

# DISSERTATION

---

## **Herstellung und Charakterisierung von dreidimensionalen Mikrostrukturen für Zellexperimente**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
von der Fakultät für Physik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Phys. Thomas Alfred Striebel  
aus Sasbach bei Achern.

---

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2011

Referent: Prof. Dr. Martin Wegener

Korreferenten: Prof. Dr. Martin Bastmeyer  
Prof. Dr. Ulrich Schwarz







# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Die Zelle und ihre natürliche Umgebung</b>	<b>5</b>
2.1. Der Aufbau tierischer Zellen . . . . .	5
2.2. Das Zytoskelett der Zelle . . . . .	8
2.3. Krafterzeugung durch Myosinmotoren . . . . .	16
2.4. Kontakte zur Außenwelt . . . . .	18
2.5. Die Extrazelluläre Matrix . . . . .	20
2.6. Zellmigration . . . . .	22
2.7. Wahrnehmung der Umwelt . . . . .	25
<b>3. Künstliche Zellumgebungen</b>	<b>29</b>
3.1. Homogene Substrate . . . . .	30
3.2. Mikrostrukturierte flache Substrate . . . . .	32
3.3. Topographische Strukturen . . . . .	35
3.4. Dreidimensionale (3D) Umgebungen für die Zellkultur . . . . .	36
3.5. Experimentelle Befunde und Herausforderungen . . . . .	38
<b>4. Grundlagen zur Herstellung und Charakterisierung von 3D Zellgerüsten</b>	<b>41</b>
4.1. Direktes Laserschreiben . . . . .	41
4.2. Fotolacke . . . . .	44
4.3. Charakterisierung von dreidimensionalen Strukturen . . . . .	51
4.4. Aufnahmen in 3D . . . . .	53
<b>5. Niederdimensionale Vorexperimente</b>	<b>57</b>
5.1. Zweidimensionale Strukturierung . . . . .	57
5.2. Topographische Strukturen und der Weg zu 3D . . . . .	69
<b>6. Herstellung von 3D Zelltemplaten</b>	<b>73</b>
6.1. Dreidimensionale Gerüste für Zellexperimente . . . . .	74
6.2. Flexible dreidimensionale Strukturen . . . . .	83
6.3. Kontrolle der Haftmöglichkeiten in drei Dimensionen . . . . .	95
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>99</b>
<b>A. Eingebettete Strukturen in weichen Gelen</b>	<b>103</b>

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>123</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>125</b>

# 1. Einleitung

Aufgrund ihrer Komplexität ist es sehr schwierig, biologische Systeme systematisch und quantitativ zu untersuchen. In den letzten Jahrzehnten wurden aber viele Fortschritte in dieser Richtung erzielt. Die Entwicklung der modernen Zellbiologie ist eng mit der Einführung von Färbemethoden und Mikroskopen verbunden, insbesondere mit der Entwicklung der ersten Konfokalmikroskope in den 1950er Jahren. Die Etablierung der ersten erfolgreichen Zellkultur mit HeLa Krebszellen im Jahre 1951 war ein weiterer wichtiger Schritt. HeLa-Zellen sind nach Henrietta Lacks benannt, die an einem Eierstockkrebs litt. Man konnte nun mit genetisch gleichartigen Zellen arbeiten und Langzeitexperimente über mehrere Stunden oder Tage durchführen. Säugetierzellen unter Laborbedingungen beobachten und manipulieren zu können, gehört auch heutzutage noch zu den mächtigsten Werkzeugen, um Abläufe auf subzellulärer Ebene zu verstehen. Die Weiterentwicklung der Molekularbiologie, die die zelluläre Reaktion auf äußere Bedingungen auf der DNA- und Proteinebene untersucht, und die Einführung von Fluoreszenz-basierten Färbetechniken, die Proteine zuverlässig detektierbar machen, ermöglichten es nun, zeitliche und räumliche Abläufe der unterschiedlichsten Prozesse auf Zellebene besser zu verstehen. Ein Meilenstein in dieser Entwicklung war die Entdeckung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP), das 1961 entdeckt und 2008 mit dem Nobelpreis bedacht wurde. Dieser Fortschritt wird durch die Einführung neuer Mikroskopiekonzepte, die die Auflösungsgrenze der optischen Mikroskopie stark verbessern und die Lokalisierung einzelner Moleküle zulassen [1], in den letzten Jahren sehr stark befeuert. Generell gilt, dass viele moderne Entwicklungen in der Physik, insbesondere in den Materialwissenschaften und der Optik, eine systematische und quantitative Untersuchung zellulärer Systeme erst ermöglichen. Optische Techniken werden heutzutage zu Aufnahmezwecken einzelner Proteine [2], Kraftexperimenten auf Proteinlevel [3] oder zu viskoelastischen Messungen von Einzelzellen [4] verwendet.

Doch nichts ist so kompliziert, wie natürliche Abläufe zu erfassen und zu verstehen, denn „Nature provides plenty of real problems. One does not need to invent them“ (Brian Davies). Die Regelung von Zellen über biochemische Botenstoffe wurde schon früh erforscht und gilt auch heutzutage als wichtige Grundlage zur Steuerung von Prozessen im Körper. Um Stammzellen in andere Zelltypen zu überführen, die Organisation und Migration von Zellen innerhalb eines Organismus zu steuern und Abläufe innerhalb von Zellpopulationen zu synchronisieren, sind Botenstoffe von entscheidender Bedeutung. Die Versuche, die zu diesen Erkenntnissen führten, wurden oft auf flachen und harten Glas- oder Plastikoberflächen durchgeführt.

Durch die Entwicklung neuer Materialien wurde klar, dass Zellen auf flachen Substraten große Unterschiede ihrer Morphologie zu in Gewebe vorhandenen Exemplaren zeigen [5]. Die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung beeinflussen die Entwicklung einer Stammzelle zu ihrem endgültigen Zelltyp massiv [6]. Tierische Bindegewebe, die von Biologen als dreidimensionale Testumgebungen für Zellexperimente verwendet werden, besitzen aufgrund ihrer natürlichen Herkunft sehr unterschiedliche Eigenschaften. Zellversuche müssen häufig in großer Zahl durchgeführt werden, damit die Ergebnisse statistisch relevant sind. Die experimentelle Systematik leidet unter diesen Umständen [7]. Künstliche Polymermatrizen, in die Zellen eingebettet werden können, besitzen eine definierte mechanische Härte. Die Zellen können sich bei einem zu dichten Besatz aber gegenseitig beeinflussen und die Kontrolle einer einzelnen Zelle innerhalb der Matrix ist nur schwer möglich [8].

Diese grundlegenden Erkenntnisse haben wichtige Konsequenzen für biomedizinische Anwendungen wie Tissue Engineering und die Regenerative Medizin. Selektives Lasersintern [9] ermöglicht beispielsweise den Nachbau von Knochen auf makroskopischer Ebene, die wichtige Mikrostrukturierung der Materialoberflächen ist mit dieser Technik aber nicht möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, reproduzierbare dreidimensionale Umgebungen für Zellexperimente zu erzeugen, die in ihrer Flexibilität einstellbar sind und mit deren Hilfe einzelne Zellen räumlich sehr genau positioniert werden können. Wir verwenden für diese Aufgabe das Direkte Laserschreiben. Mit dieser Methode lassen sich mittels Zwei-Photonen-Polymerisation aus Fotolacken, die ganz verschiedene Eigenschaften haben können, beliebige dreidimensionale Strukturen erstellen. Dieses Verfahren ist dazu geeignet, minimale Linienbreiten von 100 nm zu erzeugen und wird in der Photonik in großem Maße genutzt [10]. Die Herstellung der Zellgerüste wurde mit der Einführung eines kommerziellen Systems des Unternehmens Nanoscribe GmbH, einer Ausgründung der Arbeitsgruppe Wegener, noch einfacher und effektiver.

Die Technik des Direkten Laserschreibens vereint viele Vorteile gegenüber von Polymermatrizen [11]. Die dreidimensionalen Strukturen sind geometrisch sehr reproduzierbar. Die effektive Härte der Zellumgebungen kann über die verwendeten Materialien und, im Gegensatz zu elastischen Substraten, die Strukturgrößen variiert werden. Wir werden in unseren Experimenten beispielsweise zeigen, wie man Einzellelemente der Gerüste mit einer definierten mechanischen Steifigkeit erzeugen und vermessen kann [12]. Danach gehen wir noch einen Schritt weiter und funktionalisieren die Strukturen so, dass sich nur an bestimmten Punkten Proteine anlagern, die von der Zelle zur Anhaftung benötigt werden [13]. Damit ist es möglich, Zellversuche in noch definierteren Umgebungen, die die Situation *in vivo* realistisch nachbilden, durchzuführen.

Diese Arbeit gliedert sich wie folgt:

In Kapitel 2 wird ein kurzer Überblick über den generellen Aufbau einer tierischen Zelle gegeben. Es werden Grundkonzepte erklärt, wie Zellen äußere Reize in chemische Botenstoffe umwandeln, die dann zu ganz spezifischen Reaktionen führen. Die besondere Aufmerksamkeit gilt der mechanischen Kopplung der Zelle mit ihrer Umgebung. Es wird geklärt, wie das Zytoskelett der Zelle über Haftkontakte mit der Extrazellulären Matrix wechselwirkt. Eine Zelle erfühlt ihre Umgebung aktiv durch die Kontraktion ihres Zytoskeletts und reagiert auf die äußeren Signale, zum Beispiel mit einer gerichteten Migration.

Das 3. Kapitel zeigt auf, welche Arten von Testumgebungen für Zellexperimente bisher hergestellt wurden. Mikrostrukturierte zweidimensionale Substrate sind sehr einfach herzustellen und ein Standardwerkzeug in der Zellbiologie. Der technische Aufwand für dreidimensionale Zellumgebungen ist sehr viel höher und erfordert oft die Kooperation zwischen Forschungsgruppen verschiedener Fachrichtungen. Der Einfluss der Dimensionalität wird näher erläutert und die Vor- bzw. Nachteile einzelner Strukturierungskonzepte diskutiert. Die Erkenntnisse aus bisherigen Zellexperimenten werden danach kurz zusammengefasst.

Kapitel 4 erklärt das Direkte Laserschreiben, ein Verfahren mit dem eine dreidimensionale Strukturierung möglich ist. Außerdem wird auf die Eigenschaften der verwendeten Fotolacke eingegangen und wichtige Geräte, die zur Charakterisierung der Materialien dienen, vorgestellt. Dreidimensionale Zellgerüste bedeuten, dass dreidimensionale Aufnahme Konzepte (Konfokalmikroskopie) zu erklären sind. Die Qualität der Aufnahmen wird durch viele Faktoren wie die Färbung der Zellen und die nachträgliche Bildbearbeitung beeinflusst.

Kapitel 5 veranschaulicht die Vorexperimente, in denen die Fotolacke getestet und auf ihren späteren Einsatz für die dreidimensionale Strukturierung optimiert werden. Wir konzentrieren uns vor allem darauf, bestimmte Oberflächenbereiche für Zellen unzugänglich zu machen.

Kapitel 6. enthält die experimentellen Ergebnisse. Es werden zuerst harte dreidimensionale Zellgerüste erstellt, die auf bestimmte Fragestellungen optimiert sind und gute Eigenschaften für die Mikroskopie zeigen. In flexiblen Templaten, die von Zellen verformbar sind, können Zellkräfte vermessen werden. Für die volle Kontrolle der Zellen in drei Dimensionen geben wir in Kompositstrukturen die Haftmöglichkeiten vor und es wird erklärt, warum dies für zukünftige Experimente wichtig sein wird.

Im 7. Kapitel folgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit und ein Ausblick darauf, was mit unseren Ansätzen noch untersucht werden könnte. Weiterführende Überlegungen auf der Herstellungsseite sollen dazu führen, dass die Erstellung der dreidimensionalen Zellgerüste noch einfacher wird.



## 2. Die Zelle und ihre natürliche Umgebung

In diesem Kapitel gehen wir auf die grundlegenden Eigenschaften von lebenden Zellen ein. Wir werden wichtige Konzepte erläutern, die die Funktionsweise einzelliger Lebewesen betreffen. In mehrzelligen Organismen sind die Zellen in Gruppen unterteilt, die spezielle Funktionen ausüben. Die Kommunikation über kleine (unter Nachbarzellen) und große (zwischen Gehirn und Herz) Distanzen ist für das Überleben eines Organismus wichtig. Funktionseinheiten, die häufig in Geweben organisiert sind, bestehen nicht nur aus Zellen, sondern in großem Maße aus der sogenannten Extrazellulären Matrix (EZM), die von bestimmten Zelltypen auf- und umgebaut werden kann. Die Zusammensetzung der EZM hat ihrerseits einen großen Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Umgebung und damit auf die Funktion, das Verhalten und die Entwicklung einer in ihr lokalisierten Zelle.

### 2.1. Der Aufbau tierischer Zellen

Wenn man mit einem Mikroskop auf eine Säugetierzelle blickt, sind die Zellmembran und der Kern (daher auch der Name Eukaryote) als zwei große voneinander getrennte Bereiche erkennbar. Eine Zelle ist von einer Doppellipidmembran umgeben, die sie von der Außenwelt abgrenzt. Die Zellmembran ist für große und unpolare Moleküle undurchlässig. Transmembrane Kanäle und Pumpen können diese Moleküle aber aktiv in die Zelle hinein- oder hinausbefördern. Im auffallend großen Zellkern, ebenfalls ein von einer Membran umschlossener Bereich, befindet sich die genetische Information. Sie ist in höheren Zellen als ineinander verwundener Doppelstrang, der Diribonukleinsäure (engl.: DNA), kodiert. DNA ist in langen Ketten organisiert und sehr fragil. Sie wird im Zellkern vor den sehr dynamischen Prozessen, die in einer Zelle z.B. während der Migration ablaufen können, geschützt [14]. Die in kleine Reaktionsräume durch Membranen unterteilte Bereiche einer Zelle bezeichnet man als Kompartimente. In ihnen ist die Dichte von bestimmten Stoffen sehr viel höher als in den restlichen Bereichen der Zelle und die Umgebung ist an spezielle Prozesse angepasst, damit Reaktionen effektiv ablaufen können [15]. Die Kompartimente, die Proteine und die Flüssigkeit innerhalb der Zellmembran bilden das Zytosol einer Zelle. In Abbildung 2.1 ist eine typische Eukaryote schematisch abgebildet. Wir werden nun auf die Teile einer Zelle eingehen, die in unseren Experimenten näher untersucht werden.

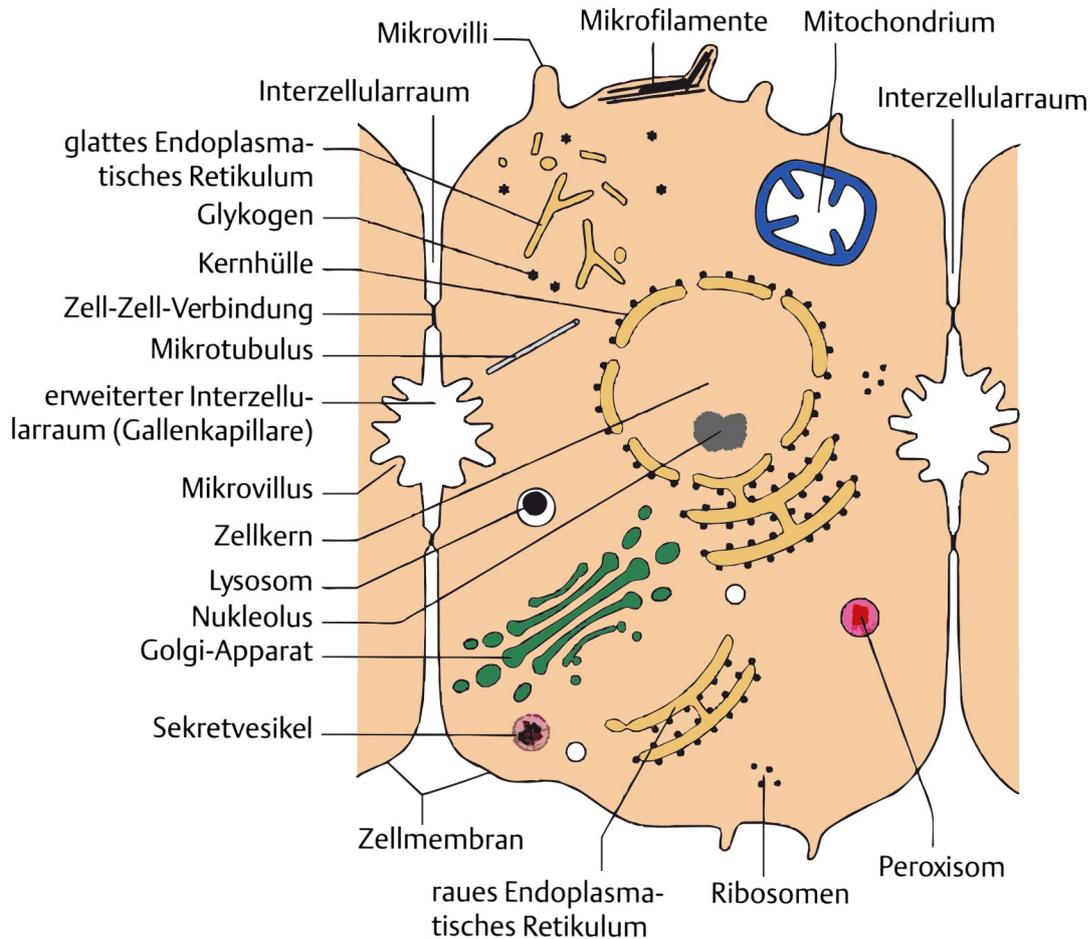


Abbildung 2.1: Eine Zelle besteht aus vielen Einzelementen, die alle eigenständige Aufgaben besitzen und sich gegenseitig beeinflussen [16].

Wie schon beschrieben, beherbergt der Zellkern die komplette genetische Information eines Lebewesens. In verschiedenen Zelltypen sind aber niemals alle Gene gleichzeitig aktiv oder werden benutzt, um Proteine zu erzeugen. Außerdem können Zellen auf externe Signale<sup>1</sup> und Veränderungen reagieren, indem sie Gene an- oder abschalten. Die sogenannten Transkriptionsfaktoren (Abb. 2.2 a) legen fest welche Gene ausgelesen und zu Proteinen weiterverarbeitet werden. Es folgt die Transkription der DNA und die Prozessierung zur mRNA (engl.: messenger ribonucleic acid), was noch innerhalb des Zellkerns geschieht. In diesem Prozess werden nichtkodierende Stücke der mRNA entfernt. Ribosomen verwandeln außerhalb des Zellkerns die kodierten Informationen in Proteine, was durch das chemische Aneinanderfügen von Aminosäuren geschieht.

<sup>1</sup>Etwa 10-15% der Proteine in Eukaryoten haben mit der Aussendung, Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Signalen zu tun.

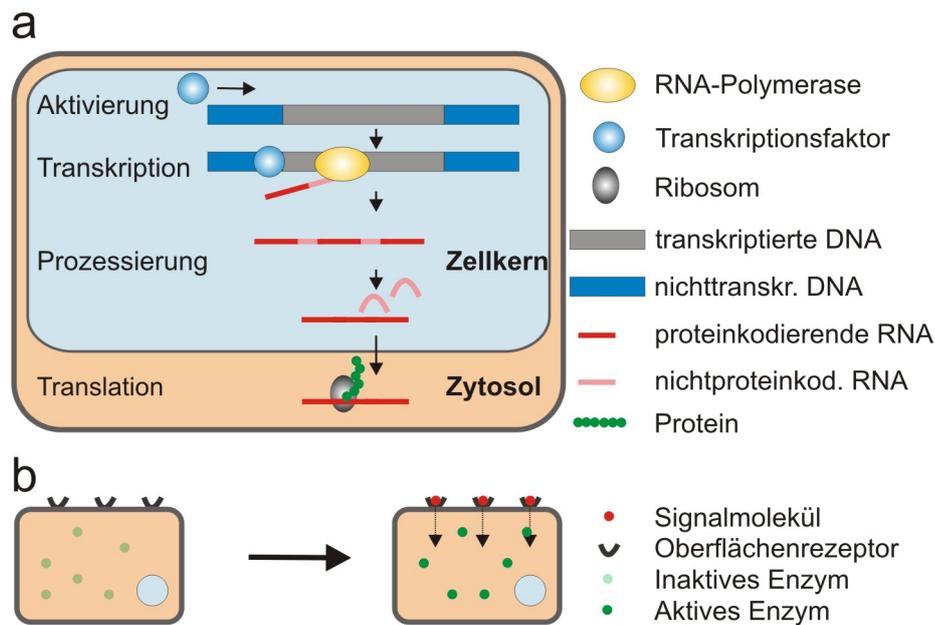


Abbildung 2.2: a) Ein Reiz von außen führt in einer eukaryotischen Zelle über Signalkaskaden zur Aktivierung von bestimmten Genen und die Zelle reagiert mit der Produktion benötigter Proteine. In b) beeinflussen äußere Stoffe die Aktivität von Rezeptorproteinen auf der Zellmembran. Diese schalten Enzyme innerhalb der Zelle frei, was eine schnelle Beeinflussung von Prozessen zur Folge haben kann [14].

Die korrekte Faltung in funktionelle Einheiten ist wichtig für die Funktionsweise der Proteine. Dieser Prozess wird von anderen spezialisierten Molekülen wie den Chaperonen unterstützt. Eine große Zahl an Ribosomen und Chaperonen sind auf dem Rauhen Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Dieses Kompartiment ist für die Synthese von Proteinen der Plasmamembran und die Herstellung von Proteinen, die in der Extrazellulären Matrix (EZM) vorkommen, verantwortlich. Das Glatte Endoplasmatische Retikulum stellt vor allem Fettsäuren und Phospholipide, aus denen die Zellmembran und die Kompartimente aufgebaut sind, her. Nachfolgend verpackt und modifiziert der Golgiapparat die zuvor synthetisierten Zellbestandteile und verschickt diese über das Zytoskelett der Zelle an ihren Bestimmungsort. Es sei darauf hingewiesen, dass das Endoplasmatische Retikulum und der Golgiapparat in polarisierten Zellen fast immer vom Kern aus in Richtung der Polarisierung zeigen. Hinsichtlich der Zellmigration ist diese Richtungsabhängigkeit sehr sinnvoll, weil am aktiven Vorderende der Großteil der Proteine gebraucht wird.

Es gibt in einer Zelle Proteine, die die chemische Energie aus der Nahrung speichern und sie durch Diffusion in der gesamten Zelle zugänglich machen, um die vielen molekularen Mechanismen der Zelle mit Energie zu versorgen. Der wichtigste Energieträger ist das ATP (Adenosintriphosphat), das in den Mitochondrien erzeugt oder

frisch aufgeladen wird. Die Mitochondrien können im Extremfall 25 Volumenprozent des Zytoplasmas ausmachen. ATP besteht aus der Aminosäure Adenosin und drei Phosphatgruppen (p). In den zwei Hauptphosphodiesterverbindungen stecken jeweils 7,3 kcal/mol an freier Energie. In den meisten Fällen wird nur eine der Verbindungen gebrochen und die Reaktion, in der Adenosintriphosphat mit Hilfe von Wasser in Adenosindiphosphat (ADP), einen anorganischen Phosphatrest (Pi), ein Wasserstoffion und Energie zerfällt (Gleichung 2.1), läuft ab. Reaktionen, die energetisch sehr unwahrscheinlich wären, können mit der Energie freisetzenden Hydrolyse von ATP somit ablaufen.



Die Zelle muss auf manche Situationen sehr dynamisch reagieren. Deshalb ist eine große Zahl von Proteinen in der Zelle schon vorhanden, wird aber an der Teilnahme an Reaktionen gehindert. Diesen Sachverhalt kann man besonders gut am Beispiel des Aktinzytoskeletts im nun folgenden Teil dieser Arbeit erkennen. Signale von außen führen dazu, dass in sehr kurzer Zeit eine große Menge von bestimmten Substanzen innerhalb einer Zelle freigesetzt werden (Abb. 2.2 b). Diese Steuerung kann sehr lokalisiert ablaufen, weil viele verschiedene Regelungsmechanismen untereinander konkurrieren. Die Zelle ist in der Lage, zur selben Zeit unterschiedliche funktionelle Einheiten an verschiedenen Orten zu erzeugen.

## 2.2. Das Zytoskelett der Zelle

Die Gestalt und die funktionelle Polarität einer Zelle wird von einem dreidimensionalen filamentösen Proteinnetzwerk sichergestellt. Dieses sogenannte Zytoskelett durchspannt die Zelle und ist über Linkerproteine mit der Zellmembran und den Organellen verbunden. Dieser Aufbau bietet eine Grundstruktur für die gesamte Zellorganisation. Das Zytoskelett ist kein festgelegtes Gebilde wie das Knochengestänge eines Menschen. Einerseits ist es sehr dynamisch, weil einzelne Komponenten in weniger als einer Minute umorganisierbar sind, andererseits kann es über mehrere Stunden stabilisiert werden. Diese variablen Eigenschaften haben zur Konsequenz, dass die Länge und Dynamik von Filamenten des Zellskeletts sehr unterschiedlich sein müssen. Die filamentösen Netzwerke bilden verschiedene Arten von Substrukturen aus (am Beispiel der Aktinfilamente in Abb. 2.3 gezeigt), die lokal von der Zelle regulierbar sind.

Das Zytoskelett besteht aus drei Hauptfilamentsystemen, die zeitlich und räumlich organisiert und beeinflussbar sind. Jedes Filamentsystem ist aus spezifischen Untereinheiten aufgebaut und besitzt unterschiedliche mechanische Eigenschaften.

**Intermediärfilamente** sind Gewebe spezifische Strukturen, die vor allem die strukturelle Integrität der Zellen mit ihrer Umgebung garantieren [17]. Eine wichtige Klasse der Intermediärfilamente stellen die Lamine dar. Sie bilden ein zweidimensionales Netzwerk, das die Innenwand des Zellkerns bedeckt und diese somit verstärkt. In einem unserer Experimente untersuchen wir den Einfluss auf das invasive Verhalten von Zellen mit unterschiedlichen Mengen einer Laminart im Zellkern. Das Fehlen von Lamin beeinflusst nicht nur die mechanische Eigenschaften des Kerns, sondern hat auch einen Effekt auf die Eigenschaften des Zytoskeletts im Zytoplasma. Die Zelle wird mechanisch weicher. Sie kann sich deshalb besser durch ein dichtes Gewebe bewegen [18]. Die Invasivität von Krebszellen (Migrationsgeschwindigkeit) hängt von der Zusammensetzung der Laminarten im Zellkern ab [19].

**Mikrotubuli** sind in langen Röhren organisiert, die aus dem Protein Tubulin aufgebaut und von sogenannten MAPs (engl.: microtubule-associated proteins) beeinflusst werden. Sie wachsen in einer Zelle nur von einem Punkt aus (MTOC (engl.: microtubule organisation center) [20]) und sind ohne die stabilisierende Wirkung der MAPs sehr labil [21]. Mikrotubuli breiten sich oft in der ganzen Zelle aus und transportieren durch die zugehörigen molekularen Motoren (Kinesin und Dynein) Zellbestandteile über längere Strecken an ihren Bestimmungsort. Auch für die Polarisierung einer Zelle während der Migration sind Mikrotubuli von entscheidender Bedeutung. Die GTPase Cdc42 (Unterkapitel 2.4) beeinflusst z.B. die assoziierten Motorproteine, die die Mikrotubuli ausrichten. Dadurch wird eine Richtung innerhalb der Zelle ausgezeichnet [22].

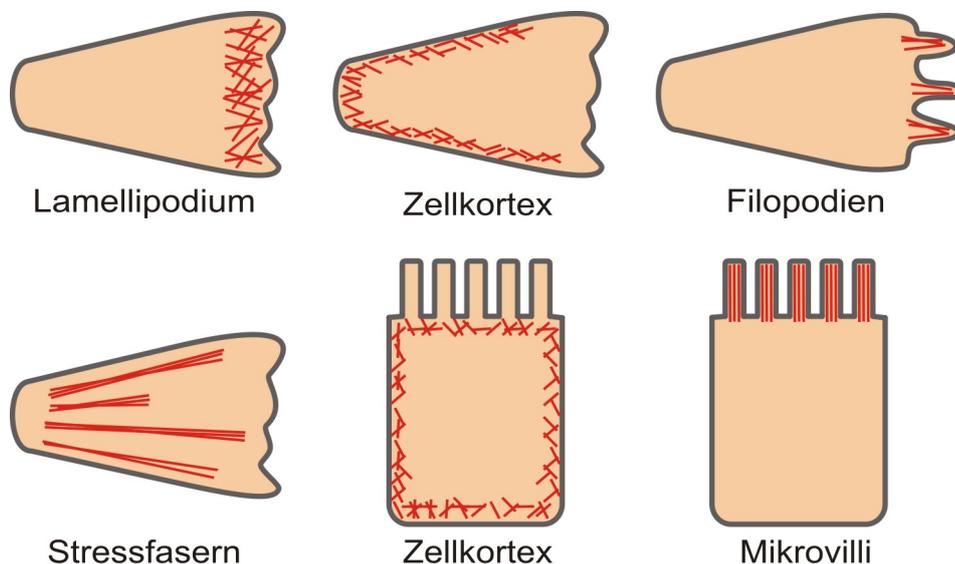


Abbildung 2.3: Mikrovilli spielen vor allem in polarisierten Epithelzellen eine Rolle. In migrierenden Zellen findet man eine Vielzahl von Ausprägungen der Aktinfilamente [14].

Die wichtigste Komponente für die Kraftentwicklung und die physikalische Wahrnehmung der Umgebung (engl.: mechanosensing) einer Zelle stellen die **Mikrofilamente** dar. Sie werden aufgrund ihrer monomeren Bestandteile auch Aktinfilamente genannt. Mikrofilamente können in sehr vielen Erscheinungsformen auftreten (Abb. 2.3), die alle unterschiedliche Aufgaben innerhalb einer Zelle übernehmen. Mikrovilli von Epithelzellen gewährleisten im Gewebeverbund beispielsweise eine größtmögliche Fläche für die Resorption von Molekülen. Mikrovilli sind lange fingerförmige Fortsätze der Zell-Oberfläche. In dieser Form sind die Aktinfilamente sehr stark geordnet und über lange Zeiträume stabil. Aktinstressfasern sind ähnlich wie Muskelfasern sehr geordnete Strukturen aus Aktin, Myosin und anderen Proteinen, die in der Lage sind große Kräfte zu entwickeln. Der ungeordnete Kortex, ein Aktinnetzwerk direkt unter der Zellmembran, stützt die Zelle im stationären Zustand. In migrierenden Zellen hat der Zellkortex einen wichtigen Beitrag zur Bewegung, worauf wir in Unterkapitel 2.6 genauer eingehen. In der migrierenden Phase sind vor allem das Lamellipodium (engl.: leading edge) bzw. die als Fühler wirkenden Filopodien im Frontbereich und die Aktinfasern, die über die Haftpunkte (Unterkapitel 2.4) mit der Extrazellulären Matrix (Unterkapitel 2.5) verbunden sind, stark ausgeprägt.

Eine Muskelzelle besteht aus bis zu zehn Gewichtsprozent des Proteins Aktin, aus dem die Mikrofilamente aufgebaut sind. In anderen Zelltypen beträgt der Aktinanteil etwa ein bis fünf Masseprozent. Die Konzentration von Aktinmonomeren im Zytosol von Fibroblasten und Epithelzelle beträgt zwischen 0,1 mM und 0,5 mM (Millimolar). Diese Zelltypen verwenden wir zum Großteil in unseren Experimenten. Eine Zelle kann die Wachstumsraten der Aktinfilamente im Lamellipodium erhöhen, indem sie die lokale Aktinkonzentration auf bis zu 5 mM steigert.

Aktin ist im Menschen in sechs Genen kodiert. Dieser Sachverhalt zeigt sich in vier Aktinisoformen in Muskelzellen und zwei Isoformen ( $\beta$ -Aktin und  $\gamma$ -Aktin) in anderen Zelltypen [14]. Jede Isoform unterscheidet sich genetisch nur in sehr geringem Maße (lokal können die Moleküle signifikant verschieden sein [23]) von den anderen. Die Funktionen sind aber klar getrennt [14].  $\alpha$ -Aktin befindet sich in kontraktile Strukturen von Muskelzellen, Stressfasern bestehen aus  $\gamma$ -Aktin und der Zellkortex sowie das Lamellipodium sind aus  $\beta$ -Aktineinheiten beschaffen.

Aktin existiert entweder als globuläres Monomer (G-Aktin) oder als filamentöses Polymer (F-Aktin), das aus G-Aktin Untereinheiten aufgebaut ist. F-Aktin kommt minimal in zweifach umschlungenen Ketten vor, deren Windungen sich alle 72 nm wiederholen. Eine Windung entspricht einer Anzahl von 14 Aktinmonomeren. Eine Windungsperiode hat eine Länge von 36 nm, da es sich um zwei umschlungene Aktinfäden handelt. Dieser Wert ist exakt auf die Schrittweite der Aktintransportproteine angepasst. F-Aktin besitzt eine strukturelle und funktionale Polarität. Alle Untereinheiten zeigen in einem Filament in die gleiche Richtung. Ein Ende wird bei der Anlagerung von Monomeren bevorzugt. Dieses Ende wird als Plus-Ende (engl.: barbed end) bezeichnet. Das Minus-Ende (engl.: pointed end) ist dadurch ausgezeichnet, dass die Bindungstasche für das ATP nicht durch die anderen Monomere geschützt, sondern

der umgebenden Flüssigkeit ausgesetzt ist. Das ist der Grund, weshalb das Minus-Ende im Normalfall schnell zerfallen kann.

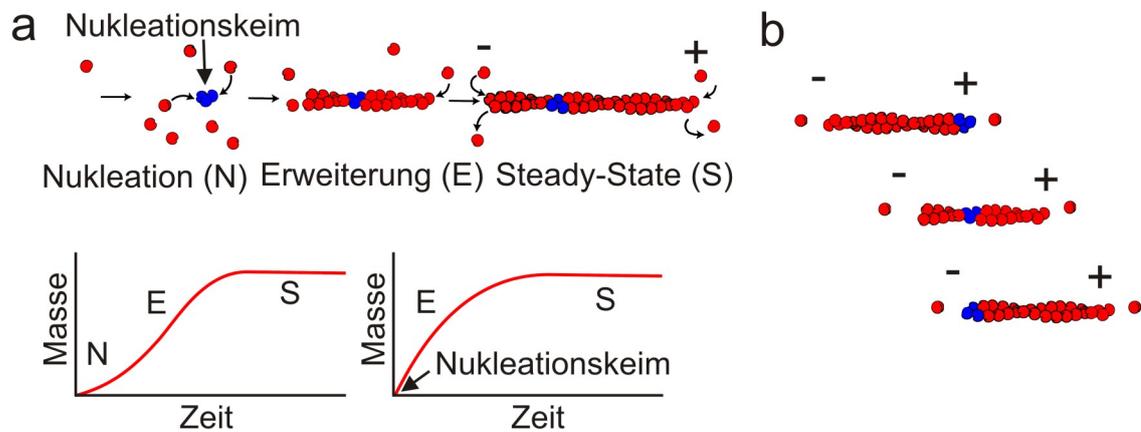


Abbildung 2.4: a) Die Vorlaufzeit bis sich ein Nukleationskeim gebildet hat bremst das Wachstum eines Aktinfilaments. Gibt man einen Nukleationskeim zu der *in vitro* Mischung startet die Polymerisation sofort. In b) wird das Treadmillingverhalten von Aktinfilamenten verdeutlicht. Am Minus-Ende wird Aktin vorwiegend abgebaut und am Plus-Ende aufgebaut. Das Filament wandert in Richtung des Plus-Endes [14].

Aktinfilamente können *in vitro* durch die Mischung von ATP, G-Aktin und geringen Mengen von Kaliumionen und Magnesiumionen zum Wachstum gebracht werden [24, 25]. Die Polymerisation findet in drei aufeinander folgenden Phasen statt (Abb. 2.4 a). G-Aktinuntereinheiten müssen sich in der Nukleationsphase zu stabilen Oligomeren vereinigen. Diese Wartezeit kann im Experiment durch die Zugabe von Oligomeren umgangen werden. Sobald sich drei Monomere verbunden haben, kann das Oligomer als stabiler Nukleationskeim fungieren, der in der zweiten Phase (Erweiterungsphase) an beiden Enden schnell wächst. Wenn die Konzentration von freiem G-Aktin unter eine kritische Schwelle fällt, stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein. Dieser Zeitabschnitt wird Steady-State-Phase genannt und zeichnet sich dadurch aus, dass die Gesamtmasse des Aktinstrangs sich nicht mehr ändert. Das Minus-Ende wird in diesem Stadium tendenziell abgebaut und das Plus-Ende kann weiterwachsen.

Die zuvor geschehenen Überlegungen werden auf der Grundlage gemacht, dass ein Aktinfilament aus gleichartigen Monomeren aufgebaut ist. In Experimenten zeigt sich, dass bei hohen G-Aktinkonzentrationen die Wachstumsraten des Plus-Endes etwa zwölfmal höher sind als die am Minus-Ende. Bei geringen Konzentrationen sind Verkürzungen an beiden Enden mit ungefähr der gleichen Rate zu beobachten [14, 26]. Es gibt einen mittleren Bereich, in dem das Plus-Ende wachsen kann und das Minus-Ende abgebaut wird. Dieses Verhalten spiegelt die unterschiedlichen Werte der kritischen Konzentrationen beider Filamentenden wider. Die ATP-G-Aktinmonomerkonzentration liegt im Steady-State zwischen diesen Punkten, was

sich im Wachstum des Plus-Endes und dem Verlust von Untereinheiten am Minus-Ende zeigt.

Dieses Verhalten ist unter dem Begriff Treadmilling bekannt. Es entsteht durch die Hydrolyse von ATP in einem Aktinfilament (Abb. 2.4 b). Wenn ATP-G-Aktin an das Plus-Ende eines Filaments bindet, hydrolysiert ATP nach kurzer Zeit zu ADP und einem Phosphatrest (Pi) [27, 28]. Der Phosphatrest wandert langsam von den Untereinheiten ab. Das Filament ist nun asymmetrisch aufgebaut mit ATP-Aktin am Plus-Ende, gefolgt von einer Region mit ADP-Pi-Aktin und ADP-Aktin Untereinheiten am Minus-Ende (Abb. 2.5). In den drei Phasen ändert sich die Konformation der Aktinmoleküle. Diese Tatsache erklärt die unterschiedlichen Auf- bzw. Abbauraten der beiden Enden. Die Hydrolyse von ATP setzt Energie frei. Aktinfilamente können *in vivo* somit Arbeit verrichten, indem sie polymerisieren.

Die Treadmilling-Geschwindigkeit *in vivo* kann eine mehrfach höhere Rate als die gemessenen Werte von Experimenten *in vitro*, die unter physiologisch richtigen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigen [14]. Aktinfilamente wachsen in einer Zelle grundsätzlich nur am Plus-Ende. Die hohe Geschwindigkeit der Aktinpolymerisation und den Austausch von ADP zu ATP des G-Aktin beschleunigen vor allem zwei aktinbindende Proteine (Abb. 2.5) [29].

Profilin bindet G-Aktin an der gegenüberliegenden Seite der Bindungstasche für Nucleotide. Die resultierende Konformationsänderung des Aktinmoleküls beschleunigt die Abgabe des ADP. ATP hat eine viel größere Bindungsaffinität als ADP und nimmt dessen Platz ein. Der Profilin-ATP-Aktinkomplex kann gleichzeitig nicht an das Minus-Ende der Aktinfilamente binden, weil Profilin die Bindestelle bedeckt. Die Bindung an das Plus-Ende ist jedoch möglich und Profilin dissoziiert ab. Die Konsequenz ist, dass so gut wie das gesamte G-Aktin in einer Zelle mit ATP gebunden vorliegt. Profilin hat für den Aufbau neuer Filamente in Zusammenarbeit mit den Forminen eine weitere wichtige Funktion, auf die wir später noch eingehen werden.

Cofilin bindet spezifisch an F-Aktin, das aus Untereinheiten aus ADP-Aktin besteht. Cofilin bindet zwischen zwei Aktinmonomeren und bewirkt eine kleine Veränderung in der Biegung eines Filaments. Das Filament wird destabilisiert und bricht auseinander. Es entstehen immer mehr Bruchstücke mit freien Minus-Enden. Der Abbau von F-Aktin wird dadurch stark beschleunigt. Die freien ADP-Aktinfragmente werden durch Profilin mit ATP aufgeladen und können wieder schnell am Treadmilling-Prozess teilnehmen. Außerdem unterbindet Cofilin ab einer kritischen Konzentration die Entstehung neuer Aktinfilamente, indem es den Arp2/3-Komplex beeinflusst [30].

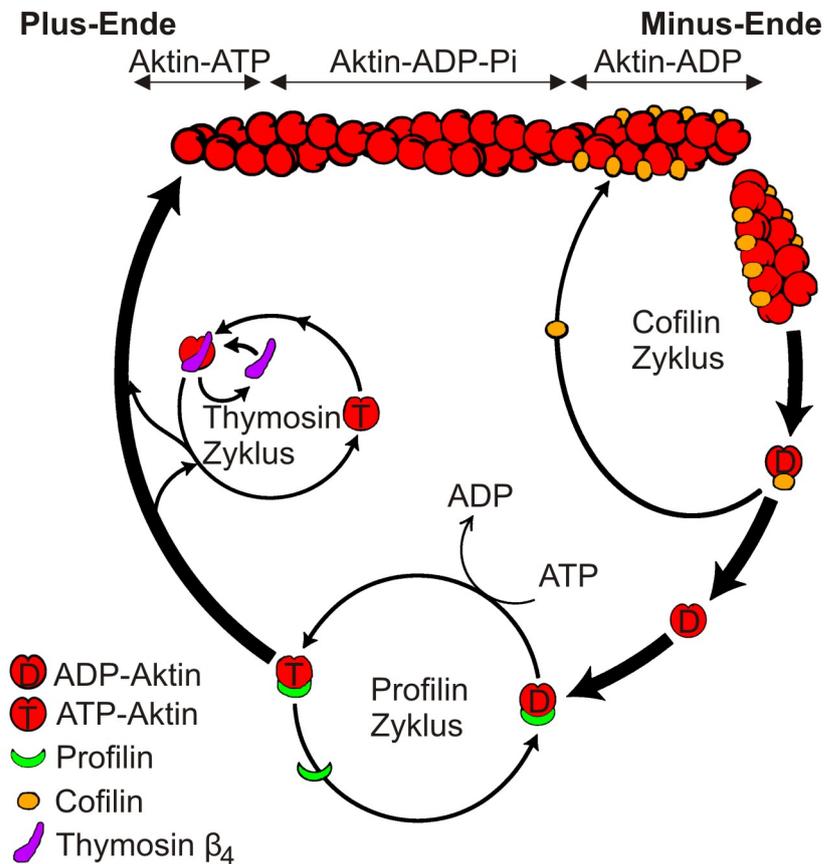


Abbildung 2.5: Die Dynamik von filamentösem Aktin wird durch Proteine wie Cofilin (baut Aktin-ADP ab), Profilin (beschleunigt den Austausch von ADP zu ATP von Aktinmonomeren) und Thymosin (bindet Aktinmonomere) gesteuert. Im oberen Bildausschnitt kann man die Bestandteile des F-Aktin in verschiedenen Phasen erkennen. Das Plus-Ende und das Minus-Ende werden voneinander unterscheidbar [14].

*In vitro* liegt die kritische Konzentration für den Beginn der Polymerisation normalerweise unter einem Mikrometer. In Zellen können aber Aktinlevel von 100–400  $\mu\text{M}$  auftreten. Es gibt Moleküle, die den Einbau von ATP-G-Aktin verhindern indem sie daran binden. Die ungehinderte Polymerisation von Aktin innerhalb einer Zelle wird unterbunden. Zu diesen Molekülen gehört Thymosin- $\beta_4$ , das sich in einem dynamischen Gleichgewicht zu freiem G-Aktin befindet (Abb. 2.5). Wenn freies Aktin für die Polymerisation verbraucht wird dissoziiert das Thymosin- $\beta_4$  lokal ab und stellt somit freies Aktin für ein weiteres Wachstum zur Verfügung. Thymosin- $\beta_4$  wirkt wie ein Puffer. Es sind zu jeder Zeit unpolymersierte Aktinmonomere vorhanden, weshalb eine Zelle sehr dynamisch reagieren kann.

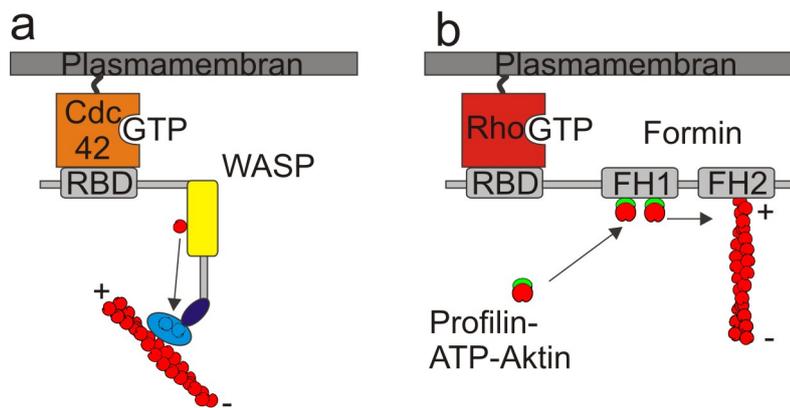


Abbildung 2.6: Die Regulierung von Aktinnukleationsorten wird in a) durch die Aktivierung von Cdc42 und WASP gesteuert. Der Arp2/3-Komplex wird aktiviert. Dies führt zur Entwicklung von verzweigten Netzwerken. In b) werden nach der Aktivierung durch Rho von Formin gerade Aktinfilamente gebildet [14].

Reguliert wird der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten von Schutzmolekülen, die spezifisch an ein Ende binden [31]. Andernfalls würden Filamente unkontrolliert wachsen oder abgebaut werden. Das Molekül CapZ blockiert das Plus-Ende von Mikrofilamenten. Dies führt zu einer Begrenzung der Filamentlänge [32]. Schutzmoleküle wie Tropomodulin blockieren das Minus-Ende von F-Aktin und stabilisieren es dadurch.

In Zellexperimenten werden oft Gifte verwendet, die eine ähnliche Wirkung wie die Schutzmoleküle haben. Phalloidin stabilisiert Aktinfilamente und hindert die Zelle am Abbau von F-Aktin. Cytochalasin blockiert, wie das CapZ Molekül, die Plus-Enden und verhindert das Wachstum von F-Aktin. Latrunculin bindet irreversibel an G-Aktin, was die Polymerisation wirksam verhindert. Mit diesen Mitteln der Molekularbiologie kann man gezielt einzelne Komponenten der Zelle beeinflussen und die Auswirkungen auf ihr Verhalten studieren.

Aktin polymerisiert *in vitro* mit einer Zeitverzögerung, weil sich erst stabile Nukleationszentren bilden müssen. Zellen nutzen diese Eigenschaft aus, um die Anfangspunkte der Aktinpolymerisation zu bestimmen und ungewolltes Wachstum zu ver-

hindern. Zwei Klassen von Aktinnukleationsproteinen (Moleküle der Forminfamilie und der Arp2/3-Komplex) bestimmen, unter der Kontrolle von Signaltransduktionswegen, wo und in welcher Ausprägung Aktinfilamente wachsen können. Die Filamine unterstützen den Aufbau von langen geraden Aktinfilamenten. Der Arp2/3-Komplex ist für die verzweigten Netzwerke verantwortlich (Abb. 2.6).

Formine besitzen eine Rho-Bindedomäne (RBD) und haben eine FH1- und FH2-Domäne (Formin Homologe Domäne 1 und 2) gemeinsam. Das Forminmolekül ist in seinem inaktiven Zustand frei im Zytoplasma der Zelle vorhanden. Sobald es von Membran gebundenem Rho-GTP (genauer wird in den Unterkapiteln 2.4 und 2.7 erklärt) aktiviert wird, können zwei FH2-Domänen einen Nukleationskeim bilden und langkettige Aktinfilamente erstellen (Abb. 2.6 b). Die Aktinmonomere werden am Plus-Ende eingebaut und das Minus-Ende wächst aus. Die FH1-Domäne beschleunigt diesen Prozess, indem sie Profilin-ATP-Aktin binden kann. Die lokale Aktinkonzentration der Monomere wird auf diese Weise erhöht. Formin verhindert gleichzeitig die Anbindung des Schutzmoleküls CapZ, um das Wachstum der Mikrofilamente nicht zu stoppen.

Der Arp2/3-Komplex (enthält zwei engl.: (a)ctin-(r)elated (p)roteins) ist für sich genommen ein schlechter Nukleationskeim. Die Aktivierung erfordert ein bereits bestehendes Aktinfilament und das Molekül WASP (Abb. 2.6 a) [33, 34]. Arp2/3 ändert seine Konformation, wenn es an F-Aktin im Beisein eines Aktivators (WASP) bindet. Die Proteine Arp2 und Arp3 ähneln nun dem Plus-Ende eines Aktinfilaments. Das Plus-Ende kann so lange auswachsen bis es von einem CapZ Protein gestoppt wird. Der Winkel zwischen dem alten und dem neuen Filament im Lamellipodium einer Zelle beträgt dann etwa  $70^\circ$  [35]. Kürzlich wurde allerdings aufgrund von cryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen vorgeschlagen, dass im Lamellipodium einer migrierenden Zelle diese  $70^\circ$ -Verzweigungen viel seltener vorkommen, als man anhand früherer elektronenmikroskopischer Studien angenommen hatte [36].

Die Struktur des Zytoskeletts in einer lebenden Zelle kann einen Hinweis über ihren Zustand geben. Bakterien [37] und Viren [38] können das Aktinzytoskelett durch Moleküle ihrer Hülle so beeinflussen, dass sie die Aktinpolymerisation zu ihrem eigenen Transport innerhalb der Zelle ausnutzen [39]. Viren hilft das Aktin sogar bei dem Zusammenbau ihrer Hülle [40]. Deshalb versucht man mittels der Beobachtung der Aktinverteilung und -richtung [41], die Auswirkung von Krankheitserregern auf das Zytoskelett zu studieren und zu verstehen. Mit einem optischen Stretcher können die viskoelastischen Eigenschaften, die eine Veränderung des Zytoskeletts mit sich bringt, direkt an der lebenden Zelle gemessen werden [4]. Krebszellen besitzen die Tendenz, weicher zu sein als ihre Ursprungszellen. Das passt gut zu ihrer erhöhten Mobilität in Geweben. Erkenntnisse, die aus einer veränderter Zellflexibilität abgeleitet werden können, und weitere Methoden Zellen mechanisch zu vermessen, werden in [42] diskutiert.

Im Reagenzglas polymerisieren Aktinfilamente zu relativ ungeordneten Netzwerken. Eine Zelle besitzt aber eine große Anzahl von geordneten Strukturen. Die Ordnung der Aktinfasern wird durch Proteine erreicht, die das Aktin in verschiedener Art und Weise vernetzen können. Fimbrin organisiert Aktinstrukturen wie die Mikrovilli, die alle die gleiche Polarität besitzen und bei denen die einzelnen Filamente eng beieinander liegen.  $\alpha$ -Aktinin hält die Aktinfilamente parallel zueinander. Es ist in Stressfasern und in den noch geordneteren Muskelfasern verbaut.  $\alpha$ -Aktinin erzeugt große Spaltbreiten zwischen den Filamenten, damit sich Motorproteine anlagern und die Aktinfasern gegeneinander verschoben werden können. Spekttrin überspannt große Bereiche und ist für die Netzwerkbildung des Zellkortex verantwortlich. Ein weiteres quer vernetzendes Protein ist das Filamin, das sehr flexibel ist und die Netzwerke in Lamellipodien stabilisiert.

### 2.3. Krafterzeugung durch Myosinmotoren

Aktinpolymerisation kann Kräfte entwickeln und damit zum Beispiel die Zellmembran verschieben. Die Zelle hat noch einen zweiten Mechanismus, der auf Bewegung ausgelegt ist. Wir gehen in diesem Abschnitt darauf ein. Myosine sind molekulare Motorproteine, die Energie der ATP-Hydrolyse in mechanische Arbeit umwandeln und so an den Aktinfilamenten entlang wandern können [43]. Im Menschen sind vor allem die drei Klassen Myosin I, II und V von großer Bedeutung. Jeder Typ für hat ganz spezielle Aufgaben in einer Zelle. Die verbreitetsten Myosine bewegen sich alle in Richtung des Plus-Endes eines Aktinfilaments. Die Ausnahme stellt Myosin VI dar [44].

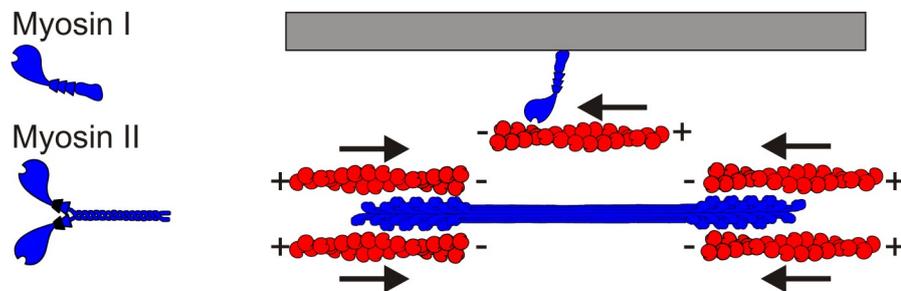


Abbildung 2.7: Myosin I besitzt einen Kopf und der Schwanz ist Membran gebunden. Myosin II besitzt zwei Köpfe und ist bündelweise organisiert. Die Myosinköpfe dieser Klassen wandern immer in Richtung des Plus-Endes der Aktinfilamente. Die Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung der Aktinfilamente an [14].

Die Myosin II Klasse assembliert einzelne Myosine in bipolare Filamente um. Die kontraktile Funktionen in einer Zelle gehen hauptsächlich auf die Myosin II Motoren in Verbindung mit den Aktinfilamenten zurück (Abb. 2.7). Die Myosin I Klasse ist Membran gebunden und vor allem bei der Erzeugung der Kortextspannung beteiligt.

Die Myosin V Klasse kann an Vesikel koppeln und diese an den Aktinfilamenten entlang transportieren.

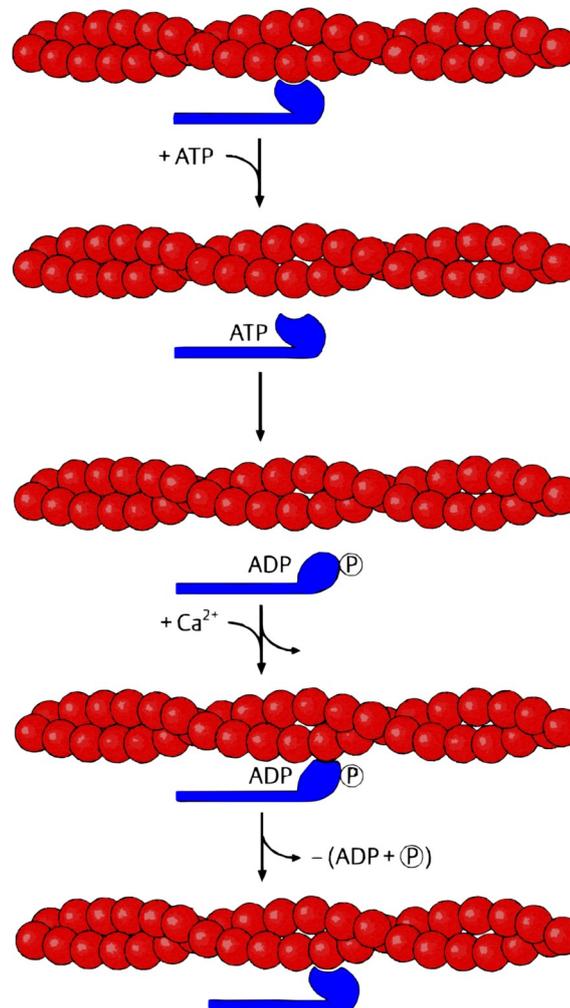


Abbildung 2.8: Die schematische Darstellung der Funktionsweise von Myosinmotoren [14].

Die Mechanismen der Kraftentwicklung sind bei allen Myosinen gleich. Wenn ein Myosinkopf kein ATP enthält, ist er sehr stark an einem Aktinfilament gebunden (Abb. 2.8). Sobald ATP bindet kann sich der Myosinkopf von Aktin lösen. Im Myosinkopf hydrolysiert ATP zu ADP und einem Phosphatrest Pi. Mit dieser Energie dreht sich der Myosinkopf im Bezug auf den Hals. Wenn der Kopf nun in Kontakt mit einem anderen Teil in Richtung des Plus-Endes eines Aktinfilaments kommt, löst sich der Phosphatrest ab und der Myosinkopf dreht sich in die ursprüngliche Position zurück. Der Myosinkopf ist nun so lange gebunden bis sich das ADP löst und ein frisches ATP Molekül mit der Bindetasche am Myosinkopf reagiert.

Die Arbeitsweise innerhalb der Myosinfamilie unterscheidet sich vor allem in der relativen Kontaktzeit des Myosinkopfes und der Schrittlänge. Ein Myosin II Molekül hat ungefähr eine Schrittlänge von 11 nm und kann eine Kraft von bis zu 6 pN erzeugen [45–47]. Die relative Kontaktdauer (das ist die Zeit, in der das Molekül an einem Aktinfilament durchschnittlich gebunden ist) beträgt nur 10 Prozent. Das ist der Grund, weshalb die Myosin II Motoren in großen Einheiten organisiert sind. Es müssen immer genügend Myosinköpfe in Kontakt mit den Filamenten sein, um ein Abrutschen zu vermeiden.

Myosin V ist hauptsächlich beim Transport von Molekülen entlang der Aktinfilamente beteiligt. Ein Myosin V Motor (mit zwei Köpfen) bewegt eine Ladung in 36 nm Schritten, was genau der Wiederholungslänge der Aktinfilamente entspricht. Die Dynamik hängt stark vom Widerstand ab, den die Motoren überwinden müssen [48]. Dieses Molekül ist, so lange es nicht durch zu große Kräfte abgerissen wird, ständig mit einem der beiden Köpfe mit dem Aktin verbunden. Deshalb wird Myosin V auch als prozessives Motorprotein bezeichnet [49]. Andere Elemente des Zytoskeletts haben ähnliche Transportmotoren [50]. Myosin V Motoren bewegen sich mit der HandoverHand-Methode fort. Ein Kopf wird über den anderen in 72 nm Schritten verrückt. Die Ladung bewegt sich pro Zyklus genau über die Hälfte dieser Distanz fort [51].

## 2.4. Kontakte zur Außenwelt

Man unterscheidet zwischen Zell-Matrix-Kontakten und Zell-Zell-Kontakten. In unseren Arbeiten wird es vor allem um die Funktion der umgebenden Matrix auf eine Zelle gehen (Einzelzelleexperimente), weshalb wir die Interaktion zwischen den Zellen vernachlässigen und hier nicht weiter erläutern werden.

Als Haftpunkte im Jahr 1971 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen migrierender Zellen entdeckt wurden sprach man von Plaque, der am Untergrund anhaftet und wahrscheinlich mit dem fibrillären System in der Zelle verbunden ist [52]. Mit der Entwicklung besserer Techniken der Molekularbiologie und der Mikroskopie kann heutzutage der räumliche Aufbau dieser wenigen Mikrometer großen Strukturen gezeigt werden.

Die Schlüsselrolle innerhalb der Haftpunkte spielen die Integrinrezeptoren. Sie verbinden durch die Zellmembran hindurch die Extrazelluläre Matrix über Adapterproteine mit dem Zytoskelett der Zelle. Diese Verbindungen sind nicht starr. Man muss sich Haftpunkte wie eine sehr viskose Flüssigkeit vorstellen. Wenn die Aktinfasern unter Spannung stehen rutschen sie nach und nach über die Haftpunkte. Ähnliches passiert auch mit den Proteinen, aus denen die Haftpunkte aufgebaut sind. Die Fließgeschwindigkeit nimmt umso mehr zu, je weiter die Proteine räumlich von den Integrinen entfernt sind [53]. Mit Hilfe von iPALM (engl.: interferometric photoactivated localization

microscopy) [2] kann man eine sehr kleine Auflösung in lateraler (20 nm) und axialer (15 nm) Richtung erreichen [54] und den Aufbau von Fokalkontakten direkt auflösen.

Die laterale Position ist wie bei anderen Mikroskopiemethoden, die einzelne kleine Emittter verwenden, durch den Mittelpunkt des gaußverteilten Detektionsspektrums gegeben. Zur Bestimmung der axialen Position einer Leuchtquelle in einer biologischen Probe wird die Selbstinterferenz eines Photons ausgenutzt. Das Photon wird über zwei Signalwege in einen Drei-Wege-Strahlteiler geführt und die beiden Strahlen werden so zur Interferenz gebracht, dass die drei Detektoren Amplituden aufzeichnen, die 120° außer Phase sind. Je nachdem in welcher Höhe über dem Glasplättchen das Fluorophor der markierten Proteine abstrahlt, nehmen die Detektoren verschiedene Amplituden wahr. Nur mit dieser optischen Technik kann im Moment eine gute Auflösung (Aufbau von Zellbestandteilen) und gleichzeitig die Bestimmung der Proteinart (fluoreszierende Label an spezifischen Proteinen) auf einmal erreicht werden.

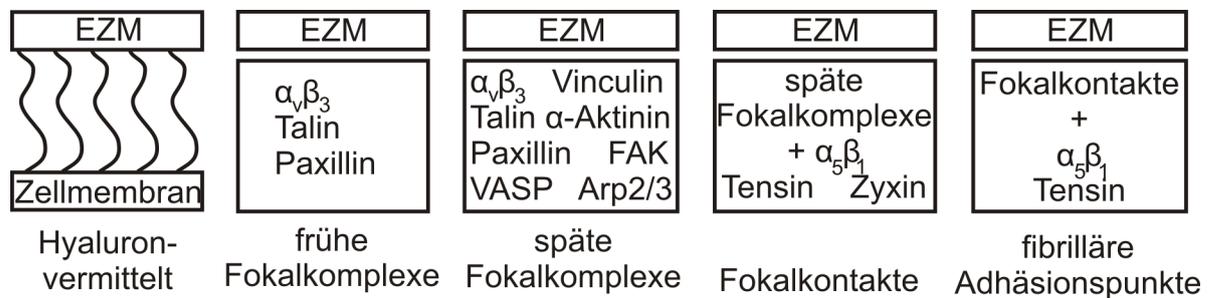


Abbildung 2.9: Der erste Kontakt wird zwischen der Zuckerhülle auf der Zellmembran und der EZM vermittelt. In einer frühen Phase der Kontaktbildung wird Paxillin in Fokalkomplexe eingebaut, weshalb dieses Protein ein guter Marker für die Erkennung von Zell-Matrix-Kontakten ist. Mit zunehmendem Alter der Kontakte werden weitere Proteine eingebaut, die stabilisierend wirken. In den fibrillären Adhäsionspunkten findet eine Umorganisation statt. Viele Proteine in dieser Abbildung werden wir in unseren Experimenten immunohistochemisch färben und als Marker für Zellkontakte verwenden [55].

Zellen bilden Haftstrukturen zu ihrer Umgebung in verschiedenen Größen über ihre gesamte Lebenszeit [56]. Genauere Untersuchungen zeigen, dass sich die Haftpunkte in unterschiedliche Gruppen zusammenfassen lassen, wenn man ihre Größe, Proteinzusammensetzung und die Lebensdauer berücksichtigt [55, 57–59]. **Fokalkomplexe** sind kleine, häufig hinter der Vorderkante in Bewegungsrichtung sitzende, Haftstrukturen (Abb. 2.9). Sie werden innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten auf- oder abgebaut und dienen zur Abtastung der lokalen EZM. **Fokale Haftpunkte** werden gebildet, wenn die Zelle Zugkräfte auf die EZM ausübt oder Kräfte von außen dies nötig machen. Sie überdauern Zeiten in der Größenordnung von 10 Minuten und enthalten Proteine, die eine erhöhte Stabilität gewährleisten. **Fibrilläre Haftpunkte** sind entlang von Aktin-Stressfasern lokalisiert und noch stabiler. Sie enthalten große Mengen an den Proteinen Tensin und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin [60].

Die Transmembranproteine der Integrinfamilie spielen für die Bildung und Stabilität der Haftstrukturen aller Art eine entscheidende Rolle. Nachdem ein Integrin mit Fibronektin (einem Protein der Extrazellulären Matrix) in Kontakt tritt durchläuft es eine Konformationsänderung in den aktiven Zustand und das Protein Talin bindet an der zytoplasmatischen Seite an die frei liegende  $\beta$ -Kette des Integrins [61]. Die Integrine beginnen nun zu clustern, um eine Plattform für Signal- und Adapterproteine zu bilden. Nicht alle Proteine in Haftpunkten können direkt mit den Integrinen interagieren. Proteine wie Talin, Paxillin und Filamin dienen hier als Verbindungsglied zwischen den Integrinen und weiteren Proteinfamilien.

Ein wichtiges Beispiel für die hierarchische Ordnung in Haftpunkten ist der Einbau von Vinculin, das an Talin bindet. In einer aktuellen Arbeit der Gruppe um Michael Sheetz wird *in vitro* mit Hilfe einer magnetischen Pinzette gezeigt, dass die Konformationsänderung, die Talin allein durch eine äußere Kraft erfährt, die Bindungsstelle für Vinculin aktivieren kann [3]. Vinculin führt zur Einbindung des Aktinquervernetzers  $\alpha$ -Aktinin, der dann an Paxillin bindet. Paxillin kann nun seinerseits das Protein FAK binden und bewirkt damit die Autophosphorylierung des FAK Proteins. Nun können Proteine der Src Proteinfamilie an FAK binden. Dies führt zur Öffnung weiterer Phosphorylierungsstellen von FAK und zu einer Signalkaskade [62]. Daraus resultiert eine Verstärkung der lokalen Signalwege einschließlich der Rho Proteinfamilie, was sich vor allem in der dynamischen Veränderung des Zytoskeletts zeigt [63]. In der Arbeit von Colombelli und Mitarbeitern wird gezeigt, dass die Regulation, die Aktivierung und der Einbau von Adhäsionsproteinen von Kräften, die durch Aktin-Stressfasern übertragen werden, abhängen kann [64]. Kräfte, die auf die Haftpunkte wirken, haben Einfluss darauf in welche Richtung ein Haftpunkt wächst oder schrumpft. Liegt kein Stimulus (Kraft von außen oder von der Zelle selbst generiert) an wird der Haftpunkt kleiner oder sogar abgebaut [65]. Außerdem ist für die Ausbildung von starken Kontakten eine Mindestkonzentration von Integrinbindepartnern in der Extrazellulären Matrix eine Voraussetzung [66].

## 2.5. Die Extrazelluläre Matrix

Der Kontakt von Zellen zueinander und zu ihrer Umgebung ist sehr wichtig. Da es in dieser Arbeit vorwiegend um Einzelzelleexperimente gehen wird, also keine Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden, konzentrieren wir uns auf die Verbindung der Zelle zu ihrer Extrazellulären Matrix (EZM). In tierischen Organismen hilft die EZM den Zellen sich zu organisieren. Sie kann über äußere Signale die Funktionen von Zellen durch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die das Zellwachstum, die Proliferation und die Expression von Genen beeinflussen, steuern [67]. Die Zusammensetzung der EZM hängt stark von der Region im Organismus und von ihrem Alter ab [68]. Auch Tumorzellen können die EZM nach ihren Bedürfnissen umbauen und so ihre Nachbarzellen beeinflussen [69, 70].

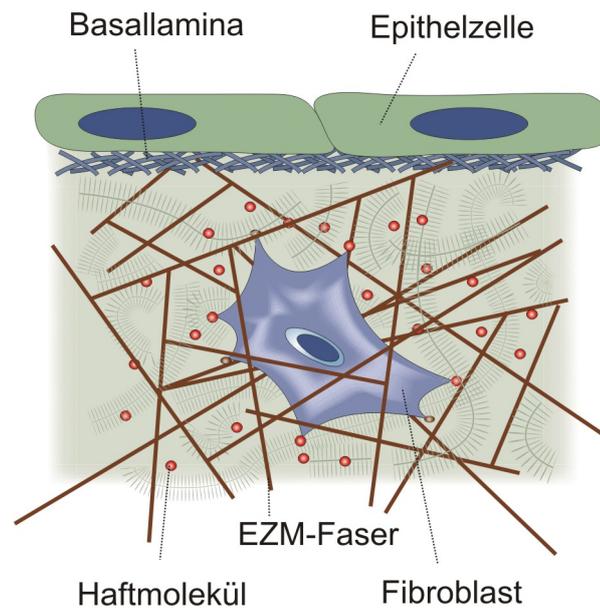


Abbildung 2.10: Eine typische *in vivo* Situation. Epithelzellen sitzen auf einer zweidimensionalen Basallamina. Bindegewebszellen sind in einem Netzwerk aus fibrillären EZM Molekülen lokalisiert [71].

Die drei Hauptklassen der EZM Moleküle bilden die Proteoglykane, Kollagene und Multiadhäsionsproteine. Sie alle können Netzwerke zwischen gleichartigen Proteinen und mit anderen Komponenten der EZM bilden. Gleichzeitig vermitteln sie den Kontakt der Zelle zu ihrer Umgebung. Signale der Umgebung und von Nachbarzellen bewirken, dass Zellen am Ort ihrer Bestimmung bleiben [72]. Die EZM füllt in Tiergeweben die Räume zwischen den Zellen aus. In manchen Regionen sind die Zellen dicht gepackt und die Zwischenräume klein. Dies ist vor allem bei Epi- und Endothelzellen der Fall, die z.B. die Blutgefäße oder die Haut aufbauen und einzelne Körpersegmente voneinander trennen. Diese Zelltypen sitzen häufig auf einer Basallamina (Abb. 2.10). Diese Art der EZM ist eine dichte quasi-zweidimensionale Schicht, die vor allem aus Kollagen vom Typ IV besteht. Die Basallamina wird durch die Anlagerung von quervernetzenden Proteinen wie Laminin sehr biegsam und reißfest. Außerdem enthält sie Haftproteine, mit denen sich die Zellen auf ihr verbinden können. Die Basallamina muss Scherkräften der Haut oder dem Druckunterschied, der in Blutgefäßen herrscht, standhalten und gleichzeitig passierbar für Immunzellen sein.

Die Situation im Bindegewebe ist eine andere. Hier ist vor allem Kollagen vom Typ I vorhanden. Es bildet lange Fasern, die nur leicht vernetzte Strukturen bilden. Die Zellen sind im Bindegewebe relativ weit voneinander entfernt und bilden nicht zwingenderweise Zell-Zell-Kontakte. Bindegewebe können entsprechend ihrer Komposition eine große Spanne physikalischer Eigenschaften abdecken. Man kann diese Tatsache besonders gut am Unterschied des Härtegrades zwischen Knochen und Gehirn erken-

nen. Die Flexibilität der Umgebung können Zellen wahrnehmen [73] und wissen somit wo sie sind.

Wichtige Proteine in der EZM sind die Multihaftproteine wie Fibronectin. Sie bilden untereinander lange Ketten. Multihaftproteine haben aber auch Bindungsbereiche für eine große Zahl von Komponenten der EZM und der Zellmembran. Eine wichtige Eigenschaft ist die Verbindung der EZM zu den Integrinen. Fibronectin kann über die Tripeptidsequenz RGD mit den Integrinen wechselwirken und spielt eine wichtige Rolle für migrierende und proliferierende Zellen. In unseren Experimenten werden Fibronectin und andere Multihaftproteine als Haftvermittler verwendet. Die Proteine kann man in verdünnter Form auf die meisten Oberflächen aufbringen und so den Kontakt zwischen einer Zelle mit einer künstlichen Struktur herstellen.

## 2.6. Zellmigration

Zellen aus tierischen Geweben bewegen sich in Migrationsmodellen in einer ganz bestimmten Art und Weise. Zellen, die man auf ein Substrat gibt, flachen zuerst einmal ab und kommen in Kontakt mit ihrer Umgebung. Die Zellmigration entsteht aus der Koordination zwischen Kräften, die in verschiedenen Zellteilen erzeugt werden. Besonders die unterschiedlichen Erscheinungsformen des Aktinzytoskeletts (Unterkapitel 2.2), die über die Haftkontakte der Zelle (Unterkapitel 2.4) mit der EZM (Unterkapitel 2.5) verbunden sind, und die Myosinmotoren (Unterkapitel 2.3) sind wichtig in diesem Prozess.

Das Verständnis der intrazellulären Vorgänge während der Zellmigration ist von großer Bedeutung in vielen Bereichen der Biologie und Medizin. In der Entwicklung von der Eizelle bis zum ausgewachsenen Menschen müssen sich Zellen mit bestimmten Aufgaben entlang vorgegebener Pfade bewegen. Fibroblasten migrieren während der Wundheilung und weiße Blutkörperchen wandern ein Leben lang z.B. in Infektionsherde ein. Fehlgeleitete Zellmigration kann man an aggressiven Krebszellen beobachten, die Metastasen bilden.

Die Zellmigration wird durch die Bildung eines großen breiten Membranfortsatzes an der Vorderseite<sup>2</sup> eingeleitet. In dieser Region bilden sich die Lamellipodien. Durch das schnelle Wachstum von Aktinnetzwerken wird die Membran nach außen gedrückt und es bilden sich am äußeren Ende Filopodien aus. Unter diesen Fortsätzen erzeugt die Zelle Kontakte mit der Umgebung, die sie fixieren. Die Zellmembran der Leading Edge kann sich nun nach vorne schieben. Die meisten Zelltypen haben ein übliches Bewegungsmuster, das man in vier Phasen einteilen kann. In der Realität laufen aber alle vier Phasen gleichzeitig ab (Abb. 2.11).

---

<sup>2</sup>Die Vorderseite wird über die Richtung der Zellmigration bestimmt.

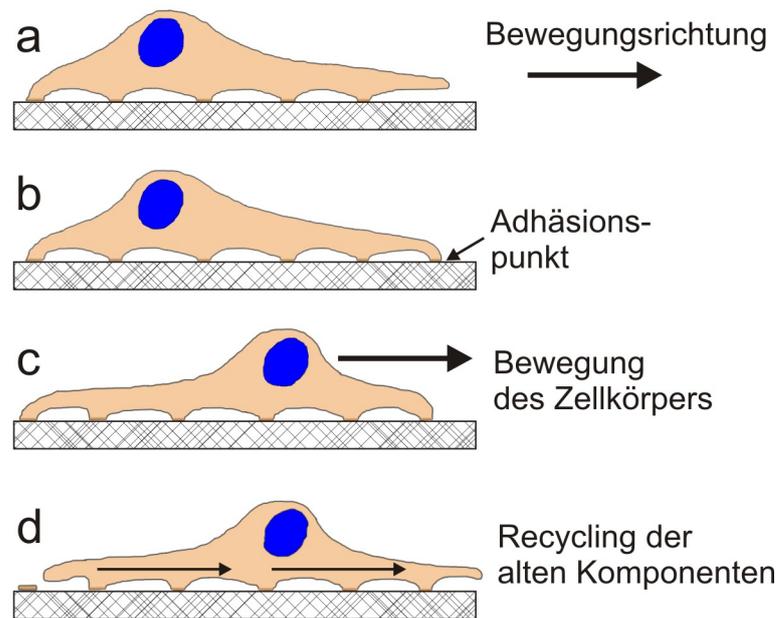


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Zellmigration [14].

Die Aktinfilamente an der Leading Edge drücken durch die vorwärts gerichtete Polymerisation die Zellmembran nach außen (Ausstülpung) (Abb. 2.11 a). Dies wird durch die Aktivierung des Proteins Arp2/3 und die Polymerisation von Filamenten, die sich in Richtung der Plus-Enden verlängern und senkrecht auf die Zellmembran treffen, erreicht. Ein sehr dünner Bereich von schwach gekoppelten Aktinfilamenten (ein bis drei Mikrometer) ist für ein zufälliges Auswachsen und Zusammenziehen der Leading Edge verantwortlich und tastet die Umgebung ab. Ein zweites kolokalisiertes Netzwerk, in dem das Aktin durch Haftkontakte mit dem Untergrund verbunden ist, ermöglicht eine dauerhafte Bewegungsrichtung [74]. Die Orientierungsverteilung der Aktinfilamente im Lamellipodium verändert sich je nach Geschwindigkeit, mit der die Zelle migriert. Dieser Mechanismus stellt eine Art Gangschaltung dar, mit der die Zelle ihre Bewegungsgeschwindigkeit steuern kann [75]. Die Zellmembran wird während der Polymerisation nach außen gedrückt, weil das Aktinnetzwerk im Bezug auf den Untergrund durch die Bindung an die EZM wenig beweglich ist. Neue Membranbestandteile am Vorderende, die von der Endozytose am Hinterende der Zelle stammen, werden wahrscheinlich durch Exozytose der Membran aufgebaut.

Im zweiten Schritt wird die neue Membran mit dem Untergrund fest verbunden (Anheftung) (Abb. 2.11 b). Dies geschieht hauptsächlich durch die Integrine, die die Zell-Matrix-Kontakte vermitteln. Die Zelle bildet Haftpunkte an der Zellfront und während die Zelle wandert werden diese bis an das hintere Ende verschoben.

Die Verschiebung des Zellkörpers in Richtung Lamellipodium ist der dritte Schritt (Abb. 2.11 c). Der Zellkern und die anderen Organellen der Zelle werden wie in einer Zahnpastatube nach vorne gedrückt. Dies geschieht, indem sich der Zellkortex im rückwärtigen Teil der Zelle zusammenzieht.

Im letzten Schritt werden die rückwärtigen Fokalkontakte aufgelöst oder abgerissen, die Integrine wiederverwendet und das nun freie Ende durch Kontraktion nach vorne gebracht (Abb. 2.11 d).

Das mechanische Kräftegleichgewicht zwischen den kontraktilen Elementen einer Zelle und den Gegenkräften, die durch die fest am Untergrund verankerten Haftpunkte entstehen, bestimmt die Fähigkeit einer Zelle zu migrieren. Zellen können sich nicht bewegen, wenn sie zu stark oder überhaupt nicht mit der Umgebung wechselwirken. Die schnellste Migrationsgeschwindigkeit ist mit einer durchschnittlichen Anzahl von Haftpunkten möglich. Sie fällt bei hohen oder niedrigen Level von Haftpunkten ab [76]. Bewegung führt nicht nur zu Druckkräften auf den Untergrund, sondern auch zu Zugkräften, die die Zelle auf ihre Umgebung ausübt.

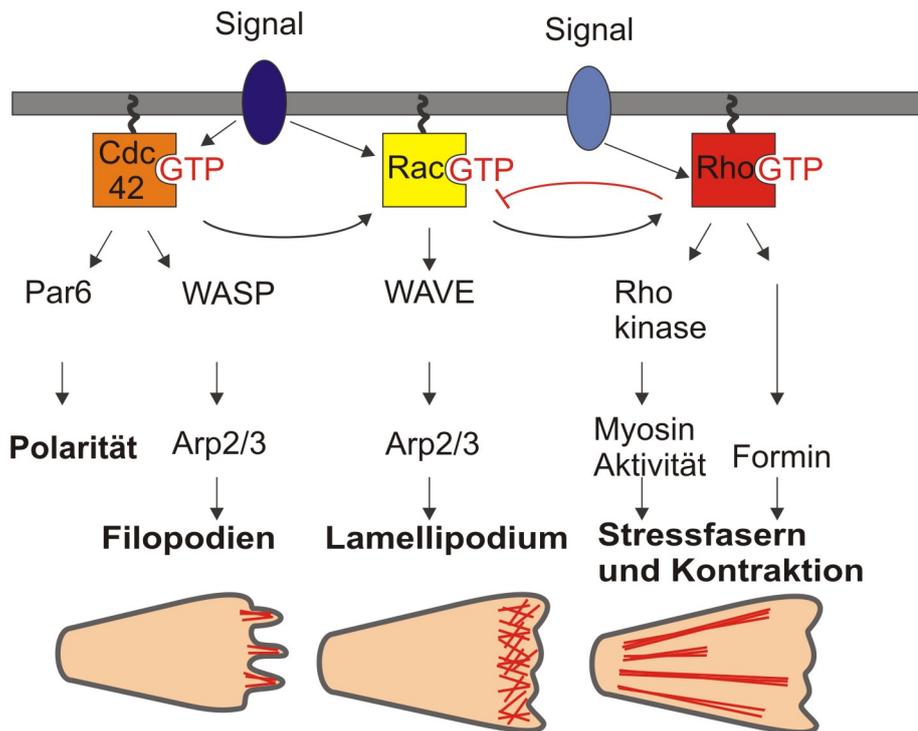


Abbildung 2.12: Zusammenfassung der Signal induzierten Änderungen im Aktinzytoskelett. Spezifische Signale werden durch Oberflächenrezeptoren der Zelle detektiert und führen zu der Aktivierung der GTPasen. Diese aktivieren Effektoren, die zu verschiedenen Ausprägungen im Zytoskelett führen [14].

Die migrierende Zelle ist polarisiert und hat somit eine Rück- und eine Vorderseite. Während der Migration werden verschiedene Komponenten des Zytoskeletts umorganisiert oder frisch gebildet, was durch bestimmte Signalwege der Zelle gesteuert wird. Die Hauptakteure in diesem Prozess sind die GTPasen Rho, Rac und Cdc42 [77]. Diese Moleküle arbeiten wie Schalter. Im inaktiven Zustand binden sie mit GDP<sup>3</sup>. Wenn ein GEF (engl.: guanine nucleotide exchange factor) das GDP durch GTP austauscht, was z.B. durch die Aktivierung von FAK in Haftpunkten passieren kann, wird die GTPase aktiviert und bindet an die Zellmembran. In diesem Zustand werden je nach GTPase Effektorproteine wie WASP, WAVE und Formin aktiviert. Dies führt zu ganz verschiedenen Reaktionen am Ende der Signalkaskade (Abb. 2.12). Die GTPase verbleibt in ihrem aktivierten Zustand bis sie durch ein GAP (engl.: GTPase-activating protein) katalytisch inaktiviert oder nach einiger Zeit selbstständig ins Zytoplasma entlassen wird.

In Experimenten kann man Zellen dazu bringen, eine der drei GTPasen zu überexprimieren. Das heißt, die Konzentration einer Komponente ist in der Zelle so hoch, dass die anderen keinen großen Einfluss mehr haben können [78]. Aus diesen Studien hat sich ein einfaches Modellsystem herauskristallisiert, wie die Zelle ihre Migration steuert. Durch Signale der Umgebung wird Cdc42 aktiviert, das die Zelle ausrichtet, weil beispielsweise die Motorproteine der Mikrotubuli aktiviert werden. Die polarisierte Zelle hat eine hohe Konzentration von Rac am Vorderende. Dieses Protein führt zur Bildung des Lamellipodiums. Die Rho Aktivität ist dagegen im rückwärtigen Teil der Zelle stark erhöht. Die Ausbildung von kontraktile Strukturen wie den Stressfasern und die Aktivierung der Myosin II Motoren wird so herbeigeführt. In der Zelle haben verschiedene Regionen unterschiedliche Konzentrationen an aktivem Cdc42, Rac oder Rho. Die lokalen Unterschiede in der Zelle kommen zustande, weil die GTPasen als Gegenspieler zueinander wirken können. Aktiviertes Rho führt zum Beispiel zur Inaktivierung von Rac (Abb. 2.12).

## 2.7. Wahrnehmung der Umwelt

Die Richtung, in die sich die Zelle bewegt, hängt schlussendlich von der Beschaffenheit ihrer Umwelt ab. Botenstoffe bewirken über Signalwege ein ganz bestimmtes Verhalten. Die Signale, auf die Zellen reagieren können, sind vielfältig und häufig sind die Mechanismen nicht richtig verstanden (Abb. 2.13). Anfangs ging man davon aus, dass Zellen vor allem auf biochemische Signale reagieren. Mit der Zeit wurden immer mehr Mechanismen gefunden, die eine Zelle in ihrer Entwicklung beeinflussen können.

---

<sup>3</sup>Guanindiphosphat fehlt ein Phosphatrest des Energieträgers GTP (Guanintriphosphat).

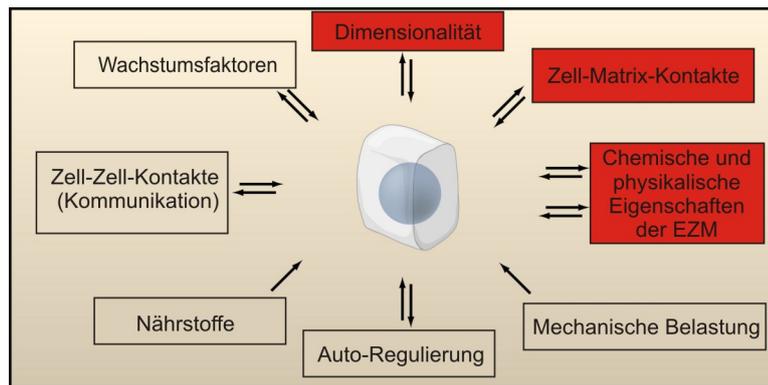


Abbildung 2.13: Zellen reagieren auf eine große Bandbreite von äußeren Signalen. In unseren Experimenten werden wir die in rot markierten Punkte kontrollieren [5].

Zellen, die einem schwachen elektrischen Feld ausgesetzt sind, bevorzugen es beispielsweise, in die Richtung des Minus-Pol zu wandern. In Wundheilungsexperimenten wird gezeigt, dass Fibroblasten mit dem Anlegen des elektrischen Feldes polarisationsabhängig entweder schneller oder langsamer in die Wunde einwachsen. Konzentrationsunterschiede von Ionen in der Zelle zu der ionenfreien Wunde führen zu elektrischen Feldern, die Nachbarzellen beeinflussen können [79]. Diese Beobachtungen werden durch ein geführtes Wachstum von Neuronen durch einen Laserstrahl ergänzt [80]. Zellen können elektrische Felder wahrnehmen, was Galvanotaxis genannt wird. Diese Entdeckung ist nur wenig untersucht und hat wohl keinen großen Effekt auf das tägliche Leben, weil der Gesamtorganismus elektrische Felder nicht aktiv fühlen kann.

Die Effekte der Chemotaxis sind sehr viel wichtiger. Wenn Zellen von Bakterien oder Viren befallen werden oder ein Gewebe verletzt wird, schütten Zellen, die sich in der Nähe befinden, chemische Botenstoffe aus. Einerseits können die frei liegenden Zellen dazu angeregt werden sich zu teilen, andererseits leiten Alarmsignale Immunzellen zu den betreffenden Stellen. Die Botenstoffe diffundieren über große Distanzen und bilden einen Gradienten aus. Diese Gradienten können von Zellen wahrgenommen werden. Chemotaktische Moleküle wirken immer in der gleichen Weise. Sie binden an Rezeptoren der Zelloberfläche und öffnen damit intrazelluläre Signalwege, die das Zytoskelett durch die Aktivierung verschiedener aktinbindender Proteine beeinflussen. Die Zellen nehmen Konzentrationsunterschiede über die gesamte Zelllänge im Prozentbereich wahr. Die Rolle von Fluktuationen ist wichtig, damit diese kleinen Unterschiede einen Einfluss auf das Aktinnetzwerk haben können und zu einer gerichteten Migration führen.

Es muss einen Mechanismus geben, der die kleinen Abweichungen von externen Signalen in große Unterschiede der Signale in der Zelle umwandelt [81]. Man nimmt an, dass die Zelle nur auf Unterschiede in den Signalstärken reagiert. Der einheitliche Hintergrund wird abgezogen und nur die Differenz verstärkt [82, 83]. Proteine, die diese Aufgabe wahrnehmen, wechselwirken mit Effektoren (GTPasen) sehr direkt. Es

kommt entweder zu positiven oder negativen Rückkopplungen in den Signalwegen. Eine Zelle kann nun den geringen Unterschied von äußeren Botenstoffen überhaupt erst wahrnehmen [84, 85]. Die beteiligten intrazellulären Proteine sind sehr vielfältig und werden durch die Untersuchung ihrer Phosphorylierung (Aktivität) in polarisierten Zellen gefunden [86].

In unseren Experimenten versuchen wir vor allem über zwei Stellschrauben, die Zellen zu beeinflussen. Die Haftproteine, die auch die Rolle von Botenstoffen spielen, sind nicht in der Nährflüssigkeit gelöst, sondern fest mit einem Substrat verbunden (Haptotaxis). Gradienten können mit Hilfe mehrerer Verfahren, auf die wir im nächsten Kapitel kurz eingehen, erzeugt werden. Die Zellen wandern normalerweise in die Richtung höherer Proteinbedeckung bis sie zu einer optimalen Konzentration finden [87]. In Zellexperimenten auf angepassten Substraten wird gezeigt, dass die Zellen nicht nur auf die Gesamtbedeckung, sondern auch auf die räumliche Verteilung der Haftproteine reagieren. Die vorgegebenen Haftmöglichkeiten dürfen nicht zu klein oder zu weit voneinander entfernt sein [88]. Auf der Größenskala von einzelnen Integrinen darf ein gegenseitiger Abstand von 70 nm nicht überschritten werden. Eine Clusterung zu starken Kontakten tritt sonst nicht auf [89].

Die mechanische Interaktion zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung ist ein weiterer Einflussfaktor, der in unseren Experimenten eine wichtige Rolle spielt. Gewebe im Körper stehen unter einer Vorspannung, die von den Zellen erzeugt wird. Dies ermöglicht eine schnelle mechanische Antwort, wie es das Beispiel von Einschnitten in die Haut sehr gut zeigt [90]. Zellen können sehr schnell auf äußere Kräfte reagieren und bilden mit ihnen ein selbststabilisierendes System, was in der Literatur als "Tensegrity Model" bekannt ist. Wenn eine Kraft auf einen Integrinrezeptor wirkt, führt dies zur Ausbildung von Fokalkontakten und gleichzeitig zu einer Versteifung des Zytoskeletts, die proportional zur Kraft steigt [91]. Außerdem werden Signalwege beeinflusst, weshalb die Funktion von Molekülen als Komponente in einem zusammenhängenden System verstanden werden muss [92]. Die mechanische Kopplung der Extrazellulären Matrix über das Zytoskelett mit dem Kern versetzt die Zelle in die Lage, auf mechanische Änderungen (selbst auf der Ebene der DNA) sehr viel schneller zu reagieren, als dies durch chemische Signalwege möglich wäre [93]. Die physikalischen Einflussfaktoren (Scherspannung), denen Zellen im menschlichen Körper häufig ausgesetzt sind, können den Einfluss der Haptotaxis auf Endothelzellen sogar übertreffen [94].



### 3. Künstliche Zellumgebungen

In diesem Kapitel werden wir uns auf allgemeine Aspekte konzentrieren, die bei der Nachbildung von Geweben oder experimentellen Umgebungen für Zellen herrschen müssen. Die Zell-Matrix-Interaktion ist für Zellen von großer Bedeutung. Wir werden auf die Techniken, die Biologen, Biophysiker und Materialwissenschaftler für die Klärung ganz bestimmter Fragestellungen benutzen, mit ihren Vor- und Nachteilen eingehen.

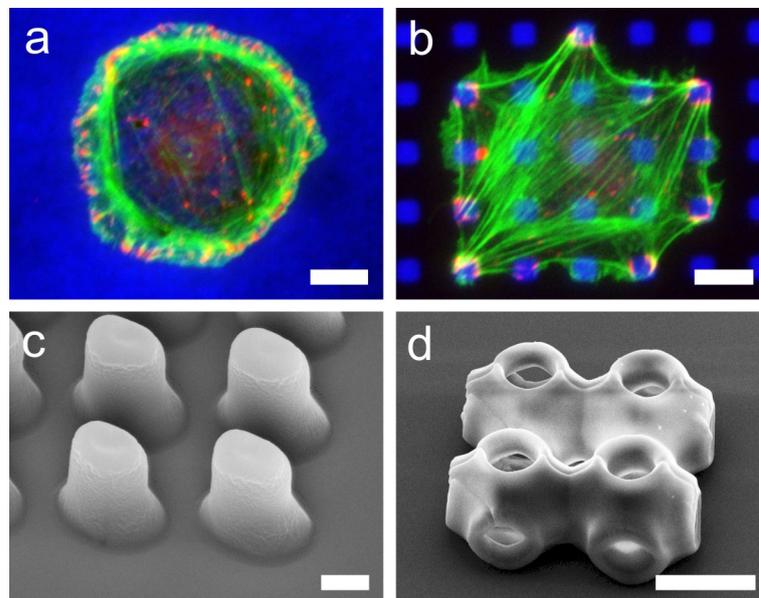


Abbildung 3.1: Fluoreszenzaufnahmen eines a) homogen beschichteten Glassubstrats und b) eines proteingestempelten Deckglases (zweidimensional). Aktin (grün), Paxillin (rot) und Fibronectin (blau). In c) und d) sind elektronenmikroskopische Aufnahmen zu sehen. c) Säulen, die eine Strukturierung in der lateralen Ebene aufweisen und in der axialen Ebene ausgedehnt sind (topographisch). d) per Direktem Laserschreiben gefertigte p-Flächen aus Ormocomp (dreidimensional). Skalenelemente in a), b)  $10\ \mu\text{m}$  [95]; in c)  $1\ \mu\text{m}$ ; in d)  $10\ \mu\text{m}$ .

Viele Methoden sind entweder in ihrer Dimensionalität (Stempeltechniken), ihrer Reproduzierbarkeit (Gewebe) oder der kleinsten erreichbaren Strukturgröße beschränkt. Das Direkte Laserschreiben ist eine sehr neue Methode in der Biologie. Diese dreidimensionale Strukturierungstechnik stellt unserer Meinung nach eine gute Möglichkeit

dar, ganz neue Fragestellungen in der Biologie zu untersuchen. Die Einteilung von Zellumgebungen kann ganz allgemein in ihrer Dimensionalität erfolgen (Abb. 3.1).

Homogene, zweidimensional strukturierte und topographische Substrate sind meistens sehr einfach und in großen Mengen herstellbar. Die Master werden per Lithografie hergestellt und sind käuflich zu erwerben. Dreidimensionale Gerüste erfordern einen weitaus höheren technischen Aufwand bei der Herstellung, der Aufnahme und der Bildrekonstruktion. Zellexperimente erfordern hier die Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Teildisziplinen der Wissenschaft. Materialforscher und Chemiker werden zur Optimierung der (in unserem Fall) Fotolacke benötigt. Die Biologen können die sinnvollsten Fragestellungen erfassen und führen die Zellexperimente durch. Die Datenanalyse für die Auswertung übernehmen oft Physiker, weil die mathematischen Hürden oft enorm sind. Das Zusammenwirken von vielen unterschiedlichen Spezialisten macht Untersuchungen in dreidimensionalen Zellversuchen erst durchführbar.

### 3.1. Homogene Substrate

Wenn wir über die Dimensionalität von Strukturen reden, müssen wir erst einmal definieren, was wir damit meinen. In Zellexperimenten sind vor allem einfache Strukturierungsmöglichkeiten weit verbreitet, weil biologische Daten häufig eine große Varianz aufweisen und deshalb eine große Anzahl von Einzelversuchen durchgeführt werden müssen. Homogene und zweidimensionale Substrate sind das häufigste Mittel der Wahl. Homogene Substrate bestehen meistens aus Haftproteinen der EZM, die auf einem Glasplättchen aufgebracht sind. Die Deckgläschen werden dazu gründlich gereinigt und gegebenenfalls mit einem Haftvermittler bedeckt. Nach dem Aufbringen der Haftproteine und einem Waschgang, in dem die überflüssigen Proteine weggespült werden, kann man die Substrate für Zellexperimente nutzen. Die Dichte der Haftproteine ist bei dieser Art von Experimenten eine wichtige Größe. In unseren Laboren kann sie, durch das Vermischen mit inaktiv gemachten Proteinen, eingestellt werden. Homogene Glassubstrate werden oft als Referenzuntergrund zu strukturierten Umgebungen verwendet.

Die Zellunterlagen aus Glas sind aufgrund ihrer Härte nicht physiologisch. Deshalb wurden von der Arbeitsgruppe um Pelham große Anstrengungen unternommen, Materialien mit definierten physikalischen Eigenschaften in die Zellbiologie einzuführen [96]. Dieses Ziel wurde erstmals mit PDMS (Polydimethylsiloxan) erreicht. Dazu wird eine dünne Hautschicht auf dem flüssigen Material polymerisiert. Zellen können die Oberfläche verziehen und es entstehen Faltenwürfe, die mikroskopisch sichtbar sind [97]. Diesen prinzipiellen Arbeit folgen viele Experimente, die das Ziel haben Zellkräfte nicht nur qualitativ zu zeigen, sondern die Stärke und die Richtung von Kräften zu messen. Dazu benötigt man Markierungen, die eine Verschiebung gegenüber dem entspannten Material anzeigen. Die Materialparameter müssen sehr genau bekannt sein. Diese Aufgaben werden durch Materialforscher gelöst. Die Biologie wendet diese Tech-

niken an und erhält ganz neue Erkenntnisse darüber, wie Zellen Kräfte während der Zellmigration auf ihre Umgebung übertragen.

In frühen Arbeiten werden kleine Latexkugeln, die als Marker dienen, auf das weiche Material gegeben [98]. Um die Materialparameter des Substrats theoretisch gut beschreiben zu können dürfen flexible Schichten nicht zu dünn sein, weil die Rolle von Grenzschichten sonst wichtig wird. Der flexible Untergrund sollte also homogene Eigenschaften besitzen. Vernetztes Polyakrylamid (PAA) ist heutzutage das bevorzugte Material für weiche Substrate, weil man die Flexibilität auf unter 10 kPa einstellbar ist und damit physiologische Bedingungen erzeugt werden können.

Die Messung der Materialflexibilität ist sehr einfach. Es werden Streifen, die definierte Abmessungen besitzen, mit der gleichen Materialzusammensetzung aus den Experimenten gegossen und die Auslenkung mit Gewichten vermessen. Man vergleicht die Messwerte der Auslenkung der Streifen mit den theoretischen Vorhersagen der Elastizitätstheorie. Das Elastizitätsmodul kann sehr genau ermittelt werden [96]. Die Markierungen sind heutzutage meistens in die flexible Polymermatrix eingearbeitet. Die Zellen reagieren nicht mehr auf eventuelle Erhebungen oder Härteunterschiede der Markierungskügelchen, die auf der Oberfläche lokalisiert sind. Dies macht die Kraftmessungen vertrauenswürdiger [99].

Die PDMS-Substrate können durch materialtechnische Verbesserungen so weich hergestellt werden, dass sie auch nach einer vollständigen Polymerisation von Zellen gut verformbar sind [100]. Die sehr weichen Materialien können fließen. Die Vermeidung dieser Fehlerquelle während der Experimente macht die Lokalisation von Kräften und deren Richtung immer genauer. Heutzutage werden die Kräfte einzelner Fokalkontakte aufgelöst. Kleine Punktmuster (jeder Punkt hat ungefähr die Größe von 300 nm) werden auf PDMS gebracht. Die Positionen der Markierungen während der Kraftentwicklung und danach (die Motorproteine werden inhibiert und die Zelle entspannt sich) werden per Phasenkontrastmikroskopie aufgenommen und verglichen [100]. Diese Technik kann verbessert werden, indem man zwei verschiedenfarbige Arten von fluoreszierenden Nanobeads in ein Gel aus PAA mischt und die Auswerteverfahren der Fluoreszenzbilder verbessert. Die Auflösung von Kräften kann in diesem Aufbau bis zu 1  $\mu\text{m}$  betragen [101]. Die Fokalkontakte haben im Normalfall einen Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$ . Die Kräfte einzelner Kontakte können mit einer hohen Genauigkeit vermessen werden, wenn man diese Methode mit zweidimensionalen Stempeltechniken kombiniert [102].

In den vorherigen Versuchen geht man davon aus, dass die Zellkräfte auf flachen Substraten parallel zur Oberfläche verlaufen. Wegen der geringen Höhe einer Zelle auf einem flachen Untergrund liegen die Aktinfasern etwa in einer Ebene. Die Versuchsanordnung von fluoreszierenden Kügelchen in dicken PAA-Gelen kann auch zur Ermittlung von Kräften in axialer Richtung verwendet werden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich je nach Region einer migrierenden Zelle große Kräfte entwickeln, die nicht in der Ebene liegen [103]. Die Zellen drücken ihr Vorderende viel mehr in das

Material hinein und ziehen am Hinterende das Material heraus [104]. Es ist noch nicht klar, ob diese Kräfteverteilung nur aufgrund der flachen Geometrie zustande kommt. Die Mikrofilamente (damit auch die Zellkräfte) müssen beispielsweise um den Kern herum geführt werden.

Um von den Verformungen der Gele auf die Kräfte zurückrechnen zu können, müssen die Materialparameter global, in besonderen Fällen auch lokal, bekannt sein. Die sehr einfache Streifenmethode kann durch die Benutzung eines AFM (engl.: atomic force microscope) [105], auf dessen Arbeitsweise wir an späterer Stelle noch genauer eingehen werden, und durch Mikointendernessmessungen [106] ergänzt oder ersetzt werden. Die Ergebnisse können mit der natürlichen Elastizität der EZM einer Zelle verglichen werden [107]. Die lokalen elastischen Eigenschaften von Gelen werden in einer neueren Methode durch die Manipulation von kleinen Latexkügelchen, die durch optische Pinzetten ausgelenkt und per Konfokalmikroskopie ausgewertet werden, bestimmt [108]. Zellen können ihre Umgebung im Organismus durch den Umbau der EZM beeinflussen. Diese Situation wird in Experimenten mit der Veränderung der Materialparameter während des Zellwachstums durch UV-Belichtung nachgestellt. Die UV-Strahlung bildet oder bricht Bindungen in den Gelen. Die Entwicklung dieser spezialisierten Moleküle kann von Chemikern übernommen werden [109].

## 3.2. Mikrostrukturierte flache Substrate

Auf mikrostrukturierten Substraten sind die Haftproteine entweder geometrisch an bestimmten Orten lokalisiert oder die Proteine bilden eine Gradientenstruktur aus, die an verschiedenen Positionen unterschiedliche Dichten der Moleküle aufweist [110]. Eine Methode zur Herstellung von Dichtegradienten stellt die Strukturierung per  $\mu$ FN (engl.: microfluidic network) dar. Die Proteine sind in einer Flüssigkeit gelöst und werden durch Kanäle gepumpt, die mit einer Form aus PDMS über einem Glasplättchen angebracht sind. Die Proteine können sich auf den Bereichen des Glasplättchens anlagern, an denen die Kanäle vorhanden sind. Der Rest der Oberfläche ist von PDMS bedeckt und wird von den Proteinen deshalb nicht erreicht [111]. Diese Methode funktioniert auch mit mehreren Zugangskanälen und verschiedenen Proteinen, so dass sehr gleichmäßige Proteingradienten, die aus mehreren Molekülen zusammengesetzt sind, auf einer Glasoberfläche herstellbar sind [112]. Wenn man Moleküle in sehr geringen Mengen in die Nährflüssigkeit gibt, können die Mikrofluidikkanäle als eine Experimentierumgebung dienen, in der gelöste Proteine diffusiv mischen. Die Zellen in den Kanälen reagieren auf die gelösten Proteingradienten. Der Gradient kann bei diesem Verfahren in Echtzeit verändert werden [113]. Die Methode der  $\mu$ FN ist sehr schonend, weil die Proteine nur minimalen mechanischen Einflüssen ausgesetzt sind. Es können aber keine komplizierten zweidimensionalen Muster auf ein Substrat gebracht werden. Außerdem können nur Strukturgrößen über einer bestimmten Ausdehnung er-

reicht werden, weil die Flüssigkeit mit den Proteinen nicht durch beliebig enge Kanäle gepumpt werden kann.

Die Methode des  $\mu$ CP (engl.: microcontact printing) schließt genau diese Lücke. Die Proteine können entweder direkt auf ein zuvor passiviertes Glasplättchen gestempelt werden [114] oder durch das Stempeln von Thiolen, die aktivierend oder passivierend wirken können, auf schonendere Weise aufgebracht werden [115]. Die Realisierung von Gradienten kann durch die Veränderung der Abstände oder der Größe der gestempelten Bereiche, die in den Experimenten mit Haftproteinen bedeckt sind, erreicht werden. Allerdings ist dieser Gradient nicht so gleichmäßig wie bei  $\mu$ FN und die Zellen müssen große Flächen abdecken, um die Bedeckungsunterschiede der Proteine zu registrieren [116]. Die Größe und die Abstände der stempelbaren Flächen kann sehr gut variiert werden. Es kann zum Beispiel die maximale Überspannweite nichtadhäsiver Flächen von verschiedenen Zelltypen untersucht werden [88].

Mit moderneren Verfahren ist es möglich die Proteine, wie mit einem Tintenstrahldrucker, mit Nanometerauflösung zu drucken [117]. Man kann auch die Spitze eines AFM verwenden, um Proteine sehr genau auf einer Oberfläche zu platzieren [118]. Diese Techniken erfordern die Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Teildisziplinen, wenn man sie in zellbiologischen Experimenten anwenden will. Der Mehrwert dieser Strukturierungsmöglichkeiten ist wahrscheinlich nicht sehr groß, weil es genügend Alternativen zur Strukturierung im Mikrometerbereich auf flachen Substraten gibt ( $\mu$ CP und  $\mu$ FN).

Zellen nehmen nicht nur Objekte von der Fläche ihrer Haftkontakte, die normalerweise wenige Quadratmikrometer beträgt, wahr. Deshalb kann das  $\mu$ CP mit einer Technik kombiniert werden, die die kontrollierte Verteilung von kleinen Goldinseln auf einem nichtadhäsiven Hintergrund aus PEG (Polyethylenglykol) zulässt. Die Gold-Nanopartikel sind von einer bürstenartigen Schicht von Proteinen ummantelt, die den Abstand zwischen den Partikeln bestimmen. Nach der Auflösung der Moleküle bleiben die Goldpartikel mit einem definierten Abstand zurück. Die Größe der Partikel ist so gewählt, dass nur ein RGD-Peptid daran festmachen kann. Diese Methode kann zusätzlich mit dem  $\mu$ CP kombiniert werden. Damit entstehen Bereiche, auf denen die Zellen nicht haften können, und Inseln von Quadratmikrometer Größe, die aus einer gleichmäßigen Verteilung der Haftproteine im Nanometermaßstab bestehen [119]. Das PEG kann ähnlich wie PDMS oder PAA in dicken Hydrogelen hergestellt werden. Die Flexibilität kann über das Mischungsverhältnis von PEG-Oligomer zu Wasser eingestellt werden. So kann neben der Strukturierung des Untergrunds zusätzlich die Härte verändert werden [120].

Für sinnvolle Mikrostrukturierung braucht man adhäsive Bereiche, an die die Zellen anhaften können. Es ist genauso wichtig und oft schwieriger, den Rest der Oberfläche antiadhäsiv zu gestalten. Im Prinzip können Zellen überall dort wachsen, wo sie Haftproteine vorfinden oder sie selbst exprimieren können. Gute antiadhäsive Materialien, die ungiftige Eigenschaften haben, sind schwer zu finden. In vielen Arbeiten

wird für diesen Zweck das Molekül PEG verwendet. Zellen wachsen und haften auf Materialien, die sehr hydrophil oder hydrophob sind, nur schlecht. Polyethylenglykol gehört zu einer sehr hydrophilen Sorte von Molekülen. Kontaktwinkelmessungen mit Wasser auf PEG verdeutlichen dies [121]. Mit diesem Molekül ist es auch möglich eine zweidimensionale Mikrostrukturierung zu erreichen [122].

Eine sehr aufwändige Methode, Kräfte zu messen, ist die Verwendung von Mikrometer großen Plättchen, die mit Haftproteinen aktiviert werden. Jede dieser Plattformen ist mit einem Cantilever verbunden. Eine Ausleseelektronik nimmt die Signale war und verarbeitet sie sofort. Man kann mit dieser Methode die Kräfte von Zellen während der Migration über die Sensoren sofort beobachten [123]. Dieser Ansatz ist sehr aufwändig. Mikrometer große elektronische Bauteile, die in der Nährlüssigkeit der Zellen arbeiten sollen, sind schwer herzustellen und bieten ein schlechteres Auflösungsvermögen der Kräfte im Vergleich zu etablierten Methoden. Allerdings können die Kräfte, die eine Zelle auf ihren Untergrund ausübt, sofort ausgewertet werden. In Zell-Kraftexperimenten auf flexiblen Gelen muss für die Auswertung der Verformungen erst eine aufwändige Bildauswertung und die Kraftrekonstruktion über mathematische Modelle erfolgen.

Eine Mikrostrukturierung kann nicht nur über die Verteilung der Haftproteine erfolgen. Man benutzt zwei Materialien mit verschiedenen elastischen Eigenschaften, um eine zweidimensionale Strukturierung der Oberflächenhärte zu erzeugen. Ein Stempel aus einer harten PDMS Mischung wird hergestellt. In die Vertiefungen dieses Stempels wird ein zweites weiches Material eingefüllt. Nach dem Aushärten gibt es auf einer glatten Oberfläche Bereiche mit zwei verschiedenen Elastizitäten [124]. Es ist auch möglich Hydrogele mit einem gleichmäßigen Elastizitätsgradienten einer Spanne der Elastizitätsmodulen von ein bis 100 kPa zu erzeugen. Dies geschieht durch die Mischung von verschiedenen PEGDAs (Polyethylenglykoldiakrylaten) und der Vernetzung unter einer UV-Lampe mit einem Fotoinitiator [125].

### 3.3. Topographische Strukturen

In dem vorangegangenen Abschnitt wird erwähnt, dass die Zellen sich gut an ihre äußere Umgebung anpassen können und es deshalb nicht einfach ist Flächen komplett unzugänglich zu machen. Säulenfelder, die mit Hilfe von Abformverfahren herstellbar sind, wurden entwickelt um diese Situation zu lösen und die effektive Steifigkeit weiter zu erniedrigen. Diese Mikronadeln stellt man meistens aus PDMS her. Die räumliche Trennung ermöglicht es die Kräfte, die auf eine einzelne Säule wirken, sehr genau zu lokalisieren [126]. Die Festigkeit eines Pfostens kann nicht nur durch das Herstellungsmaterial eingestellt werden. Die Veränderung der Höhe oder des Radius bewirken einen Unterschied in der effektiven Härte.

Diese Technik ist dazu geeignet viele Einzelexperimente auf einem Substrat durchzuführen. Es können Säulenfelder mit vielen verschiedenen Abständen und Abmessungen auf einmal abgeformt werden. Dies hat den Vorteil, dass die experimentellen Bedingungen in einer Umgebung und mit einer Population von Zellen nicht von Faktoren wie der aktuellen Zusammensetzung des Mediums abhängen [127]. Die Isotropie eines Säulenarrays kann gebrochen werden indem der Querschnitt einer Säule von rund auf oval geändert wird. Die Richtungen sind demnach in ihrer effektiven Steifigkeit ausgezeichnet. Die Zellen nehmen dies auch wahr. Epithelzellen wandern signifikant in die Richtung der höheren Steifigkeit [128].

Während der Herstellung der Mikronadeln kann man kleine Metallpartikel in die Abformmaster geben. Wenn in den Experimenten ein Magnetfeld angelegt wird wirkt eine Kraft, die die Säulen auslenkt. Diese Kraft ist für die Zellen auf den Säulen wahrnehmbar. Die Auslenkungen können auch zeitlich variiert werden. Die Verteilung der manipulierbaren Säulen ist zufällig und ein Einzelement ist nicht alleine ansteuerbar [129]. Die Säulen können auch aus antiadhäsiven Materialien hergestellt werden. Es wäre so vielleicht möglich die Effekte, die von den Integrinen in den Haftpunkten der Zelle ausgelöst werden, von anderen Signalen zu trennen. Die Herstellung von Säulen aus nichtadhäsiven Materialien ist möglich [121] und wird in unseren Experimenten mit Direktem Laserschreiben wiederholt.

Die Rauigkeit einer Oberfläche, die eine Topographie auf sehr kleinem Maßstab darstellt, von nur wenigen Nanometern wird von Zellen wahrgenommen und kann dramatische Effekte beim Wachstum von Neuronen bewirken [130]. Man kann sich die Frage stellen, ob nicht schon der geometrische Einfluss von gestempelten Haftproteinen, die sich wenige Nanometer von ihrer Umgebung abheben, einen Einfluss auf experimentelle Ergebnisse mit mikrostrukturierten Substraten haben kann. Die Auflösung von Höhenunterschieden von wenigen Nanometern ist mit der Grundausstattung eines biologischen Labors nicht möglich. Kooperationen mit Arbeitsgruppen, die Elektronenmikroskopie oder Kraftmikroskopie beherrschen, werden nötig um eventuelle Strukturierungseffekte auf zweidimensionalen Substraten ausschließen zu können.

### 3.4. Dreidimensionale (3D) Umgebungen für die Zellkultur

Sinnvolle dreidimensionale Strukturierung in der Biologie muss kleiner als eine Zelle sein oder am besten die Größenordnung wichtiger Zellbestandteile (Fokalkontakte) erreichen. Techniken, die diese Anforderungen erfüllen, sind sehr selten und oft mit großem technischen Aufwand bzw. Verständnis für die jeweiligen Methoden verbunden. Zellbiologen verwenden als dreidimensionale Versuchsumgebungen natürliche Gewebe oder künstliche Gele, in die die Zellen eingebettet werden. Die mechanischen Eigenschaften dieser Matrizen sind einfach einzustellen. Es fehlen bis jetzt aber die Methoden, einer einzelnen Zelle in einer dreidimensionalen Matrix sehr definierte Haftpunkte vorzugeben. Diese Herausforderung werden wir im Ergebniskapitel mit Direktem Laserschreiben lösen. In diesem Projekt arbeiten Biologen, Physiker und Chemiker zusammen, weil Wissenschaftler einer Teildisziplin nicht in der Lage wären die Herausforderungen zu bewältigen.

Die ersten Experimente mit Zellen in dreidimensionalen Umgebungen wurden in präparierten natürlichen Geweben durchgeführt [7]. Später wurden die Zellen in quervernetzte Hydrogele eingebettet [131], in denen Nährstoffe diffundieren können, die Zellen aber nicht so stark kontrollierbar sind wie beispielsweise auf gestempelten Substraten. Zellmigration kann in den künstlichen dreidimensionalen Kollagenmatrizen beobachtet [132] und die Zusammensetzung der Haftkontakte einer Zelle untersucht werden [11]. In Kollagengelen kann eine gerichtete Migration durch Mechanotaxis beobachtet werden. Hierzu legt man das polymerisierte Gel auf eine schiefe Ebene und drückt mit einer waagrecht gehaltenen Fläche das Wasser heraus. Am höchsten Punkt der Ebene wird die Kollagenmatrix stark gestaucht und ist somit auch härter als am wenig gestauchten Ende. Die eingebetteten Zellen wandern in Richtung der härteren Regionen [133]. Zellen, die in dreidimensionalen Matrizen eingebettet sind üben Kräfte aus. Ähnlich wie in zweidimensionalen Gelexperimenten können kleine fluoreszierende Kugeln als Marker zur Detektion dieser Kräfte dienen. Die Auswertung der Daten in drei Dimensionen ist sehr aufwändig und man benötigt sehr großes experimentelles Geschick, um die Verformungsfelder der Zellen zu erhalten. Außerdem muss man immer daran denken, dass die Auflösungsgrenzen der Mikroskope in den meisten Fällen richtungsabhängig sind [8]. Die axialen Kraftkomponenten können schlechter aufgelöst werden.

Immer häufiger werden Hydrogele aus PEG für das Einkapseln von Zellen verwendet. Langkettige PEGs werden mit Wasser gemischt und es entsteht ein Gel, dessen Flexibilität über das Mischungsverhältnis eingestellt werden kann [131]. Die Nährstoffe und Haftproteine sind in diesen Umgebungen gelöst und die Zellen überleben im Gegensatz zu PEG-Oberflächen. Die PEG-Moleküle können mit chemischen Methoden für Proteine koppelbar gemacht werden. Gebundene Haftproteine entsprechen eher der Situation in Geweben [134]. Mit kleinen Kügelchen ist es möglich die Permeabili-

tät der PEG-Hydrogele zu verbessern, weil diese Störstellen eine partiell geringere Quervernetzung erzeugen. Der Effekt auf die generelle Steifigkeit der Matrix ist sehr gering [135].

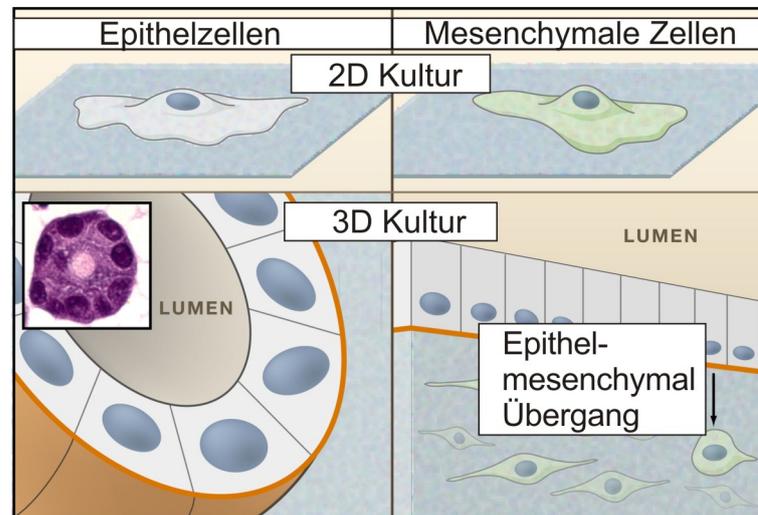


Abbildung 3.2: Die Form einer Zelle auf zweidimensionalen Oberflächen ist verschieden zur dreidimensionalen Situation in Geweben. Die Funktionalität einer Zelle hängt auch von ihrer Form und der Polarisierung ab. Die Wichtigkeit der Dimensionalität in Zellexperimenten wird deutlich [5].

Freiere dreidimensionale Geometrien, in denen die Zellen nicht komplett von einem Material umschlossen sind, können mit PEG-Hydrogelen ebenfalls verwirklicht werden. Goldnanopartikel werden in regelmäßigen Abständen auf einen Glasstab gebracht (gebogene Strukturen, um Blutgefäße (Abb. 3.2) nachzubilden). Ein akryliertes PEG wird mit Wasser und Fotoinitiator gemischt und auf den Glasstab gegeben. Nachdem die Masse mit ultraviolettem Licht vernetzt ist, wird der Glasstab entfernt. Das Ergebnis ist eine gekrümmte dreidimensionale Fläche, die einen nichtadhäsiven PEG-Hintergrund und adhäsive nanostrukturierte Bereiche besitzt [136]. Gekrümmte Oberflächen, die nur spezifische Zellbindebereiche besitzen, sind auch in den Arbeiten von Jörg Lahann das Ziel [137]. Kugeln mit mehreren  $100 \mu\text{m}$  Durchmesser werden mit fotoaktivierbaren PEGs beschichtet. Nach der Belichtung mit einer Fotomaske können die unbelichteten Bereiche mit Haftproteinen versehen werden. Diese Methode bietet eine Strukturierungsmöglichkeit auf gekrümmten dreidimensionalen Flächen.

In einem Aufbau einer optischen Pinzette können manipulierbare Mikrokugeln mit Proteinen haftbar gemacht und auf die Zellen gebracht werden. Die Kugeln können einzeln verfahren werden und sind auf der Zelle in unterschiedlichen Höhen (dreidimensional) verteilt [138].

Dreidimensionale Verfahren, die auf Einzelzellexperimente abzielen, gibt es nicht sehr viele. Dreidimensionale Objekte können mittels sehr dünner Nadeln (Innendurchmesser von 0,5 bis 5  $\mu\text{m}$ ) erzeugt werden. Eine Elektrolyt-Mixtur, die in ein Alkohol-Wassergemisch gedrückt wird, gerinnt sehr schnell. Mit Schrittmotoren sind die Nadeln in den drei Raumrichtungen verfahrbar. Die Elektrolytlinien können somit dreidimensionale Strukturen erzeugen. Die Zusammensetzung des Elektrolyten beeinflusst den Härtegrad [139]. Eine laserbasierte Methode verwendet ein Schichtverfahren, in dem dreidimensionale Polymerobjekte durch dünne Einzelschichten aufgebaut werden [140]. Schichtverfahren gibt es in einer großen Auswahl. Sie werden in der Arbeit von Franziska Klein [141] aufgelistet und die Vor- und Nachteile beschrieben. Allerdings sind sinnvolle Strukturgrößen, die für Einzelzellexperimente benötigt werden, nur mit wenigen Methoden erreichbar.

### 3.5. Experimentelle Befunde und Herausforderungen

In sehr frühen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Flexibilität des Zelluntergrunds große Auswirkungen auf die Geschwindigkeit einer migrierenden Zelle hat. Die Fokalkontakte, die Verbindungen des Aktinzytoskletts zu der EZM, sind auf weichen Unterlagen wesentlich kleiner [96]. Die meisten Zelltypen bevorzugen es, in relativ harte Regionen zu wandern. Dies wird deutlich, wenn man sie auf Gelen aussäht, die einen Härtegradienten besitzen [124]. Die Erklärung ist recht einfach. Eine härtere Unterlage erzeugt eine stärkere Antwort auf einen Kraftimpuls.

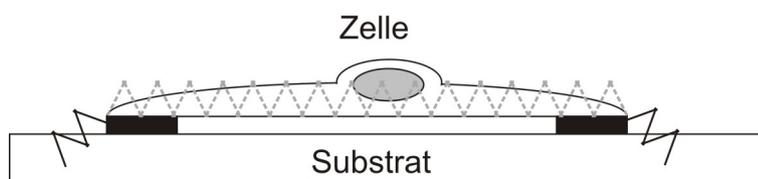


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Zwei-Federmodells. Das Aktinzytoskelett (graue Feder) und die EZM (schwarze Federn) werden durch eine Feder repräsentiert, die die Steifigkeit der Komponenten wieder gibt und sich entsprechend der Federgesetze verhält [142].

In theoretischen Arbeiten wird dies verdeutlicht [142]. Die Zelle und der Untergrund werden als Federn modelliert. Zellen verändern über die Dichte des F-Aktins und der Linkerproteine die effektive Federkonstante ihres Zytoskletts und besitzen häufig die effektive Elastizität ihrer Umgebung. In der Extremsituation einer EZM, deren

effektives Elastizitätsmodul sehr viel weicher ist als das der Zelle, würde das Zusammenziehen der Myosinmotoren nur die Umgebung verformen. Die Zelle würde so gut wie keine Gegenkräfte wahrnehmen, kraftabhängige Signalwege stumm bleiben und die Migration wäre nicht möglich. In der anderen Extremsituation einer sehr harten Umgebung können Zellen ohne Probleme migrieren. Allerdings wird die umgebende Matrix als gleichförmig hart erkannt, weil bei einer kontraktiven Myosinaktivität nur noch Zellkomponenten gedehnt werden. Die Erkennung von kleinen Unterschieden in den Elastizitätswerten der EZM ist in diesem Fall nicht mehr möglich. Theoretisch sind zwei Federn mit gleicher Federkonstante die beste Wahl. Einerseits ist die Kraftübertragung für die Migration gewährleistet, andererseits können richtungsabhängige Unterschiede in der Flexibilität gut erkannt werden.

Zellen, die Kraft auf ihre Umgebung ausüben, erzeugen Verformungsfelder, die über eine gewisse Reichweite verfügen. Wenn man annimmt, dass Zellen nur die effektive Flexibilität erkennen, sollte ein harter Glasuntergrund unter einer dünnen flexiblen Schicht detektierbar sein. Dies Art von Experiment wird auf verschiedenen Schichtdicken durchgeführt und ergibt, dass eine Zelle in der Größenordnung von  $10\ \mu\text{m}$  weit fühlen kann. Dieser Wert wird über eine hyperbolisch gefittete Funktion gefunden, in der die Zellfläche über die Dicke der flexiblen Schicht aufgetragen wird [143]. Die Annahme muss nicht unbedingt richtig sein und wir werden im Ergebniskapitel einen experimentellen Aufbau und erste Vorexperimente vorstellen, mit dem dieser Wert nachprüfbar wäre.

Die Elastizität beeinflusst die Genexpression, was großen Einfluss auf Zellen haben kann [144]. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die Entwicklung von Stammzellen zu ihrem endgültigen Zelltyp von der Härte ihres Untergrunds abhängt [73].

Aus der Form einer Zelle lassen sich Erkenntnisse über die Eigenschaften ihres Zytoskeletts gewinnen. Auf zweidimensionalen Stempelstrukturen bilden Zellen Bögen zwischen ihren Haftpunkten aus, die sich durch Kreise anfitzen lassen. Wählt man in theoretischen Modellen Federn als Strukturelemente aus, die das Aktinmyosin repräsentieren, erhält man bei einer isotropen Kontraktion keine Kreisausschnitte. Eine Übereinstimmung erhält man, wenn die Federn durch Kabelnetzwerke ausgetauscht werden. Kabel reagieren auf Zugkräfte wie Federn, verkrümmen sich bei Druck aber fast ohne Widerstand. Nur die Kombination von Elastizität und Spannung kann die Kreisbogenform erklären. Sie tritt auch in filamentösen Netzwerken, die keine isotropen oder linearen Eigenschaften besitzen, auf [145]. Kreisbögen können auch bei Zellen auf Säulenfeldern, kombiniert mit Kraftmessungen, beobachtet werden [146].

Stempelstrukturen können durch die Verteilung der Haftproteine die Richtung der Zellteilung vorgeben, die in einem Zusammenwirken von Kräften des Zellskeletts zustande kommt [147]. Kleinste Veränderungen der Stempelform können bewirken, dass die Teilungsachse um  $90^\circ$  gedreht wird [148].

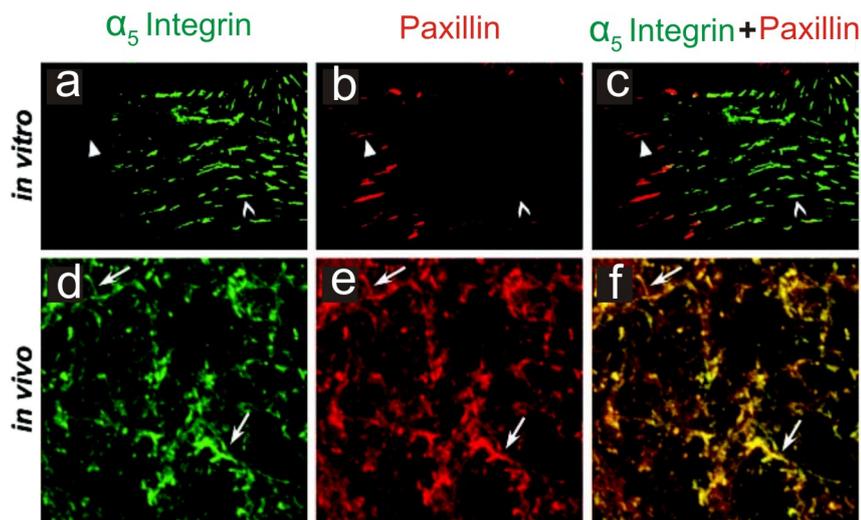


Abbildung 3.4: Fluoreszenzaufnahmen der Kontaktmarker von Zellen (a-f). *In vivo* 3D-Matrixadhäsionen (d-f) unterscheiden sich von den Fokalkontakten (Paxillin) und fibrillären Kontakten ( $\alpha_5$ -Integrin) auf 2D Substraten *in vitro* (a-c). In dreidimensionalen Umgebungen sind die Fokalkontakte und die fibrillären Kontakte räumlich kolokalisiert. Die *in vitro* Situation zeigt räumlich getrennte Kontaktarten [7].

Der Effekt der Dimensionalität der Umgebung kann sich in unterschiedlichen Raten der Differenzierung äußern. So differenzieren Stammzellen auf Polymilchsäureumgebungen wesentlich besser zu Herzzellen aus, wenn sie auf einem 3D-Substrat kultiviert werden [149]. Die Trennung zwischen Fokalkontakten und fibrillären Kontakten zeigen Experimente nur auf zweidimensionalen Substraten. In einer dreidimensionalen Umgebung sind die Kontaktmarker  $\alpha_5$ -Integrin und Paxillin immer kolokalisiert (Abb. 3.4) [7]. Die Signalwege, unter anderem die Autophosphorylierung von FAK, werden ebenfalls von der Dimensionalität der EZM beeinflusst [150]. Die Zellantwort auf gelöste Stoffe in einem Medium hängt davon ab, ob die Zelle sich auf einem flachen Substrat befindet oder von einer Matrix umschlossen ist. Somit zeigt sich ein weiteres Mal die Wichtigkeit, Experimente so realitätsnah wie möglich in dreidimensionalen Umgebungen durchzuführen [151].

# 4. Grundlagen zur Herstellung und Charakterisierung von 3D Zellgerüsten

In diesem Kapitel stellen wir die Geräte vor, die für die Herstellung und Charakterisierung der künstlichen Zellumgebungen und für die Aufnahme während der Experimente verwendet werden. Wir konzentrieren uns vor allem auf die Herstellung von dreidimensionalen Zellgerüsten, die mit Direktem Laserschreiben sehr einfach möglich ist. Danach gehen wir auf grundlegende Fragestellungen bei Fotolacken ein und diskutieren die Einsatzmöglichkeiten verschiedener kommerzieller und selbstgemischter Lacksysteme. Mit einem AFM können die Lacke mit unterschiedlichen Methoden charakterisiert werden. Zum Schluss werden wir auf die Problematiken eingehen, die dreidimensionale Aufnahmen mit Konfokalmikroskopen mit sich bringen können.

## 4.1. Direktes Laserschreiben

Eine dreidimensionale Strukturierung mit Licht ist nur möglich, wenn man in der axialen Einstrahlrichtung eine Nichtlinearität erzeugt. Sonst könnte man nur zweidimensional strukturieren. In lateraler Richtung kann der Durchmesser des verwendeten Laserstrahls das Gebiet, in dem die Polymerisation stattfindet, eingrenzen. In der Einstrahlrichtung besteht trotz Ein-Photonenabsorption die Möglichkeit, dass dreidimensionale Objekte erzeugt werden können. Die zeitliche Abfolge, in der Photonen in einem fokussierten Laserstrahl mit dem Fotolack wechselwirken, ist in diesem Fall entscheidend. Diese Tatsache kann mit dem Schwarzschildeffekt und einem nichtlinearen Verhalten der Fotolacke erklärt werden. Unter einer bestimmten Intensität kann zum Beispiel auch eine Fotoplatte längere Zeit bestrahlt werden, ohne dass dies einen großen Effekt hervorruft. Ein starker kurzer Photonenstrom belichtet ein Foto jedoch ohne Probleme [152]. Die Nichtlinearität wird verstärkt, wenn Multiphotonenprozesse ausgenutzt werden [153]. Moleküle (in unserem Fall Fotoinitiatoren) werden mit einer Wellenlänge des Lichts bestrahlt, mit der sie normalerweise nicht wechselwirken. Fokussiert man dieses Licht, wird der Lichtstrom in einem kleinen Bereich sehr groß. Die Wahrscheinlichkeit zwei Photonen innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (Femtosekunden) in einem kleinen Volumen (Größe des Moleküls) zu finden ist nicht mehr verschwindend gering und führt zum Beispiel zur Polymerisation von Fotolacken.

Dies ist das grundlegende Konzept für Zwei-Photonenabsorption und somit die Grundlage für Direktes Laserschreiben (DLS). In Abbildung 4.1 wird das Grundprinzip der dreidimensionalen Strukturierung eines Fotolacks schematisch dargestellt und im folgenden Teil genauer erklärt.

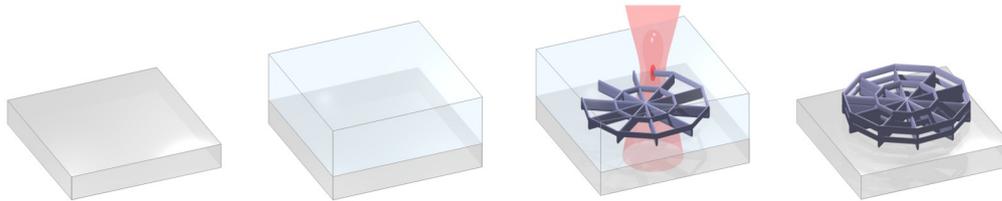


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Direkten Laserschreibprozesses. Ein Deckglaschen wird mit Fotolack benetzt. Mit dem Fokus eines Laserstrahls kann der Fotolack, wie mit einem Stift, dreidimensional strukturiert werden. Die monomeren Bestandteile werden zum Schluss mit einem Entwickler entfernt [154].

Der Fokus eines Lasers wird beim Direkten Laserschreiben wie ein Stift zum dreidimensionalen Strukturieren von Fotolacken verwendet. Diese Lithografiemethode ermöglicht eine schnelle Realisierung von der Idee bis zum Endprodukt, da die Programmierung, der Schreibprozess und die Entwicklung der Proben im Normalfall innerhalb eines Tages möglich sind. Es sind ohne Probleme Strukturgrößen von 100 nm erreichbar [10]. Mit Tricks, die schon in der optischen Mikroskopie zu hohen Auflösungsverbesserungen geführt haben [1], kann die Strukturgröße in Zukunft wahrscheinlich auf wenige 10 nm verkleinert werden [155] und somit die Größe von fibrillären Strukturen innerhalb und außerhalb einer Zelle erreichen.

Am Anfang dieser Arbeit wurden mehrere Prototypen-Geräte [156] mit verschiedenen Laserquellen (Ti:Saphire, Verstärkersystem und Oszillator betrieben bei 800 nm Wellenlänge) verwendet, was besonders bei flüssigen Fotolacken qualitative Auswirkungen auf die Ergebnisse hat [95]. Diese Geräte haben je nach verwendeter Piezobühne einen eingeschränkten automatischen Verfahrbereich von höchstens  $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}^3$ . Zellen nehmen auf flachen Substraten eine Fläche von mehreren  $100 \mu\text{m}^2$  ein, weshalb sinnvolle dreidimensionale Strukturen wenigstens  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  an Grundfläche besitzen sollten. Die Einstellung der Laserleistung per Hand nimmt viel Zeit in Anspruch und macht die Anwesenheit eines Experimentators erforderlich.

Die große Erfahrung in der Arbeitsgruppe Wegener und ein Markt für dreidimensionale Strukturierung im Sub-Mikrometerbereich führten zu der Ausgründung des Unternehmens Nanoscribe GmbH und der Entwicklung eines halbautomatischen Direkten Laserschreibsystems. Dieses Gerät hat einige Besonderheiten, die die Arbeit sehr vereinfachen. Der Aufbau ist in (Abb. 4.2) dargestellt. Als Laserquelle dient ein frequenzverdoppelter erbiumdotierter Faserlaser, der ein gutes Strahlprofil mit einer

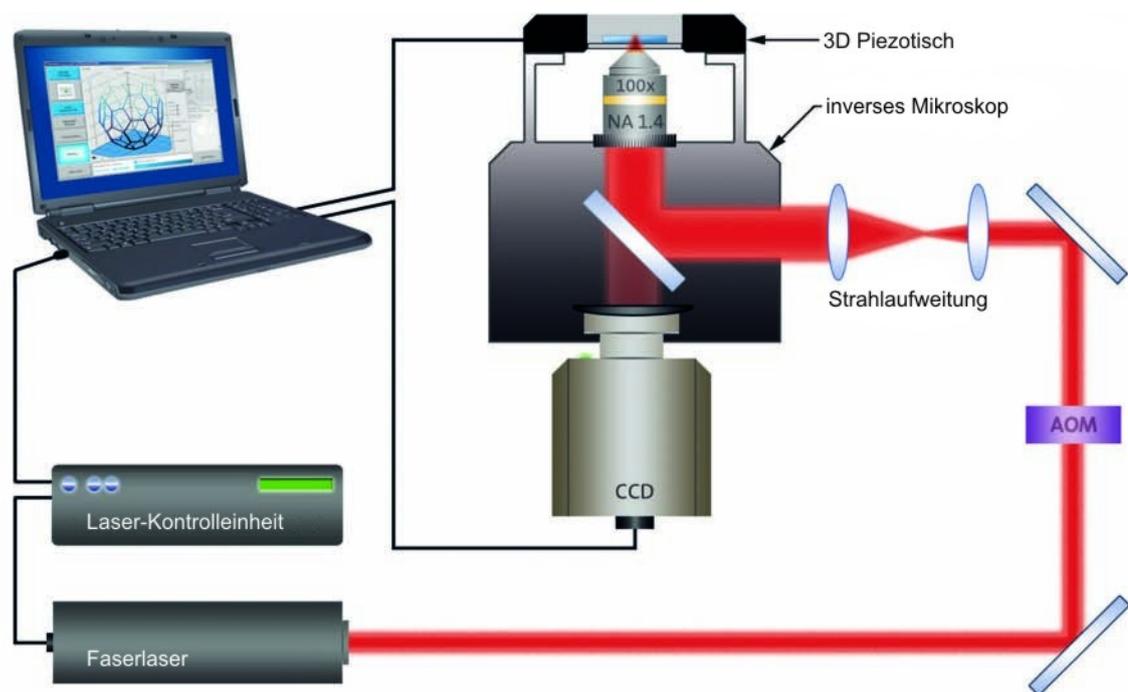


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau des Direkten Laserschreibsystems. Mit freundlicher Genehmigung der Nanoscribe GmbH.

Ausgangswellenlänge von 780 nm besitzt. Diese Laserquelle ist in einer temperaturstabilisierten Reinraumumgebung leistungsstabil, kann also problemlos über längere Zeit eine voreingestellte Leistung erbringen. Ein akustooptischer Modulator (AOM), der über eine Diode auch während eines Lithografiedurchlaufs kalibriert werden kann, übernimmt die Aufgabe, die Laserleistungen (100 Prozent entsprechen gemessenen 30 mW am Objektiv) genau einstellen zu können. Nach einer Strahlaufweitung (Ausnutzung der kompletten numerischen Apertur des Objektivs) wird der Laser über das inverse Mikroskop (Zeiss) in ein Objektiv (Zeiss Ölimmersion NA 1,4) geführt, das über einen Motor in der axialen Richtung verfahrbar ist. Auf dem Korpus des Mikroskops befindet sich eine Märzhäuserbühne, die den kompletten lateral bearbeitbaren Bereich abdeckt. Ein Piezoscanner, mit dem gleichen Verfahrbereich der Prototypengeräten, kann mit Hilfe der motorisierten Bühne den kompletten Bereich von zehn Glasplättchen, die in einem Halter direkt mit dem Scanner verbunden sind, erreichen. Alle Komponenten werden von einem Computer gesteuert und können über eine Skriptsprache angesteuert werden. Während des typischen Ablaufs fährt man mit der Märzhäuserbühne einen Schreibbereich an, auf dem ein Deckgläschen auf der Unterseite mit Immersionsöl und auf der Oberseite mit einem Fotolack benetzt ist. Dann fährt das Objektiv in axialer Richtung die Probe an und das Steuerprogramm findet über den Brechungsindexkontrast, der zwischen dem Glasplättchen und dem Fotolack herrscht, die genaue Grenzfläche. Hierfür wird die Reflexion, die in der Fokusebene besonders stark wird, von der Software analysiert. Die axiale Position dieser Grenzfläche

wird auf einen bestimmten Wert innerhalb des internen Koordinatensystems gelegt. Die Schreibgeschwindigkeit und die Laserleistung werden über die Skriptsprache in Maschinenbefehle umgewandelt und eine Datei mit dreidimensionalen Koordinatenpunkten geladen, die dann während des Schreibprozesses nacheinander angefahren werden. Eine oder mehrere Strukturen können nun sequentiell mit unterschiedlichen Parametern auf ein oder bis zu zehn Deckgläschen geschrieben werden. Die eingebaute Kamera ermöglicht es während dem Schreibprozess oder zum Anfahren bereits strukturierter Bereiche (Joystick oder Skriptbefehle) die Strukturen zu sehen (wenn ein Indexkontrast vorhanden ist). Nach dem Schreibprozess fährt das Objektiv auf eine Warteposition zurück, damit es nicht beschädigt wird. Der Probenhalter kann entfernt werden. Es folgt der Entwicklungsvorgang, der je nach Fotolack verschieden sein kann.

## 4.2. Fotolacke

Die Fotolacke, wie wir sie verwenden, haben ganz unterschiedliche Zusammensetzungen und sind auf eine jeweilige Problemstellung abgestimmt. Fotolacke setzen sich mindestens aus zwei Komponenten zusammen. Der Fotoinitiator zerfällt bei der Belichtung (Abb. 4.3) und startet die Vernetzungsreaktion der monomeren Bestandteile zu Polymeren (Abb. 4.4 a). Die Fotoinitiatoren regt man in unserem Fall per Zwei-Photonenabsorption an. Entweder wird die Energie über Fluoreszenz wieder abgegeben oder es findet ein Intersystem-Übergang in den Tripletzustand des Moleküls statt, der sehr langlebig ist. In diesem Zustand ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Fotoinitiatormolekül zerfällt, sehr hoch.

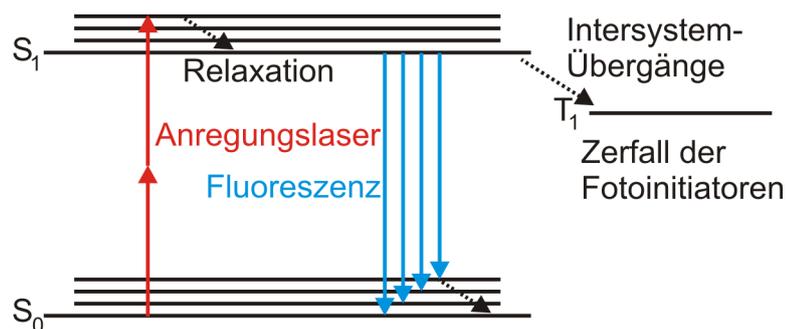


Abbildung 4.3: Ein Fotoinitiatormolekül wird durch Zwei-Photonenabsorption angeregt. Es gibt diese Anregung entweder durch Fluoreszenzlicht ab oder es findet ein Intersystem-Übergang statt und das Molekül zerfällt. Diese Bruchstücke initiieren die Polymerisation der vernetzbaren Monomere [155].

Ganz allgemein lässt sich sagen, dass die physikalische Festigkeit von Fotolacken mit der Anzahl der vernetzbaren Bestandteile pro Monomer zunimmt. Diese Eigenschaft kann man am Aufbau der Moleküle erkennen. In der schematischen Abbildung 4.4 (b und c) ist die Anzahl der aktivierbaren Akrylgruppen von PETA doppelt so hoch wie von PEGDA. Diese beiden Bestandteile werden in unseren Experimenten Verwendung finden und wir werden durch Messungen feststellen, dass PETA eine höhere Härte als PEGDA besitzt. Bei gleicher Anzahl der aktivierbaren Gruppen entscheidet oft die Größe der Monomere über die Festigkeit der Polymere. Dies ist einfach zu verstehen. Die Quervernetzungsdichte aus kleineren Ausgangsmolekülen nimmt zu und die größere Anzahl der Verbindungen ergibt eine erhöhte Festigkeit. In unseren Experimenten verwenden wir ausschließlich Negativ-Fotolacke. Dies bedeutet, dass die belichteten Bereiche nach dem Entwicklungsschritt zurückbleiben.

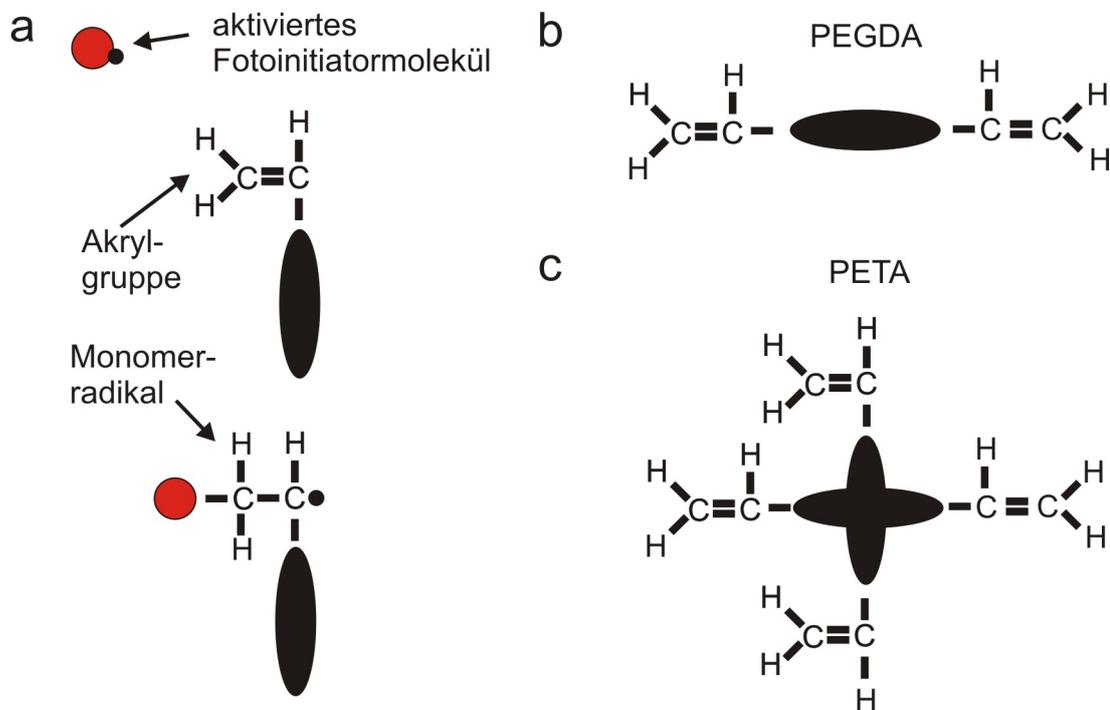


Abbildung 4.4: Schematische Darstellungen von a) ein aktiviertes Fotoinitiator greift die Akrylgruppe eines Monomers an und öffnet die Doppelbindung. Das Monomer wird zu einem Radikal und kann lange Ketten bilden. Unsere PEGDA Monomere in b) besitzen zwei Akrylenden und können Netzwerke bilden. PETA in c) besitzt vier Akrylenden und wird zu einem noch dichteren Polymer.

## SU-8

Den Fotolack SU-8 wurde anfänglich zur Herstellung unserer harten Template verwendet [95]. Dieser Lack wird wegen schlechter Eigenschaften bei der Mikroskopie (Autofluoreszenz über einen weiten Spektralbereich, Brechung) nicht selbst für Zellexperimente benutzt, sondern als formgebendes Element für die Konversion in Glassstrukturen verwendet. Der große Vorteil von SU-8 besteht darin, dass die Monomere während der Belichtung in einer festen Form vorliegen. Man muss sich während der Programmierung keine Gedanken um die Reihenfolge der einzelnen Elemente machen und Bewegungen des Piezoscanners während des Schreibvorgangs haben keinen zerstörerischen Effekt auf bereits belichtete Bereiche in der Probe. Der kommerziell erhältliche SU-8 Lack (MicroChem Corporation) setzt sich aus einem Epoxidharz (Epon SU-8), dem Lösungsmittel ( $\gamma$ -Butyrolactone) und einem Fotoinitiator (Cyracure UVI-6976) zusammen. Die Zusammensetzung ist so gewählt, dass der Lack im Wellenlängenbereich des Lasers (etwa 800 nm) der Lithographiesysteme durchsichtig ist und deshalb nur durch Multiphotonenanregung aktivierbar ist. Der Lack wird mit einer Lackschleuder auf ein Deckgläschen gebracht und das Lösungsmittel auf einer Heizplatte entfernt. Der Lack kann dann belichtet werden.

Die Polymerisation der Monomere erfolgt, im Gegensatz zu den restlichen Lacken, kationisch. Im Fokus des Laserstrahls zerfallen aktivierte Moleküle des Fotoinitiators in eine Lewis-Säure. Diese Bereiche werden erst nach dem Belichtungsschritt über eine katalytische Reaktion in einem Ofen polymerisiert. Da der Polymerisationschritt nach dem Schreibprozess stattfindet, gibt es keine ungewollten Streuereignisse, wenn der Laserstrahl bereits belichtete Stellen überfährt. Die unbelichteten Stellen, die aus monomeren Molekülen bestehen, werden danach mit einem Entwickler entfernt. Polymerisiertes SU-8 ist widerstandsfähig gegen viele Arten von Lösungsmitteln. In unseren Zellexperimenten zeigt sich, dass der längere Aufenthalt in Wasser zu einem Ablösen der Polymerstrukturen führt. Dieses Problem kommt an späterer Stelle wieder vor und wird durch die Oberflächenbehandlung der Deckgläschen gelöst. Genauere Informationen zu SU-8 und die Anwendung in photonischen Elementen findet man in [156].

## Ormocomp

Der zweite kommerzielle Fotolack stammt aus der Klasse der Ormocere (Akronym für engl.: (or)ganically (mo)dified (cer)amics). Ormocere vereinen Eigenschaften von Silikon (Elastizität), Keramiken (Stabilität und optische Eigenschaften) und Polymeren (Vernetzungsfähigkeit, Funktionalisierung) [157]. Die Lacke können unter anderem für die Produktion optischer Lichtleiter auf Silizium verwendet werden. Wir benutzen für unsere Versuche Ormocomp, was eigentlich als Material für den inneren Teil eines Glasfaserkabels Verwendung findet [158]. Die Biokompatibilität wird in [159, 160] in recht groben Strukturen, die nicht für Einzelzellexperimente geeignet sind, gezeigt.

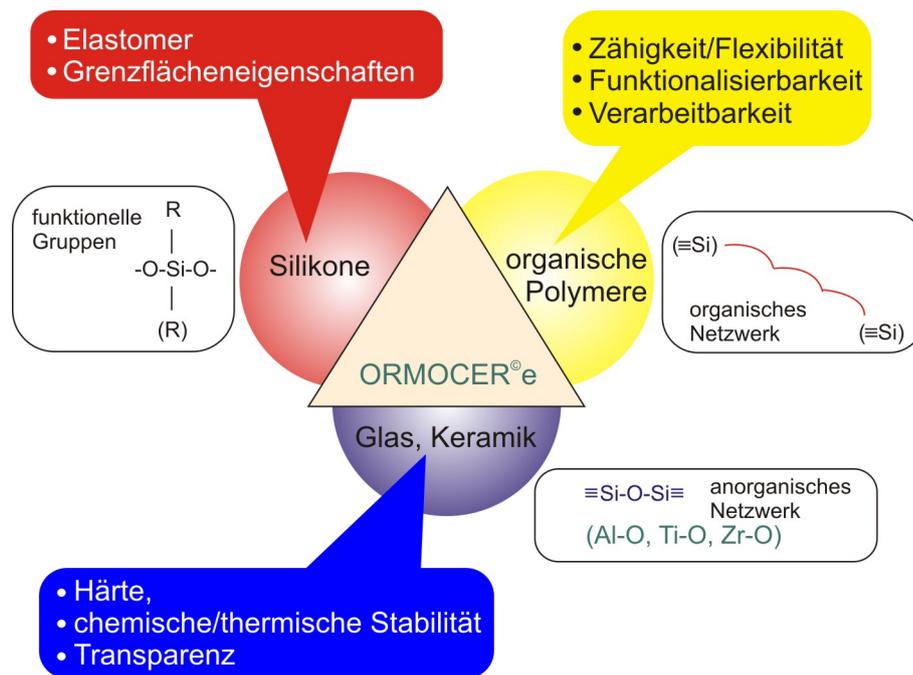


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Eigenschaften von Ormoceren. Die Änderung einzelner Komponenten führen zu angepassten Materialeigenschaften [157].

Ormocomp besteht aus einem Monomer, das nach Abbildung 4.5 so angepasst wurde, dass der Brechungsindex nahe dem von BK7 Glas ist, aus dem unsere Deckgläschen bestehen. Der Fotolack besitzt außerdem funktionelle Gruppen, die ihn sehr gut an Glas haften lassen, was eine Beschichtung des Untergrunds unnötig macht. In unseren Zellexperimenten verursacht dieser Lack keine Probleme, die sich durch ein Ablösen der Polymerstrukturen zeigen würden. Der Fotoinitiator ist Irgacure 369 (BASF), der ein starkes Absorptionsverhalten unterhalb einer Wellenlänge von 400 nm zeigt (Abb. 4.6). Während der Arbeit mit den Prototypgeräten, bei der die Übergänge zwischen Glas und Fotolack per Auge über die Verbrennung der Monomermoleküle gefunden werden, ist ein indexangepasster Lack sehr vorteilhaft, weil Abweichungen der Fokusform durch Aberationen minimal werden. Allerdings benötigt der Interface-Finder des Nanoscribe Geräts einen minimalen Unterschied im Brechungsindex, um mit einer nichtinvasiven Methode die Position der Grenzfläche zu finden. Deshalb beschichten wir anfangs die Deckgläschen mit einer etwa 5 nm dicken Schicht aus Indiumzinnoxid oder Titandioxid. Diese Schichten können sehr homogen mittels Atomlagenabscheidung (Cambridge NanoTech) auf das Deckgläschen aufgebracht werden und erzeugen einen starken Kontrast im Brechungsindex zu Glas. Dieser zusätzliche Schritt kostet Zeit und wird durch eine Verbesserung im Ausleseverhalten des Interface-Finders durch das Unternehmen Nanoscribe gelöst. Der kleine Brechzahlkontrast zwischen einem Deckglas ( $n=1,525$ ) und Ormocomp ( $n=1,518$ ) wird nun sicher erkannt.

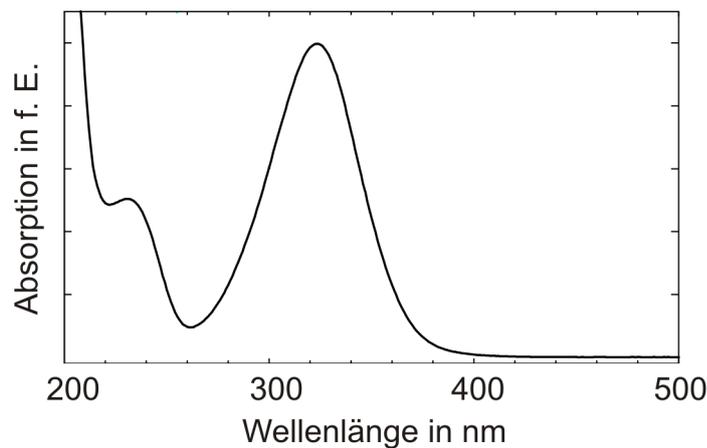


Abbildung 4.6: Die Absorption (in freien Einheiten) des Fotoinitiators Irgacure 369 über die Wellenlänge aufgetragen [161].

Ormocomp ist sehr einfach zu handhaben. Der Fotolack wird auf ein geputztes Deckgläschen getropft und kann sofort belichtet werden. Die Aneinanderkettung der Monomere erfolgt durch eine radikale Reaktion. In den belichteten Bereichen werden die Fotoinitiatormoleküle aktiviert und brechen die Akrylenden der Monomere auseinander, welche dann in einer Kettenreaktion weitere Monomere aktivieren (Abb. 4.4 a). Die Radikale wachsen so lange, bis sie entweder auf eine weitere Polymerkette oder einen Radikal-Quencher, wie ein Sauerstoffmolekül, treffen [162]. Während der Fokus des Laserstrahls durch den Fotolack geführt wird, kann man wegen des Brechzahlkontrasts das Ergebnis sofort über eine Kamera auf dem Computermonitor erkennen. Diese Eigenschaft ist für die Suche nach Fehlern von sehr großem Wert, weil die Strukturen ohne den Ausbau und die Entwicklung der Proben verbessert werden können. Nach dem Belichtungsprozess werden die Monomere in einem Entwicklerbad aus 50 % Isopropanol und 50 % MIBK (Methylisobutylketon) gewaschen und die Strukturen sind bereit für die Zellexperimente. In der Bedienungsanleitung zu Ormocomp werden Tipps für die Prozessierung des Lackes gegeben, die aus unseren Erfahrungen keine Verbesserung der Polymereigenschaften bringen.

Wir benutzen Ormocomp entweder als Fotolack für Strukturen, die von Zellen deformiert werden können oder für die adhäsive Komponente unserer Kompositstrukturen. Ormocomp besitzt laut [163] einen Elastizitätsmodul von 0,3 bis 1 GPa. Unsere Messungen mit einem AFM in [12] ergeben einen Wert von 0,8 GPa. Dieser Wert ist erst einmal recht hoch und unsere Strukturen müssen durch ein entsprechendes Design für kleine Zellkräfte verformbar gemacht werden. Fotolacke, die mit Haftproteinen adhäsive Eigenschaften besitzen gibt es sehr viele. Wir wählen Ormocomp aufgrund seiner einfachen Handhabung und der guten Verfügbarkeit für eine große Anzahl von Strukturen in unseren Experimenten aus.

## PETA

Polyerythrioltetraakrylat (PETA) von Sigma-Aldrich ist ein Monomer, das aus vier Armen mit Enden aus vernetzbaren Akrylgruppen besteht. Es wird vor allem in der Zahnmedizin verwendet und ist laut unseren Messungen [164] in purer Form mit einem Elastizitätsmodul von etwa 4 GPa fünfmal härter alsOrmocomp. Diese Grundsubstanz mischen wir mit ein bis drei Gewichtsprozent des Fotoinitiators Irgacure 369, der auch inOrmocomp Verwendung findet. Irgacure 369 löst sich, ohne dass eine zusätzliche Verwendung von Lösungsmittel nötig wäre, in PETA auf. Hierfür belässt man die Mischung in einem Ultraschallbad, das bei voller Leistung für etwa eine Stunde die Komponenten durchmischt. Danach kann der flüssige Fotolack einfach auf ein Glasplättchen getropft, beschrieben und die unbelichteten Bereiche entweder mit Azeton oder einem Lösungsmittelgemisch aus 50 % Isopropanol und 50 % MIBK gewegewaschen werden.

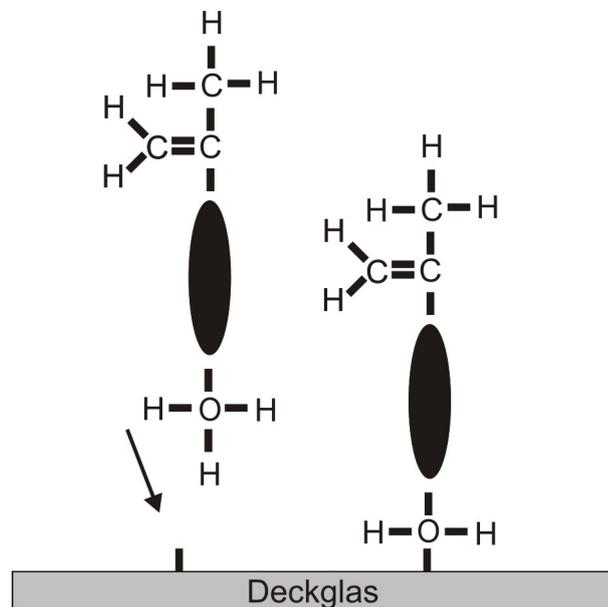


Abbildung 4.7: Die aktivierte Glasoberfläche kann kovalent mit einem Silan binden. Dieses Molekül reagiert während der Radikalpolymerisation mit den Fotolackmolekülen und verbindet diese gut mit der Glasoberfläche [164].

Die optischen Eigenschaften für ein späteres Mikroskopieren sind akzeptabel, weil PETA nur bei einer hochenergetischen Anregung der Fluoreszenzmikroskope autofluoresziert. Dieser Fluoreszenzkanal entspricht dem Farbstoff DAPI, der den Zellkern markiert. Der Kern ist, trotz ungewollter Anregung der Umgebung, noch gut zu erkennen. Wir ersetzen in unseren späteren Versuchen die Glastemplate durch Strukturen aus PETA, weil die Herstellung weniger Zeit in Anspruch nimmt und die Ergebnisse eine gute Qualität besitzen.

Ein großes Problem stellt die schlechte Haftung vieler Polymere an Glas dar. In Fotolacken wieOrmocomp werden extra Bestandteile, die eine gute Verbindung zwischen Siliziumdioxid und den Lackbestandteilen garantieren, als zusätzliche Gruppen angebracht. Hier gehen wir einen einfacheren Weg und beschichten unsere Glasplättchen mit 3-Methakryloxypropyltrimethoxysilan (Abb. 4.7). Dieses Molekül bindet mit seinen Gruppen einerseits kovalent mit dem Glasplättchen, andererseits kann es während einem Vernetzungsvorgang direkt in die Polymermatrix eingebunden werden. Diese Bindung ist sehr stark und kann von üblichen Lösungsmitteln in der Zellbiologie nicht zerstört werden.

## PEGDA

Die vier Akrylgruppen von PETA verursachen während der Polymerisation einen großen Grad an Quervernetzung, was sich in den sehr harten Eigenschaften des Materials zeigt. Die Monomere bilden lange Ketten, die sich untereinander durch die restlichen drei reaktiven Gruppen verknüpfen können. Die nun folgenden Monomere Polyethylenglykoldiakrylat (PEGDA) bestehen aus einer langen (die Länge ist variabel) Kette an deren Enden jeweils eine Akrylgruppe sitzt. Wir werden in unseren Experimenten zeigen, dass die elastischen Eigenschaften von leicht vernetzenden Monomeren wie PEGDA durch die Mischung mit einem stark quervernetzenden Molekül (PETA) beeinflussbar sind.

Von Polyethylenglykol ist bekannt, dass es antiadhäsiv auf Zellen wirkt. Mit einer Molekülvariante mit Akrylendungen versuchen wir [13] und andere [165] per Direktem Laserschreiben Bereiche zu belichten, die für Zellen unzugänglich sein sollen. Wir verwenden hauptsächlich zwei Molekülvarianten, die sich nur in der Länge der Basiseinheiten unterscheiden. Das Polyethylenglykoldiakrylat mit den atomaren Molekülmassen von 575 u bzw. 700 u mischen wir mit einem Gewichtsprozent Irgacure 369, der sich ohne weitere Behandlung löst. Die Belichtung findet auf Deckgläschen statt, die mit einer Silanschicht überzogen sind. PEGDA schwimmt ohne diese Maßnahme während der Zellexperimente ab. In weiteren Versuchen zeigen wir, dass die antiadhäsiven Eigenschaften von polymerisiertem PEGDA auch dann noch vorhanden sind, wenn man es mit PETA mischt. Hierdurch lassen sich die elastischen Eigenschaften durchstimmen und die dreidimensionalen antiadhäsiven Gerüste sind stabiler.

## 4.3. Charakterisierung von dreidimensionalen Strukturen

Kraftmikroskope (engl.: AFM (atomic force microscope)) sind in der Zellbiologie weit verbreitet [166]. In dieser Arbeit werden mit diesem Gerät einige Materialparameter bestimmt, weshalb wir kurz auf die Funktionsweise eingehen (Abb. 4.8). Das AFM wird in den Experimenten von Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Clemens Franz (CFN, Karlsruhe Institut für Technologie) bedient und die Daten werden uns freundlicherweise überlassen. Ein AFM-System (Nano Wizard 2) von JPK Instruments, das auf zellbiologische Experimente optimiert ist, wird verwendet [167]. Der AFM-Kopf kann so auf ein Inverses Mikroskop (Zeiss) montiert werden, dass sowohl Auf- als auch Durchlichtmikroskopie während des AFM-Betriebes möglich sind. Außerdem hat dieses Gerät eine Probenkammer für Zellen integriert, so dass Zellen auch über längere Zeiträume am Leben bleiben. Die Messeinrichtung kann in Flüssigkeit betrieben werden, was mit nur wenigen anderen Techniken möglich ist. Die Funktionsweise eines Kraftmikroskops ist wie folgt (Abb. 4.8 a). Ein Laserstrahl wird von der reflektiven Spitze eines Cantilevers auf den Mittelpunkt einer Vierquadranten-Diode geworfen. Ein Cantilever ist ein sehr dünner und langer Balken, der aus einem flexiblen Material besteht. Wirken Kräfte auf die Spitze, verbiegt sich der Cantilever und der Laserstrahl wird abgelenkt. Dies bewirkt eine Verschiebung des Strahlengangs und die vier Quadranten der Diode detektieren zur Ausgangslage veränderte Strahlleistungen, die über eine Elektronik ausgelesen werden. Mit der Kenntnis der Federkonstante des Cantilevers können aus den Daten Kräfte zurückgerechnet werden.

In unseren Experimenten benutzen wir vor allem zwei AFM-Modi. Für die Bestimmung verschiedener Materialparameter kann das AFM gut genutzt werden. Es ist zum Beispiel möglich, die Fähigkeit von Zellen, Haftpunkte auf einem Untergrund zu bilden, durch Einzelzellkraftspektroskopie zu bestimmen. Hierfür wird ein spitzenloser Cantilever mit Haftproteinen benetzt. Eine Zelle wird mit Hilfe des Mikroskops gesucht und der Cantilever auf diese gedrückt (Abb. 4.8 b). Wenn die Zelle stark genug anhaftet, kann sie vom Untergrund gehoben werden. Diese Zelle wird nun für die weiteren Versuche verwendet. Dies hat den Vorteil, dass Unterschiede innerhalb einer Zellpopulation während der Messung ausgeschlossen werden können. Der Cantilever wird auf einen Bereich des Glasplättchens verfahren, wo zum Beispiel Materialproben auf die Glasoberfläche aufgebracht wurden. Wenn die Zelle auf verschiedene Materialien gedrückt wird, kann sie Zell-Matrixkontakte in unterschiedlicher Stärke bilden. Der Cantilever wird von der Probe wegbewegt und die Maximalkraft, mit der eine Zelle auf dem Untergrund anhaftet zeigt an, wie gut ein Material zum Beispiel zur Passivierung von Oberflächen geeignet ist. Substrate, die nicht homogen beschichtet sind (Säulenreihen), können zudem Hinweise auf das Verhalten von einzelnen Haftpunkten der Zelle auf große Kräfte geben.

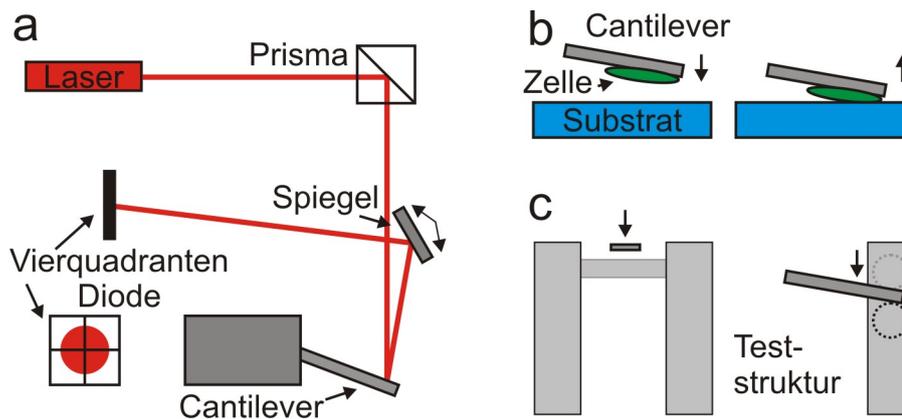


Abbildung 4.8: In a) ist der Aufbau eines AFMs schematisch dargestellt. Ein Laserstrahl wird auf den Cantilever gelenkt und von dort mit einem Spiegel auf die Mitte einer Vierquadranten-Diode geworfen. In b) ist das Grundprinzip der Einzelzellkraftspektroskopie gezeigt, der wir im Ergebniskapitel wiederbegegnen. Eine Zelle, die an einem spitzenlosen Cantilever hängt, wird auf einen Untergrund gedrückt und adhärert für kurze Zeit. Der Cantilever wird nach oben bewegt, wobei er sich durch die Adhäsionskräfte der Zelle mit dem Substrat verbiegt. Wenn die Kräfte größer werden, lösen sich adhärenzte Teile der Zelle vom Untergrund, was in den Kraftkurven zu beobachten ist. Grafik c) zeigt den prinzipiellen Verlauf einer Messung, wie wir sie zur Bestimmung der Materialparameter unserer Fotolacke durchführen. Der Cantilever wird mit einer voreingestellten Kraft axial auf einen dünnen Balken gedrückt. Je flexibler der Balken desto größer die Verbiegung. Abbildung a) nach [167].

Zur physikalischen Charakterisierung unserer Fotolacke verwenden wir ebenfalls das AFM. Ein spitzenloser Cantilever wird mit Schrittmotoren genau in die Mitte unserer Teststrukturen gefahren (Abb. 4.8 c). Diese bestehen aus zwei Säulen, die so massiv sind, dass eine Verformung während der Messung nicht beobachtbar ist. Dazwischen spannt sich jeweils ein Balken auf, der durch die axiale Bewegung mit einem Piezomotor des Cantilevers verbogen werden kann. Der Verfahrensweg zwischen dem ersten Kontakt zum Balken und einer voreingestellten maximalen Kraft wird über die Kraft aufgetragen. Allerdings besteht der komplette Verfahrensweg des Piezos aus der Verbiegung des Cantilevers und der Verformung des Balkens. Für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls, die in Kapitel 6 für mehrere Fotolacke durchgeführt wird, muss die Verformung des Cantilevers aus den Messwerten herausgerechnet werden. Dies geschieht dadurch, dass der Cantilever auf eine sehr harte Glasoberfläche gedrückt wird. Man nimmt an, dass das Glas sich nicht verformt und so die elastischen Eigenschaften des jeweiligen Cantilevers gemessen werden. Zieht man diese Messwerte von den Kurven ab, die den Verfahrensweg des Piezomotors über die Kraft darstellen, erhält man die Verbiegung eines Balkens aufgetragen über die Kraft. Wenn man die experimentellen Biegelinien von unterschiedlich dicken Balken mit den theoretischen

Überlegungen der Balkentheorie vergleicht, kann man auf den Elastizitätsmodulus des untersuchten Materials schließen.

## 4.4. Aufnahmen in 3D

### Zellen und Zellfärbung

In unseren Experimenten verwenden wir unterschiedlichste Zelltypen. Man unterscheidet im allgemeinen zwischen Zelllinien und primären Zellen. Zelllinien können monatelang in einem Medium vermehrt werden und lassen sich somit relativ einfach zu Experimenten verwenden. Im Gegensatz dazu müssen primäre Zellen kurz vor den Experimenten direkt aus Lebewesen präpariert werden und überleben typischerweise nur einige Tage. Das Gewebe eines Lebewesens besteht aus mehreren Zelltypen und Bindegewebe, weshalb die Isolierung von beispielsweise Kardiomyozyten nicht einfach ist [141]. Ein zweites Unterscheidungsmerkmal, auf das wir in den Ergebnissen hinaus wollen, ist die Herkunft des Gewebes. Zellen, die wir verwenden, kommen entweder aus dem Bindegewebe (Fibroblasten) wie B16, MEF sowie primären Hühnerfibroblasten, dem Parenchymal (Gewebezellen mit speziellen Funktionen) wie BRL-Zellen, oder aus Deckgewebe (Epithel) wie den A549-Zellen oder NRK-Zellen. Die Umgebung, in der jeder Zelltypus natürlicherweise vorkommt, unterscheidet sich in chemischer, physikalischer und nachbarschaftlicher Beziehung zu den anderen Zellen stark.

Für die Experimente werden die Strukturen in Ethanol gewaschen oder mit UV-Strahlung behandelt, um Keime abzutöten. Nach mehrmaligem Waschen in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) werden die Zellen in einem serumfreien Medium auf den Strukturen ausgesät. Nach einiger Zeit (meistens im Zeitraum von Stunden) fixiert man die Zellen chemisch mit einer Paraformaldehydlösung und macht die Zellmembran durch eine PBS-Triton Mischung durchlässig für die folgende Färbung mit Fluorophoren. Der Zellkern wird direkt mit dem Farbstoff DAPI gefärbt, der an die DNA bindet. Aktin wird ebenfalls direkt mit Phalloidin, das mit dem Farbstoff Alexa-488 gebunden ist, markiert. Fibronectin und die meisten Adhäsionsproteine (wie Paxillin) werden über eine indirekte Färbung gelabelt. Dazu werden Antikörper, die gegen die Zielproteine wirken, in die Zelle gebracht. Nachdem diese an ihr Zielmolekül gebunden haben, wird ein Sekundär-Antikörper, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist, gegen den Primär-Antikörper gerichtet. Die Deckgläschen mit den Strukturen und den immunohistologisch gefärbten Zellen werden entweder direkt mit einem Wasserobjektiv beobachtet oder auf einem Objektträger mit Mowiol fixiert und mit Ölimmersionsobjektiven mikroskopiert.

## Konfokale Mikroskopie

Einfache Fluoreszenzmikroskope beleuchten die gesamte Probe und man kann ohne Probleme einzelne Zellen unterscheiden. Sie sind gut für flache Proben geeignet und einfach zu bedienen. Wir wollen in unseren Experimenten allerdings das Verhalten von einzelnen Zellen, oder noch sehr viel kleineren Zellbestandteilen, innerhalb von dreidimensionalen Strukturen untersuchen. Wir brauchen also eine Technik, die die axiale Richtung während der Aufnahmen in Ebenen unterteilt, die dann später zu dreidimensionalen Rekonstruktionen zusammengesetzt werden können. Deshalb verwenden wir überwiegend ein LSM 510 (Zeiss). Ein LSM (engl.: laser scanning microscope) wird aufgrund seiner Arbeitsweise auch Konfokalmikroskop genannt (Abb. 4.9).

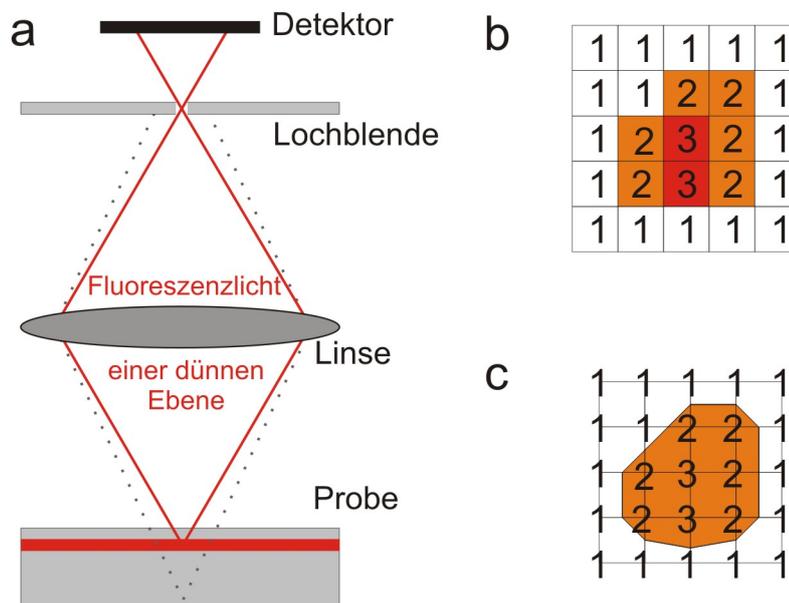


Abbildung 4.9: In a) ist das Detektionsprinzip eines Konfokalmikroskopes zu erkennen. Der Fokus des Anregungslasers (hier nicht gezeigt) wird in einer Ebene (plan-korrigiertes Objektiv) der Probe mit beweglichen Spiegeln gerastert. Das Fluoreszenzlicht aus dieser Ebene wird über die selben Spiegel zurückgeführt und auf ein kleines Loch einer Blende abgebildet. Dieses Licht kann ungehindert passieren und trifft auf einen Detektor. Das Licht von Fluorophoren, die nicht in der Fokusebene abstrahlen, wird größtenteils durch die Blende absorbiert. In b) Fluoreszenzmodus und c) Isointensitätsmodus sind zweidimensionale Darstellungen von Daten, die aus Fluoreszenzbildern gewonnen werden, gezeigt. Wir setzen in diesen Beispielen zur Unterdrückung des Hintergrunds den Diskriminatorwert auf 1,5. In b) werden die Kästchen entsprechend ihres Intensitätswertes unterschiedlich stark dargestellt. Die Methode in c) gewichtet die Einträge zwischen den Verbindungslinien zweier Werte und setzt dort einen Punkt. Die Punkte werden am Ende miteinander verbunden. Der Bereich mit Einträgen größer als der Diskriminatorwert wird dargestellt. Abbildung a) nach [168].

Ein Laserstrahl wird durch ein plan-korrigiertes Objektiv fokussiert und rastert eine Ebene ab. Das Fluoreszenzlicht der gesamten Probe wird durch das Objektiv aufgefangen und auf eine Lochblende fokussiert, die genau so platziert ist, dass das Licht aus dem Fokus ungehindert passieren kann und das Fluoreszenzlicht unter oder über dieser fokalen Ebene geblockt wird. Die einzelnen Ebenen werden in axialer Richtung so gewählt, dass die PSF (engl.: point spread function) benachbarter Ebenen sich überlappen. Die Aufnahmen können nach der Festlegung des Aufnahmebereichs und der Laserintensitäten vollautomatisch in bis zu vier unterschiedlichen Farbkanälen erfolgen. Wie auch im Falle des Direkten Laserschreibens hat eine punktförmige Quelle wegen der beschränkten numerischen Apertur eine PSF, die einem verlängerten Rotationsellipsoiden gleicht. Deshalb ist das Auflösungsvermögen in den lateralen Achsen höher als der axialen. Dies führt dazu, dass rekonstruierte Bilderstapel, die seitlich angezeigt werden, häufig sehr flächig wirken. Das Fluoreszenzlicht, das die Lochblende passiert, wird von einem Detektor aufgenommen und orts aufgelöst in einer Bilddatei gespeichert. Dies kann mit bis zu  $2048 \times 2048$  Bildpunkten und 12 Bit Farbtiefe geschehen. Unsere Standardeinstellungen liegen aus Zeitgründen und der Größe eines Bilderstapels (dieser ist immer noch häufig etwa 600 MB groß) bei  $1024 \times 1024$  Bildpunkten. In jedem Bildpunkt ist ein Intensitätswert angegeben. Außerdem werden Meta-Daten wie zum Beispiel die Abstände zwischen den einzelnen Ebenen in einer Stapeldatei abgespeichert.

Mit geeigneten Grafikprogrammen (Zeiss, Volocity) kann man auf diese Dateien zugreifen und dreidimensionale Rekonstruktionen erstellen. Dies geschieht dadurch, dass man das Gesamtvolumen in kleine Elemente unterteilt, denen eine Falschfarbe (für jeden Farbkanal) und ein Helligkeitswert (Intensitätswert an einem bestimmten Aufnahmezeitpunkt) zugeteilt wird (Abb. 4.9 b). Eine zweite Möglichkeit zur Darstellung der LSM-Rohdaten wird nun diskutiert. Man umschließt Punkte über einem bestimmten Schwellwert mit Isointensitätsflächen (Abb. 4.9 c), die man z.B. mit einem Marching-Cube Algorithmus erzeugen kann. In beiden Fällen versucht man den Hintergrund jedes Farbkanals zu minimieren, indem Intensitätswerte, die unter einer gewissen Schwelle liegen, als Nullintensität aufgefasst werden. Allerdings kann man in Abbildung 4.9 (b und c) schon erkennen, dass die Fläche einer Ebene (in drei Dimensionen das Volumen) abnimmt, wenn man den Diskriminatorwert höher setzt.

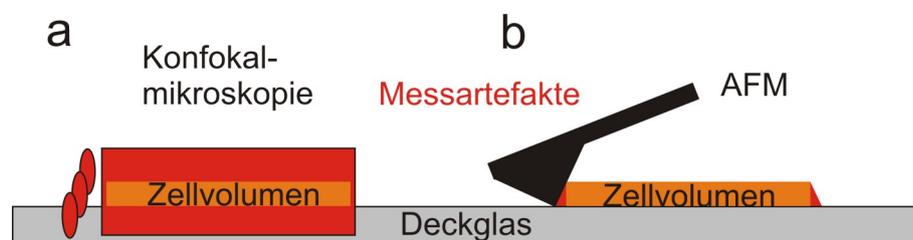


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung einer Volumenmessung a) mit einem konfokalen Mikroskop und b) eines AFM einer flachen Zelle.

Es ist klar, dass die Intensität, die der Detektor erfasst, von vielen Einflussfaktoren abhängt. Die immunohistologische Färbung hat nicht immer die selbe Qualität, weshalb die Einstellungen des Konfokalmikroskops vor den Aufnahmen angepasst werden müssen. Wenn in dreidimensionalen Strukturen viele Grenzflächen (Struktur, Zellkompartimente) auftreten, können Streueffekte die tatsächliche Strahlstärke der Fluorophore verfälschen. Dieser Effekt wird vor allem sichtbar, wenn tief in eine Probe hineinfokussiert werden muss (Absorption kann natürlich auch eine Rolle spielen), was durch die Nachregelung der Laserleistung kompensierbar ist. Die Fluorophore degradieren durch die Einwirkung des Anregungslasers oder über die Zeit. Wenn man nun zusätzlich die Anzeigeparameter in den Grafikprogrammen so optimiert, dass die ansprechendsten Bilder entstehen, kann man sich vorstellen, dass quantitative Aussagen über geringe Unterschiede von Volumen oder Flächen sehr schwer zu erreichen sind (Abb. 4.10). Der beugungsbegrenzte Aufnahmebereich eines LSM wird vor allem bei sehr flachen Zellen auf einem Glassubstrat zum Problem. In Abbildung 4.10 a kann man erkennen, dass eine flache Zelle ein viel zu großes Zellvolumen durch Messartefakte des LSM erhalten würde. Aus diesem Grund verwenden wir für die Volummessungen von Zellen auf zweidimensionalen Substraten ein AFM (Abb. 4.10 b). In unseren Experimenten wird stets versucht alle Parameter so konstant wie möglich zu halten, was z.B. durch die Färbung einer großen Anzahl von Proben am gleichen Tag und mit der gleichen Färbelösung geschehen ist.

# 5. Niederdimensionale Vorexperimente

In den folgenden zwei Kapiteln werden die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert. Die Kombination des Direkten Laserschreibens mit Fotolacken, die für spezielle Aufgaben geeignet sind, liefert gute Resultate. Wir konzentrieren uns zuerst auf niederdimensionale Versuche, die vor allem dazu dienen, die Performance der Fotolacke zu testen und sie mit anderen Strukturierungstechniken (Stempeltechniken) vergleichbar zu machen. Die Versuche Glasplättchen zweidimensional mit Haftproteinen zu strukturieren, damit die Zellen nur an vordefinierten Bereichen die Möglichkeit haben Kontakte zu bilden, sind die Grundlage für die spätere Strategie Direktes Laserschreiben auf dreidimensional strukturierte Template zu erweitern. Die Herstellung von Säulenreihen folgt als nächster Schritt. Wie in Kapitel 3 erwähnt, kann man die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Säulenelemente gut über die Höhe, das Material und den Durchmesser steuern. Außerdem sind Säulen als Unterlage geeignet, wenn es um sensible Messungen wie der Einzelzellspektroskopie geht. Eine einzelne Zelle wird mit einem Cantilever eines AFMs auf verschiedene Untergründe gepresst und man kann z.B. die Zeitabhängigkeit der Kontaktbildung untersuchen. Kraftmikroskopie ist so sensibel, dass ein Brechen selbst einzelner Integralkontakte auflösbar ist. Deshalb ist es eine gute Idee Säulen als Punkte, die Kontakte ermöglichen, zu verwenden und die Luft zwischen den Säulen als nicht kontaktierbare Bereiche auszunutzen. Diese Experimente sind wegen der Zellmigration zeitlich begrenzt (Minutenbereich). Säulen erscheinen einer Zelle als zweidimensionale Unterlage, obwohl eine axiale Ausdehnung vorhanden ist.

## 5.1. Zweidimensionale Strukturierung

In diesem Abschnitt werden wir die Vorexperimente vorstellen, die gemacht wurden, um antiadhäsive Materialien auf ihre Eignung für die dreidimensionalen Strukturierung zu testen. Die Idee ist von den zweidimensionalen Stempeltechniken inspiriert. Auf einem antiadhäsiven Hintergrund gibt es Bereiche (kleine Haftpunkte), die für die Zellen zugänglich sind. Wir verfolgen anfangs zwei Strategien (Abb. 5.1). (i) Eine Struktur aus üblichem Fotolack mit einer antiadhäsiven Schicht zu versehen und diese durch Laserablation teilweise wieder zu entfernen. (ii) Eine antiadhäsive Struktur direkt zu erzeugen und diese mit Punkten aus adhäsivem Fotolack zu funktionalisieren.

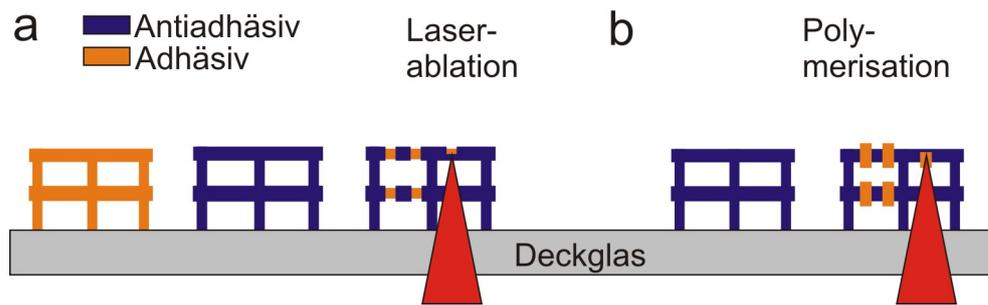


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung unserer zwei Strategien Zellen die Haftpunkte in drei Dimensionen vorzugeben. In a) ein Fotolack (orange) wird dünn mit einer antiadhäsiven Schicht (blau) benetzt. Die Punkte, an die sich Proteine anhaften sollen, werden durch Laserablation (im Laserfokus) an spezifischen Stellen zugänglich gemacht. In Strategie b) werden die dreidimensionalen Strukturen direkt aus antiadhäsiven Materialien (blau) gefertigt und die Haftstellen durch die Anbringung eines zweiten proteinadsorbierenden Lacks (orange) erzeugt.

Als ersten Test bringen wir Substanzen, die in der Literatur als zellabweisend gelten, gleichmäßig auf einem Glasplättchen auf. Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) ist ein solcher Kandidat. PVP ist wasserlöslich, biokompatibel, chemisch stabil und biologisch inert [169].

Die Substanz wird häufig in medizinischen Produkten verwendet, um beispielsweise vor unspezifischen Bindungen von Plasmaproteinen mit einer Plastikoberfläche zu schützen. Wir verwenden das Protokoll von [169] und beschichten  $22 \times 22 \text{ mm}^2$  Deckgläser mit einer Mischung aus Wasser und zehn Gewichtsprozent PVP. Auf diese Weise sollte die Glasoberfläche für Proteine und Zellen passivierbar sein. Doch in Abbildung 5.2 zeigt sich ein starker Fibronectinhintergrund (rot) und die Zellen können anscheinend sehr gut anhaften.

Es könnte sein, dass PVP in unserem Fall während verschiedener Waschvorgänge der Zellpräparation entfernt wird und sich das Haftprotein direkt auf der Glasoberfläche angelagert hat. In neueren Veröffentlichungen gibt es Möglichkeiten die Löslichkeit in Flüssigkeiten durch tempern auf einer Heizplatte einzustellen, damit die Schichten aus PVP auch in einer Nährlösung für Zellen stabil auf ihrem Untergrund haften bleiben könnten [170].

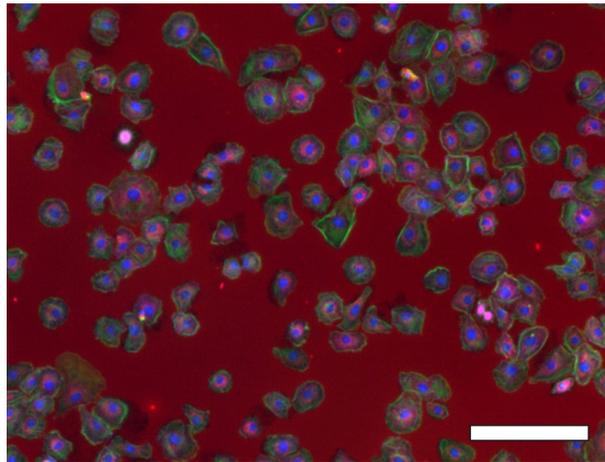


Abbildung 5.2: Eine Fluoreszenzaufnahme des Zellverhaltens auf einer Schicht aus PVP. Die Zellen sind auf Aktin (grün) und den Kern (blau) gefärbt. Fibronectin (rot) haftet stark auf der Oberfläche und die Zellen zeigen ein ausgeprägtes Adhäsionsverhalten. Skalenbalken 100  $\mu\text{m}$ .

Für einen zweiten Versuch der Oberflächenpassivierung verwenden wir einen langkettigen Polyvinylalkohol (PVA, Molekulargewicht 98.000 u) von Sigma–Aldrich. PVA zeigt antiadhäsive Eigenschaften [171]. Die Verhinderung der Bildung von Narbengewebe nach Operationen kann als Anwendungsgebiet in Frage kommen [172]. Der pulverförmige Stoff wird zu zehn Gewichtsprozent in Wasser gelöst und anschließend auf einem Glasplättchen mit einer Lackschleuder für 30 Sekunden bei 2000 Umdrehungen pro Minute gleichmäßig aufgebracht. Danach wird das Wasser auf der Heizplatte für etwa 10 Minuten ausgekocht, damit eine homogene wasserunlösliche Schicht entsteht. Die Strukturierung durch Laserablation erfolgt mit einem gepulsten zwei Watt Ti:Saphir-Lasersystem mit einer Wiederholrate von 80 MHz. Die Halbwertsbreite der Pulse liegt bei etwa 120 fs, was einen thermischen Abtrag ausschließt. Das System wird normalerweise zum Direkten Laserschreiben verwendet, ist aber bei maximaler Leistung und gut justiertem Strahlengang für die Laserablation von PVA geeignet. In Dielektrika wie PVA ist es möglich, den Abtrag durch Coulomb-Explosionen zu erzeugen. Die Atome werden durch einen stark fokussierten Laser ionisiert und die Elektronen weggerissen. Die starke Abstoßung der zurückgelassenen Ionenrümpfe bewirkt Explosionen, die das Material dann entfernen können [173]. In Abbildung 5.3 kann man ein Durchlichtbild der Strukturierungsversuche erkennen. Es werden einfache Linien und Kästchen, wie sie bei Stempeltechniken üblich sind, in die Schicht aus PVA geschnitten.

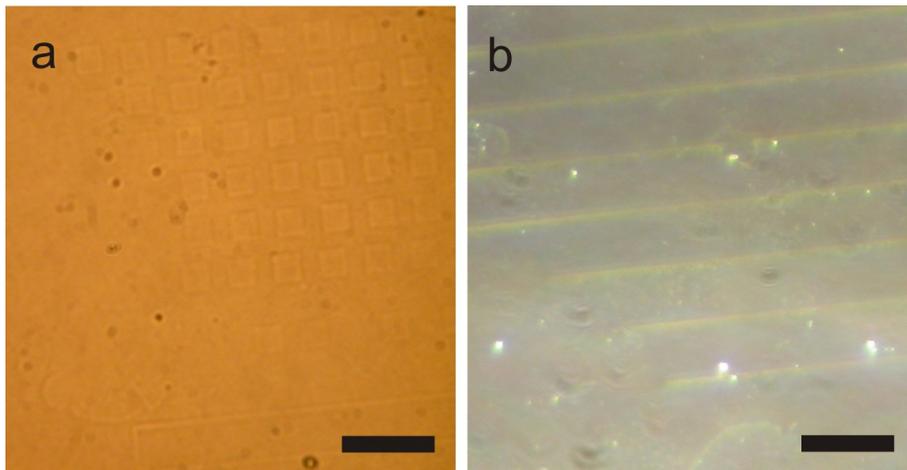


Abbildung 5.3: Die Durchlichtaufnahmen in a) und b) zeigen Resultate der Laserstrukturierung. In a) sind kleine Quadrate von nominell  $5\ \mu\text{m}$  Kantenlänge zu erkennen, am unteren Bildrand einfache Linien. Grafik b) zeigt eine vergrößerte Ansicht der Linien, die in die Schicht aus PVA geschrieben sind. Skalenbalken  $20\ \mu\text{m}$ .

Es ist auffällig, dass die Elemente nicht immer den selben Kontrast zeigen. Dies liegt nicht an der Mikroskopie, sondern an einem leicht schrägen Einbau der Probe während der Prozessierung. Die dünne PVA Schicht wird in diesem Setup per Hand gesucht. Durch die Variation der Fokusposition in axialer Richtung werden bei voller Laserleistung einzelne Punkte geschossen. In der Glasschicht findet keine Reaktion statt, aber sobald der Fokus in das Material fährt, kann man einen veränderten Brechungsindex des PVA erkennen. Diese Prozedur wird an einer Stelle durchgeführt und die Probe auf eine unbeschriebene Position direkt neben den Einschussstellen gefahren. Ein leicht schräger Einbau führt während der Piezobewegung dazu, dass der Fokus in das Glasplättchen (unter der PVA-Schicht) oder die Luftschicht (über der PVA-Schicht) gelangt und eine Strukturierung (mangels ausreichender Intensität) nicht mehr möglich ist.

Im folgenden Schritt werden die Substrate mit dem Haftprotein Fibronectin gleichmäßig beschichtet und BRL-Zellen aufgebracht. Nach einigen Stunden kann man erkennen, dass die Zellen auf die Strukturen reagieren und sich danach ausrichten (Abb. 5.4). Allerdings spannen sich die Zellen auch auf der PVA-Oberfläche sehr gut auf. Die Kanten und Unebenheiten auf dem sonst glatten PVA, die durch die Laserablation entstehen, sind als Ankerpunkte für Haftpunkte und zur Kraftübertragung besser geeignet als die flache Oberfläche. Die Zellen richten sich deshalb nach den Konturen der Strukturierung aus.

Wir wollen zu einem späteren Zeitpunkt nicht nur die Glassubstrate beschichten, sondern auch dreidimensionale Strukturen. Deshalb sind Prozesse, die schnelle Aufschleudervorgänge beinhalten, wahrscheinlich nicht förderlich für die Qualität der

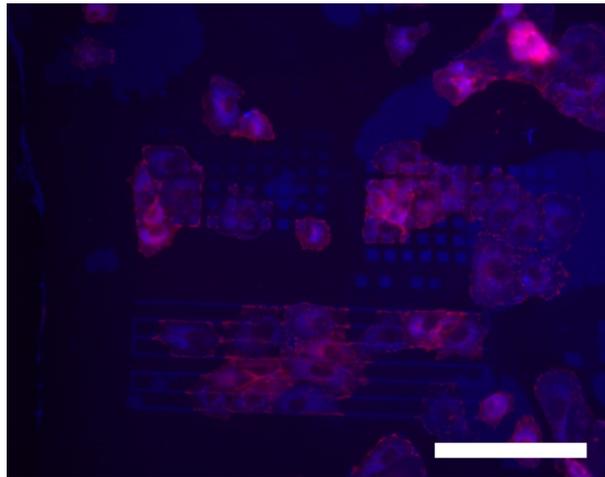


Abbildung 5.4: Die Strukturen von Abbildung 5.3 nun mit Fibronectin (blau) beschichtet. Die Haftpunkte (Paxillin) in rot zeigen sich vor allem in den Bereichen, in denen viel Fibronectin vorhanden ist. Auf der intakten PVA Schicht sind wesentlich weniger Zellen zu erkennen. Die Oberflächenqualität ist sehr unterschiedlich, was man an großen blauen Gebieten (viel Haftprotein) und an Gebieten mit relativ wenig Proteinhintergrund sehen kann. Skalenbalken  $100 \mu\text{m}$ .

Strukturen. In der Gruppe von Jörg Lahann können per Gasphasenabscheidung verschiedene antiadhäsive Stoffe schonend auf Oberflächen aufgebracht werden [174]. Eine kleine Auswahl der verschiedenen (PEG-basierten) Beschichtungen und die Zellreaktion auf die Materialien sind in Abbildung 5.5 zu sehen. Man erkennt deutliche Unterschiede in der Zellgröße und -zahl zwischen den verschiedenen Oberflächen. Eine komplette Passivierung wird aber in keinem Fall erreicht.

Unsere erste Idee dreidimensionale Template durch dünne Beschichtungen antiadhäsiv zu machen, zeigt zwar Auswirkungen, aber die Ergebnisse sind nicht perfekt. Die Template könnten später teilweise durch Laserablation wieder von ihrer antiadhäsiven Beschichtung befreit und für Zellen attraktiv gemacht werden. Die nicht optimale Qualität der Oberflächen und die Tatsache, dass die Template aus Fotolacken bei falscher Fokussierung während der Laserablation zerstört werden können, führen zu einem Strategiewechsel. Wir werden die 3D-Strukturen selbst aus nichtadhäsiven Materialien fertigen und im Nachhinein durch einen zweiten Fotolack den Zellen wieder zugänglich machen. In diesem Abschnitt werden wir auf die Vorcharakterisierung der antiadhäsiven Fotolacke eingehen und die dreidimensionalen Beispiele im nächsten Kapitel näher erläutern. Zur Herstellung verwenden wir nun ausschließlich das Lithographiesystem des Unternehmens Nanoscribe GmbH.

Polyethylenglykoldiakrylat (PEGDA) ist per Direktem Laserschreiben polymerisierbar. Dies kann entweder als Hydrogel gemischt in Wasser [175, 176] oder direkt mit Hilfe eines Fotoinitiators geschehen. Die bisher veröffentlichten Strukturen sind meis-

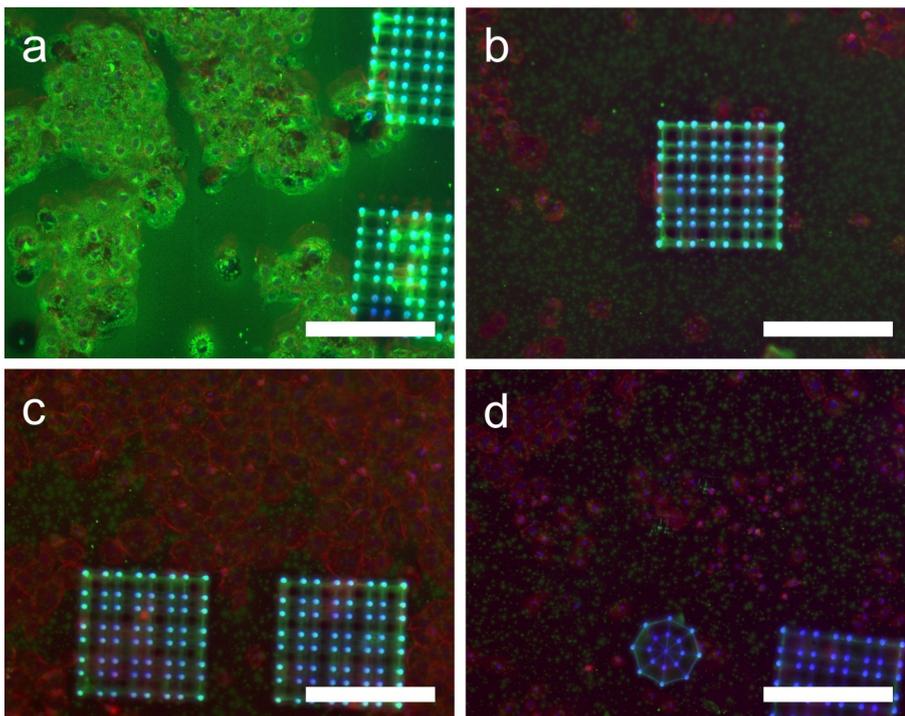


Abbildung 5.5: Die Grafiken (a-d) zeigen vier unterschiedliche PEG-basierte Beschichtungen. Fibronektin (grün), Paxillin (rot) und der Kerne (blau) fluoreszenzgefärbt. Auf allen Bildern erkennt man, dass ein unregelmäßiger (gepunkteter) Fibronektinhintergrund vorhanden ist. In a) und c) ist die Zelldichte und -größe stark ausgeprägt. In b) und c) sind die Fläche der Zellen und die Anzahl wesentlich reduziert. In den 3D-Strukturen sind nur vereinzelt Zellen zu erkennen. Skalenbalken  $200 \mu\text{m}$ .

tens zu groß, um Experimente auf Einzelzellenniveau durchführen zu können. Wir benutzen in unseren ersten Tests PEGDAs mit unterschiedlichen Molekulargewichten (258 u, 575 u, 700 u). Wenn man Glasoberflächen mit nichtakrylierten PEGs passiviert zeigt sich oft, dass die zellabweisende Wirkung mit zunehmender Molekülgröße besser wird. Längerkettige PEGDA Moleküle, als wir sie verwenden, liegen in Pulverform vor. Deren Verwendung würde bedeuten, dass man die Moleküle in Wasser lösen müsste, um die Basis für einen Fotolack zu schaffen. Es gibt Fotoinitiatoren, die wasserlöslich sind (Irgacure 2959) und man hätte die Möglichkeit die mechanischen Materialeigenschaften durch den Zusatz von Wasser zu variieren. Irgacure 2959 ist jedoch nicht so effizient, wie der von uns verwendete Irgacure 369 und das Lösungsmittel Wasser könnte mit der Zeit verdampfen. Die Zahl der Einflussfaktoren ist also größer und die Endresultate wären schlecht reproduzierbar. Deshalb verwenden wir flüssige PEGDAs als Monomere, in denen sich der weitverbreitete Fotoinitiator Irgacure 369 ohne Probleme direkt lösen lässt.

Wir mischen anfangs die reinen PEGDA Monomere mit drei Gewichtsprozent Irgacure 369. Die Menge des Fotoinitiators kann ohne sichtbare Auswirkungen auf die Ergebnisse auf ein Gewichtsprozent erniedrigt werden. Der Fotolack PEGDA mit einem Molekulargewicht von 700 u und drei Gewichtsprozent Fotoinitiator wird im folgenden mit PEGDA 700 abgekürzt (die anderen Monomere entsprechend ihres Molekulargewichts).

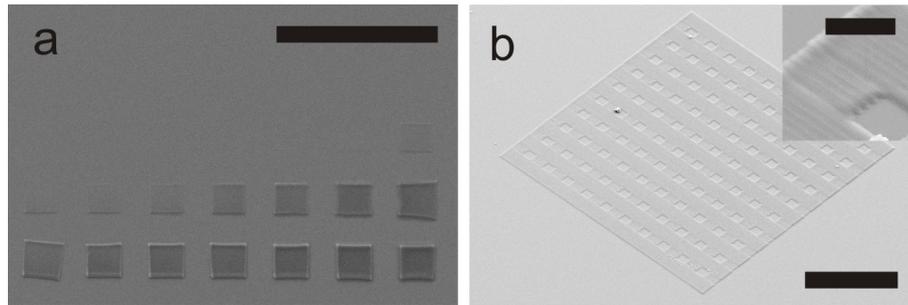


Abbildung 5.6: Schreibtest mit PEGDA 700. In a) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Dosistests des Fotolacks direkt an der Glas-Lackgrenzfläche zu sehen. Die Quadrate mit einer Kantenlänge von  $20 \mu\text{m}$  werden mit unterschiedlichen Laserleistungen geschrieben. Die übrigen Geräteparameter sind konstant. Man sieht sehr gut, dass die Größe des Schreibvoxels mit zunehmender Laserenergie immer weiter zunimmt und der Kontrast zwischen der Glasoberfläche und den Polymerfeldern größer wird. Bei manchen Quadraten nimmt die Grundfläche zu, was an der Materialausdehnung während des Entwicklungsvorgangs liegt. Dieses Problem wird uns später noch beschäftigen. In b) kann man eine Struktur zum Testen der Passivierungseigenschaften erkennen. Der Fotolack hebt sich nur einige  $100 \text{ nm}$  von der Umgebung ab. Der Einschub zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer freien Glasstelle. Das Material ist sehr glatt, zeigt aber noch eine leichte Überstruktur. Skalenelemente in a)  $100 \mu\text{m}$  und in b)  $50 \mu\text{m}$  (Einschub  $5 \mu\text{m}$ ).

Die ersten Versuche einen neuen Fotolack zu charakterisieren besteht immer darin, Linien mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten des Piezoscanners und großen Dosisvariationen auf einem Glasplättchen zu polymerisieren. Wenn bei diesen Vorversuchen keine Linien zu sehen oder nur sehr kleine Parameterspielräume erreichbar sind, weil z.B. die ersten sichtbaren Linien und die Zerstörschwelle des Fotolacks sehr nahe beieinander liegen, sollte man die Lackzusammensetzung optimieren oder auf ein anderes Lacksystem übergehen. Diese Probleme potenzieren sich nach unserer Erfahrung bei dreidimensionalen Schreibversuchen so sehr, dass keine brauchbaren Ergebnisse zu erwarten sind. Diese Versuche verlaufen im Falle der verschiedenen PEGDA-Lacke sehr gut, weshalb wir im nächsten Schritt flächige Strukturen (Abb. 5.6) produzieren.

Flüssige Fotolacke neigen häufig dazu, dass sich Miniexplosionen<sup>1</sup> bilden, wenn mit dem Laser sehr nahe an bereits polymerisierten Bereichen gearbeitet wird. Die typischen Laserleistungen bei einer Verfahrgeschwindigkeit des Piezos von  $200 \mu\text{m}$  pro Sekunde liegen innerhalb von 50 - 75 % der Maximalleistung (30 mW vor dem Objektiv). Die Ergebnisse sind qualitativ gut und es sind keine Störungen innerhalb der Strukturen zu erkennen, die von materialabhängigen Ursachen im Schreibprozess stammen könnten (Abb. 5.6). Der Kippwinkelausgleich des Nanoscribe-Systems ist für diese Versuche von entscheidender Bedeutung. Man kann keinen Kontrastunterschied (und damit Höhenunterschied) an allen vier Kanten der Fläche entdecken (Abb. 5.6 b). Die Proben sind in ihrem Halter im Normalfall maximal um 0,5 Grad verkippt (gemessene Werte aus Versuchen). Bei einer Kantenlänge von  $100 \mu\text{m}$  und einer Polymerhöhe von geschätzten 300 nm würde ein Höhenunterschied der Grenzfläche (im Extremfall) von etwa 900 nm große Auswirkungen haben. Wenn man sich das eingeschobene Bild (Abb. 5.6 b) genauer anschaut, erkennt man einzelne Linien, die durch den Proximity-Effekt zu einer fast homogenen Fläche verschmelzen. Die lackfreien Bereiche erreicht man durch ein kurzes Ausschalten des Laserstrahls. Die Software des Nanoscribe-Geräts versucht die Trägheit des Piezoscanners durch die Anpassung der Laserleistung bei Beschleunigungs- und Abbremsvorgängen anzupassen. Die Werte sind für Fotolacke des Unternehmens optimiert und können bei anderen Produkten durch ein anderes Ansprechverhalten zu Versetzungen der Linien führen.

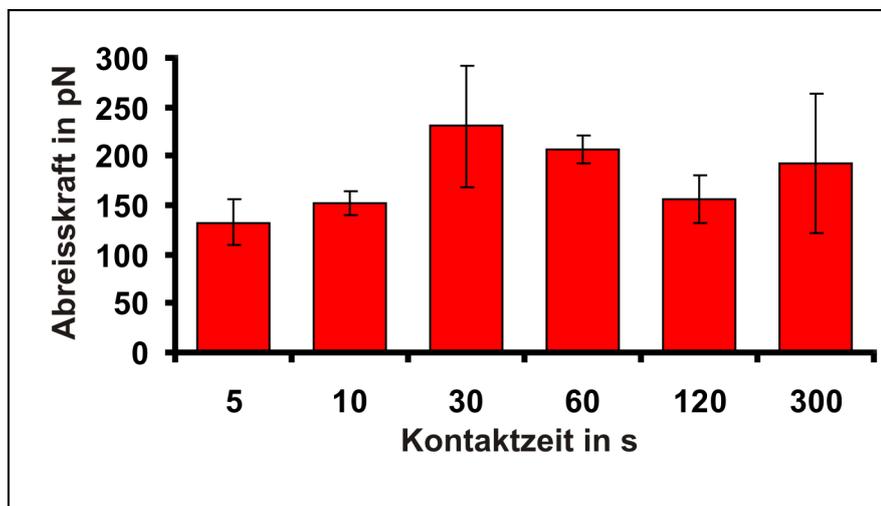


Abbildung 5.7: Die Zellen werden unterschiedlich lange auf die PEGDA 700 Polymerlage gedrückt. Man erkennt sofort, dass sich die Adhäsionskräfte mit der Kontaktzeit kaum verändern und auf sehr geringem Niveau verbleiben. Jeder Balken entspricht sechs Einzelzellversuchen. Daten von Lu Dao.

<sup>1</sup>Während der Vernetzung von Fotolacken entstehen Gase, die schnell abdiffundieren müssen. Bei hoher Laserleistung kann es sein, dass die Löslichkeit im Lack nicht ausreicht, um die Ausbildung von Gasblasen zu verhindern.

Auf einer flachen PEGDA 700 Oberfläche testen wir die Leistungsfähigkeit unserer Schichten per Einzelzellspektroskopie, die von Lu Dao in der Arbeitsgruppe Franz mit CHOwt-Zellen (Hamster) ausgeführt worden ist. Das Glasplättchen mit den Testfeldern wird in ein Gefäß mit Nährlösung gebracht und die Zellen ausgesät. Der flache Cantilever-Arm eines AFM, der mit Haftproteinen beschichtet ist, fährt auf eine zufällige Zelle bis diese adhäriert. Danach drückt man diese Zelle auf den zu testenden Untergrund und entfernt sie nach kurzer Zeit wieder von dem Substrat. Die Verbiegung, die der Cantilever bis zum Ablösen der Zelle erfährt, entspricht der Maximalkraft der Haftung. Das Ergebnis auf einem PEG-Untergrund wird in Abbildung 5.7 deutlich. Die Kräfte, mit der die Zelle sich an der PEG-Oberfläche hält, entsprechen etwa dem Wert, um eine kovalente Bindung zu lösen. Diese Zahl ist extrem niedrig, wenn man sich vor Augen hält, dass die Zelle mit einer Fläche von typischerweise einigen 100 Quadratmikrometern mit dem Material in Kontakt tritt. In diesem Experiment wurden die antiadhäsiven Flächen keinem Haftprotein ausgesetzt. Dies entspricht nicht ganz der späteren Situation. Die Kontaktstärke ist dennoch die geringste, die die Arbeitsgruppe Franz auf einer Oberfläche je gemessen hat.

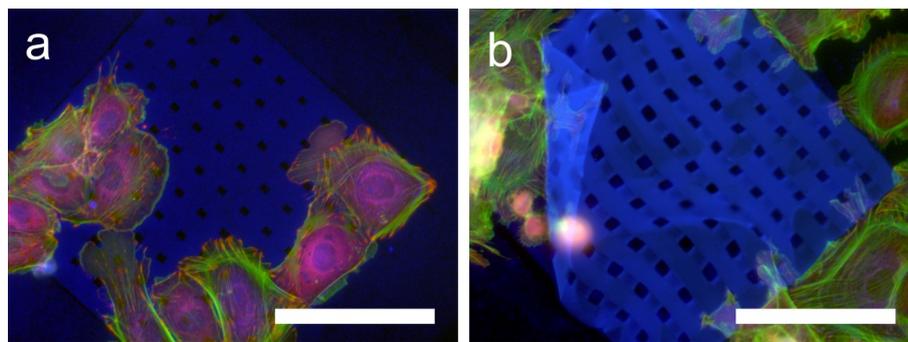


Abbildung 5.8: Fluoreszenzaufnahmen in a) und b) von Zellen, die auf Aktin (grün) und Paxillin (rot) gefärbt sind. Das Haftprotein Fibronectin ist in blau dargestellt, wird aber durch die Autofluoreszenz von PEG teilweise überstrahlt. In b) erkennt man das Ablösen einer Schicht aus PEG, was das gute Kontaktverhalten von Zellen auf eigentlich passivierten Bereichen erklären könnte. Skalenbalken in a) und b) 100  $\mu\text{m}$ .

Die Qualität der Bearbeitbarkeit und Oberflächenstruktur des PEGDA 700 Fotolacks ist sehr gut. Wie sehr sich die Lacke für eine Passivierung von Zellen eignen, muss nun untersucht werden. Dazu stellen wir Polymerflächen mit Glasabschnitten (Abb. 5.6 b) her und benetzen alle Oberflächen mit dem Haftprotein Fibronectin. Die ersten Ergebnisse sind unerwartet, weil das gefärbte Fibronectin in Fluoreszenzaufnahmen genau die umgekehrte Intensitätsverteilung zeigt, als wir es von einem antiadhäsiven Lack erwartet hätten. In Abbildung 5.8 a zeigt sich, dass auf dem Bereich, der von einer PEG-Schicht vor Proteinadsorption geschützt sein sollte, ein viel höheres Fluoreszenzlevel der gefärbten Haftproteine (rot) herrscht als auf dem umgebenden Glas. Die kleinen quadratischen Glas-Bereiche, die eigentlich als Haftpunkte dienen sollen,

zeigen nur sehr wenig Proteinbenetzung. In Abbildung 5.8 b kann man den möglichen Grund für diese Ergebnisse erkennen. Die PEG-Schichten sind sehr hydrophil. Sie saugen sich während des Entwicklungsprozesses mit dem Lösungsmittel und in den Zellexperimenten mit der Nährlösung voll. Es entstehen große Kräfte im Bereich der Polymer-Glasgrenzfläche, was zu einer Ablösung der Polymere führen kann, die sich in manchen Fällen aufrollen. Die Haftproteine werden während dieses Prozesses anscheinend von außen unter die Struktur gesaugt und die polymerfreien Bereiche bleiben von dem Beschichtungsvorgang unberührt.

Wie schon erwähnt ist PEG sehr hydrophil. Wenn man Wasser auf ein normales Glasplättchen (BK7) für die Mikroskopie gibt, bilden sich Tropfen mit einem sehr großen Kontaktwinkel zwischen Glasoberfläche und Wasser. Die Oberfläche ist sehr hydrophob und die Haftung zwischen Lack und Glas somit nicht optimal. Glas bietet in kristalliner Form keine geladene Oberfläche, was zum Beispiel durch die Benutzung eines Plasmaprozesses geändert werden kann. Bindungen des Glases werden von dem Plasma aufgebrochen und das polare Wasser kann diese aktivierten Oberflächen sehr viel besser benetzen. Der Effekt hält für wenige Stunden an, weil die offenen Bindungen langsam wieder rekombinieren. Die Haftung der Polymere auf Glas mit dieser einfachen Methode zu optimieren bringt, wie sich in Versuchen gezeigt hat, keine Verbesserungen.

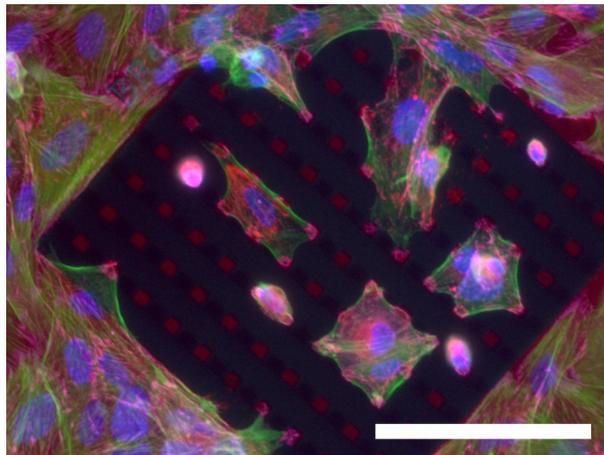


Abbildung 5.9: Die Situation entspricht Abbildung 5.8. Die Haftschrift zwischen Fotolack und Glas verhindert ein Ablösen. Die Zellen bilden ihre Haftpunkte nun vorwiegend auf den PEG-freien Bereichen aus. Skalenbalken 100  $\mu\text{m}$ .

In vielen Fällen ist es nötig die Glasoberfläche mit einem Haftvermittler zu beschichten, der eine bessere Haftung der Moleküle auf dem Glas garantiert. Wir verwenden für diesen Zweck ein 3-Methakryloxypropyltrimethoxysilan. Die Glasoberfläche muss mit einem Plasmareiniger (PlasmaPrep5 von Gala Instrumente) aktiviert werden, d.h. es werden Silizium-Sauerstoffbindungen aufgebrochen. Die Methoxy-Gruppen des Silans reagieren mit der radikalisierten Glasoberfläche und bilden kovalente Bindungen aus,

die sehr stark sind. Das Silan verfügt über eine Akrylgruppe, die während der Polymerisation des Fotolackes in das Polymernetzwerk eingebaut wird. Somit ist das Polymer nicht nur physikalisch, wie es der Situation ohne eine Beschichtung entspricht, sondern chemisch mit der Glasoberfläche verbunden. Diese starke Haftung ist besonders für fragile dreidimensionale Template, auf die wir im nächsten Kapitel zu sprechen kommen, wichtig für die Strukturqualität vor und während der Zellexperimente. In Abbildung 5.9 kann man das Ergebnis der Silanisierung, wie wir den Prozess bezeichnen, sehen. Die PEG-Schichten lösen sich nicht ab. Bereiche, die von einer Polymerschicht bedeckt sind, erscheinen fast schwarz. Das Glassubstrat zeigt eine homogene Proteinbedeckung. Die Proteine (hier Fibronectin) haften auch auf der silanisierten Glasoberfläche gut. Sie vermitteln den Zellen die Haftung zur Umgebung. An der Zellfärbung kann man erkennen, dass sich Haftkontakte fast ausschließlich auf Bereichen mit guter Fibronectinbedeckung bilden und die freien Bereiche werden wie in [88] größtenteils überspannt.

Für dreidimensional strukturierte Template werden wir PEG-basierte Lacke als anti-adhäsiven Teil unserer Zellgerüste verwenden. Aus Gründen, auf die wir zu einem späteren Zeitpunkt eingehen werden, ist es von Vorteil, wenn der sehr flexible Fotolack (PEGDA 700) mit Anteilen von stark quervernetzenden Polymeren gemischt wird. Das Gesamtlacksystem sollte Haftproteine nur wenig adsorbieren und leicht prozessierbar sein. Wir mischen die PEGDA Lacke daher mit Pentaerythrioltetraakrylat (PETA). Die vier freien Akrylenden des PETA-Moleküls versprechen eine gute strukturelle Stärke. PEGDA lässt sich ohne eine Phasenseparation mit PETA mischen. Im folgenden Teil verwenden wir PEGDA 575 für die Mischungen mit PETA. Dieses Fotolacksystem (mit drei Gewichtsprozent Irgacure 369) wird durch zweidimensionale Flächen getestet und später genau so in den 3D-Experimenten verwendet. Für die adhäsiven Anteile verwenden wir Ormocomp, weil wir sehr viel Erfahrungen mit diesem Fotolack gesammelt haben und er leicht prozessierbar ist. Die freien Glasstellen in den Strukturen wie sie in Abbildung 5.9 abgebildet sind, füllt man in einem zweiten Belichtungsprozess mit dem Ormocomp-Lack auf und erreicht durch passende Einstellungen, dass die beiden Lacke nur minimale Abweichungen in der Höhe zueinander zeigen.

In Experimenten in dreidimensionalen Strukturen wie auch in diesen Vorabtests werden primäre Hühnerfibroblasten verwendet. Dieser Zelltyp ist sehr groß und aufgrund seiner natürlichen biologischen Umgebung an eine dreidimensionale EZM angepasst. Die Gesamtfelder sind aus  $240 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$  großen Einzelteilen zusammengesetzt und aus einer Kombination von PETA und PEGDA in unterschiedlichen Konzentrationen gefertigt. Die kleineren adhäsiven Flächen ( $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ ) setzen sich allesamt aus Ormocomp zusammen. Das komplette Glasplättchen inklusive der Lacke wird mit Fibronectin und den Hühnerfibroblasten bedeckt. Die Zellen werden auf den Zellkern (blau) und Aktin (grün) gefärbt, um die einzelnen Zellen lokalisieren zu können. Für die Auswertung in Abbildung 5.10 sind aber nur die Bedeckung von Fibronectin (rot) und Paxillin (weiß) relevant. Der Fluoreszenzlevel des Haftproteins

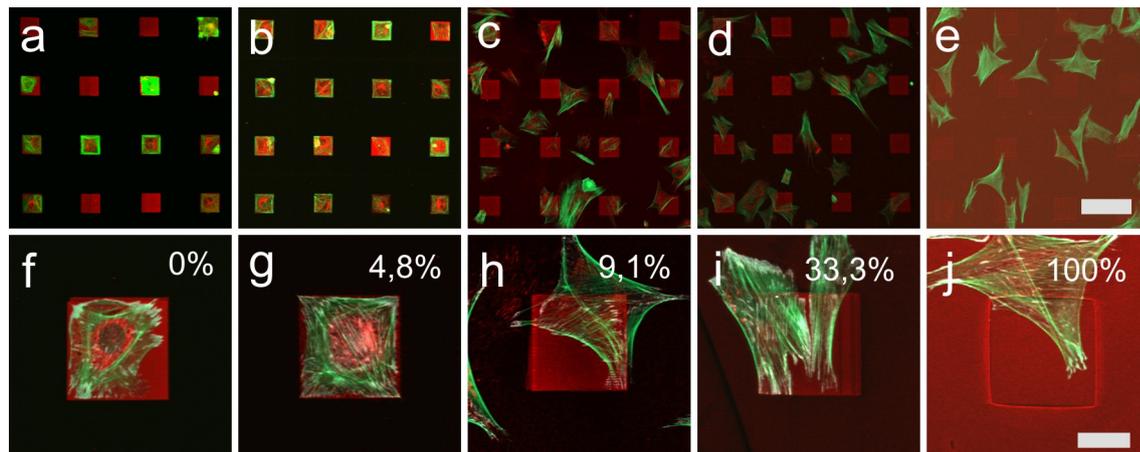


Abbildung 5.10: Übersichtsbilder (a-e) und Beispielaufnahmen (f-j) von Zellen, die in Kontakt mit Ormocomp (kleine Quadrate) und einem zweiten PEG-basierten Lackgemisch (PETA zu PEG Verhältnis in Gewichtsprozent) sind. Skalensbalken in e) (erste Zeile) entspricht  $100 \mu\text{m}$  und in j) (zweite Zeile)  $20 \mu\text{m}$  [13].

Fibronektin ist ein Maß für die Adsorptionsfähigkeit der verschiedenen Oberflächen, was mit der Häufigkeit und Größe der Fokalkontakte (Paxillin) korrelieren sollte. Die Aufnahmen werden mit einem Konfokalmikroskop von Zeiss (LSM 510 Meta) durchgeführt. Die Übersichtsbilder sind mit einem 10fach Luftobjektiv und die Auswertung wurde mit Bilderstapeln eines 40fach Wasserobjektivs gemacht, welches einen Bildbereich von  $240 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$  abdeckt. Typische Beispiele, wie die Zelle mit den verschiedenen Polymeruntergründen interagiert, sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Die Materialzusammensetzung hat eine große Bedeutung für die Lackeigenschaften. PEGDA verliert mit zunehmend beigemischter PETA Konzentration die protein- und zellabweisenden Eigenschaften.

Die Auswertung wird mit einer Maximalprojektion von drei Bildern verschiedener Ebenen durchgeführt. Die Proben können im LSM leicht verkippt sein und die Haftproteine wären somit nicht in der gleichen Aufnahmeebene. Das selbe gilt für die Moleküle in den Fokalkontakten (Paxillin). Die Farbkanäle von Fibronektin und Paxillin werden pixelweise in Grauwerte umgerechnet und mit dem Programm MetaMorph (Visitron) eine Durchschnittsintensität für jeden Kanal ermittelt. Diese Werte werden über neun  $240 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$  große Scanfelder für jede PETA-Konzentration gemittelt und durch den gemittelten Intensitätswert der Ormocompflächen geteilt. Der größte Wert, der einer reinen PETA-Bedeckung (antiadhäsiver Teil) entspricht, wird auf eins normiert. Die Intensität (korreliert mit der Bedeckung) steigt mit zunehmenden PETA-Anteilen sowohl bei den Haftproteinen als auch den Fokalkontakten an (Abb. 5.11).

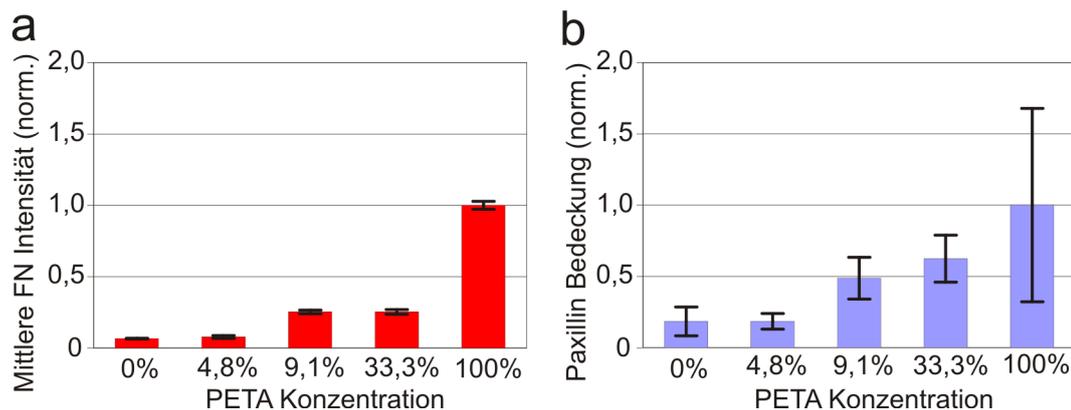


Abbildung 5.11: Quantitative Auswertungen der Aufnahmen in Abbildung 5.10. a) Charakterisierung der Bindefähigkeit von Fibronectin an die PEG-basierten Lacke durch die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten (auf Ormocomp normiert). Quantitative Darstellung der Zellbindungsfähigkeit in b) mit Hilfe des Kontaktmarkers Paxillin [13].

## 5.2. Topographische Strukturen und der Weg zu 3D

Topographische Substrate werden hier Strukturen genannt, die in einer Ebene zweidimensional strukturiert sind und sich in einer dritten Ebene vom Untergrund, wie zum Beispiel einem Glassubstrat, deutlich erheben. Das typische Beispiel für diese Art von Umgebung sind Säulenfelder, auf denen die Zellen aufliegen. Säulen sind voneinander entkoppelt. Zellen übertragen während ihrer Bewegung auf Säulenfeldern Kräfte. In Kapitel 3 sind einige Beispielerperimente aufgezeigt. Säulen werden meistens durch Abformtechniken hergestellt. Wenn man die experimentellen Bedingungen ändern will dauert es einige Zeit, weil die Herstellung der Abgussformen aufwändig ist. Direktes Laserschreiben ist für die Suche nach optimalen Bedingungen für ein Experiment sehr viel besser geeignet. Allerdings sind für große Serienexperimente, wie sie in der Biologie üblich sind, die Abformtechniken mit ihren hohen Durchsatzraten im Vorteil. Die Kombination von beiden Methoden ist vielversprechend.

Säulen sind ein vielbenutztes und untersuchtes System. Ihre Höhe, der Durchmesser und das Material bestimmen die mechanischen Eigenschaften. In unseren Versuchen variieren wir den Durchmesser der Säule. So kann man auf einfache Art und Weise einen Härtegradient herstellen. In Abbildung 5.12 kann man einen solchen Gradienten aus Ormocomp erkennen. Die Säulen auf der linken Seite haben einen Durchmesser von etwa einem Mikrometer und kleben zusammen, weil die Verdunstungskräfte sie nach der Entwicklung kollabieren lassen. Auf dieses Problem werden wir in Kapitel 6.2 wieder treffen und es dann auch lösen. Die Durchmesser in jeder Spalte nehmen zum rechten Rand hin zu. In Zeitrafferaufnahmen zeigen die schlanken Säulen eine größere Auslenkung als die Säulen am rechten Rand. Die Dynamik von zwei einzelnen Säulen wird in Abbildung 5.12 deutlich gemacht. Unterschiede in der maximalen

Auslenkung sind erkennbar. Die weichen Mikronadeln bieten den Zellen immer noch genügend Widerstand, weshalb sie keine Migrationsbewegung in Richtung der harten Seite beginnen.

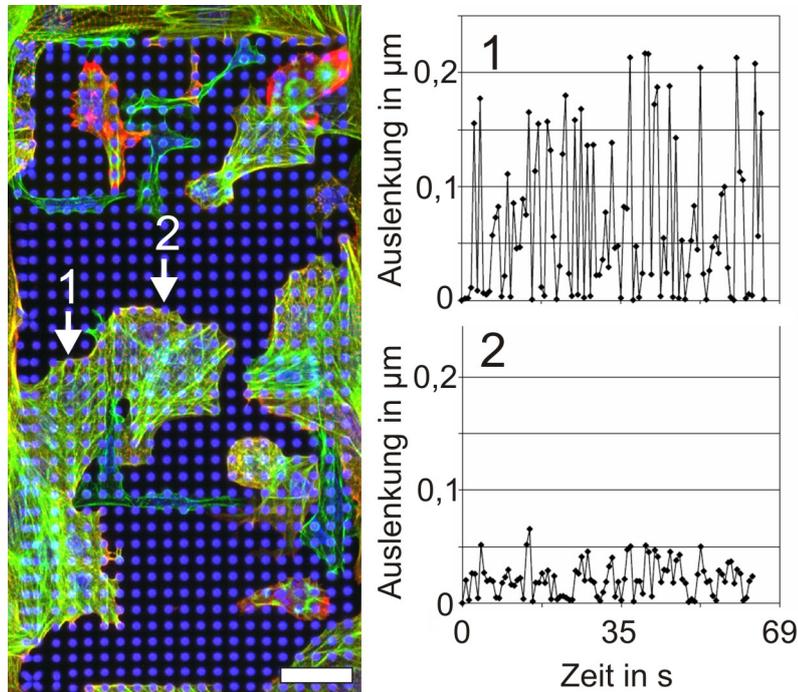


Abbildung 5.12: Fluoreszenzaufnahme (links) von embryonalen Kardiomyozyten auf elastischen Säulen aus Ormocomp. Der Säulendurchmesser nimmt von links nach rechts zu, die effektive Elastizität somit ab. Am linken Bildrand sind die Säulen so flexibel, dass sie nach der Entwicklung zusammengezogen werden und aneinander haften. Die Probe ist auf Aktin (grün),  $\alpha$ -Aktinin (rot) und das Haftprotein Fibronektin (weiß) gefärbt. Die Säulen sind in blau dargestellt (Eigenfluoreszenz). Die dynamischen Auslenkungen zweier Balken (1 und 2) werden in den entsprechenden Abbildungen gegen die Zeit aufgetragen. Die Auslenkung auf der flexibleren Seite (Säule 1) ist größer als bei größeren Säulendurchmessern (Säule 2). Das Zellverhalten in Form einer gerichteten Migration in Richtung härterer Regionen wird nicht beobachtet. Skalenbalken  $20 \mu\text{m}$  [141].

In den weiteren topographischen Experimenten mit Säulen nutzen wir die Areale zwischen den Reihen als nichtadhäsive Bereiche. Wie wir im vorangegangenen Abschnitt erfahren haben, ist es schwer Bereiche für Zellen zu präparieren, die nicht zur Haftung beitragen können. So bewirken wenige unspezifische Kontakte schon sichtbare Auswirkungen auf die Messkurven bei der Einzelzellspektroskopie mit einem AFM. Die Säulen werden in hexagonaler Anordnung hergestellt (Abb. 5.13), damit die Abstände der Einzelteile zueinander äquidistant sind und mit einem Haftprotein bedeckt. Außerdem können die Abstände zueinander variiert werden, damit Zellen der selben Größe eine unterschiedliche Anzahl von Säulen erreichen können. Nach einer vorbestimmten Kontaktdauer zieht man die Zellen mitsamt ihrer Kontakte vom Säulenuntergrund ab und kann an den Kraftkurven erkennen, wie sich einzelne Haftpunkte lösen.

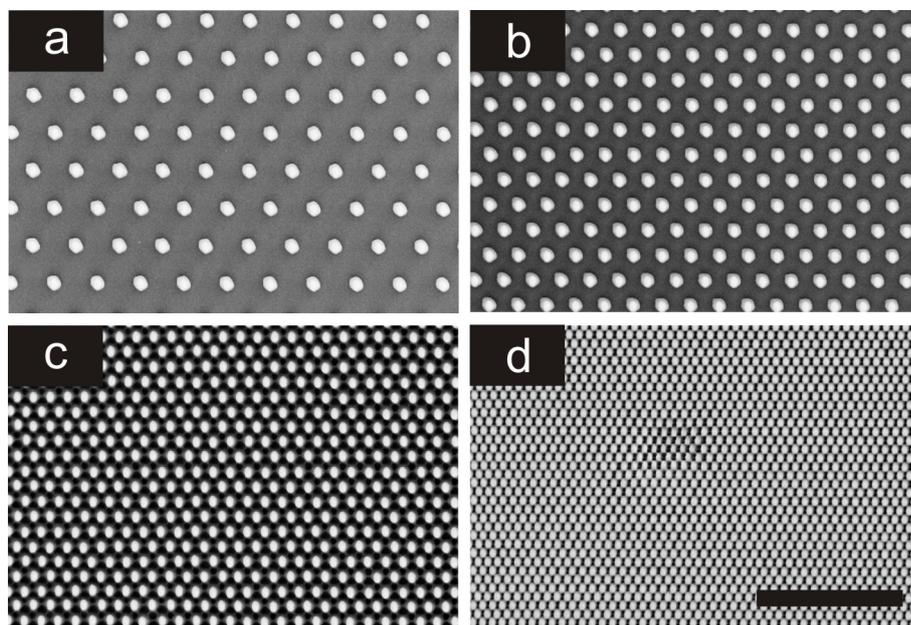


Abbildung 5.13: Gleichartige Säulen aus Ormocomp werden von a) bis d) in immer engeren Abständen geschrieben. Alle Säulen haben aufgrund der hexagonalen Anordnung den gleichen Abstand zueinander. Skalenbalken für (a-d) 20  $\mu\text{m}$ .

Die Dynamik von Zellstrukturen wie dem Zytoskelett lässt sich am besten untersuchen, wenn man die äußeren Bedingungen schlagartig ändert und die Antwort der Zelle auf molekularer und morphologischer Ebene aufnimmt. In einigen Experimenten werden die Zellen mit einer Mikropipette oder einem AFM von der Seite gedrückt [177]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den kompletten Untergrund einer Zelle zu verformen. Dies kann ein einmaliges Ereignis sein oder auch rhythmisch durchgeführt werden [178]. Zellen reagieren auf äußere Kräfte damit, dass sie die Haftpunkte und ihre Stressfasern in der Krafrichtung verstärken. Wird die Amplitude oder der Kraftwert zu hoch, versucht sich die Zelle in eine Richtung zu orientieren, in der die Kräfte nicht so stark wirken oder sie startet ihr Selbstmordprogramm [179].

Diese Auslenkungen des Untergrunds können mit Säulen erreicht werden, indem während dem Prozess der Abformung kleine metallische Partikel in die Säulenformen gegeben werden [129, 180]. Während der Zellexperimente können mit Magnetfeldern Kräfte von der Säule auf die Haftkontakte der Zelle übertragen werden. Die Säulen mit den Metallpartikeln sind allerdings zufällig verteilt und können mit dieser Methode nicht einzeln angesteuert werden. Außerdem können die mechanischen Eigenschaften einer solchen Säule beliebig kompliziert werden, weil sie nicht mehr aus einem reinen Polymermaterial besteht.

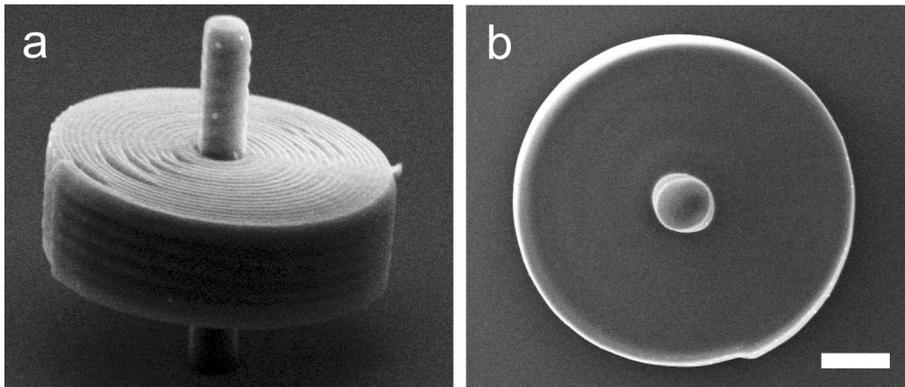


Abbildung 5.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen a) Seitenansicht und b) von oben einer Struktur, die axiale Kräfte auf die Manschette in eine laterale Auslenkungen der Säule übersetzen soll. Skalenbalken gilt für a) und b)  $5 \mu\text{m}$ .

Wir erweitern die Säulen mit einer Manschette (Abb. 5.14), um die Auslenkung auf kontrollierte Art und Weise mit einem AFM zu erzeugen. Diesen Gedankengang kann man umkehren und die Kräfte, die auf die Säule wirken mit dem AFM abgreifen und messen. In einer Anordnung von mehrerer dieser Objekte, auf denen eine Zelle sitzt, kann gezielt Kraft auf ausgesuchte Haftpunkte einer Zelle gebracht werden. In der experimentellen Umsetzung waren die Säulen noch zu unflexibel. Der Druck eines AFM-Cantilevers von oben auf die Manschette versetzt die Polymerstruktur in keine laterale Auslenkung. Wenn man aber seitlich mit dem Cantilever des AFM gegen die Säule fährt, lässt sie sich ohne Probleme verbiegen. Diese Säule mit Manschette stellt eine dreidimensionale Struktur dar. Wenn eine Zelle in einem Feld dieser Objekte auf den oberen runden Flächen sitzen würde, wäre die Strukturierung immer noch zweidimensional.

## 6. Herstellung von 3D Zelltemplaten

In den ersten dreidimensionalen Experimenten werden wir Strukturen vorstellen, die aus stark quervernetzten Fotolacken oder Glas aufgebaut sind. Die Verwendbarkeit der Materialien für Zelluntersuchungen hängt in erster Linie von der Biokompatibilität ab. Sie dürfen keine chemischen Bestandteile enthalten, die den Zellen schaden. Allerdings brauchen wir für die Auswertung von fluoreszent gefärbten Zellteilen (kleine Fokalkontakte) eine Bildqualität, die Einzelheiten nahe an der Auflösungsgrenze sichtbar macht. Die Template sind während der Aufnahme mit den Fluoreszenzmikroskopen in einer sehr viskosen Flüssigkeit, was den Brechungsindexkontrast im Vergleich zu einer Grenzfläche Polymer-Luft sehr stark verringert. Ab einer gewissen Eindringtiefe des Laserfokus machen sich Streuphänomene (abhängig von Fotolack und Geometrie) jedoch bemerkbar. Zusätzlich zeigt sich bei der Anregung mit Licht in vielen Fotolacken Autofluoreszenz, die man mit der Wahl geeigneter Fotolackbestandteile in den hochenergetischen Teil der Anregungswellenlängen verschieben kann. Die Aufnahmen von sehr kleinen oder schwach markierten Zellteilen (gelabelt mit Farbstoffen, die mit größeren Laserwellenlängen des Konfokalmikroskops angeregt werden) werden nicht von dem Fluoreszenzlicht der Strukturen überstrahlt. Die Inversion in Glas unterdrückt die Autofluoreszenz komplett, ist aber zeitaufwändig.

In den folgenden Abschnitten gehen wir auf die Herstellung weicher Template ein. Die Fotolacke selbst sind im Vergleich zu Gelen aus PDMS oder Polyakrylamid sehr hart. Der Fotolack Ormocomp besitzt einen E-Modul von etwa 800 MPa. Unsere Strategie besteht darin, die einzelnen dünnen (daher effektiv weichen) Streben an dicken Elementen aufzuhängen, die nicht verbiegbare sind. Weich definieren wir in unseren Experimenten so, dass die Zellen ihre Umgebung optisch erfassbar verformen können. Diese Verformungen können mit einem Rasterkraftmikroskop quantifizierbar gemacht und die Auslenkungen der Streben in Kräfte umgerechnet werden. Dazu werden viele Annahmen (runder Balkenquerschnitt, kleine Auslenkungen) gemacht, die auf ein einfaches mechanisches Modell führen. Damit diese Vorgaben erfüllbar sind, werden die runden Balken durch mehrere Linien mit ovalem Querschnitt angenähert. Es stellt sich heraus, dass die Balken unter einer bestimmten Dicke und Überspannlänge während des Entwicklungsprozesses des Fotolackes irreversibel am Boden kleben. Deshalb erreichen nur sehr starke Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) wahrnehmbare Verformungen. Verbesserungen durch eine optimale Verbindung der Fotolacke mit den Glassubstraten und die Vermeidung von Phasenübergängen, die große Kräfte entwickeln können, während der Entwicklung unserer Proben führen zu dünneren flexibleren Elementen, die von schwächeren Zelltypen gut auslenkbar sind.

Mit der Verwendung von Finite Elemente Methoden und der Balkentheorie kann die natürliche Form einer Linie, die per Direktem Laserschreiben angefertigt wird, mit einem elliptischen Querschnitt angefügt werden [181]. Die Zellen üben Kräfte fast nur senkrecht zur kleinen Halbachse des Querschnitts aus, was nochmals zu einer Verbesserung der Sensitivität in unseren Experimenten führt.

Die dreidimensionalen Strukturen sind bis zu diesem Zeitpunkt immer homogen mit Haftproteinen bedeckt. Das bedeutet, dass die Zellen auch an unflexiblen Bereichen oder sogar am Glasboden adhären können. Die wirkenden Gesamtkräfte können in der Größenordnung recht gut abgeschätzt werden. Allerdings fehlen Informationen an welchen Stellen und in welche Richtung die Zellen ziehen. Im Gegensatz zu zweidimensionalen weichen Gelen, in die Fluoreszenzmarker eingearbeitet sind, sind die Positionen der Verformungskräfte an langen Balken viel schwieriger zu bestimmen. Deshalb kann man den umgekehrten Weg gehen und die Zelle zwingen, sich nur an vorbestimmten Punkten anzuheften und damit die Kraftzentren vorzudefinieren. In den Vorexperimente zeigen wir, dass sich Polyethylenglykol (PEG), das mit zwei zusätzlichen Akrylendenungen polymerisierbar ist, sehr gut als antiadhäsive Komponente eignet. Die dreidimensionalen Strukturen aus PEGDA sind so weich, dass sie durch ihr eigenes Gewicht und eventuelle Zugkräfte, die bei der Trocknung nach dem Entwicklerbad entstehen können, kollabieren. Die Mischung mit einem zweiten Monomer (PETA), das eine gute Quervernetzungsfähigkeit besitzt, löst dieses Problem. Die wichtigen Eigenschaften der Nichtadhäsivität des PEG beeinflusst diese Maßnahme bei einer geeigneten Mischung nur gering. Die Steifigkeit der Gerüste kann als Nebeneffekt mit dieser Methode in einem gewissen Rahmen eingestellt werden. Geometrische Effekte auf die Ergebnisse durch unterschiedliche Balkendicken können in den Experimenten so verhindert werden. An die antiadhäsiven Balken kann stellenweise ein adhäsiver Lack überpolymerisiert werden. Diese Technik führt zu einer dreidimensionalen Kontrolle der Haftmöglichkeiten einer Zelle. Die Verwirklichung von Gradienten in drei Dimensionen sind mit dieser Methode ebenfalls möglich [164].

## 6.1. Dreidimensionale Gerüste für Zelleexperimente

Die Arbeit mit den harten Templaten wird von meiner Diplomarbeit [95] fortgeführt und weiterentwickelt. Die Vor- und Nachteile verschiedener Fotolacke bzw. Techniken, um grundlegende Probleme der Aufnahmequalität zu lösen, werden wir kurz darlegen und auf die Ergebnisse eingehen. Die Biokompatibilität und die Möglichkeit die verschiedenen Oberflächen mit Haftproteinen gleichmäßig zu beschichten, werden in der Arbeit von Franziska Klein gezeigt [141].

Anfangs verwenden wir den Fotolack SU-8 (MicroChem Corp.), der von IBM entwickelt wurde [182] und in der Fabrikation von optischen Komponenten große Verwendung findet [10]. SU-8 zeigt in den Experimenten in allen Anregungswellenlängen des LSM starke Autofluoreszenz (Abb. 6.1). Außerdem löst sich das Polymer während den Experimenten durch die Einwirkung von Nähr- und Färbeflüssigkeiten von seinem Glasuntergrund, was einen Einsatz in biologischen Versuchen ausschließt.

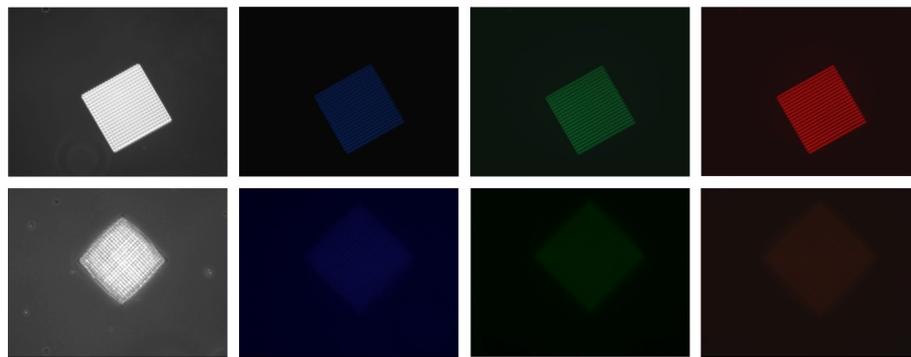


Abbildung 6.1: Der Fotolack SU-8 (obere Reihe) und die verbesserten Glastemplate (untere Reihe) im Vergleich. In weiß ist eine Durchlichtaufnahme zu sehen. Die Streuung nimmt nach der Inversion in Glas deutlich ab. Es folgen Fluoreszenzaufnahmen mit den Anregungswellenlängen des LSM von 405 nm, 488 nm und 514 nm (Falschfarben blau, grün, rot). Der Unterschied ist deutlich zu erkennen, der starke Hintergrund in der unteren Reihe kommt von der stärkeren Anregeleistung des Lasers. Kantenlänge jeder Struktur 100  $\mu\text{m}$  [95].

Die Lösung dieser Probleme ist die Ummantelung des Lacktemplates mit einer Schicht amorphen Glases per ALD (engl.: atomic layer deposition) und die darauffolgende Entfernung des fluoreszierenden SU-8 Lacks. Die Oberfläche der Fotolackstrukturen wird auf ihren Glasplättchen in einer ALD mit etwa 300 nm Siliziumdioxid beschichtet. Dies geschieht durch abwechselndes Spülen mit Wasser und Siliziumtetrachloridmolekülen, die durch das Arbeitsgas Stickstoff abwechselnd angelagert werden. Sie reagieren zu Siliziumdioxid, was auf der Oberfläche zurückbleibt, und Salzsäure, die durch den Stickstoffstrom aufgenommen und wegtransportiert wird. Die Dicke der Schicht wird neben der Struktur (gleiche Schichtdicke) in einem Dünnschichtreflektometer (Mikropack) vermessen und mit dieser Information, die oberste Schicht Glas in einem Ätzprozess mit positiv geladenen reaktiven Ionen ( $\text{SF}_6$ ) anisotrop so entfernt, dass der größte Teil der Glasmatrix noch erhalten bleibt. Danach wird das Polymer in einem Röhrenofen (Carbolite MTF) bei einer Temperatur von 480° C aus dem geöffneten Glasmantel verdampft. Zurück bleibt im optimalen Fall nur eine funktionstüchtiges Röhrenabbild des Ursprungtemplates (Abb. 6.2). Für genauere Ausführungen siehe [95].

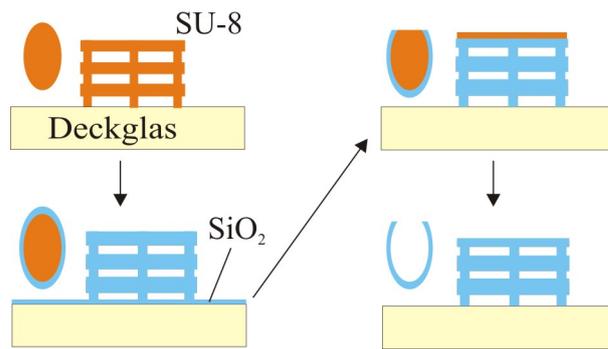


Abbildung 6.2: Der schematische Ablauf der Umwandlung einer Polymerstruktur in ein Glasabbild. Es wird jeweils der Querschnitt eines Balkens der obersten Lage und eine Struktur gezeigt. Auf eine fertige Struktur aus SU-8 beschichtet man Siliziumdioxid über alle Oberflächen per ALD. Im folgenden Schritt wird die oberste Lage des Glases entfernt, damit beim darauffolgenden Herausbrennen des Polymers die Dämpfe entweichen können. Am Ende bleibt eine Röhrenkonstruktion aus Glas mit der ursprünglichen Form des SU-8-Templates übrig.

Die Strukturen aus Siliziumdioxid sind neben der Vermeidung der Autofluoreszenz auch besser brechungsindexangepasst zu den Medien, in denen die Zellen während der Fluoreszenzaufnahmen eingebettet sind. Dies zeigt sich in einer reduzierten Streuung (Abb. 6.1). Allerdings verdoppelt sich mit dieser Methode die Grenzflächenzahl, was sich bei sehr engmaschigen Strukturen negativ auswirken kann. Die Glasstrukturen schwimmen während der Experimente nicht mehr ab und können sogar wiederverwendet werden. Während des Reinigungsprozesses werden aggressive Chemikalien und hohe Temperaturen verwendet, damit Zellreste rückstandslos entfernt werden können. Diese Prozedur funktioniert nicht immer. In manchen Fällen sterben die Zellen nach der Aussaat auf gereinigten Templaten sofort ab. Eventuell können sich die Chemikalien während der Reinigung in den Glasröhren sammeln, was selbst nach mehrmaligem Spülen mit Wasser zu Vergiftungserscheinungen der Zellen führt. Die Herstellung der Glasplatte lohnt sich nur, wenn sie oft verwendet werden können oder die Aufnahmequalität von beispielsweise sehr kleinen Haftstrukturen der Zellen es erfordert.

Um eine schnelle Herstellung und eine ausreichend gute Aufnahmequalität zu erreichen, verwenden wir für harte Strukturen deshalb in aktuelleren Experimenten einen selbstgemischten Fotolack, der aus dem Monomer Pentaerythrioltetraakrylat (PETA) und einem Gewichtsprozent des Fotoinitiators Irgacure 369 (2-Benzyl-2-Dimethylamino-4'-morpholinobutyrophenone) besteht. Diese Mischung vereint viele Vorteile. Der Fotolack enthält keine Lösungsmittel, weil der Fotoinitiator direkt in PETA löslich ist. Lösungsmittel können bei längerer Lagerung verdampfen und so die Zusammensetzung des Lackes und damit die Eigenschaften ändern. Der Fotolack polymerisiert durch die Bildung von Radikalen. Dies bedeutet, dass man die Strukturen schon während des Schreibprozesses durch Brechungsindexkontraste sehen und bei

Problemen eingreifen kann. Außerdem ist die Handhabung sehr einfach. Ein Tropfen des Lackes wird auf ein Glasplättchen gegeben, der Lack wird belichtet und nach dem Belichtungsprozess für kurze Zeit in ein Entwicklerbad aus Isopropanol und MIBK gehalten, um die unpolymersierten Bereiche zu entfernen. Je weniger Schritte ein Prozess hat, desto fehlertoleranter ist er. Der Bereich, in dem die Laserleistung variiert werden kann ist niedriger als bei SU-8, was daran liegen könnte, dass es sich um einen Flüssiglack (der Lack ist während der Belichtung noch flüssig) handelt.

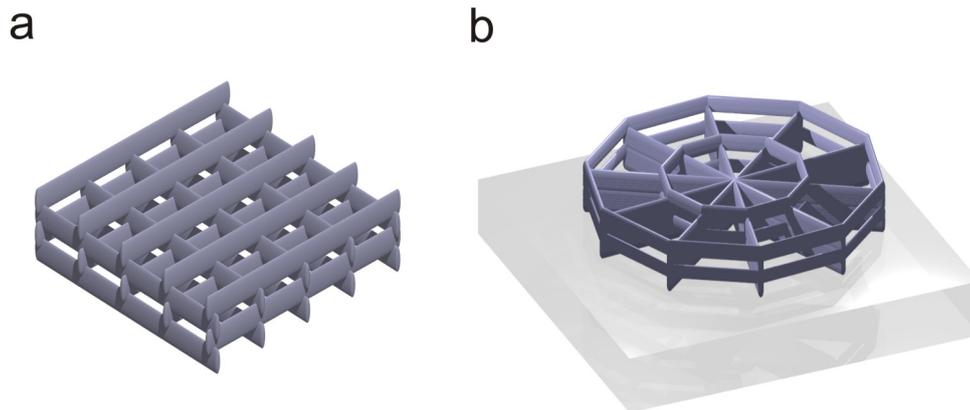


Abbildung 6.3: Rekonstruktionen erzeugt mit der Rendering-Software POV-Ray. Gezeigt ist in a) eine Stapelstruktur, deren Balkenabstände in den Experimenten variieren können. In b) ist eine Radstruktur zu sehen. Die Räume sind offener und die Zellen haben die Möglichkeit sich zwischen großen Gebieten, in denen sie sich aufspannen können, sowie den flächigeren Bereichen der Wände zu entscheiden.

Die Hauptprobleme, die das SU-8 Polymer als dreidimensionales Gerüst für Zellexperimente ausschließen, können mit PETA größtenteils gelöst werden. Die geringe Haftung kann mit der Silanisierung der Glasplättchen (kovalente Bindung über einen Haftvermittler von Glasplättchen zu Fotolack) drastisch erhöht werden (siehe Kapitel 3). Die Autofluoreszenz der Strukturen zeigt sich störend bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm, die in den Zellexperimenten meistens zur Anregung der Zellkernfärbung verwendet wird. Der Farbstoff DAPI, der direkt an die DNA im Kern bindet, ist sehr leuchtstark und der Kern sehr ausgedehnt, so dass die Anregung der Polymere in diesem Farbkanal nicht sehr störend ist. In den niederenergetischeren Anregungskanälen ist die Autofluoreszenz in PETA zum Großteil unterdrückt und stört die Aufnahmen nicht. Quarzglas besitzt ein E-Modul von etwa 70 GPa. Die Glasstrukturen haben eine geringere Härte, weil sie aus amorphem Glas bestehen und auch sehr dünn sind (vgl. Ormocompseile). Es entstehen aber keine wahrnehmbaren Verformungen der Glasstrukturen während der Experimente. Das Elastizitätsmodul von PETA liegt per AFM vermessen bei 5 GPa [164], was etwa im Bereich von ähnlichen Molekülen liegt, die in [183] untersucht werden. SU-8 besitzt einen E-Modul von bis zu 4,02 GPa [184].

Die Werte liegen etwa um den Faktor fünf über den Elastizitätsmoduli der Lacke, die wir für die weichen Strukturen verwenden werden.

Im folgenden Teil werden wir die Strukturen, die in Glas und später mit dem Fotolack aus PETA gefertigt werden, vorstellen und die Ziele der Versuche bzw. die Ergebnisse kurz erläutern. Bei tiefergehendem Interesse an der zellbiologischen Seite und den experimentellen Protokollen der Zellstudien verweise ich auf die Doktorarbeit von Franziska Klein [141].

Wir verwenden in den Experimenten mit harten Templaten zwei unterschiedliche Strukturdesigns, die für die jeweiligen Fragestellungen angepasst sind. Die erste dreidimensionale Testumgebung für Zelleexperimente ist eine Stapelstruktur (Abb. 6.3 a), die Photonischen Kristallen nachempfunden ist [10].

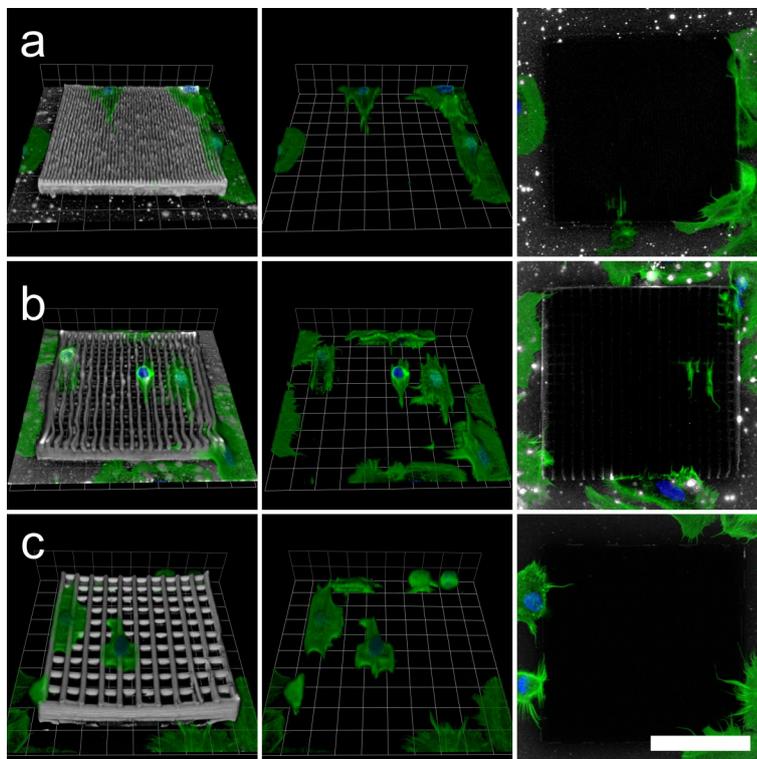


Abbildung 6.4: Epitheliale A549-Zellen auf Gitterstrukturen mit unterschiedlichen Abständen der Balken. Zeile a)  $2\ \mu\text{m}$ , b)  $5\ \mu\text{m}$  und c)  $10\ \mu\text{m}$ . Die Strukturen (weiß) in der ersten Spalte sind auf Fibronectin gefärbt. Auf allen Abbildungen sind die Zellkerne (blau) und das Aktin (grün) dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion der konfokalen Bilderstapel. Die Zellen sind fast ausschließlich auf den Strukturen lokalisiert, was in der dritten Spalte (ein Bilderschnitt direkt auf der Glasoberfläche) durch ein sehr geringes Einwachsen der Zellfortsätze in die Struktur verifiziert werden kann. Skalenbalken (gilt für alle Abbildungen)  $50\ \mu\text{m}$  [141].

Die Abstände der einzelnen Linien werden variiert, damit Hohlräume in unterschiedlicher Größe entstehen, in die die Zellen einwachsen sollen. Die Höhe beschränken wir auf etwa  $15\ \mu\text{m}$ , weil die Qualität konfokaler Aufnahmen mit der Höhe bei diesen periodischen und engen Templaten drastisch abnimmt. Der Kern einer Zelle hat etwa einen Durchmesser von fünf Mikrometern. Wir erstellen deshalb Exemplare mit Gitterkonstanten von zwei, fünf und zehn Mikrometer, um das Einwachsverhalten drei verschiedener Zelltypen zu untersuchen. Alle Zelltypen (epitheliale A549, mesenchymale BRL und fibroblastenartige B16) werden für zwei oder 24 Stunden in den fibronectinbeschichteten Strukturen kultiviert, gefärbt und konfokale Bilderstapel erstellt. Die A549-Zellen (Abb. 6.4) bleiben auf den zwei bzw. fünf Mikrometer hohen Strukturen obenauf und wandern ab zehn Mikrometer Strukturgröße teilweise ein. Die BRL-Zellen und B16-Zellen (hier nicht gezeigt) durchwachsen mit den Zellfortsätzen schon fünf Mikrometer große Hohlräume und nur der Kern bleibt auf der Oberseite der Strukturen lokalisiert. Bei zehn Mikrometer Strukturgröße durchwachsen diese Zelltypen die Stapelstrukturen bis zum Boden hin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Epithelzellen in unseren künstlichen Gerüsten ein weniger invasives Verhalten zeigen als mesenchymale oder fibroblastenartige Zellen [141].

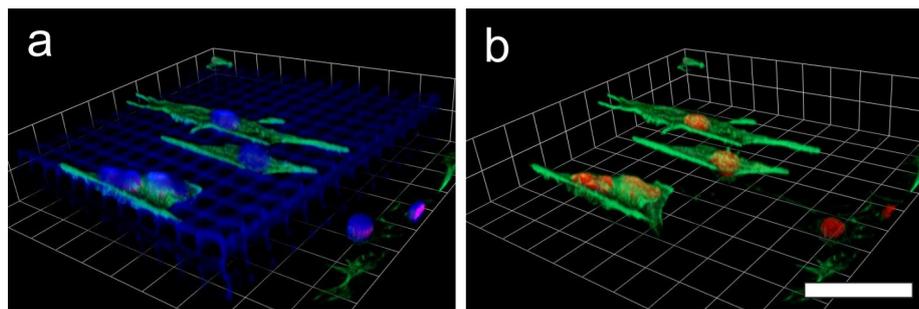


Abbildung 6.5: Dreidimensionale Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen einer Stapelstruktur mit  $10\ \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Gitterlinien aus PETA gefertigt. Die Autofluoreszenz des Polymers (blau) in a) beeinträchtigt die Bildqualität nur schwach. b) Die Ausblendung eines Aufnahmechanals lässt die Struktur verschwinden. Das Aktin (grün) und die Laminfärbung (rot) sind nun gut zu erkennen. Skalenbalken  $50\ \mu\text{m}$ . Aufnahmen von Maria Jäckel.

Die Versuche des Einwachsverhaltens von Zellen sind von großer Bedeutung in der Krebsforschung. Es wurde schon gezeigt, dass hochinvasive Krebszellen einen sehr weichen Kern besitzen, weil die Komposition der stützenden Lamin-Netzwerke im Kern verändert ist. Die Zellen können sich daher schneller durch enge Zwischenräume bewegen und sind mobiler [19]. Diese Situation wird in Versuchen in der Diplomarbeit von Maria Jäckel nachgestellt. Die Expression einer bestimmten Laminart wird unterdrückt (andere Arten sind für die Zelle überlebenswichtig) und der Zellkern wird dadurch weicher (gezeigt durch AFM Messungen von Clemens Franz). Die Strukturen für dieser Untersuchungsreihe sind aus PETA gefertigt, haben aber noch die gleiche Geometrie wie in Abbildung 6.4. Die Autofluoreszenz im Anregungskanal von  $405\ \text{nm}$

kann zur Darstellung der Struktur verwendet werden (Abb. 6.5 a). In den anderen Aufnahmekanälen ist dieser Störfaktor weitgehend unterdrückt und stört bei dieser Art von Experiment nicht, da hier keine kleinen Strukturen untersucht, sondern die gesamte Zelle beobachtet wird (Abb. 6.5 b). Die Zellen mit und ohne unterdrückter Laminexpression lässt man in die verschiedenen Strukturgrößen einwachsen und analysiert die Unterschiede der Geschwindigkeit. Maria Jäckel findet dabei, dass in den kleineren Strukturgrößen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen sind. In die zehn Mikrometer großen Strukturen wandern die Zellen mit ausgeschaltetem Lamin in vorläufigen Ergebnissen etwa doppelt so schnell ein als die unbehandelten Exemplare. Dieses Resultat gibt einen Hinweis auf den Einfluss von veränderten Zellskelettkomponenten auf das Zellverhalten.

Die zweite Struktur, die wir zuerst in Glas und später in PETA-Lack herstellen, ist die sogenannte Rad-Konstruktion. Sie besteht aus flächigen Speichen, die von dünnen Stabilisationsringen gehalten werden (Abb. 6.3 b). Die Zellen lässt man in diese Strukturen einwachsen. Dies stellt kein Problem dar, weil jede untersuchte Zellart sofort von dem zweidimensionalen Glasboden in die 3D-Strukturen einwandert. Die Zellen werden in diesen Experimenten wieder fixiert, gefärbt und aus konfokalen Bilderstapeln rekonstruiert.

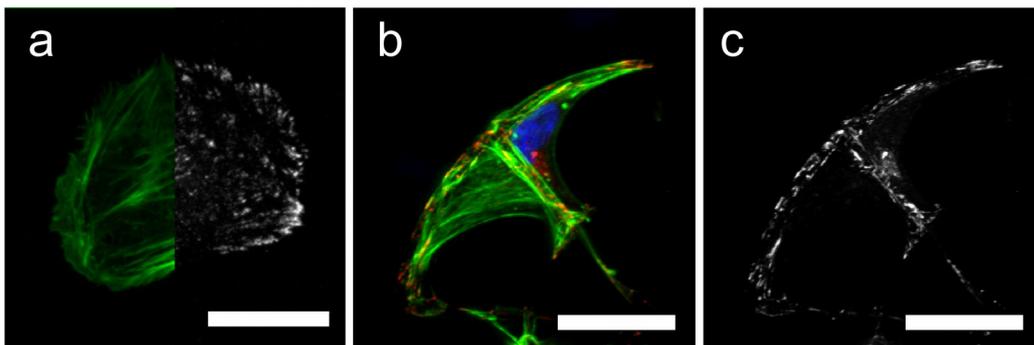


Abbildung 6.6: Fluoreszenzaufnahmen von BRL-Zellen auf a) einem zweidimensionalen Glassubstrat und b), c) in einer Radstruktur. Der Zellkern (blau), Aktin (grün) und phosphoryliertes Paxillin (rot oder weiß) sind markiert. Die Menge und Größe der Markerproteine für Haftpunkte (phosphoryliertes Paxillin) ist in a) nicht signifikant unterschiedlich zu b) und c). Skalenbalken  $20 \mu\text{m}$  [154].

Man kann nun die Haftpunkte der Zelle auf dem zweidimensionalen Glassubstrat (Abb. 6.6 a) und in den 3D-Strukturen (Abb. 6.6 b und c) in ihrer Zusammensetzung und Größe untersuchen. Wir konzentrieren uns auf eine ganze Reihe von Proteinen, die im Haftungsprozess einer Zelle eine Rolle spielen. Die Färbung einiger Proteinmarker, die in Haftkontakten der Zelle vorkommen, wie Paxillin und die phosphorylierten (aktiven) Varianten von Paxillin, Tyrosin und FAK zeigen keine Unterschiede von flachen zu dreidimensionalen harten Substraten [141]. Der Vergleich von Größe und

Verteilung von 2D zu 3D zeigt keine Unterschiede und steht damit im Kontrast zu den Arbeiten in [7]. Die Bedingungen in dreidimensionalen Geweben sind nicht so definiert wie in unseren künstlichen Templaten. Außerdem könnte die Größe der Kontakte auch mit der Flexibilität der Matrix zusammenhängen und die Dreidimensionalität auf die Zusammensetzung der Haftstrukturen einer Zelle weniger Einfluß haben als angenommen wird [154].

Desweiteren werfen wir einen Blick auf die Morphologie der Zellen in den Rädern. Zellen unterschiedlicher Herkunft wachsen in den Rädern und verhalten sich verschieden. Epitheliale Zelltypen wie A549 und NRK hängen an den flächigen Strukturen der Räder und spannen sich so gut wie nicht in den großen Freiräumen der Struktur auf. Die mesenchymalen BRL und fibroblastenartigen B16 spannen sich auf und machen auf den ersten Blick schon einen größeren Eindruck. In Abbildung 6.7 kann man am Beispiel von BRL und NRK die morphologischen Unterschiede deutlich erkennen. In einem zweiten Schritt kann man aus den einzelnen Ebenen des Bilderstapels das Volumen der Zellen bestimmen. Die Flächen der Einzelbilder werden mit den Abständen der Schnitte multipliziert und diese Ergebnisse zu einem Endresultat addiert. Diese Gesamtvolumina können mit den Zellvolumina auf dem flachen Glassubstrat verglichen werden. Abgeflachte Zellen sind nur wenige Mikrometer hoch, weshalb die Messungen des Zellvolumens mit der in 3D angewandten Methode zu großen Fehlern führen würde. Die einzelnen Ebenen der Bilderstapel sind etwa 300 nm auseinander. Die Höhe einer konfokalen Ebene ist eventuell noch größer und man kann nicht ausschließen, dass Bildartefakte mit in die Berechnungen einfließen. Deshalb wird das Volumen flacher Zellen mit dem AFM vermessen. Das Gerät kann fixierte Zellen auf dem Glasplättchen in einzelnen Linien abrastern. Die Glasebene wird als Referenz verwendet. Das AFM besitzt eine Genauigkeit von einigen Nanometern und ist eine viel direktere Methode als eine Auswertung aus konfokalen Bilderstapeln. In Abbildung 6.7 (c und d) sind Höhenplots der Zellen (BRL und NRK) auf dem Glassubstrat dargestellt. Die Höhenliniendaten können ausgelesen und mit einem MatLab-Programm in Volumenangaben umgerechnet werden. Wenn man die Volumina der Zelltypen vergleicht, stellt man fest, dass diese in Epithelzellen größtenteils unabhängig von der Dimensionalität der Umgebung sind. Fibroblasten zeigen jedoch signifikante Unterschiede und sind in den dreidimensionalen Radstrukturen wesentlich ausgedehnter als auf flachen Substraten [154]. Die Unterschiede auf die Bildqualität von Glas (Abb. 6.7 a) und dem PETA-Lack (Abb. 6.7 b) sind nur minimal. Eine Verformung der Strukturen aufgrund der Einwirkung von Zellen wird in beiden Fällen nicht festgestellt.

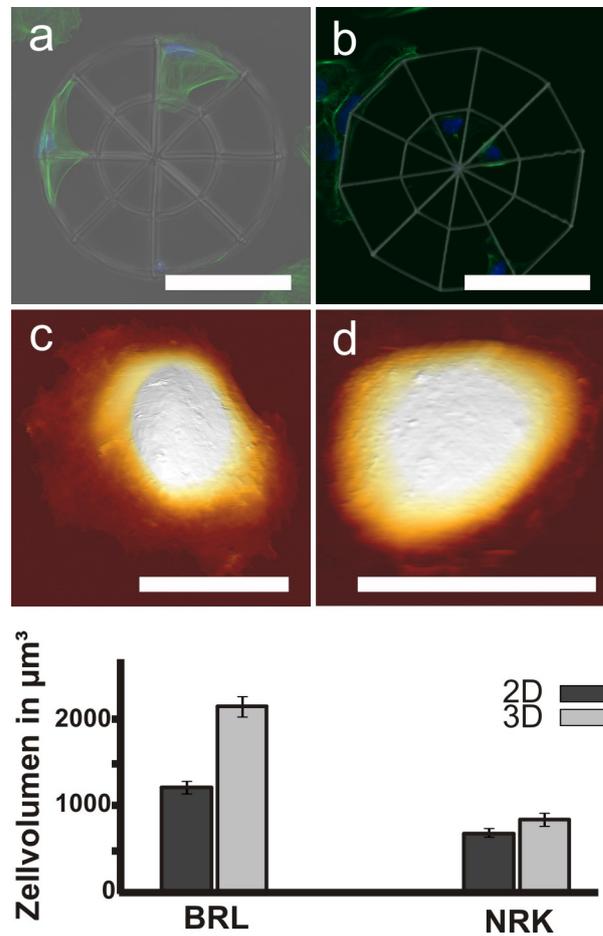


Abbildung 6.7: Fluoreszenzaufnahmen von Radstrukturen a) aus Glas und b) aus PETA, die von Zellen (links BRL, rechts NRK) in Aktin (grün) und Zellkern (blau) bevölkert werden. Die Fluoreszenzaufnahme in a) wird von einem DIC-Bild der Struktur überlagert, weil Glas keine Autofluoreszenz zeigt, in b) ist die Bildinformation der Struktur im gleichen Farbkanal wie der Zellkern (DAPI) gespeichert. Die Grafiken c) und d) zeigen Höhenprofilenaufnahmen der selben Zelltypen auf Glasplättchen per AFM aufgenommen (braun Glaslevel, weiß etwa 4 Mikrometer Höhe). Das Zellvolumen (unten) auf den 2D-Glassubstraten in (dunkelgrau) wird dem Zellvolumen in 3D-Radstrukturen (hellgrau) gegenübergestellt. Mesenchymale BRL-Zellen zeigen große Unterschiede in Abhängigkeit der Dimensionalität (größeres Volumen in 3D), epithale NRK-Zellen bleiben im Volumen etwa gleich. Skalenbalken a) und b)  $50 \mu\text{m}$ ; c) und d)  $20 \mu\text{m}$  [154].

## 6.2. Flexible dreidimensionale Strukturen

Zellen können die Flexibilität ihrer natürlichen Umgebung erkennen, indem sie sich kontrahieren und Kraftantworten in biochemische Signale umwandeln. Im menschlichen Körper stehen die Gewebe unter einer Vorspannung. Diese Tatsache nutzen Zellen aus, um die Integrität ihrer Umgebung zu ertasten. Zellen kontrahieren auch in künstlichen Umgebungen, sobald sie aus der Migrationsphase in die kontraktile Phase wechseln. Die Kräfte, die eine Zelle dann entwickelt, können mit geeigneten Methoden gemessen und ungefähr abgeschätzt werden.

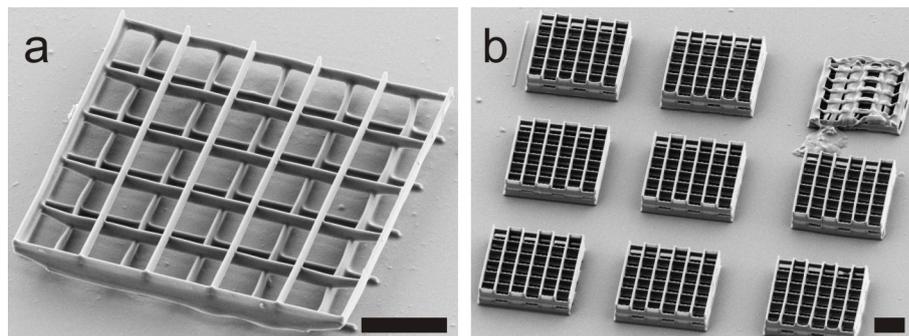


Abbildung 6.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Strukturen aus PDMS. Gerüst a) ist etwas offener und überspannte größere Distanzen als b). Skalenbalken  $10 \mu\text{m}$  [95].

In meiner Diplomarbeit [95] versuchten wir deshalb PDMS (Polydimethylsiloxan) durch DLS zu polymerisieren und daraus dreidimensionale, für Zellen verformbare, Objekte zu erschaffen (Abb. 6.8). PDMS wird häufig zur Herstellung von Säulenarrays und für flexible flache Substrate verwendet. Die elastischen Eigenschaften sind über einen weiten Bereich linear und die Biokompatibilität ist durch die häufige Anwendung sichergestellt. Die Löslichkeit bekannter Fotoinitiatoren wie ITX (Isopropylthioxanthon) in den Monomeren ist allerdings nicht gegeben, weshalb mit einigen Tricks gearbeitet werden muss und die Ergebnisse nicht sehr reproduzierbar sind. Die Oberflächenqualität der Resultate ist gut. Der Leistungsbereich des Schreiblasers für eine Polymerisation ohne sichtbare Gasbildung ist allerdings sehr eingeschränkt. Deshalb verwenden wir den kommerziellen Fotolack Ormocomp, dessen Materialeigenschaften härter sind. Dieser Nachteil kann, durch die Möglichkeit dünnere Linien schreiben und die Ergebnisse sehr reproduzierbar machen zu können, ausgeglichen werden. Außerdem zeigt Ormocomp im Vergleich zu PDMS in längerwelligen Laseranregungsspektren des LSM ein wesentlich geringeres Maß an Autofluoreszenz (hier nicht gezeigt).

In die ersten weichen Strukturen setzen wir primäre Kardiomyozyten. Dieser Zelltyp wird durch die mechanische und enzymatische Auflösung eines Hühnerherzens gewonnen. Die aufgereinigten Kardiomyozyten, die im lebenden Organismus den Herzschlag verursachen, haben die Eigenschaft auch auf künstlichen Oberflächen rhythmisch

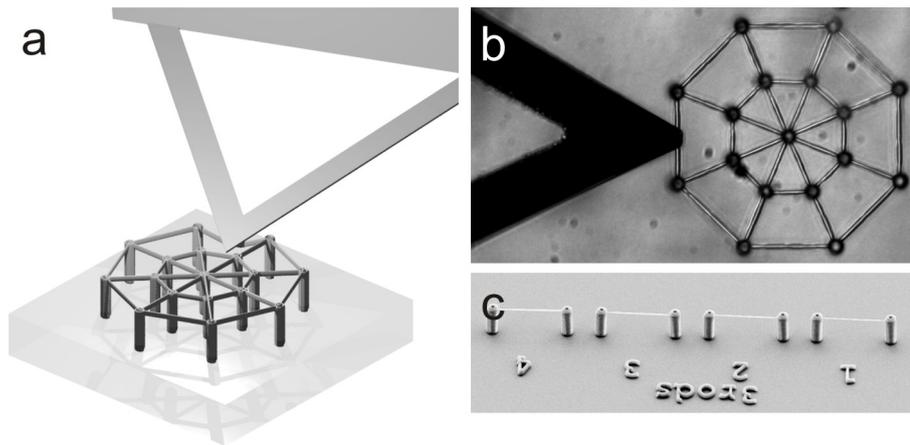


Abbildung 6.9: a) Gerenderte Darstellung (POV-Ray) der neue Rad-Struktur mit der (angedeuteten) Meßmethode für die Flexibilität per AFM. b) Es wird ein Durchlichtbild der Anordnung in a) gezeigt. c) Für die tatsächliche Bestimmung der Materialparameter werden Teststrukturen hergestellt. Die unverformbaren Säulen sind mit flexiblen Balken verbunden [12].

zu kontrahieren. Dies passiert mit einer Wiederholrate von etwa einem Hertz. Die Zellen sind im Vergleich zu den Exemplaren von Zelllinien sehr groß und können unsere etwa 100 Mikrometer großen Rad-Strukturen komplett überspannen. Wir setzen diese Zellen ein, weil sie bekanntermaßen die größten Kräfte (etwa 140nN in der relaxierten und 400 nN in der kontraktile Phase bei Rattenkardiomyozyten [185]) im Körper entwickeln können. Die Radstruktur wird für die Kraftmessungen angepasst. Man braucht in diesen Experimenten möglichst dünne, weitüberspannende Elemente, damit sich die Kräfte durch gut wahrnehmbare Verformungen erfassen lassen (Abb. 6.9 a). Für die flexiblen Strukturen verwenden wir nun generell den Fotolack Ormocomp.

Wir verwenden ein AFM (auf einem inversen Mikroskop montiert) um die Flexibilität der Streben des neuen Rad-Designs abschätzen und die Materialeigenschaften von Ormocomp, das durch Direktes Laserschreiben polymerisiert wird, bestimmen zu können. Die Messungen von Clemens Franz werden an Streben unterschiedlicher Dicke, die an massiven Säulen festgemacht sind, durchgeführt. Diese Teststrukturen sind 15  $\mu\text{m}$  hoch und die 35  $\mu\text{m}$  langen Balken bestehen aus drei einzelnen Schreiblinien, um einen annähernd runden Querschnitt zu erreichen. Weitere Untersuchungen zur Optimierung der Strukturqualität sind in [157] zu finden. Die Spitze eines flachen Cantilevers wird über den Teststrukturen (Abb. 6.9 c) positioniert und dieser bis zu einer voreingestellten Maximalkraft von 20 nN auf die Streben gedrückt. Die Kraft-Abstandskurven dieser Messungen werden später von den Referenzmessungen, die auf dem harten Glasboden (70 GPa) durchgeführt werden, abgezogen. Diese Anpassung ist nötig, weil die Balken nicht den vollen Verfahrensweg der Piezobühne ausgelenkt werden, sondern ein Teil der Kraft-Weg-Kurve in die Verbiegung des Cantilevers ein-

fließt. Diese Messungen werden bis zu 20 mal an einer Teststruktur wiederholt. Eine Ermüdung des Materials der Polymerstruktur kann nicht festgestellt werden.

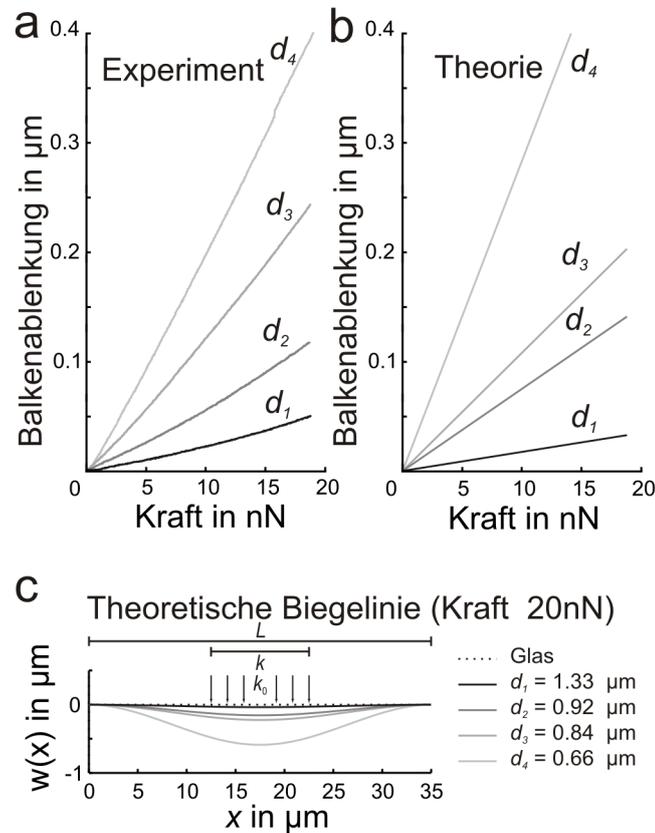


Abbildung 6.10: Grafik a) zeigt die experimentellen Werte der Kraft-Abstandsmessungen per AFM mit den Balkendurchmessern in c). In b) sind die theoretischen Kurven zu sehen, die zu einem Elastizitätsmodul von  $E = 800 \text{ MPa}$  und den Liniendicken in c) gehören. Grafik c) zeigt die berechneten Werte der Balkenauslenkung (verschiedene Balkendicken) bei einer Kraft von  $20 \text{ nN}$ , die über eine Länge von  $10 \mu\text{m}$  des Balkens wirkt [12].

Die Balken werden in verschiedenen Dicken, was mit einer Variation der Schreibgeschwindigkeit oder der Laserintensität des DLS-Gerätes erreicht werden kann, gefertigt. Die Durchmesser der Balken variieren von  $0,66$  bis  $1,33 \mu\text{m}$ . Diese Werte sind aus elektronenmikroskopische Aufnahmen vermessen. Wenn wir nun von einem konstanten Elastizitätsmodul, kleinen Auslenkungen und nicht verformbaren Säulen ausgehen, können unsere Messungen mit theoretischen Biegelinien verglichen und das E-Modul abgeschätzt werden (Abb. 6.10).

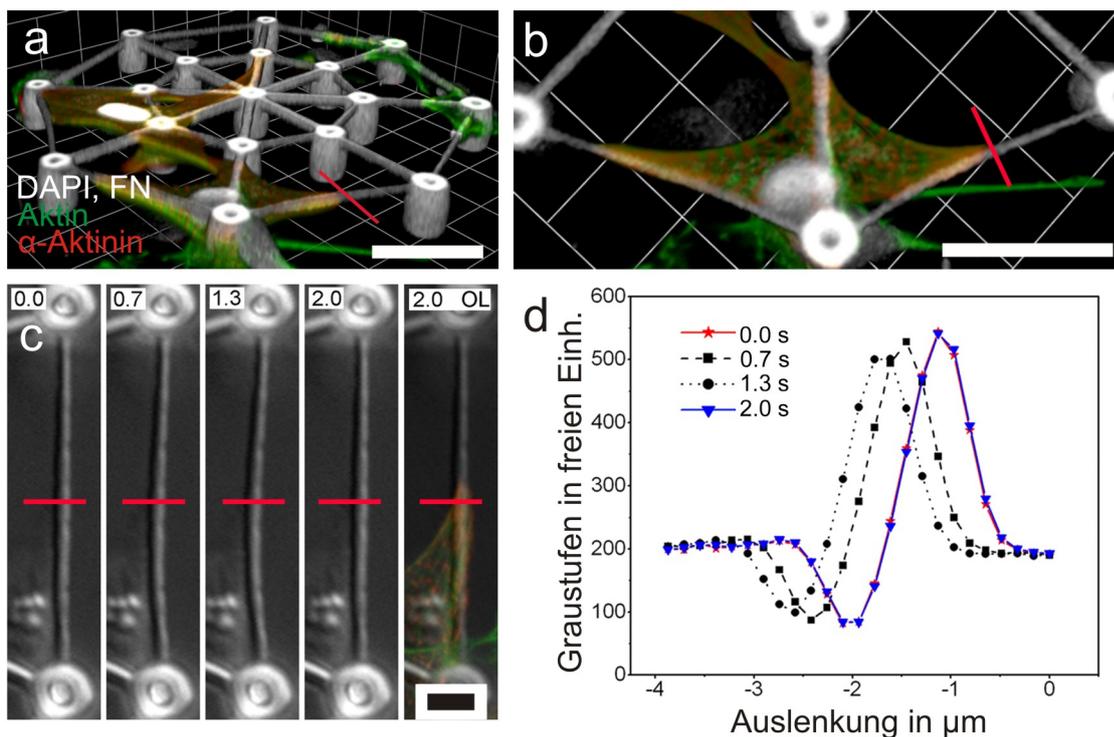


Abbildung 6.11: a), b) 3D-Rekonstruktion eines konfokalen Bilderstapels von Hühnchenkardiomyozyten in einer Radstruktur aus Ormocomp (a) Schrägansicht, b) Aufsicht). Die Balkendicke der Struktur beträgt nur  $0,6 \mu\text{m}$ . Die Färbung von Aktin und  $\alpha$ -Aktinin macht die Myofibrillen sichtbar. Die Auswertung in d) der Balkenverbiegung (rote Linie) von einzelnen Filmframes (Zeit in Sekunden) in c) wird über die Graustufen der Balken ermittelt. Skaleneinheiten in a) und b)  $20 \mu\text{m}$ ; in c)  $5 \mu\text{m}$  [12].

Die Differentialgleichung einer Biegelinie  $w(x)$  lautet in der Näherung für schwache Auslenkungen [186]:

$$E \cdot I \cdot \frac{d^4}{dx^4} w(x) = F(x) \tag{6.1}$$

E steht für das Elastizitätsmodul, das wir so an die experimentellen Daten anpassen, dass alle Balken mit dem Durchmesser  $d$  und dem daraus resultierenden Flächenträgheitsmoment  $I = \pi \cdot d^4/64$  die Differentialgleichung 6.1 erfüllen. Die Kräfteverteilung  $F(x)$  wird den experimentellen Bedingungen angepasst. Deshalb wird als Kraft eine gleichmäßige Flächenlast auf den inneren  $k=10 \mu\text{m}$  (Breite des Cantilevers) der  $L=35 \mu\text{m}$  langen Balken angenommen.

Mit diesen Annahmen gilt:

$$E \cdot I \cdot \frac{d^4}{dx^4} w(x) = k_0 \left( \theta \left( x - \frac{L}{2} + \frac{k}{2} \right) - \theta \left( x - \frac{L}{2} - \frac{k}{2} \right) \right) \quad (6.2)$$

Als Nebenbedingung wird angenommen, dass an beiden Rändern (Kontaktpunkte der Balken mit den Säulen) keine Auslenkung stattfindet und die Biegelinie dort keine Steigung hat (geklemmte Randbedingungen). Mit diesen vier Randbedingungen ist die Differentialgleichung eindeutig lösbar.

Die Kardiomyozyten verbiegen die Balken in unseren Kraftexperimenten meistens in lateraler Richtung, weshalb wir die elastischen Eigenschaften der Teststrukturen auch seitlich mit dem AFM testen. Dies erfordert, dass wir Streifen aus den Glasplättchen (Substrate der Polymerstrukturen) mit einem Glasschneider unter einem Millimeter Breite präparieren. Andernfalls würde der Laserstrahl des AFM durch die Glasgrenzflächen gestört und Messungen nicht möglich. Die Ergebnisse sind ähnlich wie in unserer ursprünglichen Messanordnung. Die Annahme eines runden Balkenquerschnitts scheint gültig zu sein.

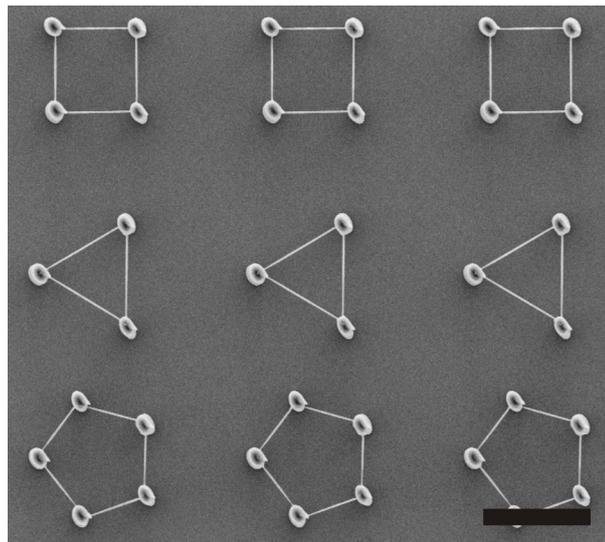


Abbildung 6.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Aufsicht) von festen Säulen mit flexiblen Seilen verbunden. Die Grundfläche ist aus Drei-, Vier- und Fünfecken aufgebaut. Skalenbalken  $20 \mu\text{m}$ .

In den Zellexperimenten verwenden wir die dünnsten Balkendicken, die zu diesem Zeitpunkt herstellbar sind (Abb. 6.11). Diese haben etwa einen Durchmesser von  $660 \text{ nm}$ . Die zellinduzierte Verbiegung von ungefähr  $0,8 \mu\text{m}$ , die wir an einzelnen Balken unserer angepassten Radstruktur detektieren, entspricht etwa einer Kraft von  $47 \text{ nN}$ . Die Kardiomyozyten kontrahieren mit einer geringen Frequenz, weshalb aus Filmaufnahmen einer Zeitspanne von  $1,5 \text{ Minuten}$  etwa  $26$  Kontraktionen für die Auswertung verwendet werden können [12].

Die detektierbaren Kräfte sollen in den folgenden Experimenten nun verkleinert werden, damit auch schwächere Zelltypen untersucht werden können. Diese verursachen keine rhythmischen Auslenkungen wie Herzzellen, sondern bauen in den Strukturen wie in ihrer natürlichen Umgebung durch innere Kontraktion eine Vorspannung auf. Die Strukturen werden so angepasst, dass die Zellen innerhalb der verbiegbaren Elemente aufgehängt sind und sich möglichst wenig an den harten Pfostenelementen, die zur Stabilisierung dienen, festhalten. Hierzu werden Säulen, die in drei einfachen Grundflächen angeordnet sind, aus Ormocomp gefertigt (Abb. 6.12). Die flexiblen Balken sind während des Schreibvorgangs und innerhalb des unpolymerisierten Lacks nach der Belichtung vollkommen in Ordnung. Wenn die Zelltemple aus dem Entwicklerbad entfernt und getrocknet werden, erhält man bei Strukturen unter einer bestimmten Linienbreite nur noch Exemplare, deren flexiblen Elemente entweder auf dem Glasboden oder aneinander haften. Diese Randbedingungen herrschten auch schon in den Experimenten mit den Kardiomyozyten. Der Flaschenhals für dünnere freihängende Strukturen ist nicht die Polymerisationsschwelle des Fotolacks, sondern ein nachträglicher Effekt im Entwicklungsschritt der Proben. Flüssigkeiten (Entwicklersubstanzen) verdampfen nach ihrem Einsatz in den Strukturen und bilden Grenzflächen aus, die starke Kräfte auf ihre Umgebung ausüben. Wenn sich die Tropfen beim Verdampfen der Flüssigkeit zurückziehen, reißen sie flexible oder schlecht verankerte Objekte mit sich. In dieser Phase ziehen Lösungsmitteltropfen die Elemente zusammen und verkleben sie irreversibel miteinander.

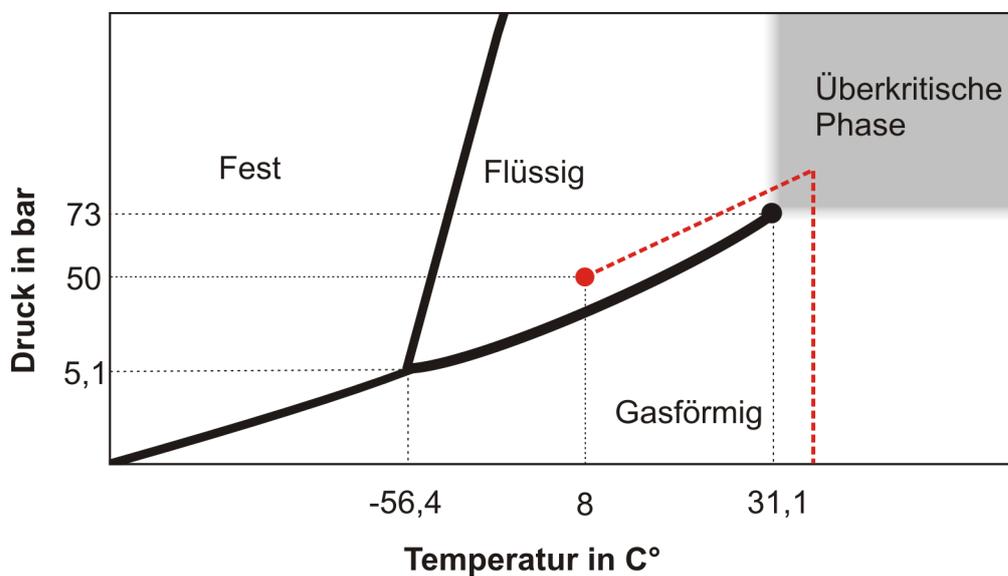


Abbildung 6.13: Schematische Darstellung eines Phasendiagramms von Kohlendioxid. Die rote Linie (Start roter Punkt) deutet den Druck-Temperaturverlauf an, der während des kritischen Punkttrocknens durchlaufen wird.

In Referenz [187] wird gezeigt, wie man mit kritischer Punkttrocknung die DLS-Ergebnisse von sehr fragilen und eng beieinanderliegenden Objekten verbessern kann. Diese Methode basiert darauf den Übergang der flüssigen in die gasförmige Phase zu vermeiden. Der Entwicklungsprozess wird auf eine leicht modifizierte Art durchgeführt. Die Glasplättchen werden aus der Entwicklerflüssigkeit sofort in einen Halter, der mit Azeton gefüllt ist, überführt. Die Template dürfen auf keinen Fall trocknen. In einem Gerät von Leica (EM CPD030) wird die Druckkammer mit Azeton gefüllt und der Probenhalter schnell überführt. Das Azeton ersetzt man zyklisch durch flüssiges  $\text{CO}_2$  (die Strukturen sind immer von Flüssigkeit bedeckt) und kühlt alles auf eine Temperatur von etwa 8 Grad Celcius ab. Bei dieser Temperatur und einem Druck von etwa 50 bar wird das  $\text{CO}_2$  erhitzt (Abb. 6.13). Mit der Temperatur erhöht sich der Druck in der Kammer, bis die kritische Phase des Kohlendioxids erreicht wird. Nun lässt man den Druck und das Kohlendioxid langsam durch ein Nadelventil ab, um die Kondensation von  $\text{CO}_2$  zu vermeiden. Während dieser Trocknungsart durchläuft das Kohlendioxid keine Phasenübergänge, die zu einem Kollaps von Strukturbestandteilen führen könnten.

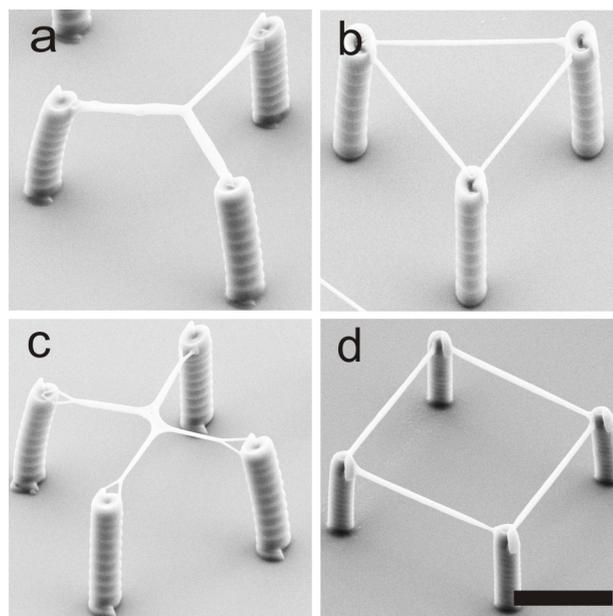


Abbildung 6.14: (a-d) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) und c) Strukturen aus Ormocomp, die normal entwickelt wurden bzw. b) und d) den Prozess des kritischen Punkttrocknens durchlaufen haben. Skalenbalken 10  $\mu\text{m}$ .

Kritische Punkttrocknung liefert Ergebnisse wie sie in Abbildung 6.14 dargestellt sind. Die Strukturen sind in keinsten Weise verformt. Selbst die Template mit dreieckigen Grundflächen, die wegen der kleinen Abstände der Balken in der Nähe der Verankerungspunkte am sensibelsten sind, zeigen eine gute Qualität.

Die theoretische Auswertung, die von Denis Danilov durchgeführt wird [181], ist nun komplizierter, weil die Balken keinen runden Querschnitt besitzen. Die typischen Größenordnung der Balkenabmessungen sind für die kleine Achse etwa  $d_1 = 0,32 \mu\text{m}$  und für die die große Achse  $d_2 = 0,42 \mu\text{m}$ . Diese Werte werden aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt. Besonders der kleine Wert für  $d_1$  und die großen Überspannlängen der Balken von etwa  $25 \mu\text{m}$  lassen darauf schließen, dass diese Strukturelemente wesentlich sensitiver auf die (größtenteils) lateral wirkenden Kräfte reagieren, die aufgespannte Zellen in unseren Geometrien erzeugen. Das theoretische Aspektverhältnis von etwa drei für eine Linie, die mit einem Objektiv der  $\text{NA}=1,4$  geschrieben wird, ist in diesem Fall nicht erfüllt. Der Fotolack zieht sich anscheinend, während die Lösungsmittel verdampfen in axialer Richtung stärker zusammen als in lateraler Richtung.

Die Differentialgleichung für eine Biegelinie (Gleichung 6.1) der Balkentheorie gilt nach wie vor. Für das Flächenträgheitsmoment, das auf einen ovalen Querschnitt der Balken angepasst wird, ergibt sich  $I = \pi \cdot d_1^3 \cdot d_2 / 64$ . Die kleine (sehr dünne) Achse geht in dieser Formel mit der dritten Potenz ein. Dies bedeutet, dass der kleine vermessene Wert dieser Zahl bei Kräften, die Kardiomyozyten ausüben, eine sehr große Verbiegung der Balken ergeben würde. Das Young Modul von Ormocomp wird erneut per AFM auf einen Wert von etwa 800 MPa bestimmt.

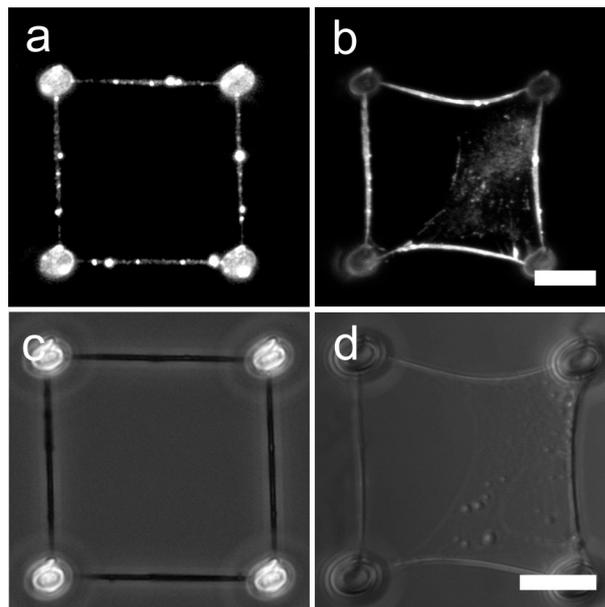


Abbildung 6.15: Fluoreszenzaufnahmen (Aufsicht) von a) und b) Fibronektin gefärbt (weiß) einer Ormocompstruktur in a) vor der Zellaussaat, in b) nach zwei Stunden (Zelle chemisch fixiert). c) und d) zeigen die selbe Zelle (noch lebend) als Phasenkontrastaufnahme. Skalenbalken  $10 \mu\text{m}$  [181].

Die hohe erwartete Sensitivität der Balken und die große Fläche, die eine Zelle in den Strukturen überspannen muss, veranlassen uns primäre Hühnerfibroblasten als Versuchszellen zu verwenden. Dieser Zelltyp ist sehr groß, bringt als Fibroblast aber keine so großen Kräfte auf wie ein Kardiomyozyt. Die Strukturen werden, nachdem die Haftproteine aufgebracht sind, mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops abfotografiert (Abb. 6.15 a). Wenn die Zellen in den Strukturen aufgespannt und kontrahiert sind, kann erneut ein Phasenkontrastbild erstellt werden. Wenn man die relaxierte mit der verbogenen Struktur vergleicht (Abb. 6.15 b), kann die Biegelinie der Balken aus den Bildern extrahiert werden.

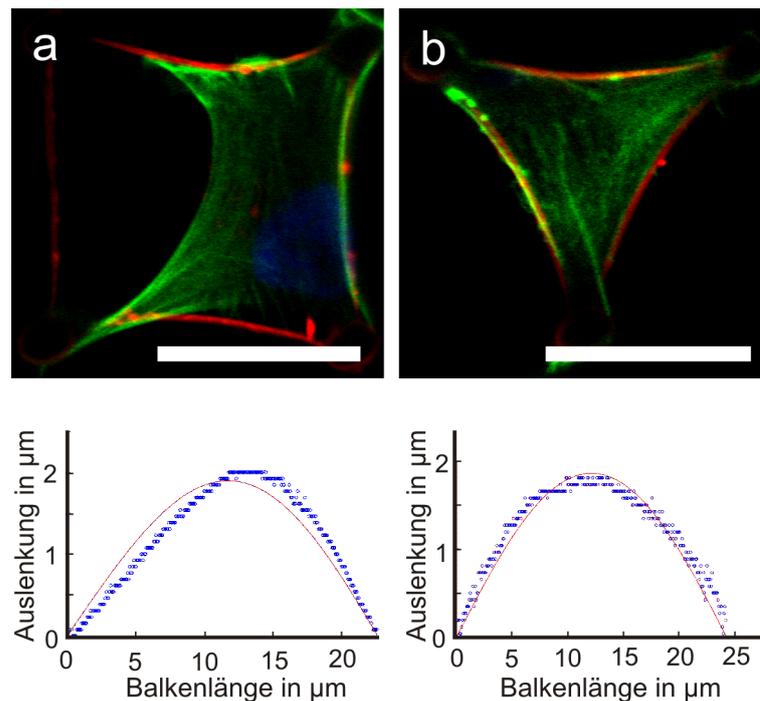


Abbildung 6.16: In a) und b) Fluoreszenzaufnahmen von Zellen, die die Balken von Strukturen (wie in Abb. 6.14) verbiegen. Die Zellen sind auf Aktin (grün) und den Kern (blau) gefärbt. Fibronektin, das die Struktur benetzt, ist rot dargestellt und zeigt die Verbiegung der Balken an. Die obere Biegelinie jeder Struktur wird in den Schaubildern in der gleichen Spalte durch blaue Punkte angezeigt. Die roten Kurven stellen die gefitteten Parameter dar. Skalenbalken in a) und b)  $20 \mu\text{m}$  [181].

In Abbildung 6.16 sind kontrahierte Zellen in einem quadratischen und einem dreieckigen Grundriss zu erkennen. Die Verbiegung der Struktur ist deutlich sichtbar. Aus den gemessenen Verbiegelinien (gepunktete blaue Kurven in Abbildung 6.16) die eine Auslenkung der Balken von etwa  $2 \mu\text{m}$  ergeben, kann man unter der Annahme einer gleichmäßigen Linienkraft über die gesamte Strecke des Balkens eine berechnete Kurve (durchgezogene rote Linien in Abbildung 6.16) anpassen. Wenn man so vorgeht, berechnet man für die quadratische Struktur eine Gesamtzugkraft (jeweils oberer Balken)

von 6,55 nN und für die dreieckige Grundordnung einen Wert von 3,69 nN. Es sei erwähnt, dass die maximalen Linienauslenkungen einen um den Faktor zwei größere Werte gegenüber unseren Rad-Strukturen in [12] ergeben. Diese Auslenkung wird erreicht, obwohl die Gesamtkräfte um eine Größenordnung geringer sind als bei den Versuchen mit den Kardiomyozyten.

Die Balkentheorie eignet sich vor allem für die Modellierung gleichmäßiger Kraftverteilungen, die senkrecht zu den Balkenelementen wirken. Eine Zelle hat eine isotrope kontraktile Komponente, wenn sich der Zellkortex zusammenzieht. Allerdings sieht man in den Fluoreszenzaufnahmen unserer Zellen stark ausgeprägte Aktin-Stressfasern, die nicht unbedingt in eine senkrechte Richtung zu den Balken kontrahieren. Die theoretischen Ergebnisse in (Abb. 6.16) passen nicht perfekt zu den gemessenen Linien. Dies lässt auf anisotrope Elemente in der Zelle schließen, die Kraftkomponenten in paralleler Balkenrichtung aufweisen und so die Biegelinien entlang der Balkenachse verschieben.

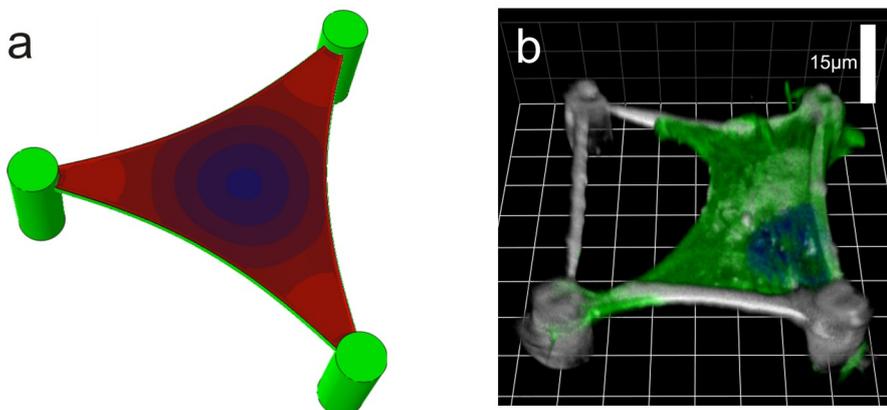


Abbildung 6.17: a) FEM-Nachbildung einer Zelle in einer dreieckigen Struktur (grün). Die Zelle wird als Material modelliert, das sich isotrop zusammenziehen kann und die Balken wie in den Zellexperimenten verzieht. Die Spannung in der Zelle ist in freien Einheiten farblich kodiert und nimmt von blau nach rot zu [181]. b) Eine dreidimensionale Rekonstruktion eines konfokalen Bilderstapels einer Zelle (Aktin in grün, Zellkern in blau). Man kann erkennen, dass sich Aktinfasern auch an den Pfosten und am Glasboden befinden. Die Zelle befindet sich also nicht nur in der Ebene der Balken, weshalb eine zweidimensionale Projektion zu nicht erklärbaeren Biegelinien führen kann.

Diese komplexe Situation kann nur mit einer Finiten Elemente Methode (FEM) gelöst werden (Abb. 6.17 a). Die Balkenelemente können in jedem beliebigen Querschnitt in die Rechnungen einfließen. Die Zelle wird als Verbundmaterial modelliert, das aus einem isotropen Teil (was dem Zellkortex entspricht) und anisotropen Elementen besteht (Stressfasern). Die Stressfaserverteilung der künstlichen Zellen kann der experimentellen Situation nachgeahmt werden, indem die Mikrofilamente in den Fluores-

zenzaufnahmen per Bilderkennung in Richtung und Stärke erfasst werden und so in das FEM-Modell mit einfließen.

Diese Herangehensweise löst die Unterschiede zu den experimentellen Befunde nicht komplett auf. Die Zelle wird in den Aufnahmen von oben nur in einer Ebene dargestellt. Die Strukturen sind dreidimensional und die Zellen haben somit die Möglichkeit auch Kräfte in axialer Richtung auszuüben, beziehungsweise starke Stressfasern auszubilden, die nicht in der Aufnahmeebene liegen. Diese Situation kann man an dreidimensionalen Rekonstruktionen klar erkennen (Abb. 6.17 b). Die Zellen halten sich teilweise auf der kompletten Länge der Stützpfeiler auf und können von dort aus durch starke Aktinbündel mit den Balken mechanisch interagieren. Ein zweites Problem stellt die Lokalisierung der Kräfte dar. Wir gehen davon aus, dass die Gesamtkraft gleichmäßig über den gesamten Balken wirkt. Wie wir aber wissen, wird eine kontraktile Kraft, die im inneren der Zelle von Myosinmotoren erzeugt wird, über Haftpunkte auf die Umgebung übertragen. Jeder Haftpunkte kann unterschiedlich groß sein und verschieden starke Kräfte übertragen. Proteine dieser Haftpunkte werden von uns immunohistochemisch gefärbt und mikroskopiert. Es lässt sich aber keine eindeutige Verteilung feststellen. In zweidimensionalen Gelen fällt die Wirkung einer Punktkraft mit eins über den Radius in jede Richtung ab. Bei einem Balken von 25  $\mu\text{m}$  Länge, der auf beiden Seiten eingespannt ist, kann zwischen der Wirkung auf den Balken von zwei Kraftpunkten, die einige Mikrometer voneinander entfernt sind, kaum unterschieden werden. Diese Situation werden wir auflösen, indem wir die Haftpunkte an den Balken für die Zelle im folgenden Unterkapitel vorgeben.

Die Möglichkeit sehr elastische und somit für die Zelle weiche Elemente herzustellen, wie es DLS in Kombination mit kritischem Punkttrocknen zulässt (Abb. 6.18), eröffnet uns die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Haftpunkte von Zellen in harten 3D-Strukturen mit Haftpunkten an weichen Balken zu vergleichen. Es wird eine großflächige Struktur erstellt, die aus flexiblen Balkenelementen und unverformbaren Säulen besteht (Abb. 6.18 a). Die Abstände zwischen den Säulen sind in kleine und größere Bereiche aufgeteilt. Wie man erkennen kann (Abb. 6.18 b), ist die Methode der kritischen Punkttrocknung sehr wichtig, um die Strukturen vor einem Kollaps zu bewahren. Die Laserleistung während des Belichtungsvorgangs wird in einprozentigen Schritten so stark reduziert, bis die Linienbreiten der Balken mit einer großen Überspannlänge minimal werden. Unter einer bestimmten Linienbreite kollabieren die Balken entweder unter ihrem eigenen Gewicht oder brechen an den Kontaktpunkten zu den Säulen.

Auf diesen Strukturen werden BRL-Zellen ausgestreut und einer kurzer Zeit immunohistochemisch auf Aktin, den Zellkern und die gleichen Markerproteine für Kontakte, wie zuvor in den harten Strukturen gefärbt. Die Analyse der Verteilung dieser Haftproteine in dreidimensionalen weichen Gerüsten (Abb. 6.18 c und d) und die Größe der gesamten Haftpunkte zeigen keinen Unterschied zu Molekülverteilungen in zwei Dimensionen. Dies lässt den Schluss zu, dass die sehr weichen Matrix-Umgebungen, die in [7] für die Experimente verwendet werden, vielleicht einen größeren Einfluss auf

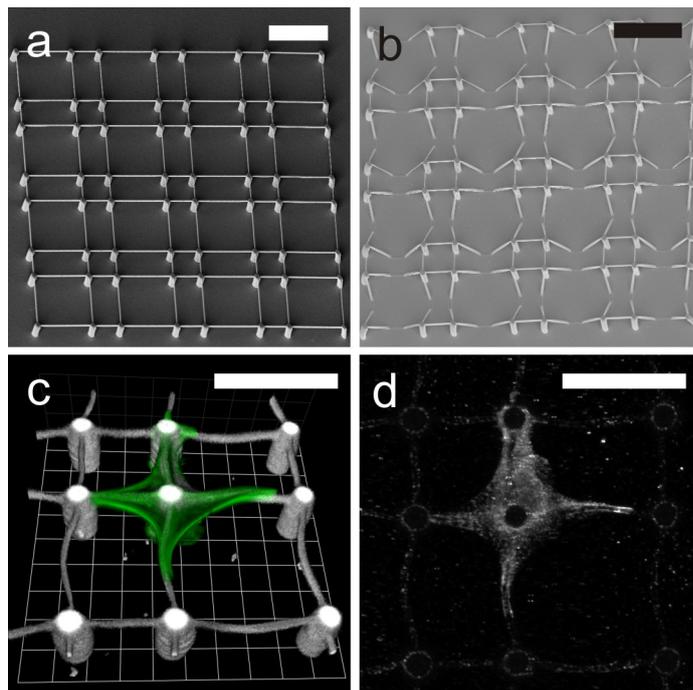


Abbildung 6.18: In a) und b) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme mit einer Struktur, die aus Säulen und Balken mit zwei verschiedenen Längen ( $30\ \mu\text{m}$  und  $10\ \mu\text{m}$ ) besteht, gezeigt. In b) werden die flexiblen Elemente durch den Entwickler irreversibel auf den Glasboden gezogen. Abbildung a) zeigt eine Struktur mit den selben Parametern gefertigt und mit kritischer Punkt-trocknung behandelt. In c) ist eine dreidimensionale Rekonstruktion eines LSM-Bilderstapels zu sehen, in der eine BRL-Zelle auf Aktin (grün) und die Struktur auf Fibronectin (weiß) gefärbt ist. Die Haftstrukturen der gleichen Zelle (weiß) in d) sind auf das Protein pFAK (engl.: phosphorylated focal adhesion kinase) gefärbt. Skalenbalken in a) und b)  $50\ \mu\text{m}$ ; c) und d)  $30\ \mu\text{m}$ . Abbildungen b) und c) aus [141].

die Zusammensetzung der Haftkontakte haben, als es die Dreidimensionalität hat. Die Balkendicken unserer Strukturen haben Werte von etwa  $200\ \text{nm}$ . Die natürliche Umgebung von Fibroblasten, die in dichten Filamentnetzwerken leben (mit Einzel-filamenten von wenigen  $\text{nm}$  Dicke) sind vielleicht noch zu groß. Die Linienbreiten können durch die Kombination von Direktem Laserschreiben und STED im Prinzip auf Werte von etwa  $65\ \text{nm}$  verkleinert werden [155]. Die Herstellung von wohl definierten weitüberspannenden Strukturen wird aufgrund von Stabilitätsproblemen einer solchen Anordnung sehr schwer realisierbar sein.

### 6.3. Kontrolle der Haftmöglichkeiten in drei Dimensionen

In unseren Vorexperimenten zeigen wir bereits einige Strategien, wie eine zweidimensionale Strukturierung per DLS möglich ist. Diese Studien dienen vor allem dazu, die Eigenschaften der Fotolacke zu spezifizieren. Eine zweidimensionale Strukturierung kann durch viele unterschiedliche Methoden erstellt werden. Wir zeigen mit DLS, wie diese Konzepte auf dreidimensionale Polymergerüste erweitert werden können. Die Notwendigkeit einer solchen Anordnung zeigt sich vor allem in den dreidimensionalen Kraftexperimenten mit Zellen. Anstatt die Haftpunkte durch Zellfärbungen zu lokalisieren geht man den umgekehrten Weg und gibt den Zellen vor, wo sie an einer Struktur anhaften können. Die Möglichkeit Gerüste aus adhäsiven Fotolacken mit einer antiadhäsiven Schicht zu belegen und diese an spezifischen Punkten durch Laserablation zu entfernen wird verworfen, weil die Polymerstrukturen selbst beschädigt werden könnten. Deshalb verwenden wir verschiedene PEG-basierten Lacke als Grundgerüste, die von Haftproteinen und den Zellen nicht bedeckt werden können.

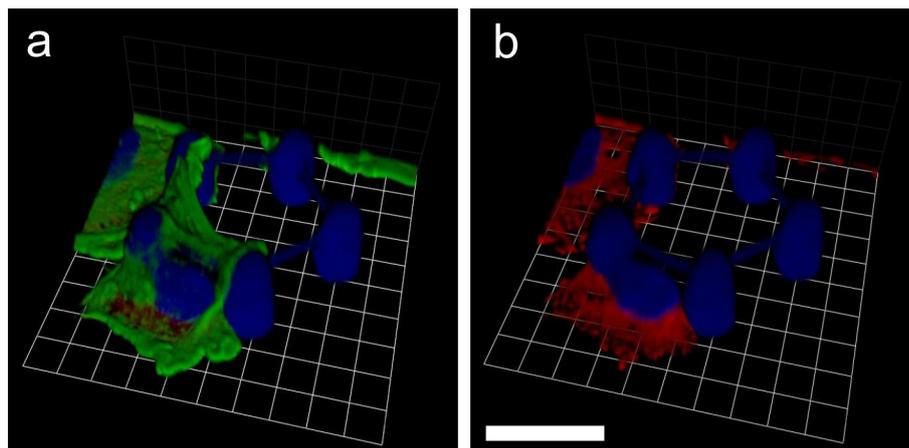


Abbildung 6.19: Grafik a) zeigt eine dreidimensionale Rekonstruktion aus LSM-Dateien einer Struktur aus PEGDA und Fotoinitiator. Der Fotolack zeigt Autofluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm. Deshalb sind die Struktur und die Zellkerne (DAPI) in blau dargestellt. Die Zellen (Aktin in grün) wachsen über die Struktur, können aber keine Haftkontakte in b) auf deren Oberfläche bilden (Paxillin in rot). Der Glasboden ist für die Zellen vollständig zugänglich. Skalenbalken gilt für a) und b) 15  $\mu\text{m}$ .

Anfangs wird PEGDA 700 mit drei Gewichtsprozent des Fotoinitiators Irgacure 369 gemischt. Die Beschichtung der Glasplättchen mit einem Silan, wie wir sie in den 2D-Experimenten eingeführt haben, wird fortgeführt, weil die Polymergerüste sich sonst während der Experimente ablösen würden. Wenn pure PEGDA-Lacke verwendet werden, erreichen wir mit der kritischen Punkttrocknung, dass unsere dreidimensionalen

Objekte nicht kollabieren (Abb. 6.19). Zellen, die diese Strukturen überwuchern, bilden keine sichtbaren Kontakte auf der PEG-Oberfläche aus. Im Gegensatz dazu zeigen sich auf dem Glassubstrat große Ansammlungen von Haftkontakten (Abb. 6.19 b). Die Zellen benötigen auch auf zweidimensionalen Substraten nur eine geringe Fläche, die ihr Überleben sichert und können nichtadhäsive Bereiche großflächig überspannen [88]. Deshalb ist es für Zellen ohne Probleme möglich, sich über die nichtadhäsive Struktur zu legen, so lange der Kontakt zu genügend Haftproteinen vorhanden ist.

Um zu vermeiden, dass die Zellen mit dem Glassubstrat interagieren, wird der Glasboden unter den Strukturen durch PEG-Flächen unzugänglich gemacht. Der Schritt der kritischen Punkttrocknung für die Strukturen kann umgangen werden, wenn wir für die nichtadhäsiven Teile der Gerüste eine Mischung aus PEGDA 575 und zur besseren Quervernetzung 4,8 Gewichtsprozent PETA verwenden. Die Eigenschaften der Kompositlacke auf die Zelladhäsion wurden in den zweidimensionalen Vorexperimenten gezeigt. Diese Herangehensweise hat zwei Vorteile. Erstens ist die Herstellung unkomplizierter, weil ein Zwischenschritt (kritische Punkttrocknung) gespart werden kann. Zweitens verbiegen sich die flexiblen Teile der Strukturen im zweiten Belichtungsschritt, in dem die PEG-basierten Template von dem Flüssiglack Ormocomp umschlossen sind, nicht mehr.

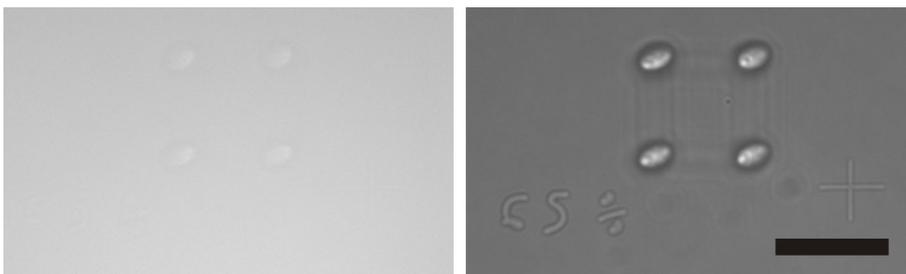


Abbildung 6.20: Unterschiede zwischen Aufsichtbeleuchtung (links) und Durchlichtbeleuchtung (rechts) der gleichen PETA Struktur im flüssigen Ormocomp Fotolack. Die Kontraste der Durchlichtaufnahme sind deutlich schärfer. Die Aufnahme zeigt die Grenzfläche zwischen Glasplättchen und Fotolack, weshalb die Säulen, die Schrift und das Zielkreuz scharf erscheinen. Skalenbalken  $20\ \mu\text{m}$ .

Der zweite Fotolack muss mit einer Genauigkeit von weniger als einem Mikrometer auf die dünnen Seile angebracht werden, weil die Ausdehnung der Strukturelemente in dieser Größenordnung liegt. Dazu sucht man mit dem Interfacefinder des Nanoscribe Geräts die Grenzfläche zwischen Glas und Ormocomp. Wenn diese Position gefunden ist, verfährt man mit einem Steuerelement die Märzhäuser-Bühne und sucht die Strukturen. Die Zielkreuze (Abb. 6.20) werden von uns immer an der selben Position zu den Strukturen platziert. Ihr Mittelpunkt dient als Referenzmarke in lateraler Richtung. Die axiale Position wird durch das Wissen der Strukturparameter und die Glas-Fotolackgrenzfläche festgelegt. Die Position des Schreiblasers auf dem Bildschirm wird

durch das erneute Schreiben eines Zielkreuzes im zweiten Lack (Ormocomp) gefunden und mit einem abwaschbaren Stift vorsichtig auf dem Monitor markiert. Wenn wir die beiden Zielkreuze bei einer vordefinierten Position der Piezobühne übereinander legen, sind die Koordinatensysteme des ersten und des zweiten Schreibprozesses synchronisiert. Eine Verdrehung in der Ebene kann durch die Entfernung der Glasplättchen für den Entwicklungsschritt des ersten Fotolacks entstehen. Man verhindert dieses Problem entweder durch die Entwicklung der Template direkt im Probenhalter oder man kann die Verdrehung ausmessen und über die Anpassung des Winkels in der Schreibdatei korrigieren.

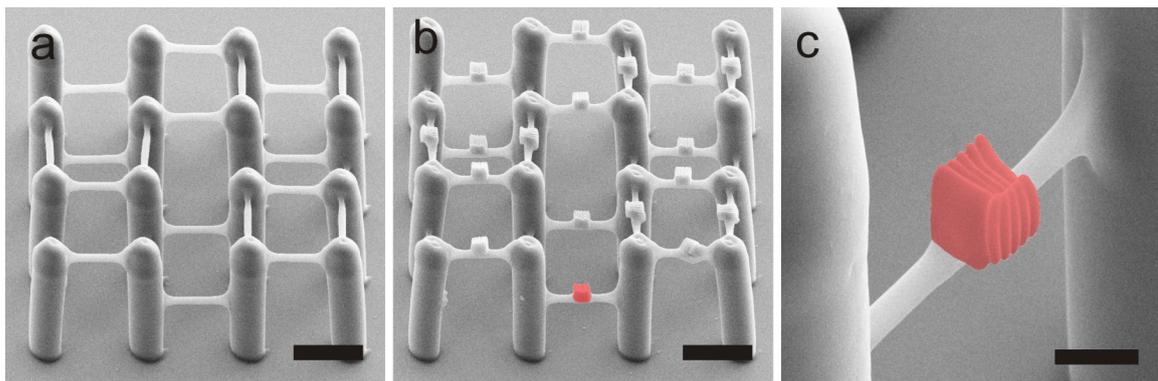


Abbildung 6.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) einer Basisstruktur gefertigt aus PEGDA mit 4,8 Gewichtsprozent PETA. Auf dieses Grundgerüst werden in einem zweiten DLS Schritt in b) kleine Punkte aus Ormocomp (ein Punkt ist in rot hervorgehoben) präzise aufgebracht. c) zeigt die vergrößerte Ansicht eines Ormocompunktes (in rot hervorgehoben). Skalenbalken in a) und b)  $10\ \mu\text{m}$ , in c)  $2\ \mu\text{m}$  [13].

In Abbildung 6.21 ist der vollständige Prozess der dreidimensionalen Strukturierung dargestellt. Der PEG-basierte Lack ist die antiadhäsive Basis (Abb. 6.21 a). Die Haftpunkte aus Ormocere werden mit der gerade beschriebenen Methode angebracht und die monomeren Lackbestandteile mit einer Mischung aus 50 % Isopropanol und 50 % Methylisobuthylketone (MIBK) weggelöst (Abb. 6.21 b und c). Die Strukturen sind danach einsatzbereit. Diese Methode ist sehr gut geeignet, um definierte Verteilungen von Haftpunkten von Zellen zu erzeugen. In der Arbeit von Benjamin Richter [164] zeigen wir, dass es nun auch möglich ist, Haftgradienten von einer zweidimensionalen Verteilung in die dritte Dimension zu erweitern. Verschiedene Mischungen aus PEGDA und PETA besitzen zudem verschiedene Elastizitätsmoduli, weshalb die Steuerbarkeit der physikalischen dreidimensionalen Umgebung nicht allein von der Geometrie abhängt.

Wir zeigen nun, dass die dreidimensionale Strukturierung funktioniert hat und die Ergebnisse der zweidimensionalen Vorexperimente übertragbar sind. Hierfür sähen wir primäre Hühnchenfibroblasten aus und lassen diese wachsen. Die genaue Herangehensweise für die Beschichtung der Strukturen und der immunohistochemischen Färbung

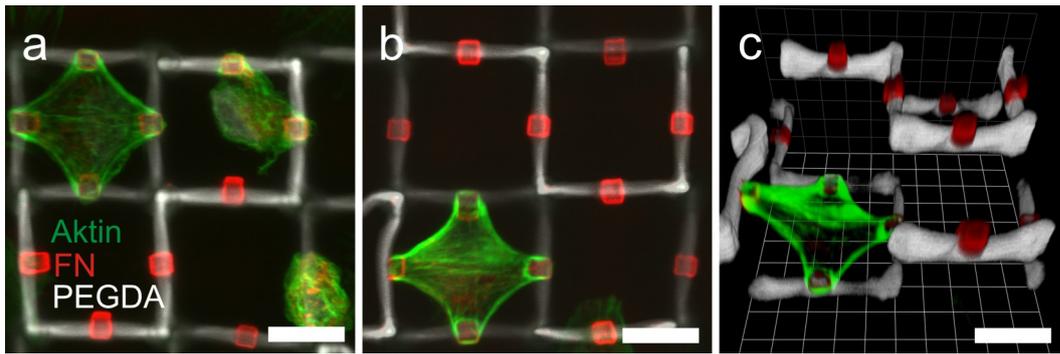


Abbildung 6.22: Zellwachstum in dreidimensionalen Kompositstrukturen (Abb. 6.21). Primäre Hühnchenfibroblasten werden in den Gerüsten kultiviert und auf Fibronektin (rot), Aktin (grün) und Paxillin (gelb) immunohistochemisch gefärbt. a) Drei Zellen adhären an den Ormocompunkten, die mit Fibronektin überzogen sind. b) Aufsicht und c) dreidimensionale Rekonstruktion einer zwischen den Haftpunkten (auf unterschiedlichen Höhen) aufgespannten Zelle. Skalenbalken 10  $\mu\text{m}$  [13].

der Zellen wird in [13] beschrieben. Nach zwei Stunden wird das Zellwachstum gestoppt und für die Aufnahmen durch das LSM werden Aktin, der Kern, Fibronektin und Paxillin mit Fluorophoren versehen. Die Ergebnisse wirken sehr überzeugend (Abb. 6.22). Die Zellen, die komplett innerhalb der Kompositstruktur verweilen, kontaktieren nur die roten Bereiche, die das fluoreszierende Fibronektin darstellen. Ein Hintergrund des Haftproteins auf den restlichen Strukturelementen ist nicht zu erkennen. Wenn eine Zelle nur einen Haftpunkt erreicht kugelt sie sich ab, was ein Zeichen für den Zelltod ist. Die Zellen scheinen nicht in der Lage zu sein eigene Haftproteine auf den PEG-basierten Oberflächen aufzubringen. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass die kontraktile Zellen in drei Dimensionen, ähnlich wie in zweidimensionalen Experimenten in [145], kreisförmige Bögen ausbilden.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

In unseren Zellexperimenten können wir die Form von dreidimensionalen Zellgerüsten, ihre mechanischen Eigenschaften und die Verteilung der Haftproteine (und damit der Kontaktmöglichkeiten) sehr genau kontrollieren. Diese Einzelaspekte und damit experimentell gut definierte Bedingungen sind auf flachen Substraten, wie sie in zellbiologischen Versuchen oft benutzt werden, realisiert. Wichtige Erkenntnisse der Zellwahrnehmung wurden mit proteingestempelten harten Oberflächen [88], flachen weichen Gelunterlagen [6, 73] oder einer Kombination [178] von beidem gewonnen. Die Erweiterung auf topographische Strukturen, wie zum Beispiel einer Zelle auf Säulenfelder [128], erlaubt es, die Haftmöglichkeiten noch genauer vorzugeben und die Kräfte, die an diesen Stellen auf die Umgebung wirken, zu erfassen.

Wir leben aber in einer dreidimensionalen Welt. Es wurde schon gezeigt, dass sich die Morphologie [5], die Proteinzusammensetzung sowie Verteilung der Haftkontakte [7] und die internen Signalwege [151] einer Zelle unterscheiden, je nachdem ob sie auf flachen Substraten oder in dreidimensionalen Polymermatrizen lokalisiert ist. Das Problem in dreidimensionalen Polymeren ist nun, dass Versuchsumgebungen auf Basis von künstlichen Netzwerken [8] oder in vorgereinigten Geweben [7] zwar in ihren globalen Parametern z.B. der Flexibilität, nicht aber in ihren lokalen Eigenschaften (Verteilung von Haftmöglichkeiten, Aufbau der Mikrostruktur) in jedem Einzelversuch genau steuerbare Eigenschaften besitzen. Außerdem können die Zellen durch ihre Kraftentwicklung die Umgebung (und damit auch benachbarte Organismen) beeinflussen, was nicht immer gewünscht ist.

Die Möglichkeit eine mechanisch entkoppelte dreidimensionale Testumgebung, die die anfangs erwähnten Eigenschaften besitzt, herstellen zu können, ist eine große Herausforderung für die Materialwissenschaften und die Zellbiologie. Es gibt durchaus Techniken, die eine dreidimensionale Strukturierung und die Kontrolle der mechanischen Eigenschaften zulassen [139]. Die Größe einzelner Strukturelemente ist allerdings so ausgedehnt, dass eine Zelle eher auf einer gebogenen Wand sitzt, anstatt den Eindruck einer künstlichen Extrazellulären Matrix zu erhalten.

Direktes Laserschreiben ist eine Methode, mit der in der Photonik ohne Probleme Objekte mit Strukturgrößen bis hinunter zu 100 nm erstellt werden können [10]. Direktes Laserschreiben wurde schon verwendet, um haftbare Bereiche in Polymernetzwerken [175] oder freistehende dreidimensionale Objekte aus Fotolacken [160, 165] zu erzeugen. Diese Arbeiten sind darauf ausgelegt, die Materialeigenschaften von vernetzbaren Substanzen zu untersuchen. Die Zellen dienen nur zur Verifikation für

die Biokompatibilität. Wir verwenden ebenfalls Direktes Laserschreiben, gehen aber den umgekehrten Weg. Dreidimensionale Strukturen werden so entworfen und angepasst, dass genau definierte biologische Fragestellungen geklärt werden können. Dazu werden teilweise Konzepte aus niederdimensionalen Versuchen anderer Experimente übernommen, um so die Leistungsfähigkeit unserer Arbeit zu testen.

In zweidimensionalen Strukturierungsversuchen wurden verschiedene Oberflächen (PVP, PVA, PEG-basiert durch Gasphasenabscheidung) auf ihre Eigenschaften als antiadhäsive Komponenten in späteren dreidimensionalen Gerüsten getestet. Die Zelldichte und Größe auf diesen Materialien zeigte durchaus, dass Zellen nicht gut auf den Oberflächen wachsen und bevorzugt an freien Glasflächen anhaften, die durch Laserablation erzeugt wurden. Die antiadhäsiven Eigenschaften von polymerisierten PEGDA Flächen sind aber sehr viel besser, was mit Einzelzellspektroskopie und Zellwachstumsexperimenten gezeigt werden konnte.

Adhäsive Inseln auf einem antiadhäsiven Hintergrund (Freiräume) wurden auch mit Säulenstrukturen erzeugt. Deren oberen runden Flächen können solange als zweidimensional angesehen werden bis die Zellen in die Zwischenräumen einwachsen. Mit Direktem Laserschreiben konnten gleichartige geordnete Säulenfelder für Einzelzellspektroskopieexperimente, quasi-zweidimensionale Härtegradienten mit unterschiedlichen Säulendurchmessern und eine Säulenform, mit der man Kräfte auf einzelne Zell-Matrixkontakte ausüben kann, erzeugt werden.

Dreidimensionale harte Gitterstrukturen wurden entwickelt, um das Einwachsverhalten von Zellen in Gewebe zu simulieren. Die Polymermatrix musste anfangs in einem Konversionsverfahren in ein Glasgerüst umgewandelt werden, weil Objekte aus SU-8 Fotolack starke Autofluoreszenz während der Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop zeigten und sich von den Substraten (Mikroskopdeckgläser) während der Zellversuche ablösten. Diese Situation konnte mit einem Fotolack auf der Basis des Monomers PETA (Eigenfluoreszenz stark unterdrückt) und einer Beschichtungsmethode der Glasplättchen mit einem Haftvermittler (kovalente Bindungen zwischen Glas und Fotolack) gelöst werden. Die sehr zeitaufwändige Verglasungsmethode [95] wurde somit überflüssig.

Die gleichen Materialien wurden für unsere Radstrukturen verwendet [154], die ein offeneres Design besitzen und den Zellen die Möglichkeit bieten, sich entweder über weite Strecken aufzuspannen oder eine eher zweidimensionale Umgebung an den flachen Wänden vorzufinden. Das Volumen von Epithelzellen, die *in vivo* auf einer quasi-zweidimensionalen Basallamina lokalisiert sind, ändert sich kaum, wenn man diesen Zelltyp auf dem flachen Glassubstrat und in der 3D-Struktur vergleicht. Fibroblasten und mesenchymale Zellen zeigen im Gegensatz dazu ein signifikant größeres Zellvolumen in der dreidimensionalen Umgebung. Dies war so noch nicht bekannt [154].

In mechanisch harten Umgebungen wurden, ähnlich wie es in natürlichen Geweben praktiziert wurde [7], die Zusammensetzung der Zell-Matrix-Kontakte von BRL-Zellen (mesenchymale Zellen) in den Radstrukturen (3D) und auf dem Glassubstrat (2D)

verglichen und keine Unterschiede festgestellt [141]. Deshalb wurden dreidimensionale flexible Strukturen aus dem Fotolack Ormocomp erstellt, in denen auch keine Unterschiede in der Proteinkomposition der Haftkontakte einer Zelle festgestellt wurden. Die Haftkontakte, die einen großen Einfluss in der Zellwahrnehmung der Umgebung besitzen, werden offensichtlich von der Dimensionalität der Umgebung nicht unbedingt beeinflusst. Die Ausprägung der Kontakte hängt von einer Vielzahl von Faktoren (Art und Zusammensetzung der Polymermatrix) ab.

Ormocomp ist laut unseren Messungen durch eine AFM-basierte Methode [12] mit einem Elastizitätsmodul von 800 MPa (entspanntes Muskelgewebe hat etwa 10 kPa [6]) nicht weich. Deshalb wurden Strukturen aus Säulen, die mit sehr dünnen Balken verbunden sind, erstellt. Die Balken können von Herzzellen (Kardiomyozyten) wahrnehmbar rhythmisch verformt werden. Aus diesen Verformungen schließen wir mit Hilfe der Balkentheorie auf eine Kraft, die an einem Polymerbalken wirkt, von etwa 47 nN [12]. Die Balkendicke hat den größten Einfluss auf die elastischen Eigenschaften. Um sie zu verringern, verwenden wir kritische Punkttrocknung [187], die verhindert, dass dünne Balken während des Entwicklungsprozesses der Fotolacke kollabieren. Die dünneren Balkenelemente erlauben schwächeren Zelltypen (primäre Hühnerfibroblasten) eine Auslenkung der flexiblen Elemente von über zwei Mikrometern. Eine Gesamtkraft von etwa 5 nN konnte ermittelt werden. Die Untersuchungen wurden mit Methoden, die in der Lage sind anisotrope Kräfte von Stressfasern einer Zelle zu berücksichtigen [181], erweitert. Kräfte werden von der Zelle auf ihre Umgebung über definierte Haftpunkte übertragen. Diese Fokalkontakte zu lokalisieren war durch immunohistologische Färbungen nur eingeschränkt möglich.

Deshalb umgehen wir dieses Problem und erstellen aus dem Fotolack PEGDA ein antiadhäsives dreidimensionales Gerüst, das aus Säulen und dünnen Balken in verschiedenen Höhen besteht. An die Balken werden in einem zweiten Polymerisations-schritt (Verwendung findet der Fotolack Ormocomp) adhäsive Punkte angebracht. Außerdem kann man durch die Mischung von PEGDA mit dem Quervernetzer PETA in einem gewissen Bereich die mechanischen Eigenschaften der Gerüste einstellen ohne die antiadhäsiven Eigenschaften zu verlieren [13]. Die Zellen spannen sich nun an frei definierbaren Punkten in der dreidimensionalen Matrix auf. Das Ziel, eine dreidimensionale Struktur mit kontrollierbaren mechanischen Eigenschaften und einer definierten Verteilung der Haftproteine herzustellen, wurde somit erreicht.

Im Anhang, der gleichzeitig einen Ausblick auf künftige Experimente darstellt, zeigen wir eine Methode, mit der mechanisch harte Strukturen in einer weichen Polymermatrix eingebettet werden können. Die Zellen verformen die weiche Matrix und sollten Unterschiede in der effektiven Härte (durch die eingebetteten Elemente) erkennen und sich nach den mechanisch harten Fotolackstrukturen ausrichten. Dieser Testaufbau stellt eine Erweiterung der Experimente von Discher [143] dar. Eine gute Verbindung zwischen Glasplättchen und Polyakrylamidgel (PAA) wurde mit einer Oberflächenbehandlung der Glasplättchen erreicht. Kollagen, das als Haftprotein für die Zellen dient, muss durch ein spezielles Verfahren erst modifiziert werden damit

es an PAA bindet [188]. Die Abstände zwischen den Strukturen und der Matrixoberfläche können mit Polymerkugeln eingestellt werden, was durch das nachträgliche Anschwellen der Polymermasse nur eine bedingte Information über den Abstand der eingebetteten Strukturen zur PAA-Oberfläche, auf der die Zellen sitzen, liefert. Die Ergebnisse lassen Aussagen zu wie weit die Strecken sind, auf denen Zellen mechanisch in Kontakt treten können. Diese Kommunikationsform ist zeitlich schneller als die Diffusion von chemischen Botenstoffen.

Die Herstellung der Kompositstrukturen aus adhäsiven und antiadhäsiven Matrixbestandteilen sollte fortgeführt werden. In [164] wird zum Beispiel gezeigt, dass Proteingradienten in drei Dimensionen herstellbar sind. Die Unterschiede von Ergebnissen auf zweidimensionalen strukturierten Substraten zu den Ergebnissen in 3D könnten grundlegende Fragen klären wie eine Zelle ihre Umgebung wahrnimmt. Außerdem könnte in Betracht gezogen werden, dass Materialien, die beispielsweise für künstliche Hüftgelenke Verwendung finden, durch eine (dreidimensionale) Strukturierung der Oberflächen den Zellen eine wesentlich physiologischere Umgebung bieten, so dass die Fremdkörper schneller anwachsen. Bereiche, die nicht bevölkert werden sollen, könnten passiviert werden.

Diese Ziele können mit der Weiterentwicklung der Lacke einhergehen. Im Moment verwenden wir für eine Kompositstruktur zwei verschiedene Fotolacksysteme. Die Entwicklung eines Lackes, dessen lokalen Eigenschaften nach dem Direkten Laserschreiben veränderbar sind, wäre sehr wünschenswert. Eine Verbesserung würde auch die Automatisierung des zweiten Belichtungsschrittes im Herstellungsprozess der Kompositstrukturen ermöglichen. Im Moment muss die Ausrichtung der antiadhäsiven Grundgerüste per Auge am Monitor durchgeführt werden. Dieser Schritt könnte durch Bilderkennung automatisiert werden und der Durchsatz an Kompositstrukturen damit deutlich erhöht.

In den Kompositstrukturen können die kreisförmigen Bögen, die Zellen auf zweidimensional strukturierten Substraten zeigen [145], auf Kugelflächen in drei Dimensionen erweitert werden. Die Probleme liegen hier nicht an der Herstellung der Gerüste, sondern an der Qualität der Zellfärbungen und der Aufnahmen mit dem LSM.

Reproduzierbare Netzwerke aus vielen dünnen Linien, die eine Zelle durchwandern kann, würden die Situation *in vivo* in Bindegeweben noch besser nachstellen als die geordneten Strukturen, die wir bisher verwenden. Die Invasivität von Krebszellen könnte physiologischer untersucht werden als in den Stapelstrukturen.

Die 3D-Strukturen könnte man in eine Polymermatrix einbetten, die Zellen durchwandern kann. Die Unterschiede in der Kontaktzusammensetzung von Zellen, die (teilweise) an den Gerüsten festmachen, und anderen Exemplaren, die komplett in der weichen Matrix sitzen, wären interessant.

## A. Eingebettete Strukturen in weichen Gelen

Im Anhang kommen wir auf die Möglichkeit zu sprechen, wie getestet werden kann, wie weit Zellen eingebettete Strukturen in einer weichen Matrix wahrnehmen können. Eine etwas indirektere Methode von [143] wird hier durch anisotrope Elemente erweitert. In diesem Zusammenhang werden Strukturen unterschiedlicher axialer Ausdehnung, die per Direktem Laserschreiben gefertigt werden, in eine Lage von weichem Polyakrylamid eingebettet. Es sind einige Bearbeitungsschritte nötig, damit die weiche Schicht während der Zellexperimente nicht abschwimmt und die Zellen auf ihr adhären. Erste Ergebnisse dieses Experiments werde ich hier vorstellen.

Zellen können durch innere Kontraktion Kräfte auf ihre Umgebung ausüben und damit eine Vorspannung in lebenden Geweben erzeugen. Diese Eigenschaft führt dazu, dass sich flexible Materialien verformen und die Zellen über den mechanischen Widerstand der Materialien ihr Umgebung erfühlen können. Die Gruppe um Denis Discher zeigt in ihren Experimenten, dass die Zellwahrnehmung von mechanischen Eigenschaften nicht auf den direkten Kontakt angewiesen ist, sondern über einige Entfernung möglich ist [143]. Für diese Experimente wird sehr weiches Polyakrylamid (PAA) in unterschiedlichen Dicken auf ein hartes Glasplättchen aufgebracht. Zellen werden auf die Gelmatrix gegeben und durch Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Später wird ihre Größe in Abhängigkeit zu der Dicke ihrer Unterlage ausgewertet. Die Daten, die aus nur vier unterschiedlich dicken Gelschichten gewonnen worden sind, werden mit einer hyperbolischen Funktion angenähert. Für ein Elastizitätsmodul von etwa 1 kPa des PAA beträgt die berechnete typische Längenskala in einer konservativen Auswertung etwa  $4 \mu\text{m}$ . In [189] werden die Deformationen, die Zellkräfte in dünnen PAA Schichten verursachen, untersucht. Die Autoren kommen zu der Auffassung, dass die Schichten zur Bestimmung von Zellkräften in Zell-Kraftexperimenten auf flachen Substraten über  $5 \mu\text{m}$  an Höhe besitzen sollten. Ab diesem Wert werden die Auswirkungen der Randbedingungen der harten Glasunterlage vernachlässigbar klein.

Diese Experimente zeigen, dass Zellen Verformungsfelder in flexiblen Proben verursachen können und indirekt die harte Unterlage spüren, was sich insbesondere in ihrem Wachstumsverhalten zeigt. In Experimenten, die die Wahrnehmung biochemischer Stoffe untersuchen, können Zellen auch sehr kleine Konzentrationsunterschiede detektieren. Die Wahrnehmung von effektiven Elastizitätsunterschieden könnte ähnlich sensibel sein sein. Die internen Verstärkungskaskaden der Signalproteine führen da-

zu, dass Zellen vielleicht kleinste Unterschiede in Verformungsfeldern ihrer Umgebung registrieren und darauf reagieren.

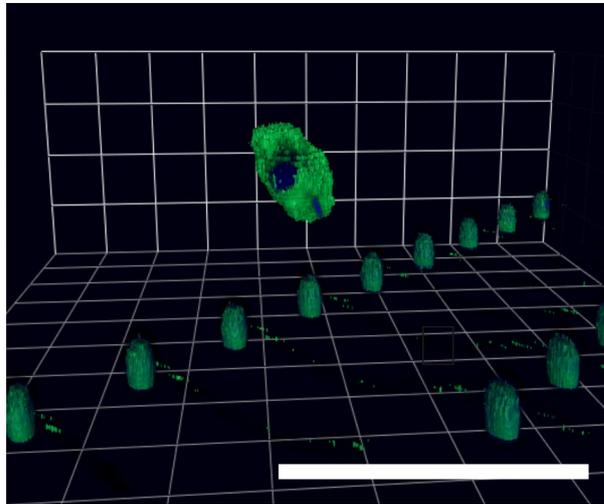


Abbildung A.1: Rekonstruktion einer konfokalen Bilderstapeldatei. Ein Zellhaufen (BRL-Zellen) auf Aktin (grün) und den Kern (blau) gefärbt liegt auf einer sehr weichen Schicht Polyakrylamid. Die eingebetteten Strukturen aus PETA zeigen Autofluoreszenz (grün). Sie bestehen aus Säulen, die mit Balken in einer Richtung verbunden sind. Skalenbalken  $50 \mu\text{m}$ .

Zu diesem Zweck versuchen wir die Experimente von Discher zu erweitern. In die sehr weiche Matrix aus PAA werden harte Strukturen unterschiedlicher Höhe eingebracht, um die elastische Isotropie des Untergrunds zu brechen. Die Strukturhöhen unterscheiden sich um jeweils einen Mikrometer und könnten im Prinzip auch als gleichmäßiger Gradient hergestellt werden. Die Template (lange Balken auf Säulen) aus PETA werden per DLS hergestellt. Die silanisierten Deckgläschen, die den Halt des Fotolackes garantieren, eignen sich allerdings nicht als Haftgrundlage für PAA. Dies zeigt sich während der Experimente durch das Ablösen der Polymerschicht. Aus diesem Grund werden die Glasplättchen mit den Strukturen für kurze Zeit (5 min) und nur wenig Resonatorleistung (200 W) des Plasmareinigers in einem Luftplasma aktiviert und für eine Stunde mit einer 1 mmol Lösung von Allyltriethoxysilan (ABC) in Azeton behandelt. Es folgt eine Spülung in destilliertem Wasser und die vorsichtige Trocknung mit Stickstoff. Die Polymerstrukturen werden mit verschiedenen PAA-Mischungen bedeckt. Diese bestehen (auf zwei Milliliter gerechnet) aus einem variablen Volumenanteil Akrylamid, Bis-Akrylamid (0,8 Volumenprozent) als Quervernetzer,  $1 \mu\text{l}$  TEMED und  $4 \mu\text{l}$  einer 10 % Ammoniumpersulfatlösung. Der Rest des Volumens wird mit Wasser aufgefüllt. Außerdem geben wir  $10 \mu\text{l}$  Polystyren-Kügelchen (eins zu zehn Mischung aus der Stammlösung) mit einem Durchmesser von  $15 \mu\text{m}$  hinzu. Diese Mischung muss schnell verarbeitet werden, weil die Polymerisation sofort beginnt. Es wird ein Volumen von  $4 \mu\text{l}$  pro Deckglas auf die PETA-Strukturen gegeben und sofort ein zweites Deckglas aufgelegt. Die Kügelchen dienen als Platzhalter, damit

eine ebene homogene Fläche entsteht. Die vollständige Vernetzung benötigt etwa eine halbe Stunde. Danach wird das unsilanisierte Deckglas vorsichtig entfernt und die Probe in PBS gelagert, um das Austrocknen des PAA-Films zu verhindern. Vor den Experimenten wird die Polymeroberfläche mit Kollagen beschichtet. Wenn man dies tut lagert sich nur sehr wenig Kollagen an (Abb. A.1). Es sind zwar Zellklomere vorhanden, die in den Fluoreszenzaufnahmen über den Strukturen schweben. Die Zellen haben jedoch keine normale Morphologie.

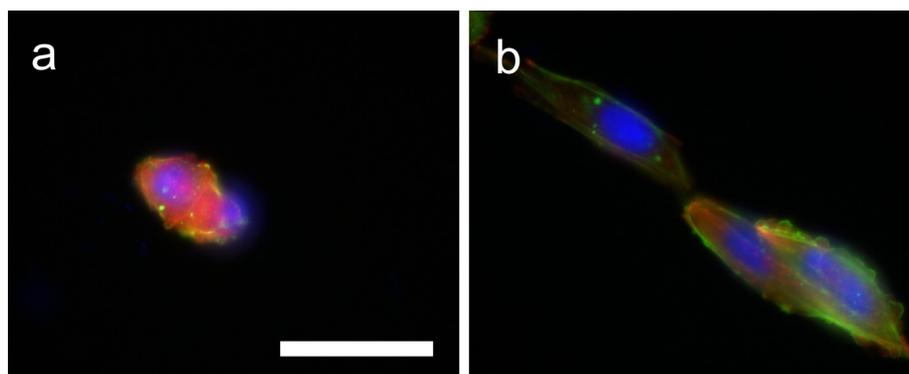


Abbildung A.2: BRL-Zellen auf einem Polyakrylamidgel, das aus 4,5 Volumenprozent Akrylamid besteht. Dieses Gel ist sehr weich, weshalb eine einzelne Zelle in a) sich abrundet und stirbt. b) Mehrere Zellen können durch die Kräfte, die sie über die weiche Matrix übertragen, überleben und richten sich in einer Linie aus. Skalenbalken gilt für a) und b)  $20 \mu\text{m}$ .

Die Oberfläche von PAA kann entweder durch Sulpho-Sanpah [190] oder einer günstigeren Methode [188], die ihre Wirkung auch über einen längeren Zeitraum beibehält, aktiviert werden. Wenn wir die Versuche mit dem Protokoll laut [188] durchführen, sehen wir Bereiche auf dem Polymer wo sich die Zellen ausbreiten und in langen Linien anordnen (Abb. A.2). Manche Zellen sind dagegen abgerundet. Die Kräfte der Zelle in einem Verband haben auch Auswirkungen auf ihre Nachbarn, indem die Zellen die Matrix durch Kontraktion effektiv härter machen. Einzelne Zellen erhalten dagegen zu wenig mechanische Antwort auf ihre Kontraktion, was zu ihrem Zelltod führt. Zellantworten auf die harten Strukturen in der weichen Matrix konnten noch nicht beobachtet werden, weil die PAA-Schicht noch zu hoch ist.



# Literaturverzeichnis

- [1] S. W. Hell und J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy.” *Opt Lett* **19**, 780–782 (1994).
- [2] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, und H. F. Hess, “Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3125–3130 (2009).
- [3] A. del Rio, R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, und M. P. Sheetz, “Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding.” *Science* **323**, 638–641 (2009).
- [4] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, und J. Käs, “The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells.” *Biophys J* **81**, 767–784 (2001).
- [5] K. M. Yamada und E. Cukierman, “Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D.” *Cell* **130**, 601–610 (2007).
- [6] D. E. Discher, P. Janmey, und Y.-L. Wang, “Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate.” *Science* **310**, 1139–1143 (2005).
- [7] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, und K. M. Yamada, “Taking cell-matrix adhesions to the third dimension.” *Science* **294**, 1708–1712 (2001).
- [8] W. R. Legant, J. S. Miller, B. L. Blakely, D. M. Cohen, G. M. Genin, und C. S. Chen, “Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices.” *Nat Methods* **7**, 969–971 (2010).
- [9] J. J. Mao, W. V. Giannobile, J. A. Helms, S. J. Hollister, P. H. Krebsbach, M. T. Longbaker, und S. Shi, “Craniofacial tissue engineering by stem cells,” *J Dent Res* **85**, 966–979 (2006).
- [10] K. Busch, G. von Freymann, S. Linden, S. F. Mingaleev, L. Tkeshelashvili, und M. Wegener, “Periodic nanostructures for photonics.” *Phys Rep* **444**, 101 (2007).

- [11] S. I. Fraley, Y. Feng, R. Krishnamurthy, D.-H. Kim, A. Celedon, G. D. Longmore, und D. Wirtz, "A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility." *Nat Cell Biol* **12**, 598–604 (2010).
- [12] F. Klein, T. Striebel, J. Fischer, Z. Jiang, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und M. Bastmeyer, "Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements." *Adv Mater* **22**, 868–871 (2010).
- [13] F. Klein, B. Richter, T. Striebel, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und M. Bastmeyer, "Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture." *Adv Mater*, Online veröffentlicht (2011).
- [14] H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, und P. Matsudaira, *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman and Company, 2008), 6te Ed.
- [15] B. Alberts, A. Johnsen, L. Lewis, M. Raff, K. Roberts, und K. Walter, *Molekularbiologie der Zelle* (Wiley-VCH, 2004).
- [16] H. Plattner und J. Hentschel, *Zellbiologie* (Thieme, 2005).
- [17] P. A. Coulombe, M. E. Hutton, R. Vassar, und E. Fuchs, "A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases." *J Cell Biol* **115**, 1661–1674 (1991).
- [18] J. S. H. Lee, C. M. Hale, P. Panorchan, S. B. Khatau, J. P. George, Y. Tseng, C. L. Stewart, D. Hodzic, und D. Wirtz, "Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration." *Biophys J* **93**, 2542–2552 (2007).
- [19] N. D. Willis, R. G. Wilson, und C. J. Hutchison, "Lamin A: a putative colonic epithelial stem cell biomarker which identifies colorectal tumours with a more aggressive phenotype." *Biochem Soc Trans* **36**, 1350–1353 (2008).
- [20] M. Osborn und K. Weber, "Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 867–871 (1976).
- [21] K. S. Burbank und T. J. Mitchison, "Microtubule dynamic instability." *Curr Biol* **16**, R516–R517 (2006).
- [22] S. Etienne-Manneville, J.-B. Manneville, S. Nicholls, M. A. Ferenczi, und A. Hall, "Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization." *J Cell Biol* **170**, 895–901 (2005).
- [23] C. E. Schutt, J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. Goonesekere, und U. Lindberg, "The structure of crystalline profilin-beta-actin." *Nature* **365**, 810–816 (1993).

- [24] T. D. Pollard, "Measurement of rate constants for actin filament elongation in solution." *Anal Biochem* **134**, 406–412 (1983).
- [25] M. S. Mooseker, T. D. Pollard, and K. A. Wharton, "Nucleated polymerization of actin from the membrane-associated ends of microvillar filaments in the intestinal brush border." *J Cell Biol* **95**, 223–233 (1982).
- [26] J. R. Kuhn und T. D. Pollard, "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy." *Biophys J* **88**, 1387–1402 (2005).
- [27] P. Ranjith, K. Mallick, J.-F. Joanny, und D. Lacoste, "Role of ATP-hydrolysis in the dynamics of a single actin filament." *Biophys J* **98**, 1418–1427 (2010).
- [28] I. Fujiwara, D. Vavylonis, und T. D. Pollard, "Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8827–8832 (2007).
- [29] B. Bugyi und M.-F. Carlier, "Control of actin filament treadmilling in cell motility." *Annu Rev Biophys* **39**, 449–470 (2010).
- [30] C. Chan, C. C. Beltzner, und T. D. Pollard, "Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments." *Curr Biol* **19**, 537–545 (2009).
- [31] C. G. dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, und N. J. Nosworthy, "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." *Physiol Rev* **83**, 433–473 (2003).
- [32] I. Delalle, C. M. Pflieger, E. Buff, P. Lueras, und I. K. Hariharan, "Mutations in the *Drosophila* orthologs of the F-actin capping protein alpha- and beta-subunits cause actin accumulation and subsequent retinal degeneration." *Genetics* **171**, 1757–1765 (2005).
- [33] J. G. Kiselar, R. Mahaffy, T. D. Pollard, S. C. Almo, und M. R. Chance, "Visualizing Arp2/3 complex activation mediated by binding of ATP and WASp using structural mass spectrometry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1552–1557 (2007).
- [34] C. Egile, I. Rouiller, X.-P. Xu, N. Volkmann, R. Li, und D. Hanein, "Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions." *PLoS Biol* **3**, e383 (2005).
- [35] T. M. Svitkina und G. G. Borisy, "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." *J Cell Biol* **145**, 1009–1026 (1999).
- [36] E. Urban, S. Jacob, M. Nemethova, G. P. Resch, und J. V. Small, "Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia." *Nat Cell Biol* **12**, 429–435 (2010).

- [37] T. P. Loisel, R. Boujemaa, D. Pantaloni, und M. F. Carrier, “Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins.” *Nature* **401**, 613–616 (1999).
- [38] N. Jouvenet, P. D. Bieniasz, und S. M. Simon, “Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells.” *Nature* **454**, 236–240 (2008).
- [39] T. Ohkawa, L. E. Volkman, und M. D. Welch, “Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface.” *J Cell Biol* **190**, 187–195 (2010).
- [40] M. Gladnikoff, E. Shimoni, N. S. Gov, und I. Rousso, “Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism.” *Biophys J* **97**, 2419–2428 (2009).
- [41] J. Weichsel, N. Herold, M. J. Lehmann, H.-G. Kräusslich, und U. S. Schwarz, “A quantitative measure for alterations in the actin cytoskeleton investigated with automated high-throughput microscopy.” *Cytometry A* **77**, 52–63 (2010).
- [42] S. Suresh, “Biomechanics and biophysics of cancer cells.” *Acta Biomater* **3**, 413–438 (2007).
- [43] M. A. Geeves und K. C. Holmes, “Structural mechanism of muscle contraction.” *Annu Rev Biochem* **68**, 687–728 (1999).
- [44] A. L. Wells, A. W. Lin, L. Q. Chen, D. Safer, S. M. Cain, T. Hasson, B. O. Carragher, R. A. Milligan, und H. L. Sweeney, “Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards.” *Nature* **401**, 505–508 (1999).
- [45] M. Y. Jiang und M. P. Sheetz, “Mechanics of myosin motor: force and step size.” *Bioessays* **16**, 531–532 (1994).
- [46] J. T. Finer, R. M. Simmons, und J. A. Spudich, “Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps.” *Nature* **368**, 113–119 (1994).
- [47] S. V. Mikhailenko, Y. Oguchi, und S. Ishiwata, “Insights into the mechanisms of myosin and kinesin molecular motors from the single-molecule unbinding force measurements.” *J R Soc Interface* **7**, 295–306 (2010).
- [48] Y. Imafuku, N. Thomas, und K. Tawada, “Hopping and stalling of processive molecular motors.” *J Theor Biol* **261**, 43–49 (2009).
- [49] M. Rief, R. S. Rock, A. D. Mehta, M. S. Mooseker, R. E. Cheney, und J. A. Spudich, “Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9482–9486 (2000).
- [50] C. B. Korn, S. Klumpp, R. Lipowsky, und U. S. Schwarz, “Stochastic simulations of cargo transport by processive molecular motors.” *J Chem Phys* **131**, 245107 (2009).

- [51] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, und P. R. Selvin, "Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization." *Science* **300**, 2061–2065 (2003).
- [52] M. Abercrombie, J. E. M. Heaysman, und S. M. Pegrum, "The locomotion of fibroblasts in culture IV. Electron microscopy of the leading lamella." *Exptl Cell Res* **67**, 359–367 (1971).
- [53] K. Hu, L. Ji, K. T. Applegate, G. Danuser, und C. M. Waterman-Storer, "Differential transmission of actin motion within focal adhesions." *Science* **315**, 111–115 (2007).
- [54] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, und C. M. Waterman, "Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions." *Nature* **468**, 580–584 (2010).
- [55] R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi, und B. Geiger, "Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes." *Biochem Soc Trans* **32**, 416–420 (2004).
- [56] C. S. Izzard und L. R. Lochner, "Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study." *J Cell Sci* **42**, 81–116 (1980).
- [57] W. T. Chen und S. J. Singer, "Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell-substratum and cell-cell contacts in cultured fibroblasts." *J Cell Biol* **95**, 205–222 (1982).
- [58] E. Puklin-Faucher und M. P. Sheetz, "The mechanical integrin cycle." *J Cell Sci* **122**, 179–186 (2009).
- [59] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, und B. Geiger, "Functional atlas of the integrin adhesome." *Nat Cell Biol* **9**, 858–867 (2007).
- [60] D. C. Worth und M. Parsons, "Advances in imaging cell-matrix adhesions." *J Cell Sci* **123**, 3629–3638 (2010).
- [61] A. Banno und M. H. Ginsberg, "Integrin activation." *Biochem Soc Trans* **36**, 229–234 (2008).
- [62] A. Tomar und D. D. Schlaepfer, "Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility." *Curr Opin Cell Biol* **21**, 676–683 (2009).
- [63] S. Huveneers und E. H. J. Danen, "Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho." *J Cell Sci* **122**, 1059–1069 (2009).
- [64] J. Colombelli, A. Besser, H. Kress, E. G. Reynaud, P. Girard, E. Caussinus, U. Haselmann, J. V. Small, U. S. Schwarz, und E. H. K. Stelzer, "Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization." *J Cell Sci* **122**, 1665–1679 (2009).

- [65] A. Besser und S. A. Safran, “Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions.” *Biophys J* **90**, 3469–3484 (2006).
- [66] E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, und J. P. Spatz, “Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands.” *Biophys J* **92**, 2964–2974 (2007).
- [67] A. Aszódi, K. R. Legate, I. Nakchbandi, und R. Fässler, “What mouse mutants teach us about extracellular matrix function.” *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 591–621 (2006).
- [68] F. H. Silver, D. DeVore, und L. M. Siperko, “Invited review: role of mechanophysiology in aging of ecm: effects of changes in mechanochemical transduction.” *J Appl Physiol* **95**, 2134–2141 (2003).
- [69] N. E. Campbell, L. Kellenberger, J. Greenaway, R. A. Moorehead, N. M. Linnerth-Petrik, und J. Petrik, “Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis.” *J Oncol* **2010**, 586905 (2010).
- [70] A. C. Shieh, “Biomechanical forces shape the tumor microenvironment.” *Ann Biomed Eng* (2011).
- [71] L. G. Griffith und M. A. Swartz, “Capturing complex 3D tissue physiology in vitro.” *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 211–224 (2006).
- [72] S. Cattaruzza und R. Perris, “Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading.” *Matrix Biol* **24**, 400–417 (2005).
- [73] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, und D. E. Discher, “Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.” *Cell* **126**, 677–689 (2006).
- [74] A. Ponti, M. Machacek, S. L. Gupton, C. M. Waterman-Storer, und G. Danuser, “Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells.” *Science* **305**, 1782–1786 (2004).
- [75] J. Weichsel und U. S. Schwarz, “Two competing orientation patterns explain experimentally observed anomalies in growing actin networks.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6304–6309 (2010).
- [76] S. P. Palecek, J. C. Loftus, M. H. Ginsberg, D. A. Lauffenburger, und A. F. Horwitz, “Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness.” *Nature* **385**, 537–540 (1997).
- [77] S. Etienne-Manneville und A. Hall, “Rho GTPases in cell biology.” *Nature* **420**, 629–635 (2002).
- [78] C. D. Nobes und A. Hall, “Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.” *J Cell Biol* **144**, 1235–1244 (1999).

- [79] B. Song, Y. Gu, J. Pu, B. Reid, Z. Zhao, und M. Zhao, "Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo." *Nat Protoc* **2**, 1479–1489 (2007).
- [80] A. Ehrlicher, T. Betz, B. Stuhmann, D. Koch, V. Milner, M. G. Raizen, und J. Kas, "Guiding neuronal growth with light." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16024–16028 (2002).
- [81] A. von Philipsborn und M. Bastmeyer, "Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration." *Int Rev Cytol* **263**, 1–62 (2007).
- [82] M. Iijima, Y. E. Huang, und P. Devreotes, "Temporal and spatial regulation of chemotaxis." *Dev Cell* **3**, 469–478 (2002).
- [83] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, und A. R. Horwitz, "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**, 1704–1709 (2003).
- [84] S. Merlot und R. A. Firtel, "Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways." *J Cell Sci* **116**, 3471–3478 (2003).
- [85] X. Xu, M. Meier-Schellersheim, J. Yan, und T. Jin, "Locally controlled inhibitory mechanisms are involved in eukaryotic GPCR-mediated chemosensing." *J Cell Biol* **178**, 141–153 (2007).
- [86] Y. Wang, S.-J. Ding, W. Wang, J. M. Jacobs, W.-J. Qian, R. J. Moore, F. Yang, D. G. Camp, R. D. Smith, und R. L. Klemke, "Profiling signaling polarity in chemotactic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8328–8333 (2007).
- [87] D. S. Rhoads und J.-L. Guan, "Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signaling molecules." *Exp Cell Res* **313**, 3859–3867 (2007).
- [88] D. Lehnert, B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B. A. Imhof, und M. Bastmeyer, "Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion." *J Cell Sci* **117**, 41–52 (2004).
- [89] J. Huang, S. V. Grater, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. Ding, und J. P. Spatz, "Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion." *Nano Lett* **9**, 1111–1116 (2009).
- [90] D. E. Ingber, "Tensegrity and mechanotransduction." *J Bodyw Mov Ther* **12**, 198–200 (2008).
- [91] N. Wang, J. P. Butler, und D. E. Ingber, "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton." *Science* **260**, 1124–1127 (1993).

- [92] D. E. Ingber, "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks." *J Cell Sci* **116**, 1397–1408 (2003).
- [93] N. Wang, J. D. Tytell, und D. E. Ingber, "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 75–82 (2009).
- [94] S. Li, N. F. Huang, und S. Hsu, "Mechanotransduction in endothelial cell migration." *J Cell Biochem* **96**, 1110–1126 (2005).
- [95] T. Striebel, "Herstellung und Charakterisierung von Dreidimensionalen Templaten für Zellwachstumsstudien." Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (2007).
- [96] R. J. Pelham und Y. Wang, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13661–13665 (1997).
- [97] A. K. Harris, P. Wild, und D. Stopak, "Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion." *Science* **208**, 177–179 (1980).
- [98] J. Lee, M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, und K. Jacobson, "Traction forces generated by locomoting keratocytes." *J Cell Biol* **127**, 1957–1964 (1994).
- [99] R. J. Pelham und Y. Wang, "High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate." *Mol Biol Cell* **10**, 935–945 (1999).
- [100] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, und B. Geiger, "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nat Cell Biol* **3**, 466–472 (2001).
- [101] B. Sabass, M. L. Gardel, C. M. Waterman, und U. S. Schwarz, "High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances." *Biophys J* **94**, 207–220 (2008).
- [102] J. Stricker, B. Sabass, U. S. Schwarz, und M. L. Gardel, "Optimization of traction force microscopy for micron-sized focal adhesions." *J Phys Condens Matter* **22**, 194104 (2010).
- [103] S. S. Hur, Y. Zhao, Y.-S. Li, E. Botvinick, und S. Chien, "Live cells exert 3-dimensional traction forces on their substrata." *Cell Mol Bioeng* **2**, 425–436 (2009).
- [104] S. A. Maskarinec, C. Franck, D. A. Tirrell, und G. Ravichandran, "Quantifying cellular traction forces in three dimensions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22108–22113 (2009).
- [105] N. Gavara und R. S. Chadwick, "Noncontact microrheology at acoustic frequencies using frequency-modulated atomic force microscopy." *Nat Methods* **7**, 650–654 (2010).

- [106] J. G. Jacot, S. Dianis, J. Schnall, und J. Y. Wong, "A simple microindentation technique for mapping the microscale compliance of soft hydrated materials and tissues." *J Biomed Mater Res A* **79**, 485–494 (2006).
- [107] E. M. Darling, R. E. Wilusz, M. P. Bolognesi, S. Zauscher, und F. Guilak, "Spatial mapping of the biomechanical properties of the pericellular matrix of articular cartilage measured in situ via atomic force microscopy." *Biophys J* **98**, 2848–2856 (2010).
- [108] M. A. Kotlarchyk, E. L. Botvinick, und A. J. Putnam, "Characterization of hydrogel microstructure using laser tweezers particle tracking and confocal reflection imaging." *J Phys Condens Matter* **22**, 194121 (2010).
- [109] M. T. Frey und Y.-L. Wang, "A photo-modulatable material for probing cellular responses to substrate rigidity." *Soft Matter* **5**, 1918–1924 (2009).
- [110] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, und J. P. Vacanti, "Microscale technologies for tissue engineering and biology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2480–2487 (2006).
- [111] S. Takayama, J. C. McDonald, E. Ostuni, M. N. Liang, P. J. Kenis, R. F. Ismagilov, und G. M. Whitesides, "Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5545–5548 (1999).
- [112] Y. Sun, Y. Liu, W. Qu, und X. Jiang, "Combining nanosurface chemistry and microfluidics for molecular analysis and cell biology." *Anal Chim Acta* **650**, 98–105 (2009).
- [113] S. Takayama, E. Ostuni, P. LeDuc, K. Naruse, D. E. Ingber, und G. M. Whitesides, "Subcellular positioning of small molecules." *Nature* **411**, 1016 (2001).
- [114] A. C. von Philipsborn, S. Lang, A. Bernard, J. Loeschinger, C. David, D. Lehnert, M. Bastmeyer, und F. Bonhoeffer, "Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns." *Nat Protoc* **1**, 1322–1328 (2006).
- [115] R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides, und D. E. Ingber, "Engineering cell shape and function." *Science* **264**, 696–698 (1994).
- [116] A. C. von Philipsborn, S. Lang, J. Loeschinger, A. Bernard, C. David, D. Lehnert, F. Bonhoeffer, und M. Bastmeyer, "Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients." *Development* **133**, 2487–2495 (2006).
- [117] H. M. Birch und J. Clayton, "Cell biology: close-up on cell biology." *Nature* **446**, 937–940 (2007).
- [118] K. Salaita, Y. Wang, und C. A. Mirkin, "Applications of dip-pen nanolithography." *Nat Nanotechnol* **2**, 145–155 (2007).

- [119] D. Aydin, M. Schwieder, I. Louban, S. Knoppe, J. Ulmer, T. L. Haas, H. Walczak, und J. P. Spatz, "Micro-nanostructured protein arrays: a tool for geometrically controlled ligand presentation." *Small* **5**, 1014–1018 (2009).
- [120] D. Aydin, I. Louban, N. Perschmann, J. Blümmel, T. Lohmüller, E. A. Cavalcanti-Adam, T. L. Haas, H. Walczak, H. Kessler, R. Fiammengo, und J. P. Spatz, "Polymeric substrates with tunable elasticity and nanoscopically controlled biomolecule presentation." *Langmuir* **26**, 15472–15480 (2010).
- [121] M. C. Lensen, V. A. Schulte, J. Salber, M. Diez, F. Menges, und M. Möller, "Cellular responses to novel, micropatterned biomaterials." *Pure Appl. Chem.* **80**, 2479–2487 (2008).
- [122] K. Subramani und M. A. Birch, "Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogel micropatterns with osteoinductive growth factors and evaluation of the effects on osteoblast activity and function." *Biomed Mater* **1**, 144–154 (2006).
- [123] C. G. Galbraith und M. P. Sheetz, "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9114–9118 (1997).
- [124] D. S. Gray, J. Tien, und C. S. Chen, "Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus." *J Biomed Mater Res A* **66**, 605–614 (2003).
- [125] S. Nemir, H. N. Hayenga, und J. L. West, "PEGDA hydrogels with patterned elasticity: novel tools for the study of cell response to substrate rigidity." *Biotechnol Bioeng* **105**, 636–644 (2010).
- [126] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, und C. S. Chen, "Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1484–1489 (2003).
- [127] A. Saez, A. Buguin, P. Silberzan, und B. Ladoux, "Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces?" *Biophys J* **89**, L52–L54 (2005).
- [128] A. Saez, M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan, und B. Ladoux, "Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8281–8286 (2007).
- [129] N. J. Sniadecki, C. M. Lamb, Y. Liu, C. S. Chen, und D. H. Reich, "Magnetic microposts for mechanical stimulation of biological cells: fabrication, characterization, and analysis." *Rev Sci Instrum* **79**, 044302 (2008).
- [130] V. Brunetti, G. Maiorano, L. Rizzello, B. Sorce, S. Sabella, R. Cingolani, und P. P. Pompa, "Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6264–6269 (2010).

- [131] S. K. Seidlits, C. E. Schmidt, und J. B. Shear, “High-resolution patterning of hydrogels in three dimensions using direct-write photofabrication for cell guidance.” *Adv Funct Mater* **19**, 3543–3551 (2009).
- [132] A. L. Siegel, K. Atchison, K. E. Fisher, G. E. Davis, und D. D. W. Cornelison, “3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility.” *Stem Cells* **27**, 2527–2538 (2009).
- [133] E. Hadjipanayi, V. Mudera, und R. A. Brown, “Guiding cell migration in 3D: a collagen matrix with graded directional stiffness.” *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 121–128 (2009).
- [134] M. C. Cushing und K. S. Anseth, “Materials science. hydrogel cell cultures.” *Science* **316**, 1133–1134 (2007).
- [135] W. Lee, N.-J. Cho, A. Xiong, J. S. Glenn, und C. W. Frank, “Hydrophobic nanoparticles improve permeability of cell-encapsulating poly(ethylene glycol) hydrogels while maintaining patternability.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20709–20714 (2010).
- [136] S. V. Graeter, J. Huang, N. Perschmann, M. López-García, H. Kessler, J. Ding, und J. P. Spatz, “Mimicking cellular environments by nanostructured soft interfaces.” *Nano Lett* **7**, 1413–1418 (2007).
- [137] S. Mitragotri und J. Lahann, “Physical approaches to biomaterial design.” *Nat Mater* **8**, 15–23 (2009).
- [138] Holmlin, Schiavoni, Chen, Smith, Prentiss, und Whitesides, “Light-driven microfabrication: assembly of multicomponent, three-dimensional structures by using optical tweezers.” *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 3503–3506 (2000).
- [139] G. M. Gratson, M. Xu, und J. A. Lewis, “Microperiodic structures: direct writing of three-dimensional webs.” *Nature* **428**, 386 (2004).
- [140] V. Chan, P. Zorlutuna, J. H. Jeong, H. Kong, und R. Bashir, “Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation.” *Lab Chip* **10**, 2062–2070 (2010).
- [141] F. Klein, “Der Einfluss von 2D- und 3D-Substratgeometrien und Flexibilität auf Zellform und Zellverhalten.” Doktorarbeit, Universität Karlsruhe (2009).
- [142] U. S. Schwarz, T. Erdmann, und I. B. Bischofs, “Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model.” *Biosystems* **83**, 225–232 (2006).
- [143] A. Buxboim, K. Rajagopal, A. E. X. Brown, und D. E. Discher, “How deeply cells feel: methods for thin gels.” *J Phys Condens Matter* **22**, 194116 (2010).
- [144] A. Buxboim, I. L. Ivanovska, und D. E. Discher, “Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells ‘feel’ outside and in?” *J Cell Sci* **123**, 297–308 (2010).

- [145] I. B. Bischofs, F. Klein, D. Lehnert, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz, “Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape.” *Biophys J* **95**, 3488–3496 (2008).
- [146] O. M. Rossier, N. Gauthier, N. Biais, W. Vonnegut, M.-A. Fardin, P. Avigan, E. R. Heller, A. Mathur, S. Ghassemi, M. S. Koeckert, J. C. Hone, und M. P. Sheetz, “Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts.” *EMBO J* **29**, 1055–1068 (2010).
- [147] M. Théry, V. Racine, A. Pépin, M. Piel, Y. Chen, J.-B. Sibarita, und M. Bornens, “The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis.” *Nat Cell Biol* **7**, 947–953 (2005).
- [148] M. Théry, A. Jiménez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens, und F. Jülicher, “Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation.” *Nature* **447**, 493–496 (2007).
- [149] S. Pagliari, A. C. Vilela-Silva, G. Forte, F. Pagliari, C. Mandoli, G. Vozzi, S. Pietronave, M. Prat, S. Licoccia, A. Ahluwalia, E. Traversa, M. Minieri, und P. D. Nardo, “Cooperation of biological and mechanical signals in cardiac progenitor cell differentiation.” *Adv Mater* **23**, 514–518 (2011).
- [150] R. Damianova, N. Stefanova, E. Cukierman, A. Momchilova, und R. Pankov, “Three-dimensional matrix induces sustained activation of ERK1/2 via Src/Ras/Raf signaling pathway.” *Cell Biol Int* **32**, 229–234 (2008).
- [151] S. Raghavan, C. J. Shen, R. A. Desai, N. J. Sniadecki, C. M. Nelson, und C. S. Chen, “Decoupling diffusional from dimensional control of signaling in 3D culture reveals a role for myosin in tubulogenesis.” *J Cell Sci* **123**, 2877–2883 (2010).
- [152] M. Thiel, J. Fischer, G. von Freymann, und M. Wegener, “Direct laser writing of three-dimensional submicron structures using a continuous-wave laser at 532 nm.” *Appl Phys Lett* **97**, 221102 (2010).
- [153] M. Göppert-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen,” *Ann Phys* **9**, 273 (1931).
- [154] F. Klein, T. Striebel, A. Greiner, Z. Jiang, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und M. Bastmeyer, “Analysis of 3D cell morphology depending on tissue origin.” In Vorbereitung.
- [155] J. Fischer, G. von Freymann, und M. Wegener, “The materials challenge in diffraction-unlimited direct-laser-writing optical lithography.” *Adv Mater* **22**, 3578–3582 (2010).
- [156] M. Deubel, “Dreidimensionale Photonische Kristalle mittels Direkten Laserschreibens: Herstellung und Charakterisierung.” Doktorarbeit, Universität Karlsruhe (2006).

- [157] J. Fischer, "Herstellung und Charakterisierung von Elastischen Dreidimensionalen Mikrostrukturen für Biologische Zellexperimente." Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (2008).
- [158] J. Serbin, A. Egbert, A. Ostendorf, B. N. Chichkov, R. Houbertz, G. Domann, J. Schulz, C. Cronauer, L. Fröhlich, und M. Popall, "Femtosecond laser-induced two-photon polymerization of inorganic-organic hybrid materials for applications in photonics." *Opt Lett* **28**, 301–303 (2003).
- [159] A. Doraiswamy, C. Jin, R. J. Narayan, P. Mageswaran, P. Mente, R. Modi, R. Auyeung, D. B. Chrisey, A. Ovsianikov, und B. Chichkov, "Two photon induced polymerization of organic-inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices." *Acta Biomater* **2**, 267–275 (2006).
- [160] S. Schlie, A. Ngezahayo, A. Ovsianikov, T. Fabian, H.-A. Kolb, H. Haferkamp, und B. N. Chichkov, "Three-dimensional cell growth on structures fabricated from ORMOCER by two-photon polymerization technique." *J Biomater Appl* **22**, 275–287 (2007).
- [161] K. Schafer, J. Hales, M. Balu, K. Belfield, E. van Stryland, und D. Hagan, "Two-photon absorption cross-sections of common photoinitiators." *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry* **162**, 497–502 (2004).
- [162] S. Maruo, O. Nakamura, und S. Kawata, "Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization." *Opt Lett* **22**, 132–134 (1997).
- [163] S. Obi, "Replicated optical microstructures in hybrid polymers: process technology and application." Doktorarbeit, University of Neuchâtel (2006).
- [164] B. Richter, "Selektive Funktionalisierung Dreidimensionaler Mikrostrukturen für Kontrolliertes Zellwachstum." Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (2010).
- [165] A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbner, K. Sternberg, K.-P. Schmitz, und A. Haverich, "Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications." *Acta Biomater* **7**, 967–974 (2011).
- [166] P. Eaton und P. West, *Atomic Force Microscopy* (Oxford, 2010).
- [167] *JPK Nano Wizard II, User Manual (4/2009)*.
- [168] "Microscopy from Carl Zeiss, LSM 510 and LSM 510 META, Laser Scanning Microscopes," .
- [169] Z. Wu, H. Chen, X. Liu, Y. Zhang, D. Li, und H. Huang, "Protein adsorption on poly(N-vinylpyrrolidone)-modified silicon surfaces prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization." *Langmuir* **25**, 2900–2906 (2009).

- [170] A. M. Telford, M. James, L. Meagher, und C. Neto, "Thermally cross-linked PNVP films as antifouling coatings for biomedical applications." *ACS Appl Mater Interfaces* **2**, 2399–2408 (2010).
- [171] A. D. Doyle, F. W. Wang, K. Matsumoto, und K. M. Yamada, "One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration." *J Cell Biol* **184**, 481–490 (2009).
- [172] C. Weis, E. K. Odermatt, J. Kressler, Z. Funke, T. Wehner, und D. Freytag, "Poly(vinyl alcohol) membranes for adhesion prevention." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **70**, 191–202 (2004).
- [173] R. Stoian, A. Rosenfeld, D. Ashkenasi, I. V. Hertel, N. M. Bulgakova, und E. E. B. Campbell, "Surface charging and impulsive ion ejection during ultrashort pulsed laser ablation." *Phys Rev Lett* **88**, 097603 (2002).
- [174] H.-Y. Chen, Y. Elkasabi, und J. Lahann, "Surface modification of confined microgeometries via vapor-deposited polymer coatings." *J Am Chem Soc* **128**, 374–380 (2006).
- [175] M. S. Hahn, L. J. Taite, J. J. Moon, M. C. Rowland, K. A. Ruffino, und J. L. West, "Photolithographic patterning of polyethylene glycol hydrogels." *Biomaterials* **27**, 2519–2524 (2006).
- [176] M. S. Hahn, J. S. Miller, und J. L. West, "Laser scanning lithography for surface micropatterning on hydrogels," *Adv Mater* **17**, 2939–2942 (2005).
- [177] P. J. Mack, M. R. Kaazempur-Mofrad, H. Karcher, R. T. Lee, und R. D. Kamm, "Force-induced focal adhesion translocation: effects of force amplitude and frequency." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C954–C962 (2004).
- [178] W. W. Ahmed, T. Wolfram, A. M. Goldyn, K. Bruellhoff, B. A. Rioja, M. Möller, J. P. Spatz, T. A. Saif, J. Groll, und R. Kemkemer, "Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain." *Biomaterials* **31**, 250–258 (2010).
- [179] U. Raaz, H. Kuhn, H. Wirtz, und S. Hammerschmidt, "Rapamycin reduces high-amplitude, mechanical stretch-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells." *Microvasc Res* **77**, 297–303 (2009).
- [180] N. J. Sniadecki, A. Anguelouch, M. T. Yang, C. M. Lamb, Z. Liu, S. B. Kirschner, Y. Liu, D. H. Reich, und C. S. Chen, "Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14553–14558 (2007).
- [181] D. Danilov, T. Striebel, F. Klein, T. Böhlke, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz, "Measuring and modeling mechanotransduction in cell adhesion." Unveröffentlicht.

- [182] J. Gelorme, N. LaBianca, W. Conley, S. Holmes, and J. Shaw, “Negative photoresists for optical lithography,” *IBM J Res Develop* **41**, 81–94 (1997).
- [183] M. Schuster, C. Turecek, A. Mateos, J. Stampfl, R. Liska, and F. Varga, “Evaluation of biocompatible photopolymers II: further reactive diluents,” *Monatsheft für Chemie* **138**, 261–268 (2007).
- [184] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud, and P. Vettiger, “SU-8: a low-cost negative resist for MEMS,” *J Microchem Microeng* **7**, 121–124 (1997).
- [185] A. Kajzar, C. M. Cesa, N. Kirchgessner, B. Hoffmann, and R. Merkel, “Toward physiological conditions for cell analyses: forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars.” *Biophys J* **94**, 1854–1866 (2008).
- [186] Gross, Hauger, Schröder, und Wall, *Technische Mechanik 2 (Elastostatik)* (Springer, 2007).
- [187] S. Maruo, T. Hasegawa, and N. Yoshimura, “Single-anchor support and supercritical CO<sub>2</sub> drying enable high-precision microfabrication of three-dimensional structures.” *Opt Express* **17**, 20945–20951 (2009).
- [188] V. Damljanovic, B. C. Lagerholm, and K. Jacobson, “Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays.” *Biotechniques* **39**, 847–851 (2005).
- [189] R. Merkel, N. Kirchgessner, C. M. Cesa, and B. Hoffmann, “Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness.” *Biophys J* **93**, 3314–3323 (2007).
- [190] J. Y. Wong, A. Velasco, P. Rajagopalan, and Q. Pham, “Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels,” *Langmuir* **19**, 1908–1913 (2003).



# Veröffentlichungen

## Wissenschaftliche Zeitschriften

- F. Klein, T. Striebel, J. Fischer, Z. Jiang, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und Martin Bastmeyer, “Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements,” *Adv Mater* **22**, 868–871 (2010).
- F. Klein, B. Richter, T. Striebel, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und Martin Bastmeyer, “Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture,” *Adv Mater* (Online veröffentlicht DOI: 10.1002/adma.201004060).
- F. Klein, T. Striebel, A. Greiner, Z. Jiang, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, and M. Bastmeyer, “Analysis of 3D cell morphology depending on tissue origin,” (in Bearbeitung).

## Vorträge und Poster (nur eigene Beiträge)

- T. Striebel, F. Klein, M. Wegener, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz “Artificial three-dimensional scaffolds for cell adhesion studies,” in “DPG Frühjahrstagung (Dresden, Deutschland),” Vortrag (2009).
- T. Striebel, F. Klein, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz, “Design, fabrication and characterization of artificial three-dimensional scaffolds for cell studies,” in “CFN Sommerschule (Bad Herrenalb, Deutschland),” Poster [Posterpreis 3. Platz] (2009).
- T. Striebel, F. Klein, J. Fischer, Z. Jiang, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz, “3D Scaffolds for cell experiments made by direct laser writing (DLW),” in “De Gennes Days Konferenz (Totes Meer, Israel),” Poster (2010).
- T. Striebel, F. Klein, D. Danilov, T. Böhlke, M. Wegener, M. Bastmeyer, und U. S. Schwarz, “Flexible three-dimensional scaffolds for cell adhesion studies,” in “DPG Frühjahrstagung (Dresden, Deutschland),” Poster (2011).



# Danksagungen

An dieser Stelle ist es Zeit danke zu sagen. Zuerst einmal möchte ich mich bei den Professoren Martin Wegener, Martin Bastmeyer und Ulrich Schwarz bedanken. Die Möglichkeit verschiedene Blickwinkel auf ein sehr interessantes Themengebiet zu bekommen hat mir persönlich sehr gut gefallen. Die Herstellung und Optimierung der Polymerstrukturen wurde vor allem in den sehr gut eingerichteten Laboren von Prof. Wegener gemacht, in denen ich freundlicherweise arbeiten durfte. Die experimentelle Arbeit in den Laboren von Prof. Bastmeyer mit den Zellen und einer großen Auswahl an Mikroskopen, sowie ein Grundverständnis für andere Themengebiete der Biologie, wurden mit dem Einblick in theoretische Konzepte der Zellbiologie in der Gruppe von Prof. Schwarz erweitert.

Ein weiteres Dankeschön gilt den Personen, mit denen ich während der Promotionszeit zusammenarbeiten durfte. Vor allem möchte ich hier Dr. Franziska Klein, Dr. Zhongxiang Jiang, Dr. Alexandra Greiner und Tatjana Autenrieth von der biologischen Seite hervorheben, die die Zellen liebevoll gepflegt sowie den Großteil der Zellexperimente und Aufnahmen an den verschiedenen Mikroskopen durchgeführt haben.

In der Angewandten Physik bedanke ich mich vor allem bei unserer kleinen Biogruppe bestehend aus Joachim Fischer, Benjamin Richter und Andrea Scheiwe. Meine Arbeit wurde durch die viele Diskussionen und die gute Zusammenarbeit entscheidend nach vorne gebracht und geprägt. Außerdem sage ich danke zu Justyna Gansel, Isabelle Staude und Joachim Fischer für die Korrekturen an dieser Arbeit.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Schwarz möchte ich mich bei Dr. Denis Danilov, der sich bei der Modellierung der Kräfte in den 3D Zellkraftexperimenten hervorgetan hat, bedanken. Außerdem waren die Fahrten in seinem Privatauto von Karlsruhe zu den Gruppensitzungen in Heidelberg immer sehr lehrreich im Bezug auf die russische Lebensart. Jerome Soiné, dem letzten Karlsruher in Heidelberg, danke ich für die lustigen Rückfahrten in den meist überfüllten Zügen.

Ein großer Dank gilt Dr. Clemens Franz und seiner Gruppe für die unkomplizierte Zusammenarbeit, wenn es um Experimente mit AFM-Beteiligung ging. Die Daten wurden oft spät in der Nacht aufgenommen und kurzfristig zur Verfügung gestellt.

Für die freundliche Atmosphäre und den kollegialen Umgang möchte ich den aktuellen und früheren Mitgliedern aller Arbeitsgruppen danken. Auch die Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeiten waren immer sehr unterhaltsam und haben mir sehr viel Spass gemacht.

Den reibungslosen Ablauf aller administrativen Angelegenheiten verdanke ich der tollen Arbeit aller Sekretariate. Ich möchte mich für den freundlichen Umgang und die hilfreichen Tipps in allen Lebenslagen bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, meiner Schwester, Verwandten und Freunden bedanken, die mich in allen Entscheidungen immer bestärkt und unterstützt haben.