resist	OrmoStamp®	micro resist technology
PDL	27964-99-4	Sigma Aldrich
PDMS	Sylgard 187	Dow Corning
Penicillin/Streptomycin	3810-74-0	PAN Biotech
Polymerfolie	IPS	Obducat
Positivresist	AR-P 5910	All Resist
Referenzelektrode	DJ Ag/AgCl ref. electrode	Metrohm
Reinigungslösung	Tergazym	Alconox
Reinigungslösung	Hellmanex III	Hellma Analytics
Resistverdünner	AR 300-12	All Resist
Sauerstoff	7782-44-7	Linde
Schwefelsäure	7664-93-9	AppliChem
Silan	FOTCS	Sigma Aldrich
Silan	4-Aminothiophenol	Sigma Aldrich
Silberleitlack	H20E-PFC 1OZ	Epoxy Technology
Stickstoff N ₂	7727-37-9	Linde
Tetrafluormethan	75-73-0	Linde
Trypsin-EDTA	9002-07-7	PAN Biotech
Underfill	EPO-TEK 377	Epoxy Technology
Wasserstoffperoxid	7722-84-1	Chemsolute
Zellkulturmedium	DMEM	Gibco
Zellkulturmedium	Alpha-MEM	Biochrom GmbH

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich im Verlauf meiner Promotion unterstützt haben und dazu beigetragen haben, sodass ich diese zu einem erfolgreichen Abschluss führen konnte.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hempelmann bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat, eine kooperative Promotion in Zusammenarbeit seines Lehrstuhls durchzuführen. In gleicher Weise gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Monika Saumer, die mir dieses sehr interessante Thema angeboten und die fachliche Betreuung an der Hochschule Kaiserslautern übernommen hat. Ich bedanke mich für die fachlichen Diskussionen sowie für die Möglichkeit, an Konferenzen und Workshops teilzunehmen. Ich bedanke mich bei der *Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation* für die finanzielle Unterstützung im Projekt. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Seidel, der die Zweitbegutachtung meiner Arbeit übernommen hat sowie bei Herrn Prof. Dr. Dirk Bähre, der die Aufgabe des wissenschaftlichen Begleiters wahrgenommen hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Karl-Herbert Schäfer, Prof. Dr. Holger Rabe, Prof. Dr. Sven Ingebrandt, Dr. Herbert Freimuth sowie Dr. Manuela Gries, die mich insbesondere in technologischen, biologischen und messtechnischen Fragestellungen unterstützt und wertvolle Anregungen gegeben haben.

Des Weiteren gilt mein Dank Detlev Cassel für das Bedampfen etlicher Wafer sowie für die Hilfestellung bei sämtlichen Fragestellungen hinsichtlich der Prozesse und Technologien im Reinraum. Danke an Rainer Lilischkis für die Durchführung sämtlicher REM-Aufnahmen. Bei Petra Böswald und Heike Müller möchte ich mich insbesondere für die zahlreichen Analysen des Goldelektrolyten bedanken. Den Werkstätten für Feinwerkmechanik und Elektrotechnik gilt mein besonderer Dank für die Anfertigung diverser Probenhalter und Messapparaturen. Ich bedanke mich bei Monika Martin und Christa Isaacs für die Präparation der zellbiologischen Proben. Bedanken möchte ich mich bei den Bachelor-Studenten Melissa Pirrung und Benjamin Obermeyer sowie bei meinem ehemaligen HiWi Sebastian Fahlbusch für die Bearbeitung verschiedener Aufgaben im Bereich der Zellkultur respektive elektrochemischer Abscheidung. Ein besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. Anette Britz, Walid Munnief, Martin Theis, Michael Göddel, Bharat Nowduri sowie dem gesamten Arbeitskreis IMST für die fachlichen Diskussionen und gegenseitige Unterstützung.

Für die sprachliche Korrektur meiner Arbeit danke ich Tina Jene ganz ausdrücklich.

Der letzte und zugleich größte Dank richtet sich an meine Familie und Freunde. Danke, dass ihr mich während meiner Promotion stets begleitet, motiviert und unterstützt habt.

Vorträge und Posterbeiträge

- Development of 3D nanostructured electrodes for biosensing applications; Konferenz ICAM3D, Loughborough University, England (03./04.06.2015)
- Processing and characterization of 3D nanostructured electrodes for biosensing applications; Meeting Point Functional Layers, Hasselt University, Belgien (07.-11.09.2015)
- Fabrication of 3D nanostructured multielectrode arrays by using thermal nanoimprint lithography to improve cell coupling for low signaling neurons; 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Tübingen (28.06.-01.07.2016)
- Wafer-scale fabrication of 3D nanostructured multielectrode arrays to improve cell recording for low signaling neurons; Meeting Point Functional Layers (10.05.2017)
- Impedance of 3D nanostructured MEAs: Influence of Coating and Cell Cultivation; 11th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Tübingen (04.-06.07.2018)
- Combining nanoimprint lithography, electroplating and microstructuring techniques to fabricate 3D nanostructured multielectrode arrays for biological applications; 7. GMM Workshop Mikro-Nano-Integration, Dortmund (22.-23.10.2018)

Tagungsbeiträge und Veröffentlichungen

- Decker D, Ingebrandt S, Rabe H, Schäfer K-H, Saumer M (2016). Fabrication of 3D Nanostructured Multielectrode Arrays by Using Thermal Nanoimprint Lithography to Improve Cell Coupling for Low Signaling Neurons. *Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2016 | 10th International Meeting on Substrate-Integrated Electrode Arrays*. doi: 10.3389/conf.fnins.2016.93.00039
- Decker D, Pirrung M, Gries M, Ingebrandt S, Schäfer K, Saumer M, Rabe H (2018). Impedance of 3D Nanostructured MEAs: Influence of Coating and Cell Cultivation. *Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018 | 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays*. doi: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00094
- Decker D, Ingebrandt S, Rabe H, Schäfer K-H, Saumer M (2018). Combining nanoimprint lithography, electroplating and microstructuring techniques to fabricate 3D nanostructured multielectrode arrays for biological applications. *GMM-Fachbericht 92: Mikro-Nano-Integration, 22. – 23.10.2018 in Dortmund*. ISBN 978-3-8007-4789-4
- Decker D, Hempelmann R, Natter H, Pirrung M, Rabe H, Schäfer K-H, Saumer M (2019). 3D Nanostructured Multielectrode Arrays: Fabrication, Electrochemical Characterization and Evaluation of Cell–Electrode Adhesion; *Adv. Mater. Technol.* 4, 1800436 (1-10), 2019. <https://doi.org/10.1002/admt.201800436>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung (a) des Funktionsprinzips und (b) einer beispielhaften Prozessführung bei der T-NIL (adaptiert von micro resist technology ¹⁰).....	6
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung (a) des Funktionsprinzips und (b) einer beispielhaften Prozessführung bei der UV-NIL (adaptiert von micro resist technology ¹⁶).....	7
Abbildung 2.3: Einfluss von unebenen Substraten beim Einsatz (a) harter und (b) weicher Stempelmaterien.	9
Abbildung 2.4: Mögliche Defekte, die während des Imprints und bei der Entformung auftreten können (adaptiert von Schiff ³²).	10
Abbildung 2.5: Veränderung des Schubmoduls in Abhängigkeit von der Temperatur am Beispiel von PMMA mit einer Glasübergangstemperatur von 100 °C und verschiedenen Molekülmassen M_w (adaptiert von Schiff ³² , Schiff et al. ³⁵ , Franck ³⁶).....	11
Abbildung 3.1: (a) Schematische Darstellung der elektrolytischen Doppelschicht (adaptiert von Hamann und Vielstich ⁶⁸). (b) Metallabscheidung in einer elektrochemischen Zelle.	16
Abbildung 3.2: Darstellung der verschiedenen Reaktionsmechanismen bei der Metallabscheidung (adaptiert von Ghoddsi ⁷¹ , Arnold et al. ⁷²).....	19
Abbildung 3.3: Einfluss unterschiedlicher Aspektverhältnisse der Mikrostrukturen bei der (a) Feldlinienverteilung und beim (b) Stofftransport (adaptiert von Dambrowski ⁶⁷).	23
Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines Neurons (adaptiert von Kanacademy ⁸⁴).....	24
Abbildung 4.2: (a) Transportmechanismen sowie Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zellmembran (adaptiert von Lodish ⁸⁵ , what-when-how ⁸⁹). (b) Schematische Darstellung eines Aktionspotentials eines Neurons (adaptiert von Flexicon ⁹⁰).	25
Abbildung 4.3: (a) Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik (adaptiert von Discoverymedicine ⁹⁵). (b) Schematische Darstellung der extrazellulären Ableitung mittels Metallelektrode (adaptiert von Hierlemann et al. ⁹⁴).	28
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des elektrochemischen Ersatzschaltbilds nach Hodgkin und Huxley für eine extrazelluläre Messung an einer Zelle.....	29
Abbildung 4.5: (a) Schematische Darstellung und (b) Anwendungsbeispiel eines Umschlängens einer pilzförmigen Elektrodenstruktur (adaptiert von Spira et al. ¹⁵⁸ , Fendyur et al. ¹⁵⁹). (c) Schematische Darstellung und (d) Anwendungsbeispiel der Penetration der Zelle durch die spitzenförmigen Elektroden (Abstand: 1 μm) (adaptiert von Spira et al. ¹⁵⁸ , Robinson et al. ¹⁴⁴).	33
Abbildung 5.1: (a) Monolithisch aufgebauter, kommerziell erhältlicher MEA-Chip (Multi Channel Systems) mit einer Kammer. (b) Individuell hergestellter MEA-Chip auf PCB-Trägersubstrat mit Zwei-Kammer-Prinzip. (c) Rückseite des PCB (ohne Chip).....	36

Abbildung 5.2: Möglichkeiten des Maskenlayouts für die MEA-Herstellung (a) der monolithischen Variante und (b) der Variante mit PCB-Trägersubstrat.	37
Abbildung 5.3: Schematische Darstellung des Nanostrukturierungsprozesses der MEA Chips (Erläuterungen siehe Text).....	39
Abbildung 5.4: Schematische Darstellung des Mikrostrukturierungsprozesses der MEA-Chips - als Fortsetzung zu Abbildung 5.3 (Erläuterungen siehe Text)....	40
Abbildung 5.5: Schematischer Querschnitt eines fertig prozessierten Chips auf der Trägerplatine inklusive Glasringbegrenzung (adaptiert von Sørensen ¹⁷²).....	41
Abbildung 5.6: (a) Schematische Darstellung des MEA-Layouts inklusive Elektroden (Mitte), Zuleitungen und Kontaktpads (außen). (b) Elektrodenbereich: Die rot schraffierten Flächen kennzeichnen die nanostrukturierten Areale.	42
Abbildung 5.7: (a) Darstellung der vier verschiedenen Strukturformen: Säule (1), Röhre (2), überwachsene Säule (3) und überwachsene Röhre (4). (b) Layout der Nanostrukturen (P: Säule, T: Röhre, Zahl: Außendurchmesser in nm, *: Strukturfeld mit 500x500 μm^2 nanostrukturierter Fläche) und Mikrostrukturierung (siehe Farbkodierung).....	43
Abbildung 5.8: (a) Schematische Darstellung der Nanostrukturfelder auf dem NIL-Stempel. (b) Schematische Darstellung der Auswahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Nanostrukturabständen.....	44
Abbildung 6.1: Vergleich der Kontaktwinkelmessungen (a) vor der Aktivierung, (b) nach der Aktivierung sowie (c) nach der Silanisierung des Si-Masters.....	47
Abbildung 6.2: Prinzipskizze zur Herstellung eines Siliziumreplikats mittels Hartmaske.	48
Abbildung 6.3: Fehlerbild bei dem Replikationsverfahren mittels Hartmaske: (a) Darstellung eines gesamten Strukturfelds mit (b) schlechter und (c) guter Strukturübertragung.	49
Abbildung 6.4: Prinzipskizze zur Herstellung eines Polymerreplikats mittels IPS [®] -Folie und OrmoStamp [®] -Verfahren (adaptiert von micro resist technology ¹⁷⁷).	50
Abbildung 6.5: Fehlerbilder bei dem Replikationsverfahren mittels IPS [®] -Folie und OrmoStamp [®] : (a) Teilweiser Abriss der Nanostrukturen im Randbereich und (b) Versatz der Strukturfelder aufgrund eines intrinsischen Verzugs der Folie.	51
Abbildung 6.6: Prinzipskizze zur Herstellung eines Polymerreplikats mittels zweifachem OrmoStamp [®] -Verfahren (adaptiert von micro resist technology ¹⁷⁷).....	51
Abbildung 6.7: (a) Fehlerbild bei dem Replikationsverfahren mittels doppeltem OrmoStamp [®] -Verfahren zeigt eine vermehrte Blasenbildung. Der Großteil des (b) gesamten Arrays sowie (c) des einzelnen Strukturfelds sind jedoch meist defektarm.....	52
Abbildung 6.8: Vergleich der (a) Strukturhöhe h_{nano} und der (b) Abweichung des Durchmessers der Nanostrukturen Δd_{nano} vom Sollwert verschiedener Strukturfelder von Master und den hergestellten Replikaten ($n=6$).....	53
Abbildung 6.9: Vergleich der Partikelbelastung der Goldoberfläche des Wafers (a) ohne Resist, nach Auftragen des Resists (b) ohne Filter und (c) mit Filter.....	54

Abbildung 6.10: Vergleich der Mäanderstrukturen nach einem Imprint mit dem Teststempel bei einem Druck von 20 bar, einer Zeit von 4 min und einer Temperatur von (a) 160 °C und (b) 190 °C.....	55
Abbildung 6.11: Vergleich der Waferoberfläche nach einem Imprint bei einer Temperatur von (a) 190 °C und (b) 160 °C.....	56
Abbildung 6.12: (a) Die REM-Aufnahme zeigt die nach dem RIE Prozess geöffneten Strukturen zur Galvanikstartschicht. Vergleich der Nanostrukturübertragung bei unterschiedlichen RIE-Parametern zeigen (b) eine überwiegend isotrope und (c) überwiegend anisotrope Ätzung.....	57
Abbildung 6.13: Vergleich der Resistschichtdicken d_{Resist} der prozessierten Wafer nach verschiedenen Prozessschritten ($n=5$).	58
Abbildung 6.14: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei der Kombination aus (a) Master und Siliziumwafer, (b) OrmoStamp®-Replikat und Goldwafer und (c) Master und Goldwafer.	59
Abbildung 6.15: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei (a) Verwendung einer Titanzwischen-schicht und (b) Verwendung eines Lift-Off-Resists als Zwischenschicht.....	60
Abbildung 6.16: Vergleich der Nanostrukturübertragung des gesamten Arrays (oben) und eines einzelnen Strukturfelds (unten) bei sukzessiver Erhöhung der NIL-Lackschichtdicke auf (a) 300 nm, (b) 400 nm und (c) 450 nm.	61
Abbildung 6.17: Vergleich von (a) Höhe der Resiststruktur h_r und (b) Abweichung des Nanostrukturdurchmessers Δd_r vom Sollwert verschiedener Strukturfelder nach NIL und RIE im Vergleich zum Master ($n=6$).....	62
Abbildung 6.18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur elektrochemischen Abscheidung.....	64
Abbildung 6.19: Substrathalter für (a) den Einsatz von Goldplättchen während den Vorversuchen und (b) den Einsatz von Wafer zur Herstellung der Nanostrukturen.....	65
Abbildung 6.20: Abhängigkeit der Stromausbeute ψ , mittleren Rauigkeit R_a und des Glanzes der abgeschiedenen Schicht von der Stromdichte j	66
Abbildung 6.21: (a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines nanostrukturierten Arrays nach der elektrochemischen Abscheidung. (b) Abhängigkeit der Strukturhöhe h_{nano} der Säulen- und Röhrenstrukturen vom Struktur-durchmesser d_{nano} ($n=6$).	67
Abbildung 6.22: (a) Korrelation der gemessenen mittleren Strukturhöhen (in nm) zu den dazugehörigen Strukturfeldern. (b) Entwicklung der Spannung U während einer Zeit t_{gal} bei konstantem Stromfluss.	69
Abbildung 6.23: (a) Abhängigkeit der Strukturhöhe h_{nano} der Säulen- und Röhrenstrukturen von der Zeit t_{gal} der elektrochemischen Abscheidung ($n=12$). (b) Abhängigkeit der Abscheiderate $dh_{\text{nano}} \cdot dt_{\text{gal}}^{-1}$ vom Struktur-durchmesser d_{nano} ($n=12$).....	70
Abbildung 6.24: REM-Aufnahmen von (a) überwachsenen Säulenstrukturen und (b) überwachsenen Röhrenstrukturen. (c) REM-Aufnahme eines Querschnitts einer einzelnen überwachsenen Säulenstruktur.	71

Abbildung 6.25: (a) Vergleich der Mikrostrukturen der Maske (oben) mit den durch Photolithographie prozessierten Strukturen im Resist (unten). (b) Vergleich der Mikroelektroden vor (oben) und nach dem Ätzen (unten) der Gold- und Titanschicht und resultierender Unterätzung an unstrukturierten Elektroden. (c) Nanostrukturierte Mikroelektrode nach der Lithographie (oben) und nach dem nasschemischen Ätzen (unten).	73
Abbildung 6.26: (a) Abhängigkeit der Strukturbreitenänderung Δb von der Ätzzeit $t_{\text{ätz}}$ beim Ätzen der Goldschicht ($n=6$). (b) Änderung der Strukturbreite Δb von Elektrode (El.) und Zuleitung (Zul.) nach der Photolithographie und dem Ätzen ($n=6$).	74
Abbildung 6.27: (a) REM-Aufnahme zeigt die geschlossene Oberfläche der Isolationsschicht (nach Kontaktlochöffnung). (b) Mittelwerte der gemessenen Schichtdicken des Isolatorstapels d_{Isolator} verschiedener Wafer ($n=5$).	75
Abbildung 6.28: (a) Vergleich der Kontaktlochöffnungen der Maske (oben) mit den durch Photolithographie prozessierten Strukturen im Resist (unten). (b) Mittelwerte der Vergrößerung des Kontaktlochdurchmessers Δb nach der Photolithographie und dem Ätzen ($n=6$).	76
Abbildung 6.29: Vergleich von (a) Abtrag $h_{\text{ätz}}$ und (b) Änderung der Strukturbreite Δb bei verschiedenen Ätzzeiten der RIE $t_{\text{ätz}}(\text{RIE})$ und Verwendung einer HF-Ätzung ($n=5$).	77
Abbildung 6.30: (a) Ätzangriff auf die Elektrodenoberfläche bei verlängerter Trockenätzung. (b) Isolationsschichtreste um die Nanostrukturen bei nicht durchgeführter Flusssäure-Ätzung. (c) Effekt einer 1 min Flusssäure-Ätzung auf die Strukturbreite (grüner Ring).	78
Abbildung 6.31: Mikroskopaufnahmen nach der Kontaktlochöffnung bei optimierten Prozessparametern zeigen (a) ein gesamtes Strukturarray, (b) eine nanostrukturierte und (c) unstrukturierte Elektrode.	79
Abbildung 6.32: REM-Aufnahmen nanostrukturierter Mikroelektroden nach Prozessende. Repräsentativ dargestellt sind (a) überwachsene Röhrenstrukturen mit 300 nm Stildurchmesser und 1 μm Abstand und (b) überwachsene Säulenstrukturen mit 300 nm Stildurchmesser und 5 μm Abstand.	80
Abbildung 7.1: Potential-Zeit-Verlauf bei der Cyclovoltammetrie.	82
Abbildung 7.2: Prinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie, bei der eine Wechselspannung angelegt und der sich ausbildende Wechselstrom detektiert wird (adaptiert von Moosbauer ¹⁸⁴).	83
Abbildung 7.3: Elektrochemisches Ersatzschaltbild einer Halbzelle (adaptiert von Buitenweg et al. ¹⁶⁶).	84
Abbildung 7.4: (a) Schematische Darstellung des Messaufbaus bezüglich der elektrochemischen Charakterisierung an Makroelektroden und (b) Messaufbau zur elektrochemischen Charakterisierung an nanostrukturierten MEAs.	85
Abbildung 7.5: (a) CV-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen mit verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten. (b) Das Auftragen des Betrags des anodischen und kathodischen Spitzenstroms $ I_p $ gegenüber der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit v zeigt ein lineares Verhalten.	86

- Abbildung 7.6:** (a) CV-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen unterschiedlicher Fläche bei konstanter Vorschubgeschwindigkeit. (b) Das Auftragen des kathodischen bzw. anodischen Spitzenstroms $|I_p|$ gegenüber der Fläche A der Goldplättchen zeigt ein lineares Verhalten. 88
- Abbildung 7.7:** (a) Nyquist-Diagramm der EIS-Messungen an unstrukturierten Goldplättchen unterschiedlicher Fläche. (b) Vergrößerung des Ausschnitts aus (a) (ohne 4 mm²-Fläche). (c) Darstellung derselben Messergebnisse im Bode-Diagramm ($|Z|$: durchgezogene Linie, φ : gestrichelte Linie). (d) Das Auftragen des Impedanzbetrags $|Z|$ gegenüber dem Kehrwert der Fläche A^{-1} der Goldplättchen zeigt ein lineares Verhalten. 89
- Abbildung 7.8:** Ergebnisse der mittels elektrochemischen Ersatzschaltbilds simulierten Parameter für (a) die Doppelschichtkapazität C_{dl} und Elektrolytwiderstand R_E sowie (b) Durchtrittswiderstand R_D und Warburgimpedanz Z_W in Abhängigkeit der Fläche A der Elektroden. 90
- Abbildung 7.9:** CV-Messungen an einer nanostrukturierten MEA-Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) mit (a) geringer Vorschubgeschwindigkeit und (b) hohen Vorschubgeschwindigkeiten. 92
- Abbildung 7.10:** Schematische Darstellung der (a) planaren Diffusion an Makroelektroden und der (b) semi-hemisphären Diffusion an Mikroelektroden in Abhängigkeit von dem Elektrodendurchmesser D und der Diffusionslänge δ 93
- Abbildung 7.11:** (a) Vergleich des CV-Diagramms einer nano- und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 V/s. (b) Betrag der kathodischen Spitzenströme $|I_{pc}|$ in Abhängigkeit der Vorschubgeschwindigkeit v einer nano- und einer unstrukturierten Mikroelektrode (am Beispiel T600_1). 94
- Abbildung 7.12:** Mittelwert der normierten Kapazität nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden der untersuchten MEA-Chips ($n=8$). 95
- Abbildung 7.13:** (a) Deckschichtdiagramm einer nanostrukturierter und einer unstrukturierter Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) in 3 M KCL bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 V/s. (b) Mittelwert der normierten umgesetzten Ladungsmenge Q_{norm} nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden der untersuchten MEA-Chips ($n=8$). 96
- Abbildung 7.14:** Elektrochemische Impedanzspektroskopie in Kaliumhexacyanoferrat-Lösung einer nanostrukturierter und einer unstrukturierter Mikroelektrode (am Beispiel T600_1) dargestellt im (a) Nyquist-Diagramm und (b) im Bode-Diagramm ($|Z|$: durchgezogene Linie, φ : gestrichelte Linie). 100
- Abbildung 7.15:** Mittelwert (a) des Impedanzbetrags $|Z|$ und (b) des Betrags der Phase $|\varphi|$ nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden aller untersuchten MEA-Chips bei einer Frequenz von 1 kHz ($n=8$). 101
- Abbildung 7.16:** (a) Messaufbau zur Bestimmung des Rauschens und zur Zellpotentialmessung. (b) Zeitlicher Verlauf des Rauschens U_{noise} einer nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektrode des MEA-Chips T600_1. 106
- Abbildung 7.17:** (a) Vergleich des Spitzen-Spitzen-Rauschens U_{pp} und (b) Vergleich des RMS-Rauschens U_{rms} nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden verschiedener Layouts. Dargestellt ist der Mittelwert aller Elektroden für einen Zeitraum von 30 s sowie die prozentuale Veränderung aufgrund der Nanostrukturen ($n=30$). 107

Abbildung 8.1: Qualitative Überprüfung der Biokompatibilität von P19 Zellen mit den nanostrukturierten MEAs. Aufnahmen an (a) Tag 0 vor der Aussaat, (b) Tag 1 und (c)/(d) Tag 23.....	110
Abbildung 8.2: REM-Aufnahmen von SVZ-Zellen auf nanostrukturierten Goldplättchen mit (a)/(b) P500_1 Nanostrukturen sowie (c)/(d) P500_5 Nanostrukturen.....	112
Abbildung 8.3: (a) Konfluente Zellschicht der HEK 293 Zellen am Tag 3 nach der Aussaat. (b) Darstellung des Impedanzbetrags $ Z $ (bei $f=1$ kHz) nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden (am Beispiel P500_1). Der Mittelwert (inklusive Standardabweichung) sind sowohl für Messungen ohne Zellkultivierung (schwarz/blau) als auch mit Kultivierung mit HEK 293 Zellen (rot/gelb) dargestellt ($n=5$).....	114
Abbildung 8.4: (a) Schematische Darstellung verschiedener Einflussmöglichkeiten einer nanostrukturierten Elektrode auf die Zell-Elektroden-Kopplung im Vergleich zu einer unstrukturierten Elektrode (links). (b) Vergleich des Einflusses der Nanostrukturen auf die Zelladhäsion unterschiedlicher MEA Chips anhand von Impedanzmessungen ($n=5$).	115
Abbildung 8.5: Mit (a) ECM-Gel, (b) Gelatine und (c) PDL beschichtete Goldplättchen zur Bestimmung der Schichtdicke mittels Oberflächenprofilometrie.....	117
Abbildung 8.6: REM-Aufnahmen nanostrukturierter MEA Elektroden, die mit (a) ECM-Gel, (b) Gelatine und (c) PDL beschichtet sind.....	118
Abbildung 8.7: Darstellung des Impedanzbetrags $ Z $ (bei $f=1$ kHz) nanostrukturierter und unstrukturierter Mikroelektroden des MEA-Chips P500_1 für verschiedene adhäsionsvermittelnde Schichten in PBS. Als Kontrolle wird derselbe Chip ohne Schicht gemessen.	119
Abbildung 8.8: (a) Beispielmessung zur Detektion von Zellpotentialen am MEA-Chip T600_5. (b) Vergrößerung aus (a) zeigt die Abfolge der Potentialpeaks über einen Zeitraum von 30 s. (c) Vergrößerung aus (b) zeigt die Darstellung einzelner Potentialpeaks.	123
Abbildung 8.9: Aufnahmen der Zellkultur an (a) Tag 0, (b) Tag 1, (c) Tag 11 ohne Membran und (d) Tag 11 mit Membran.	125
Abbildung 8.10: (a) Impedanzmessungen am Chip T500_1 zur Validierung einer möglichen Chipverschmutzung oder eines Chipdefekts aufgrund des Abbaus der Isolationsschicht. (b) Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die partielle Degradation der Isolationsschicht.	129
Abbildung B.1: Elektrisches Ersatzschaltbild einer MEA-Elektrode unter Messbedingungen (adaptiert von Buitenweg et al ¹⁰³).	142
Abbildung C.1: Parameterdarstellung zur Berechnung einer (a) überwachsenen Säulenstruktur, (b) Röhrenstruktur und eines (c) Torus.....	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1: Liste aller zur Charakterisierung verwendeter MEA Chips und deren Eigenschaften, Durchmesser d_{nano} , Strukturabstände l_{nano} und Strukturhöhen. ..	91
Tabelle 7.2: Vergleich der abgeschätzten Oberflächenvergrößerung aufgrund der Topographie mit der in den Experimenten ermittelten Vergrößerung. Die hervorgehobenen Werte zeigen die größte Übereinstimmung der Messwerte mit dem abgeschätzten Wert.	103
Tabelle 8.1: Leitfähigkeitsmessungen verschiedener adhäsionsvermittelnder Stoffe beinhalten der Lösungen.	121
Tabelle 8.2: Vergleich der ermittelten Werte für die Dicke der Adhäsionsschicht d_A aus den Impedanz- und Profilometermessungen für die verschiedenen Beschichtungsarten.	122
Tabelle 8.3: Vergleich der Anzahl aktiver Elektroden sowie verschiedener Parameter der Aktionspotentiale der untersuchten MEA-Chips an verschiedenen Tagen der Messung.	124

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AFM	Rasterkraftmikroskop, <i>atomic force microscope</i>
CE	<i>counter electrode</i>
CPE	<i>constant phase element</i>
CV	Cyclovoltammetrie
DI-Wasser	deionisiertes Wasser
ECM	Extrazellulärmatrix, <i>extracellular matrix</i>
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
FOTCS	1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilan
FET	Feldeffekttransistor
FTP	<i>film thickness probe</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
IPS	<i>intermediate polymer stamp</i>
MEA	Multielektrodenarray
NIL	Nanoimprintlithographie
o.E.	ohne Einheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCB	<i>printed circuit board</i>
PDL	Poly-D-Lysin
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECVD	<i>plasma enhanced chemical vapour deposition</i>
PEDOT	Poly-3,4-ethylendioxythiophen
PMMA	Polymethylmethacrylat
RE	<i>reference electrode</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop

RIE	<i>reactive ion etching</i>
RMS	<i>root mean square</i>
sccm	<i>standard cubic centimeters per minute</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i>
SOP	<i>standard operating procedure</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
T-NIL	thermische Nanoimprintlithographie
UV-NIL	auf Ultraviolett-Licht basierende Nanoimprintlithographie
WE	<i>working electrode</i>

Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Beschreibung
a	nm	Radius des Ellipsoids
a_{CPE}	Ω	Maß des Betrags des CPE
A_e	m^2	Fläche der Elektrode
A_{Isolator}	μm^2	Fläche des Isolatormaterials
$A_{\text{Kopf(P,T)}}$	m^2	Fläche des Kopfs einer überwachsenen Säule/Röhre
$A_{\text{Stil(P,T)}}$	m^2	Fläche des Stils einer überwachsenen Säule/Röhre
$A_{\text{Zuleitung}}$	μm^2	Querschnittsfläche der Zuleitung
b	μm	Strukturbreite der Mikrostrukturen
b_{CPE}	o.E.	Maß der Phase des CPE
c	nm	Höhe des Ellipsoids
c_{ox}	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Konzentration der oxidierten Form
c_{red}	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Konzentration der reduzierten Form
C	F	Kapazität
C_{dl}	F	Doppelschichtkapazität
C_e	F	Kapazität der Elektrode
C_{Isolator}	F	Kapazität der Isolationsschicht
C_{M}	F	Kapazität der Zellmembran
d_e	μm	Dicke der Elektrode
d_{A}	nm	Dicke der Adhäsionsschicht
d_{Isolator}	nm	Dicke der Isolationsschicht
d_{nano}	nm	Durchmesser der Nanostruktur (Stil)
d_{r}	nm	Durchmesser der Nanostruktur im Resist
d_{res}	cm	Höhe des Reservoirs
d_{Resist}	nm	Dicke des Resists

D	μm	Durchmesser der Elektrode
E	V	Potential (allgemein)
E_a	V	Potential des anodischen Peakstroms
E_k	V	Potential des kathodischen Peakstroms
E_0	V	Standardelektrodenpotential
E_{GG}	V	Gleichgewichtspotential
E_M	V	Membranpotential der Zelle
E_X	V	Potential der Ionensorte x
f	Hz	Frequenz (allgemein)
Δf	Hz	Bandbreite (allgemein)
F	$\text{A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}$	Faradaykonstante ($F= 96485 \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}$)
h_0	nm	Lackdicke vor dem Imprint
$h_{\text{ätz}}$	μm	Dicke der geätzten Schicht
h_{nano}	nm	Höhe der Nanostruktur
h_r	nm	Höhe der Resiststruktur nach dem Imprint
h_{res}	nm	Dicke des <i>residual layers</i>
h_{Stil}	nm	Höhe des Stils der Nanostruktur
H	nm	Gesamthöhe der Nanostruktur
H_{krit}	nm	kritische Höhe der Nanostruktur
I	A	Strom (allgemein)
I_a	A	anodischer Strom
I_k	A	kathodischer Strom
I_m	A	Stromamplitude
I_M	A	Ionenstrom durch Zellmembran
$I_{p,a}$	A	anodischer Peakstrom
$I_{p,k}$	A	kathodischer Peakstrom
j	$\text{A}\cdot\text{dm}^{-2}$	Stromdichte (allgemein)
j_i	$\text{A}\cdot\text{dm}^{-2}$	Stromdichte im Segment i im Strom-Dipol-Modell
j_D	$\text{A}\cdot\text{dm}^{-2}$	Gesamtstromdichte

k_B	$J \cdot K^{-1}$	Boltzmann-Konstante ($k_B = 1,3810 \cdot 10^{-23} J \cdot K^{-1}$)
l_{nano}	μm	Abstand der Nanostrukturen
$l_{\text{Zuleitung}}$	mm	Länge der Zuleitung
m_{tat}	g	tatsächlich abgeschiedene Masse
m_{theo}	g	theoretisch abgeschiedene Masse
M	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Molare Masse
M_W	u	Molekülmasse
n	mol	Stoffmenge
p	Pa	Druck beim Imprint
P_x	m^2	Permeabilität der Ionensorte x
Q	C	Ladung (allgemein)
Q_{ab}	C	zur Abscheidung genutzte Ladung
Q_B	C	Ladung zum Auf-/Abbau von Deckschichten
Q_{ges}	C	gesamte umgesetzte Ladungsmenge
r	nm	Radius der Imprintstruktur
r_i	m	Distanz zum Segment i im Strom-Dipol-Modell
r_{Stil}	nm	Durchmesser des Stil
R	$J \cdot K^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	universelle Gaskonstante ($R = 8,314 J \cdot K^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
R_a	nm	mittlere Rauigkeit
R_D	Ω	Durchtrittswiderstand
R_e	Ω	Widerstand der Elektrode
R_E	Ω	Elektrolytwiderstand
R_{Gap}	Ω	Widerstand aufgrund des Zell-Elektrodenabstands
R_s	Ω	Widerstand der Adhäsionsschicht
R_{Seal}	Ω	Abdichtwiderstand
R_X	Ω	Widerstand der Ionensorte x
$R_{\text{Zuleitung}}$	Ω	Widerstand der Zuleitung
S	nm	Fläche des Ellipsensegments
ΔS_i	m^2	Oberfläche des Segments i im Strom-Dipol-Modell

t	s	Zeit (allgemein)
t_t	nm	Wandstärke der Röhre
$t_{\text{ätz}}$	s	Ätzzeit
t_f	s	Zeit zum Füllen der Imprintstruktur
t_{gal}	s	Zeit der elektrochemischen Abscheidung
T	K	absolute Temperatur
T_g	K	Glasübergangstemperatur
T_I	K	Imprinttemperatur
u	nm	Umfang der Ellipse
U	V	Spannung (allgemein)
U_m	V	Spannungsamplitude
U_{noise}	μV	Spannung des Rauschens
U_{pp}	μV	Spitzen-Spitzen-Spannungsrauschen
U_{rms}	μV	RMS-Spannungsrauschen
v	$\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	Vorschubgeschwindigkeit
$v_{\text{noise,therm}}$	V	thermisches Rauschen
V_{ex}	V	extrazelluläres Potential im Strom-Dipol-Modell
$[x_a]$	mol	Konzentration des Ions x außerhalb der Zelle
$[x_i]$	mol	Konzentration des Ions x innerhalb der Zelle
z	o.E.	Äquivalenzahl
Z	Ω	Impedanz (allgemein)
$\Im(Z)$	Ω	Imaginärteil der Impedanz
$\Re(Z)$	Ω	Realteil der Impedanz
Z_{CPE}	Ω	Impedanz des konstanten Phasenelements
Z_W	Ω	Warburgimpedanz
ΔZ_{nano}	Ω	Impedanzunterschied der nanostrukturierten Elektroden
ΔZ_{unstr}	Ω	Impedanzunterschied der unstrukturierten Elektroden
γ_{SG}	$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$	Grenzflächenspannung fest-gasförmig
γ_{SL}	$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$	Grenzflächenspannung fest-flüssig

γ_{LG}	$N \cdot m^{-1}$	Grenzflächenspannung flüssig-gasförmig
δ	μm	Diffusionslänge
ϵ_0	$C^2 \cdot N^{-1} \cdot m^{-2}$	absolute Permittivität ($\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} C^2 \cdot N^{-1} \cdot m^{-2}$)
ϵ_r	o.E.	relative Permittivität
η	V	Überspannung
η_D	V	Durchtrittsüberspannung
η_0	Pa·s	Viskosität des Lacks
Θ	°	Kontaktwinkel
ν	o.E.	Füllfaktor
ρ	$\Omega \cdot m$	spezifischer Widerstand (allgemein)
σ	$\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$	elektrische Leitfähigkeit (allgemein)
σ_A	$\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$	elektrische Leitfähigkeit der Adhäsionsschicht
σ_{PBS}	$\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$	elektrische Leitfähigkeit des PBS
φ_u	°	Phase der Spannung
φ_i	°	Phase des Stroms
φ	°	Phase der Impedanz mit $\varphi = \varphi_u - \varphi_i$
ϕ	V	Elektrodenpotential
ψ	o.E.	Stromausbeute
ω	Hz	Frequenz der Impedanz

Literaturverzeichnis

1. Chuang A. T., Margo C. E., Greenberg P. B.: Retinal implants: a systematic review: Table 1. *Br J Ophthalmol* 98, 852–856 (2014).
2. Mayberg H. S., Lozano A. M., Voon V., McNeely H. E., Seminowicz D., Hamani C., Schwab J. M., Kennedy S. H.: Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Neuron* 45, 651–660 (2005).
3. Bronstein J. M., Tagliati M., Alterman R. L., Lozano A. M., Volkmann J., Stefani A., Horak F. B., Okun M. S., Foote K. D., Krack P., Pahwa R., Henderson J. M., Hariz M. I., Bakay R. A., Rezai A., Marks Jr W. J., Moro E., Vitek J. L., Weaver F. M., Gross R. E., DeLong M. R.: Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease. *Arch Neurol* 68 (2011).
4. Sandoe C., Krishna V., Basha D., Sammartino F., Tatsch J., Picillo M., di Biase L., Poon Y.-Y., Hamani C., Reddy D., Munhoz R. P., Lozano A. M., Hutchison W. D., Fasano A.: Predictors of deep brain stimulation outcome in tremor patients. *Brain Stimulation* 11, 592–599 (2018).
5. Fujimori S.: Fine Pattern Fabrication by the Molded Mask Method (Nanoimprint Lithography) in the 1970s. *Jpn. J. Appl. Phys.* 48, 06FH01 (2009).
6. Chou S. Y.: Patent: 1498402236884655000-05772905 (1995).
7. Chou S. Y.: Nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B* 14, 4129 (1996).
8. Compano R.: Technology Roadmap for Nanoelectronics (2000).
9. Chou S. Y., Krauss P. R., Renstrom P. J.: Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl. Phys. Lett.* 67, 3114–3116 (1995).
10. Micro Resist Technology: Processing Guidelines – mri8000r[®].
11. Haisma J.: Mold-assisted nanolithography: A process for reliable pattern replication. *J. Vac. Sci. Technol. B* 14, 4124 (1996).
12. Colburn M., Johnson S. C., Stewart M. D., Damle S., Bailey T. C., Choi B., Wedlake M., Michaelson T. B., Sreenivasan S. V., Ekerdt J. G., Wilson C. G.: Step and flash imprint lithography: a new approach to high-resolution patterning. *Proceedings of the SPIE1999*, 3676: p. 379-389 (1999).
13. Resnick D. J., Sreenivasan S. V., Willson C. G.: Step & flash imprint lithography. *Materials Today* 8, 34–42 (2005).

14. Schmid G.: Step and flash imprint lithography for manufacturing patterned media. *J. Vac. Sci. Technol. B* 27, 573 (2009).
15. Abdo A., Schuetter S., Nellis G., Wei A., Engelstad R., Truskett V.: Predicting the fluid behavior during the dispensing process for step-and-flash imprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B* 26 (6), 3276-3282 (2002).
16. Micro Resist Technology: Processing Guidelines – mrUVCur21[®].
17. Austin M. D., Ge H., Wu W., Li M., Yu Z., Wasserman D., Lyon S. A., Chou S. Y.: Fabrication of 5nm linewidth and 14nm pitch features by nanoimprint lithography. *Appl. Phys. Lett.* 84, 5299–5301 (2004).
18. Gao H., Tan H., Zhang W., Morton K., Chou S. Y.: Air Cushion Press for Excellent Uniformity, High Yield, and Fast Nanoimprint Across a 100 mm Field. *Nano Lett.* 6, 2438–2441 (2006).
19. Xia Y., Whitesides G. M.: Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition* 37, 550–575 (1998).
20. Kim E., Xia Y., Whitesides G. M.: Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature* 376, 581–584 (1995).
21. Bietsch A., Michel B.: Conformal contact and pattern stability of stamps used for soft lithography. *J. Appl. Phys* 88, 4310 (2000).
22. Hui C., Jagota A., Lin Y. Y., Kramer E. J.: Constraints on Microcontact Printing Imposed by Stamp Deformation. *Langmuir* 18, 1394–1407 (2002).
23. Huang Y. Y., Zhou W., Hsia K. J., Menard E., Park J.-U., Roger J. A., Alleyne A. G.: Stamp Collapse in Soft Lithography. *Langmuir* 21, 8058–8068 (2005).
24. Decré M. M. J., Timmermans P. H. M., van der Sluis O., Schroeders R.: Numerical and Experimental Study of Critical Roof Collapse Conditions in Soft Lithography. *Langmuir* 21, 7971–7978 (2005).
25. Roca-Cusachs P., Rico F., Martinez E., Toset J., Farré R., Navajas D.: Stability of Microfabricated High Aspect Ratio Structures in Poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* 21, 5542–5548 (2005).
26. Beck M., Graczyk M., Maximov I., Sarwe E.-L., Ling T. G. I., Keil M., Montelius L.: Improving stamps for 10 nm level wafer scale nanoimprint lithography. *Microelectronic Engineering* 61-62, 441–448 (2002).
27. Park S., Padeste C., Schiff H., Gobrecht J.: Nanostructuring of anti-adhesive layers by hot embossing lithography. *Microelectronic Engineering* 67-68, 252–258 (2003).

28. Schiff H., Saxer S., Park S., Padeste C., Piele U., Gobrecht J.: Controlled co-evaporation of silanes for nanoimprint stamps. *Nanotechnology* 16, 171 (2005).
29. Okada M., Iwasa M., Nakamatsu K., Kanda K., Haruyama Y. Matsui S.: Durability of antisticking layer against heat in nanoimprinting evaluated using scanning probe microscopy. *Microelectronic Engineering* 86, 657–660 (2009).
30. Bailey T., Choi B. J., Colburn M., Meissl M., Shaya S., Ekerdt J.G., Sreenivasan S. V., Willson C. G.: Step and flash imprint lithography: Template surface treatment and defect analysis. *J. Vac. Sci. Technol. B* 18, 3572 (2000).
31. Jung G.-Y., Li W., Wu W., Chen Y., Olynick D. L., Wang S.-Y., Tong W. M., Williams S.: Vapor-Phase Self-Assembled Monolayer for Improved Mold Release in Nanoimprint Lithography. *Langmuir* 21, 1158–1161 (2005).
32. Schiff H.: Nanoimprint lithography: An old story in modern times - A review, *J. Vac. Sci. Technol. B* 26, 458 (2008).
33. Pfeiffer K., Bleidiessel G., Gruetzner G., Schulz H., Hoffman T., Scheer H.-C., Sotomayor Torres C. M., Ahopelto J.: Suitability of new polymer materials with adjustable glass temperature for nano-imprinting. *Microelectronic Engineering* 46, 431–434 (1999).
34. Scheer H.-C., Bogdanski N., Wissen M., Möllenbeck S.: Imprintability of polymers for thermal nanoimprint. *Microelectronic Engineering* 85, 890–896 (2008).
35. Schiff H., Kristensen A.: Nanoimprint Lithography. *Springer Handbook of Nanotechnology*, 4th ed., Springer Berlin Heidelberg (2017).
36. Franck A.: *Kunststoff-Kompodium. Herstellung, Aufbau, Verarbeitung, Anwendung, Umweltverhalten und Eigenschaften der Thermoplaste, Polymerlegierungen, Elastomere und Duroplaste*. 6th ed., Vogel, Würzburg (2006).
37. Schiff H., Kim G., Lee J., Gobrecht J.: 3D visualization of mold filling stages in thermal nanoimprint by white light interferometry and atomic force microscopy. *Nanotechnology* 20, 355301 (2009).
38. Sotomayor Torres C. M.: *Alternative Lithography. Unleashing the Potentials of Nanotechnology*, Springer US, Boston, MA (2003).
39. Heyderman L., Schiff H., David C., Gobrecht J., Schweizer T.: Flow behaviour of thin polymer films used for hot embossing lithography. *Microelectronic Engineering* 54, 229–245 (2000).
40. Baraldi L. G.: *Heißprägen in Polymeren für die Herstellung integriert-optischer Systemkomponenten*, Dissertation, ETH Zürich (1994).
41. Bird R. B.: *Dynamics of polymeric liquids*. 2nd ed., Wiley, New York (1996).

42. Jackson A. P., Liu X.-L., Paton R.: Squeeze flow characterisation of thermo-plastic polymer. *Composite Structures* 75, 179–184 (2006).
43. Schiff H., Park S., Gobrecht, J.: Nano-Imprint-Molding Resists for Lithography. *J. Photopol. Sci. Technol* 16, 435–438 (2003).
44. Rowland H. D., King W. P.: Polymer deformation and filling modes during microembossing. *J. Micromech. Microeng* 14, 1625–1632 (2004).
45. Rowland H. D., Sun A. C., Schunk P. R., King W. P.: Impact of polymer film thickness and cavity size on polymer flow during embossing: toward process design rules for nanoimprint lithography. *J. Micromech. Microeng* 15, 2414–2425 (2005).
46. Resnick D. J., Sreenivasan S., Willson, C. G.: Step & flash imprint lithography. *Materials Today* 8, 34–42 (2005).
47. Ji R., Hornung M., Verschuuren M. A., van de Laar R., van Eekelen J., Plachetka U., Moeller M., Moormann C.: UV enhanced substrate conformal imprint lithography (UV-SCIL) technique for photonic crystals patterning in LED manufacturing. *Microelectronic Engineering* 87, 963–967 (2010).
48. Voit T.: Mikromechanisch durchstimmbare, dielektrische Fabry-Pérot-Filter im nahen Infrarot-Bereich: Konzept, Herstellung und Charakterisierung, Dissertation, Universität Kassel (2013).
49. Albrecht A.: Substrate Conformal Imprint Lithography als innovatives Verfahren zur Herstellung von Nanospektrometern im sichtbaren Spektralbereich, Dissertation, Universität Kassel (2012).
50. Ji R., Krüger A., Hornung M., Verschuuren M., van de Laar R., van Eekelen J.: Full Field Nanoimprint on Mask Aligners Using Substrate Conformal Imprint Lithography Technique. *Acta Phys Pol A* 116, 187-189 (2009).
51. Zaumseil J., Meitl M. A., Hsu J. W. P., Acharya B. R., Baldwin K. W., Loo Y.-L., Rogers J. A.: Three-Dimensional and Multilayer Nanostructures Formed by Nanotransfer Printing. *Nano Lett* 3, 1223–1227 (2003).
52. Nakajima M., Yoshikawa T., Sogo K., Hirai Y.: Fabrication of multi-layered nano-channels by reversal imprint lithography. *Microelectronic Engineering* 83, 876–879 (2006).
53. Kehagias N., Reboud V., Chansin G., Zelsmann M., Jeppesen C., Schuster C., Kubenz M., Reuther F., Gruetzner G., Sotomayor Torres C. M.: Reverse-contact UV nanoimprint lithography for multilayered structure fabrication. *Nanotechnology* 18, 175303 (2007).
54. Suh D., Rhee J., Lee, H. H.: Bilayer reversal imprint lithography: direct metal–polymer transfer. *Nanotechnology* 15, 1103–1107 (2004).

55. Kong Y. P., Low H. Y.: Duo-mold imprinting of three-dimensional polymeric structures. *J. Vac. Sci. Technol. B* 22, 3251 (2004).
56. Borzenko T., Tormen M., Schmidt G., Molenkamp L. W.: Polymer bonding process for nanolithography. *Appl. Phys. Lett* 79, 2246–2248 (2001).
57. Huang X. D. Bao L.-R., Cheng X., Guo L. J., Pang S. W., Yee A. F.: Reversal imprinting by transferring polymer from mold to substrate. *J. Vac. Sci. Technol. B* 20, 2872 (2002).
58. Cheng X., Guo, L. J.: A combined-nanoimprint-and-photolithography patterning technique. *Microelectronic Engineering* 71, 277–282 (2004).
59. Tegenfeldt J. O., Prinz C., Cao H., Huang R. L., Austin R. H., Chou S. Y., Cox E. C., Sturm J. C.: Micro- and nanofluidics for DNA analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 1678–1692 (2004).
60. Wachenschwanz D., Jiang W., Roddick E., Homola A., Dorsey P., Harper B., Treves D., Bajorek C.: Design of a manufacturable discrete track recording medium. *IEEE Trans. Magn* 41, 670–675 (2005).
61. McClelland G. M., Hart M. W., Rettner C. T., Best M. E., Carter K. R., Terris B. D.: Nanoscale patterning of magnetic islands by imprint lithography using a flexible mold. *Appl. Phys. Lett* 81, 1483–1485 (2002).
62. Cardinale G. F., Skinner J. L., Talin A. A., Brocato R. W., Palmer D. W., Mancini D. P., Dauksher W. J., Gehoski K., Le N., Nordquist K. J., Resnick D. J.: Fabrication of a surface acoustic wave-based correlator using step-and-flash imprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B* 22, 3265 (2004).
63. Ahn S.-W., Lee K.-D., Kim J.-S., Kim S. H., Lee S. H., Park J.-D., Yoon P.-W.: Fabrication of subwavelength aluminum wire grating using nanoimprint lithography and reactive ion etching. *Microelectronic Engineering* 78-79, 314–318 (2005).
64. Yu Z., Schablitsky S. J., Chou S. Y.: Nanoscale GaAs metal–semiconductor–metal photodetectors fabricated using nanoimprint lithography. *Appl. Phys. Lett* 74, 2381–2383 (1999).
65. Baba A., Hizukuri M., Iwamoto M., Asano T.: Stamp technology for fabrication of field emitter from organic material. *J. Vac. Sci. Technol. B* 18, 877 (2000).
66. Landolt D.: Electrochemical and materials science aspects of alloy deposition. *Electrochimica Acta* 39, 1075–1090 (1994).
67. Dambrowsky N.: Goldgalvanik in der Mikrosystemtechnik: Herausforderungen durch neue Anwendungen, Dissertation, Universität Karlsruhe (2006).

68. Vielstich W., Hamann C. H.: *Elektrochemie*. 4th ed., Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005).
69. MicroChemicals (ed.): *Mikro-Galvanik. Elektrochemische Grundlagen*, Ulm (2014).
70. Pletcher D.: *A first course in electrode processes*. 2nd ed., RSC Pub., Cambridge, UK (2009).
71. Ghodssi R., Lin P. (eds.): *MEMS Materials and Processes Handbook*, Springer US, Boston, MA (2011).
72. Arnold D. P., Saumer M., Yoon Y.-K.: *Additive Processes for Metals*. MEMS Materials and Processes Handbook, edited by R. Ghodssi & P. Lin, Springer US, Boston, MA, 137–191 (2011).
73. Kanani N.: *Galvanotechnik. Grundlagen, Verfahren und Praxis einer Schlüsseltechnologie*. 2nd ed., Hanser, München (2009).
74. Knauschner A. (ed.): *Oberflächenveredeln und Plattieren von Metallen*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1983).
75. Fischer H. J.: *Elektrolytische Abscheidung und Elektrokristallisation von Metallen*, Springer, Berlin (1954).
76. Vetter K. J.: *Elektrochemische Kinetik*, Springer Berlin Heidelberg (1961).
77. Landsberg R., Bartelt H. (eds.): *Elektrochemische Reaktionen und Prozesse*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1977).
78. Schwabe K.: *Physikalische Chemie*. 3rd ed., Akad.-Verl., Berlin (1986).
79. Ruzzu A., Matthis B.: Swelling of PMMA-structures in aqueous solutions and room temperature Ni-electroforming. *Microsystem Technologies* 8, 116–119 (2002).
80. Wang L., Desta Y. M., Fettig R. K., Goettert J., Hein H., Jakobs P., Schulz J.: High resolution x-ray mask fabrication by a 100 keV electron-beam lithography system. *J. Micromech. Microeng* 14, 722–726 (2004).
81. Choi Y.-S.: Three-Dimensional Calculation of Current Distribution in Electrodeposition on Patterned Cathode with Auxiliary Electrode. *J. Electrochem. Soc* 143, 480 (1996).
82. Leyendecker K., Bacher W., Bade K., Stark W.: *Untersuchungen zum Stofftransport bei der Galvanoformung von LIGA-Mikrostrukturen*, Dissertation, Universität Karlsruhe (1995).
83. Karthaus J.: *Galvanische Abscheidung von Metallen aus nichtwässrigen Elektrolyten für die Mikrosystemtechnik*, Dissertation, Universität Karlsruhe (2010).

84. <https://www.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/overview-of-neuron-structure-and-function>, abgerufen am 16.02.2018.
85. Lodish H.: *Molecular cell biology*. 4th ed., Freeman, New York (2002).
86. Kandel E.R.: *Principles of neural science*. 5th ed., McGraw-Hill, New York (2013).
87. Heuschkel M. O.: *Fabrication of multi-electrode array devices for electrophysiological monitoring of in-vitro cell/tissue cultures*, Dissertation, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (2001).
88. Heuschkel M. O., Fejtl M., Raggenbass M., Bertrand D., Renaud P.: A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. *Journal of Neuroscience Methods* 114, 135–148 (2002).
89. <http://what-when-how.com/neuroscience/electrophysiology-of-neurons-the-neuron-part-1>, abgerufen am 16.02.2018.
90. <http://flexikon.doccheck.com/de/Aktionspotential>, abgerufen am 16.02.2018.
91. Kléber A. G., Rudy Y.: Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias. *Physiological Reviews* 84, 431–488 (2004).
92. Koch C.: *Biophysics of computation*, Oxford University Press, New York, Oxford (2004).
93. Neher E., Sakmann B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802 (1976).
94. Hierlemann A., Frey U., Hafizovic S., Heer F.: Growing Cells Atop Microelectronic Chips: Interfacing Electrogenic Cells In Vitro With CMOS-Based Microelectrode Arrays. *Proc. IEEE* 99, 252–284 (2011).
95. <http://www.discoverymedicine.com/Jeffrey-J-Clare/2010/03/24/targeting-ion-channels-for-drug-discovery>, abgerufen am 16.02.2018.
96. Bergveld P.: Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng BME-17*, 70–71 (1970).
97. Thomas Jr C., Springer P. A., Loeb G. E., Berwald-Netter Y., Okun L. M.: A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research* 74, 61–66 (1972).
98. Gross G. W., Williams A. N., Lucas J. H.: Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture. *Journal of Neuroscience Methods* 5, 13–22 (1982).

99. Regehr W. G., Pine J., Coxa C. S., Mischke M. D., Tank D. W.: Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *Journal of Neuroscience Methods*, 91–106 (1989).
100. Connolly P., Clark P., Curtis A. S. G., Dow J. A. T., Wilkinson C. D. W.: An Extracellular microelectrode Array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors and Bioelectronics* 5, 223–234 (1990).
101. Hodgkin A. L., Huxley A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117, 500–544 (1952).
102. Buitengeweg J., Rutten W., Marani E.: Modeled channel distributions explain extracellular recordings from cultured neurons sealed to microelectrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 49, 1580–1590 (2002).
103. Buitengeweg J., Rutten W., Marani E.: Geometry-based finite-element modeling of the electrical contact between a cultured neuron and a microelectrode. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 50, 501–509 (2003).
104. Fromherz P.: Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips. *ChemPhysChem* 3, 276 (2002).
105. Wrobel G., Höller M., Ingebrandt S., Dieluweit S., Sommerhage F., Bochem H. P., Offenhäuser A.: Transmission electron microscopy study of the cell-sensor interface. *Journal of the Royal Society Interface* 5, 213–222 (2008).
106. Braun D., Fromherz P.: Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 65, 341–348 (1997).
107. Iwanaga Y., Braun D., Fromherz P.: No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing GFP-vinculin and fluorescence interference of DiI. *European Biophysics Journal* 30, 17–26 (2001).
108. Gleixner R., Fromherz P.: The Extracellular Electrical Resistivity in Cell Adhesion. *Biophysical Journal* 90, 2600–2611 (2006).
109. Lambacher A., Fromherz P.: Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes. *J. Opt. Soc. Am. B* 19, 1435 (2002).
110. Henze D. A., Borhegyi Z., Csicsvari J., Mamiya A., Harris K. D., Buzsáki G.: Intracellular Features Predicted by Extracellular Recordings in the Hippocampus In Vivo. *Journal of Neurophysiology* 84, 390–400 (2000).
111. Egert U., Heck D., Aertsen A.: Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices. *Experimental Brain Research* 142, 268–274 (2002).

112. Nam Y., Wheeler B. C.: In Vitro Microelectrode Array Technology and Neural Recordings. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 45–62 (2011).
113. Roth S. H., Bland B. H., Maciver B. M.: Biphasic actions of pentobarbital on synaptic transmission. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 7, 821–825 (1983).
114. Deadwyler S. A., West J. R., Cotman C. W., Lynch G. S.: A neurophysiological analysis of commissural projections to dentate gyrus of the rat. *Journal of Neurophysiology* 38, 167–184 (1975).
115. Abe H., Ogata N.: Effects of penicillin on electrical activities of neurons in guinea-pig hippocampal slices. *Jpn.J.Pharmacol* 31, 661–675 (1981).
116. Abraham W. C., Manis P. B., Hunter B. E., Zornetzer S. F., Walker D.W.: Electrophysiological analysis of synaptic distribution in CA1 of rat hippocampus after chronic ethanol exposure. *Brain Research* 237, 91–105 (1982).
117. Avoli M., Psarropoulou C., Tancredi V., Fueta Y.: On the synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the CA3 subfield of juvenile rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 70, 1018–1029 (1993).
118. Granger R., Whitson J., Larson J., Lynch G.: Non-Hebbian properties of long-term potentiation enable high-capacity encoding of temporal sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10104–10108 (1994).
119. Kolta A., Ambros-Ingerson J., Lynch G.: Early and late components of AMPA-receptor mediated field potentials in hippocampal slices. *Brain Research* 737, 133–145 (1996).
120. Heer F., Franks W., Blau A., Taschini S., Ziegler C., Hierlemann A., Baltes H.: CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 358–366 (2004).
121. Pancrazio J. J., Whelan J. P., Borkholder D. A., Ma W., Stenger D. A.: Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Annals of Biomedical Engineering* 27, 697–711 (1999).
122. Berdondini L., van der Wal P. D., Guenat O., de Rooij N. F., Koudelka-Hep M., Seitz P., Kaufmann R., Metzler P., Blanc N., Rohr S.: High-density electrode array for imaging in vitro electrophysiological activity. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 167–174 (2005).
123. Oka H., Shimono K., Ogawa R., Sugihara H., Taketani M.: A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *Journal of Neuroscience Methods* 93, 61–67 (1999).

124. Pine J.: Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* 2, 19–31 (1980).
125. Jimbo Y., Robinson H., Kawana A.: Simultaneous measurement of intracellular calcium and electrical activity from patterned neural networks in culture. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 40, 804–810 (1993).
126. Novak J. L., Wheeler, B. C.: Recording from the Aplysia Abdominal Ganglion with a Planar Microelectrode Array. *IEEE Trans. Biomed. Eng BME-33*, 196–202 (1986).
127. Borkholder D., Bao J., Maluf N. I., Perl E. R., Kovacs G. T. A.: Microelectrode arrays for stimulation of neural slice preparations. *Journal of Neuroscience Methods* 77, 61–66 (1997).
128. Janders M., Ebert U., Stelze M., Nisch W.: Novel thin film titanium nitride micro-electrodes with excellent charge transfer capability for cell stimulation and sensing applications. *Proceedings of 18th Annual International Conference of the IEEE* 241, 245–247 (1997).
129. Ebert U., Schlosshauer B., Fennrich S., Nisch W., Fejtl M., Knott T., Müller T., Hämmerle H.: A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols* 2, 229–242 (1998).
130. Gross G. W., Rhoades B. K., Azzazy H. M. E., Wu M.-C.: The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 553–567 (1995).
131. Weiland J., Anderson D., Humayun M.: In vitro electrical properties for iridium oxide versus titanium nitride stimulating electrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 49, 1574–1579 (2002).
132. Gerwig R., Fuchsberger K., Schroepfel B., Link G. S., Heusel G., Kraushaar U., Schuhmann W., Stett A., Stelzle M.: PEDOT–CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology, and Electrical Properties. *Front. Neuroeng* 5 (2012).
133. Zhou H., Cheng X., Rao L., Li T., Duan Y. Y.: Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) /multiwall carbon nanotube composite coatings for improving the stability of microelectrodes in neural prostheses applications. *Acta Biomaterialia* 9, 6439–6449 (2013).
134. Keefer E. W., Botterman B. R., Romero M. I., Rossi A. F., Gross G. W.: Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nature Nanotech* 3, 434–439 (2008).
135. Fang Y., Hou J., Fang Y.: Flexible bio-interfaced nanoelectronics. *J. Mater. Chem. C* 2, 1178 (2014).

136. Bareket-Keren L., Hanein Y.: Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects. *Front. Neural Circuits* 6 (2013).
137. Deng M., Yang X., Silke M., Qiu W., Xu M., Borghs G., Chen H.: Electrochemical deposition of polypyrrole/graphene oxide composite on microelectrodes towards tuning the electrochemical properties of neural probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 158, 176–184 (2011).
138. Sessolo M., Khodagholy D., Rivnay J., Maddalena F., Gleyzes M., Steidl E., Buisson B., Malliaras G. G.: Easy-to-Fabricate Conducting Polymer Microelectrode Arrays. *Adv. Mater* 25, 2135–2139 (2013).
139. Abidian M. R., Kim D.-H., Martin D. C.: Conducting-Polymer Nanotubes for Controlled Drug Release. *Adv. Mater.* 18, 405–409 (2006).
140. Antensteiner M., Khorrami M., Fallahianbijan F., Borhan A., Abidian M. R.: Conducting Polymer Microcups for Organic Bioelectronics and Drug Delivery Applications. *Adv. Mater.* 29, 1702576 (2017).
141. Malliaras G., Abidian, M. R.: Organic Bioelectronic Materials and Devices. *Adv. Mater.* 27, 7492 (2015).
142. Kim J.-H., Kang G., Nam Y., Choi Y.-K.: Surface-modified microelectrode array with flake nanostructure for neural recording and stimulation. *Nanotechnology* 21, 85303 (2010).
143. Prinz C., Hällström W., Martensson T., Samuelson L., Montelius L. Kanje M.: Axonal guidance on patterned free-standing nanowire surfaces. *Nanotechnology* 19, 345101 (2008).
144. Robinson J. T., Jorgolli M., Shalek A. K., Yoon M.H., Gertner R. S., Park H.: Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits. *Nature Nanotech* 7, 180–184 (2012).
145. Greve F., Frerker S., Bittermann A. G., Burkhardt C., Hierlemann A., Hall H.: Molecular design and characterization of the neuron–microelectrode array interface. *Biomaterials* 28, 5246–5258 (2007).
146. Soussou W. V., Yoon G. J., Diaz Brinton R., Berger T. W.: Neuronal Network Morphology and Electrophysiology of Hippocampal Neurons Cultured on Surface-Treated Multielectrode Arrays. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 54, 1309–1320 (2007).
147. Medert R. Schuster A., Schwarz L. K., Schwab T., Schäfer K.-H.: Spiking rate of myenteric neurons recorded from multi-electrode arrays depending on local microenvironment. *Phys. Status Solidi C* 10, 877–881 (2013).

148. Hofmann B., Kätelhön E., Schottdorf M., Offenhäuser A., Wolfrum B.: Nanocavity electrode array for recording from electrogenic cells. *Lab Chip* 11, 1054 (2011).
149. Erickson J., Tooker A., Tai Y.-C., Pine J.: Caged neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of Neuroscience Methods* 175, 1–16 (2008).
150. Taylor A. M., Blurton-Jones M., Rhee W. W., Cribbs D. H., Cotman C. W., Jeon N. L.: A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Meth* 2, 599–605 (2005).
151. Dworak B. J., Wheeler, B. C.: Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture. *Lab Chip* 9, 404–410 (2009).
152. Morales R., Riss M., Wang L., Gavin R., Del Rio J.A., Alcubilla R., Claverol-Tinturé E.: Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience. *Lab Chip* 8, 1896 (2008).
153. Pan L., Alagapan S., Franca E., Brewer G. J., Wheeler B. C. Propagation of action potential activity in a predefined microtunnel neural network. *J. Neural Eng* 8, 46031 (2011).
154. Brewer G. J., Boehler M. D., Leondopulos S., Pan L., Alagapan S., DeMarse T. B., Wheeler B. C.: Toward a self-wired active reconstruction of the hippocampal tri-synaptic loop: DG-CA3. *Front. Neural Circuits* 7 (2013).
155. Kanagasabapathi T. T., Franco M., Barone R. A., Martinoia S., Wadman W. J., Decré M. M. J.: Selective pharmacological manipulation of cortical–thalamic co-cultures in a dual-compartment device. *Journal of Neuroscience Methods* 214, 1–8 (2013).
156. Kanagasabapathi T., Ciliberti D., Martinoia S., Wadman W. W., Decré M. M. J.: Dual-compartment neurofluidic system for electrophysiological measurements in physically segregated and functionally connected neuronal cell culture. *Front. Neuroeng* 4 (2011).
157. Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Suzuki T., Mabuchi K., Jimbo Y.: Network-wide integration of stem cell-derived neurons and mouse cortical neurons using microfabricated co-culture devices. *Biosystems* 107, 1–8 (2012).
158. Spira M. E., Hai A.: Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nature Nanotech* 8, 83–94 (2013).

159. Fendyur A., Mazurski N., Shappir J., Spira M. E.: Formation of Essential Ultrastructural Interface between Cultured Hippocampal Cells and Gold Mushroom-Shaped MEA- Toward “IN-CELL” Recordings from Vertebrate Neurons. *Front. Neuroeng* 4 (2011).
160. Brueggemann D.: Nanostrukturierte Metallelektroden zur funktionalen Kopplung an neuronale Zellen, Dissertation, RWTH Aachen (2010).
161. Unger E.: Die Erzeugung dünner Schichten - Das PECVD-Verfahren: Gasphasenabscheidung in einem Plasma. *Chemie in unserer Zeit* 25 (3), 148–158 (1991).
162. Sterling H. F., Warren R. W.: Cold Crucibles for the Processing of Silicon and Applied Reactive Materials, Semiconductor Products and Solid State Technology, 33-36 (1965).
163. Jupe A.: Herstellung und Charakterisierung eines CMOS-kompatiblen Multi-Elektroden-Arrays, nanomodifiziert mit Kohlenstoff-Nanoröhren und Ruthenium-Nano-Rasen, Dissertation, Universität Duisburg-Essen (2015).
164. Schmitt G., Schultze J.-W., Faßbender F., Buß G., Lüth H., Schöning M. J.: Passivation and corrosion of microelectrode arrays. *Electrochimica Acta* 44, 3865–3883 (1999).
165. Sassella A., Borghesi A., Corni F., Monelli A., Ottaviani G., Tonini R., Pivac B., Bacchetta M., Zanotti L.: Infrared study of Si-rich silicon oxide films deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 15, 377–389 (1997).
166. Buitenweg J., Rutten W. L. C., Willems W. P. A., van Nieuwkastele J. W.: Measurement of sealing resistance of cell-electrode interfaces in neuronal cultures using impedance spectroscopy. *Med. Biol. Eng. Comput* 36, 630–637 (1998).
167. Krause M., Ingebrandt S., Richter D., Denyer M., Scholl M., Sprössler C., Offenhäuser A.: Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings. *Sensors and Actuators B: Chemical* 70, 101–107 (2000).
168. Ingebrandt S., Yeung C.-K., Krause M., Offenhäuser A.: Neuron transistor coupling: interpretation of individual extracellular recorded signals. *Eur Biophys J* 34, 144–154 (2005).
169. Ingebrandt S.: Charakterisierung der Zell-Transistor Kopplung, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2001).
170. Krause M.: Untersuchungen zur Zell-Transistor Kopplung mittels der Voltage-Clamp Technik, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2000).
171. Völklein F., Zetterer T.: Praxiswissen Mikrosystemtechnik. Grundlagen - Technologien – Anwendungen, 2nd ed., Vieweg, Wiesbaden (2006).

172. Sörensen P.: Entwurf eines Mikroelektroden-Array-Chip und die Charakterisierung der Elektrodenoberfläche durch elektrochemische Impedanzspektroskopie, Diplomarbeit, Fachhochschule Gießen-Friedberg (2003).
173. Lin Z. C., Xie C., Osakada Y., Cui Y., Cui B.: Iridium oxide nanotube electrodes for sensitive and prolonged intracellular measurement of action potentials. *Nat Commun* 5, 1 (2014).
174. Chen J., Shi J., Decanini D., Cambril E., Chen Y., Haghiri-Gosnet A.-M.: Gold nanohole arrays for biochemical sensing fabricated by soft UV nanoimprint lithography. *Microelectronic Engineering* 86, 632–635 (2009).
175. Kontio J. M., Husu H., Simonen J., Huttunen M. J., Tommila J., Pessa M., Kau-ranen M.: Nanoimprint fabrication of gold nanocones with ~10 nm tips for enhanced optical interactions. *Opt. Lett.* 34, 1979 (2009).
176. Young T.: An Essay on the Cohesion of Fluids. *Proceedings of the Royal Society of London* 1, 171–172 (1800).
177. Micro Resist Technology: Processing Guidelines – OrmoStamp®.
178. Love J. C., Estroff L. A., Kriebel J. K., Nuzzo R. G., Whitesides G. M.: Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* 105, 1103–1170 (2005).
179. Baek C.-W., Kim Y.-K., Ahn Y., Kim Y.-H.: Measurement of the mechanical properties of electroplated gold thin films using micromachined beam structures. *Sensors and Actuators A: Physical* 117, 17–27 (2005).
180. Honma H., Hagiwara K.: Fabrication of Gold Bumps Using Gold Sulfite Plating. *J. Electrochem. Soc.* 142, 81 (1995).
181. Honma H., Kagaya Y.: Gold Plating Using the Disulfiteaurate Complex. *J. Electrochem. Soc.* 140, L135 (1993).
182. Rapson W. S., Groenewald T.: Gold usage. Academic Press, London, New York (1978).
183. Macdonald J. R.: Impedance spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering* 20 (3), 289–305 (1992).
184. Moosbauer D.: Elektrochemische Charakterisierung von Elektrolyten und Elektroden für Lithium-Ionen-Batterien, Dissertation, Universität Regensburg (2010).
185. Student: The probable error of a mean. *Biometrika*, 1–25 (1908).
186. Merrill D. R., Bikson M., Jefferys J. G.: Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods* 141, 171–198 (2005).

187. Shannon C. E.: Communication in the presence of noise. *Proceedings of the IEEE* 86 (2), 447–457 (1998).
188. Wierzbicki R. D.: Nanostructured micro-electrode arrays for electrophysiological measurements, Dissertation, Dänemarks Technische Universität Lyngby (2013).
189. Bender M., Schwind L., Grundmann D., Martin M., Klotz M., Götz C., Montenarh M., Schäfer K.-H.: Impact of protein kinase CK2 inhibitors on proliferation and differentiation of neural stem cells. *Heliyon* 3(6), e003185 (2017).
190. Rabe H., Picard R., Uusi-Oukari M., Hevers W., Lüddens H., Korpi E. R.: Coupling between agonist and chloride ionophore sites of the GABAA receptor: agonist/antagonist efficacy of 4-PIOL. *European Journal of Pharmacology* 409, 233–242 (2000).
191. van der Heyden M. A. G., van Kempen M. J. A., Tsuji Y., Rook M. B., Jongasma H. J., Opthof T.: P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovascular Research* 58, 410–422 (2003).
192. Stenger D. A., McKenna T. M.: Enabling technologies for cultured neural networks, Academic Press, San Diego (1994).
193. Lom B., Healy K. E., Hockberger P.: Versatile technique for patterning biomolecules onto glass coverslips. *Journal of Neuroscience Methods* 50, 385–397 (1993).
194. Branch D. W., Wheeler B. C., Brewer G. J., Leckband D. E.: Long-term maintenance of patterns of hippocampal pyramidal cells on substrates of polyethylene glycol and microstamped polylysine. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47, 290–300 (2000).
195. Corey J. M., Wheeler B. C., Brewer G. J.: Micrometer resolution silane-based patterning of hippocampal neurons: critical variables in photoresist and laser ablation processes for substrate fabrication. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 43, 944–955 (1996).
196. Thielecke H., Stieglitz T., Beutel H., Matthies T., Ruf H. H., Meyer J.-U.: Fast and precise positioning of single cells on planar electrode substrates. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 18, 48–52 (1999).
197. Alberts B.: *Molekularbiologie der Zelle*. 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim (2011).
198. Chang J. C., Brewer G. J., Wheeler B. C.: Neuronal network structuring induces greater neuronal activity through enhanced astroglial development. *J. Neural Eng.* 3, 217–226 (2006).
199. Nam Y.: *Engineering Principles to Design and Analyze Patterned Neuronal Cultures Using Multielectrode Arrays*, Dissertation, University of Illinois (2005).

200. Boulton A. A., Baker G. B., Vanderwolf C. H. (eds.): *Neurophysiological Techniques, II*, Humana Press, New Jersey (1990).
201. Drake K. L., Wise K. D., Farraye J., Anderson D. J., BeMent S. L.: Performance of planar multisite microprobes in recording extracellular single-unit intracortical activity. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 35, 719–732 (1988).
202. Claverol-Tinture E., Pine J.: Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Methods* 117, 13–21 (2002).
203. Nam Y., Wheeler B. C., Heuschkel M. O.: Neural recording and stimulation of dissociated hippocampal cultures using microfabricated three-dimensional tip electrode array. *Journal of Neuroscience Methods* 155, 296–299 (2006).
204. Coughlan S.: Improved Plating of Small Holes and other Benefits found using “Pulse Plating” of Acid Copper in PCB Manufacture. *Transactions of the IMF* 73, 54–57 (2017).
205. Yung K. C., Chan K. C., Yue T. M., Yeung K. F.: The effect of waveform for pulse plating on copper plating distribution of microvia in PCB manufacture. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 23, 245–248 (2004).
206. Pearson T., Dennis J. K.: Effect of pulsed reverse current on the structure and hardness of copper deposits obtained from acidic electrolytes containing organic additives. *Surface and Coatings Technology* 42, 69–79 (1990).
207. Pearson T., Dennis J. K.: The effect of pulsed reverse current on the polarization behaviour of acid copper plating solutions containing organic additives. *J Appl Electrochem* 20, 196–208 (1990).
208. Xie C., Lin Z., Hanson L., Cui Y., Cui. B.: Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation. *Nature Nanotech* 7, 185–190 (2012).
209. James C. D., Spence A. J. H., Dowell-Mesfin N. M., Hussain R. J., Smith K. L., Craighead H. G., Isaacson M. S., Shain W., Turner J. N.: Extracellular Recordings From Patterned Neuronal Networks Using Planar Microelectrode Arrays. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, 1640–1648 (2004).
210. Chang J. C., Brewer G. J., Wheeler B. C.: Modulation of neural network activity by patterning. *Biosensors and Bioelectronics* 16, 527–533 (2001).
211. Jungblut M., Knoll W., Thielemann C., Pottek M.: Triangular neuronal networks on microelectrode arrays: an approach to improve the properties of low-density networks for extracellular recording. *Biomed Microdevices* 11, 1269–1278 (2009).
212. Nam Y., Branch D. W., Wheeler B. C.: Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 589–597 (2006).

213. Nam Y., Chang J. C., Wheeler B. C., Brewer G. J.: Gold-Coated Microelectrode Array With Thiol Linked Self-Assembled Monolayers for Engineering Neuronal Cultures. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, 158–165 (2004).
214. Segev R., Benveniste M., Hulata E., Cohen N., Palevski A., Kapon E., Shapira Y., Ben-Jacob E.: Long Term Behavior of Lithographically Prepared In Vitro Neuronal Networks. *Phys. Rev. Lett.* 88, 153 (2002).
215. Eschermann J. F., Stockmann R., Hueske M., Vu X. T., Ingebrandt S., Offenhäuser A.: Action potentials of HL-1 cells recorded with silicon nanowire transistors. *Appl. Phys. Lett* 95, 83703 (2009).
216. Duan X., Gao R., Xie P., Cohen-Karni T., Qing Q., Choe H. S., Tian B., Jiang X., Lieber C. M.: Intracellular recordings of action potentials by an extracellular nanoscale field-effect transistor. *Nature Nanotech* 7, 174–179 (2012).
217. Tian B., Cohen-Karni T., Qing Q., Duan X., Xie P., Lieber C. M.: Three-Dimensional, Flexible Nanoscale Field-Effect Transistors as Localized Bioprobes. *Science* 329, 830–834 (2010).
218. Zhang Y., Kang Z., Yan X., Liao Q.: ZnO nanostructures in enzyme biosensors. *Sci. China Mater* 58, 60–76 (2015).
219. Frey U., Egert U., Heer F., Hafizovic S., Hierlemann A.: Microelectronic system for high-resolution mapping of extracellular electric fields applied to brain slices. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2191–2198 (2009).
220. Frey U., Sedivy J., Heer F., Pedron R., Ballini M., Mueller J., Bakkum D., Hafizovic S., Faraci F. D., Greve F., Kirstein K.-U., Hierlemann A.: Switch-Matrix-Based High-Density Microelectrode Array in CMOS Technology. *IEEE J. Solid-State Circuits* 45, 467–482 (2010).