
Reaktionen von Zellen in dreidimensionalen Mikrostrukturen auf lokale mechanische Stimuli

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. Andrea Caroline Scheiwe
aus Aachen

Tag der mündlichen Prüfung:	30.01.2015
Referent:	Prof. Dr. Martin Wegener
Korreferent:	Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
2 Grundlagen	15
2.1 Zellen und Kräfte	15
2.1.1 Aufbau von eukaryotischen Zellen	15
2.1.2 Die extrazelluläre Matrix	17
2.1.3 Zell-Matrix-Kontakte	19
2.1.4 Zell-Zell-Kontakte	21
2.1.5 Das Aktin-Zytoskelett	22
2.1.6 Sarkomere zur Krafterzeugung bei Muskelzellen	23
2.2 Zellkultivierung in drei Dimensionen	25
2.2.1 Einflussfaktoren auf das Zellverhalten	25
2.2.2 Beispielsysteme für 3D-Zellkultivierung	27
2.3 Methoden zur Kraftausübung auf Zellen	29
2.3.1 Passive Methoden zur Kraftausübung und Kraftmessung	29
2.3.2 Aktive Methoden zur Kraftausübung	30
3 Methoden	33
3.1 Dreidimensionale Mikrostrukturen durch direktes Laserschreiben	33
3.1.1 Nanoscribe Photonic Professional	35
3.2 Fotolacke	36
3.2.1 Ormocomp	38
3.2.2 Passivierender Fotolack auf Basis von PEG-DA	39
3.3 Vorbereitung der Substrate	40
3.4 Kombination von zwei Fotolacken zur Steuerung des Zellwachstums	43
3.4.1 Herstellungsprozess für Mikrostrukturen aus zwei Lacken	43
3.4.2 Beispiele für Strukturen aus zwei Fotolacken	45
3.5 Direktes Laserschreiben auf mikroporösen Membranen	47
3.6 Zellkultivierung	49
3.6.1 Gewinnung embryonaler Hühnerfibroblasten	49
3.6.2 Gewinnung embryonaler Hühnerkardiomyozyten	50
3.6.3 Auszählen von Zellen	52
3.6.4 Aussäen von Zellen auf 3D-Mikrostrukturen	52

3.7	Immunhistochemie	53
3.8	Bildgebende Verfahren	55
3.9	Videoauswertung der Mikromanipulation von Herzmuskelzellen	56
3.9.1	Ermittlung des Fourierspektrums kontrahierender Herzmuskelzellen	56
3.9.2	Bestimmung der Schlagrate von Herzmuskelzellen	58
4	Mikromanipulation von Zellen in 3D-Mikrostrukturen	61
4.1	Mikromanipulator zur mechanischen Verformung von 3D-Mikrostrukturen .	61
4.2	Design von Strukturen zur Mikromanipulation	63
5	Embryonale Hühnerkardiomyozyten unter dem Einfluss mechanischer Kräfte	67
5.1	Mikrostrukturen zur Mikromanipulation von Herzmuskelzellen	67
5.2	Zeitliches Verhalten von Hühnerkardiomyozyten in 3D-Mikrostrukturen . .	69
5.3	Mikromanipulation mit gleichbleibender Frequenz	71
5.4	Mikromanipulation mit variierender Frequenz	73
5.5	Mikromanipulation mit gepulster Anregung	74
5.6	Kommunikation mechanisch gekoppelter Herzmuskelzellen	75
5.7	Diskussion	80
6	Embryonale Hühnerfibroblasten unter dem Einfluss mechanischer Kräfte	83
6.1	Mikrostrukturen zur Mikromanipulation von Fibroblasten	84
6.2	Mikromanipulation embryonaler Hühnerfibroblasten in 3D-Mikrostrukturen	87
6.3	Einfluss von Manipulationsmodus und -dauer	92
6.4	Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten	94
6.5	Zug-induzierte Größenveränderung der Zell-Matrix-Kontakte	97
6.6	Diskussion	99
7	Zusammenfassung und Ausblick	103
A	Chemikalien und Zellkulturmedien	107
A.1	Zellkulturmedien	107
A.2	Chemikalien	108
B	Messdaten Kardiomyozyten	109
C	Messdaten Fibroblasten	111
	Literaturverzeichnis	124

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

A. M. Greiner¹, M. Jäckel¹, A. C. Scheiwe¹, D. R. Stamow, T. J. Autenrieth, J. Lahann, C. M. Franz und M. Bastmeyer, *Multifunctional polymer scaffolds with adjustable pore size and chemoattractant gradients for studying cell matrix invasion*, *Biomaterials* **35**, 611 (2014).

A. C. Scheiwe¹, S. C. Frank¹, T. J. Autenrieth, M. Bastmeyer und M. Wegener, *Subcellular stretch-induced cytoskeletal response of single fibroblasts within 3D designer scaffolds*, *Biomaterials* **44**, 186 (2015).

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Wissenschaftskonferenzen veröffentlicht (nur eigene Präsentationen):

A. C. Scheiwe, B. Richter, M. Bastmeyer und M. Wegener, *Dynamical properties of cardiomyocytes in three-dimensional polymer scaffolds*, *Nano-Optics for Enhancing Light-Matter Interactions on a Molecular Scale*, Springer Netherlands, 447 (2013).

¹diese Autoren trugen in gleichem Umfang zu dieser Veröffentlichung bei

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	<i>atomic force microscope</i> , Rasterkraftmikroskop
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CEF	<i>chicken embryonic fibroblast</i> , embryonaler Hühnerfibroblast
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	<i>differential interference contrast</i> , Differentialinterferenzkontrast
DLW	<i>direct laser writing</i> , direktes Laserschreiben
EZM	extrazelluläre Matrix
F-Aktin	Aktinfilament
F12/Kardio	für die Kultivierung von Kardiomyozyten verwendetes Medium
F12/Serum	für die Kultivierung von CEFs verwendetes Medium
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> , Fokaladhäsionskinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
G-Aktin	globuläres Aktin, Aktin-Monomer
Hanks	HBSS aus eigener Herstellung
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , standardisierte, gepufferte Salzlösung
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop (auch Laserrastermikroskop)
NA	numerische Apertur
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	PEG-DA-Lack, Fotolack aus PEG-DA 757, PETTA und Irgacure 369
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEG-DA	Polyethylenglycol Diacrylat
PETTA	Pentaerythritol Tetraacrylat
pFAK	an Tyrosin 397 phosphoriliertes FAK
pPaxillin	an Tyrosin 118 phosphoriliertes Paxillin
REM	Rasterelektronenmikroskop
Voxel	Volumenelement

1 Einleitung

Der heutige Kenntnisstand über zellbiologische Zusammenhänge wurde größtenteils erlangt, indem man die Wechselwirkung bestimmter Proteine untersuchte oder gezielt die zellinterne Signalkette störte und den Einfluss dieser Störung auf das Zellverhalten untersuchte. Experimente solcher Art wurden größtenteils mit Zellen in Petrischalen bzw. Zellkulturflaschen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Zellen in dichten Teppichen auf flachen Oberflächen kultiviert wurden. In diesen Umgebungen sind sie flach wie Pfannkuchen auf dem Boden ausgebreitet und berühren sich an ihrer Peripherie gegenseitig. Ohne Zweifel bieten Experimente dieser Art einen tiefen Einblick in die zellinterne Maschinerie und sind auch zukünftig ein wichtiges Forschungsfeld, da immer noch viele Wechselwirkungen nur unzureichend verstanden sind.

Schaut man sich allerdings Gewebe *in vivo* an, so findet man im Allgemeinen eine andere Situation vor: In vielen Geweben sind Zellen in einem dichten Netzwerk aus Proteinen eingebettet. Dieses Netzwerk ist erstens häufig entlang aller drei Raumrichtungen ausgedehnt und nicht flach. Zweitens ist dieses Netzwerk sowohl von einer Flüssigkeit durchdrungen, die eine Vielzahl an gelösten Substanzen enthält, als auch mit ungelösten Signalstoffen angereichert. Diese fest eingebundenen Signalstoffe kommen oft nicht in homogener sondern sehr inhomogener Verteilung vor. Drittens verfügt dieses Netzwerk nicht überall über die gleichen mechanischen Eigenschaften: Knochengewebe ist beispielsweise wesentlich steifer als Fettgewebe. Hinzu kommt, dass nicht alle diese Eigenschaften zeitlich konstant sind, sondern sich als Reaktion auf verschiedene Reize verändern: Blutgefäße werden größer, wenn viel Blut hindurch fließt, wie es z. B. passiert, wenn jemand anfängt sich regelmäßig sportlich zu betätigen. Auch Knochen nehmen bei zunehmender Belastung an Dicke zu, um dieser stand zu halten.

Aus diesen Gründen wurden Anstrengungen unternommen um Zellen oder Zellbestandteile in anderen Umgebungen als auf flachen und harten Substraten zu untersuchen: Diese Entwicklung begann mit Harrison, der im Jahr 1914 Spinnenfäden verwendete, um auf ihnen Zellen zu kultivieren [1]. In der jüngeren Vergangenheit wurden weitere Methoden für diesen Zugang entwickelt. Dazu zählen die Verwendung von Hydrogelen sowie von Substraten, die mittels Druck- oder Lithographiemethoden hergestellt werden. Aber auch tierische Gewebe, die von Zellen befreit wurden, können als Substrat zur Zellkultivierung dienen. Anhand von Experimenten in solchen Gerüsten konnte nachgewiesen werden, dass es für Zellen durchaus relevant ist, in welcher Art von mechanischer Umgebung sie wachsen. Dies zeigt sich am deutlichsten an der Morphologie der Zellen [2], aber auch an der molekularen Zusammensetzung der Zellkontakte zu ihrer Umgebung [3]. Auch bei der

1 Einleitung

Differenzierung von Stammzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Steifigkeit des Untergrundes steuert, ob sie sich in Richtung Fett-, Nerven- oder Knochenzellen entwickeln [4].

Mechanische Kräfte werden von Zellen über eine Vielzahl von Mechanismen wahrgenommen, beispielsweise über integrin-vermittelte Zell-Matrix-Kontakte. Mit diesen Kontakten erfühlen Zellen ihre Umgebung und passen sich ihr entsprechend an. So kann beispielsweise beobachtet werden, dass Zellen auf Oberflächen, deren Steifigkeit ortsabhängig ist, zur größeren Steifigkeit wandern [5]. Um die Mechanismen dieser Wahrnehmung zu untersuchen, wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, um auf Zellen oder Zellbestandteile Kräfte auszuüben. Viele dieser Methoden betreffen ganze Zellensembles oder wirken gleichmäßig auf die ganze Zelle. Andere Methoden untersuchen kleine Zellregionen oder sogar einzelne Proteine. Eine Gemeinsamkeit dieser Methoden ist allerdings, dass sich die Zellen bei den Experimenten in einer geometrisch nicht näher bestimmten Form befinden. Dies erschwert den Vergleich verschiedener Experimente untereinander.

Es wäre daher wünschenswert, Zellen in definierter dreidimensionaler Geometrie zu kultivieren und anschließend lokal an diesen Zellen Kräfte zu applizieren. Das direkte Laserschreiben unter der Verwendung von zwei Photolacken ermöglicht die genaue Steuerung von Zelladhäsionspunkten in drei Dimensionen [6]. Auf diese Weise hat man die Möglichkeit, die äußere Form von Zellen sehr gezielt zu steuern. Außerdem sind die dreidimensionalen Mikrostrukturen, die man mit direktem Laserschreiben herstellt, zu einem gewissen Grad elastisch [7]. Diese Eigenschaft lässt sich nutzen, um die Strukturen und somit auch die in ihnen kultivierten Zellen mechanisch zu verformen.

Das Ziel dieser Arbeit ist somit die Entwicklung eines Versuchsaufbaus zur gezielten Manipulation von Mikrostrukturen, die Zellen tragen. Mit Hilfe eines solchen Aufbaus soll dann untersucht werden, wie sich einzelne Zellen in einer definierten dreidimensionalen Umgebung unter Einfluss einer wohldefinierten Kraft verhalten. Hierzu wurden einerseits Herzmuskelzellen andererseits Fibroblasten ausgewählt. An den Herzmuskelzellen soll untersucht werden, in wieweit sich ihr Kontraktionsverhalten durch mechanische Stimuli beeinflussen lässt. Fibroblasten sind Bindegewebszellen, die maßgeblich am Auf- und Umbau von Geweben beteiligt sind. Aufgrund von Experimenten an Fibroblasten auf flachen Substraten wird vermutet, dass sie sich in Reaktion auf mechanische Reize umstrukturieren um diesen Reizen entweder zu entgehen oder ihnen durch erhöhte zellinterne Zugkraft entgegen zu wirken.

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt gegliedert:

In Kapitel 2 wird der Leser in zellbiologische Grundlagen eingeführt, die zum Verständnis der Arbeit benötigt werden. Anschließend wird ein Überblick über Experimente gegeben, die sich in der Literatur zu den Themen der Zellkultur in fortschrittlichen Zellkulturumgebungen und zur mechanischen Stimulation von Zellen finden.

Kapitel 3 soll dazu dienen die Methoden vorzustellen, die zur Durchführung der Experimente verwendet wurden. Es beinhaltet sowohl das direkte Laserschreiben als auch Methoden der Zellbiologie sowie Teile der Auswertung. Dieses Kapitel sollte eher als Möglichkeit verstanden werden, gezielt Prozeduren nachzuschlagen, dabei aber für den fachkundigen Leser verzichtbar sein.

In Kapitel 4 wird der Mikromanipulator beschrieben, der für die Experimente aufgebaut wurde, und es werden einige allgemeine Betrachtungen über das Design der dreidimensionalen Mikrostrukturen angestellt.

Kapitel 5 stellt Experimente vor, die mit Hilfe des Mikromanipulator an Herzmuskelzellen durchgeführt wurden. Dazu zählen die Untersuchung des zeitlichen Verhaltens der Zellen in den Strukturen und die Reaktionen auf mechanische Reize mit konstanter Frequenz, ansteigender Frequenz und mit kurzen Pulsen. Daneben findet sich ein Abschnitt zur Untersuchung des gegenseitigen mechanischen Einflusses mehrerer Herzzellen aufeinander.

In Kapitel 6 werden Experimente an Fibroblasten behandelt. Hier wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume sinusförmig und auch statisch gestreckt und es wurde verfolgt, wie diese Stimulation Umstrukturierungen des Zytoskeletts und der Fokalkontakte bewirkt. Die strukturellen Veränderungen werden hier nicht nur qualitativ nachgewiesen, sondern auch quantitativ analysiert.

Die Arbeit wird in Kapitel 7 zusammengefasst und es folgt ein kurzer Ausblick, der insbesondere die zukünftigen Anwendungsmöglichkeiten der Methode darstellt.

2 Grundlagen

Da sich diese Arbeit damit befasst, in der Physik entwickelte Methoden auf die Messung von zellbiologischen Vorgängen zu übertragen, werden in diesem Kapitel die Grundlagen gelegt, die benötigt werden um diese zellbiologischen Zusammenhänge zu verstehen. Um abschätzen zu können, inwieweit die hier entwickelte Methodik sich von bereits existierenden Methoden zur Untersuchung ähnlicher Vorgänge abgrenzt, werden im zweiten Teil dieses Kapitels einige der bereits vorhandenen Methoden zur Zellkultivierung in dreidimensionalen (3D) Umgebungen und zur Kraftausübung auf Zellen beschrieben.

2.1 Zellen und Kräfte

Hier soll ein kurzer Überblick über die Zellbiologie gegeben werden, der natürlich nicht vollständig sein kann. Allerdings soll das nötige Verständnis für die Vorgänge in Zellen vermittelt werden, die unmittelbar mit den in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen zusammenhängen.

Der größte Teil dieses Kapitels befasst sich damit, wie Zellen in der Lage sind auf sie ausgeübte Kräfte zu registrieren. Hierbei werden die extrazelluläre Matrix (alles, was die Zelle unmittelbar umgibt) und ihre Eigenschaften beschrieben. Danach werden Zell-Matrix-Kontakte beschrieben und wie sie Signale von außen ins Innere der Zelle weiterleiten. Ein weiterer Punkt sind Zell-Zell-Kontakte, insbesondere sogenannte Gap Junctions, da diese bei der Reizübertragung im Herzmuskel eine große Rolle spielen. Da Zellen nicht nur Signale von außen empfangen und verarbeiten können, sondern auch in der Lage sind, mechanische Kräfte auf ihre Umgebung auszuüben (was bei Muskelzellen besonders offensichtlich ist, aber auch bei anderen Zelltypen eine wichtige Rolle spielt), werden am Ende noch die Mechanismen beschrieben, die Zellen eine solche Kraftauswirkung ermöglichen.

2.1.1 Aufbau von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen verfügen im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen über einen Zellkern, in dem die DNA (die Erbinformation) gespeichert wird. Dieser ist mit einer

2 Grundlagen

Doppelmembran umgeben. Alle Pflanzen, Tiere und Pilze sind Eukaryoten, Bakterien und Archaeen¹ bilden gemeinsam die Gruppe der Prokaryoten.

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch ihre große Komplexität aus (siehe Abbildung 2.1). Diese äußert sich unter anderem darin, dass sie über eine Vielzahl sehr verschiedenartiger Organellen verfügen, die unterschiedlichste Aufgaben wahrnehmen. Viele Organellen sind Kompartimente innerhalb der Zelle, die durch eine Lipid-Doppelschicht (Membran) von dem Cytosol, also der Flüssigkeit, mit der die Zelle gefüllt ist, abgetrennt sind.

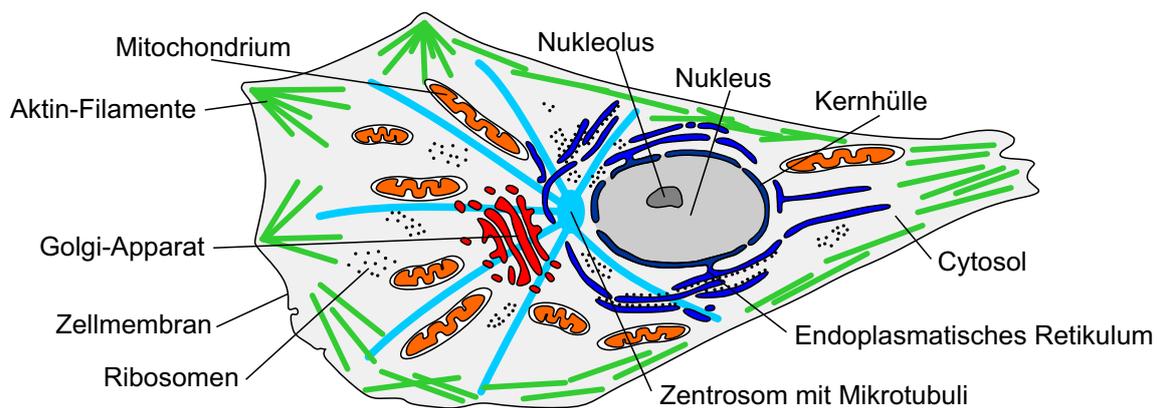


Abbildung 2.1: Skizze einer eukaryotischen Zelle (nach [8]): Dargestellt ist eine typische Tierzelle mit vielen der in ihr vorhandenen Organellen.

Vom bereits genannten Zellkern abgesehen, ist das endoplasmatische Retikulum (ER) ein Beispiel für eine von einer Membran umgebene Organelle. Es nimmt bei vielen Zellen etwa die Hälfte des Volumens ein. Es dient als Fabrik für fast alle Lipide der Zelle und übernimmt auch einen Teil der Proteinbiosynthese. Insbesondere findet hier die Proteinfaltung statt.

Eng mit dem ER verknüpft ist der Golgi-Apparat. Er modifiziert viele Proteine, die er vom ER erhält und verteilt sie anschließend auf die gesamte Zelle. Die Lage des Golgi-Apparats gibt daher auch Aufschluss über die sogenannte Polarisation der Zelle, also z.B. die Richtung der Zellmigration. Da er das Transportzentrum ist, befindet er sich vom Zellkern aus gesehen immer auf der Seite, in die die Zelle polarisiert ist, da hier neue Proteine gebraucht werden [9].

Andere wichtige Organellen sind die Mitochondrien. Sie stellen durch Phosphorylierung von ADP das für fast alle Prozesse im Zellinneren benötigte ATP her². Dies ist auch der Grund, warum sie oft dort gefunden werden, wo die Zelle einen hohen Energiebedarf hat. Dies ist insbesondere bei Muskelzellen sehr auffällig. Eine Besonderheit der Mitochondrien

¹Archaeen sind einzellige Organismen ohne Zellkern mit oft ringförmiger DNA. Sie werden häufig in extremen Lebensräumen wie Vulkanen, Salzseen, aber auch im Darm von Tieren gefunden.

²Adenosintriphosphat (ATP) ist der innerhalb von Zellen verwendete Energieträger. Um Energie freizusetzen wird ATP in Adenosindiphosphat (ADP) umgewandelt

ist, dass sie ebenso wie der Zellkern durch eine doppelte Membran vom Rest der Zelle abgetrennt sind und dass sie über eigene DNA verfügen. Diese beiden Umstände lassen auch darauf schließen, dass Eukaryoten entwicklungsgeschichtlich durch Endozytose³ und anschließende Symbiose mit anderen einzelligen Organismen entstanden sind [8].

Eine weitere Gruppe von Organellen sind diejenigen, die nicht von einer Membran umgeben sind. Hier sind insbesondere die Makromoleküle des Zytoskeletts zu nennen: Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Auf die Aktinfilamente wird im Zuge der Kraftübertragung in Zellen noch genauer eingegangen (Kapitel 2.1.3). Darüber hinaus sollen noch die Ribosomen genannt werden, die die Proteinsynthese durchführen. Auch die Fokalkontakte, die die Signalübertragung vom äußeren der Zelle auf das Aktin-Zytoskelett übernehmen, kann man als Organellen bezeichnen.

2.1.2 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist all das, was eine Zelle *in vivo* umgibt und wird dort von Zellen aufgebaut und ständig verändert. Diese Umgebung ist in Abhängigkeit vom Gewebe, zu dem die Zelle gehört, sehr verschieden. So sind z. B. in Bindegeweben wie Knochen, Knorpel und der Lederhaut von Auge und Haut die Zellen sehr dünn verteilt und haben daher kaum Kontakt zu anderen Zellen. Stattdessen sind sie vereinzelt eingebettet in die Matrix, die zu großen Teilen aus faserbildenden Kollagenen besteht, aber auch eine Vielzahl an in Wasser gelösten Wachstumsfaktoren und Nährstoffen sowie Adhäsionsproteine enthält. In Epithelien wie z. B. der Auskleidung des Darms oder der Abdeckung der Haut hingegen bilden Epithelzellen eine dichte Lage, die nur für die Moleküle durchlässig ist, die von den Zellen gezielt durchgelassen werden. Daher liegen die Epithelzellen dicht und haben enge Kontakte zu ihren Nachbarzellen. Ein weiterer Unterschied, der sich an diesen beiden Beispielen aufzeigen lässt, ist die Dimensionalität der Matrix. Während Bindegewebszellen in eine 3D-Matrix eingebettet sind, befinden sich Epithelzellen auf einer flachen 2D-Matrix.

Diese sehr verschiedenen Umgebungen beeinflussen in vielfältiger Weise Überleben, Entwicklung, Verhalten sowie Form und Polarität der Zellen. *In vivo* besteht die EZM aus einer Vielzahl von Proteinfasern verwoben mit einem Gel aus Glykosaminoglycan-Ketten. Fasrige Proteine wie Kollagen und Elastin bestimmen die mechanischen Eigenschaften der EZM (Steifigkeit, Elastizität usw.). Außerdem bilden sie Strukturen, an denen die Zellen haften können. Als Vermittler zwischen den Fasern der EZM und den Zellen dienen hierbei Glykoproteine wie z. B. Fibronectin und Laminin. In Geweben, die eher dreidimensionale Eigenschaften aufweisen, ist Fibronectin das wichtigste dieser Proteine. Es wurde daher bei den Experimenten in dieser Arbeit zur Beschichtung der Mikrostrukturen verwendet und wird im Folgenden ausführlicher beschrieben.

³Endozytose wird der Vorgang genannt, bei dem eine Zelle durch Einstülpung ihrer Membran Teile des sie umgebenden Mediums, z. B. Flüssigkeitstropfen mit darin gelösten Nährstoffen oder auch ganze Zellen, in sich aufnimmt.

Fibronektin

Fibronektin (FN) ist ein großes Glycoprotein und zirkuliert in hohen Konzentrationen im Blut. Dort ist es ein Dimer, das in dieser Form keine funktionelle Wirkung hat. Fibronektin in seiner dimeren Form ist aufgebaut aus zwei Ketten, die aus drei verschiedenen wiederkehrenden Einheiten bestehen, den Fibronektin-Wiederholungseinheiten Typ I–III (Abbildung 2.2). Diese Ketten sind an ihrem C-Terminus mit zwei Disulfidbindungen verbunden. Die Ketten sind untereinander sehr ähnlich aber nicht gleich. So gibt es einige variable Domänen, die in der Abbildung in grau dargestellt sind.

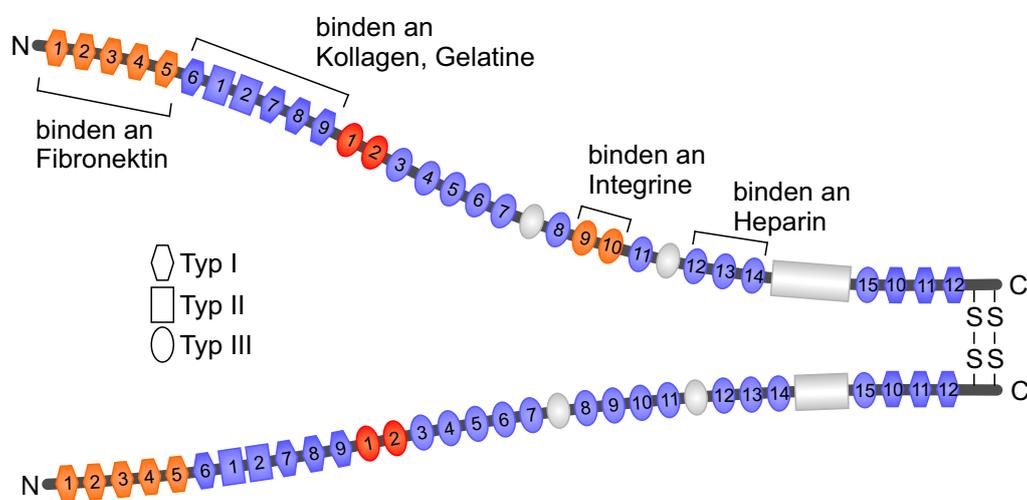


Abbildung 2.2: Fibronektin-Dimer (nach [10]): FN ist aufgebaut aus drei sich wiederholenden Einheiten. Das Zusammenspiel dieser Einheiten mit Zellen ermöglicht die gezielte Zell-gesteuerte Aggregation des FN. Die Kette von Untereinheiten lässt sich wiederum in Domänen unterteilen, die bestimmte Aufgaben übernehmen, indem sie selektiv Bindungen eingehen. Das Modell ist stark vereinfacht und viele der möglichen Bindungspartner bzw. Funktionen von Untereinheiten sind der Übersicht halber nicht dargestellt

In der EZM kommt FN dagegen als nicht lösliche Fibrille vor, die aus Multimeren aufgebaut ist. Damit es nicht zu ungewollten Aggregaten der gelösten Dimere kommt, ist der Prozess der Aggregation zellgesteuert. Er beginnt damit, dass gelöstes FN an die Membran von Zellen bindet, genauer an Integrine, die in der Zellmembran vorhanden sind. Integrine sind eine Gruppe von dimeren Molekülen, die die Zellmatrix durchstoßen und daher eine extra- und eine intrazelluläre Domäne haben. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Einheit, die im Gegensatz zu z. B. dem Fibronektin nur lose miteinander verbunden sind, wobei es eine Vielzahl verschiedener solcher Einheiten gibt. Ein sehr prominenter wenn auch nicht alleiniger Bindungspartner von FN ist das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Durch Zug, den die Zelle am FN ausübt (Kapitel 2.1.3), werden sonst verdeckte Bindungsstellen für FN freigelegt und es kann polymerisieren [11].

Die Bindungsstellen für Integrine sind RGD-Sequenzen⁴ in Typ-III-Einheiten Nr. 9 und 10 (Abbildung 2.2). Die Bindungsstelle, die die Selbstassoziation vermittelt, befindet sich am N-Terminus des Moleküls und besteht aus fünf Typ-I-Untereinheiten.

2.1.3 Zell-Matrix-Kontakte

Die EZM vermittelt Kräfte an Zellen und wird durch diese verformt. Außerdem spielen Kräfte wie oben am Beispiel von Fibronectin bereits angedeutet eine große Rolle bei der Aggregation der EZM. Damit diese wechselseitige Einflussnahme möglich ist, ist es notwendig eine mechanische Verbindung zwischen der EZM und der zellinternen Maschinerie einer Zelle herzustellen. Diese Verbindung wird Zell-Matrix-Kontakt genannt. Da die meisten Experimente, auf denen die hier beschriebenen Erkenntnisse beruhen, an Zellkulturen auf flachen Substraten (2D) gemacht wurden, beziehen sich die Aussagen hier auf derartig kultivierte Zellen. Es muss davon ausgegangen werden, dass manche Prozesse in 3D-Kulturen und natürlich auch *in vivo* anders ablaufen. Es wird im folgenden Text an geeigneten Stellen darauf hingewiesen, wo bekannte Unterschiede liegen. Auch wird in Kapitel 2.2 explizit auf die Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Zellkultur eingegangen.

Zell-Matrix-Kontakte sind sehr komplexe Organellen, die aus mehr als 150 verschiedenen Proteinen aufgebaut sind. Sie lassen sich für 2D-Zellkulturen grob anhand ihrer Größe und Zusammensetzung in drei Untergruppen aufteilen.

Fokalkomplexe sind neu gebildete Kontakte. Daher finden sie sich auch hauptsächlich im Lamellipodium⁵, sind noch sehr klein und weisen eine punktförmige Morphologie auf. Sie sind häufig kurzlebig und können schnell wieder zurückgebildet werden.

Fokalkontakte bilden sich unter Krafteinwirkung bzw. Einfluss der kleinen Rho-GTPase⁶ RhoA aus Fokalkomplexen. Diesen Prozess nennt man Reifung. Fokalkontakte sind in der Zellperipherie zu finden, haben eine ovale Morphologie und sind wesentlich größer als Fokalkomplexe. Die Reifung zu Fokalkontakten hat zur Folge, dass die Strukturen eine wesentlich geringere Dynamik aufweisen. Auch die Zusammensetzung ändert sich: So ist nun α_v -Integrin ein wesentlicher Bestandteil. Des Weiteren kommen zu dem schon in den Fokalkomplexen vorhandenen Paxillin und Vinculin auch α -Aktinin, Talin und die Fokaladhäsionskinase (FAK) hinzu (Abbildung 2.3).

⁴Die RGD Sequenz ist ein Peptid der Typ-III-Untereinheit, der aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht. Sie kommt auch in vielen anderen EZM-Proteinen vor. Darüber hinaus vermittelt sie auch alleinstehend Fokalkontakte [12].

⁵Das Lamellipodium ist bei migrierenden oder sich ausbreitenden Zellen in 2D-Zellkulturen eine sehr flache und breite Ausstülpung in Migrationsrichtung, mit deren Hilfe sich die Zelle weiterbewegt.

⁶GTPasen sind kleine Proteine die in der Signalübertragung (Signaltransduktion) als Schalter fungieren [14]. Die Aktivierung der GTPase geschieht hier durch die Umwandlung von GDP nach GTP durch Phosphorylierung.

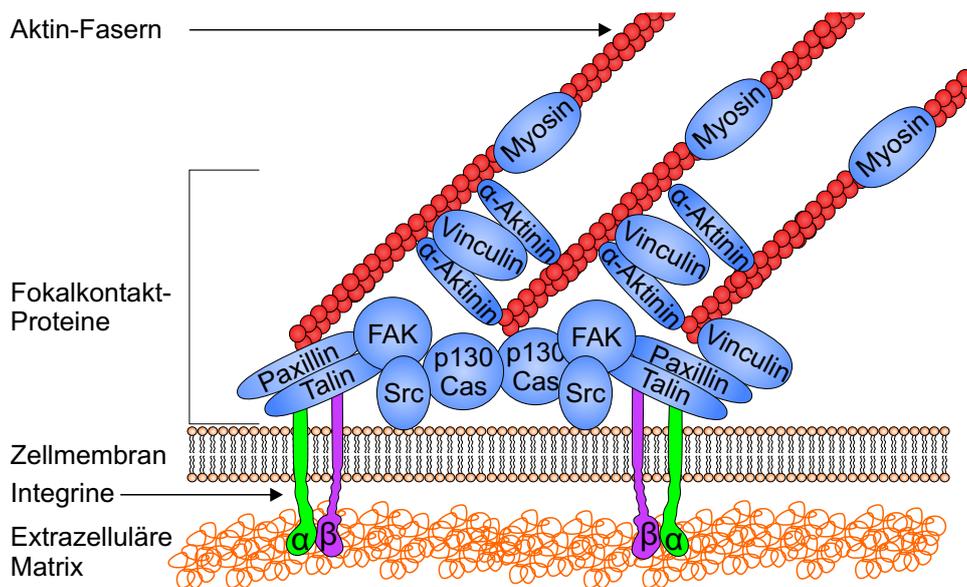


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines Fokalkontakts (nach [13]): Fokalkontakte sind Konstrukte, die für die Signalübertragung von außen in das Innere der Zelle benötigt werden. Hierbei binden Integrine mit ihrer extrazellulären Domäne an die EZM und intrazellulär an Talin und Paxillin. Dadurch werden die Fokaladhäsions-Kinase (FAK) und Vinculin rekrutiert. Nun wird α -Aktinin von FAK phosphoryliert, bindet an Vinculin, vernetzt das Aktin-Zytoskelett und verankert es an den Fokalkontakten. Src und p130Cas spielen bei der Häufung der Integrine an Fokalkontakten eine Rolle.

Der dritte Typ sind die **fibrillären Adhäsionen**. Sie finden sich im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Arten von Zell-Matrix-Kontakten immer unter der zentralen Region der Zelle (d. h. *in vitro* zwischen der zentralen Region und dem Deckglas bzw. der Zellkulturflasche) und haben, wie der Name schon andeutet, eine fibrilläre oder manchmal auch kugelige Form. Sie spielen bei der Aggregation der EZM eine große Rolle. Es findet sich in solchen Adhäsionen daher vor allem α_5 -Integrin, während sonst typische Proteine wie Paxillin und Vinculin fehlen.

An dieser Stelle sollte bemerkt werden, dass sich diese Einteilung für 3D-Zellkulturen nicht so einfach gestaltet und auch stark von der Art der 3D-Geometrie abhängt. So wurden z. B. in Kontakten an fibrilläre 3D-Strukturen andere Proteinzusammensetzungen gefunden, als von 2D-Experimenten bekannt [3]. Hier wurde unter anderem die an Tyrosin 397 phosphorylierte Fokaladhäsionskinase (FAK Tyr397) nicht gefunden. In den Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, findet man FAK Tyr397 allerdings in den Kontakten. Es werden hier die Kontakte von Fibroblasten untersucht, die bereits seit einigen Stunden in 3D-Strukturen aufgespannt sind. Diese Kontakte sind sehr groß und lassen sich am ehesten den Fokalkontakten zuordnen.

Zur Architektur der Fokalkontakte war lange wenig bekannt. Experimente mit hochauflösenden Mikroskopietechniken haben gezeigt, dass sie (in 2D) ein sehr geordnetes

Schichtsystem darstellen [15]: Hierbei sind die Integrine von den Aktin-Fasern durch eine etwa 40 nm dicke Schicht voneinander getrennt. In dieser Fokalkontaktschicht finden sich wiederum teilweise überlappende Schichten der Fokalkontakt-Proteine.

Die im Zuge dieser Arbeit näher untersuchten Fokaladhäsionsproteine sind FAK und Paxillin. Untersuchungen in der Literatur über das Verhalten von Mäusefibroblasten ohne FAK zeigte, dass Zellen ohne FAK zwar weiterhin an Fibronektin binden, allerdings sehr viele Fokalkontakte ausbilden und sich sehr langsam ausbreiten [16]. Des Weiteren führt der Mangel an FAK zu weniger Migration der Zellen. Daraus lässt sich vermuten, dass FAK besonders beim Umbau von Fokalkontakten eine sehr große Rolle spielt. Paxillin wird sehr früh zu neu entstehenden Adhäsionen herangezogen [17] und scheint daher eine große Rolle in deren Aufbau und molekularer Architektur zu spielen [18]. Darüber hinaus scheint es allerdings ebenso wie FAK auch beim Abbau der Fokalkontakte wichtig zu sein, wie die Stabilisierung der Kontakte bei Zellen mit einem Paxillinmangel vermuten lässt [19].

2.1.4 Zell-Zell-Kontakte

In Geweben, in denen die Zelldichte hoch ist, spielen die Kontakte zwischen den Zellen eine größere Rolle als die zur Matrix. Von diesen Zell-Zell-Kontakten gibt es sehr verschiedene Typen. So gibt es analog zu den Fokalkontakten Cadherin-vermittelte **Ankerverbindungen**, die eine mechanische Verbindung zwischen den Zytoskeletten benachbarter Zellen herstellen.

In Epithelien bilden Zellen eine undurchlässige Barriere, die beispielsweise steuert, welche Nahrungsbestandteile die Darmwand durchdringen können. Hierzu werden die Lücken zwischen benachbarten Zellen mit sogenannten **Tight Junctions** geschlossen.

Um Signale chemischer Art von einer Zelle zur nächsten zu übermitteln gibt es kanalbildende Verbindungen, die sogenannten **Gap Junctions**. Diese spielen unter anderem bei der elektrischen Signalkaskade in Nerven- und Muskelzellen eine Rolle. Die Gap Junctions haben einen Durchmesser von etwa 1,5 nm und lassen somit kleine Moleküle wie Ionen hindurch, aber keine Makromoleküle wie Proteine. Sie sind aufgebaut aus sogenannten Connexinen oder Innexinen, wobei bei Wirbeltieren die Connexine überwiegen. Es sind in den Membranen von zwei durch Gap Junctions verbundene Zellen immer jeweils sechs Connexine zu einem zylindrischen Connexon verbunden, von denen je zwei einen Kanal von Zelle zu Zelle bilden. Eine Gap Junction besteht aus mehreren (bis zu Tausenden) von solchen Kanälen, die andauernd auf- und abgebaut werden. Außerdem können Zellen die Durchlässigkeit der Gap Junctions steuern. So werden, um angrenzende Zellen zu schützen, die Gap Junctions geschlossen, wenn die Konzentration eines Stoffes einen bestimmten Wert überschreitet. Auch Botenstoffe wie Dopamin können die Durchlässigkeit der Gap Junctions beeinflussen.

2.1.5 Das Aktin-Zytoskelett

Zur Erzeugung mechanischer Stabilität, aber auch zur Migration, Krafterzeugung und für den intrazellulären Transport, haben Zellen ein Zytoskelett. Es ist aufgebaut aus Aktin- und Intermediärfilamenten sowie aus Mikrotubuli. Sie bilden ein Gerüst, das in Anpassung an die Umgebung und in Antwort auf externe Reize wie Wachstumsfaktoren ständig verändert wird.

Für die Krafterzeugung ist das Aktin-Zytoskelett entscheidend. Es besteht aus einer Vielzahl an Aktinfilamenten (F-Aktin) verschiedenster Länge. Diese werden fortlaufend auf- und abgebaut. Das ist möglich, da die Filamente aus globulärem Aktin-Monomer bestehen (G-Aktin). Durch Steuerung des Auf- und Abbaus wird die schnelle Umstrukturierung des Gerüsts möglich. Diese werden durch verschiedene Polymerisierungsraten an den beiden Enden des Filaments ermöglicht. Der Unterschied in diesen Raten entsteht, da bei der Polymerisierung eine Konformationsänderung des G-Aktins stattfindet, die an den verschiedenen Enden verschieden lange dauert. Das hierdurch aktivere Ende wird auch als *plus*-Ende und das weniger aktive Ende als *minus*-Ende bezeichnet. Der Umbau des Aktin-Zytoskeletts unterliegt meist dem Tretmühlen-Mechanismus. Hierbei wird das Filament am einen Ende aufgebaut, während es am anderen Ende abgebaut wird. Dies liegt daran, dass es bei der Bindung des Monomers an das Filament zu einer Spaltung von ATP nach ADP kommt. Da sich meistens ATP-tragendes G-Aktin anlagert und ADP-tragendes ablöst ergibt sich ein Ungleichgewicht der beiden Enden in den kritischen Konzentrationen von G-Aktin. Die kritische Konzentration für die Anlagerung an das Filament liegt beim *minus*-Ende über der des *plus*-Endes. Dadurch wird innerhalb eines Konzentrationsbereichs G-Aktin an einem Ende des Filaments abgebaut, während sich am anderen Ende weitere Monomere anlagern.

In Zellen, die keine Muskelzellen sind, kommen in 2D-Kultur im Wesentlichen drei Arten von Gerüsten aus Aktin vor. Im Lamellipodium findet sich ein gelartiges Netz aus unter einem großen Winkel verbundenen Fasern. In kleinen Ausstülpungen wie Filopodien sind die Filamente zu sehr dichten Bündeln parallel gepackt. Im Unterschied dazu sind die Bündel in sogenannten Stressfasern sehr viel lockerer und die Filamente stehen antiparallel. Dies ist nötig, um eine Zugkraft ausüben zu können. Die Stressfasern verlaufen im Inneren der Zelle und spannen sie zwischen den Fokalkontakten auf.

Zugkräfte entstehen im engen Zusammenspiel von Aktinfilamenten mit Myosin II. Myosin II ist das bekannteste der Motorproteine, die sich entlang von Aktinfilamenten bewegen und auf diese Weise viele Aufgaben wahrnehmen, wie z. B. den Proteintransport in Richtung Zellmembran. Es gibt 24 Myosin-Klassen [20], von denen Myosin II die häufigste ist. Es ist ein 150 nm langes Protein, das aus einer langen Schwanzdomäne besteht und an einem Ende zwei Köpfe hat. Diese Köpfe können an Aktinfilamenten vom *minus*- zum *plus*-Ende entlangwandern, indem sie immer wieder an das F-Aktin binden, eine Knickbewegung des Kopfes ausführen und sich danach wieder von F-Aktin lösen. In Zellen, die keine Muskelzellen sind, kommt es in einer inaktiven Konformation vor, in der es eingerollt ist, und in einer aktiven, in der es langgestreckt ist. In der langgestreckten

Konformation legt es sich mit anderen Myosin II zu einem dicken Filament zusammen, dass bipolar aufgebaut ist und an beiden Enden eine Vielzahl von Köpfen aufweist (siehe hierzu Abbildung 2.4). Nun können sich diese dicken Filamente an entgegengesetzt angeordneten Aktinfilamenten entlang schieben. Hierdurch verschieben sich dann die Aktinfilamente gegeneinander wodurch die Kontraktilität der Aktin-Stressfasern zustande kommt.

2.1.6 Sarkomere zur Krafterzeugung bei Muskelzellen

Der soeben beschriebene Mechanismus zur Erzeugung von Zugkräften wird auch in Muskelzellen genutzt, um Kontraktionen des Muskels zu erreichen. Da im Muskel eine sehr große Längenveränderung in kurzer Zeit nötig ist, geschieht dies in einer sehr geordneten Struktur, dem Sarkomer (Abbildung 2.4). Eine Muskelzelle enthält sehr viele dieser Sarkomere und kann sich dadurch in kürzester Zeit um etwa 10 % verkürzen. Die Hauptkomponenten sind sehr lange Myosinfilamente, die auch dickes Filament genannt werden. Ihre Mittellinie ist z. B. unter dem Elektronenmikroskop gut zu sehen und wird M-Linie genannt. Diese dicken Filamente gleiten durch ihre sehr hohe Anzahl an Köpfen sehr schnell an den dünnen Filamenten, die aus F-Aktin bestehen, entlang. Um die Länge des dünnen Filaments festzulegen und festzuhalten ist es mit Nebulin umwunden und mit Tropomodulin terminiert. Die dünnen Filamente sind mit ihrem *plus*-Ende an der Z-Scheibe befestigt, welche sich aus Cap-Z und α -Aktinin zusammensetzt. Um das dicke Filament an seiner Position in der Mitte zwischen zwei Z-Scheiben und auch den dünnen Filamenten zu halten ist auch dieses an der Z-Scheibe befestigt. Hierzu dient das Protein Titin.

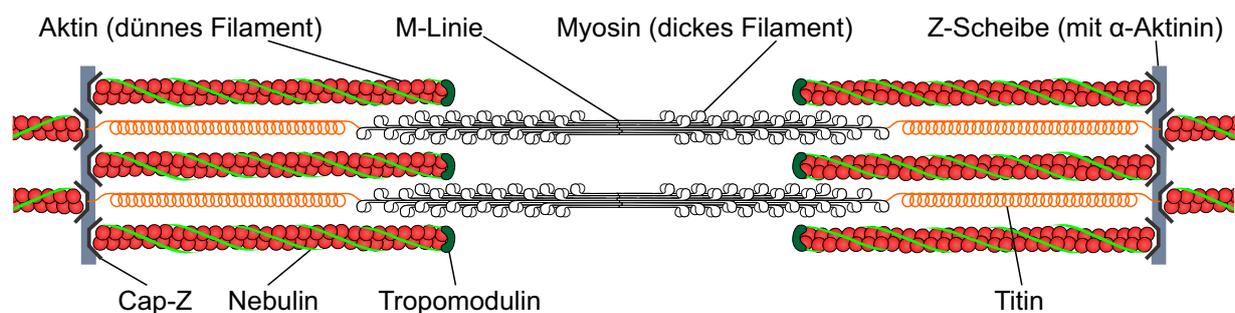


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines Sarkomers (nach [8]). Das dicke Filament, das aus über hundert Myosin-II-Proteinen besteht, gleitet bei der Muskelkontraktion zwischen die Aktinfilamente. Eine ganze Reihe an Hilfsproteinen bewirkt den extrem gleichmäßigen Aufbau und ermöglicht das gezielte Zusammenziehen um bis zu 10 %.

Um nun im Muskel zusammenzuarbeiten sind sehr viele dieser Sarkomere in einer einzelnen Zelle aneinander gereiht. In Skelettmuskeln geht dies so weit, dass die Muskelvorläuferzellen zu riesigen Zellen mit sehr vielen Zellkernen verschmelzen. Im Herzmuskel sind die Zellen noch voneinander getrennt. Allerdings sind aneinandergrenzende

2 Grundlagen

Herzmuskelzellen über Gap Junctions sehr eng miteinander verknüpft. Um eine schnelle elektrische Reizleitung zu ermöglichen, befindet sich überall dicht an den Sarkomeren das sarkoplasmatische Retikulum, eine hochspezialisierte Form des endoplasmatischen Retikulum. Dieses schüttet bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol schlagartig sehr viel mehr Ca^{2+} aus und sorgt so für einen schnellen Anstieg des Signals zur Kontraktion am Sarkomer.

2.2 Zellkultivierung in drei Dimensionen

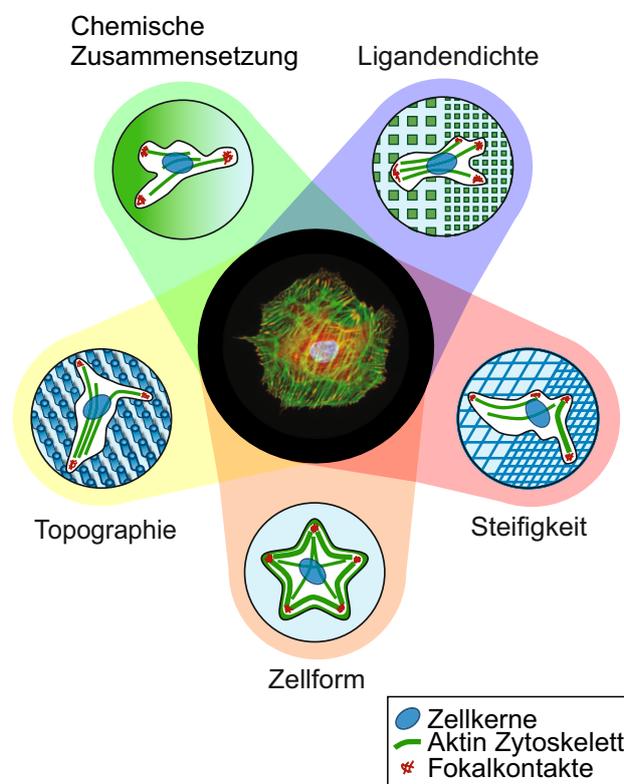
Es hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass die Art des Substrats kultivierter Zellen das Zellverhalten maßgeblich beeinflusst. Eine wichtige Rolle bei dieser Entwicklung spielen dabei neue Erkenntnisse in der Materialforschung und Mikrostrukturierung die neue Zellkultivierungsbedingungen möglich machen.

2.2.1 Einflussfaktoren auf das Zellverhalten

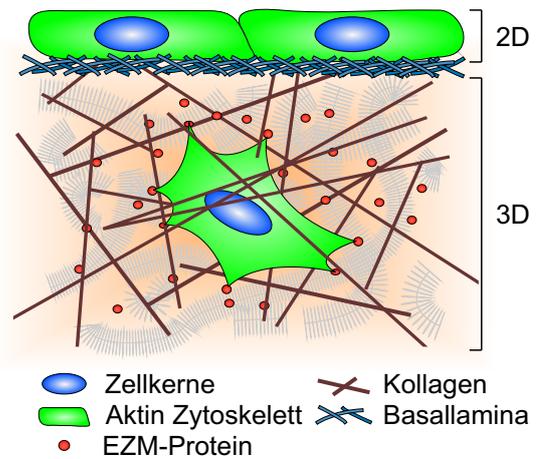
Um die Einflussfaktoren des Substrats auf das Zellverhalten zu untersuchen, gibt es eine ganze Reihe möglicher Ansätze. Zunächst kann man auf flachen Substraten die Oberflächenbeschaffenheit gezielt steuern. Da dies relativ einfach umzusetzen ist wird ein hoher Durchsatz an Experimenten möglich, was dies zu einer sehr effektiven Methode macht, um Erkenntnisse über das Zellverhalten in Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren zu erlangen [21]. Die folgenden Parameter wurden durch solche Experimente als wichtige Einflussfaktoren ausgemacht (siehe Abbildung 2.5(a)):

- Die Konzentration an adhäsionsvermittelnden Molekülen (Liganden) an der Substratoberfläche steuert die Zellform und die Stärke der Fokalkontakte. Dies wiederum beeinflusst die Migrationsgeschwindigkeit [22–24]. Hierzu reicht schon die Verwendung des beispielsweise in Fibronectin vorkommenden RGD-Motivs [25, 26].
- Der Abstand zwischen den Liganden steuert Zellausbreitung und Migration. Ein Ligandenabstand unter 70 nm führt zu besserem Ausbreiten der Zellen als größere Abstände [27]. Mit Hilfe einer speziellen Methode (*micro contact printing*) können Proteininseln auf Goldoberflächen gedruckt werden. Mit derartig strukturierten Substraten lässt sich zeigen, dass ein Abstand von Insel zu Insel kleiner als 5 μm keine Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zu homogen beschichteten Substraten bewirkt. Abstände zwischen 5 μm und 25 μm führen dagegen zu einem Aufspannen der Zelle von Insel zu Insel. Damit verbunden ist die Ausbildung von Aktin-Bögen zwischen den Inseln. Größere Abstände können nicht überbrückt werden [28]. Auf Oberflächen, auf denen sich der Abstand der Proteininseln graduell ändert, migrieren Zellen gerichtet hin zur größeren Proteindichte [29].
- Die Steifigkeit des Substrats spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration. Ähnlich wie bei der Ligandendichte adhäreren Zellen besser auf harten Materialien als auf weichen und bilden hierbei mehr Aktin-Stressfasern und größere Fokalkontakte [30–32]. Auch migrieren Zellen zu Bereichen größerer Steifigkeit [5].
- Gibt man Zellen ihre äußere Form mit Hilfe von beispielsweise *micro contact printing* vor, so können auch hier eine Vielzahl von Zellreaktionen hervorgerufen werden: Ist der Raum, den man Zellen zur Adhäsion zur Verfügung stellt, zu gering, so kommt es zu Apoptose (Zellsterben) [33]. Hierbei ist die Fläche ein wichtigerer Faktor als

(a) Einflussfaktoren auf das Zellverhalten



(b) 2D- und 3D-Matrix



(c) 2D- und 3D-Zellkultivierung

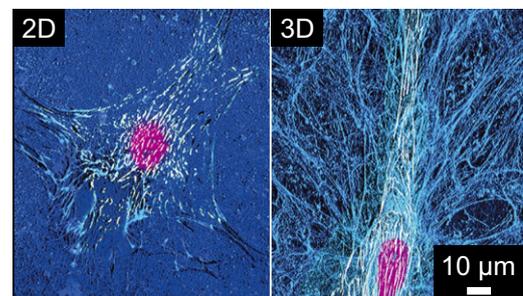


Abbildung 2.5: (a) Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf das Zellverhalten. Diese Faktoren sind die Konzentration an Liganden, deren räumliche Verteilung, die Substratsteifigkeit, die äußere Form der Zellen und die Topographie des Substrats. Die Abbildung ist leicht verändert aus [21] entnommen. (b) Schematische Darstellung der EZM *in vivo* für Zellen in Epithelien und Zellen in Bindegewebe (Abbildung leicht verändert aus [41]). (c) Zellkultur auf flachen Substraten und in einer 3D-Matrix (Fibronectin: blau, Zellkerne: Magenta, α_5 -Integrin: weiß. Abbildung aus [2]).

die Menge des zur Verfügung gestellten Haftproteins. Es lässt sich außerdem zeigen, dass Zellen ihre äußere Form solchen Flächen anpassen und sich abhängig von der vorgegebenen Form polarisieren [34–36].

- Die Topographie der Substrate spielt auch eine große Rolle und wurde insbesondere anhand von Rillen (flaches Substrat, das mit langen dünnen Rillen durchzogen ist) und Gruben (flaches Substrat in das kleine runde Löcher eingelassen sind) untersucht. Die Zellen sind entlang der Rillen elongiert und migrieren auch in die durch die Rillen vorgegebene Richtung. Die Adhäsion scheint im Vergleich zu flachen Substraten verstärkt [37, 38]. Im Gegensatz dazu wird die Adhäsion auf Gruben schwächer. Hierbei steigt die Anzahl an Filopodien [39, 40].

Anhand dieser Ergebnisse in zweidimensionalen Systemen erkennt man, dass Zellen nicht nur durch biochemische, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Faktoren gesteuert werden. Daher ist es naheliegend, für Zellexperimente auch in die dritte Dimension zu gehen: Viele Gewebe in unserem Körper sind 3D-Gerüste mit sehr unterschiedlichen mechanischen und biochemischen Eigenschaften (siehe Abbildung 2.5(b)). Diese möglichst naturgetreu nachzubauen muss daher ein Ziel der Entwicklung neuartiger Zellkultursubstrate sein. Ein anderes Ziel muss aber auch sein, einige wenige Eigenschaften der Gewebe in sehr definierter Form nachzubilden, um gezielt den Einfluss dieser Eigenschaft zu untersuchen. Für beide Herangehensweisen wurden eine Vielzahl an Herstellungsmethoden entwickelt, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden sollen. Da das Ziel hierbei ist, möglichst definierte Zellkulturbedingungen zu schaffen, wird sich hier auf künstliche Materialien beschränkt. Darüber hinaus können aber auch Gewebe, die von Zellen befreit wurden, oder Matrizen, die durch Zellen in Kultur aufgebaut wurden, als Substrat zur 3D-Zellkultivierung verwendet werden.

2.2.2 Beispielsysteme für 3D-Zellkultivierung

Die am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung artifizierlicher Strukturen für die Zellkultivierung in drei Dimensionen ist die Verwendung von Hydrogelen. Sie umschließen die Zellen vollständig und bestehen oft aus EZM-Molekülen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin. Diese Systeme weisen leider eine homogene Verteilung der Liganden auf, was nicht der Situation *in vivo* entspricht. Außerdem lässt sich die Dichte dieser Liganden nur schwer bestimmen. Um die Ligandenverteilung zu steuern, werden Hydrogele aus passivierendem Polyethylenglycol (PEG) photochemisch mit EZM-Proteinen funktionalisiert [42, 43].

Eine Möglichkeit zur Erzeugung von sehr definierten 3D-Zellkultursubstraten ist, diese in verschiedenen Druckmethoden herzustellen. Hierbei gibt es eine Vielzahl an Verfahren die Material schichtweise aufbringen: Es kann hierbei ein Pulver mit einem Laser verschmolzen werden [44, 45] oder ein Material nach und nach wie beim Tintenstrahldrucker entweder tropfenweise oder als Faden aufgebracht werden. Bei Bedarf und je nach Materialsystem kann das Material anschließend mit UV-Licht ausgehärtet werden [46–53].

Mittlerweile recht verbreitet ist auch das direkte Laserschreiben (DLW), das in der Zwischenzeit zu einigen Anwendungen in der Zellbiologie geführt hat [54–60]. Da es in Kapitel 3.1 ausführlich beschrieben wird, wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Als schnelle Methode zur Erzeugung von 3D-Mikrostrukturen bietet sich je nach Struktur das Abformen vom einem „Master“ an. Hierbei dürfen nur die Überhänge nicht zu groß sein. Insbesondere bei Experimenten, bei denen ein hoher Durchsatz an Strukturen nötig ist, handelt es sich hierbei um eine zeit- und kostensparende Methode. Es wird dabei ein Master verwendet, der zuvor mit Elektronenstrahlolithographie, UV-Lithographie oder

2 Grundlagen

auch DLW hergestellt wurde. Dieser Master wird anschließend in ein Polymer (meistens Polydimethylsiloxan, PDMS) abgeformt [49, 61–68].

Da das Feld der Zellkultivierung hochdefinierten 3D-Mikrostrukturen noch sehr neu ist und schon die Herstellung der Strukturen eine Herausforderung darstellen kann, ist die Menge an zellbiologischen Erkenntnissen, die bisher aus solchen Experimenten gewonnen wurden, noch überschaubar. Viele der Studien beschränken sich daher darauf zu zeigen, dass gewisse Materialien und Fertigungsweisen geeignet sind, um Strukturen herzustellen, die sich prinzipiell zur Zellkultivierung eignen, und deren Materialien keine zytotoxische Wirkung haben [44, 51, 56, 58, 59, 69, 70]. Als nächster Schritt wurde untersucht, inwieweit die Zellkultivierung in 3D-Strukturen zu Veränderungen in der Zellteilungsrate führt [44, 54, 69, 71, 72].

Darüber hinaus existieren einige Einzelzellstudien, bei denen die äußere Form, Morphologie, Adhäsion an die Strukturen und die Motilität (Fähigkeit zur Migration) der Zellen untersucht wurde. Hierbei hervorzuheben sind die Arbeiten zur Zellform und der Zusammensetzung von Fokalkontakten im Vergleich von 2D-Zellkultivierung und 3D-Kultivierung in Proteinmatrizen [2] bzw. Geweben [3]: Die Morphologie der Zellen in 2D ist sehr flach gerückt und rundlich. In den Geweben weisen sie dann eine spindelförmige, langgestreckte Form auf (siehe Abbildung 2.5(c)). Auch die molekulare Zusammensetzung der Zell-Matrix-Kontakte ist verschieden, wie schon in Kapitel 2.1.3 beschrieben. In Strukturen, die die Zellform etwas mehr vorgeben, konnte gezeigt werden, dass Zellen, die in spindelförmigen 3D-Mikrovertiefungen wachsen, diese vollständig ausfüllen und sich nicht nur auf den Boden dieser Vertiefungen beschränken. Dies gilt sowohl für das Aktin-Zytoskelett, als auch für die Zell-Matrix-Kontakte [62]. Verwendet man für diese Mikrovertiefungen weiche Materialien, so können keine Aktin-Stressfasern ausgebildet werden [66].

Weiterhin wurden 3D-Mikrostrukturen verwendet, um Kräfte an Zellen zu messen. Diese sind in Kapitel 2.3 beschrieben. Für viele der benannten Methoden gibt es eine Vielzahl an Anwendungen in der Stammzellforschung, die nicht mit aufgeführt sind.

2.3 Methoden zur Kraftausübung auf Zellen

Im folgenden Abschnitt werden kurz die grundlegenden Methoden vorgestellt, um Zellreaktionen auf mechanische Reize zu untersuchen. Hierbei werden wo möglich die Vor- und Nachteile dieser Methoden herausgearbeitet um damit die Abgrenzung zu der in dieser Arbeit entwickelten Methode zu schaffen. Zunächst werden Methoden vorgestellt, die passiv die mechanischen Kräfte, die auf Zellen wirken, beeinflussen hierbei aber nicht aktiv eine Kraft in des System einbringen. Hiermit beschäftigt sich anschließend der zweite Teil dieses Kapitels.

2.3.1 Passive Methoden zur Kraftausübung und Kraftmessung

Mit Experimenten an Zellen in Kultur kann untersucht werden, wie mechanische Reize zellulär verarbeitet werden und wie sie das Zellverhalten bestimmen. Im einfachsten Fall kann man die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung variieren um Unterschiede im Zellverhalten in Abhängigkeit von diesen Eigenschaften zu studieren. Ein Beispiel hierfür ist die Variation der Härte des Substrates, auf dem die Zelle sich befindet [73–75]. Eine andere Möglichkeit ist die Veränderung der zellinternen Fähigkeit Kräfte zu generieren, indem man die Zellen mit entsprechenden Inhibitoren oder Ähnlichem behandelt [76].

Auch die Kräfte, die Zellen auf ihre Umgebung ausüben, lassen sich messen. Die wohl älteste Methode ist, die Zellen auf dünnen Membranen auszusäen und die Falten zu vermessen, die die Kontraktilität der Zellen hier verursacht [74]. Etwas einfacher und genauer ist es fluoreszente Partikel in solchen weichen Substraten zu verteilen. Die Lage dieser Partikel gibt dann Aufschluss über die Verteilung der durch die Zellen ausgeübten Kräfte [77]. Da aber auch hier alle Messpunkte (die Partikel) über das Substrat miteinander verbunden sind, ist die Berechnung der Kräfte aufwendig. Eine neuere Methode ist es daher, die Zellen auf Anordnungen von sehr kleinen Pfosten auszusäen [61]. Diese sind mechanisch entkoppelt und erleichtern daher die Auswertung.

Allerdings beschränken sich alle diese Möglichkeiten auf zweidimensionale (oder wie im letzten Fall 2,5 dimensionale⁷) Geometrien. Es wurde demonstriert, dass auch die Verwendung des direkten Laserschreibens (*direct laser writing*, DLW, Kapitel 3.1) eine Möglichkeit bietet, um Kräfte von Zellen zu messen [7]. Bei Verwendung eines geeigneten Lackes (Ormocomp, Kapitel 3.2.1) und bei filigranen Strukturen können Zellen diese Strukturen verformen. Über einen Kalibrierungsschritt mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (*atomic force microscope*, AFM) kann die Zugkraft der Zelle aus der Verformung der Struktur bestimmt werden. Die Zugkraft von embryonalen

⁷Es werden solche Strukturen als 2,5-dimensional bezeichnet, die zwar über eine große Ausdehnung in der dritten Dimension verfügen, allerdings keine Strukturierung entlang dieser Raumrichtung haben. Im Gegensatz dazu werden Topographien, die nur einige Nanometer bis wenige Mikrometer hoch sind, noch als 2D bezeichnet.

Hühnerkardiomyozyten wurde hier zu 47 nN gemessen. Auch die Verwendung von weichen Säulen aus PDMS, die eine Höhe von über 20 μm und einen Abstand von etwa 30 μm haben, ermöglicht Herzmuskelzellen in einer dreidimensionalen Morphologie wachsen zu lassen (obwohl die Strukturen selbst 2,5 dimensional sind) [78]. Auch in diesem Fall lässt sich über die Verbiegung der Materials die Kraft bestimmen, die von Zellen ausgeübt wird. Hier wurde gezeigt, dass nicht die Kraft, mit der Zellen an den Säulen ziehen, von Zelle zu Zelle ähnlich groß ist, sondern dass vielmehr die Amplitude innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von der Steifigkeit des Materials ist.

Eine Möglichkeit, die Kräfte ganzer dreidimensionaler Zellverbände in Abhängigkeit der Steifigkeit ihrer Umgebung zu vermessen, ist das Aufspannen eines Hydrogels zwischen Pfosten aus PDMS [79]. Hier ist die Form des Gewebes sehr definiert, was sowohl eine Mittelung über verschiedene Experimente als auch eine numerische Modellierung des Gewebes erlaubt.

2.3.2 Aktive Methoden zur Kraftausübung

Da es manchmal wünschenswert ist die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung nicht nur festzulegen, sondern Kräfte auch gezielt auf Zellen auszuüben und deren Reaktionen direkt zu beobachten, wurden auch hierzu einige Methoden entwickelt. Zu ihnen gehören zum einen Methoden, die in der Lage sind eine Kraft über die gesamte Zelle verteilt aufzubringen (globale Methoden). Zum anderen gibt es Methoden, um gezielt nur Teile einer Zelle zu verformen (lokale Methoden).

Globale Methoden

Eine sehr verbreitete Methode mechanische Kräfte an ganzen Zellen auszuüben ist, die Zellen auf flexiblen Substraten auszusäen und die Substrate entlang einer Achse zyklisch zu dehnen [80–83]. Diese Methode wurde auf eine Vielzahl von Zelltypen angewandt, unter anderem auf Herzmuskelzellen [81] und Fibroblasten [82, 84]. Es zeigt sich bei dieser Art von Messung nach einigen Stunden zyklischen Ziehens eine unter dem Lichtmikroskop gut zu erkennende Reorientierung der Zellen. Sie drehen sich mit der langen Halbachse senkrecht zur Zugrichtung. Dies geht so weit, dass bei sich teilenden Zellen die Tochterzellen auf einer Gerade senkrecht zur Zugachse liegen [80]. Diese Reorientierung der Zellen zeigt sich auch direkt im Zytoskelett. So kann man beobachten, wie bei bereits ausgebreiteten Zellen Aktin-Stressfasern, die zuvor parallel der Zugrichtung orientiert waren, in weniger als einer Stunde durch solche senkrecht zu ihr ersetzt werden [83]. Dieser Prozess hängt eng mit den Fokalkontakten der Zellen zusammen, die während dieses Prozesses über das Substrat gleiten, und wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Protein RhoA vermittelt [84]. Messungen dieser Art werden üblicherweise in Frequenzbereichen um 0,5 – 1 Hz durchgeführt, da dies dem Herzschlag entsprechend eine physiologisch sinnvolle Frequenz ist. Allerdings lässt sich der Effekt der

Ausrichtung auch im mHz-Bereich nachweisen [85]. Beim statischen Fall allerdings kommt es zu einem anderen Effekt: die Zelle richten sich entlang der Zugachse aus [86, 87]. Auch die Strecke, um die das Substrat gestreckt wird, spielt eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Zellen auf Streckungen um weniger als 2% [88] bzw. 4% [82] nicht reagieren.

Unterzieht man Kardiomyozyten dieser Art von Experiment, so zeigt sich, dass auch bei ihnen die Fokalkontakte von zyklischem Ziehen beeinflusst werden. Insbesondere wird FAK aktiviert und dies wird durch RhoA vermittelt. Allerdings zeigt sich hierbei keine Konzentrationsveränderung von RhoA [89]. Auch führt das Ziehen wie bei anderen Zelltypen zu einer Orientierung quer zur Zugachse [90]. Weiterhin scheint zyklisches Strecken zu Zellvergrößerung (Hypertrophie) zu führen [81].

Abgesehen von dem Ziehen an flexiblen Substraten gibt es noch einige weitere Möglichkeiten um die Reaktionen von Herzzellen auf mechanische Stimuli zu untersuchen. Adulte Kardiomyozyten sind sehr elongiert. Daher lassen sie sich mit beiden Enden an Glaspipetten oder Ähnlichem befestigen [91]. Hierzu werden häufig Frosch-Herzmuskelzellen verwendet, da diese sehr lang (200-400 μm) und dünn (2-10 μm) und somit recht einfach zu handhaben sind. Die Froschzellen können mit beiden Enden um Glasspitzen gewickelt oder an beiden Enden mit Mikropipetten angesaugt werden; oder man lässt sie an beschichteten Glasspitzen adhären. Für Zellen von Säugetieren gestaltet sich das schon etwas schwerer, da sie wesentlich kleiner sind. Die Verwendung von Karbonfasern hat sich hier bewährt, da die Zellen von alleine an diesen haften. Durch Auseinanderbewegen der beiden Befestigungspunkte kann die Herzmuskelzelle gestreckt werden. Insbesondere wurde mit solchen Techniken der Einfluss von Zugkräften auf das Membranpotential und den Ca^{2+} -Fluss von Kardiomyozyten vermessen [92, 93].

Man kann ganze Zellen auch mit einem Scherfluss beeinflussen [94–96]. Hierbei wird in einer speziellen Flusskammer ein laminarer Fluss Zellkulturmedium über die Zellen gespült. Diese Methode wird, da sie sehr nahe an den physiologischen Gegebenheiten im Innern von Blutgefäßen ist, häufig für Endothelzellen verwendet. Es lässt sich hierbei zeigen, dass sich im Gegensatz zu Zellen auf dehnbaren Substraten die Aktin-Stressfasern entlang der Zugrichtung ausrichten [97]. Dies geht einher mit einer Vergrößerung der Fokalkontakte und einer Reduktion ihrer Anzahl [95].

Analog zur Kraftmessung an Zellverbänden, die am Ende von Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde, kann auch an Zellverbänden eine Zugkraft ausgeübt werden. Hierzu wird eine Nickel-Kugel an einem der Pfosten befestigt. Mit Hilfe eines Magnetfeldes kann dieser Pfosten nun bewegt werden [98].

Lokale Methoden

All die Methoden, die in den vorhergehenden Abschnitten besprochen wurden betreffen immer die gesamte Zelle. Es gibt aber auch Methoden, die nur Teile einer Zelle gezielt einer Dehnung unterziehen. Das hat den Vorteil, dass die Teile der Zelle, die nicht betroffen sind

2 Grundlagen

als Referenz dienen können und der Einfluss der Kräfte damit viel direkter beobachtet werden kann. Viele dieser Methoden bedienen sich kleiner Partikel, die erst mit Proteinen beschichtet werden und dann an der Zellmembran adhären. Anschließend kann man mit elektromagnetischen Feldern die Position oder Orientierung dieser Partikel verändern: Zur Positionskontrolle werden üblicherweise optische Pinzetten verwendet [99]. Magnetische Partikel können mit Magnetfeldern rotiert werden [100, 101]. Mit beiden Methoden lässt sich zeigen, dass Fokalkontakte, die unter Zug stehen, verstärkt werden und dass von der Zelle mit erhöhter Kraft zurückgezogen wird.

Bei einer neueren Veröffentlichung [102] werden Zellen auf einem Gitter aus kleinen Säulen (Durchmesser $d = 3\ \mu\text{m}$ und Höhe $d = 10\ \mu\text{m}$) ausgesät. Einige wenige dieser Säulen enthalten magnetische Partikel und können daher mit einem externen magnetischen Feld bewegt werden. Hiermit kann eine Zugkraft auf einen Zell-Matrix-Kontakt einer Zelle ausgeübt werden. Gleichzeitig können die Kräfte, die die Zelle als Reaktion darauf auf alle Säulen ausübt, über die Veränderung der Position des mit der Zelle verbundenen Säulenendes vermessen werden. Es zeigt sich eine Vergrößerung des Fokalkontakts, an dem gezogen wurde. Des Weiteren führt die Kraftaufwendung an einem Zell-Matrix-Kontakt im Mittel zu einer Verringerung der Zugkräfte, die die Zelle auf die verbleibenden Säulen ausübt.

3 Methoden

Für die Experimente dieser Arbeit werden Mikrostrukturen hergestellt und in diesen Mikrostrukturen werden Zellen ausgesät. Anschließend werden mit Hilfe eines Mikromanipulators (siehe Kapitel 4) die Strukturen verformt, um Kräfte auf die Zellen auszuüben. Nach diesem Prozess werden die Zellen immunohistochemisch gefärbt und charakterisiert. Im nun folgenden Kapitel werden all die Methoden aus Physik und Biologie, die für diesen Prozess benötigt werden, ausführlich erklärt. Darüber hinaus werden einige 3D-Mikrostrukturen und ihre Anwendung beschrieben, die zwar im Laufe dieser Arbeit entwickelt und hergestellt wurden, aber nicht unmittelbar mit der Mikromanipulation in Verbindung stehen.

3.1 Dreidimensionale Mikrostrukturen durch direktes Laserschreiben

Direktes Laserschreiben (*direct laser writing*, DLW) bietet die Möglichkeit dreidimensionale Strukturen direkt in photoempfindliche Materialien zu schreiben [103]. Hierbei macht man sich Nichtlinearitäten im System zu Nutze, die in der Regel durch Zweiphotonenabsorption zustande kommen. Umgesetzt wird dies dadurch, dass der Fotolack bei der Laserwellenlänge (in unserem Fall etwa 800 nm) vollkommen durchsichtig ist, aber bei der halben Wellenlänge absorbiert. Dies führt dazu, dass für die Anregung jeweils zwei Photonen absorbiert werden müssen (Abbildung 3.1(a)). Dadurch hängt bei Zweiphotonenabsorption die Lichtabsorption des Lackes quadratisch von der Intensität des Lichtes ab. Bei Einphotonenabsorption würde man eine lineare Abhängigkeit erwarten.

Zur praktischen Umsetzung ist hierfür eine gepulste Laserquelle mit Pulslängen im Femtosekundenbereich nötig, da die Photonendichte sehr hoch sein muss, um eine ausreichende Wahrscheinlichkeit zur Zweiphotonenabsorption zu erhalten. Auch führt dies dazu, dass die Veränderung des Lackes (in vielen Fällen der Übergang des Fotoinitiators in den angeregten Zustand mit anschließendem Zerfall) nur oberhalb einer bestimmten Intensität und damit nur im fokalen Volumen und nicht darüber oder darunter auftritt. In Analogie zum zweidimensionalen Pixel wird dieses Volumenelement im DLW Voxel genannt. Weiterhin gibt es keine Akkumulation der Veränderung in Bereichen, die eventuell durch mehrere Belichtungen ähnlich viel Leistung erfahren. Dies ist in Abbildung 3.1(b) dargestellt. Die lineare bzw. quadratische Abhängigkeit

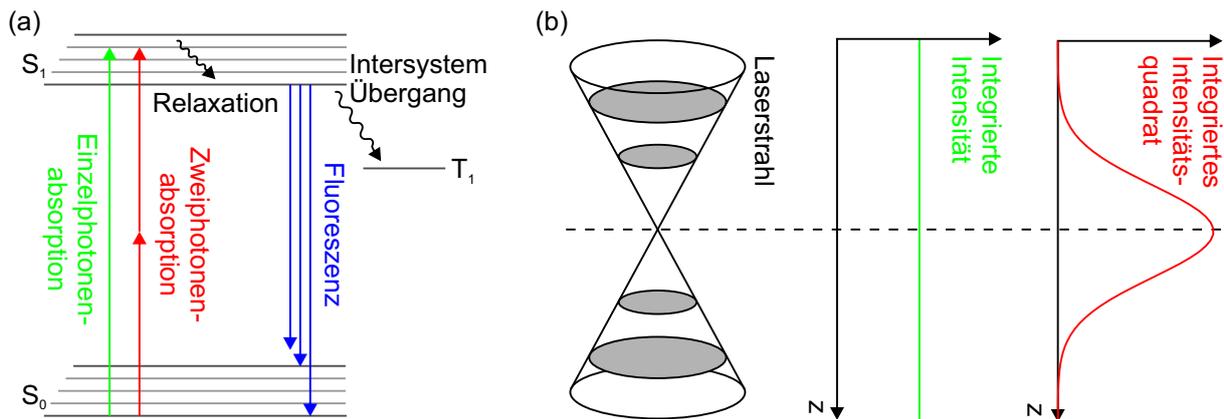


Abbildung 3.1: (a) Vereinfachtes Termschema eines typischen Fotoinitiators mit für die Fotoaktivierung wichtigen Zuständen und Übergängen: Der Fotoinitiator wird durch Absorption von einem bzw. zwei Photonen des jeweils passenden Wellenlängenbereichs angeregt und geht von dort mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Tripletzustand (T_1) über. Dort zerfällt er dann und startet die Reaktionskette. (b) Veranschaulichung des dreidimensionalen Schreibens durch Zweiphotonenabsorption. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung des Fotoinitiators ist bei Einphotonenabsorption proportional zur Intensität und bei Zweiphotonenabsorption proportional zum Intensitätsquadrat. Integration der Absorption über die gesamte x - y -Ebene (entspricht der Belichtung einer Ebene) führt für die betrachteten Fälle zu den dargestellten Kurven. Abbildung nach [104] und [105].

der Absorption führen bei Integration über die x - y -Ebene zu einer Geraden oberhalb der Nulllinie bzw. einer Glockenkurve, die ober und unterhalb der Fokusposition auf Null abfällt. In das Experiment übertragen heißt dies, dass ein Abrastern einer Ebene im Fall von Einphotonenabsorption zu einer Belichtung eines ganzen Blocks, im Fall der Zweiphotonenabsorption zur Belichtung einer dünnen Ebene führt. Auch dieser Effekt ist nötig, um freistehende dreidimensionale Strukturen fertigen zu können. Andernfalls würde man durch das Abfahren einiger Linien im Volumen durch Mehrfachbelichtung auch in Bereichen oberhalb und unterhalb des fokalen Volumens eventuell Veränderungen des Lackes hervorrufen, die die Dreidimensionalität der resultierenden Strukturen verhindern könnten [106].

Zur Herstellung freistehender dreidimensionaler Mikrostrukturen wird also ein Fotolack auf ein Substrat (in der Regel ein Deckglas) aufgebracht. Dieser Lack wird mit einem stark fokussierten Laser mit einer Wellenlänge belichtet, die Zweiphotonenabsorption im Lack ermöglicht. Die belichteten Stellen werden dadurch je nach Art des Lackes entweder löslich oder unlöslich für ein geeignetes Lösungsmittel. Durch einen Entwicklungsschritt in eben diesem Lösungsmittel wird nun die erzielte 3D-Struktur freigelegt.

3.1.1 Nanoscribe Photonic Professional

Das DLW wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Systems Photonic Professional der Firma Nanoscribe durchgeführt. Der Schreiblaser in diesem System ist ein frequenzverdoppelter gepulster Faserlaser (C-Fiber 780, Menlo Systems). Er hat eine mittlere Wellenlänge von $\lambda = 780 \text{ nm}$ mit einer Pulslänge von $T = 120 \text{ fs}$ und einer Repetitionsrate von $f_{\text{rep}} = 100 \text{ MHz}$. Der Laserstrahl wird durch einen akustooptischen Modulator geführt. Akustooptische Modulatoren beugen Laserlicht an einem optischen Gitter, das von einer durch einen Kristall propagierenden Schallwelle erzeugt wird. Über die Intensität dieser Welle kann bestimmt werden, welcher Anteil des Lichts in die erste Beugungsordnung gebeugt wird. Wird nun die nullte Ordnung geblockt und nur die erste Ordnung zum Schreiben verwendet, so kann auf diese Weise schnell und präzise die Intensität des Laserstrahls eingestellt werden.

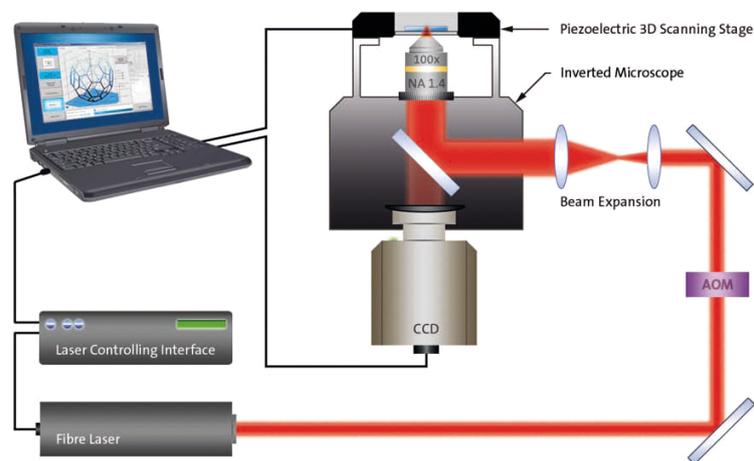


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Nanoscribe Photonic Professional (nach [107]).

Um die Lichtintensität beim Schreiben zu überwachen, ist hinter einem Strahlteiler, der fast das gesamte Licht reflektiert, eine Fotodiode angebracht. Um einen möglichst guten Fokus zu erhalten, muss die gesamte Rückapertur des Objektivs möglichst homogen ausgeleuchtet werden. Daher wird mittels zweier Linien der Strahl auf einen Durchmesser aufgeweitet, der sicher größer als diese Apertur ist. Der Strahl wird nun in ein inverses Mikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1) eingekoppelt und mit einem Objektiv mit sehr hoher numerischer Apertur (Zeiss Plan-Apochromat 100 \times 1,4 Oil DIC M27) fokussiert. Vor dem Objektiv beträgt die mittlere Laserleistung maximal 30 mW, typische Schreibleistungen liegen für die hier verwendeten Lacke und Strukturen im Bereich von 10 bis 20 mW.

Bei diesem Gerät können bis zu zehn Deckgläser in einen Probenhalter eingeklebt werden. Die Proben werden dann mit Hilfe eines 3D-Piezotisches gegen den Fokus verschoben (Physik Instrumente P-563.3CD, 300 \times 300 \times 300 μm^3). Hierbei ist die maximale Strukturhöhe durch den Arbeitsabstand des Objektivs auf 170 μm begrenzt. Darüber hinaus verliert man durch tiefes Fokussieren in den Lack Intensität und Auflösung

durch optische Aberrationen aufgrund des Brechungsindexunterschieds zwischen Lack und Immersionsöl. Dies führt dazu, dass qualitativ gute Strukturen wesentlich über 30 μm Höhe nicht umsetzbar sind.

Um Flächen größer als $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ (Piezo-Verfahrensbereich) zu beschreiben und um mehrere Deckgläser direkt hintereinander prozessieren zu können ist der Piezo an einer motorisierten Bühne (Märzhäuser Wetzlar SCAN IM 120×100) befestigt. Ein hoher Grad an Automatisierung wird über einen Autofokus (Zeiss *definite focus*) erreicht. Hierbei wird die Reflexion eines schräg in der Bildebene stehenden Gitters auf eine Reihe von Dioden abgebildet. Ist das Bild dieser Reflexion an der richtigen Position auf der Diodenreihe scharf, so befindet sich eine Grenzfläche im Fokus. Durch eine Abweichung des Schärfebereichs von der optimalen Position kann geschlossen werden, ob die Grenzfläche über oder unter der Fokusebene des Objektivs liegt.

3.2 Fotolacke

Alle Fotolacke, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind sogenannte Negativlacke. Dies bedeutet, dass der belichtete Teil des Lackes nach dem Entwicklungsprozess stehen bleibt und der unbelichtete Teil weggespült wird. Der Begriff Negativlack ist hier etwas kontraintuitiv. Das liegt daran, dass der Begriff aus der UV Belichtung mit Masken kommt, die z. B. mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellt werden. Bei einem Negativlack muss die Maske das Negativ der gewünschten Geometrie sein. Ein sehr bekannter Negativlack ist SU-8, der in der Mikrosystemtechnik weit verbreitet ist [108]. SU-8 ist nicht toxisch für Zellen [109] und wurde auch für zellbiologische Experimente verwendet [110], ist allerdings in der Anwendung recht aufwendig, da er aufgeschleudert werden muss und Aushärteschritte unter Hitzeeinwirkung (z. B. um nach dem Aufschleudern das Lösungsmittel zu verdampfen) benötigt um zuverlässig zu funktionieren. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Flüssiglacke verwendet, die wesentlich einfacher in der Anwendung sind, da sie nur auf das Substrat aufgetropft werden müssen. Hinzu kommt, dass SU-8 eine starke Autofluoreszenz hat, die ihn in der Fluoreszenzmikroskopie nahezu unbrauchbar macht [111].

Des Weiteren beruhen alle verwendeten Lacke auf radikalischer Polymerisation [112] (Siehe Abbildung 3.3 für eine schematische Darstellung): Bei Beleuchtung mit Licht der geeigneten Wellenlänge wird ein Fotoinitiator aktiviert und zerfällt in zwei Radikale. Diese binden anschließend an die reaktiven Gruppen der Monomere, oft Doppelbindungen zwischen zwei Kohlenstoffatomen, die daraufhin selbst zu Radikalen werden. In dieser Arbeit werden ausschließlich Monomere verwendet, die über ein Acrylsäureester als reaktive Gruppe verfügen. Grundsätzlich sind aber auch andere Gruppen möglich. An diese Primärradikale lagern sich nun immer mehr Monomere an und eine Kette entsteht. Falls das Monomer über mehr als eine reaktive Gruppe verfügt, so kann es auch zu Verzweigungen innerhalb der Ketten kommen und es entstehen kreuzvernetzte Polymere, die aufgrund der Vernetzung oft eine größere Steifigkeit aufweisen, als rein kettenförmige

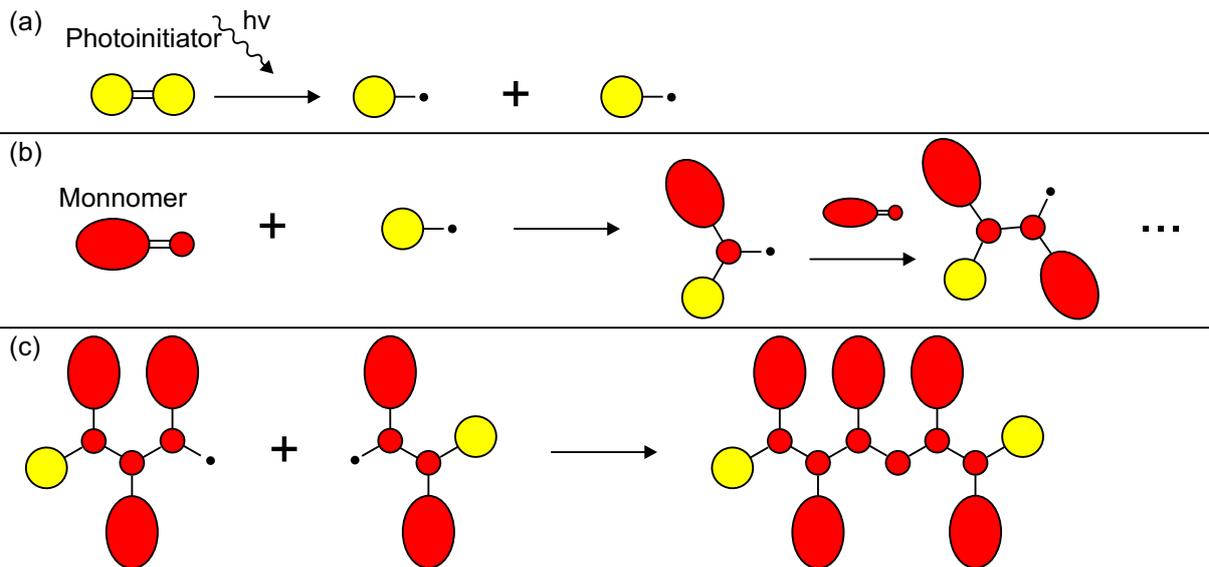


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Reaktionen, die bei radikalischer Polymerisation stattfinden: (a) Unter Lichteinstrahlung bricht der Fotoinitiator in zwei Radikale auf. (b) Kettenreaktion, bei der immer weitere Monomere angelagert werden. (c) Typische Abbruchreaktion, bei der sich zwei Polymerketten treffen und kombinieren.

Polymere. Darüber hinaus sind sie in Lösungsmitteln unlöslich während lineare Polymere teilweise löslich sind (z. B. PMMA¹).

Je weniger Monomere noch vorhanden sind und je höher der Anteil an Ketten ist, umso wahrscheinlicher wird es, dass zwei radikalische Polymerketten aufeinandertreffen. Diese reagieren ohne ein neues Radikal zu bilden und stoppen somit die Reaktion. Die Reaktion ist hierbei entweder eine Bindung der beiden Ketten zu einer langen Kette (Abbildung 3.3 (c)) oder Disproportionierung. Hierbei wird durch eine Redoxreaktion bei beiden beteiligten Radikalen die offene Bildungsstelle geschlossen, ohne dass die Ketten zu einem Molekül reagieren. Von diesen Abbruchreaktionen abgesehen enthalten Monomere beim Kauf immer auch einen Anteil an Radikalfängern, die verhindern, dass die Monomere spontan polymerisieren. Diese Radikalfänger spielen natürlich auch bei der gewollten Reaktion beim direkten Laserschreiben eine Rolle und unterdrücken diese bis zu einem gewissen Grad. Des Weiteren ist auch der Sauerstoff, der aus der Umgebungsluft in den Fotolack gelangt, ein Radikalfänger und zu einem gewissen Anteil immer im Lack enthalten [114].

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen zwei Fotolacke verwendet, deren Eigenschaften und Zusammensetzung im Folgenden beschrieben wird.

¹PMMA (Polymethylmethacrylat, Plexiglas[®]) ist ein Polymer, das unter anderem in der Elektronenstrahlolithographie verwendet wird [113].

3.2.1 Ormocomp

Ormocomp ist ein Polymer aus der Familie der Ormocere [115]. Diese wurden am Fraunhofer Institut für Materialforschung entwickelt und sollen die Eigenschaften verschiedener Materialien (Silikongummi, Kunststoff und Glas, siehe Abbildung 3.4) zusammenbringen. Dies wird durch den Namen angedeutet, der ein Akronym für **OR**ganically **MO**dified **CER**amics ist. Grundsätzlich sollen alle Ormocere optisch transparent, duroplastisch verarbeitbar und nichtkristallin sein. Die weiteren Eigenschaften sind über die genaue Zusammensetzung der Monomere steuerbar. Anwendung fanden sie zuerst in der UV-Strukturierung optischer Komponenten [116]. Auch stellte sich heraus, dass Ormocomp geeignet für 3D-Strukturierung mittels Zweiphotonenabsorption ist, und dass das hierbei entstehende Polymer nicht Zytotoxisch ist, sich also Zellen darauf züchten lassen [54]. In dieser Veröffentlichung [54] steht, dass Ormocomp mit Hilfe des Fotoinitiators Irgacure 369 polymerisiert wird, auf den im nächsten Abschnitt noch eingegangen wird. Allerdings wird mittlerweile die genaue Zusammensetzung von Ormocomp geheim gehalten und es ist gut möglich, dass inzwischen ein anderer Fotoinitiator verwendet wird.

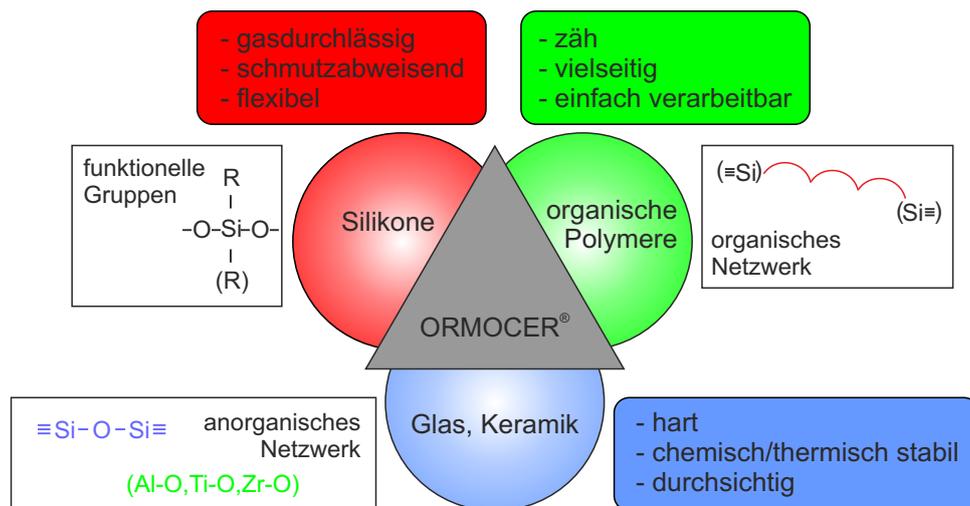


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Ormocere (nach [115]).

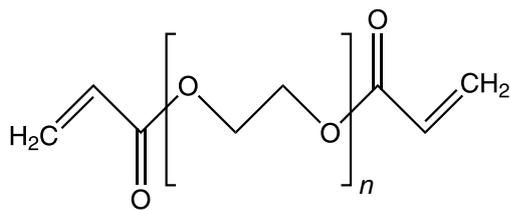
Der Brechungsindex von nicht polymerisiertem Ormocomp ist $n_{\text{Ormocomp}} = 1,518$. Damit liegt er sehr nah an dem der Deckgläser ($n_{\text{Deckglas}} = 1,5230$), was zu Beginn dieser Arbeit zu Problemen mit dem Autofokus des Nanoscribe Photonic Professional geführt hat. Diese Probleme konnten umgangen werden indem die Deckgläser mit einer dünnen Schicht Aluminiumoxid (Brechungsindex $n_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 1,77$) beschichtet wurden. Später war diese Beschichtung wegen einer Verbesserung der Software des Autofokus nicht mehr nötig. Der geringe Brechungsindexunterschied zwischen Lack und Glas hat allerdings den Vorteil, dass mit wenig Verlust in der Strukturqualität zu rechnen ist, wenn man tief in den Lack fokussiert.

Des Weiteren konnte in unserer Gruppe vor einiger Zeit gezeigt werden, dass Ormocomp eine gewisse Flexibilität aufweist, die es Herzzellen ermöglicht, dünne Strukturen aus Ormocomp zu verbiegen [7]. Der Elastizitätsmodul von diesem mit Zweiphotonenabsorption gewonnenem Polymer wurde hier auf etwa 800 MPa bestimmt.

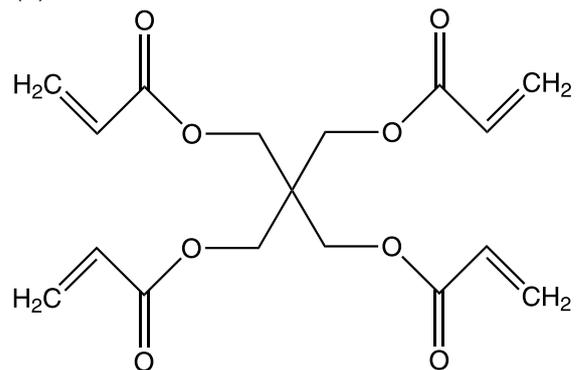
3.2.2 Passivierender Fotolack auf Basis von PEG-DA

Der im Folgenden beschriebene Fotolack wurde von Benjamin Richter während seiner Diplomarbeit entwickelt [6]. Das Ziel war, in drei Dimensionen zu steuern, wo Zellen adhären und wo nicht. Da ein Lack mit adhären Eigenschaften mit beispielsweise Ormocomp schon vorhanden war, wurde ein Lack entwickelt, der passivierend für Proteinadsorption und Zelladhäsion wirkt. Da Polyethylenglycol (PEG) erwiesenermaßen aufgrund seiner extremen Hydrophilie passivierend sowohl auf Proteine [117] als auch auf Zellen [118] wirkt, wurde es als Grundbestandteil für diesen Lack verwendet.

(a) PEG-DA



(b) PETTA



(c) Irgacure 369

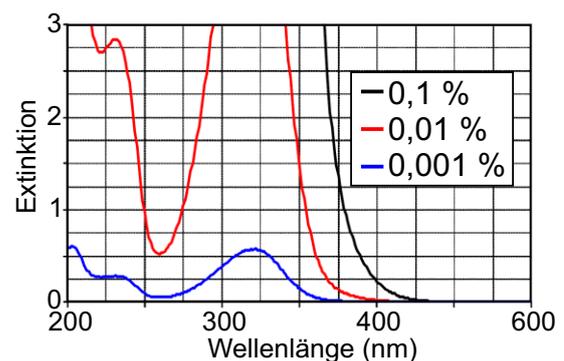
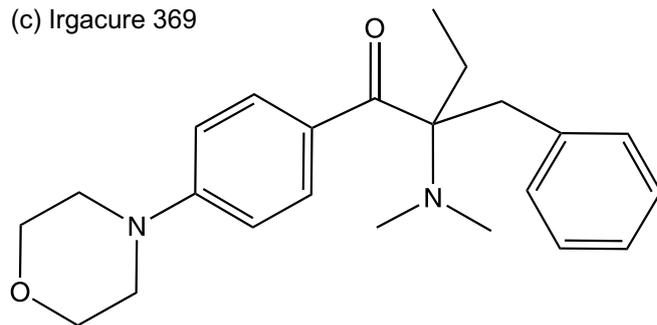


Abbildung 3.5: Die Bestandteile des passivierenden Fotolacks PDL: (a) Polyethylenglycol-Diacrylat (PEG-DA), (b) Pentaerythritol-Tetraacrylat (PETTA) und (c) Irgacure 369. Beim Fotoinitiator ist zusätzlich zur chemischen Struktur auch das Extinktionsspektrum gezeigt [119].

Um einen Fotolack zu erhalten, wurde ein PEG-Diacrylat (PEG-DA) gewählt (Abbildung 3.5(a)): Es lässt sich mit UV-Lithographie unter Zuhilfenahme eines

geeigneten Fotoinitiators polymerisieren [120]. Als Fotoinitiator wurde Irgacure 369 in einer Konzentration von 3% w/w² gewählt (Abbildung 3.5(c)). Dieser hat sich als sehr geeignet für die 3D-Laserlithographie herausgestellt. Der Vergleich mehrerer PEG-DAs mit verschiedenen Kettenlängen zeigt, dass für den in Zellexperimenten relevanten Größenbereich der Struktur ein PEG-DA mit einer molaren Masse von $M_{\text{PEG-DA}} = 575 \text{ g/mol}$ gut geeignet ist: Das Auflösungsvermögen des resultierenden Lacks ist in einem Größenbereich, der sich für die Herstellung von Strukturen mit charakteristischen Merkmalen von wenigen μm Größe eignet. $M_{\text{PEG-DA}} = 575 \text{ g/mol}$ entspricht etwa einer Kettenlänge von $n = 8$ in Abbildung 3.5(a).

Um eine ausreichende Stabilität der 3D-Strukturen zu gewährleisten, wurde dem Lack zusätzlich Pentaerythritol-Tetraacrylat (PETTA) in einer Konzentration von 4,8% w/w beigemischt [120]. Da PETTA ein recht kleines Molekül mit vier Acrylat-Gruppen ist, lässt sich damit die Quervernetzung und somit die Steifigkeit des Polymers erhöhen. Diese Rezeptur ermöglicht eine hohe Strukturqualität bei gleichzeitig ausgeprägter Passivierung. Dies ist nicht selbstverständlich, da PETTA selbst nicht passivierend wirkt. Zugabe von PETTA in höheren Konzentrationen führt dementsprechend auch zu Verlusten in den passivierenden Eigenschaften des Lacks [6].

Der Elastizitätsmodul dieses Lacks wurde auf etwa 200 MPa bestimmt. Es liegt damit zwar deutlich unter dem von Ormocomp, ist aber in derselben Größenordnung. Dieser Unterschied in den mechanischen Eigenschaften lässt sich beim Design von Strukturen ausnutzen (siehe Kapitel 4.2). Allerdings kann die geringere Steifigkeit des Lacks auch zu Problemen mit der Stabilität von Strukturen führen, die zu großen Teilen aus selbigem bestehen. Um auf diesen Lack einfach referenzieren zu können, wird er im weiteren Verlauf dieser Arbeit als PDL (**PEG-DA-Lack**) bezeichnet.

3.3 Vorbereitung der Substrate

Die Substrate, auf die die 3D-Strukturen aufgebracht werden, sind Deckgläser der Stärke $170 \pm 5 \mu\text{m}$. Abgesehen von der Reinigung der Deckgläser, die für optimale optische Eigenschaften nötig ist, hat sich herausgestellt, dass die Haftung von PDL an reinen Glassubstraten nicht ausreichend ist. Insbesondere in der Zellkultur, wo sich die Proben längere Zeit (einige Stunden bis Tage) in wässriger Lösung befinden, stellt dies ein Problem dar. Wegen der großen Hydrophilität des Materials schwillt PDL in Wasser an und die schwache elektrostatische Haftung am Substrat reicht nicht mehr aus. Dieses Problem lässt sich durch die Funktionalisierung der Deckgläser mit einem Silan beheben, das über Gruppen verfügt, die sich bei der Polymerisation des Fotolackes in das Polymer einbinden. Das Silan [121], das in unserer Gruppe für diesen Zweck etabliert wurde, ist das 3-(Trimethoxysilyl)propyl-Methacrylat (Abbildung 3.6(a)). Die drei Methoxy-Gruppen, die sich an dem Silizium-Atom des Silans befinden, binden unter Einfluss von Wasser an

²Gewichtsprozent

oxidiertes Glas. Die am anderen Ende des Moleküls befindliche Methacrylat-Gruppe wird bei der Polymerisation in das Polymer eingebunden.

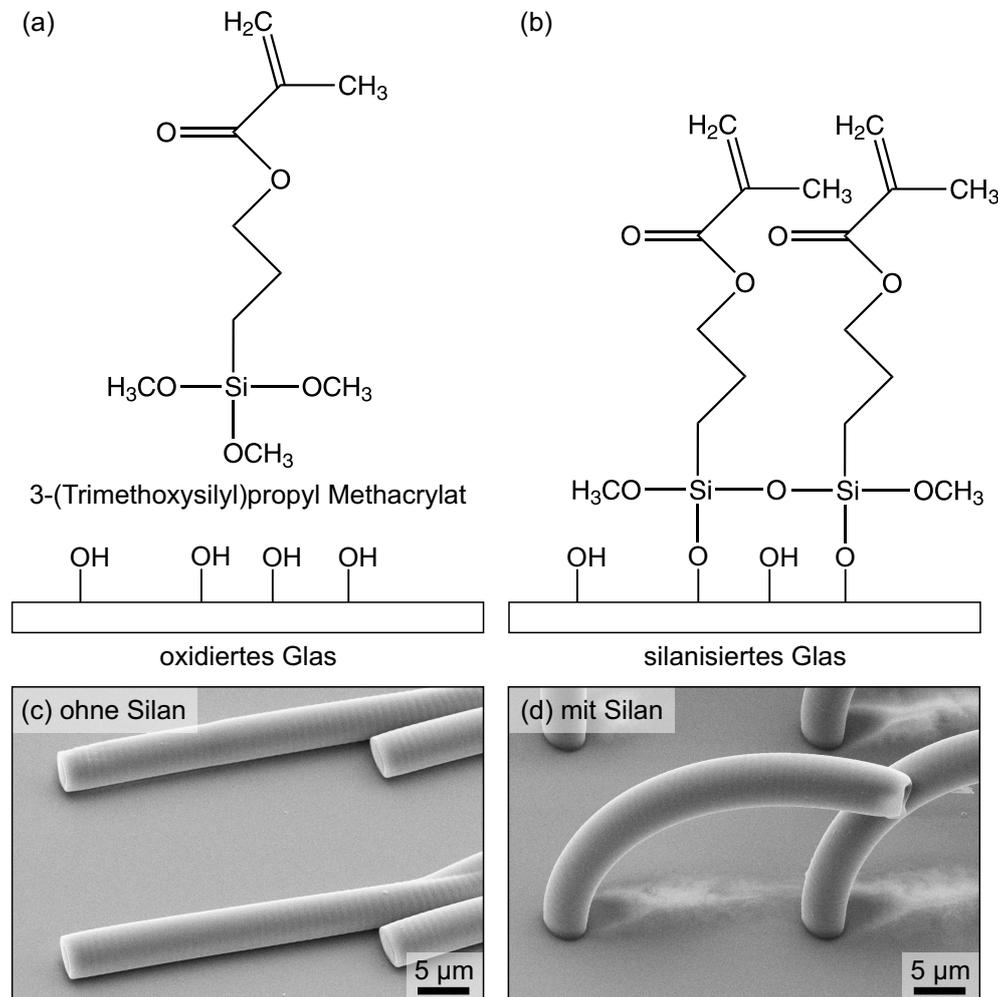


Abbildung 3.6: (a) 3-(Trimethoxysilyl)propyl-Methacrylat bindet kovalent unter Einfluss von Wasser an eine oxidierte Glasoberfläche. Das silanierte Glas (b) verfügt nun über Methacrylat-Gruppen und kann kovalent an das beim direkten Laserschreiben entstehende Polymer binden. (c) und (d) zeigen anschaulich den Effekt der Silanisierung. Ohne Silan (c) lösen sich durch einen starken Gasstrom mit DLW geschriebene Säulen vom Deckglas. Mit Silan (d) bleiben sie haften. (c) und (d) wurden freundlicherweise von Benjamin Richter zur Verfügung gestellt.

Zur Silanisierung werden Deckgläser mit in Isopropanol getränkten Tüchern mechanisch gereinigt und mit Stickstoff staubfrei geblasen. Dann werden sie in einem Plasmaätzer 10 Minuten einem Argonplasma ausgesetzt, um OH-Gruppen an der Glasoberfläche zu erzeugen. Unmittelbar danach werden sie mit einer Lösung von 1 mMol 3-(Trimethoxysilyl)propyl-Methacrylat in Toluol für eine Stunde bedeckt. Durch anschließendes Spülen in Wasser findet die Reaktion der an die Oberfläche voradhärierten Silanmoleküle statt. Da die Deckgläser durch die Silanisierung extrem hydrophob werden,

3 Methoden

ist ein Trockenblasen mit Stickstoff in den meisten Fällen nicht nötig, sondern die Substrate sind nach dem Herausziehen aus dem Wasserbad bereits nahezu Wasserfrei.

Die Wirksamkeit dieser Methode lässt sich durch ein einfaches Experiment anschaulich belegen: Es werden sowohl auf ein nicht silanisiertes als auch auf ein silanisiertes Deckglas etwa $50\ \mu\text{m}$ hohe und $3\ \mu\text{m}$ dicke Säulen geschrieben. Nach dem Entwickeln wird mit hohem Druck Stickstoff am Deckglas entlang geblasen. Die Säulen kippen hierdurch um. Schaut man sich die Strukturen anschließend unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) an, so stellt man fest, dass sich ohne Silan die Säulen vom Deckglas lösen (Abbildung 3.6(c)). Mit Silan ist die Haftung so groß, dass die Verbindung zwischen Deckglas und Säule trotz der starken Verbiegung durch den Gasstrom erhalten bleibt (Abbildung 3.6(d)). Das Experiment wurde von Benjamin Richter durchgeführt und er hat die Bilder in Abbildung 3.6(c) und (d) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.4 Kombination von zwei Fotolacken zur Steuerung des Zellwachstums

Wie zuvor in Kapitel 3.2 beschrieben, stehen zwei Fotolacke zu Verfügung, die bezüglich der Zelladhäsion grundsätzlich andere Eigenschaften aufweisen. Wie lassen sich diese beiden Lacke nun gemeinsam nutzen, um die Adhäsion von Zellen in drei Dimensionen gezielt zu steuern? Hierzu müssen diese zwei verschiedenen Lacke in einer einzigen Struktur kombiniert werden. Es wird dabei zunächst eine Struktur aus einem ersten Lack hergestellt und anschließend um Elemente aus einem weiteren Lack erweitert. Dabei ist es grundsätzlich egal, ob man ein nicht adhäsives Gerüst aus PDL herstellt und anschließend um adhäsive Elemente aus Ormocomp erweitert, oder ob man von einer vollkommen adhäsiven Ormocomp-Struktur ausgehend Teile dieser Struktur für die Zellen „verbirgt“, indem man sie mit PDL bedeckt. Beide Varianten haben Vor- und Nachteile und wurden im Zuge dieser Arbeit angewandt. Im Folgenden wird zunächst beschrieben, wie sich Mikrostrukturen aus zwei Lacken herstellen lassen. Anschließend werden exemplarisch einige Strukturen gezeigt, die im Verlauf dieser Arbeit hergestellt wurden.

3.4.1 Herstellungsprozess für Mikrostrukturen aus zwei Lacken

Zur Herstellung einer Mikrostruktur (Abbildung 3.7) aus zwei Fotolacken werden wie oben erwähnt zunächst mit dem ersten Lack Strukturen geschrieben. Da die Anzahl an Strukturen, die in dem durch den Verfahrenweg des Piezos beschränkten Schreibfeld von $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ Größe Platz finden, für Zellexperimente nicht ausreichend ist, werden immer mehrere dieser Felder nebeneinander beschrieben. Dies geschieht durch Verfahren der motorisierten Bühne. Zusätzlich werden mittels DLW neben den Strukturen Markierungen an der Substratoberfläche angebracht. Diese Markierungen befinden sich in jedem beschriebenen Schreibfeld an der gleichen Stelle, um eine Position mit definierten Koordinaten zu markieren. Als Markierung wurde ein Kreuz auf dem Deckglas an der Position ($x = 10 \mu\text{m}$, $y = 10 \mu\text{m}$, $z = 10 \mu\text{m}$) gewählt, also am Rand des Schreibfelds wo es wenig stört.

Wenn nun die erste Struktur geschrieben wurde, muss man den nicht polymerisierten Lack mit Hilfe eines Lösungsmittels entfernen. Da man auf die Strukturen später mit einem zweiten Lack schreiben möchte, bietet es sich an, die Deckgläser zum Entwickeln nicht aus dem Halter zu entfernen. Würde man dies tun, so müsste man die Deckgläser anschließend für das Schreiben in den zweiten Lack erneut in den Halter einkleben, was sich nicht ohne eine Verdrehung der Deckgläser bewerkstelligen lässt. Lässt man die Probe dagegen bei der Entwicklung im Halter, bleibt die Orientierung der Strukturen relativ zu den Koordinatenachsen des Nanoscribe-Systems erhalten.

Ist der erste Lack entfernt, so wird der zweite Lack auf die bestehende Struktur aufgetropft und der Probenhalter wieder in das Gerät geschoben. Nun wird die bereits geschriebene

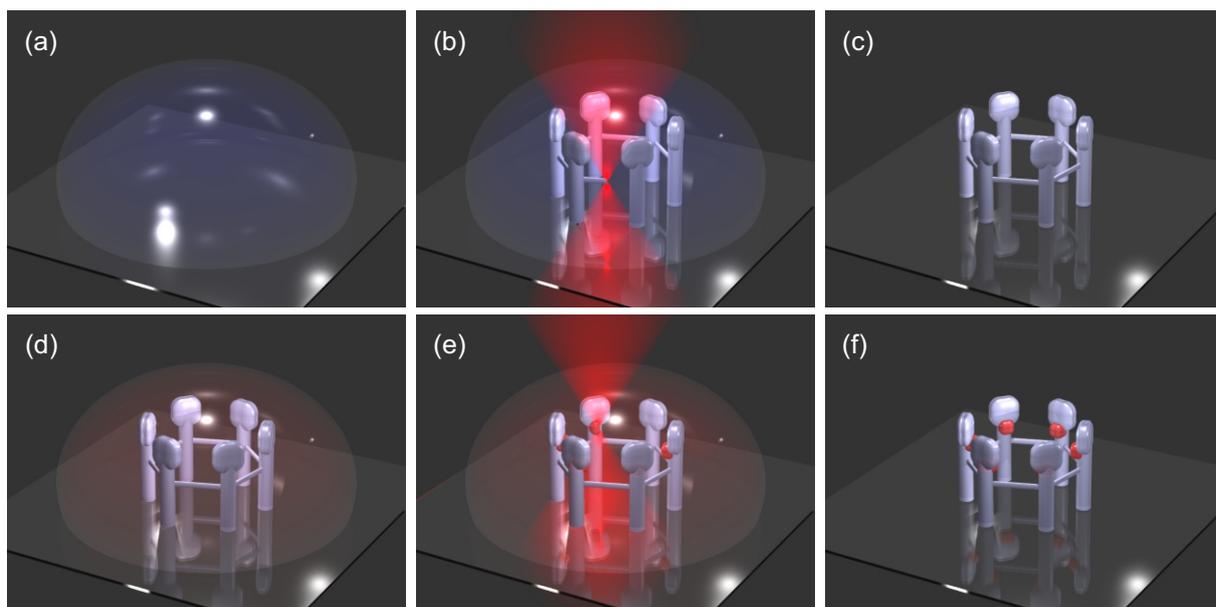


Abbildung 3.7: Schematischer Herstellungsprozess von Mikrostrukturen aus zwei Fotolacken mittels DLW: Der erste Lack wird aufgetropft (a), beschrieben (b) und entwickelt (c). Anschließend wird der zweite Lack aufgetropft (d), nach dem Ausrichten der bereits vorhandenen Struktur zur Position des Laserfokus beschrieben (e) und entwickelt (f).

Struktur angefahren und der Piezo auf die Position ($x = 10 \mu\text{m}$, $y = 10 \mu\text{m}$, $z = 10 \mu\text{m}$) eingestellt. Wenn man nun die Mitte der mit dem ersten Lack geschriebenen Markierung an die Position bringt, an die der Laser fokussiert wird, so decken sich die Positionen des zweiten Lackes mit denen des ersten Lackes. Die Position des Lasers kann man zuvor durch vorsichtiges Erhöhen der Laserleistung an einer Position neben den Strukturen an der Grenzfläche zwischen Lack und Deckglas bestimmen. Man sieht dann den Fokus als hellen Punkt auf dem Bild der Kamera des Nanoscribe-Systems. Diese Position lässt sich dann für die folgenden Schritte auf dem Bildschirm markieren.

Da nun das Koordinatensystem des ersten Lithographieschrittes wiederhergestellt ist, kann der zweite Lack belichtet werden. Da die Wiederholgenauigkeit der Piezobühne im Bereich weniger Nanometer liegt, können nach der manuellen Positionierung einer Markierung Strukturen über den kompletten Piezoverfahrbereich mit dem zweiten Fotolack dekoriert werden. Da die Wiederholgenauigkeit der Märzhäuserbühne dagegen wesentlich schlechter ist ($< 1 \mu\text{m}$), müssen die Markierungen nach Verfahren dieser Bühne jeweils neu angefahren werden.

3.4.2 Beispiele für Strukturen aus zwei Fotolacken

Wie bereits erwähnt, spielt es für die Herstellung der Mikrostrukturen keine Rolle, welcher Lack zuerst geschrieben wird. Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass es für das Ausrichten der Markierung angenehmer ist, wenn der zweite Lack PDL ist, da hier der Brechungsindex-Kontrast zwischen hochbrechendem polymerisiertem Ormocomp-Marker und niedrigbrechendem nicht polymerisiertem PDL größer ist als im umgekehrten Fall. Es kann sich aus mechanischen Gesichtspunkten als geschickter herausstellen, wenn das Gerüst aus dem einen oder anderen Lack besteht (Ormocomp ist härter als PDL). Ein wichtiger Faktor ist aber auch die Schreibzeit: Das Schreiben in den ersten Lack auf großen Flächen läuft voll automatisiert ab und somit können mehrere Deckgläser beispielsweise über Nacht beschrieben werden. Beim zweiten Lack muss hingegen wie oben geschildert jedes Feld neu und von Hand angefahren werden. Daher ist es zeitsparender im zweiten Schritt möglichst wenig Material aufzubringen.

In Abbildung 3.8 sind drei Beispiele für Strukturen gezeigt, wie sie im Laufe dieser Arbeit hergestellt wurden. In der ersten Zeile ist eine Struktur dargestellt, die für den Mikromanipulator entworfen wurde (siehe auch Kapitel 6.1). Die hohen Säulen (a) sollen keine Angriffsfläche für die Zellen bieten, sondern mit der Nadel des Mikromanipulators verformbar sein. Daher ist das weiche PDL hier die richtige Wahl. Im zweiten Schritt (b) wurden dann Würfel aus Ormocomp hinzugefügt, die eine gezielte Adhäsion der Zellen ermöglichen (c).

Die unteren beiden Zeilen in Abbildung 3.8 zeigen Strukturen, bei der eine andere Reihenfolge der Herstellung gewählt wurde. Aus Experimenten an 2D-Geometrien, die als Proteinverteilungen auf ansonsten nicht adhäsiven Substraten realisiert wurden, ist bekannt, dass diese Geometrien einen großen Einfluss auf die in ihnen wachsenden Zellen haben. Dieser Einfluss äußert sich in der intrazellulären Organisation, aber auch in der Zellteilungsachse der Zellen [34, 35, 122]. Im direkten Vergleich hierzu wurden in einer Kooperation 3D-Mikrostrukturen mit verschiedenen Geometrien hergestellt und das Zellverhalten in diesen Strukturen untersucht [123]. Die biologischen Versuche dieser Studie wurden von Mona Jaggy in ihrer Masterarbeit an NIH/3T3-Zellen³ durchgeführt. Hier kam es darauf an, eine bestimmte Geometrie als sehr stabile Struktur herzustellen. Daher wurde die gesamte Struktur aus Ormocomp hergestellt und anschließend wurden die tragenden Säulen mit PDL umhüllt. Ein umgekehrtes Vorgehen wäre hier möglich gewesen (Säulen aus PDL und anschließend Balken aus Ormocomp), allerdings wäre in diesem Fall der Zeitaufwand wesentlich höher gewesen: Die Balken wurden aus vielen kleinen Ellipsen aufgebaut, was wesentlich länger dauert als das Umhüllen der Säulen mit PDL. Auch hier funktioniert die selektive Adhäsion problemlos. Eine weitere Struktur aus der gleichen Studie mit anderer Geometrie ist in Abbildung 3.8 (g)-(i) gezeigt.

³NIH/3T3 ist eine Zelllinie aus embryonalen Mausfibroblasten

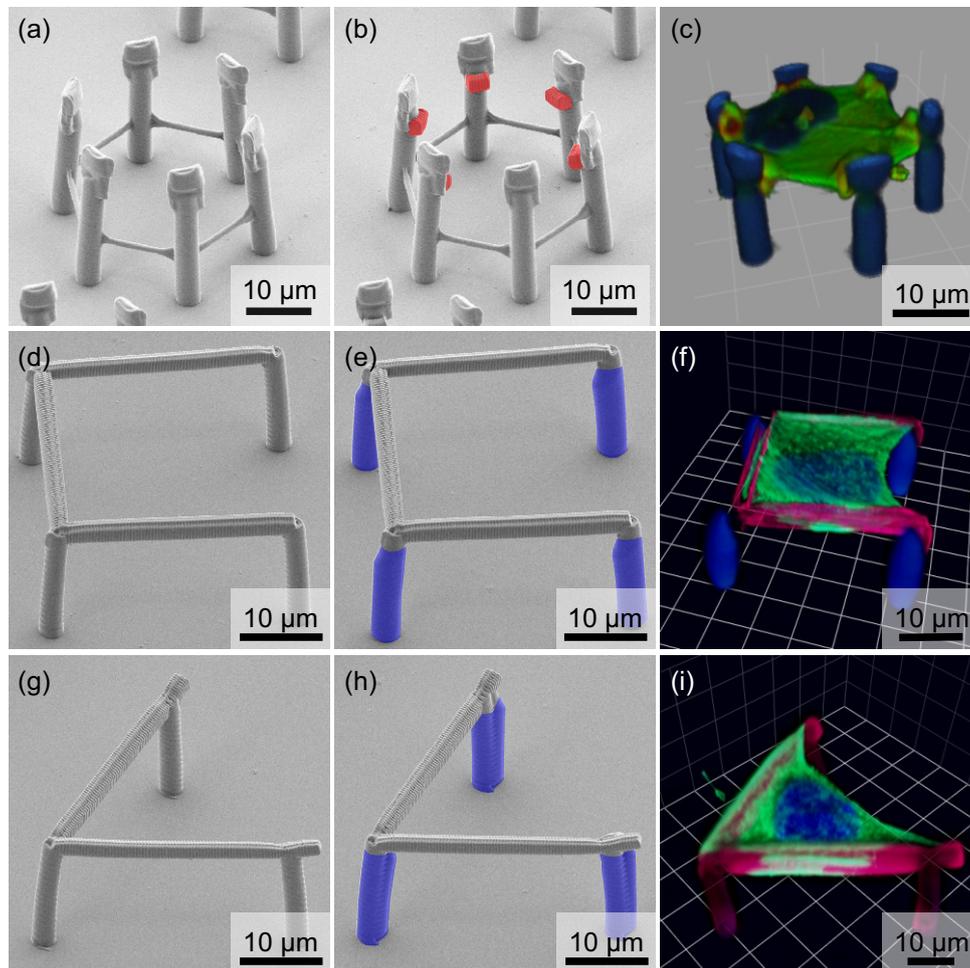


Abbildung 3.8: (a) PDL-Rohling einer Strukturdesigns, das zur Mikromanipulation von primären Hühnerfibroblasten entwickelt wurde. (b) Fertige Mikrostruktur mit Würfeln aus Ormocomp (in rot eingefärbt). (c) Solch eine Struktur mit primärem Hühnerfibroblasten, der nur an den sechs Ormocomp-Würfeln Kontakte ausbildet (3D-Rekonstruktion eines mit dem LSM aufgenommenen Bilderstapels, Kapitel 3.8). (d) Rohling aus Ormocomp, der entwickelt wurde um den Einfluss der Geometrie auf das Zellverhalten zu untersuchen. (e) Fertige Struktur, bei der die Säulen mit PDL (blau eingefärbt) umhüllt wurden um dort Adhäsionen zu vermeiden. (f) Eine NIH/3T3-Zelle in solch einer Struktur. Die Zelle bildet nur Kontakte an den nicht umhüllten Ormocomp Balken aus. (g)–(i) sind analog zu (d)–(f), nur wurde hier eine andere Geometrie realisiert.

3.5 Direktes Laserschreiben auf mikroporösen Membranen

Zellen müssen *in vivo* zur Migration durch den Körper oft ihren Zellkörper und auch ihren Zellkern verformen, um durch kleine Poren in der EZM zu passen. Ein häufiger Auslöser für diese Migration sind chemische Signale. Um genauer zu untersuchen, wie gut verschiedene Zelltypen in verschiedenen kleinen Poren einwandern können, wurden in einer Kooperation mit Maria Jäckel 3D-Strukturen mit verschiedenen großen Poren (2–10 μm Seitenlänge) auf mikroporösen Membranen (Porendurchmesser 3 μm) hergestellt. Diese Membranen erlauben über Diffusion durch sie hindurch, einen chemischen Gradienten entlang der Struktur anzulegen [60].

Das DLW auf diffusen und weichen Materialien, wie der hier verwendeten mikroporösen Membran, ist nicht ohne weiteres möglich. Hierfür gibt es drei Gründe: Zum einen kann man nicht durch diese Membran hindurch fokussieren, da die vielen Poren, die sie durchziehen, durch Streuung den Fokus zerstören. Auch kann man wegen der Porosität der Membran nicht auf eine Seite Lack und auf die andere Immersionsöl aufbringen, ohne dass diese sich vermischen. Darüber hinaus ist die Membran mechanisch nicht stabil, sondern eine Folie, die sich leicht verbiegen lässt. Daher muss sie beim Schreibprozess mechanisch unterstützt werden.

Um die genannten Probleme zu umgehen, wurde für den DLW-Schritt eine spezielle Konfiguration benutzt (Abbildung 3.9(a)). Hierzu wurde die Membran mit dem Lack zwischen zwei Deckgläser gelegt und dieser Stapel mit einem Kleber (Fixogum von Marabu) versiegelt. Die Struktur wird dann durch das untere Deckglas hindurch an die untere Seite der Membran geschrieben. Beim Aufbau dieser Konfiguration muss darauf geachtet werden, dass der Abstand zwischen dem unteren Deckglas und der Membran groß genug ist, dass die Struktur dazwischen Platz findet. Andernfalls würde man bei dem Schreibprozess die Struktur auch an das untere Deckglas schreiben. Beim Lösen der Membran von diesem Deckglas würde die Struktur zerstört. Des Weiteren darf der Abstand nicht zu groß sein, da der Arbeitsabstand des Objektivs auf 170 μm beschränkt ist. Auch muss die Membran möglichst glatt und ohne Verkippung zwischen den Deckgläsern liegen, da eine Korrektur der Verkippung hier nicht möglich ist. Der Grund hierfür ist, dass die Membran für die Positionsmessung des Autofokus zu sehr streut. Aus demselben Grund muss die untere Grenzfläche zwischen Membran und Lack vor dem Schreiben der Strukturen von Hand gesucht werden, was den Automatisierungsgrad, der sonst beim DLW mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät gegeben war, stark verringert. Das obere Deckglas ist zum Versiegeln des Stapels und zur mechanischen Stabilisierung nötig. Vor dem Entwickeln der Strukturen entfernt man den Kleber, der den Stapel zusammenhält. Im Lösungsmittel lösen sich die Membran und die beiden Deckgläser dann voneinander. Die Membran mit den Strukturen (Abbildung 3.9(c)) kann nun für die Experimente zur Invasion von Zellen in diese Strukturen unter Einfluss eines chemischen Gradienten verwendet werden. Hierzu wird eine sogenannte Boyden-Kammer verwendet (Abbildung 3.9(b)). Die horizontal angeordnete Membran trennt hierbei ein

3 Methoden

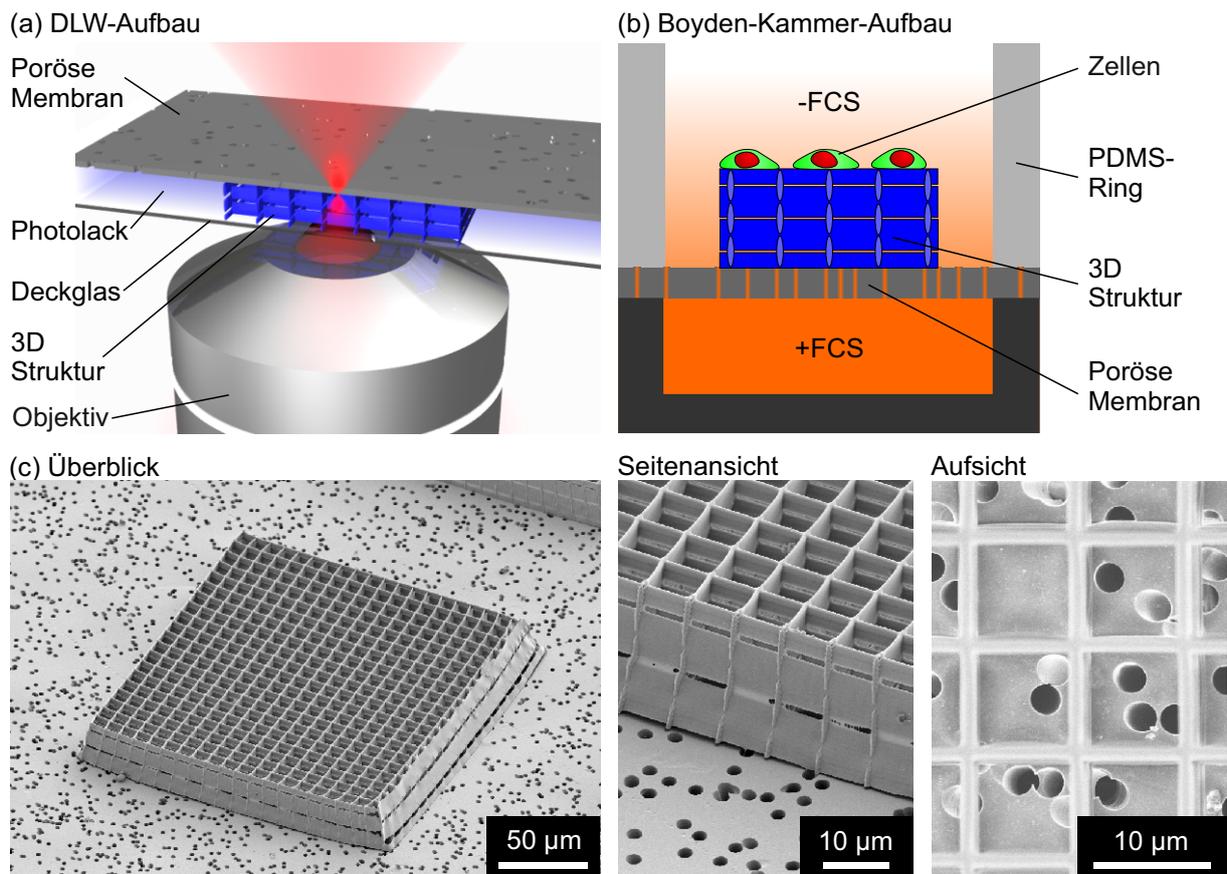


Abbildung 3.9: (a) Schemazeichnung der Konfiguration, mit der DLW auf porösen Materialien möglich ist. (b) Schemazeichnung der fertigen Struktur in der sogenannten Boyden-Kammer, mit der ein chemischer Gradient angelegt werden kann. (c) REM-Bilder der Struktur auf der porösen Membran aus verschiedenen Blickwinkeln. Die Abbildung ist leicht verändert [60] entnommen.

Gefäß in zwei Teile. Der untere Teil wird mit Zellkulturmedium gefüllt, das einen chemischen Wachstumsfaktor (in diesem Fall fetales Kälberserum (FCS)) enthält. Im oberen Teil des Gefäßes befindet sich Medium ohne den Wachstumsfaktor, die Strukturen und die Zellen. Es bildet sich durch die Diffusion der Medien durch die Membran ein Gradient des Wachstumsfaktors aus.

In der mit dieser Methode von Maria Jäckel durchgeführten Studie [60] konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten (embryonale Fibroblasten der Maus) auch ohne Gradienten in recht enge Strukturen einwandern. Durch das Ausschalten eines bestimmten Proteins (Lamin) wird der Zellkernen weicher und dieser Effekt verstärkt. Im Gegensatz dazu wandern Epithelzellen (A549-Zelllinie) unabhängig von der Zellkernsteifigkeit nicht ohne ein chemisches Signal in die Strukturen ein. Es konnte also gezeigt werden, dass die Zellkernsteifigkeit bei Epithelzellen nicht der regulierende Faktor ist, wenn es um Zellinvasion geht. Entscheidend scheinen chemische Signale zu sein.

3.6 Zellkultivierung

Im Zuge dieser Arbeit wurden im Wesentlichen zwei Arten von Zellen verwendet. Diese sind embryonale Hühnerfibroblasten (*chicken embryonic fibroblasts*, CEFs) und primäre embryonale Hühnerkardiomyocyten (Herzmuskelzellen). Deren Kulturbedingungen werden im Folgenden beschrieben.

3.6.1 Gewinnung embryonaler Hühnerfibroblasten

Die CEFs, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gehören keiner unsterblichen Zelllinie an, sondern werden aus der Haut von Hühnerembryonen präpariert und können danach nur kurze Zeit in Kultur gehalten werden können, da sich ihre Morphologie nach längerer Kultivierung zu verändern beginnt. Im Folgenden werden daher die Präparation und die darauf folgende Zellkultivierung beschrieben. Diese Arbeiten wurden von Stephanie Frank durchgeführt und sie hat die Zellen freundlicherweise für die Experimente zu Verfügung gestellt.

Präparation

CEFs werden von acht Tage alten Hühnerembryonen gewonnen. Hierzu werden pathogenfreie Hühnereier (Hockenberger Geflügelzuchterei in Eppingen-Elsenz) acht Tage in einem Brutschrank bei 37 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Der Brutschrank wendet die Eier alle 2 h um 180°, um eine optimale Entwicklung der Embryos zu fördern. Anschließend werden die Eier unter sterilen Bedingungen geöffnet, der Embryo ohne Chorion und Dottersack entnommen und in eine Petrischale (Durchmesser $d = 5,0$ cm) mit 4 °C kaltem Hanks (siehe Anhang A.1) überführt. Nun wird die Rückenhaut der Embryos in möglichst großen Stücken abgezogen und in 4 °C kaltem Hanks gespült. Anschließend werden die Hautstücke in einer Petrischale, die mit 37 °C warmem F12/Serum (siehe Anhang A.1) gefüllt ist, zerkleinert und am Boden fest gedrückt. Während der nun folgenden einwöchigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit wandern die Fibroblasten aus den Gewebestücken aus. Nun können sie unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert werden.

Zellkultivierung

Dreimal wöchentlich findet die Kultivierung der embryonalen Hühnerfibroblasten statt. Hierbei werden konfluente⁴ Zellen passagiert und bei noch nicht konfluenten Kulturen ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Medium hierbei dient F12/Serum. Bei jeder Zellkultur

⁴konfluente Zellen bilden in der Zellkulturflasche eine lückenlose Zelldecke

(folglich dreimal pro Woche) erhöht sich die Passagenzahl um 1. Die Zählung beginnt eine Woche nach der Präparation mit dem Überführen der aus dem Gewebe ausgewachsenen Fibroblasten in Zellkulturflaschen. Bei der Passagierung werden nach zweimaligem Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) die Zellen durch Zugabe von 300 µl Trypsin/EDTA (1:3)⁵ aus der Kulturflasche herausgelöst. Dies geschieht innerhalb von etwa 3 Minuten im Brutschrank. Das Trypsin wird durch die Zugabe von 10 ml F12/Serum kompetitiv inhibiert⁶ und die Zellen für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in F12/Serum resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die Experimente dieser Arbeit wurden Zellen der Passagen 5 bis 10 verwendet.

3.6.2 Gewinnung embryonaler Hühnerkardiomyozyten

Da primäre embryonale Hühnerkardiomyozyten nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren (sich zu teilen und damit zu vermehren), können sie nicht kultiviert werden, sondern müssen für jedes Experiment frisch aus den Herzen von Hühnerembryonen gewonnen werden. Zur Gewinnung der Embryonen wurden Hühnereier 7-10 Tage bebrütet. Für nähere Informationen hierzu siehe Kapitel 3.6.1. Zu Beginn der Arbeit wurde das Protokoll von Franziska Klein übernommen [7], die 10 Tage alte Embryos verwendet hat. Später wurde zu jüngeren Embryonen (7 Tage) gewechselt, da hier der Anteil an spontan schlagenden Zellen im Präparat größer war [124].

Die nun beschriebene Präparation der Herzmuskelzellen findet mit 4 °C kalten Medien statt, um die Apoptose nach der Tötung des Embryos zu verlangsamen. Unter sterilen Bedingungen werden die Eier geöffnet, der Embryo entnommen, in Hanks gespült (Abbildung 3.10(a)) und der Kopf entfernt. In einer Petrischale (Durchmesser $d = 5,0$ cm) mit frischem Hanks wird das Herz entnommen und in eine weitere saubere Petrischale mit Hanks gelegt (Abbildung 3.10(b)). Hier wird der Herzmuskel von Blutgefäßen und Herzbeutel befreit und die Herzkammern werden eingeschnitten. Dies sorgt für besseres Spülen der Herzen und somit für weniger unerwünschte Blutzellen im Präparat. Auf diese Weise werden bis zu 10 Herzen entnommen und in HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} auf Eis gesammelt. Sobald genug Herzen vorhanden sind, werden sie zerkleinert (jedes Herz in etwa 10 Stücke) und mit Hanks gespült.

Nun werden bei 37 °C die Gewebestücke enzymatisch aufgetrennt, um einzelne Zellen zu erhalten. Hierbei werden die Gewebestücke jeweils 5 Minuten alternierend mit den folgenden zwei Enzymlösungen behandelt: (1) 0,05 % Trypsin/0,54 mM EDTA in HBSS

⁵Trypsin ist ein Gemisch von Verdauungsenzymen, dass bei kurzer Einwirkzeit extrazelluläre Proteine spaltet. Es ist mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt und wird mit standardisierter, gepufferter Salzlösung (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} im Verhältnis 1:3 verdünnt.

⁶bei dieser kompetitiven Inhibition konkurrieren Bestandteile des Serums mit dem Trypsin um die Bindestellen an der Zelle. Da mehr Serum als Trypsin vorhanden ist, kann das Trypsin kaum mehr reagieren.

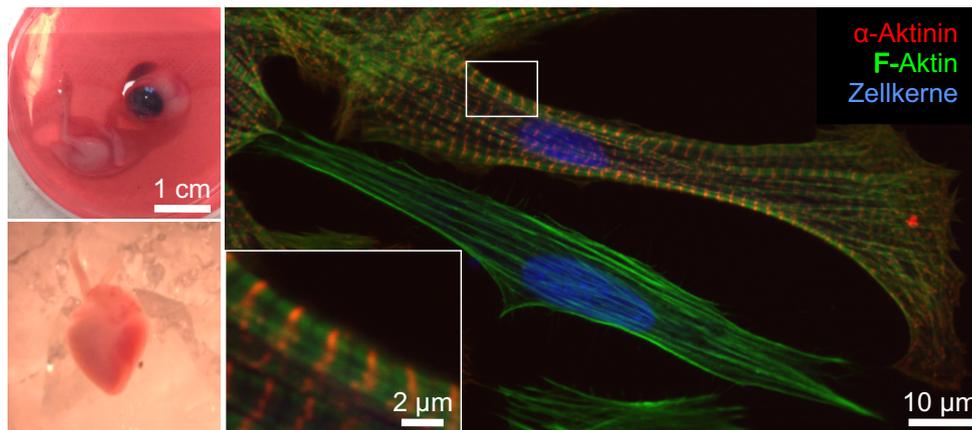


Abbildung 3.10: (a) Ein sieben Tage alter Hühnerembryo in einer 6 cm großen Petrischale. (b) Das Herz eines sieben Tage alten Embryos. (c) Mit dem LSM aufgenommenes Fluoreszenzbild einer typischen embryonalen Kardiomyozyte und kardiale Fibroblaste. Die Herzmuskelzelle ist daran zu erkennen, dass sie das typische Streifenmuster aufweist, das durch die Einfärbung des F-Aktins und des α -Aktinins, die sich im Sarkomer abwechseln, zustande kommt. Der Fibroblast enthält kein α -Aktinin (bzw. zu wenig um in dieser Darstellung sichtbar zu sein).

ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; (2) 0,1 % Kollagenase 2 und 0,005 % DNase I in HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Gewebestücke werden mit der jeweiligen Lösung inkubiert und dabei in Bewegung gehalten. Am Ende der Inkubationszeit lässt man die Gewebestücke absinken, entnimmt den Überstand, der die bereits gelösten Zellen enthält, und fügt die nächste Enzymlyse zu den verbleibenden Gewebestücken hinzu. Der entnommene Überstand wird sofort mit 5 ml F12/Kardio (siehe Anhang A.1) versetzt um die Enzymwirkung zu stoppen, für 3 min bei 500 U/min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml F12/Kardio resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen werden auf Eis gelagert, bis alle Enzymschritte beendet sind. Nach ca. 5 Schritten sind die Gewebestücke vollständig aufgelöst. Nun werden alle Zellen mit einem Nylonfilter mit Porengröße 40 μm (BD Bioscience) gefiltert, um evtl. noch vorhandene Gewebestücke zu entfernen [125].

Die Zellsuspension, die man durch die Dissoziation von Herzmuskeln erhält, besteht nicht ausschließlich aus Kardiomyozyten sondern enthält einen nicht geringen Anteil an kardialen Fibroblasten (Abbildung 3.10(c)). Um den Anteil an Fibroblasten zu reduzieren, macht man sich zu Nutze, dass diese wesentlich schneller adhäreren als die Kardiomyozyten [126]. Daher wird die gesamte Zellsuspension für 30 Minuten in einer großen Zellkulturflasche (75 cm^2) inkubiert. In dieser Zeit adhäreren die meisten der Fibroblasten, jedoch nur sehr wenige der Kardiomyozyten. Hiernach können die Kardiomyozyten abgenommen, gezählt und in der gewünschten Zelldichte ausgesät werden. Nach ca. 24 h fangen viele der Herzmuskelzellen in Kultur an zu kontrahieren.

3.6.3 Auszählen von Zellen

Um eine gleichbleibende Zelldichte in den Experimenten zu gewährleisten, wird vor der Aussaat auf Substrate die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach der Präparation der Herzzellen wird eine kleine Menge der Zellsuspension zuvor mit der gleichen Trypanblau (Carl Roth) gemischt. Dies dringt ausschließlich durch die Zellmembran toter Zellen in deren Zytoplasma ein und färbt sie blau. Tote und lebende Zellen können so beim Auszählen unter dem Mikroskop unterschieden werden.

Über das Volumen des Zählbereichs in der Kammer und die Anzahl an gezählten Zellen (evtl. unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Trypanblau) kann nun die Anzahl der Zellen pro Milliliter berechnet werden.

3.6.4 Aussäen von Zellen auf 3D-Mikrostrukturen

Bevor die Deckgläser mit den Mikrostrukturen zur Zellkultivierung verwendet werden können, sollten sie sterilisiert werden. Hierzu werden sie kurz (1–2 Minuten) in eine Mischung aus 70 % Ethanol und 30 % Wasser gelegt. Dabei sollten alle Keime abgetötet werden. Anschließend wird durch dreimaliges Spülen in PBS das (zytotoxische) Ethanol entfernt. Hierbei wie auch bei allen folgenden Schritten sollte darauf geachtet werden, dass die Strukturen auf den Substraten nicht trocken fallen, da dies wegen der Oberflächenspannung von Wasser immer ein gewisses Risiko birgt, die Strukturen zu beschädigen.

Um definierte Adhäsionen der Zellen an den Strukturen zu erhalten, werden diese als nächstes mit einem Protein der extrazellulären Matrix beschichtet. In den Experimenten, die in dieser Arbeit gezeigt werden, wurde ausschließlich Fibronectin verwendet. Allerdings sind auch andere Proteine, wie z. B. Laminin, denkbar und auch diese haften problemlos an den Strukturen. Zur Beschichtung mit Fibronectin werden 200 µl einer Lösung von 10 µg/ml Fibronectin in PBS auf je ein Deckglas mit Mikrostrukturen gegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit haftet das Protein an der Oberfläche des Deckglases und an den Teilen der Struktur, die nicht aus PDL bestehen. Nun wird durch Spülen mit PBS überschüssiges Protein entfernt und die Probe in einer kleinen Petrischale (Durchmesser $d = 3,0$ cm) mit 2 ml Zellmedium bedeckt.

Nun können die Zellen ausgesät werden. Hierzu werden bei der Zellkultivierung (siehe Abschnitt 3.6.1) bzw. nach der Präparation (Abschnitt 3.6.2) eine entsprechende Anzahl Zellen in einem kleinen Volumen aufgenommen und möglichst genau auf die Strukturen getropft. Bei den Fibroblasten wurden 40 000 Zellen verwendet, die in etwa 50 µl suspendiert waren, bei den Herzmuskelzellen 200 000 Zellen in etwa 100 µl. Die Petrischalen werden nun einige Minuten stehen gelassen damit die Zellen absinken können. Anschließend wird unter dem Mikroskop überprüft, ob sich genug Zellen in den Strukturen befinden. Ist dies nicht der Fall, können weitere Zellen dazugegeben werden. Ist man

zufrieden mit dem Ergebnis, so werden die Petrischalen in den Inkubator überführt, wo die Zellen dann an die Strukturen adhären können und sich in ihnen aufspannen. Für die CEFs dauert dies etwas 3 Stunden. Die Herzmuskelzellen werden 24 Stunden im Inkubator belassen, da sie diese Zeit benötigen, um nach der Präparation zu beginnen zu kontrahieren.

3.7 Immunhistochemie

Das Einfärben der für die Versuche relevanten Zellbestandteile geschieht mittels Immunhistochemie. Hierbei werden fixierte Zellen mit fluoreszierenden Molekülen, die an bestimmte Zellbestandteile binden (direkte Färbung), inkubiert bzw. nacheinander mit zwei Antikörpern (indirekte Färbung). Bei der indirekten Färbung bindet der erste Antikörper (Primärantikörper) an das Antigen in der Zelle (z. B. Paxillin) der zweite Antikörper (Sekundärantikörper) trägt den Fluoreszenzfarbstoff und bindet an den Primärantikörper. Da der Sekundärantikörper an jeden Primärantikörper bindet, der in einem bestimmten Tier hergestellt wurde, ist er daher vielfältig einsetzbar. Die gesamte Färbung findet in abgedunkelten Kammern statt, um die Fluoreszenzfarbstoffe zu schonen. Darüber hinaus wird bei hoher Luftfeuchtigkeit gearbeitet, um Verdunstung zu vermeiden und damit die Menge an benötigter Färbelösung klein zu halten (200 μ l bei runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von $d = 24$ mm). Im Folgenden wird das Protokoll für die Färbung beschrieben. Die hierbei verwendeten Antikörper und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Protokoll zur Immunhistochemie

Zuerst werden die Zellen bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 Minuten fixiert. Dies geschieht bei den Experimenten mit den primären Hühnerfibroblasten (Kapitel 6) unmittelbar nach dem Entfernen des Mikromanipulators (Kapitel 4) noch auf dem Mikroskop; die Herzmuskelzellen (Kapitel 5) werden erst nachdem alle Experimente am Mikromanipulator abgeschlossen sind fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen drei Mal für 5 Minuten mit 1% Triton X-100 in PBS gewaschen.⁷ Nun wird die Lösung der Primärantikörper aufgebracht und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C (im Kühlschrank) inkubiert. Die Antikörper werden hierzu in 1% BSA (*Bovine Serum Albumine*) in PBS verdünnt. Das BSA verhindert unspezifische Bindungen der Antikörper in den Zellen. Nun werden die Zellen erneut drei Mal 5 Minuten mit 1% Triton X-100 in PBS gewaschen und anschließend die zweite Verdünnung von Antikörpern und Farbstoffen aufgebracht. Wiederum folgt eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank.

⁷Triton X-100 permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht so ein gleichmäßiges Eindringen der Antikörper in die Zelle. Möchte man Membranproteine färben muss darauf verzichtet werden.

3 Methoden

Im Anschluss wird die zweite Antikörper-Verdünnung drei Mal 5 Minuten mit PBS abgewaschen.

	Antigen	Spezifikation	Verdünnung
primäre Antikörper	α -Aktinin	monoklonal Maus	1:400
	Fibronektin	polyklonal Kaninchen	1:400
	Fibronektin	monoklonal Maus	1:500
	Paxillin	monoklonal Maus	1:500
	pPaxillin (Tyr 118)	polyklonal Kaninchen	1:500
	pFAK (Tyr 397)	monoklonal Kaninchen	1:300
	Golgi (GM 130)	monoklonal Maus	1:500
sekundäre Antikörper	Kaninchen	Alexa Fluor 568	1:300
	Kaninchen	Alexa Fluor 647	1:200
	Maus	Cy3	1:500
	Maus	Alexa Fluor 647	1:200
direkte Farbstoffe	DNA	DAPI	1:1000-1:1200
	F-Aktin	Phalloidin Alexa Fluor 488	1:100

Tabelle 3.1: Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper und Farbstoffe.

Um die Zellen nun für die Mikroskopie vorzubereiten und haltbar zu machen, werden die Deckgläser mit einigen Tropfen Mowiol⁸ kopfüber auf Objektträger geklebt und zum Aushärten einige Tage in den Kühlschrank gelegt bevor das Präparat mikroskopiert werden kann. Dieses Einbetten in Mowiol verhindert das Austrocknen der Zellen und erleichtert mit einem Brechungsindex von $n = 1,46$ die Mikroskopie. Wenn man wie in dieser Arbeit mit teilweise recht hohen (bis zu 30 μm) 3D-Strukturen arbeitet, muss man darauf achten, genug Mowiol zu verwenden und das Deckglas nicht auf den Objektträger zu drücken, da sonst die Strukturen platt gedrückt werden können. Eine sichere Methode, dies zu vermeiden, wäre Abstandhalter zu verwenden (z. B. kleine Stücke von 70 μm dünnem Glas). Allerdings hat sich herausgestellt, dass der Aufwand relativ hoch ist und diese Abstandhalter mit etwas Übung auch nicht nötig sind.

⁸Mowiol wird als lösliches Granulat (Mowiol 4-88) verkauft und mit PBS und Glycerin zu einer zähflüssigen Masse verrührt. Um die Fluoreszenz zu bewahren kann 1% n-Propylgallat hinzugefügt werden.

3.8 Bildgebende Verfahren

Für die Charakterisierung der hergestellten 3D-Mikrostrukturen und der darauf kultivierten Zellen wurden eine Vielzahl verschiedener bildgebender Verfahren verwendet, die im Folgenden kurz aufgezählt werden.

Die verwendeten Strukturen wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (Zeiss Supra 55VP) dargestellt und vermessen.

Für die Videoaufnahmen während der Mikromanipulation wurde bei 20-facher Vergrößerung eine CCD-Kamera (Hamamatsu) benutzt, die Videoaufnahmen mit einer Bildfrequenz von 25 Einzelbildern pro Sekunde ermöglicht.

Die fixierten und immunochemisch gefärbten Zellen wurden meist mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta) untersucht. Einige wenige Aufnahmen wurden mit einem Apotome-Mikroskop (Zeiss) gemacht. In beiden Fällen wurden Stapel von Bildern durch die gesamte Zelle hindurch angefertigt. Für die Darstellung dieser Stapel wurde jeweils eine der folgenden Möglichkeiten verwendet:

- Man kann eine Maximalprojektion anfertigen, wie sie auch bei der Darstellung von z. B. Computertomographien verwendet wird. Hier wird an jeder Position des resultierenden Bildes (in den Fällen hier in der gesamten x - y -Ebene) jeweils der hellste Pixel entlang der z -Achse ausgewählt und dargestellt. Dies bietet den Vorteil, dass sich Strukturen innerhalb von Zellen gut erkennen lassen. Allerdings geht hierbei Information verloren, da entlang einer Achse nur jeweils ein Pixel verwendet wird.
- Statt der Maximalprojektion kann man auch eine Summenprojektion verwenden. Hier werden entlang einer Achse die Grauwerte der Pixel addiert. Dies führt zu leicht verschwommenen Bildern. Allerdings ist diese Projektion geeigneter, um quantitative Aussagen in Bezug auf Fluoreszenzintensitäten zu treffen, da jeder gemessene Punkt einfließt.
- Um die Dreidimensionalität der Zellen und der Strukturen visuell darzustellen, kann man mit Hilfe spezieller Programme (in dieser Arbeit wurden Volocity (PerkinElmer) und Imaris (Bitplane) verwendet) sogenannte 3D-Rekonstruktionen anfertigen. Hier werden aus den Bilderstapeln dreidimensionale Modelle erstellt, die anschließend zu Bildern und sogar Animationen verarbeitet werden können.

3.9 Videoauswertung der Mikromanipulation von Herzmuskelzellen

Das Ziel der Mikromanipulation an Herzmuskelzellen war es, herauszufinden, ob sich das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen durch mechanische Stimulation gezielt verändern lässt. Hierzu muss zunächst ein Weg gefunden werden dieses Kontraktionsverhalten zu quantifizieren. Dafür wurden während des Manipulationsprozesses Videos aufgenommen. Aus diesen musste nun für die Analyse die Bewegung der Zelle und evtl. des Mikromanipulators extrahiert werden. Hierbei kann man sich zu Nutze machen, dass kontrahierende Zellen, die an den Strukturen adhäreren, diese verformen [7]. Da die Strukturen im Mikroskop recht eindeutige Merkmale aufweisen, bzw. sich mittels DLW gezielt solche Merkmale an die Strukturen anbringen lassen, können diese mit Hilfe von Bildanalyse-Verfahren von Bild zu Bild verfolgt werden. In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen wurden zum Beispiel in die Mitte der Seile, die die Pfosten miteinander verbinden, kleine Verdickungen geschrieben (Abbildung 3.11(a), (b) und (c)).

3.9.1 Ermittlung des Fourierspektrums kontrahierender Herzmuskelzellen

Um die Bewegungen einzelner Bereiche der Bilder eines Videos berechnen zu können, werden um jede interessante Stelle kleine Bereiche ausgeschnitten (z. B. um die Mitte jedes Seiles, zu dem die Zelle Verbindung hat, roter Kasten in Abbildung 3.11(b) und (c)). Diese Bildausschnitte müssen so groß sein, dass bei den Bewegungen, die im Verlauf der Messung vorkommen, immer das gesamte Merkmal im Bildausschnitt bleibt. Gleichzeitig sollten sie so klein gewählt werden, dass nicht mehr Hintergrund als unbedingt nötig im Bild vorhanden ist.

Von zwei aufeinanderfolgenden Bildausschnitten (B_1 und B_2) des Videos wird dann die Kreuzkorrelation berechnet:

$$C(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} B_1(m, n) B_2(m - k, n - l) \quad \begin{array}{l} -(P-1) \leq k \leq M-1, \\ -(Q-1) \leq l \leq N-1 \end{array} \quad (3.1)$$

Der Schwerpunkt dieser Korrelation (Abbildung 3.11(d)) dient als Maß für die Veränderung der Position des Merkmals. Alternativ könnte an die Form der Kreuzkorrelation eine Kurve angepasst werden und somit die Position des Maximums mit Sub-Pixel-Genauigkeit bestimmt werden. Dieses Verfahren liefert sehr gute Ergebnisse, da hier die absolute Position des Maximums bestimmt wird. Wir berechnen hier aber nur die Lage des Schwerpunktes. Dies führt zwar zu einer zu kleinen Amplitude, was aber vernachlässigt werden kann, da wir uns nur für die Frequenz der Bewegung interessieren.

3.9 Videoauswertung der Mikromanipulation von Herzmuskelzellen

Außerdem ist diese Methode weniger störanfällig und weniger rechenintensiv als das Anpassen einer Kurve an die Kreuzkorrelation.

Der Mittelwert dieser relativen Bewegung liegt durch Rundungsfehler nicht genau bei Null. Da diese kleine Abweichung sich aufgrund der vielen Einzelbilder stark auf die resultierende Bewegung auswirken kann, wird anschließend die relative Bewegung um die Null zentriert, indem der Mittelwert subtrahiert wird. Danach wird von der Anfangsposition ausgehend durch Addition der relativen Bewegungen die tatsächliche Bewegung der Struktur in x - und y -Richtung berechnet. Um Schwankungen mit langsamer Periode auszugleichen, die z. B. durch Schwingungen des Mikroskops auftreten können, wird zum Schluss das laufende Mittel über 50 Bildausschnitte (2 Sekunden) abgezogen. Die daraus resultierende Bewegung in y -Richtung ist in Abbildung 3.11(e) gezeigt.

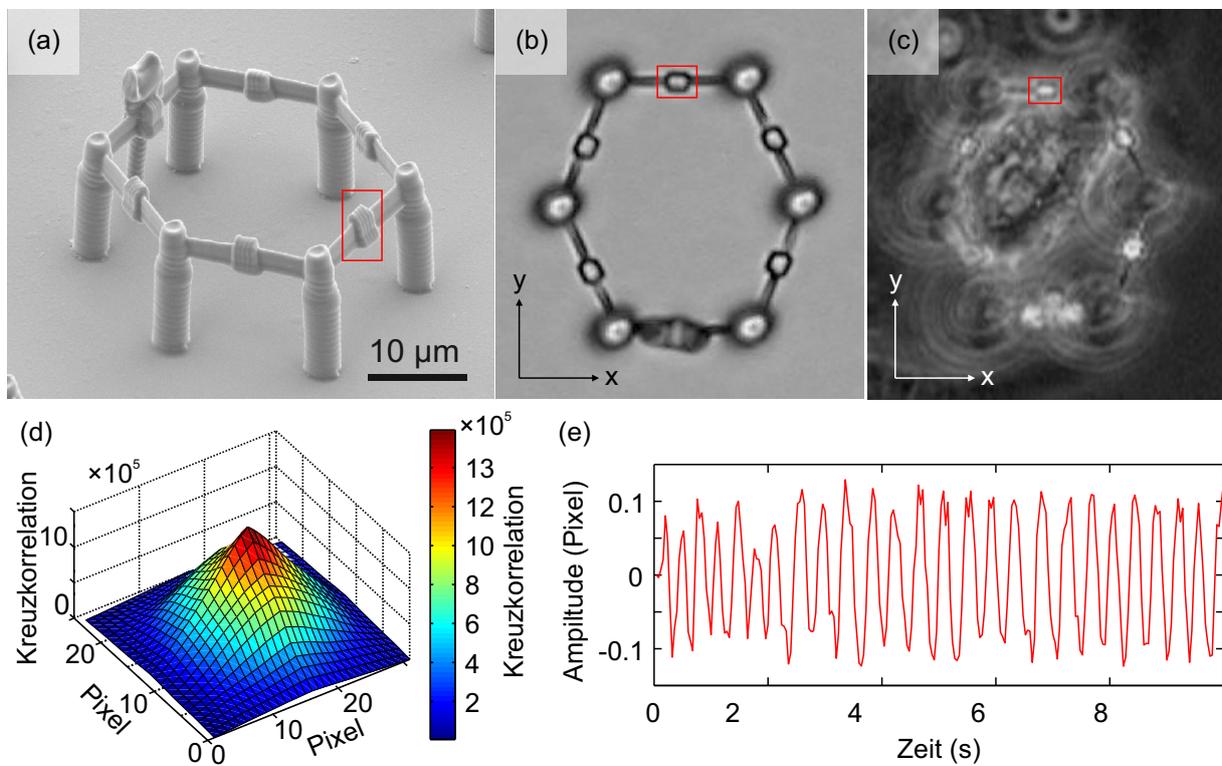


Abbildung 3.11: (a)–(c) Struktur mit dem zur Auswertung verwendeten Bereich in rot: (a) zeigt das REM-Bild einer typischen Struktur. (b) zeigt das lichtmikroskopische Bild (Durchlicht) einer ebenso hergestellten Struktur direkt nach der Entwicklung. In (c) ist ein Bildausschnitt aus einem Video einer kontrahierenden Herzzelle in einer solchen Struktur gezeigt. (d) zeigt das typische Ergebnis der Kreuzkorrelation zweier aufeinanderfolgender Bilder aus diesem Video. Der Schwerpunkt ist leicht dezentriert und entspricht dem Inkrement der Bewegung. In (e) sieht man die Bewegung, die aus dem Video extrahiert wurde.

Wir sind wie erwähnt an der Frequenz der Herzmuskelzellen interessiert und insbesondere daran, wie diese sich unter mechanischen Einflüssen verändert. Daher bietet es sich an, das Fourierspektrum der zuvor aufgenommenen Bewegung zu betrachten. Da die

3 Methoden

Experimente bis zu einer Stunde dauerten, sollte die Darstellung dieser Frequenzspektren möglichst kompakt sein. Allerdings kann sich auf kurzen Zeitskalen recht viel an diesen Spektren ändern (Zellen hören für wenige Minuten auf zu kontrahieren und beginnen dann wieder). Auch das muss noch zu erkennen sein. Daher wurde eine Darstellung der Leistung des Fourier-Spektrums von Abschnitten der Bewegung gewählt, die jeweils 30 Sekunden Länge haben. Diese Spektren werden mit einer Farbskala dargestellt und dann in Streifen übereinander angeordnet, so dass sich die y-Achse als Zeitachse darstellt. Hierbei wird, falls vorhanden, über die Spektren verschiedener Zellregionen gemittelt. Ein Beispiel dieser Darstellung ist in Abbildung 3.12 gezeigt.

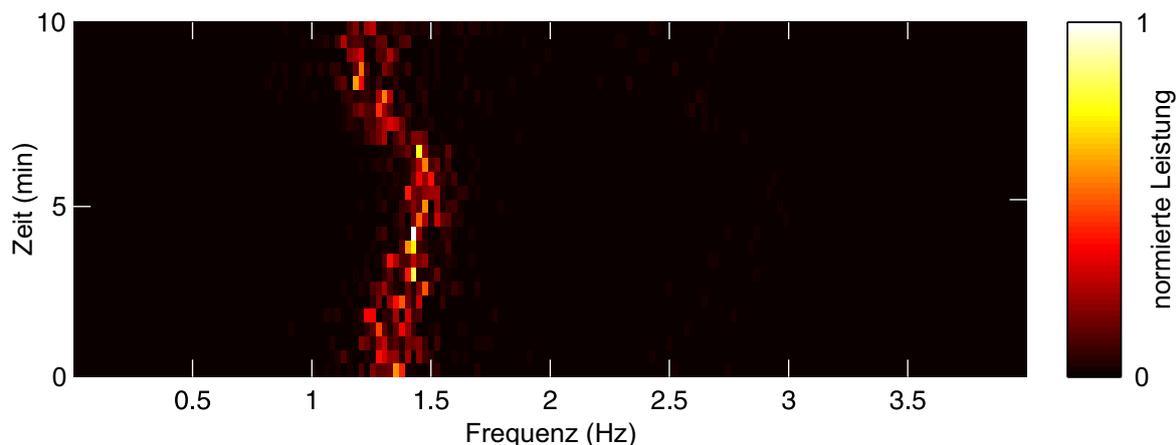


Abbildung 3.12: Darstellung der Kontraktionen einer Herzmuskelzelle als Farbplot der Leistung des Fourier-Spektrums von aufeinanderfolgenden Abschnitten der Bewegung von 30 s Länge. So kann verfolgt werden wie sich das Spektrum über einen längeren Zeitraum verändert. Gezeigt ist die Zelle aus Abbildung 3.11.

3.9.2 Bestimmung der Schlagrate von Herzmuskelzellen

Eine weitere Darstellungsmöglichkeit ist es, die Kontraktionsrate der Zellen in bestimmten Zeitabschnitten zu bestimmen. Dies bietet sich insbesondere an, wenn man relativ kurzfristige Reaktionen auf kurze Stimuli darstellen möchte im Vergleich zu Zeiten, in denen die Zelle keinen Stimulus erfuhr. Es wurden zu diesem Zweck Experimente ausgeführt, in denen die Zelle mehrfach für 10 Sekunden mit einer Frequenz von $f = 1$ Hz angeregt und anschließend für 2 Minuten ungestört belassen wurde. Man kann nun die Kontraktionsraten vor, während und nach der Stimulation miteinander vergleichen. Hierzu muss man in der Lage sein, die einzelnen Kontraktionen der Zelle aus den Daten zu extrahieren. Die einfachste Möglichkeit wäre es, einen Grenzwert an die Positionen anzulegen und eine Kontraktion immer dann zu zählen, wenn dieser Grenzwert überschritten wird.

Um die Kontraktionen der Zellen besser identifizieren zu können muss man sie gut von dem Rauschen, mit dem die Messungen auch ohne Kontraktionen behaftet sind (siehe

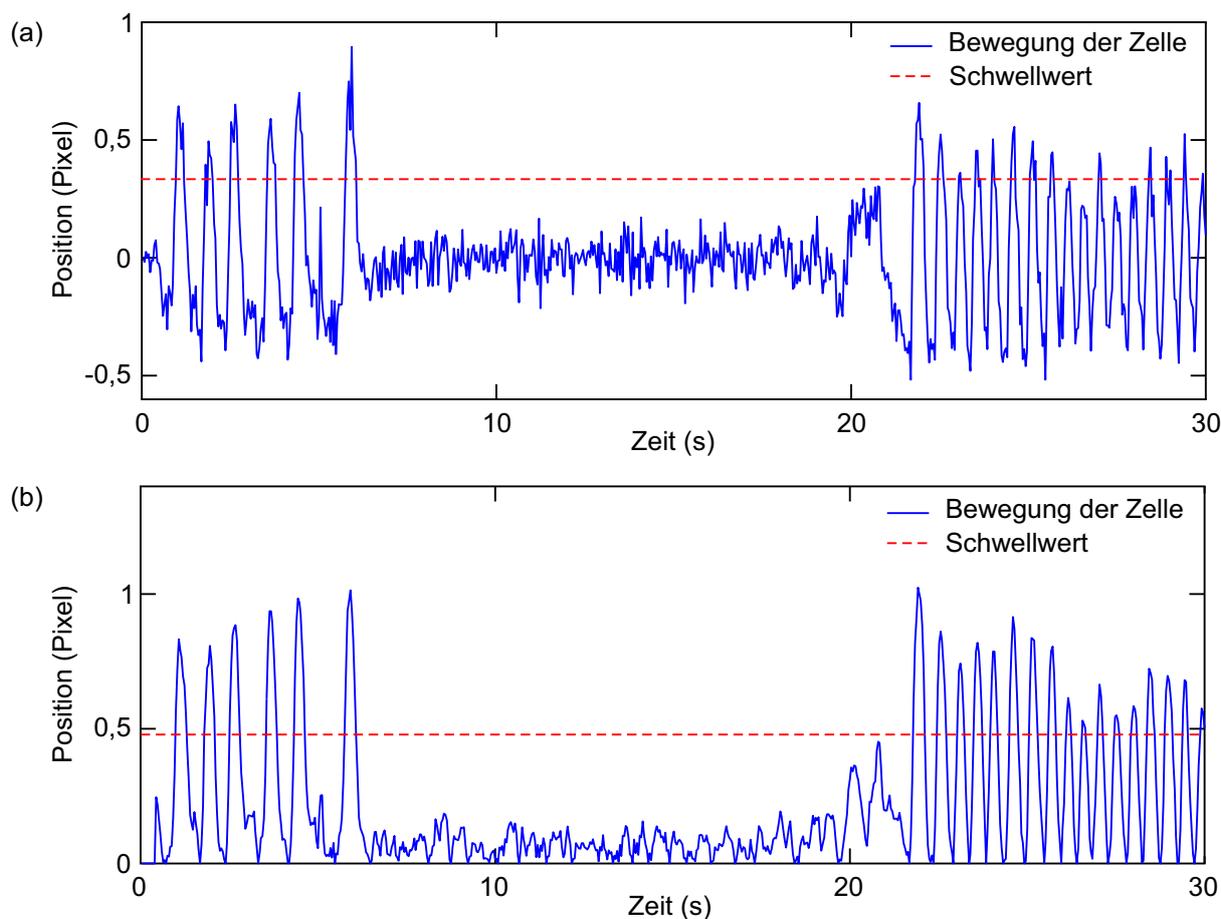


Abbildung 3.13: (a) unbenutzte Bewegungen einer Beispielzelle. Legt man den Grenzwert knapp über das Rauschen im Zeitbereich $t = 7 - 21$ s, werden einige Kontraktionen nicht erkannt und andere als mehrere gewertet. (b) nach der Bearbeitung der Daten ist die Genauigkeit der Messung wesentlich erhöht.

Abbildung 3.13(a)) zu trennen. Hierzu wurden die Daten noch über das Maß hinaus bearbeitet, das zu Beginn dieses Kapitels beschrieben wurde. Da eine Kontraktion definiert werden soll als Überschreiten eines bestimmten Schwellwerts von unten, muss dafür gesorgt werden, dass es keine solchen Übergänge gibt, wenn nicht auch eine Kontraktion stattgefunden hat. Eine Möglichkeit das umzusetzen ist, das Rauschen klein zu halten. Dies lässt sich dadurch umsetzen, dass man die zeitliche Auflösung reduziert, indem man die Graustufen der aufeinanderfolgenden Bilder mittelt. Als guter Wert hierfür hat sich eine Mittlung über drei aufeinanderfolgende Bilder herausgestellt. Es wurde ein gleitendes Mittel verwendet, also nicht auf Bilder verzichtet, sondern nur über sie geglättet (Abbildung 3.13).

Eine weitere Verbesserung erhält man, wenn man die Ausschläge nur in eine Richtung (z. B. nach oben) darstellt. Dafür muss unter Umständen zunächst die Positionskurve an der x-Achse gespiegelt werden. Das ist immer dann sinnvoll, wenn die Kontraktion der Zelle zu einem Ausschlag der Positionskurve nach unten führt. Das Weiteren kann man

3 Methoden

dann das Rauschen **und** die Position bei entspannter Zelle auf die Nulllinie schieben. Dies ist im Vergleich von Abbildung 3.13(a) und (b) gut zu sehen und wird dadurch umgesetzt, dass von den Positionswerten immer das laufende Minimum über 10 Bilder davor und danach abgezogen wird:

$$P'_i = P_i - \min\{P_j | (i - 10) \leq j \leq (i + 10)\}. \quad (3.2)$$

Legt man nun wieder den Grenzwert knapp über das Rauschen, so sieht man, dass es in diesem Zeitfenster keine falsch oder nicht erkannten Kontraktionen mehr geben wird (siehe Abbildung 3.13 (b)).

4 Mikromanipulation von Zellen in 3D-Mikrostrukturen

Wie in Kapitel 2.3 dargelegt wurde, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, das Verhalten von Zellen auf mechanische Stimuli zu untersuchen. Allerdings haben all diese Techniken nicht die Fähigkeit, einzelne Zellen in dreidimensionalen Strukturen zu verformen. Da aber viele intrazelluläre Prozesse sich je nach Dimensionalität der Zellkultur unterscheiden (siehe hierzu Kapitel 2.2 und [71, 127–129]), wäre es interessant, Messungen der Reaktionen von Zellen auf mechanische Reize in 3D durchzuführen. Des Weiteren sind die Geometrien der Zellen in den Experimenten aus der Literatur im besten Fall grob vorgegeben, bei verschiedenen Zellen aber nicht vollkommen gleich. Uns ist es durch das direkte Laserschreiben (DLW) jedoch möglich, Zellen in sehr gezielter Weise in dreidimensionalen Umgebungen zu kultivieren [6]. Es hat sich weiter gezeigt, dass diese Strukturen weich genug sind, um durch Zellen verformt zu werden [7]. Daher entstand die Idee, diese beiden Möglichkeiten zu nutzen um Zellen, die sich in sehr definierter 3D-Geometrie befinden, durch externe mechanische Reize zu stimulieren und die Reaktionen dieser Zellen hierauf zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Mikromanipulator gebaut, der in der Lage ist, durch die Bewegung einer feinen Spitze speziell hierfür entworfene Mikrostrukturen zu verbiegen. Diese Verbiegung der Strukturen soll sich idealerweise in eine Kraft an der Zelle übersetzen.

Im Folgenden wird zunächst der Mikromanipulator beschrieben, der im Zuge der Arbeit entwickelt wurde. Anschließend werden Aspekte des Strukturdesigns herausgearbeitet, die für den Erfolg solcher Experimente wichtig sind.

4.1 Mikromanipulator zur mechanischen Verformung von 3D-Mikrostrukturen

Die Strukturen, die für die 3D-Kultivierung von Zellen verwendet werden sollen, haben insgesamt Abmessungen von einigen 10 Mikrometern in allen Raumrichtungen. Der Teil der Struktur, der zur Verformung vom Mikromanipulator getroffen werden muss, wird also wenige Mikrometer groß sein. Die Spitze des Mikromanipulators, mit der während des Experiments die Struktur berührt werden soll, muss daher etwa einen Mikrometer groß sein und mit einer Genauigkeit von unter einem Mikrometer platziert werden können.

4 Mikromanipulation von Zellen in 3D-Mikrostrukturen

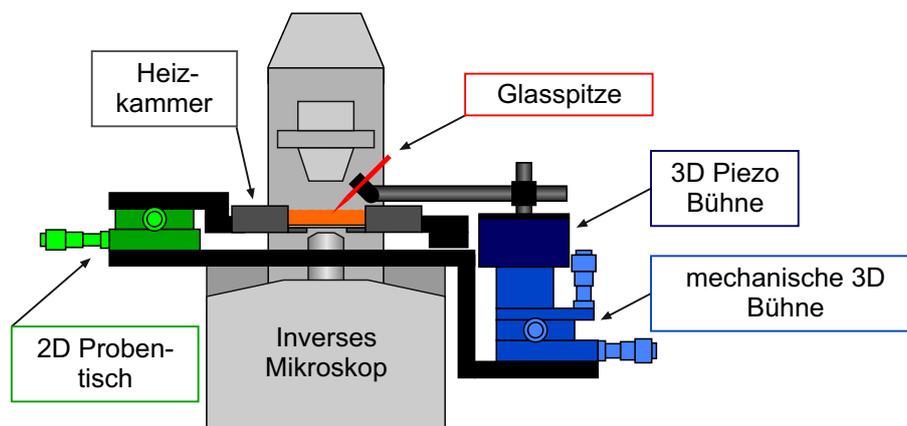


Abbildung 4.1: Schemazeichnung des selbstgebauten Mikromanipulators: Ein inverses Mikroskop mit präzise manuellen mechanischen Tisch und beheizbarer Kammer zur Aufnahme lebender biologischer Proben wurde um einen Mikromanipulator erweitert. Dieser besteht aus einer feinen Glasspitze (Durchmesser $1\ \mu\text{m}$), die auf einer mechanischen 3D-Bühne und einer 3D-Piezobühne befestigt ist.

Mechanisch stabile Werkzeuge, die an der Spitze einen Durchmesser von ca. $1\ \mu\text{m}$ aufweisen, lassen sich erzeugen, indem man Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von $1\ \text{mm}$ unter lokaler Hitzeeinwirkung zieht, bis sie in zwei Hälften reißen. Diese Spitzen werden in Biologie und Medizin zur Mikroinjektion verwendet, nachdem die Spitze abgebrochen und unter Umständen die Bruchkanten rund geschmolzen wurde. Da man in unserem Fall aber nur eine feine Spitze braucht, werden die gezogenen Spitzen ohne Nachbearbeitung verwendet.

Um nun mit einer solchen Spitze die Strukturen zu adressieren und zu verformen, wird sie auf einer 3D-Piezobühne befestigt ($100\ \mu\text{m}$ Verfahrweg in alle Raumrichtungen), die sich wiederum auf einer mechanischen 3D-Bühne ($13\ \text{mm}$ Verfahrweg in alle Raumrichtungen mit differentiellen Mikrometerschrauben) befindet (Abbildung 4.1). Diese Kombination ist nötig, da bei jedem Wechsel der Glasspitze diese wieder nah an die Probe gebracht werden muss und dafür ein großer Verfahrweg benötigt wird. Andererseits möchte man mit der hohen Präzision des Piezoverstellers diese Struktur verformen, sobald man die Glasspitze in die Nähe der Struktur gebracht hat.

Da mit dem Mikromanipulator Strukturen verformt werden sollen, in denen sich lebende Zellen befinden, ist er an ein inverses Mikroskop angeschlossen. Hier lässt sich der Manipulationsvorgang in ausreichender Vergrößerung ($20\times$) überwachen und anpassen. Es ist außerdem möglich, Videoaufnahmen während des Vorgangs zu machen (mit Hilfe einer CCD-Kamera von Hamamatsu). Außerdem kann die Probe sehr präzise und unabhängig von der Position des Mikromanipulators mit der Verfahrbühne des Mikroskops positioniert werden. Des Weiteren ist in den Proben-tisch eine Heizkammer eingebaut, die die Proben bei 37°C hält. Für optimale Kulturbedingungen würde man auch die Luftfeuchtigkeit (wegen der Verdunstung und damit verbundenen Erhöhung des Salzgehalts im Medium)

und den CO_2 -Gehalt¹ der Luft kontrollieren. Da aber ein Aufbau einer Kammer, die dies leistet, in Kombination mit dem Mikromanipulator schwierig wäre, wurde hierauf verzichtet. Die Verdunstung ist bei Versuchen, die weniger als eine Stunde dauern, noch zu vernachlässigen und das Medium kann durch Zugabe von HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) auch ohne hohen CO_2 -Gehalt in der Luft im pH-Wert eingestellt werden. Zur Schonung der Zellen sind in der Mikroskop-Beleuchtung zwei Filter eingebaut, die die Randbereiche des optischen Spektrums herausfiltern und damit phototoxische Effekte minimieren.

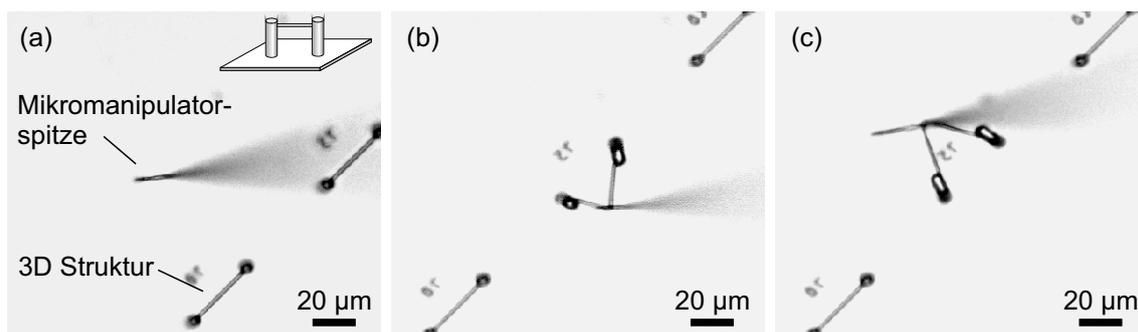


Abbildung 4.2: Bei einem Test des Mikromanipulators sieht man, dass sich mit Hilfe der Glasspitze 3D-Strukturen verformen lassen und diese ausreichend gut am Substrat haften. Die Strukturen sind Säulen aus PDL, die mit Seilen verbunden sind (siehe Skizze in (a)).

In ersten Versuchen an Teststrukturen (Abbildung 4.2) zeigt sich, dass sich diese Strukturen (in diesem Falle zwei Säulen aus PDL, die mit einem PDL-Seil verbunden sind) mit dem Mikromanipulator verformen lassen. Der dreieckige Schatten auf den Bildern ist die Spitze des Manipulators, der wegen seiner Neigung nur an einer Stelle im Fokus ist. Auf den beiden anderen Bildern sieht man, dass die Struktur weich genug bzw. die Spitze hart genug für extreme Verformungen ist. Auch ist die Haftung der Strukturen am Deckglas so gut, dass sie sich durch die Kraftausübung nicht ablösen. Dieses Experiment wurde an Luft gemacht; daher ist der Kontrast sehr stark. Dagegen wird der Manipulator später im Zellmedium (wegen des geringeren Brechungsindex-Kontrasts) weniger deutlich erkennbar sein.

4.2 Design von Strukturen zur Mikromanipulation

Zur Mikromanipulation von Zellen in 3D-Strukturen müssen natürlich geeignete Struktur-Designs entwickelt werden. Diese müssen zum einen genug Adhäsionsfläche für die Zellen zur Verfügung stellen und eine für Fragestellung und Zelltyp geeignete Geometrie aufweisen. Zum anderen muss eine Verformung möglich sein, ohne die Zellen zu beschädigen. Das bedeutet, dass Zelladhäsion an den Stellen der Struktur, die beim

¹Das Zellkulturmedium hat bei 5% CO_2 in der Luft einen konstanten pH-Wert

4 Mikromanipulation von Zellen in 3D-Mikrostrukturen

Mikromanipulationsvorgang mit der Spitze berührt werden, verhindert werden muss. Es wurden daher die Strukturen mit Hebeln aus PDL ausgestattet (Abbildung 4.3, blau), die wegen der Eigenschaften des Lacks (Kapitel 3.2.2) nicht von den Zellen überwachsen werden sollten. Zusätzlich sind diese Hebel etwa $10\ \mu\text{m}$ höher als der adhäsive Teil der Struktur (Abbildung 4.3, rot), sodass zwischen Zelle und der Spitze des Mikromanipulators ausreichend Sicherheitsabstand besteht. Versuche, bei denen die Hebel noch als einfache Säule ausgeführt war (siehe Abbildung 4.3(a)), führten zu einem Abrutschen des Mikromanipulators von diesem Hebel. Um das Abrutschen der Spitze zu vermeiden, wurde der Hebel um eine Platte am oberen Ende ergänzt (siehe Abbildung 4.3(b)). Diese Platte hat am Rand Wulste, die das Abrutschen des Hebels zusätzlich erschweren.

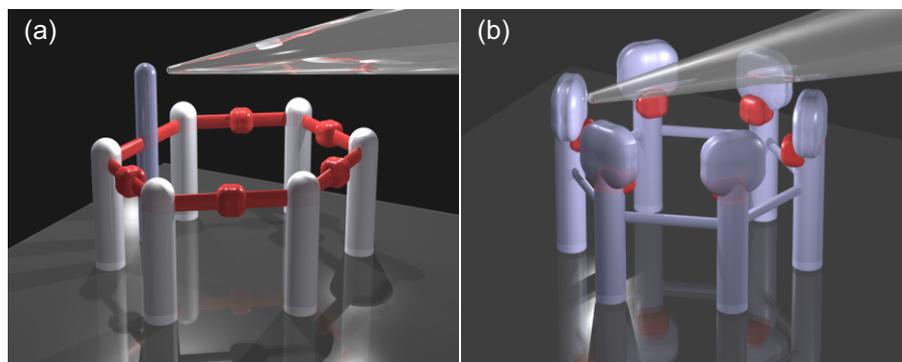


Abbildung 4.3: Mittels POV-Ray erstellte Darstellung zweier Strukturdesigns für die Mikromanipulation. Ormocomp ist jeweils in rot dargestellt, der Rest der Struktur besteht aus PDL. Die Teile der Struktur, die zur Verformung mit dem Mikromanipulator gedacht sind, sind in blau dargestellt.

Eine weitere Überlegung, die man beim Design der Strukturen anstellen sollte, ist wie man möglichst viele Zellen dazu bringt, sich in den Strukturen aufzuspannen. Das Aussäen der Zellen geschieht rein zufällig. Das heißt, die Zellsuspension wird auf die Strukturen getropft und beim Absinken der Zellen auf den Boden bleiben einige an den Strukturen hängen und spannen sich in ihnen auf. Um den Anteil der Zellen, die sich an den Strukturen absetzen, zu maximieren, würde man sich eine möglichst hohe Strukturdichte wünschen. Dies lässt sich umsetzen, indem man die Strukturen als Gitter anordnet. Denkbar wäre hier z. B. eine wabenartige Geometrie. Bei solch einer Art von Strukturdesign sieht man bald, dass zwar recht viele Zellen in den Strukturen gefunden werden, diese Zellen sich allerdings sehr ungeordnet aufspannen und auch häufig Kontakte zu anderen Zellen ausbilden (siehe Abbildung 4.4). Für die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente untereinander sind es aber eine vergleichbare Zellform und isolierte Zellen wünschenswert. Daher wurden Strukturen verwendet, die Abstand zu den benachbarten Strukturen haben, dass Zellen die Lücke dazwischen nicht überspannen können.

Es hat sich im Zuge der Experimente herausgestellt, dass es günstig ist, recht hohe Strukturen zu schreiben, damit der Einfluss der Mikromanipulation auf die Zellen maximal wird. Dies liegt daran, dass der Hebel länger ist und damit der Winkel, um den der

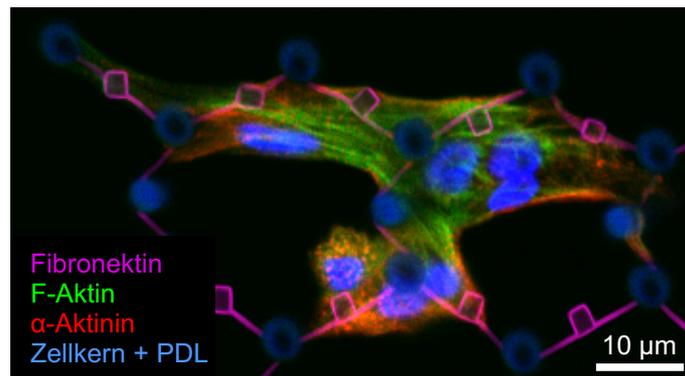


Abbildung 4.4: Maximalprojektion einiger Herzzellen, die in einer 3D-Mikrostruktur aufgespannt sind. Das Bild wurde mit einem LSM (siehe Kapitel 3.8) aufgenommen. Nach dem Säen der Zellen auf die Strukturen wurden Fibronectin (pink), α -Aktinin (rot), F-Aktin (grün) und Zellkerne (blau) gefärbt. In blau sieht man auch die Autofluoreszenz des PDL.

Hebel verbogen wird bei gleichem Verfahrensweg kleiner ist. In der Praxis bedeutet das, dass eine stärkere Verformung der Struktur möglich wird, bevor der Mikromanipulator vom Hebel herunterrutscht. Bei der Herstellung sehr hoher Strukturen in normaler Konfiguration des DLW (siehe Kapitel 3.1) muss allerdings beachtet werden, dass durch die tiefere Fokussierung in den Fotolack die Qualität des Fokus nachlässt und daher mehr Laserleistung benötigt wird und die resultierenden Strukturen etwas verschwommen aussehen.

Von diesen sehr allgemeinen Überlegungen abgesehen müssen die Strukturen noch dem verwendeten Zelltyp und der Fragestellung angepasst werden. Dies kann über mehrere Faktoren geschehen. Zum einen hat jeder Zelltyp eine andere Größe. Die optimalen Maße der Strukturen müssen daher für jeden Zelltyp neu gefunden werden. Ebenso kann die Geometrie für jedes Experiment anders sein. In dieser Arbeit wurden ausschließlich hexagonale Strukturen verwendet. Grundsätzlich ist auch jede andere Symmetrie denkbar, und es bietet sich für weiterführende Experimente an, hier auch andere Wege zu gehen.

Für das Experiment kann es wünschenswert sein, nur sehr kleine Kontaktflächen herzustellen um die Form der Zelle möglichst streng zu definieren. Allerdings muss das von den Zellen auch toleriert werden. So müssen z. B. die Kontaktflächen für die Herzzellen sehr groß gewählt werden, damit kontrahierende Zellen in den Strukturen gefunden werden können. Für die später verwendeten CEFs hingegen sind relativ kleine Würfel ausOrmocomp ausreichend.

5 Embryonale Hühnerkardiomyozyten unter dem Einfluss mechanischer Kräfte

Das zuvor beschriebene System aus Mikromanipulator und 3D-Strukturen wird nun verwendet, um zu untersuchen, inwieweit sich die Kontraktionsrate von embryonalen Hühnerkardiomyozyten (Kapitel 3.6.2) durch mechanische Reize beeinflussen lässt. Hierzu wurde zunächst eine Struktur gesucht, in der diese Zellen möglichst isoliert überleben und kontrahieren. Die Struktur, die letztendlich gewählt wurde, wird am Anfang dieses Kapitels beschrieben. Anschließend wurden mit Herzmuskelzellen in dieser Struktur verschiedene Messungen durchgeführt, die danach erläutert werden.

Abschließend wird noch ein alternativer Ansatz beschrieben, mit dem sich ähnliche Betrachtungen anstellen lassen. Hierbei wird der direkte Kontakt zweier Zellen, der zu Gap-Junctions (Kapitel 2.1.4) und damit zu chemischer Signalübermittlung führen würde, durch 3D-Strukturen rein unterbunden. Gleichzeitig wird eine mechanische Kopplung der Zellen durch dünne Membranen ermöglicht.

5.1 Mikrostrukturen zur Mikromanipulation von Herzmuskelzellen

Die Strukturen, die bei den Experimenten an den Herzmuskelzellen verwendet wurden (Abbildung 5.1), bestehen aus einem Gerüst aus Ormocomp (Kapitel 3.2.1), an das aus dem passivierenden PDL der Hebel zur Mikromanipulation geschrieben ist. Des Weiteren sind die Säulen des Gerüsts mit PDL umhüllt, damit die Ankerpunkte der Zelle auf eine Ebene beschränkt bleiben und sie auch keine Kontakte am Substrat ausbildet.

Die Geometrie der Strukturen ist ein in die Länge gezogenes Hexagon aus Säulen, die mit Seilen verbunden sind (Abbildung 5.1). In die Länge gezogen bedeutet hier, dass die Innenwinkel der Verbindungslinien zweier benachbarter Säulen statt 120° an zwei der Ecken 135° und an den übrigen vier Ecken $112,5^\circ$ beträgt. Dies wurde so gewählt, um der natürlichen Elongation der Herzzellen, die sowohl *in vivo* als auch in 2D-Zellkultur beobachtet wird, Rechnung zu tragen [130]. Der Hebel zur Mikromanipulation

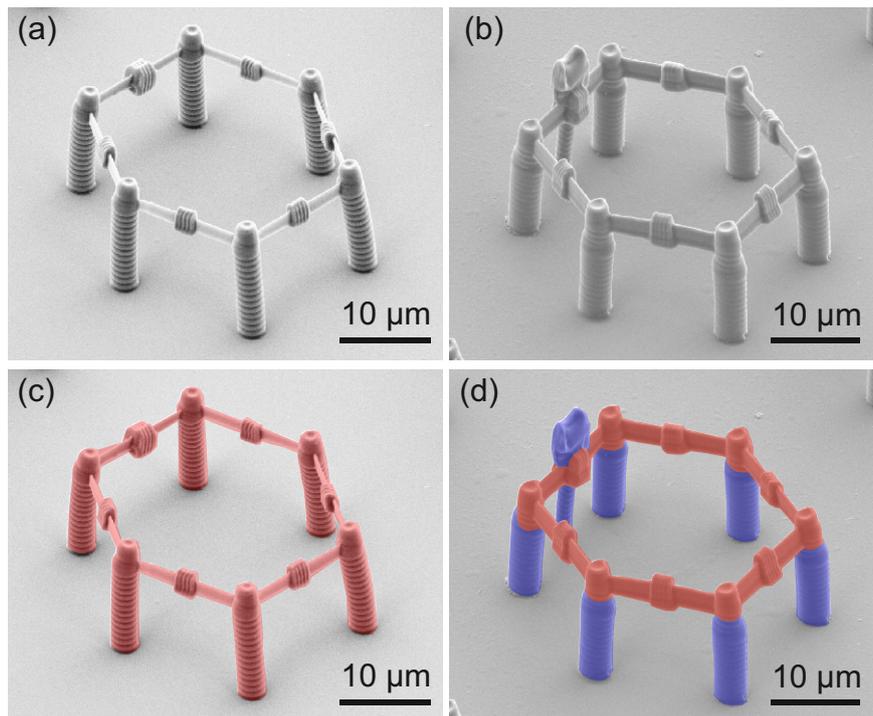


Abbildung 5.1: REM-Bilder der Strukturen, wie sie für die Experimente an den CEFs verwendet wurden. Die Strukturen bestehen aus einem Rahmen aus Ormocomp ((a) und (c)). Dieser Rahmen ist in den unteren Bildern rot eingefärbt. Mit PDL wird der Hebel für die Mikromanipulation geschrieben und der untere Bereich der Säulen umhüllt, damit die Zellen sich in der oberen Ebene aufspannen ((b) und (d)). PDL ist in (d) blau eingefärbt.

befindet sich in der Mitte zwischen zwei Säulen an einer der beiden weiter voneinander entfernten Seiten (siehe Abbildung 5.1). Auch das ist bewusst gewählt, da die natürlichen Kontraktionen von Herzmuskelzellen entlang der langen Achse geschehen und man den Zug daher möglichst entlang dieser Achse aufbauen möchte.

Die Abmessungen der Strukturen sind nach einigen Versuchen der Kultivierung der Kardiomyozyten in diesen Strukturen auf einen Abstand der Säulen zueinander von $16\ \mu\text{m}$ gewählt worden. Die Höhe der Säulen beträgt $15\ \mu\text{m}$, die des Hebels $22\ \mu\text{m}$. Damit ist der Hebel so hoch, dass man die Zelle nicht beschädigt, während man den Hebel mit dem Mikromanipulator verformt.

Die Seile, die zwischen den Säulen gespannt sind, dienen zum einen als Kontaktfläche für die Zellen. Auch die Verdickungen in der Mitte der Seile sind in dieser Hinsicht sinnvoll, da die Herzzellen sehr empfindlich sind und eine Vergrößerung der Kontaktflächen den Anteil an kontrahierenden Zellen in den Strukturen steigert. Andererseits ist es aber auch für die Analyse der Videos hilfreich Verdickungen an den Seilen zu haben, da diese eine charakteristische Form bilden und daher bei der Kreuzkorrelation der Videos zur Bewegungsanalyse (siehe Kapitel 3.9.1) ein verwertbares Signal liefern. Auch an dem

5.2 Zeitliches Verhalten von Hühnerkardiomyozyten in 3D-Mikrostrukturen

Seil, an das der Hebel geschrieben wird, findet sich solch eine Verdickung. Hier ist sie allerdings etwas größer (doppelter Radius) damit sie auch aus dem Hebel heraus ragt. Dies ist notwendig, da hier der einzige direkte Kontakt zwischen Herzmuskelzelle und dem beweglichen Teil der Struktur besteht. Ohne eine starke Verankerung der Zelle an dieser Verdickung und damit am Hebel wäre eine zuverlässige Kraftübertrag auf die Zelle nicht möglich.

Um die Kontaktfläche zwischen Struktur und Zellen weiter zu vergrößern, wurden die Säulen nicht über die gesamte Höhe, sondern nur bis $3\ \mu\text{m}$ unterhalb der Spitze mit PDL eingehüllt. Somit stehen auch die Spitzen der Säulen als proteinbesetzte Kontaktfläche zur Verfügung. Dies lässt sich gut an der eingefärbten REM-Aufnahme in Abbildung 5.1 (d) erkennen.

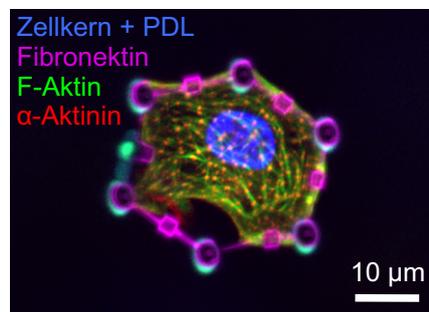


Abbildung 5.2: Maximalprojektion einer Herzzelle, die in einer 3D-Mikrostruktur aufgespannt ist. Das Bild wurde mit einem Apotome-Mikroskop (siehe Kapitel 3.8) aufgenommen. Nach dem Säen der Zellen auf die Strukturen wurden Fibronektin (pink), α -Aktinin (rot), F-Aktin (grün) und Zellkerne (blau) gefärbt. In türkis sieht man die Autofluoreszenz des PDL.

In Abbildung 5.2 ist eine Herzzelle gezeigt, die sich in einer solchen Struktur aufspannt: Die Zelle wurde, nachdem sie sich über 24 h aufgespannt hat, fixiert und immunohistochemisch gefärbt (Kapitel 3.7). Man sieht anhand der Maximalprojektion (Kapitel 3.8), dass die Zelle in der Struktur aufgespannt ist und auch Kontakt zu dem Hebel (türkisfarbener Schatten auf der linken Seite) hat.

5.2 Zeitliches Verhalten von Hühnerkardiomyozyten in 3D-Mikrostrukturen

Um einen zeitlichen Überblick über das Verhalten der Kardiomyozyten in den vorgestellten 3D-Mikrostrukturen zu bekommen, werden hier zunächst zwei Messungen an Zellen gezeigt, die nicht manipuliert, sondern über nur längere Zeit gefilmt wurden. Dadurch lässt sich überprüfen, ob die Zellen über einen ausreichend langen Zeitraum unter dem Mikroskop in Kultur gehalten werden können, ohne dass sich ihr Verhalten zu stark verändert, oder es sogar zu Zellsterben kommt.

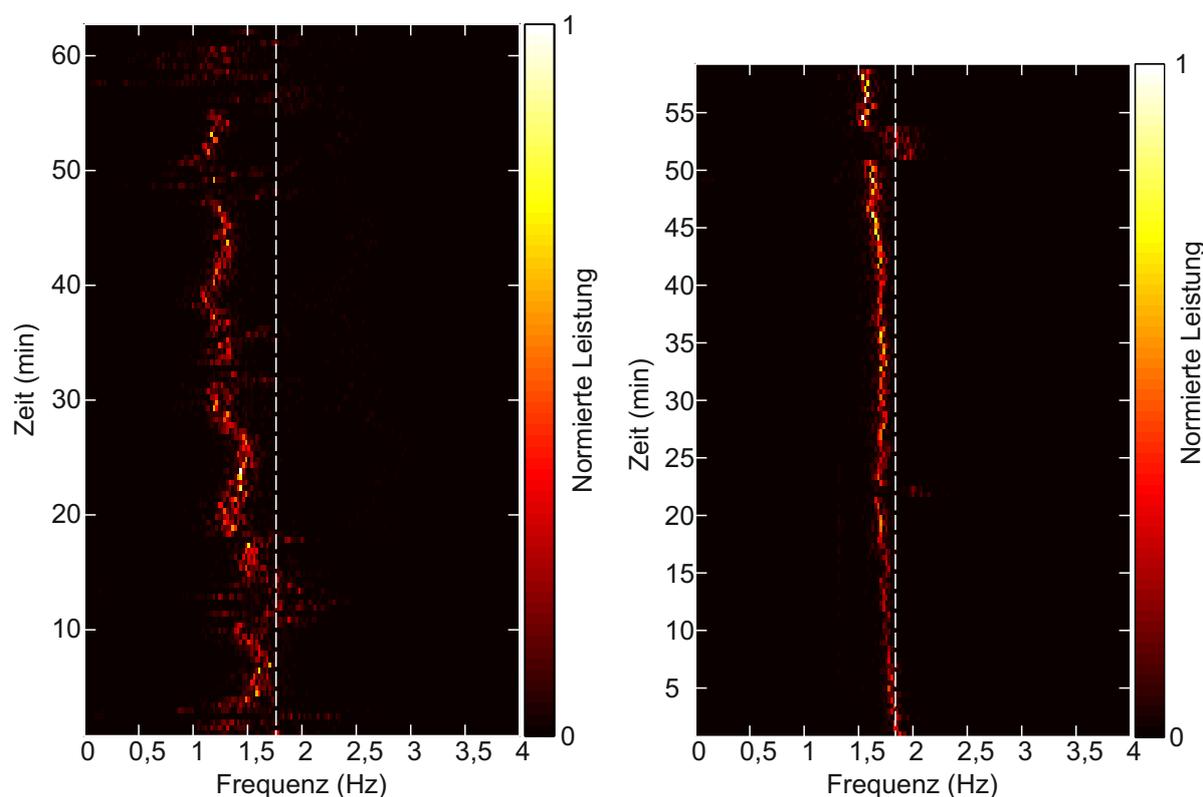


Abbildung 5.3: Darstellung der Kontraktionen von zwei Herzmuskelzellen als Farbplot der Leistung des Fourierspektrums von aufeinanderfolgenden Abschnitten der Bewegung von 30 s Länge. So kann verfolgt werden wie sich das Spektrum über einen längeren Zeitraum verändert. Dargestellt sind die Kontraktionen der Herzmuskelzellen in 3D-Strukturen, die nicht manipuliert wurden. Der linke und rechte Graph stammen von unabhängigen Messungen. Die Frequenz der Zelle zu Anfang der Messung ist zur Orientierung als senkrechte gestrichelte Linie dargestellt.

Die Analyse von zwei solchen Videos ist in Abbildung 5.3 gezeigt. Die Auswertung der Aufnahmen geschah wie in Kapitel 3.11 beschrieben mit Matlab. Man kann sehen, dass die Frequenz der Kontraktionen zu Beginn der Messung etwa bei 1,7 Hz lag. In beiden Fällen nahm die Frequenz leicht ab, was daran liegen könnte, dass die Zellen durch das Licht während der Aufnahme und die unter dem Mikroskop evtl. leicht veränderten Kulturbedingungen gestört waren. Es wird jedoch auch deutlich, dass die Bedingungen gut genug waren, dass die Zellen bis zum Ende der Aufnahme, also in beiden Fällen etwa eine Stunde, kontrahierten.

Im Vergleich der beiden Zellen fällt aber auch auf, dass es zwischen verschiedenen Zellen große Unterschiede im Kontraktionsverhalten gibt. So veränderte sich bei der linken Zelle die Kontraktionsfrequenz ständig und scheinbar erratisch. Bei der rechten Zelle hingegen nahm zwar die Frequenz über den gesamten Zeitraum ab, dies allerdings recht stetig. Es gab nur zwei kurze Episoden bei etwa 20-25 Minuten und bei 50-55 Minuten, während

derer die Zelle kurz weniger periodisch und dafür schneller kontrahierte. Dies zeigt sich an der Verbreiterung des Fourierspektrums und seiner Verschiebung zu höheren Frequenzen.

Da es also sehr große Unterschiede zwischen verschiedenen nicht manipulierten Zellen gibt, muss man bei der Manipulation eine sehr eindeutige Veränderung des Kontraktionsverhaltens messen, um behaupten zu können auf das sonst spontane Zellverhalten Einfluss genommen zu haben. Die sehr verschiedenen Verhaltensweisen der Zellen in den Mikrostrukturen könnten daran liegen, dass man bei der Präparation von embryonalen Herzen eine sehr inhomogene Population von Herzmuskelzellen erhält. In den folgenden Kapiteln werden nun einige Messungen vorgestellt, die durchgeführt wurden, um solch deutliche und reproduzierbare Reaktionen zu herbeizuführen.

5.3 Mikromanipulation mit gleichbleibender Frequenz

Zunächst wurde getestet, ob sich durch sinusförmiges Dehnen mit einer konstanten Frequenz eine deutliche Änderung des Frequenzspektrums einer Kardiomyozyte in den 3D-Strukturen erreichen lässt. Hierzu wurde eine Frequenz nahe der Eigenfrequenz einer kontrahierenden Zelle gewählt. Dies geschah, damit die Zelle keine zu extreme Änderung in ihrem Kontraktionsverhalten herbeiführen muss, um sich der Anregungsfrequenz anzupassen. Sofern die Zelle positiv auf diese Manipulation reagiert, erwartet man eine Verschiebung des Spektrums der Zellkontraktionen hin zur Anregungsfrequenz. Auch eine Stabilisierung des Kontraktionsverhaltens wäre denkbar und an den Messungen in einer Verschmälerung des Spektrums zu erkennen. Bei negativer Reaktion auf den Stimulus wäre es denkbar, dass die Zelle aufhört zu kontrahieren oder es nur noch unkoordiniert und unregelmäßig zu Kontraktionen kommt.

Bei Betrachtung der Messungen in Abbildung 5.4, lässt sich folgendes erkennen: Die Frequenz des Mikromanipulators ist in beiden Fällen kleiner als die der Zelle und als scharfe senkrechte Linie in den Spektren zu sehen. Dies erklärt sich folgendermaßen: Die Manipulatorspitze ist als Schatten über fast der gesamten Struktur sichtbar und erscheint daher auch als Teil des Signals bei der Kreuzkorrelation der Bildausschnitte. Die Zelle, die links dargestellt ist, wurde zwei mal für 20 Minuten mit einer Frequenz von 1,2 bzw. 1,4 Hz angeregt. Bei höheren Frequenzen kann man jeweils dünnere senkrechte Linien erkennen. Dies sind höhere Harmonische der nicht perfekt sinusförmigen Bewegung der Struktur während der Mikromanipulation. Die rechte Zelle wurde vier Mal für ca. zehn Minuten angeregt. Die Frequenz dieser Anregung lag bei etwa 1,2 Hz. Es ließ sich jedoch bei keiner der gezeigten Zellen eine der erhofften Reaktionen nachweisen. Auch bei weiteren Experimenten, die durchgeführt wurden (hier nicht gezeigt) ändert sich das Bild nicht. Die Leistungsspektren der Zellbewegungen zeigen keine deutlichen Änderungen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

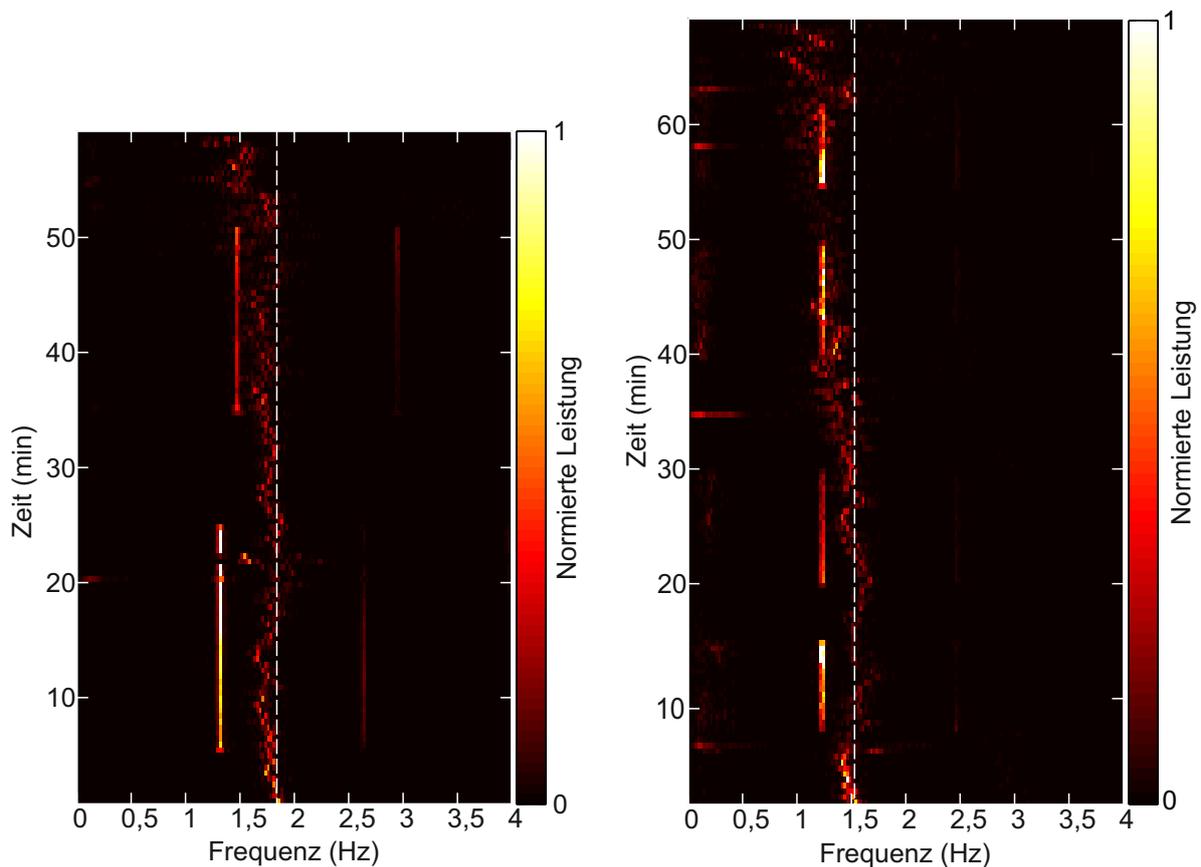


Abbildung 5.4: Darstellung der Kontraktionen von zwei Herzmuskelzellen als Farbplot der Leistung des Fourierspektrums von aufeinanderfolgenden Abschnitten der Bewegung von 30 s Länge. Dargestellt sind die Kontraktionen der Herzmuskelzellen in einer 3D-Struktur, die mit konstanter Frequenz manipuliert wurden. Der linke und rechte Graph stammen von unabhängigen Messungen. Die konstanten Frequenzanteile, die als vertikale Linien erscheinen, entsprechen der Anregungsfrequenz und deren Harmonischen. Die Frequenz der Zelle zu Anfang der Messung ist zur Orientierung als senkrechte gestrichelte Linie dargestellt. Es sind keine Reaktionen der Zellen auf die mechanische Manipulation erkennbar.

5.4 Mikromanipulation mit variierender Frequenz

Da die Experimente mit konstanter Frequenz keine Zellreaktionen auf den mechanischen Stimulus zeigten, wurden Experimente mit stufenweise steigender Frequenz durchgeführt. Durch den größeren abgedeckten Frequenzbereich erhofft man sich, dass die Chance auf eine eindeutige Zellreaktion größer ist, als bei den Messungen mit konstanter Frequenz. Eine Messung dieser Art ist in Abbildung 5.5 gezeigt. Auch in diesem Fall ist keine positive Zellreaktion zu erkennen. Die Zelle zeigt allerdings eine negative Reaktion im höheren Frequenzbereich: Sie hört bei der gezeigten Messung oberhalb einer gewissen Anregungsfrequenz auf, koordiniert zu kontrahieren. Das gleiche gilt auch für eine weitere Messung, die noch in einem älteren Strukturdesign gemacht wurde und daher hier nicht gezeigt ist.

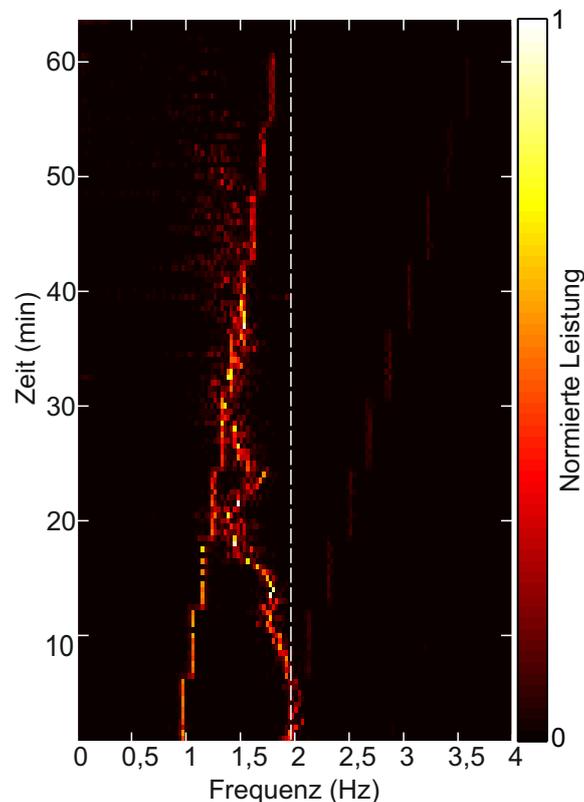


Abbildung 5.5: Darstellung der Kontraktionen einer Herzmuskelzelle als Farbplot der Leistung des Fourierspektrums von aufeinanderfolgenden Abschnitten der Bewegung von 30 s Länge. Dargestellt sind die Kontraktionen einer Herzmuskelzelle in einer 3D-Struktur, die mit in Stufen ansteigender Frequenz manipuliert wurden. Die Frequenz der Zelle zu Anfang der Messung ist zur Orientierung als senkrechte gestrichelte Linie dargestellt. Mit zunehmender Manipulationsfrequenz verliert die Zelle die Fähigkeit zur regelmäßigen Kontraktion.

5.5 Mikromanipulation mit gepulster Anregung

Nachdem die in den vorhergehenden Kapiteln vorgestellte Methode der Mikromanipulation und Analyse keine positiven Zellreaktionen messbar machen konnte, wurde der Versuch leicht verändert. In manchen Experimenten konnte beobachtet werden, dass Zellen, die zunächst nicht kontrahieren, damit anfangen, sobald man die Struktur mit dem Manipulator berührt.

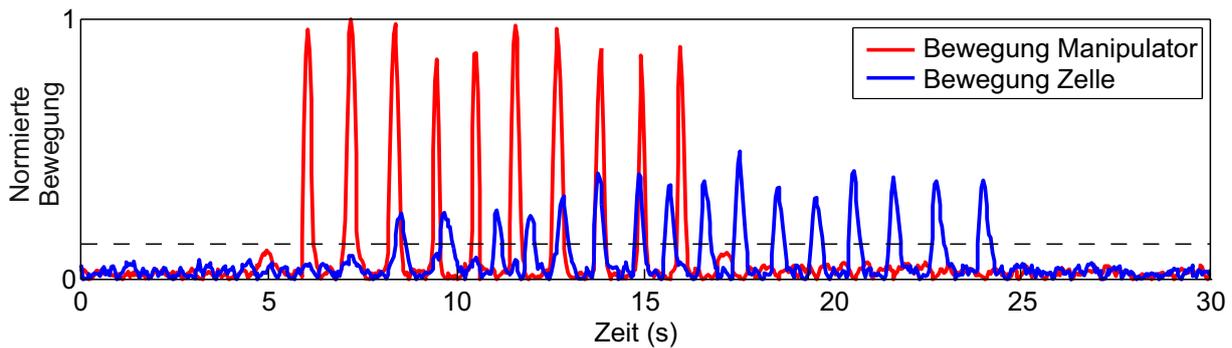


Abbildung 5.6: Die Bewegung einer Herzzelle und der Struktur an der vom Mikromanipulator verbogenen Stelle. Man kann erkennen, dass die Zelle scheinbar durch die mechanische Reizung zu kontrahieren beginnt. Die Auswertung geschah wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben und die Bewegungen sind auf die maximale Amplitude des Mikromanipulators normiert dargestellt.

Daher wurde von der zuvor angewendeten Anregung über lange Zeiträume zu einer mit wenigen Anregungspulsen gewechselt. Hierbei wurde die Struktur jeweils zehn mal im Sekundentakt verformt. Die Verformung geschah nicht mehr sinusförmig, sondern in kurzen Pulsen von 0,5 s Länge. Anschließend folgte eine zweiminütige Ruhepause. Danach wurde die Zelle erneut zehn Mal angeregt. Das Ganze wurde an jeder Zelle zehn Mal wiederholt. Ein Ausschnitt von 30 s Länge solch einer Messung ist in Abbildung 5.6 gezeigt. Nun kann das Kontraktionsverhalten einzelner Zellen in den Zeiten unmittelbar vor (also ungestört), während und unmittelbar nach dieser Anregung miteinander verglichen werden. Die Größe, die für diesen Vergleich herangezogen wird, ist die Anzahl an Kontraktionen pro Zeiteinheit (Kontraktionsrate), die auf die mittlere Kontraktionsrate der Zellen über die gesamte Messung hinweg normiert wird.

Dieses Verfahren scheint bei den ersten Messungen tatsächlich eine Zellreaktion zu belegen. Es waren bei diesen Messungen die Schlagraten während der Manipulation höher als unmittelbar davor und danach. Nachdem allerdings sieben unabhängige Messungen dieser Art durchgeführt worden waren, ließ sich diese Schlussfolgerung nicht bestätigen und die Experimente wurden eingestellt. Die einzelnen Messungen sind in Anhang B zu sehen, Abbildung 5.7 zeigt die Mittelung über alle Messungen. Man sieht hier, dass die Streuung der Mittelwerte so groß ist, dass sie für alle Zeiten fast an die mittlere Frequenz heranreicht. Dies wiederum bedeutet, dass auf Grundlage der Messung zu diesem Zeitpunkt keine statistisch relevante Aussage getroffen werden kann. Allerdings scheint die

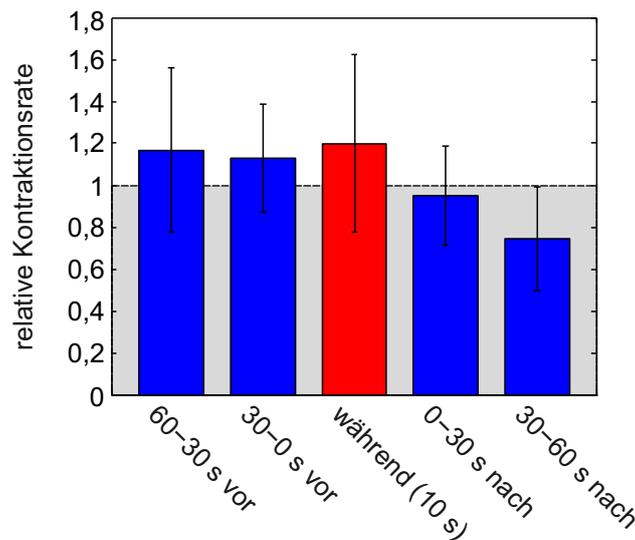


Abbildung 5.7: Die Schlagraten von Herzmuskelzellen vor, während und nach der mechanischen Anregung mit 10 kurzen Pulsen. Die Kontraktionen pro Zeiteinheit werden gezählt und auf die mittlere Kontraktionsrate im gesamten Video normiert (durch die Linie auf der Höhe 1 angedeutet). Die Fehlerbalken zeigen die Unsicherheit auf den Mittelwert. Es zeigt sich, dass keine statistisch signifikante Veränderung im Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten nachgewiesen werden kann.

Kontraktionsrate der Zellen unmittelbar nach der Mikromanipulation herunterzugehen, was dafür spricht, dass die Zellen hierdurch aus dem Takt gebracht werden.

5.6 Kommunikation mechanisch gekoppelter Herzmuskelzellen

Die mechanische Stimulation der Herzmuskelzellen in den Mikrostrukturen mit Hilfe des Mikromanipulators kann wegen der Verdunstung des Mediums nur über Zeiträume von etwa einer Stunde aufrecht erhalten werden. Daher wurde noch ein weiterer Ansatz verfolgt, um die rein mechanische Kommunikation von Herzmuskelzellen zu untersuchen. Die grundlegende Idee, die hierbei verfolgt wurde, ist folgende: Die Kardiomyozyten sollen durch eine geeignete Struktur daran gehindert werden Gap Junctions (Kapitel 2.1.4) aufzubauen. Dennoch sollen sie weiterhin in der Lage sein, mechanisch aufeinander Einfluss zu nehmen. Dies sollte z. B. durch eine Membran, die dünn und weich genug ist, um von einzelnen Zellen verformt zu werden, möglich sein. Wenn nun zwei Kardiomyozyten nur durch solch eine Membran voneinander getrennt sind, werden sich die Zellen über die Zeit, die sie sich in Kultur befinden (24 Stunden), gegenseitig verformen. Somit kann gemessen werden, ob diese Zellen sich durch die mechanische Interaktion in ihrem Kontraktionsverhalten aneinander angleichen.

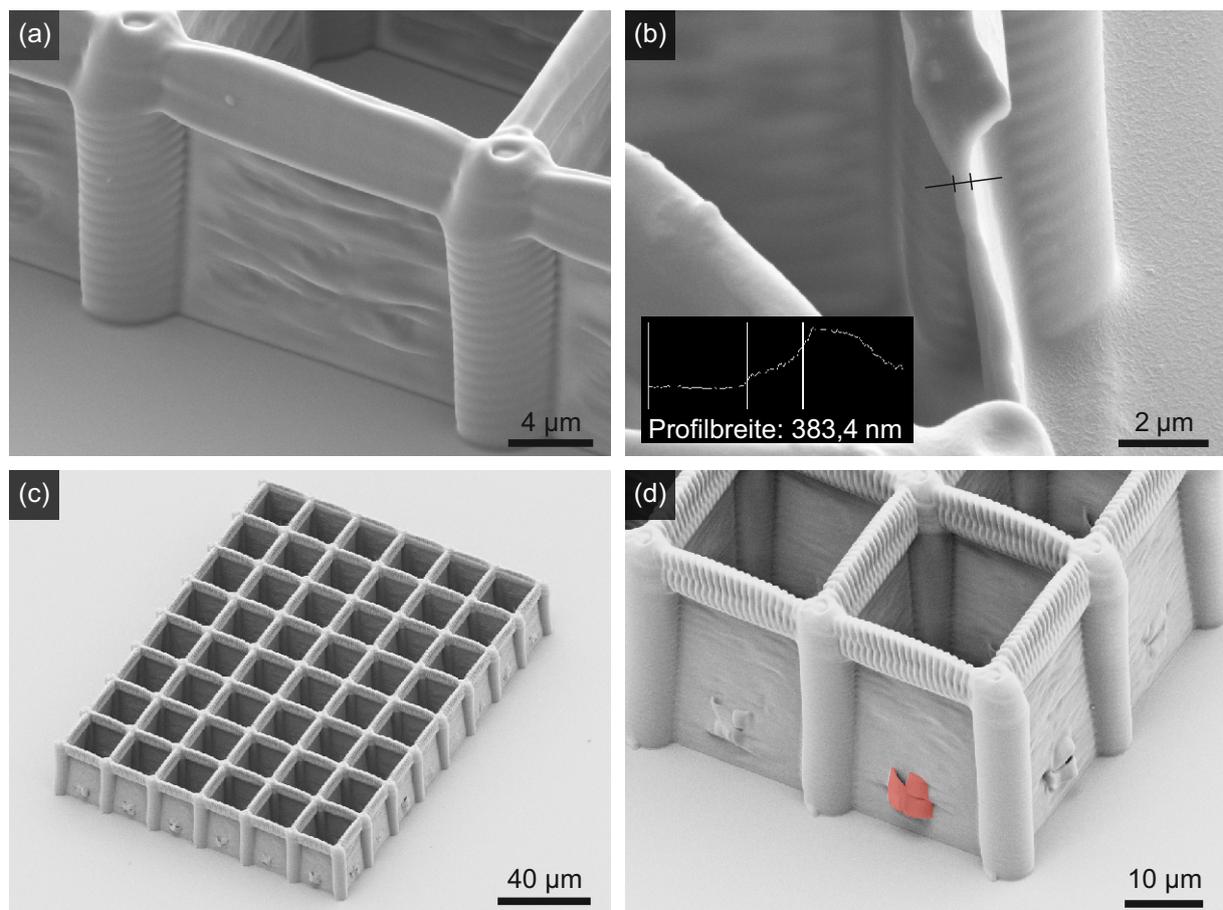


Abbildung 5.8: REM-Aufnahmen von Strukturen, wie sie für die Experimente zur mechanischen Kommunikation von Herzmuskelzellen verwendet wurden. (a) Gerüst der Struktur aus PDL: Man kann den Rahmen sowie die danach geschriebene Membran erkennen. (b) Nahaufnahme einer solchen Struktur. Hier ist die Membran gerissen und man kann die Dicke messen. (c), (d) Fertigen PDL-Struktur um Kontaktpunkte aus Ormocomp ergänzt. Die Strukturen haben 6×8 Kompartimente der Größe $23 \mu\text{m} \times 23 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$. Die Kontaktpunkte wurden als horizontale Ringe mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ realisiert (rot eingefärbt in (d)).

Strukturdesign

Als Strukturen für das oben beschriebene Experiment wurden durch Membranen getrennte würfelförmige Kompartimente gewählt (Abbildung 5.8). Damit die Herzzellen nicht die gesamte Struktur überwachsen, wurden diese Strukturen aus PDL geschrieben und an der Membran um Kontaktpunkte aus Ormocomp ergänzt. Um möglichst filigrane Membranen zu erhalten wurden zunächst massive Rahmen geschrieben und die Membranen in diese Rahmen eingehängt. Die Rahmen bestehen aus Säulen, die in einem quadratischen Raster von $23 \mu\text{m} \times 23 \mu\text{m}$ angeordnet sind. Diese Säulen sind mit stabilen Balken zu einem Gerüst verbunden. Indem man nun mit sehr wenig Laserleistung nah aneinander liegende Linien zwischen diese Säulen schreibt, lassen sich Membranen

5.6 Kommunikation mechanisch gekoppelter Herzmuskelzellen

realisieren, die bis zu 400 nm dünn sind (Abbildung 5.8(b)). Die Höhe der Struktur beträgt 30 μm . Zusätzlich wurde der Boden der Kompartimente mit einer Lage PDL passiviert: Es hat sich herausgestellt, dass andernfalls die Zellen hauptsächlich zum Boden Kontakte ausbilden und daher nur noch selten auch an den Membranen ziehen.

Um eine Adhäsion der Zellen an den Membranen zu ermöglichen, werden an diesen Kontaktpunkte aus Ormocomp angebracht. Diese müssen auf den unteren Bereich der Struktur beschränkt werden, da es sonst zum Überwachsen der Strukturen durch die Herzmuskelzellen kommt. Aus demselben Grund können keine Membranen aus Ormocomp verwendet werden, was sonst naheliegend gewesen wäre. Um die Membranen trotz des zusätzlich aufgetragenen Materials möglichst flexibel zu halten, darf nur eine recht geringe Menge an Material direkt auf die Membran geschrieben werden. Da die Membranen allerdings anfangen sich zu verformen, sobald Ormocomp auf die PDL-Strukturen getropft wird, darf die Ormocomp-Struktur auch nicht zu klein sein: Sonst würde man die Membran entweder gar nicht oder nur von einer Seite funktionalisieren. Daher wurden als Adhäsionspunkte Ringe mit einem Durchmesser von 2 μm gewählt (Abbildung 5.8(c) und (d)).

Aufgrund der elongierten Form der Herzmuskelzellen *in vivo* und auch in Kultur auf 2D-Substraten, wurde zwischenzeitlich der Ansatz verfolgt, den Kompartimenten eine lange rechteckige Grundform zu geben. Leider verbiegen sich die Strukturen im Zellkulturmedium aufgrund der Hydrophilie von PDL derart stark, dass die Öffnungen oben sehr schmal werden und keine Zellen mehr in die Kompartimente eingebracht werden können. Daher wurde für das hier gezeigte Experiment die quadratische Form gewählt.

Kardiomyozyten in Kompartimenten

Um zu erreichen, dass zwei einzelne Zellen in direkt aneinander angrenzenden Kompartimenten an die Membranen adhären und dass diese Zellen dann auch noch spontan kontrahieren, reicht es nicht die Zellen (wie für die anderen Experimente in Kapitel 3.6.4 beschrieben) einfach auf die Strukturen zu tropfen: Man würde nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit Zellen in benachbarten Kompartimenten erhalten, oder die gesamte Struktur mit mehr als einer Zelle pro Kompartiment füllen. Daher wurde ein Mikroinjektor (Aureka von Aura Optik) verwendet, um gezielt in jedes Kompartiment genau eine Zelle einzusetzen.

Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass sich zwei kontrahierende Herzmuskelzellen in benachbarten Kompartimenten befinden und an der sie trennenden Membran ziehen. Von diesen Zellen wurde nach 24 h Kultivierung ein Video von 300 s Länge aufgenommen, um ihr Kontraktionsverhalten zu analysieren. Anschließend wurden sie immunohistochemisch gefärbt und mit dem LSM Bilderstapel von ihnen aufgenommen. 3D-Rekonstruktionen dieser Bilderstapel sind in Abbildung 5.9 zu sehen. Die Zellen sind hier aus verschiedenen Perspektiven dargestellt, die mit den Koordinatenachsen angezeigt sind. Man kann anhand der Bilder erkennen, dass die Zellen Kontakt zur Membran haben und diese

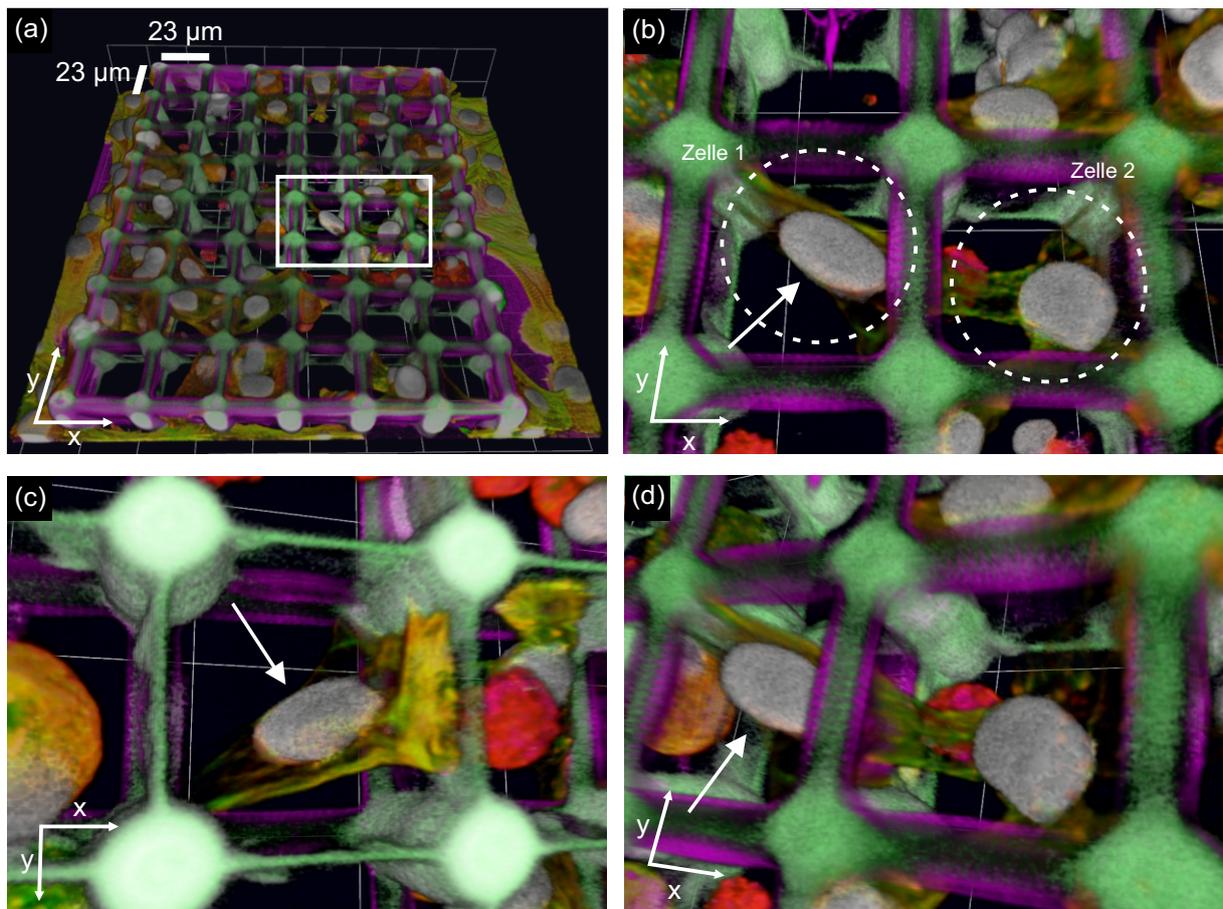


Abbildung 5.9: Mittels Velocity erstellte 3D-Rekonstruktionen von Kardiomyozyten in den Kompartimenten (grün: F-Aktin, rot: α -Aktinin, magenta: Fibronektin, weiß: Zellkerne und PDL, die Grundfläche der Kompartimente ist $23\ \mu\text{m} \times 23\ \mu\text{m}$). (a) Übersichtsbild der Struktur und der Zellen. (b) Vergrößerung des in (a) markierten Bereichs. Hier befinden sich zwei Zellen, die jeweils zu einer Seite der Membran Kontakt haben. (c) Blick von unten (durch das Deckglas hindurch) auf den in (b) dargestellten Bereich. (d) gedrehte Darstellung desselben Bereichs, die einen Blick auf die Membran ermöglicht. Der weiße Pfeil deutet immer auf die selbe Stelle von Zelle 1.

Membran auch nicht über Öffnungen verfügt, durch die eine direkte Kommunikation der Zellen möglich gewesen wäre.

Das Video der kontrahierenden Zellen lässt sich wie in Kapitel 3.9 beschrieben analysieren. In Abbildung 5.10(a) und (b) sind die Fourierspektren der Bewegungen der Zellen in x - und y -Richtung dargestellt. Man sieht, dass die Bewegungen von Zelle 1 in y -Richtung sehr unregelmäßig sind. Die Bewegungen in x -Richtung allerdings sind sehr regelmäßig, wie die schmale Form des Fourierspektrums zeigt. Eine sehr ähnliche Form hat das Fourierspektrum von Zelle 2 in beide Richtungen. Dieses Verhalten lässt sich folgendermaßen interpretieren: Zelle 2 verformt in x -Richtung die Membran zwischen den Zellen. Durch diese Verformung wird auch Zelle 1 verformt, was man am x -Spektrum ihrer

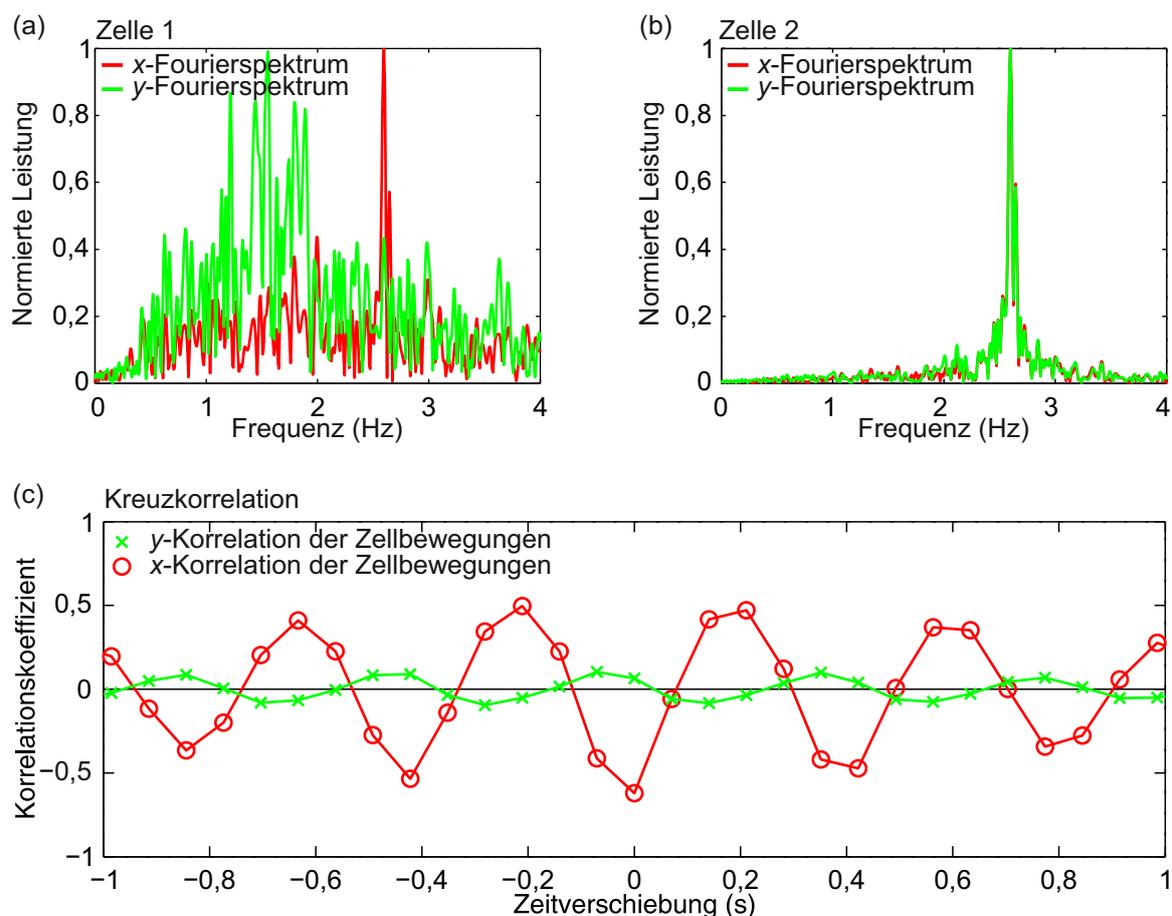


Abbildung 5.10: Analyse der Kontraktionen der in Abbildung 5.9 gezeigten Zellen. (a) Leistung des Fourierspektrums der Kontraktionen von Zelle 1 in x - und y -Richtung. (b) Leistung des Fourierspektrums der Kontraktionen von Zelle 2 in x - und y -Richtung. (c) Korrelationen der Zellbewegungen beider Zellen. (c) Dynamische Korrelation der Zellbewegungen.

Bewegung sehen kann. Allerdings scheint sie sich in ihrem Kontraktionsverhalten nicht Zelle 2 anzupassen, wie sich anhand der davon unabhängigen Bewegung in y -Richtung erkennen lässt.

Diese These wird durch weitere Analyse der Videos unterstützt. Die Kreuzkorrelationen der Bewegungen in x - und y -Richtung (Abbildung 5.10(c)) zeigen, dass die Bewegungen in y -Richtung unkorreliert sind (Werte nahe der Null). Die Bewegungen in x -Richtung allerdings sind stark korreliert bzw. antikorreliert. Es kommt also wie geplant zu einer mechanischen Stimulation einer Kardiomyozyte durch eine andere, ohne dass es auch zu einem direkten Kontakt beider Zellen kommt. Allerdings scheint dies trotz der 24 Stunden Inkubationszeit nicht dazu zu führen, dass die Zellen sich in ihrem Kontraktionsverhalten einander angleichen.

5.7 Diskussion

Auf den vorhergehenden Seiten wurden einige Experimente gezeigt, mit denen versucht wurde, Reaktionen von Kardiomyozyten auf rein mechanische Stimuli nachzuweisen. Allerdings konnten bei keiner der gezeigten Methoden solche Reaktionen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Hierfür kann es eine Vielzahl von Gründen geben, die im Folgenden diskutiert werden.

Bei Experimenten anderer Gruppen, bei denen an Kardiomyozyten gezogen wurde [89], waren die Amplituden im Bereich von 10 % der Gesamtlänge der Zelle (siehe Kapitel 2.3). Mit der hier verwendeten Struktur kann diese Amplitude nicht erreicht werden. Möglicherweise kann also unter den gezeigten Versuchsbedingungen keine Änderung der Schlagrate beobachtet werden, da der mechanische Einfluss nicht groß genug ist. Wie sich in den späteren Experimenten gezeigt hat, hätten höhere Strukturen größere Verformungen ermöglicht. Dies muss allerdings nicht zwangsläufig zu besseren Ergebnissen führen, denn es ist durchaus möglich, dass Herzmuskelzellen eine Verformung über die gesamte Länge (also ein Strecken aller Sarkomere) benötigen, um eine Reaktion in Bezug auf das Kontraktionsverhalten zu zeigen. Dies wäre mit dem Ansatz der Verformung von 3D-Strukturen nur schwer umzusetzen, da man mit dem Mikromanipulator nur einen kleinen Teil der Strukturen verformen kann.

Ein weiteres Problem in der Akquisition aussagekräftiger Daten könnte auch sein, dass die Population von Zellen, die man durch die Präparation von Hühnerembryonen erhält, nicht ausreichend homogen ist. Zum einen enthält das Präparat einen nicht geringen Anteil an Fibroblasten (Kapitel 3.6.2), zum anderen aber auch eine Mischung von Kardiomyozyten in den verschiedensten Stadien der Entwicklung. Dies ist nicht nur deswegen der Fall, weil ein einzelnes Herz Muskelzellen enthält, die verschiedene Aufgaben wahrnehmen und deswegen große Unterschiede im Verhalten aufweisen [131, 132], sondern auch, weil die Zellen mehrerer Embryonen zusammen verwendet werden. Diese Embryonen wurden zwar gleich lange im Brutschrank bebrütet, dennoch sind die Embryonen in der Entwicklung nie vollkommen gleich. Diese Diversität der Zellkultur zeigt sich auch an dem stark unterschiedlichen Verhalten der vermessenen Kardiomyozyten, wie es in den Abschnitten 5.2 und 5.5 beschrieben ist.

Aus diesem Grund wurde im Zuge dieser Arbeit ebenfalls versucht, die Experimente an einer Zelllinie von Herzmuskelzellen aus Mäusen durchzuführen [133]. Dies hat den Vorteil, dass man eine sehr homogene Population hat und darüber hinaus die Zellen auch ohne die zeit- und kostenintensive Präparation zu Verfügung stehen. Es hat sich bei der Kultivierung dieser Zelllinie und bei den Experimenten mit 3D-Mikrostrukturen jedoch herausgestellt, dass Zellen dieser Zelllinie nur im Verbund mit vielen anderen Zellen kontrahieren und daher für Experimente an isolierten Zellen nicht geeignet sind.

Auch bei den Experimenten zu rein mechanisch gekoppelten Herzmuskelzellen konnte nicht beobachtet werden, dass es zu einer Angleichung der Kontraktionen kommt. Ein

möglicher Grund hierfür kann sein, dass die Membran so steif ist, dass der Kontakt nicht ausreichend ist. Andererseits gibt es auch Experimente, in denen Herzmuskelzellen direkt im Kontakt zueinander standen und die Gap Junctions chemisch blockiert wurden. Hier verloren sie schon kurze Zeit nach der Zugabe der Chemikalie die Fähigkeit synchron zu kontrahieren [134].

6 Embryonale Hühnerfibroblasten unter dem Einfluss mechanischer Kräfte

Ein weiteres interessantes Feld, in dem die hier entwickelte Methode eingesetzt werden kann, ist die Untersuchung der Reaktion auf mechanische Reize von Bindegewebezellen, wie z. B. Fibroblasten. Diese Zellen haben nicht die Möglichkeit, rhythmisch zu kontrahieren, wie dies Herzmuskelzellen tun. Dennoch sind sie in der Lage, Kräfte auf ihre EZM auszuüben und auch Kräfte wahrzunehmen, die von außen auf sie ausgeübt werden. In diesem Fall lassen sich die Zellreaktionen nicht direkt anhand der Deformation der Struktur messen. Stattdessen müssen die Zellen nun unmittelbar nach dem Experiment fixiert werden und die Zellbestandteile, deren Reaktion man untersuchen will, immunohistochemisch gefärbt werden. Die Zellen, die für die nun vorgestellten Experimente verwendet wurden, sind embryonale Hühnerfibroblasten (CEFs, Kapitel 3.6.1 und 3.6.1).

Dies wurde in verschiedenen Konfigurationen umgesetzt: Es wurde für verschiedene Zeiten statisch und periodisch an der Zelle gezogen und es wurden anschließend verschiedene Zellbestandteile mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert: Das Aktin-Zytoskelett, die Zellkerne, die Fokaladhäsionskinase FAK und Paxillin. Um Aufschluss über die Aktivität von Paxillin und FAK zu bekommen, wird von FAK der Anteil gefärbt, der an Tyrosin 397 phosphoryliert ist, und Paxillin sowohl in seiner Gesamtheit als auch spezifisch auf die an Tyrosin 118 phosphorylierte Form. Des Weiteren wurde bei einigen Experimenten der Golgiapparat untersucht, um in Kombination mit der Lage der Zellkerne Rückschlüsse auf die Polarisierung der Zellen zu ziehen. FAK und Paxillin als wichtige Bestandteile der Zell-Matrix-Kontakte sollten Aufschlüsse über Veränderungen in eben diesen Kontakten geben. Durch die sehr reproduzierbare Form der Zellen in den Strukturen entstehen Möglichkeiten in der Auswertung der Messungen, die in der Zellbiologie neu sind. Diese Methoden und die daraus resultierenden Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Der Inhalt dieses Abschnittes ist bei Biomaterials eingereicht [135]. Das Aussähen auf die Mikrostrukturen und die immunohistochemische Färbung der im Folgenden gezeigten Zellen wurde von Stephanie Frank durchgeführt.

6.1 Mikrostrukturen zur Mikromanipulation von Fibroblasten

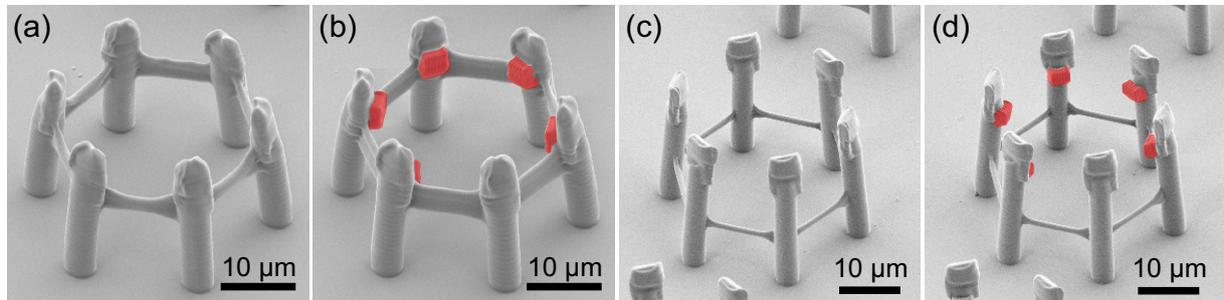


Abbildung 6.1: REM-Aufnahmen von Strukturen, wie sie für die Experimente an den Fibroblasten verwendet wurden (Kapitel 6). (a) und (c) zeigen das Gerüst der Struktur aus PDL in verschieden hohen Ausführungen. Die Säulen sind alle gleich und jede Säule kann als Hebel zur Mikromanipulation benutzt werden. Dadurch ist die Struktur hexagonal symmetrisch. (b) und (d) zeigen die fertigen PDL-Strukturen um kleine Würfel aus Ormocomp ergänzt (rot eingefärbt). Der Effekt der hohen Strukturen wird in Abbildung 6.4 gezeigt.

Das Ziel der in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente ist es, durch mechanische Stimulation bedingte Veränderungen an Aktin-Zytoskelett und den Zell-Matrix-Kontakten zu dokumentieren. Um dies möglichst effizient zu tun, wurden Mikrostrukturen mit sehr hoher Symmetrie gewählt, die über sechs kleine Stellen verfügen, an denen die Zelle adhären kann. Diese Stellen sind kleine Würfel aus Ormocomp, die an den Säulen der ansonsten vollkommen aus PDL aufgebauten Struktur angebracht sind (Abbildung 6.1). Dies führt nun dazu, dass die Zelle sehr definierte Kontakte mit homogener Größe ausbildet, was die Analyse erleichtert. Alle sechs Säulen, die die Adhäsionsflächen halten, sind gleichzeitig als Hebel verwendbar, über den die Struktur bei den Experimenten verformt werden. Der Abstand zwischen zwei Säulen beträgt wie bei den Kardiomyozyten $16\ \mu\text{m}$. Allerdings sind die Säulen hier anders als bei den für die Kardiomyozyten verwendeten Strukturen in einer hexagonalen Symmetrie angeordnet, die sich später auch in eine hohe Symmetrie der in diesen Strukturen wachsenden CEFs übersetzen soll. Die adhäsiven Würfel, die an diese Säulen geschrieben sind, haben eine Größe von etwa $3 \times 3 \times 3\ \mu\text{m}^3$, wobei sie entlang einer Achse um 50 % in die Säulen versenkt sind. Die Würfel befinden sich auf einer Höhe von 15 bzw. $20\ \mu\text{m}$, wobei die Säulen, die wie oben erwähnt auch zu Manipulieren genutzt werden können, $6\ \mu\text{m}$ höher sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser beiden Struktur-Varianten sind mit und ohne die Würfel aus Ormocomp in Abbildung 6.1 zu sehen.

Durch die Wahl dieser Geometrie kann davon ausgegangen werden, dass nur einer der sechs Zell-Matrix-Kontakte unmittelbar durch die Mikromanipulation verändert wird, die beiden angrenzenden Kontakte noch indirekt über das Zytoskelett der Zelle verändert werden und man drei Kontakte erhält, die von der Mikromanipulation kaum beeinflusst werden und die man dadurch als intrazelluläre Kontrolle nutzen kann.

6.1 Mikrostrukturen zur Mikromanipulation von Fibroblasten

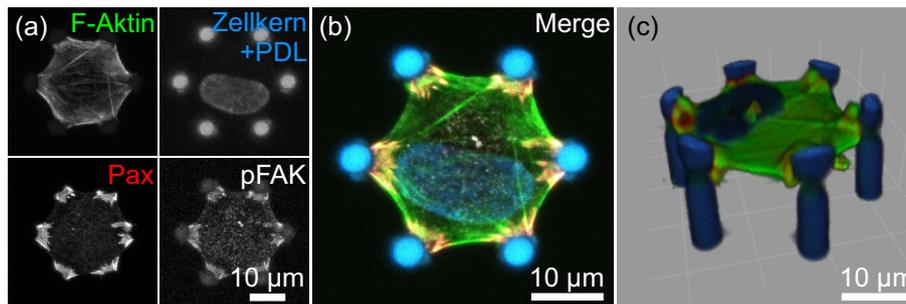


Abbildung 6.2: LSM-Stapel eines embryonalen Hühnerfibroblasten in einer Struktur wie sie in Abbildung 6.1 (d) gezeigt ist. (a) Maximalprojektion der einzelnen Kanäle. (b) kombinierte Darstellung dieser Maximalprojektion (grün: F-Aktin, rot: Paxillin, weiß: pFAK, blau: Dapi und PDL). (c) zeigt eine 3D-Rekonstruktion desselben Bilderstapels, die mit Imaris erstellt wurde.

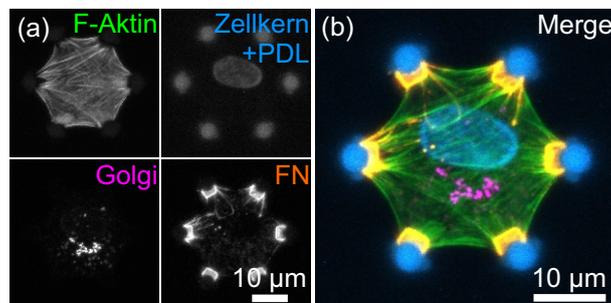


Abbildung 6.3: Eine weitere Zelle in einer gleichartigen Struktur, bei der andere Zellbestandteile angefärbt wurden. (a) Maximalprojektion der einzelnen Kanäle. (b) kombinierte Darstellung dieser Maximalprojektion (grün: F-Aktin, orange: Fibronectin, magenta: Golgi, blau: Dapi und PDL).

Sät man in solchen Mikrostrukturen CEFs aus, so kann man erstens feststellen, dass sich diese Zellen trotz der sehr geringen Proteindichte in diesen Strukturen aufspannen. Dies ist für die Variante der höheren Struktur in Abbildung 6.2 zu sehen. Die Zelle, die in dieser Abbildung gezeigt ist, wurde drei Stunden nach dem Aussäen immunohistochemisch gefärbt (Kapitel 3.7) und mit dem LSM mikroskopiert. In der Maximalprojektion (Kapitel 3.8) erkennt man die ausgeprägte Symmetrie der Zelle, die Kontakte zu allen sechs Ormocomp-Würfeln ausgebildet hat. Diese Symmetrie lässt sich sowohl am Zytoskelett erkennen (F-Aktin Färbung (grün)), als auch in den Kontakten (Färbung von Paxillin (rot) und pFAK (weiß) in (a)). Die Lage des Zellkerns scheint allerdings diese Symmetrie zu brechen, da er sich nicht in der Mitte der Zelle befindet. Schaut man sich allerdings die Maximalprojektion einer Zelle an, bei der der Golgi-Apparat gefärbt wurde (Abbildung 6.3), so sieht man, dass Kern und Golgi-Apparat zusammen gerade den mittleren Bereich der Zelle ausfüllen.

Abbildung 6.2 (c) Zeigt eine 3D-Rekonstruktion der Zelle. Hier erkennt man deutlich, dass die CEFs Kontakte zu allen sechs Ormocomp-Würfeln aufweisen und keine Kontakte zum

Boden hin ausbilden. Dies ist wichtig, da der gesamte Boden wie die Ormocomp-Würfel mit Fibronectin beschichtet sind. Würde die Zelle Kontakte dorthin ausbilden, wäre die sonst sehr definierte Morphologie der Zelle nicht mehr gegeben.

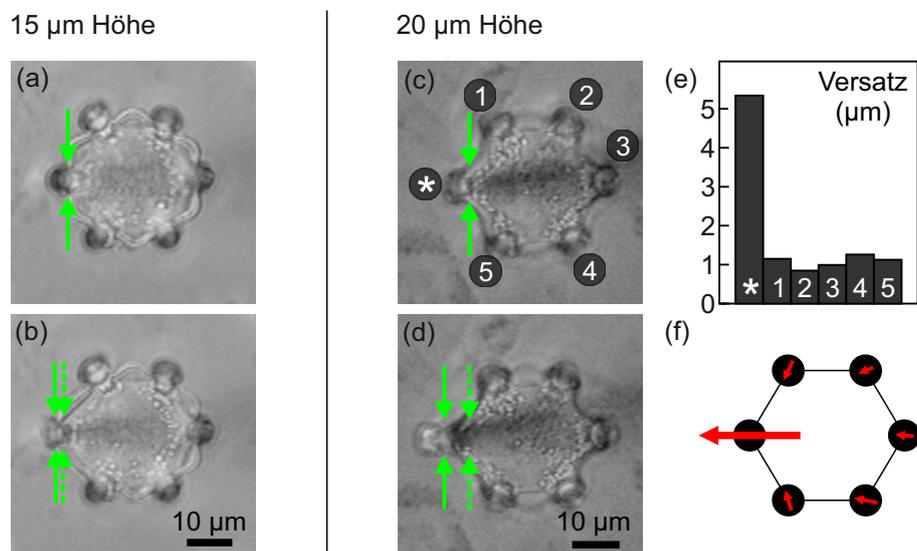


Abbildung 6.4: (a),(b) Einzelbild aus einem Video, das während der Manipulation eines Fibroblasten in den 15 µm hohen Strukturen aufgenommen wurde. (a) Zeigt die Ruhelage der Struktur, (b) die maximal mit dieser Struktur mögliche Auslenkung. Die Größe dieser Auslenkung ist durch die grünen Pfeile verdeutlicht. Der gestichelte Pfeil ist hierbei an der Ausgangsposition, der durchgezogene bei der Maximalauslenkung. (c) (d) maximale Auslenkung, die mit den 20 µm hohen Strukturen möglich ist. In (e) ist aufgetragen um wie viel sich die adhäsiven Würfel an der hohen Struktur bei maximaler Auslenkung betragsmäßig verschieben. In (f) sieht man den zugehörigen Winkel dieser Verschiebungen. Die Pfeile sind hierbei proportional lang zur maximalen Auslenkung aber der Deutlichkeit halber übergroß gezeichnet.

Wie zuvor erwähnt, wurden für die Experimente an Fibroblasten zwei verschiedene hohe Strukturvarianten getestet. Dies hat den Grund, dass man mit höheren Strukturen eine größere Auslenkung der manipulierten Säule erreichen kann. Dies soll nun anhand von zwei Beispielen, einer niedrigen und einer hohen Struktur, gezeigt werden. Auf Deckgläser, die solche Strukturen enthielten, wurden Zellen ausgesät und gewartet, bis sie sich ausgebreitet hatten. Danach wurde eine Struktur, die eine Zelle enthielt ausgewählt und unter den Manipulator gelegt. Hier wurde sie mit der für diese Struktur maximal möglichen Auslenkung, bei der das Risiko mit der Spitze von der Struktur abzurutschen noch nicht zu hoch war, ausgelenkt. Die Auslenkung wurde mit einer Videosequenz dokumentiert. In Abbildung 6.4 sind für beide Strukturhöhen (15 µm links, 20 µm rechts) je ein Bild der Ruheposition und eines der maximalen Auslenkung gezeigt. Schon durch einfaches Vergleichen dieser beiden Bilder offenbart sich der große Unterschied in der maximal möglichen Auslenkung. Dies ist durch die grünen Pfeile verdeutlicht.

Für die in den folgenden Abschnitten gezeigten Messungen wurden wegen der größeren maximalen Auslenkung immer die höheren Strukturen verwendet. Daher wurde für diesen

Fall vermessen, wie sehr sich die Säulen verbiegen lassen. Dazu wurde für die periodische Manipulation an einer Säule die Auslenkung auf Höhe der Zelle für alle sechs Säulen vermessen: Da diese durch die Zelle miteinander gekoppelt sind, kann es auch zu einer Auslenkung der nicht direkt durch den Mikromanipulator verbogenen Säulen kommen. Eine massive durch die Zellen vermittelte Verbiegung würde die Annahme widerlegen, dass nur ein Fokalkontakt durch die Manipulation beeinflusst wird. Für die Messung der Verformung wurden anhand des Videos, aus dem auch die Bilder in Abbildung 6.4 (d) und (e) stammen, für sechs periodische Auslenkungen die Extremalpositionen der Ormocomp-Würfel vermessen. Hieraus kann nun der Betrag der Auslenkung berechnet werden. Die gemittelte Maximalauslenkung ist in Abbildung 6.4 (e) gezeigt. Die maximal mögliche Auslenkung der manipulierten Säule beträgt $5,3\ \mu\text{m}$. Die Auslenkung der anderen Säulen ist mit etwa $1\ \mu\text{m}$ bei allen fünf ähnlich groß und wesentlich geringer als die der manipulierten Säule. Die Vektoren dieser Verschiebungen zeigen im Wesentlichen in Richtung der manipulierten Säule (Abbildung 6.4(f)). Damit sehen wir die Annahme, dass die verschiedenen Zell-Matrix-Kontakte als entkoppelt angesehen werden können, als gerechtfertigt an.

6.2 Mikromanipulation embryonaler Hühnerfibroblasten in 3D-Mikrostrukturen

Mit den Ergebnissen aus dem vorhergehenden Kapitel das zum einen die CEFs sich in den Mikrostrukturen aufspannen und dort morphologisch eine hohe Symmetrie ausbilden, soll nun getestet werden, ob sich diese Symmetrie durch Mikromanipulation an einer Säule brechen lässt. Hierzu wird auf der Probe eine Zelle ausgewählt, die unter dem Mikroskop (Differentieller Interferenzkontrast) aussieht, als würde sie an allen sechs adhäsiven Würfeln der Struktur Zell Matrix Kontakte ausbilden, ohne gleichzeitig am Boden zu adhären. Des Weiteren werden Zellen ausgewählt, bei denen sich aufgrund der Größe schließen lässt, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit nur über einen Zellkern verfügen. Letztendlich können diese Dinge aber erst nach der immunohistochemischen Färbung mit Bestimmtheit gesagt werden. Zellen, die diesen Bedingungen nicht entsprechen, müssen also bei der abschließenden Mikroskopie aussortiert werden. Diese Bedingungen werden gestellt, da eine Adhäsion am Boden die Symmetrie schon vor dem Experiment stören würde. Bei zwei Zellkernen kann nicht von einer normal entwickelten gesunden Zelle ausgegangen werden.

Wurde eine Zelle gefunden, die den Anforderungen voraussichtlich genügt, wird die Spitze des Mikromanipulators an die Struktur gefahren, die diese Zelle beherbergt. Nun wird für 15 Minuten eine der Säulen dieser Struktur zyklisch mit einer Frequenz von $f = 0,5\ \text{Hz}$ um die maximal mögliche Strecke nach außen gebogen, was zu einer Translation des adhäsiven Würfels von ca. $5,3\ \mu\text{m}$ führt.

Unmittelbar nach Ablauf dieser Zeit wird die Zelle noch auf dem Mikroskop fixiert, damit während der Manipulation aufgetretene strukturelle Veränderungen in der Zelle nicht rückgängig gemacht werden können. Anschließend folgt die immunohistochemische Färbung und Mikroskopie mit dem LSM.

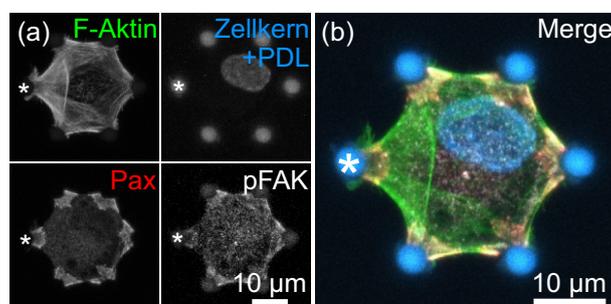


Abbildung 6.5: LSM-Stapel eines embryonalen Hühnerfibroblasten nach 15-minütiger Mikromanipulation bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von 5,3 µm. (a) Maximalprojektion der einzelnen Kanäle. (b) kombinierte Darstellung dieser Maximalprojektion (grün: F-Aktin, rot: Paxillin, weiß: pFAK, blau: Dapi und PDL).

Bei Betrachtung der Maximalprojektion einer solchen Zelle (Abbildung 6.5) stellt man fest, dass im Vergleich zu den nicht manipulierten Zellen (Abbildung 6.2 und 6.3) deutliche Veränderungen auftreten. In der Beispielzelle wurden F-Aktin, der Zellkern, Paxillin und phosphoriliertes FAK gefärbt. Der manipulierte Hebel ist mit einem Stern markiert.

F-Aktin ist als wichtigstes formgebendes und kraftübertragendes Element des Zytoskeletts prädestiniert, um Änderungen in eben diesem sichtbar zu machen. Tatsächlich zeigen sich deutliche Unterschiede zu den nicht manipulierten Zellen. In der Nähe des manipulierten Hebels ist wesentlich mehr F-Aktin vorhanden als in der gegenüberliegenden Zellhälfte. Des Weiteren werden Aktin-Bögen sichtbar, die in Richtung des manipulierten Hebels zeigen (Abbildung 6.5(a)).

Auch die Zell-Matrix-Kontakte, die mit Paxillin als Markierung ihrer Position und Ausdehnung sowie mit pFAK als Markierung für die Signalkaskade gefärbt wurden, sind im Vergleich zu der nicht manipulierten Vergleichszelle verändert. So scheint der Kontakt am manipulierten Hebel kleiner zu sein und auch über weniger pFAK zu verfügen als die anderen Kontakte der Zelle (vgl. Abbildung 6.2 und 6.5).

Nun kann natürlich anhand von einzelnen Zellen keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Effekte tatsächlich vorhanden sind oder nur durch die natürliche Streuung der Morphologie von Zellen zu Stande kommen. Hier lässt sich ausnutzen, dass die vermessenen Zellen in gleichartigen symmetrischen Mikrostrukturen gewachsen sind, und daher auch eine sehr ähnliche äußere Form und Größe haben. Hierdurch sind wir in der Lage direkt über die Ergebnisse von verschiedenen Experimenten zu mitteln. Für diese Mittelung werden die Maximalprojektionen der LSM-Aufnahmen von Zellen verschiedener Experimente zunächst alle in dieselbe Orientierung gebracht (manipulierter Hebel auf der linken Seite) und die Struktur und Zelle auf die Mitte des Bildausschnitts zentriert. Für die

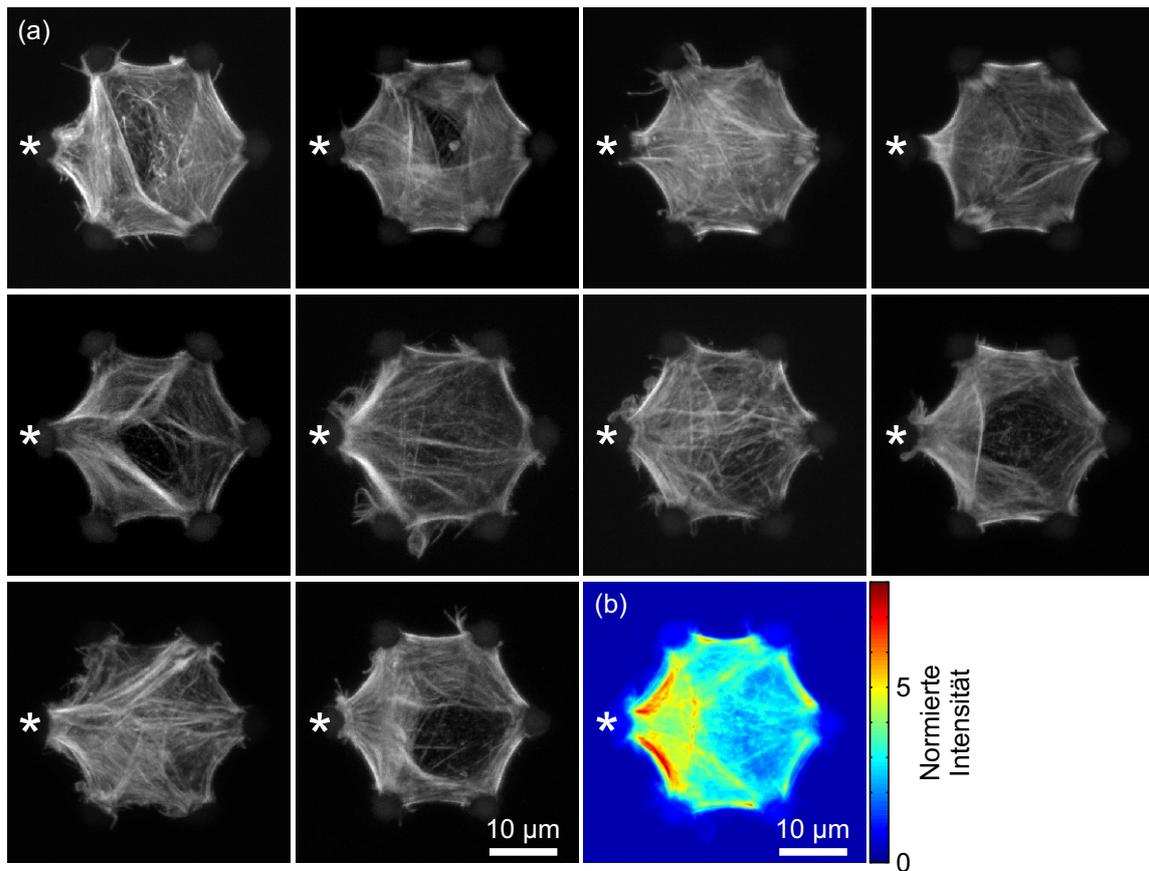


Abbildung 6.6: LSM-Stapel embryonaler Hühnerfibroblasten nach 15-minütiger Mikromanipulation bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von 5,3 μm . (a) Maximalprojektionen der F-Aktin-Kanäle der verschiedenen Zellen. (b) Gemittelte Maximalprojektion der F-Aktin-Kanäle. Die manipulierte Säule ist mit * gekennzeichnet.

Messungen, bei denen die Struktur 15 Minuten bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von 5,3 μm verformt wurde, sind diese gedrehten und zentrierten Bilder für den F-Aktin-Kanal in Abbildung 6.6 (a) gezeigt.

Die in Abbildung 6.6 (a) gezeigten Maximalprojektionen werden nun aufgrund der immer leicht variierenden Färbequalität und der Unterschiede, die bei der Bildaufnahme mit dem LSM zustande kommen, auf ihren Mittelwert normiert und die Grauwerte werden anschließend über die verschiedenen Zellen gemittelt. Durch die der Mittelung vorangehende Normierung wird vermieden, dass Zellen, die über eine besonders helle Färbung verfügen, mehr zur Mittelung beitragen als solche, die blasser gefärbt oder ein weniger dichtes Zytoskelett haben. Die resultierenden gemittelten normierten Intensitäten werden nun als Falschfarbendiagramm dargestellt. Für das Aktin-Zytoskelett ist dies in Abbildung 6.6 (b) gezeigt.

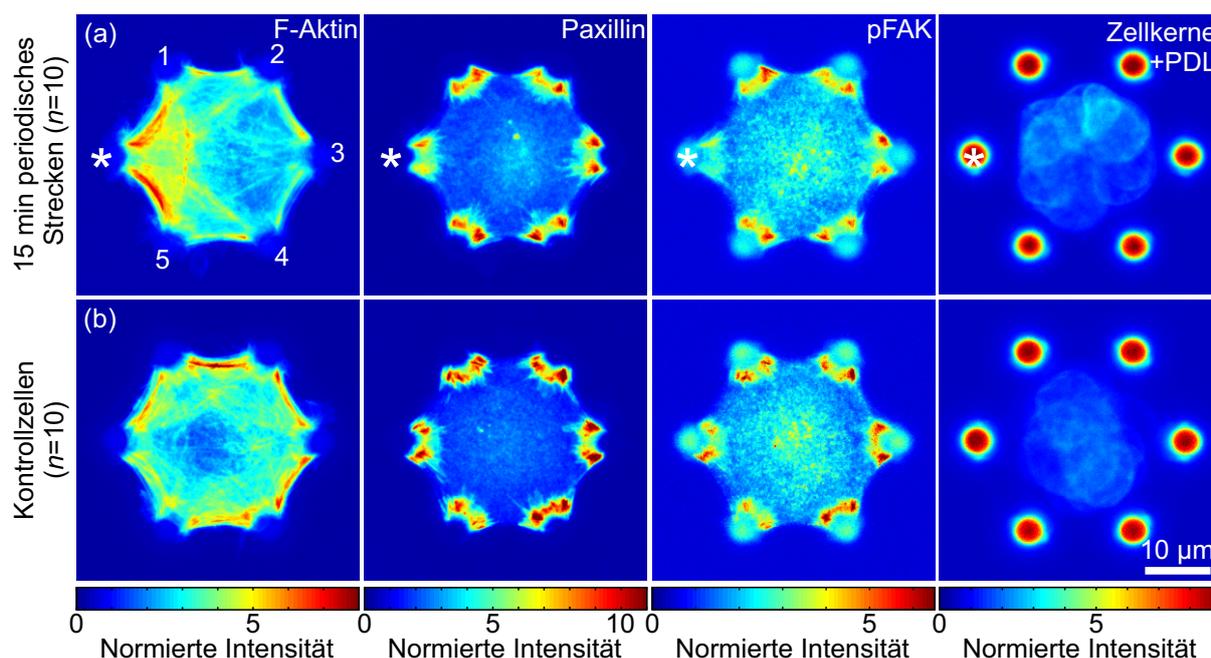


Abbildung 6.7: Falschfarbendarstellungen der normierten gemittelten Intensitäten von F-Aktin, Paxillin, pFAK und den Zellkernen (a) nach 15 Minuten periodischen Streckens bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von 5,3 µm und (b) für Kontrollzellen, die nicht verformt wurden. Die Kontrollzellen wurden jeweils von derselben Probe und unter denselben Einstellungen Mikroskopiert wie die manipulierten Zellen. Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Einzelmessungen können in Anhang C in den Abbildungen C.1 und C.2 eingesehen werden.

Zusammenfassend sind die Falschfarbendiagramme aller Kanäle (F-Aktin, Paxillin, pFAK und Dapi) in Abbildung 6.7 gezeigt. Hier sind auch die Falschfarbendiagramme von Kontrollzellen dargestellt. Für die Kontrollen wurde von jeder Probe, auf der eine Zelle vermessen wurde, eine Referenzzelle mit denselben Einstellungen am Mikroskop aufgenommen, die nicht manipuliert wurde. Auch diese Zellen werden wie die manipulierten gedreht, zentriert, normiert und gemittelt. Der Drehwinkel wird hierbei identisch zur entsprechenden manipulierten Zelle gewählt. In der Falschfarbendarstellung sind die Farbskalen für die manipulierten und Kontrollzellen dieselben, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die unterschiedlichen Kanäle wurden die Farbskalen angepasst. Die diesen Falschfarbendiagrammen zugrunde liegenden Maximalprojektionen sind im Anhang C.1 und C.2 gezeigt.

Man kann nun im direkten Vergleich der manipulierten Zellen und der Kontrollzellen sehen, dass sich die zuvor bei einer einzelnen Zelle gemachten Beobachtungen bestätigen lassen. Die Kontrollzellen verfügen im Mittel über ein sehr symmetrisches Zytoskelett, während die manipulierten Zellen auf der linken (der manipulierten) Seite über eine wesentlich höhere Dichte an F-Aktin verfügen als auf der anderen. Darüber hinaus lässt sich sagen, dass diese höhere Dichte sich nicht etwa in einer diffusen Konzentrationserhöhung des F-Aktin äußert, sondern sich Verstärkungen des Zytoskeletts entlang der Verbindungslinien vom manipulierten Hebel zu seinen nächsten (1 und 5) und

übernächsten Nachbarn (2 und 4) ausbilden. Des Weiteren bildet sich ein F-Aktin Bogen aus, der die beiden Nachbarn des manipulierten Hebels (1 und 5) miteinander verbindet und damit senkrecht zur Zugrichtung orientiert ist.

Auch anhand der Paxillin- und pFAK-Färbung kann man Unterschiede zwischen manipulierten und nicht manipulierten Zellen erkennen. So sind bei den nicht manipulierten Zellen alle sechs Kontakte in beiden Färbungen gleich groß und gleich hell gefärbt, was auf eine ähnliche Proteindichte schließen lässt. Bei den manipulierten Zellen hingegen zeigt der Kontakt zu dem manipulierten Hebel eine deutlich Veränderung. In beiden Kanälen ist er im Mittel weniger intensiv gefärbt und scheint etwas vergrößert. Dieser Effekt ist für die pFAK-Färbung wesentlich ausgeprägter als für Paxillin. Es wird anhand der hier gezeigten bildlichen Darstellung allerdings nicht ganz klar, ob hier die Fokalkontaktproteine in den entsprechenden Kontakten abgebaut (oder im Fall des pFAK vielleicht auch dephosphoriliert) werden oder ob sie sich auf eine größere Fläche verteilen.

Schaut man sich die Verteilung der Zellkerne an, so sieht man, dass in beiden Fällen (manipuliert und nicht manipuliert) die Zellkerne als diffuse Wolke in der Mitte der Zelle erscheinen, was bedeutet, dass sich durch den Manipulationsprozess keine bevorzugte Ausrichtung der Kernposition herausbildet.

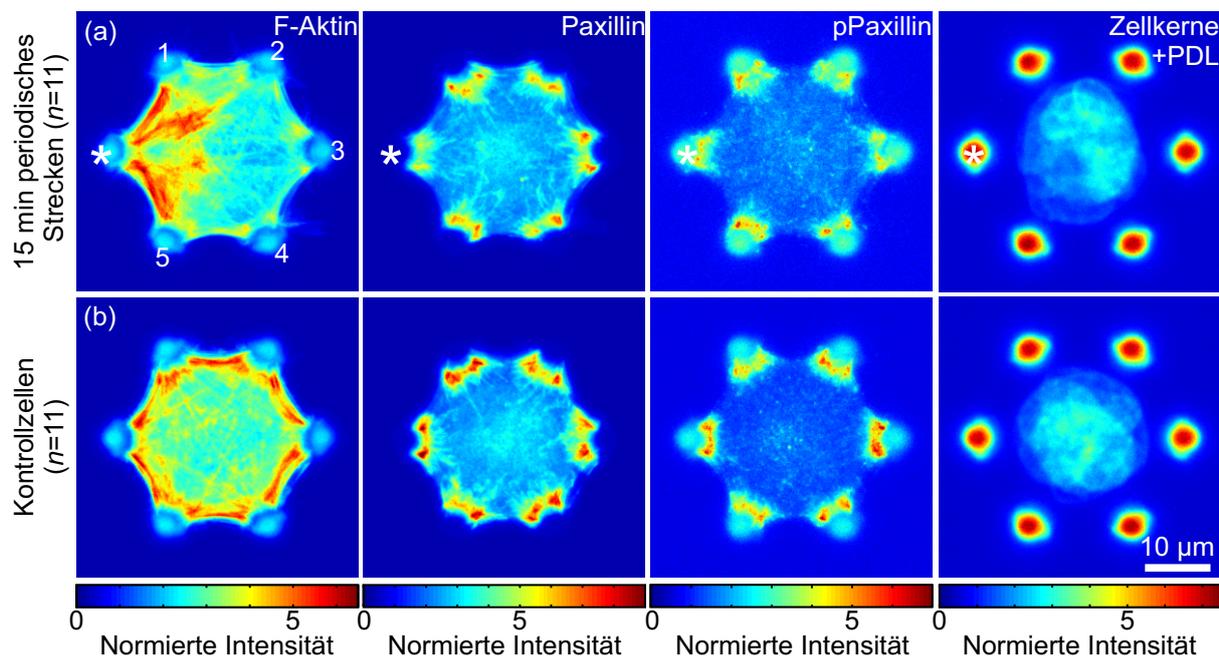


Abbildung 6.8: Falschfarbendarstellungen der normierten gemittelten Intensitäten von F-Aktin, Paxillin, pPaxillin und den Zellkernen (a) nach 15 Minuten periodischen Streckens bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von $5,3 \mu\text{m}$ und (b) für Kontrollzellen, die nicht verformt wurden. Die Kontrollzellen wurden jeweils von derselben Probe und unter denselben Einstellungen mikroskopiert wie die manipulierten Zellen. Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Einzelmessungen können in Anhang C in den Abbildungen C.5 und C.6 eingesehen werden.

Um die Vorgänge beim Umbau der Zell-Matrix-Kontakte besser zu verstehen, wurden die Experimente der periodischen Manipulation für 15 Minuten noch einmal wiederholt, und anschließend statt Paxillin die an Tyrosin 118 phosphorierte Form von Paxillin (pPaxillin) angefärbt. Dies soll klären, ob es im Paxillin tatsächlich wenig Veränderungen gibt, oder es ähnlich wie bei FAK zu Veränderungen in der Verteilung der phosphorierten Form, also im Aktivitätsniveau kommt (Kapitel 2.1.3 und [136–138]). Die Ergebnisse der Experimente mit der gemeinsamen Färbung von Paxillin und pPaxillin sind in Abbildung 6.8 gezeigt. Es wurde wie bei den Messungen mit der pFAK-Färbung zu jeder gemessenen Zelle eine Referenzzelle auf der gleichen Probe mit denselben Einstellungen aufgenommen. Es stellt sich heraus, dass der Phosphorierungsgrad von Paxillin nach 15 Minuten periodischen Streckens über alle sechs Zell-Matrix-Kontakte konstant bleibt. Anhand der Färbungen von F-Aktin, Paxillin und Zellkernen lässt sich zeigen, dass die Messungen mit denen aus Abbildung 6.7 sehr gut übereinstimmen.

6.3 Einfluss von Manipulationsmodus und -dauer

Da bereits nach 15 Minuten periodischen Streckens der CEFs sehr ausgeprägte Veränderungen in der Zellmorphologie sichtbar waren, untersuchten wir als nächstes die Auswirkungen bei periodischem Strecken über einen kürzeren Zeitraum von 5 Minuten. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss von statischem Strecken im Vergleich zu den periodischen Experimenten. Hierzu wurde der Hebel um die maximal möglichen $5,3\ \mu\text{m}$ verbogen und 15 Minuten in dieser Position gehalten. Die resultierenden gemittelten Intensitäten sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Die originalen Maximalprojektionen hierzu finden sich im Anhang C in Abbildung C.3 und C.4.

Das Strecken mit $0,5\ \text{Hz}$ für 5 statt 15 Minuten führt zu weniger ausgeprägten Veränderungen im Aktin-Zytoskelett. Die Asymmetrie bleibt zwar sichtbar, allerdings sind die Aktin-Bögen im Vergleich weniger ausgeprägt. Nur die Verstärkung der Bögen zwischen dem manipulierten Hebel und seinen nächsten Nachbarn bleibt ähnlich deutlich. In Bezug auf die Zell-Matrix-Kontakte lässt sich sagen, dass hier allenfalls minimale Veränderungen in Signalkaskade und strukturellem Aufbau aufzutreten scheinen. Dies lässt darauf schließen, dass zwar eine Reaktion der Zelle innerhalb von 5 Minuten möglich ist, diese Reaktion aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist, es also bei weiterer Belastung noch zu weiteren strukturellen Veränderungen kommt.

Sehr ähnliches lässt sich über das statische Strecken über 15 Minuten hinweg sagen. Hier sind die Veränderungen in den Zell-Matrix-Kontakten ähnlich schwach ausgeprägt wie nach 5 Minuten periodischen Streckens. Die Veränderungen im Aktin-Zytoskelett sind geringer als im zuvor genannten Fall. Es lässt sich nur noch eine sehr geringe Asymmetrie mit leichter Verstärkung der Aktin-Bögen zwischen dem manipulierten Kontakt und seinen nächsten Nachbarn feststellen. Dies lässt den Schluss zu, dass das wiederholte Strecken an einem Zell-Matrix-Kontakt wesentlich mehr Einfluss auf das Zellverhalten hat als eine einmalige Formveränderung, die beibehalten wird.

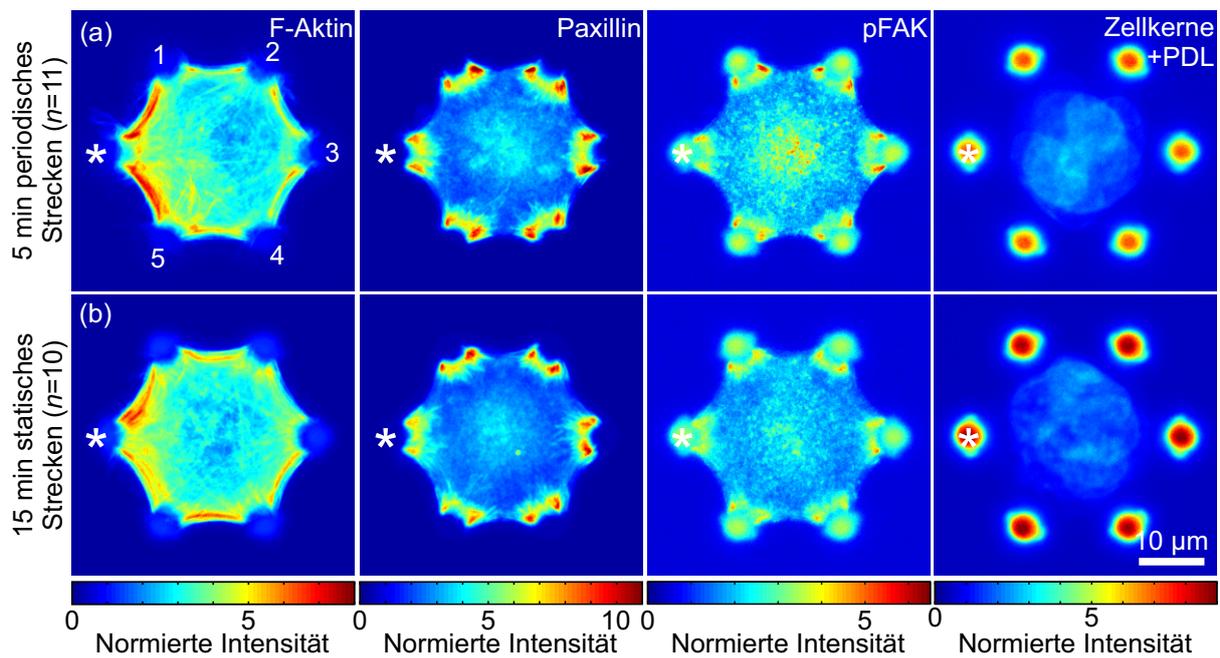


Abbildung 6.9: Falschfarbendarstellungen der normierten gemittelten Intensitäten von F-Aktin, Paxillin, pFAK und den Zellkernen (a) nach 5 Minuten periodischen Streckens bei 0,5 Hz mit einer Auslenkungsamplitude von 5,3 µm und (b) nach 15 Minuten statischen Streckens mit einer Auslenkung von 5,3 µm. Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Einzelmessungen können in Anhang C in den Abbildungen C.3 und C.4 eingesehen werden.

6.4 Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten

Bisher konnte anhand der Falschfarbendarstellungen gezeigt werden, dass es durch das Strecken an einem einzelnen Zell-Matrix-Kontakt in 3D-Mikrostrukturen zu starken Veränderungen an der Morphologie von Zytoskelett und Zell-Matrix-Kontakten kommt. Diese Veränderungen sollen im Folgenden quantifiziert werden.

Hierzu werden Asymmetriefaktoren der Fluoreszenz berechnet:

$$A = \frac{I_m - I_0}{I_m + I_0}. \quad (6.1)$$

Hierbei ist I_m die Gesamtfluoreszenzintensität in einer durch die Manipulation beeinflussten Region der Zelle und I_0 die Gesamtfluoreszenzintensität in einer nicht beeinflussten Kontrollregion derselben Zelle. Ein positiver Wert dieser Asymmetrie bedeutet hiermit eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals in der durch die Manipulation beeinflussen Zellregion, ein negativer Wert entspricht einer Verringerung.

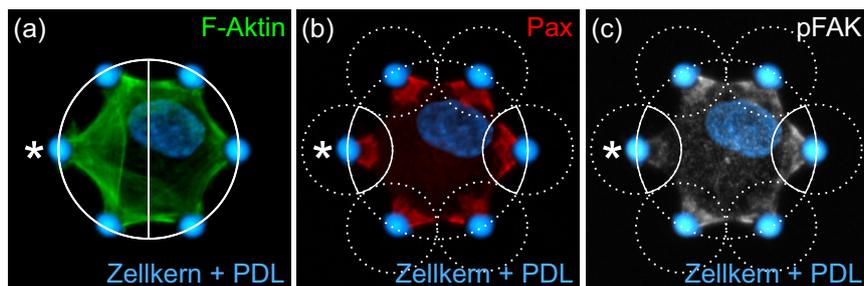


Abbildung 6.10: Anhand der Summenprojektion einer als Beispiel dienenden Zelle wird die Lage der Zellregionen, die der Berechnung der Asymmetriefaktoren zugrunde liegen, veranschaulicht. Regionen für (a) F-Aktin (grün), (b) Paxillin (rot) und (c) pFAK (weiß). Die Region ist jeweils in weiß mit durchgezogenen Linien dargestellt. Um die Konstruktion zu verdeutlichen, sind auch der Dapi-Kanal (Zellkern und Struktur) in blau und Hilfslinien (weiß gestrichelt) dargestellt.

Zur quantitativen Analyse wurden die Bilderstapel mit einer Summenprojektion (Kapitel 3.8) auf die x - y -Ebene projiziert. Zur Definition der Zellregionen, die in die Berechnung einfließen (Abbildung 6.10), wurde zunächst ein Kreis durch die Säulen der Struktur gezogen. Die Zelle ist, da sie zwischen diesen Säulen eingespannt ist, auf das Innere dieses Kreises beschränkt. Im Fall der F-Aktin Fluoreszenz wurde dieser Kreis mit einer Gerade senkrecht zur Manipulationsachse in zwei Hälften geteilt. Hiermit wird I_m die Intensität in dem Halbkreis, der den manipulierten Hebel enthält und I_0 die innerhalb des anderen Halbkreises.

Für die Fluoreszenzintensitäten der Kontakte zogen wir um die Mittelpunkte der Säulen zusätzlich sechs Kreise, deren Radius gerade so groß ist, dass sie sich berühren. Durch

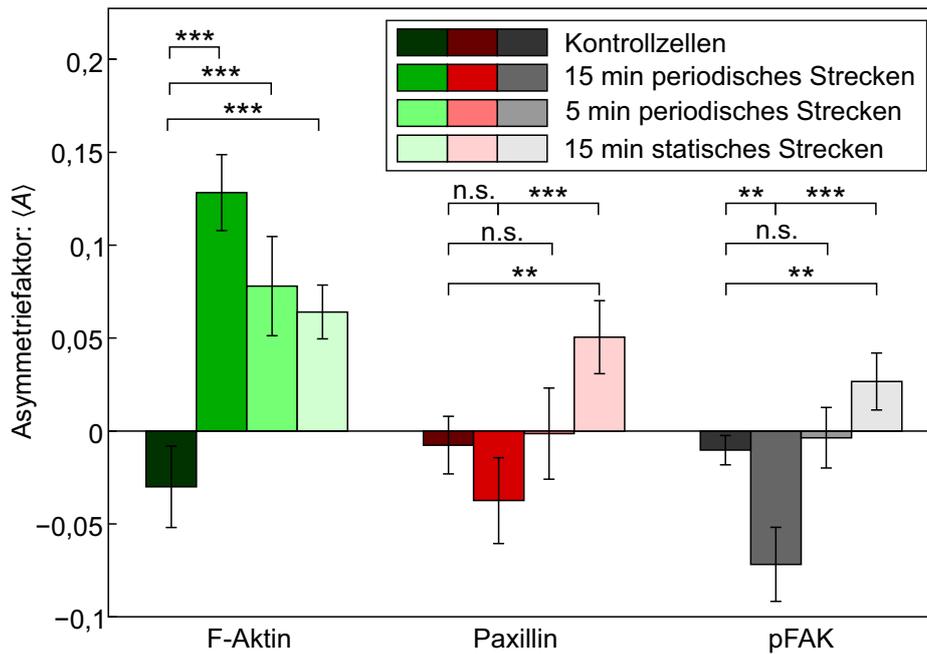


Abbildung 6.11: Der über vergleichbare Zellen gemittelte Asymmetriefaktor $\langle A \rangle$ für die Fluoreszenzintensitäten des F-Aktin (grün), Paxillin (rot) und pFAK (grautöne). Es sind für jeden einzelnen Kanal von links nach rechts die Ergebnisse der Kontrollzellen sowie für 15 Minuten periodisches Strecken, 5 Minuten periodisches Strecken und 15 Minuten statisches Strecken nebeneinander aufgetragen. Der aufgetragene Fehler ist jeweils die Standardabweichung des Mittelwerts, die Signifikanz wurde nach dem T-Test bestimmt (**: $p < 0,05$, ***: $p < 0,01$ und n. s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$)).

die Schnittpunkte dieser sechs Kreise mit dem großen ergibt sich um jeden Kontakt eine gleich große Region, die diesen Kontakt vollständig einschließt, aber gleichzeitig viel vom insbesondere im Zellinneren recht hohen Hintergrund ausschließt (siehe Abbildung 6.10(b) und (c)). Als I_m für die Kontakte wurde nun die Fluoreszenzintensität in der Region gewählt, die den Kontakt umschließt, der an dem manipulierten Hebel liegt. Die Region, die zur Berechnung von I_0 hinzugezogen wurde, ist entsprechend die gegenüberliegende.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 6.11 dargestellt. Hier sind für jeden Kanal (F-Aktin (grün), Paxillin (rot) und pFAK (grautöne)) die Asymmetriefaktoren für alle vier betrachteten Versuchsbedingungen aufgetragen. Für die Fluoreszenzintensität des F-Aktin ergibt sich erwartungsgemäß bei den Kontrollen eine Asymmetrie von nahe Null ($\langle A \rangle = -0,025 \pm 0,02$). Für 15 Minuten periodisches Strecken ergibt sich eine Asymmetrie von $\langle A \rangle = 0,13 \pm 0,02$, die nach nur 5 Minuten periodischen Streckens mit $\langle A \rangle = 0,08 \pm 0,02$ wesentlich geringer ausfällt und nach 15 Minuten statisches Streckens bei nur $\langle A \rangle = 0,06 \pm 0,02$ liegt. Diese Ergebnisse sind im Vergleich zu den Kontrollzellen alle signifikant (T-Test: $p < 0,01$).

Für die Kontakte ergeben sich überraschende Resultate: So liegen die Asymmetriefaktoren bei den Kontrollzellen und denjenigen Zellen, die 5 Minuten periodisch gestreckt

wurden, innerhalb des Fehlers bei Null. 15 Minuten periodisches Strecken führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensitäten: Die Asymmetriefaktoren wurden für Paxillin zu $\langle A \rangle = -0,04 \pm 0,02$ bestimmt, für pFAK zu $\langle A \rangle = -0,07 \pm 0,02$. Statisches Strecken hingegen führt für beide Kontaktproteine zu einer Erhöhung der Proteindichte und damit der Fluoreszenzintensität. Der Asymmetriefaktor der Paxillinfärbung liegt hier bei $\langle A \rangle = 0,05 \pm 0,02$ und der der pFAK Färbung bei $\langle A \rangle = 0,03 \pm 0,02$. Diese Erhöhung der Fluoreszenzintensität ist für beide Färbungen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (T-Test: $p < 0,05$), die Verringerung der Fluoreszenzintensität allerdings nur für die pFAK-Färbung (T-Test: $p < 0,05$) und nicht für die Paxillinfärbung. In beiden Kanälen ist aber der Unterschied zwischen statischem und periodischen Streckens mit $p < 0,01$ signifikant.

Die quantitative Analyse des Zellverhaltens wurde analog für die in Abbildung 6.8 gezeigten Messungen mit der pPaxillin-Färbung durchgeführt (6.12). Hier ergeben sich für das Paxillin und das F-Aktin sehr ähnliche Werte wie zuvor bei den Zellen, bei denen pFAK gefärbt wurde. pPaxillin zeigt keine Asymmetrie.

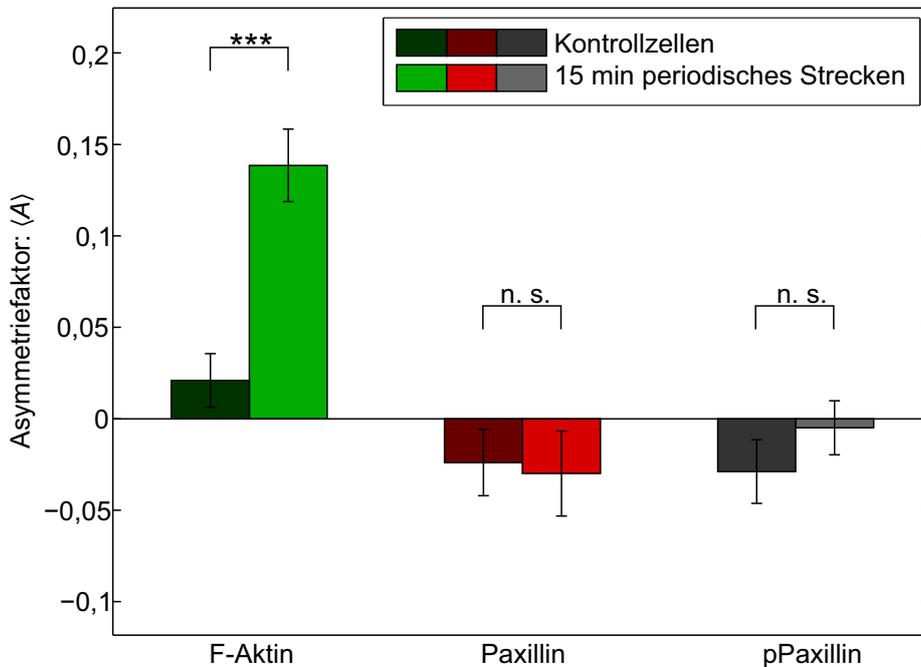


Abbildung 6.12: Der über vergleichbare Zellen gemittelte Asymmetriefaktor $\langle A \rangle$ für die Fluoreszenzintensitäten von F-Aktin (grün), Paxillin (rot) und pPaxillin (grautöne). Es sind für jeden einzelnen Kanal von links die Ergebnisse der Kontrollzellen und rechts die für 15 Minuten periodisches Strecken aufgetragen. Der aufgetragene Fehler ist jeweils die Standardabweichung des Mittelwerts und die Signifikanz wurde nach dem T-Test bestimmt (***: $p < 0,01$ und n. s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$)).

6.5 Zug-induzierte Größenveränderung der Zell-Matrix-Kontakte

In einer Veröffentlichung, die sich mit den Einflüssen von mechanischer Verformung auf Zellen beschäftigt und unserer Methode recht nahe kommt, wird die Größenänderung der Zell-Matrix-Kontakte gemessen [102]. Um die Ergebnisse dieser Methode mit unseren vergleichen zu können, führen wir diese Analyse bei unseren Messungen durch. Paxillin ist als struktureller Bestandteil der Zell-Matrix-Kontakte gut für diese Analyse geeignet.

Um die Größe einer biologischen Struktur anhand von Fluoreszenzbildern zu vermessen, legt man üblicherweise einen Grenzwert an die Fluoreszenzintensitäten an und zählt Pixel mit einer Intensität oberhalb dieses Grenzwerts als zur Struktur gehörig und Pixel mit einer Intensität unterhalb dieses Grenzwerts nicht als Teil der Struktur. Da sich die verschiedenen Fluoreszenzbilder, die in dieser Studie aufgenommen wurden, stark in der absoluten Intensität unterscheiden, konnte nicht ein Grenzwert für alle Zellen herangezogen werden. Um dennoch ein möglichst objektives Maß für die Größe der Kontakte zu erhalten, entschieden wir uns, den Grenzwert jeweils aus den Bildern zu berechnen. Hierzu wurden wie bei den vorangegangenen quantitativen Auswertungen auch die Summenprojektionen der LSM-Bilderstapel verwendet. Um in diesen Projektionen die intrazelluläre Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, wurde ein Kreis von 100 Pixeln Durchmesser in der Mitte der jeweiligen Zelle gezogen und dort die mittlere Intensität $I_{\text{mittl.}}$ berechnet (weißer Kreis in Abbildung 6.13). Des Weiteren wurde in den schon zuvor für die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten bestimmten Regionen, in denen sich Zell-Matrix-Kontakt befinden, die maximale Intensität I_{max} bestimmt (gestrichelt weiß umrandete Zonen in Abbildung 6.13). Den Grenzwert für die Diskriminierung zwischen Kontakt und Hintergrund I_{Grenz} legten wir auf 5 % oberhalb der mittleren Intensität in der Zellmitte fest:

$$I_{\text{Grenz}} = (I_{\text{max}} - I_{\text{mittl.}}) \times 0,05 + I_{\text{mittl.}} \quad (6.2)$$

Mit dieser Definition berechnen wir nun die Flächen, in denen dieser Grenzwert überschritten wird, innerhalb der Regionen * und 1–5. Streng genommen sind Zell-Matrix-Kontakte dreidimensionale Gebilde. Wir betrachten hier aber nur die auf die Ebene der Kontaktpunkte projizierte Fläche dieser Zell-Matrix-Kontakte. Diese Messgröße ist ein Maß für die Größe der Kontakte, sollte aber nicht direkt als solche bezeichnet werden, da ja zum einen nur eine Projektion der Kontakte in eine Ebene betrachtet wird, zum anderen die Wahl der Grenzwertes zwar objektiv, aber dennoch recht willkürlich ist. Würde man sich z. B. auf 10 % oberhalb von $I_{\text{mittl.}}$ festlegen, erhielte man wesentlich kleinere projizierte Flächen.

Die Ergebnisse dieser Auswertung für die Kontrollzellen sowie die Zellen, die für 15 Minuten periodisch bzw. statisch gestreckt wurden, sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

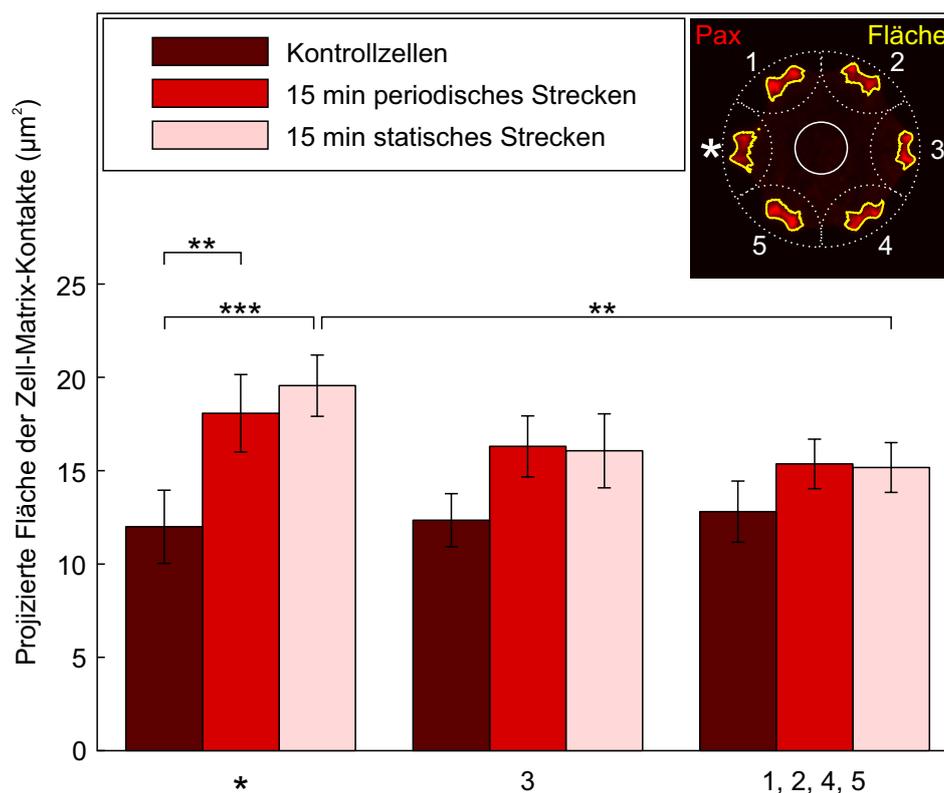


Abbildung 6.13: Projizierte Fläche der Zell-Matrix Kontakte der Zellen aus Abbildung 6.7 und 6.9(b). Die Kontaktgrößen wurden für den manipulierten Kontakt (*), den gegenüberliegenden (3) und die übrigen (1, 2, 4, 5) getrennt vermessen. Der aufgetragene Fehler ist jeweils die Standardabweichung des Mittelwerts, die Signifikanz wurde nach dem T-Test bestimmt (**, falls $p < 0,05$ und ***, falls $p < 0,01$).

Da die Regionen 1, 2, 4 und 5 als gleichwertig angesehen werden, wird über die in ihnen enthaltenen Kontaktflächen gemittelt. Es stellt sich zunächst heraus, dass allgemein die Kontakte in unseren selektiv funktionalisierten 3D-Strukturen größer als $12 \mu\text{m}^2$ sind während in der Literatur eher Werte von einigen wenigen μm^2 zu finden sind [28, 139].

Des Weiteren lässt sich anhand der Auswertung sagen, dass sich die Größe der Kontakte durch die Mikromanipulation verändert. So sind die Kontakte nach 15 Minuten periodischen und auch statischen Streckens in der Nähe der manipulierten Säule signifikant größer als an der gleichen Stelle in den Kontrollzellen. Darüber hinaus ist nach 15 Minuten statischen Streckens die Fläche am manipulierten Hebel größer als an allen anderen Hebeln dieser Zellen.

6.6 Diskussion

Es ist in dieser Studie gelungen, durch die Kombination von direktem Laserschreiben mit zwei Lacken und einem Mikromanipulator primäre Hühnerfibroblasten, die sich in 3D-Mikrostrukturen aufspannen, zu strecken und hiermit deutliche intrazelluläre Reaktionen zu provozieren. Die hohe Reproduzierbarkeit der Zellmorphologie in den zweikomponentigen Mikrostrukturen erlaubt darüber hinaus ein direktes Mitteln von Fluoreszenzfärbungen verschiedener Zellen, die auf die gleiche Art gestreckt wurden, und damit bei Aussagen über die Zellmorphologie ein hohes Maß an Verlässlichkeit. Darüber hinaus ermöglicht die hohe Symmetrie der Zellen mit der begrenzten Zahl von sechs Zell-Matrix-Kontakten quantitative Aussagen über Veränderungen in der Zellmorphologie. Auf diese Art wurden die zuginduzierte asymmetrische Verteilung bestimmter Zellbestandteile und die Größe der Zell-Matrix-Kontakte analysiert. Da nur an einer der sechs Kontaktstellen, die der Zelle zur Verfügung stehen, gezogen wird, kann die andere Hälfte ein und derselben Zelle als Referenz für die Experimente herangezogen werden, da diese Hälfte kaum durch den Prozess der Mikromanipulation beeinflusst wird, wie durch Messungen der Verformung der Struktur bestätigt wurde. Um alle Zellen unabhängig von ihren internen Zugkräften der geometrisch gleichen Veränderung auszusetzen, haben wir nicht die Kraft, mit der die Zellen verformt wurden, sondern die Verbiegungsamplitude des Hebels zwischen den Experiment gleich gehalten.

Die von uns gemessenen Zellreaktionen zeigen sich am deutlichsten in den Veränderungen im Zytoskelett. Diese Veränderungen wurden hier anhand einer Färbung des F-Aktin nachgewiesen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass es durch das Strecken der Zellen an einem Zell-Matrix-Kontakt zu einer Verstärkung von F-Aktin-Bögen kommt, die sich zwischen dem manipulierten Hebel und seinen direkten Nachbarn aufspannen. Dieser Effekt ist bereits nach fünf Minuten periodischen Streckens sichtbar und wird durch längeres Andauern des Versuches noch deutlicher. In dieser kurzen Versuchszeit von fünf Minuten konnten keine Veränderungen in den Zell-Matrix-Kontakten nachgewiesen werden. Es wird in der Literatur eine positive Rückkopplung vermutet, bei der durch Zug an F-Aktin Bündeln in den Fokalkontakten das Protein RhoA aktiviert wird. Im Gegenzug wird die Anreicherung von F-Aktin befördert [84, 140]. Daher vermuten wir, dass der Umbau des Zytoskeletts zunächst durch RhoA vermittelt wird, bevor es nach längerem periodischen Ziehen auch zu einer strukturellen Veränderung der Zell-Matrix-Kontakte kommt. Diese These ließe sich durch eine FRET-Messung¹ überprüfen, ähnlich wie sie in [84] durchgeführt wurde.

Der Umbau des F-Aktin wird durch längeres periodisches Strecken (15 Minuten) deutlicher. Es bilden sich Bögen zwischen dem manipulierten Hebel und seinen übernächsten Nachbarn aus und ein quer zur Zugrichtung verlaufender, der die beiden Nachbarn des manipulierten Hebels direkt verbindet. Der Literatur lässt sich entnehmen,

¹FRET steht für Förster-Resonanzenergietransfer. Hierbei wird die Fluoreszenzanregung eines Donors auf einen Akzeptor übertragen. Die Effizienz dieses Transfers ist stark vom Abstand der beiden abhängig und daher lassen sich auf diese Weise beispielsweise Konformationsänderungen von Proteinen nachweisen.

dass Zellen in 2D-Experimenten bei konstantem Strecken [86, 87] oder auch wenn sie einer laminaren Strömung [82, 94, 96] ausgesetzt sind ihre F-Aktin-Fasern in Zugrichtung verstärken, bei periodischen Streckens allerdings quer zur Zugrichtung [80, 83, 141]. In unseren Experimenten scheint es allerdings zu Verstärkungen in beiden Richtungen zu kommen. Gut möglich ist, dass diese Reaktion durch die eingeschränkten Möglichkeiten bedingt ist, die der Zelle zum Umbau der Kontakte in unserem Experiment bleiben. Immerhin stehen ihr nur sechs Kontaktstellen zur Auswahl, womit eine graduelle Wanderung der Fokalkontakte, die sonst mit der Ausrichtung der Fasern senkrecht zur Zugrichtung einher geht [84], in unserem Experiment nicht möglich ist. Der F-Aktin Bogen, der die beiden nächsten Nachbarn des manipulierten Hebels verbindet, könnte allerdings auch nicht durch eine funktionelle Verstärkung der Zytoskeletts zustande kommen, sondern vielmehr durch die Stauchung der Zelle zurück in die nicht gestreckte Form nach Abschluss des Experiments.

Neben dem Aktin-Zytoskelett wurden auch die Zell-Matrix-Kontakte untersucht, indem Paxillin, pPaxillin und pFAK angefärbt wurden. Paxillin zeigt die räumliche Ausbreitung der Kontakte an, wohingegen pPaxillin und pFAK die durch das Strecken ausgelösten Signalkaskade an den Kontakten repräsentieren [142]. Nach 15 Minuten sehen wir auch hier deutliche Veränderungen. Periodisches Strecken mit 0,5 Hz führt zu einer Verringerung in der Konzentration von Paxillin und pFAK. Im Gegensatz dazu beobachten wir nach statischem Strecken der Zellen eine Erhöhung beider Konzentrationen. Diese Erhöhung der Konzentration in der Region um den Ormocomp-Würfel scheint sich nicht in den gemittelten Fluoreszenzintensitäten widerzuspiegeln. Hier geht die maximale Intensität an dem manipulierten Kontakt herunter. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Erhöhung der Konzentration mit einer merklichen Verschmierung des Kontaktes einhergeht, was sich effektiv in einer Verringerung des Fluoreszenz-Maximums äußert. Auf pPaxillin konnten wir keinen Einfluss feststellen; es wurde allerdings auch nur der periodische Fall betrachtet. An Endothelzellen, die einer laminaren Strömung ausgesetzt werden, lässt sich beobachten, dass die Fokalkontakte wachsen und sich entlang der Flussrichtung ausrichten [143]. Hierbei wird FAK phosphoryliert, was einer Aktivierung entspricht. Da die laminare Strömung zu einer konstanten Scherkraft auf die Zellen führt, könnte diese Art von Experiment mit unserem statischen Fall vergleichbar sein und die dort beobachtete Phosphorylierung passt gut zu unserem Ergebnis für den statischen Fall. Dass der Kontakt nach 15 Minuten periodischen Streckens sowohl an Paxillin- als auch an pFAK-Konzentration verliert, könnte für eine Destabilisierung des Kontaktes sprechen. Dies wiederum würde zu dem Ergebnis passen, dass sich Zellen bei periodischer Krafteinwirkung entlang der geringsten Kraft (also senkrecht zum Zug) ausrichten. Allerdings können wir nicht sagen ob hier pFAK aus dem Kontakt abgezogen oder dephosphoryliert wird. Dazu wäre eine vergleichende Färbung von FAK und pFAK nötig gewesen. Dies war allerdings nicht möglich, da ein für die Mikroskopie in den 3D-Strukturen ausreichend guter FAK-Antikörper für Hühnerzellen nicht gefunden werden konnte.

Bei der Untersuchung der Größe der Zell-Matrix-Kontakte konnten wir zunächst beobachten, dass unsere Zellen recht große Kontakte aufweisen. Die Größe der projizierten

Fläche der Paxillin-Färbung ist in unserem Fall größer als $16 \mu\text{m}^2$. Der Vergleich mit der Literatur zeigt, dass dies sehr viel ist: Auf unstrukturierten 2D-Substraten liegt die Größe der Kontakte bei etwa $3 \mu\text{m}^2$ [139]. Auch auf strukturierten 2D-Substraten sind die Kontakte mit einigen wenigen μm^2 viel kleiner [28]. Aus den Erfahrungen in unserem Labor lässt sich sagen, dass auch auf nicht selektiv funktionalisierten 3D-Strukturen die Kontakte wesentlich kleiner sind. Es könnte also sein, dass hier ein wirklicher Unterschied zwischen den beiden Zellkultivierungsbedingungen vorliegt. Allerdings ist bei den Zellen in den hier verwendeten Strukturen die Kontaktfläche (also die Oberfläche der Ormocomp-Würfel) senkrecht zum Deckglas. Es ist daher auch möglich, dass durch mangelnde Auflösung in z -Richtung mehrere Fokalkontakte scheinbar zu einem sehr großen Zell-Matrix-Kontakt zusammenschmelzen. Dafür spricht auch, dass bei den Abbildungen der einzelnen Zellen (siehe Anhang) die Kontakte einiger Zellen zum Zellinnern hin recht ausgefranst erscheinen bzw. in mehrere Substrukturen zerfallen. Dieser Punkt sollte in Zukunft mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie untersucht zu werden.

Allerdings kann mangelnde Auflösung nicht erklären, warum sich die Kontakte derart weit in des Zellinnere erstrecken. In Studien an Zellen auf flachen Substraten konnte gezeigt werden, dass die Dicke der dort geformten Kontakte nur etwa 40 nm beträgt [15]. Dies scheint eng mit der Richtung zusammenzuhängen, in die die intrazellulären Kräfte auf den Kontakt wirken. In 2D-Zellkulturen ist diese Richtung parallel zum Substrat, in unserem Fall senkrecht von der Kontaktfläche weg. Vielleicht wäre also ein Vergleich der Ausdehnung der Fokalkontakte in Krafrichtung angebracht. Bei Zellen in 2D-Kulturen entspricht diese Ausdehnung der Länge der Fokalkontakte [139]. Diese beträgt üblicherweise einige Mikrometer und passt damit schon wesentlich besser zu der Ausdehnung unserer Zell-Matrix-Kontakte in Richtung der Zugkraft der Zelle. Allerdings ist das allgemeine Verständnis der Zusammenhänge in den Fokalkontakten, dass Paxillin in erster Linie an die Integrine bindet und von dort aus an der Mechanotransduktion teilnimmt. Integrine wiederum sind Transmembranproteine und somit ausschließlich in der Membran zu finden. Die Annahme, dass Paxillin und Integrine in Fokalkontakten sehr nahe beieinander liegen wird auch durch hochauflösende Fluoreszenzmessungen bestätigt, die zeigen, dass Paxillin und FAK sich in 2D-Fokalkontakten in einer Schicht sehr nahe der Membran befinden [15]. In unserem Fall erscheint es allerdings unplausibel, dass Paxillin in allen Fällen an Integrine gebunden ist, da wir Paxillin auch sehr weit im Innern der Zelle finden. An diesem Punkt muss also die Rolle von Paxillin neu überdacht werden.

Durch das Ziehen an einem der Zell-Matrix-Kontakte lässt sich eine Größenveränderung an diesem Kontakt herbeiführen: Statisches und periodisches Strecken führen zu einer Vergrößerung der Kontakte in der gesamten Zelle und insbesondere an dem manipulierten Kontakt auf bis zu $20 \mu\text{m}^2$. Dieser Effekt ist für statisches Strecken ausgeprägter. In der Literatur findet sich ein Experiment, das unserem recht ähnlich ist [102]. Hier werden Zellen auf kleinen PDMS-Säulen kultiviert, auf denen sie dann wie auf einem Nagelbrett zu liegen kommen und mehrere dieser Säulen überwachsen. Einige wenige dieser Säulen sind mit einem magnetischen Partikel versehen, mit dessen Hilfe nun durch das Anlegen eines Magnetfeldes eine Kraft auf den Zell-Matrix-Kontakt ausgeübt werden kann, mit dem die Zelle sich an dieser speziellen Säule festhält. Der größte

Unterschied zu dem hier entwickelten Experiment ist, dass die Zellform auf diesen Säulen undefiniert und heterogen ist und dass die Position der Säule, mit deren Hilfe die Kraft auf den Fokalkontakt ausgeübt wird, nicht festgelegt werden kann. Bei diesem Experiment führt statisches Strecken für 15 Minuten an einem Zell-Matrix-Kontakt zu einer Vergrößerung von selbigem. Mehrmaliges Strecken für jeweils zwei Minuten konnte hier den Effekt verstärken. Es erscheint nun auf den ersten Blick etwas verwunderlich, dass bei uns das periodische Strecken nicht diesen verstärkenden Effekt herbeiführt. Allerdings ist mehrmaliges zweiminütiges Strecken wohl eher nicht mit einer sinusförmigen Verformung mit einer Frequenz von 0,5 Hz vergleichbar. Der vergleichbare Fall des statischen Streckens führt in beiden Experimenten zu dem gleichen Ergebnis, dass die Zellen auf die Kraftausübung mit einer Vergrößerung der Kontakte reagieren.

Zusammenfassend ist der große Unterschied zwischen statischem und periodischem Strecken ein Aspekt unserer Messungen, der ins Auge springt. Es lässt sich bei Messungen an 2D-Zellkulturen ein sehr ähnlicher Unterschied feststellen: Zellen reagieren beim Strecken auf flexiblen Substraten mit einer Ausrichtung senkrecht zur Zugrichtung im periodischen Fall und parallel zur Zugrichtung im statischen Fall [84–87]. Es ist daher möglich, dass in unserem Experiment etwas Ähnliches geschieht. Die Verringerung der Proteinkonzentrationen in den Zell-Matrix-Kontakten im periodischen Fall könnte sehr wohl darauf hinweisen, dass die Zellen den Kontakt zu dem manipulierten Hebel aufgeben werden. Dies wird dadurch bestätigt, dass es bei den Experimente manchmal (und meist bei periodischem Strecken) zu einer Ablösung der Zelle vom manipulierten Hebel kam. Diese Zellen wurden wegen der nun geänderten Geometrie und da man sich nicht sicher sein konnte, dass dieses Ablösen nicht mit einer eventuellen Verletzung der Zellen zusammenhängt, nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Im Gegensatz dazu werden die Fokalkontakte im statischen Fall eher verstärkt. Da hier die Manipulation eher einer Geometrieänderung entspricht, könnte diese Verstärkung darauf zurückzuführen sein, dass ganz einfach eine größere Distanz zum nächsten Zell-Matrix-Kontakt überbrückt werden muss. Für die Stärke von Aktin-Bögen wurde dieser Zusammenhang nachgewiesen [144].

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die mechanische Umgebung von Zellen spielt eine große Rolle bei der Steuerung ihres Verhaltens. Um Zellreaktionen zu untersuchen, kann es von Vorteil sein, wenn sich die Zellen in einer definierten äußeren Form befinden. Hierdurch wird eine Fehlerquelle in der Zellbiologie von Anfang an gering gehalten: Zellen, die verschiedene geometrische Formen haben, werden sich auch unterschiedlich verhalten. Durch die Uniformität der Zellen wird darüber hinaus eine Mittelung von Proteinverteilungen über mehrere Experimente möglich. Dies erlaubt es morphologische Trends sichtbar zu machen und bei quantitativen Analysen zu statistisch signifikanteren Ergebnissen zu gelangen.

Um Zellen in eine definierte Form zu bringen, kann man prinzipiell verschiedene Ansätze verfolgen. Möchte man allerdings die Freiheit haben, diese Geometrie in drei Dimensionen zu bestimmen, so bietet sich das direkte Laserschreiben als Methode an. Durch die Verwendung zweier Lacke, von denen einer proteinbindend und einer proteinabweisend ist, lassen sich Strukturen herstellen, in denen sich Zellen in einer sehr reproduzierbaren Weise ausbreiten. Diese Methode wurde im Zuge dieser Arbeit verwendet, um zwei verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Bedürfnissen und für unterschiedliche Fragestellungen gezielt in solche dreidimensionalen Mikrostrukturen einzubringen.

Über die gezielte Vorgabe der Zellgeometrie hinaus wurde in dieser Arbeit untersucht, wie lokale mechanische Stimuli das Zellverhalten in solchen Strukturen verändern. Dies ist eine wichtige Fragestellung, weil Zellen *in vivo* immer mechanischen Reizen ausgesetzt sind, die das Zellverhalten auf vielfältige Weise beeinflussen. Um Einflussfaktoren gezielt zu untersuchen, muss man in der Lage sein, solche Reize präzise zu applizieren. Zu diesem Zweck wurde ein Mikromanipulator entwickelt, mit dessen Hilfe sich dreidimensionale Mikrostrukturen verformen lassen. Da die Zellen an die Mikrostrukturen adhären, überträgt sich diese Verformung auf die Zellen.

In einem ersten Schritt wurden Mikrostrukturen entwickelt, mit deren Hilfe sich dieses Prinzip umsetzen lässt. Hierbei ist erstens zu beachten, dass man den Zellen genug adhäsive Flächen zur Verfügung stellt, so dass sie in den Strukturen wachsen. Zweitens muss diese Struktur derart gestaltet sein, dass die resultierende Zellform der Fragestellung entspricht. Drittens muss dafür gesorgt sein, dass der Mikromanipulator zwar die Struktur verformt, dabei allerdings die Zelle nicht verletzt wird. Insbesondere darf der Mikromanipulator nicht unbeabsichtigt von der Mikrostruktur abrutschen und die Teile der Struktur, die der Mikromanipulator berührt, dürfen nicht von Zellen bewachsen werden. Der letzte Punkt wurde allgemein dadurch gelöst, dass die Strukturen über eine

Art von Zielscheibe verfügten, die aus dem nicht zelladhäsiven PDL besteht und am Rand über Wulste verfügt, die ein Abrutschen des Mikromanipulators verhindern. Die Ersten beiden Punkte müssen der jeweiligen Fragestellung und dem Zelltyp entsprechend gelöst werden. Es wurden Experimente mit zwei recht verschiedenen Zelltypen und sehr unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt: Embryonale Hühnerherzmuskelzellen wurden daraufhin getestet, ob es möglich ist, sie in ihrem Kontraktionsrhythmus durch eine durch den Mikromanipulator vermittelte mechanische Reizung zu beeinflussen. Außerdem wurde an embryonalen Hühnerfibroblasten untersucht, wie sich die an der Übermittlung mechanischer Reizen beteiligten Zellbestandteile F-Aktin, Paxillin und die Fokaladhäsionskinase FAK unter dem Einfluss mechanischer Kraft umorganisieren.

Die Herzmuskelzellen wurden in leicht lang gestreckten Sechsecken kultiviert. Diese bestehen aus nicht adhäsiven Säulen, deren Spitze adhäsiv ist und die mit Seilen verbunden sind, an die die Zellen ebenfalls Kontakte ausbilden können. An einem Ende des Sechsecks befindet sich die Säule, sie mit dem Mikromanipulator verbogen wird. Auf diese Weise wird die Zelle entlang ihrer langen Achse in die Länge gezogen. Mit diesem Versuchsaufbau wurden Herzmuskelzellen nun über Zeiträume von bis zu einer Stunde sinusförmig gestreckt. Es wurde sowohl lange Zeit die selbe Frequenz verwendet als auch ein Verlauf mit steigender Frequenz. In allen getesteten Konfigurationen konnte allerdings keine statistisch signifikante Zellreaktion nachgewiesen werden. Daher wurde der Versuch abgewandelt und die Herzzellen wurden in kurzen Episoden mit mehreren Impulsen hintereinander gestreckt. Es wurden die Kontraktionen pro Zeiteinheit jeweils kurz vor, während und kurz nach diesen Impulsen miteinander verglichen. Auch hier konnte keine eindeutige Reaktion nachgewiesen werden. Es ließ sich allerdings beobachten, dass die Herzmuskelzellen bei zu schneller Reizung aufhören zu kontrahieren. Um einen längeren Zeitraum der mechanischen Einflussnahme zu untersuchen, wurden die Herzmuskelzellen zusätzlich zu den Experimenten mit dem Mikromanipulator auf eine andere Weise untersucht: Die Herzzellen wurden in Strukturen gesetzt, wo sie die Möglichkeit hatten, von beiden Seiten an einer dünnen Membran zu ziehen und somit mechanisch zu interagieren. Gleichzeitig unterdrückt diese Membran das Ausbilden echter Zell-Zell-Kontakte und dadurch den Ionenaustausch, der die mechanische Kopplung überflüssig machen würde. Auf diese Weise können sich die Zellen über Zeiträume von vielen Stunden mechanisch beeinflussen. Allerdings hat auch dieses Experiment keine solche Beeinflussung nachweisen können.

In den Experimenten mit Fibroblasten wurden diese in symmetrischen Sechsecken kultiviert, bei denen an jeder Ecke ein kleiner Würfel als Kontaktfläche zur Verfügung stand. Die Zellen wachsen in diesen Sechsecken sehr symmetrisch mit sechs definierten Zell-Matrix-Kontakten gleicher Größe. Außerdem hat jede Zelle dieselbe äußere Form, was eine Mittelung der Proteinverteilung über mehrerer Zellen ermöglicht. Die Zellen wurden für jeweils 5 oder 15 Minuten sinusförmig gestreckt und dann mit solchen verglichen, die gar nicht gestreckt wurden, sowie mit solchen, die ein 15-minütiges statisches Strecken erfahren hatten. Durch Mittelung der Fluoreszenzintensitäten konnten Veränderungen in der Morphologie des Aktin-Zytoskeletts aufgedeckt werden. Darüber hinaus wurden die Fluoreszenzintensitäten der Zellen quantitativ untersucht: Hierbei wurde zum einen die

Asymmetrie der Proteinverteilungen bestimmt, die durch des Strecken der Zellen induziert wird, und zum anderen wurde die Größe der Zell-Matrix-Kontakte anhand der Paxillin-Färbung untersucht. Es stellte sich bei den Experimenten heraus, dass es bereits nach 5 Minuten periodischen Streckens zu einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts kommt, die nicht mit einer an Paxillin und FAK messbaren Veränderung an den Zell-Matrix-Kontakten einhergeht. Nach 15 Minuten periodischen Streckens kommt eine Veränderung der Zell-Matrix-Kontakte hinzu: Die Menge an phosphoryliertem FAK nimmt ab. Das statische Ziehen führt zu recht geringen Veränderungen am Aktin-Zytoskelett. Allerdings sind die Veränderungen an den Fokalkontakten recht deutlich: Sie werden größer und die Menge an pFAK und Paxillin nimmt zu. Diese Veränderung steht im Gegensatz zum Fall des periodischen Streckens, wo die Menge der Proteine pFAK und Paxillin abnimmt.

Dieser Versuch bietet sich dazu an, in Zukunft theoretische Modelle zur Modellierung der Zellform und der Kraftverteilung in den Zellen nach der mechanischen Manipulation zu testen. Diese Modellierung ist dadurch, dass die Zelle zwischen gleichartigen Kontaktpunkten aufgespannt ist, die logische Fortsetzung von bereits in der Arbeitsgruppe von Martin Bastmeyer in einer Kooperation mit der Gruppe von Ulrich Schwarz getätigten Experimenten [144]. Hier wurde die Form von Zellen auf 2D-Punktmustern aus Fibronectin modelliert. Zur Zeit gibt es Bestrebungen dieses Modell sowohl auf dreidimensional angeordnete Kontaktpunkte zu erweitern, als auch in diese dreidimensionalen Modelle externe Kräfte einzubeziehen.

Die Strukturherstellung ist ein Prozess, der bei den Experimenten viel Zeit in Anspruch nimmt. Dies ist insbesondere der Fall, da das Belichten des zweiten Lacks nicht vollautomatisch geschehen kann. Eine Möglichkeit, einen höheren Durchsatz an Strukturen und damit bessere Statistiken der Zellexperimente zu erreichen wäre, beim Schreiben statt die Probe zu bewegen, den Fokus mit Spiegeln durch den Lack zu scannen. Dies führt zu wesentlich höheren Schreibgeschwindigkeiten von 20 mm/s statt 100 $\mu\text{m/s}$ [145]. Ein weiterer Punkt, der das Probenesign erschwert, ist der Verlust von Leistung und Auflösung hin zu höheren Strukturen. Dieses Problem lässt sich durch eine Weiterentwicklung an dem zur Probenherstellung verwendeten Gerät mittlerweile umgehen: Es ist nun möglich in einer Konfiguration (*dip-in*, [146]) zu schreiben, bei der man das Objektiv direkt in den Lack eintaucht und von unten an das Deckglas schreibt. Hierdurch verliert man zwar insgesamt etwas Auflösung, allerdings ist dieser Verlust aufgrund der recht großen Strukturen in der Zellbiologie kein Problem.

Im Rahmen dieser Arbeit (unter anderem mangels geeigneter Antikörper) konnte eine ganze Reihe von Proteinen, die in die Mechanotransduktion involviert sind, noch nicht untersucht wurden. Im Allgemeinen gibt es für Säugetierzellen mehr verlässlich funktionierende Antikörper als für Zellen aus Vögeln. Daher werden für zukünftige Experimente verschiedene Säugetier-Fibroblasten darauf getestet, wie verlässlich sie in Mikrostrukturen welcher Größe und Geometrie eingebracht werden können. Hierzu stehen beispielsweise embryonale Fibroblasten von Ratten oder Mäusen als Zelllinien zur Verfügung. Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich zur Zeit eine Masterarbeit. Ist es gelungen eine der genannten Zelllinien verlässlich in die Strukturen einzubringen, können

7 Zusammenfassung und Ausblick

weitere Proteine wie das nicht phosphorylierte FAK, Vinculin, α -Aktinin und Myosin untersucht werden.

Um zu beobachten, wie sich beispielsweise das Aktin-Zytoskelett während der Mikromanipulation umbaut, wäre es sehr spannend, das zeitliche Verhalten der Fibroblasten unter mechanischem Zug direkt und in Echtzeit zu beobachten. Hierzu könnte man die Zellen mit einer geeigneten Fluoreszenz-DNA transfizieren. Hierbei wird ein Gen in die Zellen eingebracht, was dazu führt, dass bestimmte Zellbestandteile von der Zelle direkt mit einem fluoreszenten Protein exprimiert werden. Danach kann man an lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie diese Zellbestandteile sichtbar machen ihren Umbau und während der Mikromanipulation dokumentieren.

A Chemikalien und Zellkulturmedien

Hier werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und die Zusammensetzung der Medien aufgelistet, die in dieser Form nicht direkt vom Hersteller bezogen werden, sondern in der Gruppe selbst hergestellt werden.

A.1 Zellkulturmedien

F12/Serum: 700 ml steriles vollentsalztes H₂O
10,63 g F12 nutrient mixture
1,176 g NaHCO₃
100 ml fetales Kälberserum
20 ml Hühnerserum
10 ml 200 mMol L-Glutamin
2 ml Penizillin/Streptomycin
0,4 ml Gentamycin

F12/Kardio: 700 ml steriles vollentsalztes H₂O
10,63 g F12 nutrient mixture
2,2008 g NaHCO₃
266,6 mg CaCl₂·2H₂O
100 ml fetales Kälberserum
50 ml Hühnerserum
10 ml 200 mMol L-Glutamin
2 ml Penizillin/Streptomycin
0,4 ml Gentamycin

Hanks: 1000 ml steriles vollentsalztes H₂O
8 g NaCl
0,4 g KCl
60 mg NaH₂PO₄
60 mg NaHPO₄·2H₂O
0,35 g NaHCO₃
1 g Glucose
7,76 g HEPES
10 mg Phenolrot

A.2 Chemikalien

Chemikalie:	Bezugsstelle:
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
DNase I	Worthington
F12 nutrient mixture	life technologies
fetales Kälberserum	HyClone
Fibronektin (FN)	Sigma Aldrich
L-Glutamin	life technologies
Glucose	Carl Roth
Gentamycin	Sigma Aldrich
<i>Hank's Balanced salt solution</i> (HBSS)	life technologies
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazynil)- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Hühnerserum	life technologies
Irgacure 369	BASF
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kollagenase 2	Worthington
Mowiol	Carl Roth
MIBK	Carl Roth
n-Propylgallat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth
Ormocomp	micro resist technology
PEG-DA 575	Sigma Aldrich
Penizillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
PETTA	Sigma Aldrich
Phenolrot	Carl Roth
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Biochrom (bei Immunohistochemie) Life Technologies (in Zellkultur)
Triton X-100	Carl Roth
Trypanblau	Carl Roth
Trypsin/EDTA	Invitrogen

B Messdaten Kardiomyozyten

Hier sind die Messungen gezeigt, die dem Balkendiagramm aus Abbildung 5.7 zu Grunde liegen.

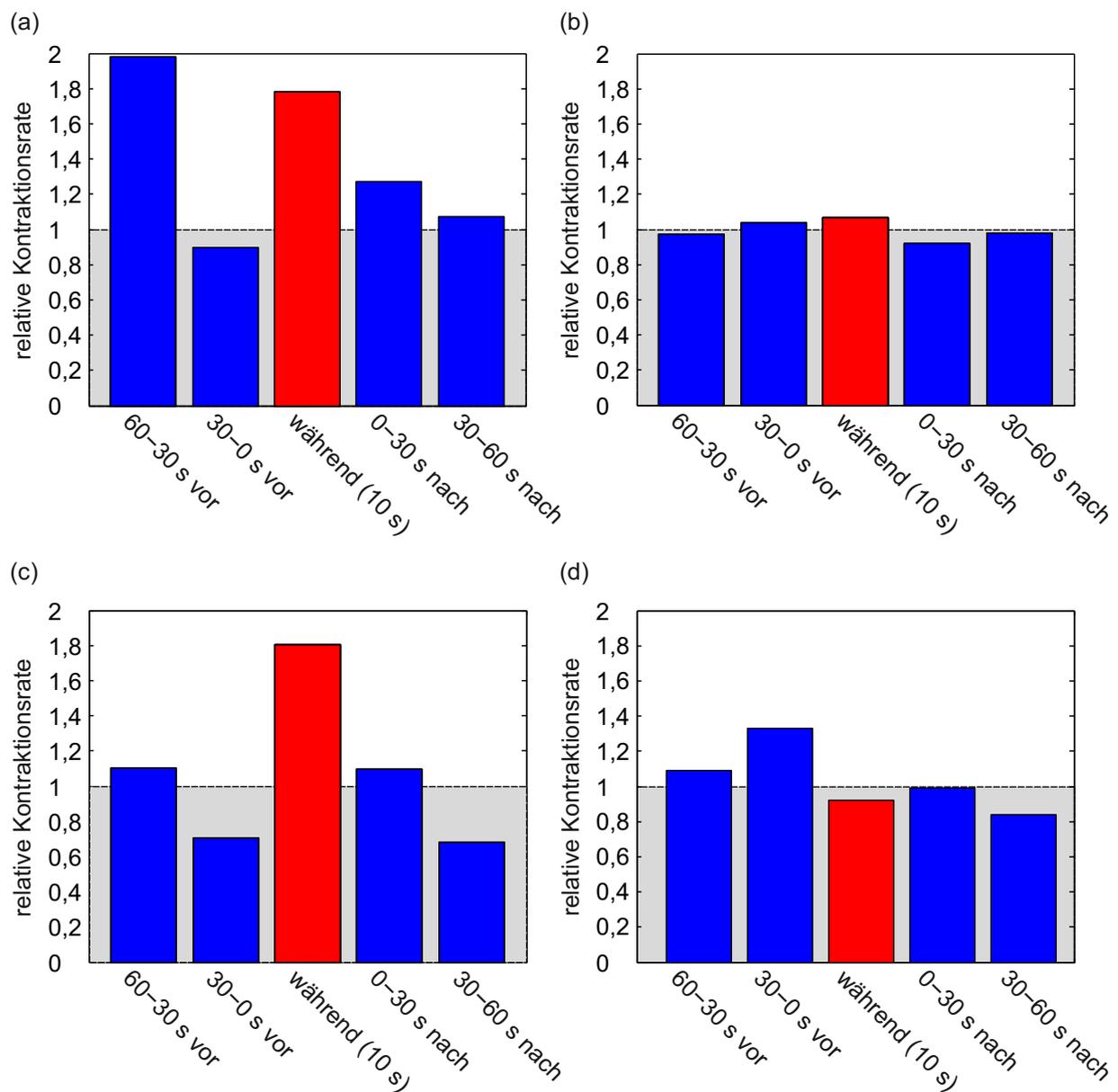


Abbildung B.1: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

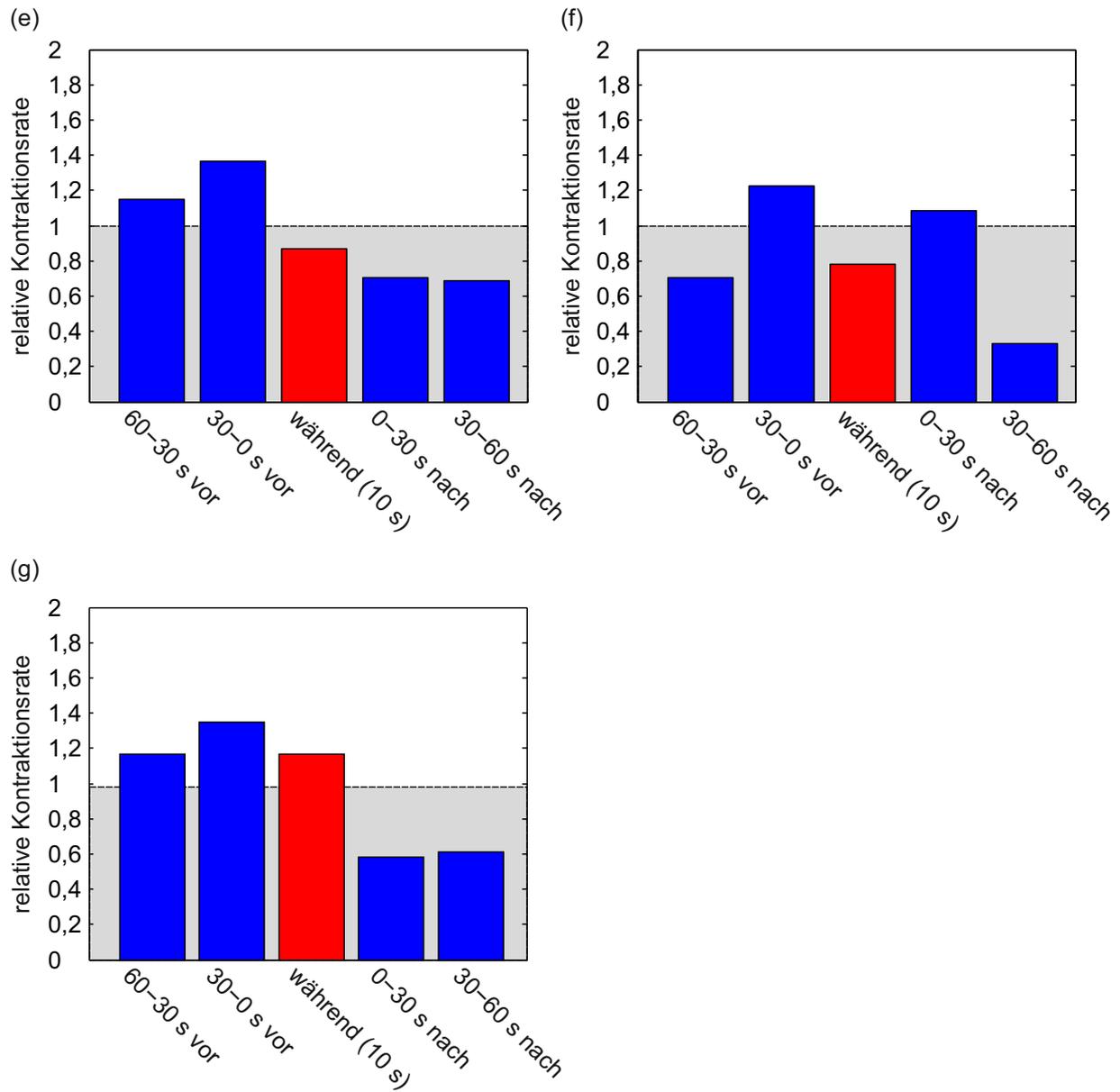


Abbildung B.1: Originalmessungen zu der in Abbildung 5.7 gezeigten Zusammenfassung (Fortsetzung)

C Messdaten Fibroblasten

Auf den folgenden Seiten sind die einzelnen Maximalprojektionen gezeigt, die den Falschfarbendarstellungen aus Kapitel 6.2 zugrunde liegen.

Zu einer Messreihe gehörende Projektionen sind auf jeweils einer Doppelseite dargestellt.

15 Minuten Mikromanipulation bei 0,5 Hz, Färbung von Paxillin und pFAK:

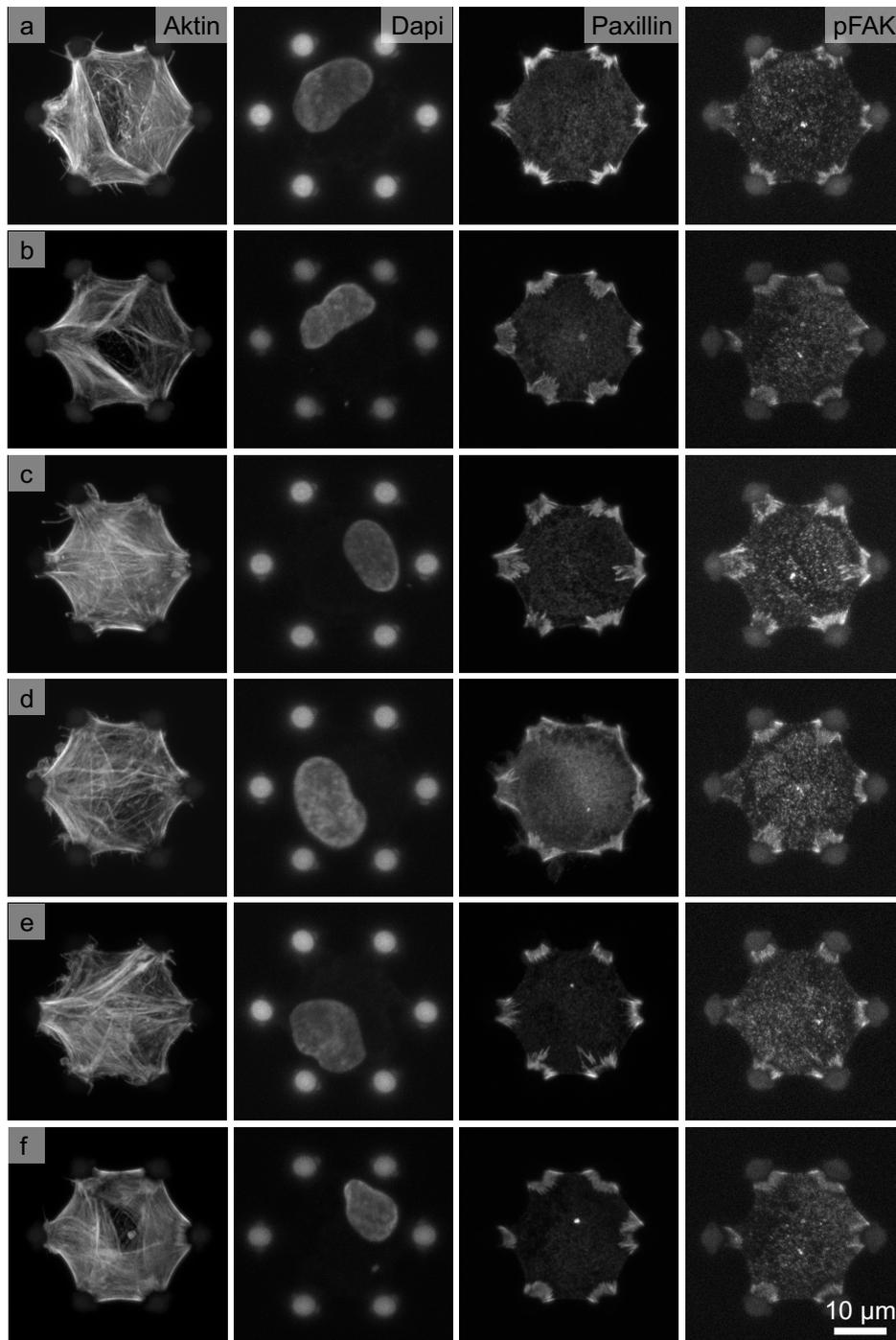


Abbildung C.1: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

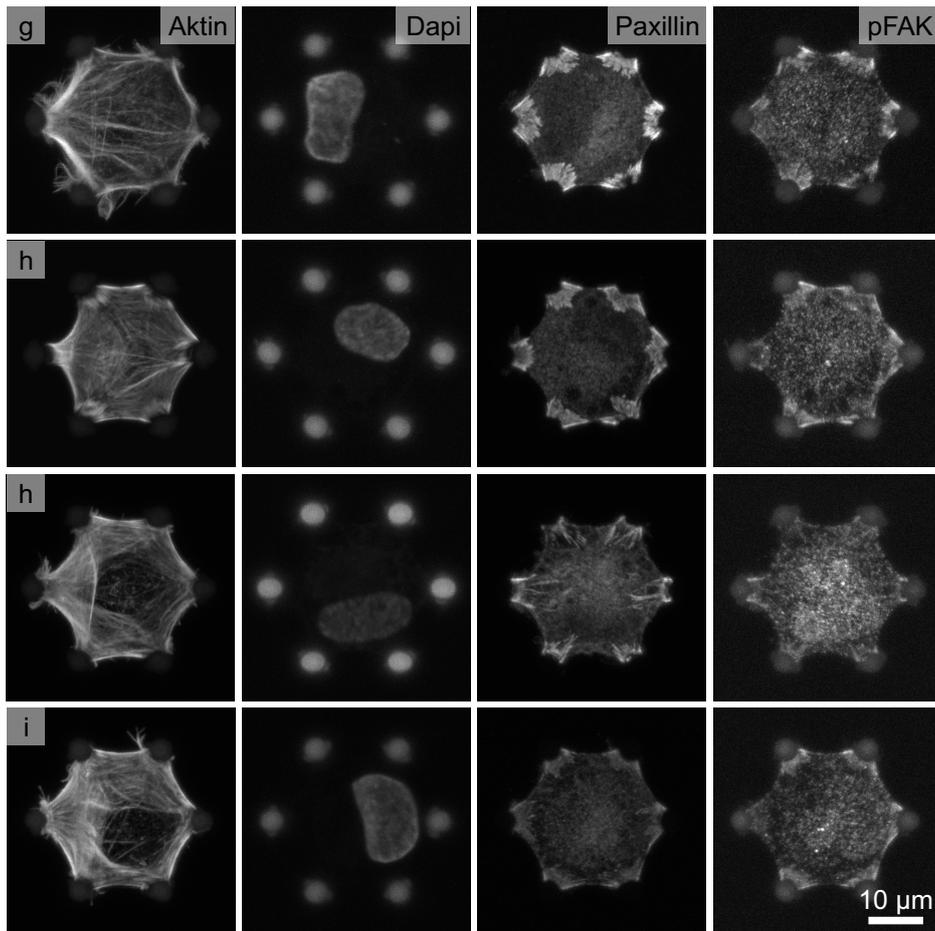


Abbildung C.1: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.7 (a) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

Nicht manipulierte Referenzen bei Färbung von Paxillin und pFAK:

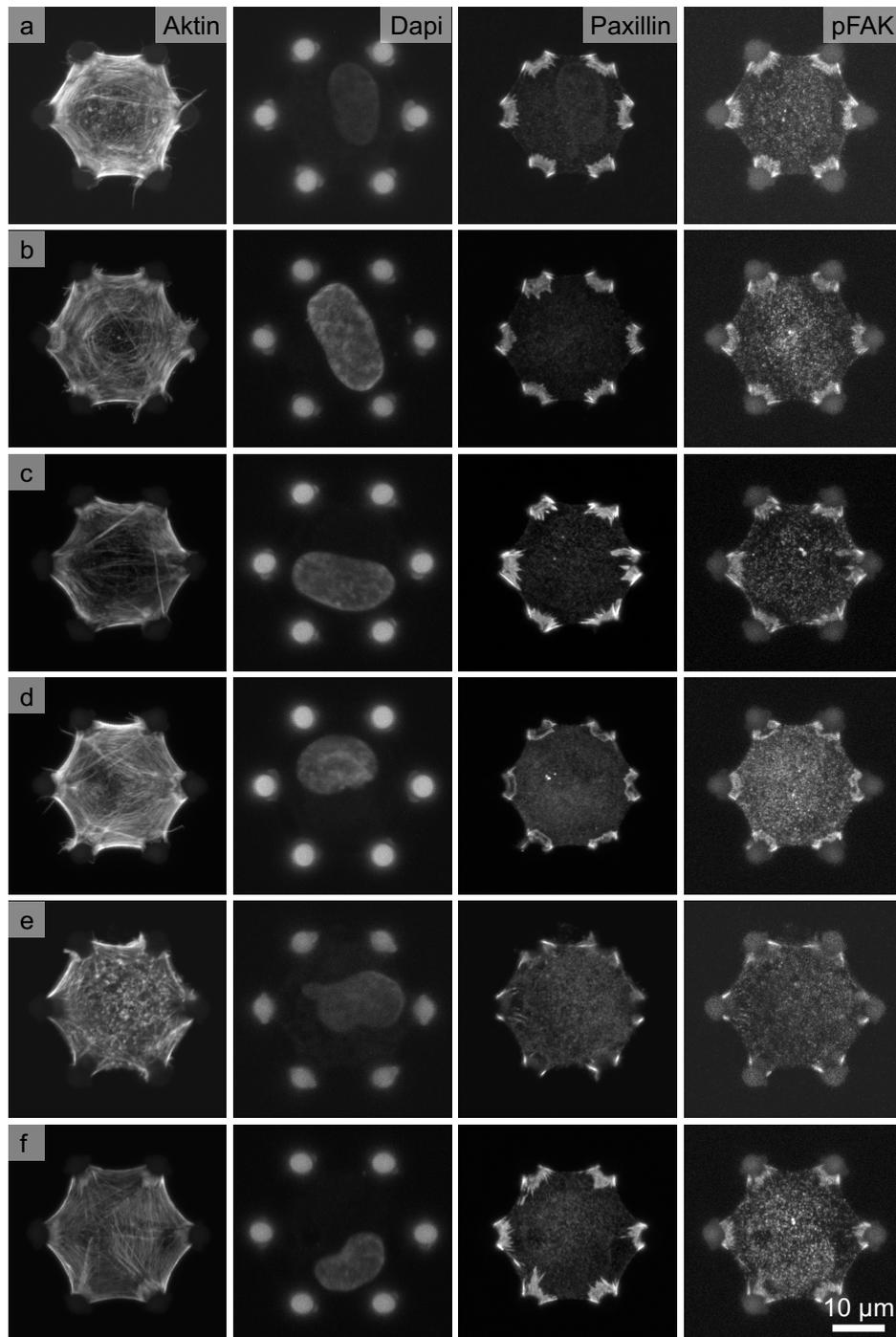


Abbildung C.2: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

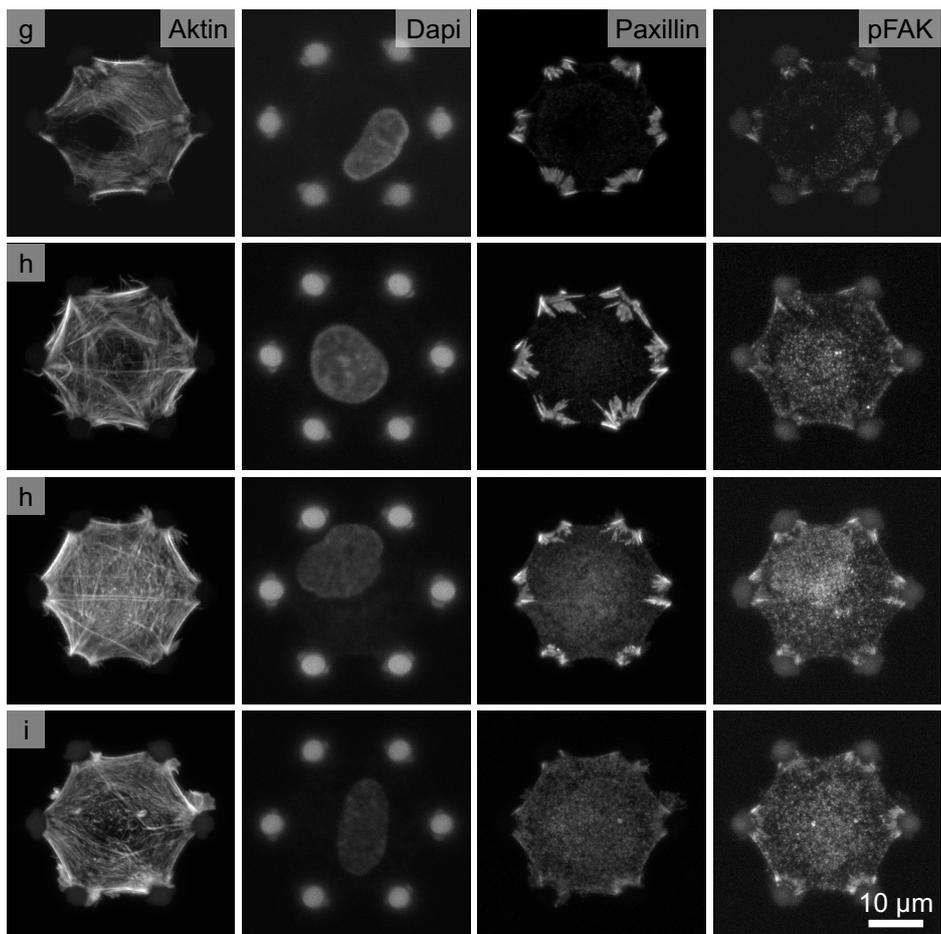


Abbildung C.2: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.7 (b) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

5 Minuten Mikromanipulation bei 0,5 Hz, Färbung von Paxillin und pFAK:

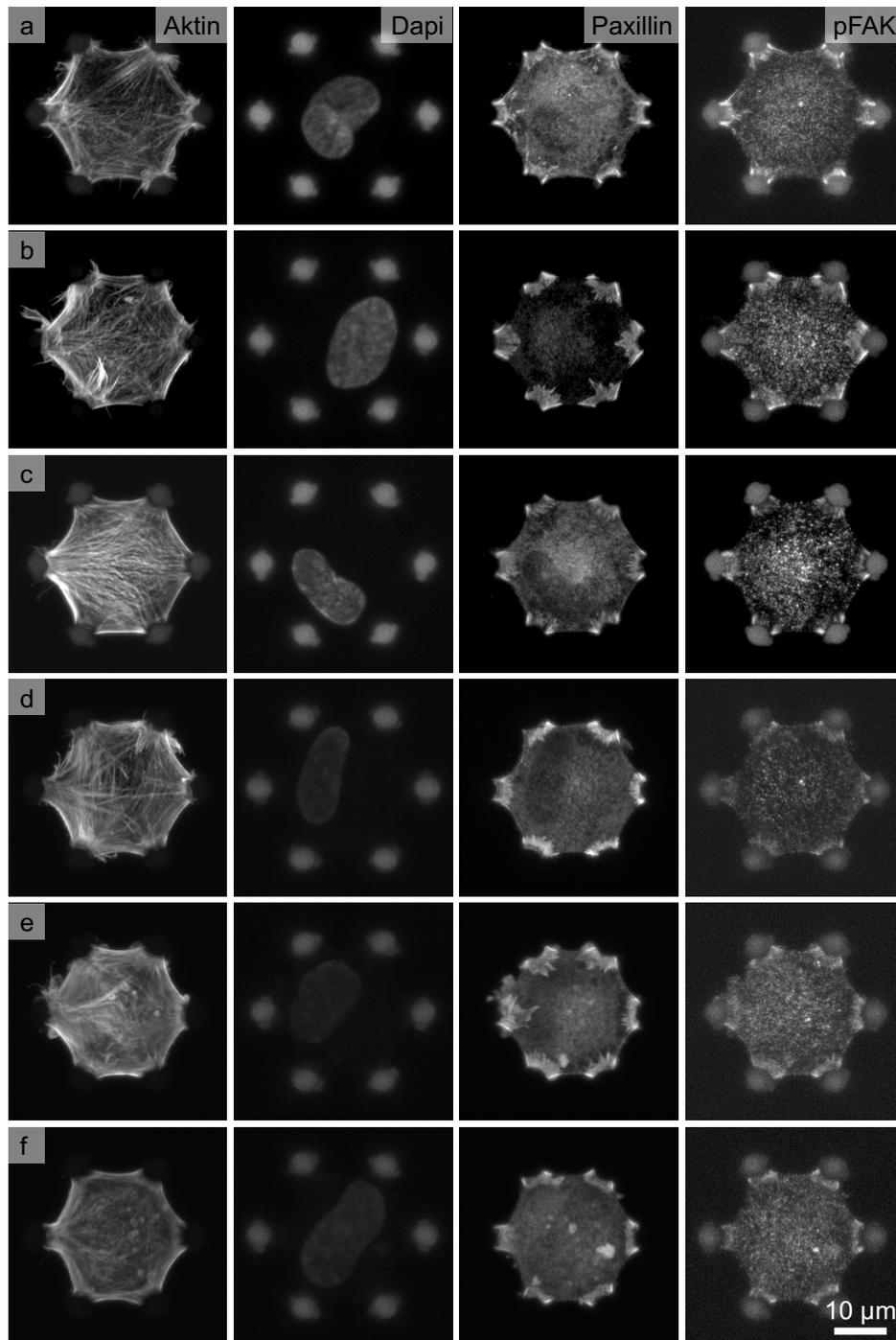


Abbildung C.3: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

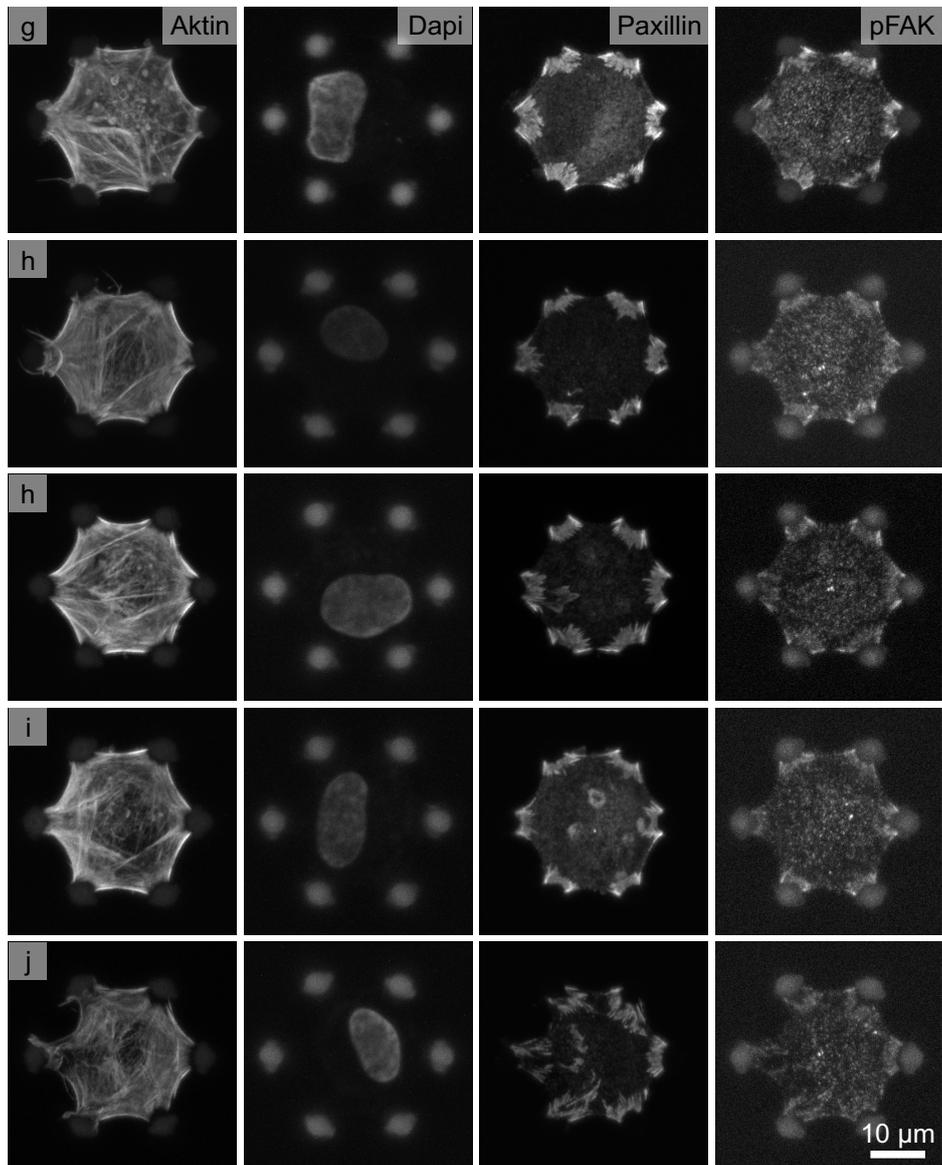


Abbildung C.3: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.9 (a) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

15 Minuten konstante Streckung, Färbung von Paxillin und pFAK:

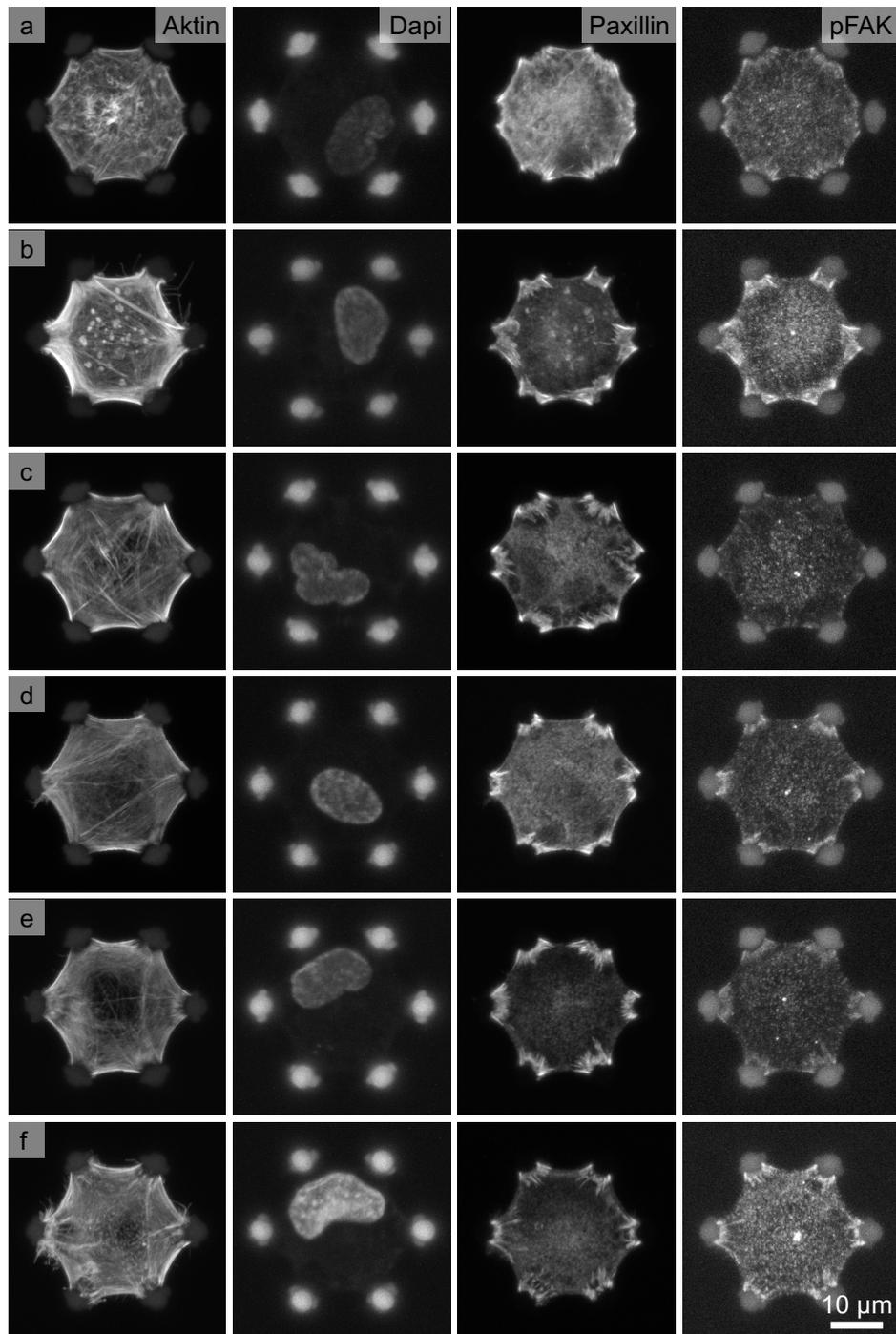


Abbildung C.4: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

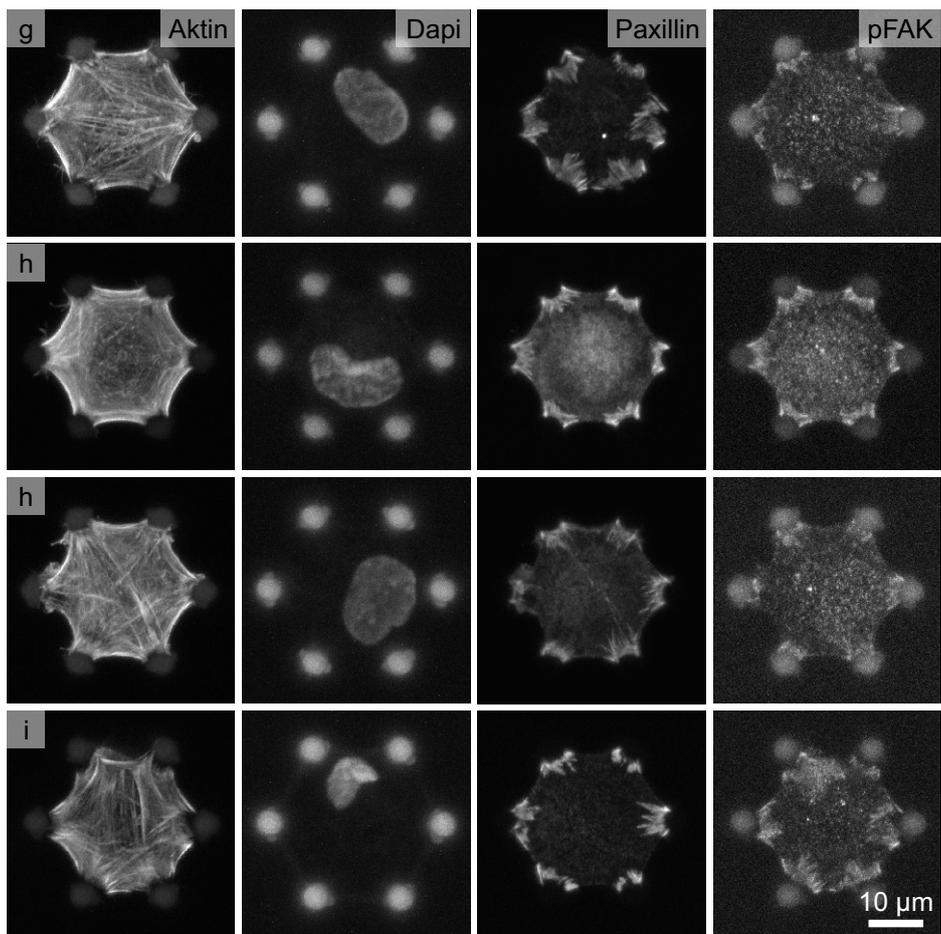


Abbildung C.4: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.9 (b) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

15 Minuten Mikromanipulation bei 0,5 Hz, Färbung von Paxillin und pPaxillin:

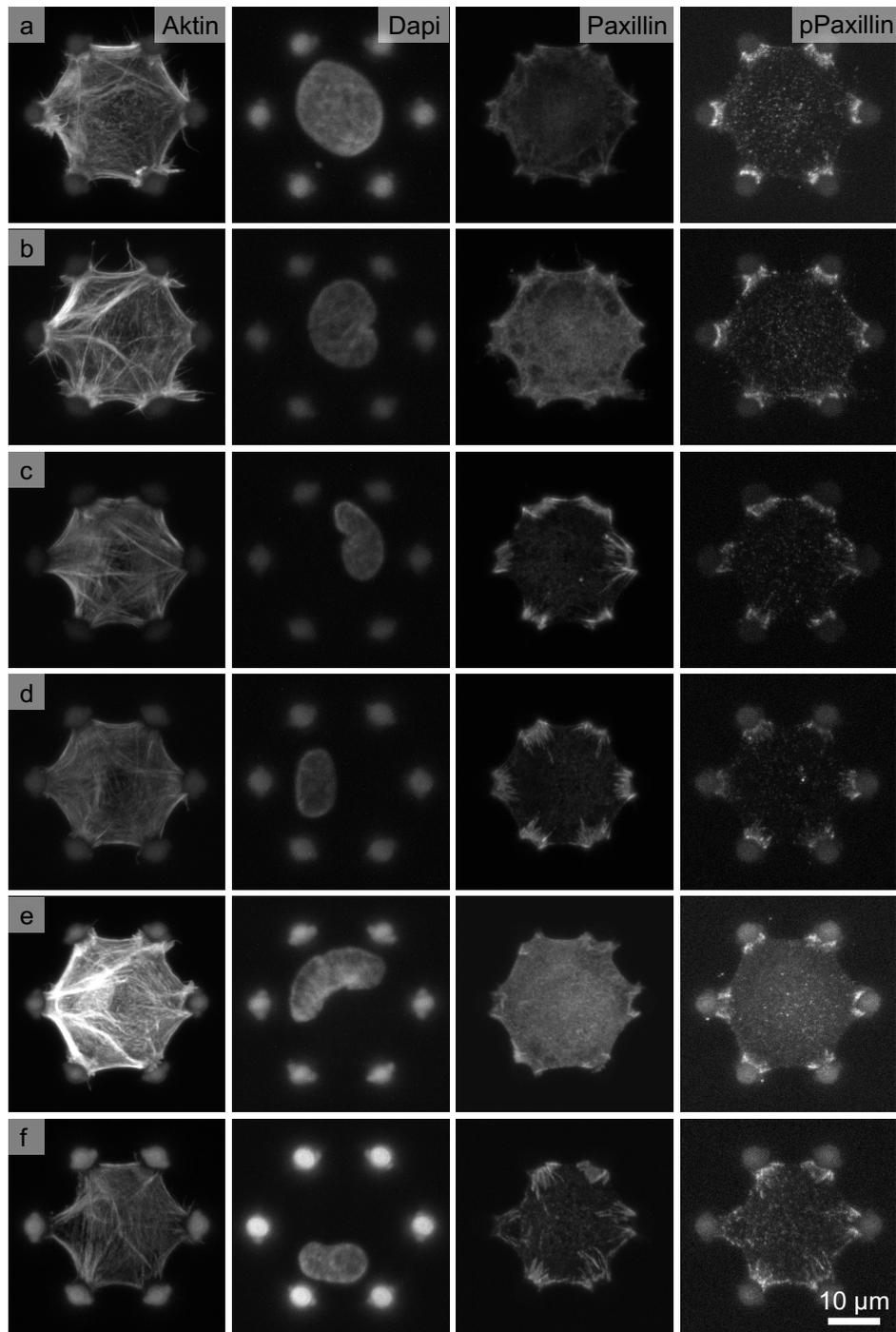


Abbildung C.5: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

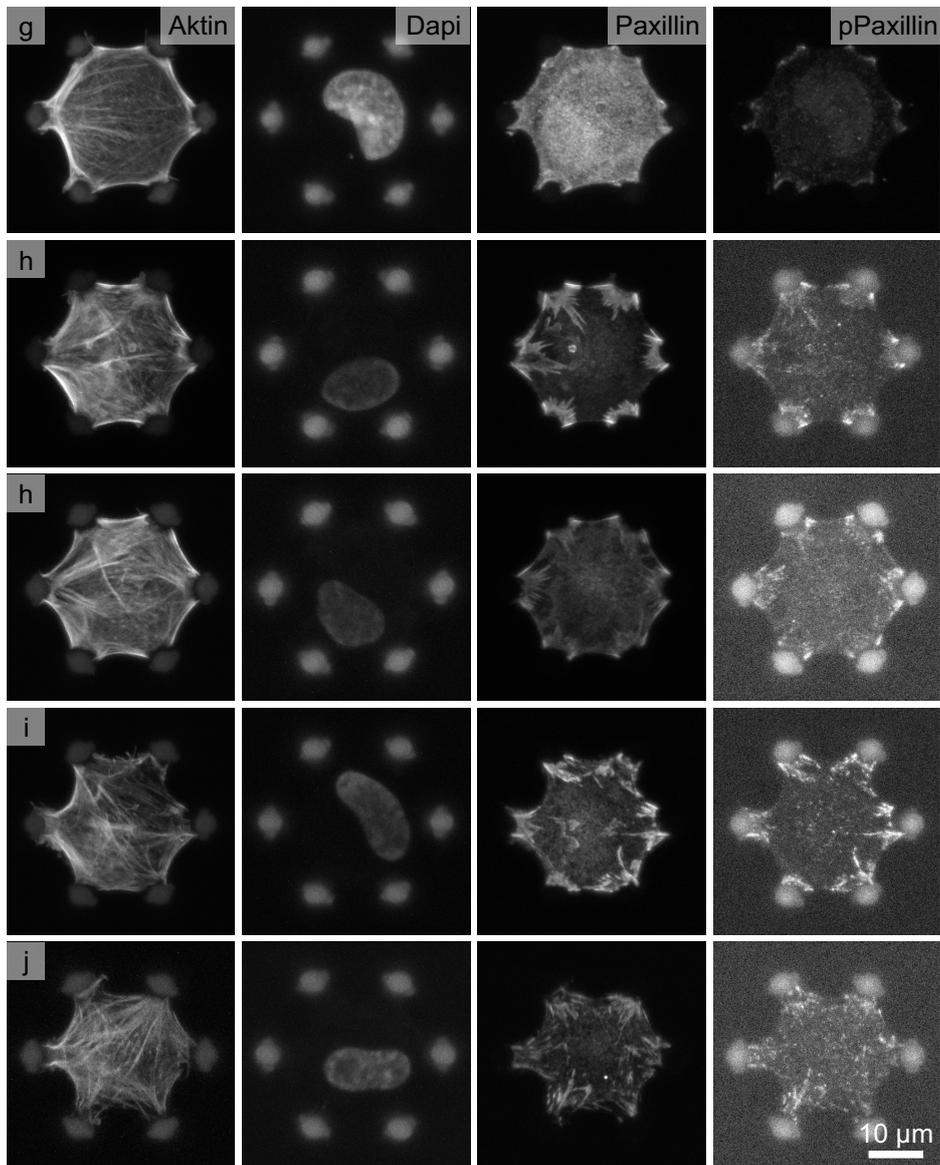


Abbildung C.5: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.8 (a) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

Nicht manipulierte Referenzen, Färbung von Paxillin und pPaxillin:

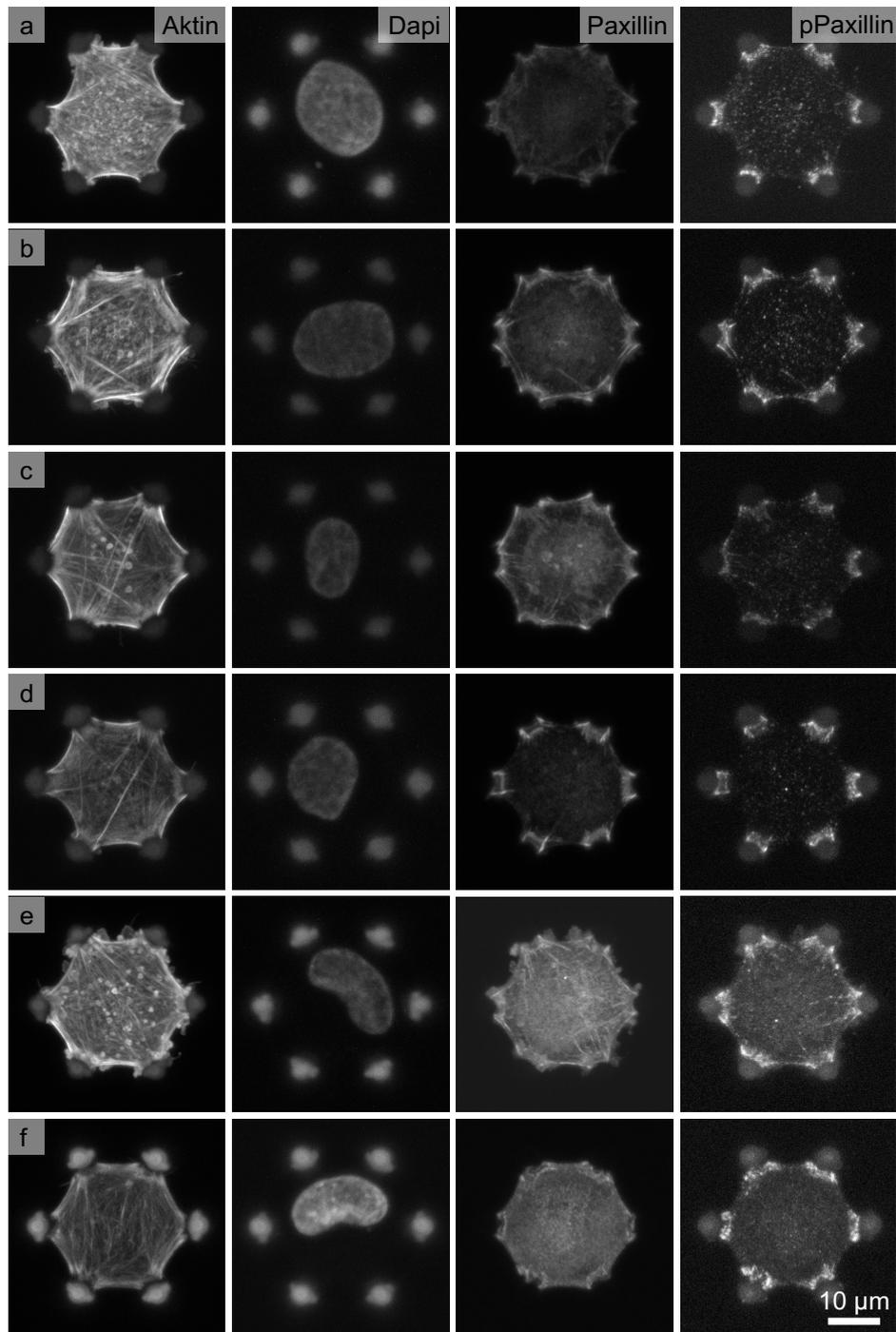


Abbildung C.6: Bildunterschrift siehe gegenüberliegende Seite.

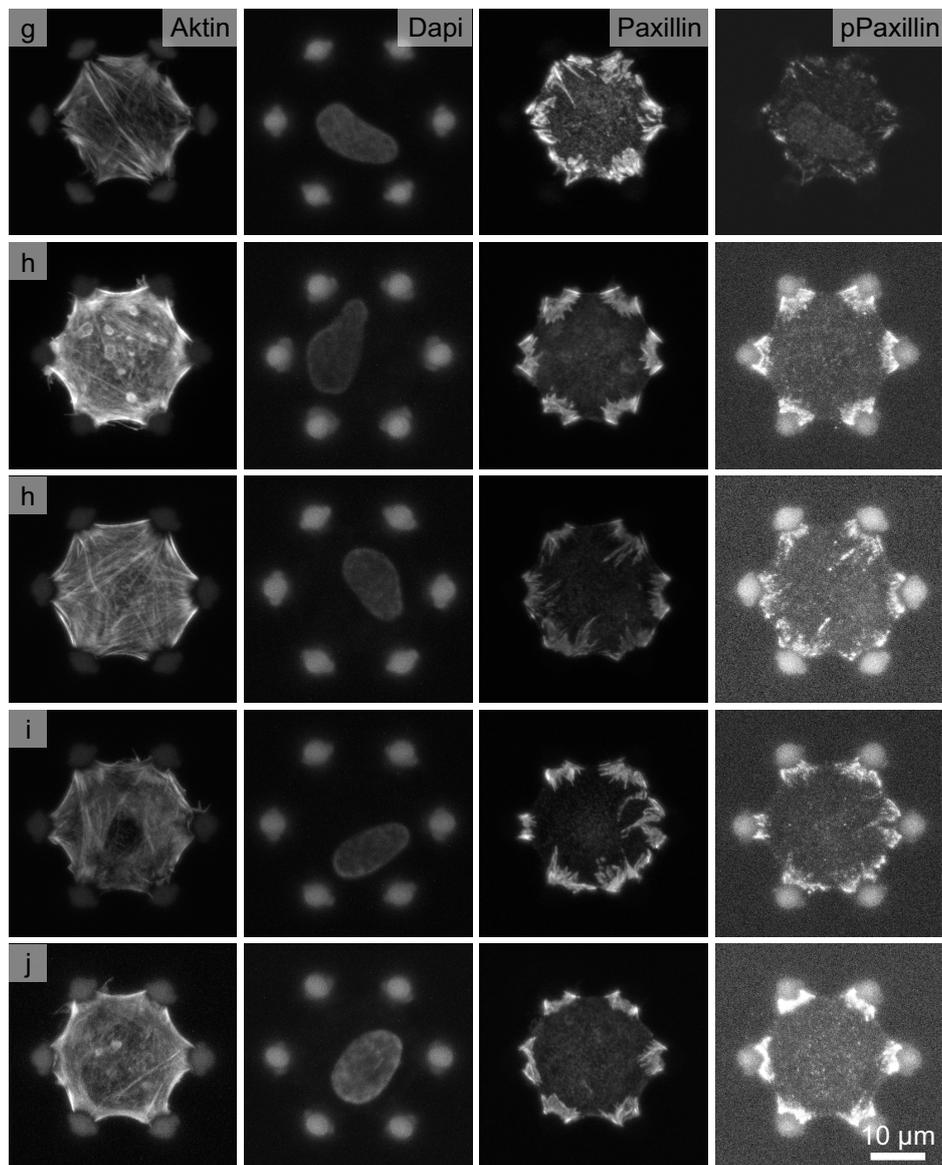


Abbildung C.6: Einzelmessungen zu den in Abbildung 6.8 (b) gezeigten Falschfarbendarstellungen. (Fortsetzung)

Literaturverzeichnis

- [1] R. G. Harrison, *The reaction of embryonic cells to solid structures*, Journal of Experimental Zoology **17**, 521 (1914).
- [2] K. M. Yamada und E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*, Cell **130** (4), 601 (2007).
- [3] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens und K. M. Yamada, *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*, Science **294**, 1708 (2001).
- [4] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney und D. E. Discher, *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*, Cell **126**, 677 (2006).
- [5] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo und Y. li Wang, *Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate*, Biophysical Journal **79**, 144 (2000).
- [6] F. Klein, B. Richter, T. Striebel, C. M. Franz, G. v. Freymann, M. Wegener und M. Bastmeyer, *Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture*, Advanced Materials **23**, 1341 (2011).
- [7] 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*, Advanced Materials **22**, 868 (2010).
- [8] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle* (WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004).
- [9] J. E. Bergmann, A. Kupfer und S. Singer, *Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts*, Proceedings of the National Academy of Sciences **80**, 1367 (1983).
- [10] P. Singh, C. Carraher und J. E. Schwarzbauer, *Assembly of fibronectin extracellular matrix*, Annual Review of Cell and Developmental Biology **26**, 397 (2010).
- [11] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov und K. M. Yamada, *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton*, Nat Rev Mol Cell Biol **2**, 793 (2001).
- [12] Y. Danilov und R. Juliano, *(Arg-Gly-Asp)_n-Albumin conjugates as a model substratum for integrin-mediated cell adhesion*, Experimental Cell Research **182**, 186 (1989).

- [13] S. K. Mitra, D. A. Hanson und D. D. a. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*, Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**, 56 (2005).
- [14] H. R. Bourne, D. A. Sanders und F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*, Nature **348**, 125 (1990).
- [15] 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 (2010).
- [16] D. Llić, Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, T. Yamamoto und S. Aizawa, *Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice*, Nature **377**, 539 (1995).
- [17] M. A. Digman, C. M. Brown, A. R. Horwitz, W. W. Mantulin und E. Gratton, *Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy*, Biophysical Journal **94**, 2819 (2008).
- [18] N. O. Deakin und C. E. Turner, *Paxillin comes of age*, Journal of Cell Science **121**, 2435 (2008).
- [19] D. J. Webb, K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons und A. F. Horwitz, *FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly*, Nature Cell Biology **6**, 154 (2004).
- [20] B. J. Foth, M. C. Goedecke und D. Soldati, *New insights into myosin evolution and classification*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**, 3681 (2006).
- [21] C. A. DeForest und K. S. Anseth, *Advances in bioactive hydrogels to probe and direct cell fate*, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering **3**, 421 (2012).
- [22] C. A. Reinhart-King, M. Dembo und D. A. Hammer, *The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading*, Biophysical Journal **89**, 676 (2005).
- [23] P. DiMilla, J. Stone, J. Quinn, S. Albelda und D. Lauffenburger, *Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength*, The Journal of Cell Biology **122**, 729 (1993).
- [24] 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 (1997).
- [25] G. Maheshwari, G. Brown, D. Lauffenburger, A. Wells und L. Griffith, *Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering*, Journal of Cell Science **113**, 1677 (2000).

- [26] L. Y. Koo, D. J. Irvine, A. M. Mayes, D. A. Lauffenburger und L. G. Griffith, *Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus*, Journal of Cell Science **115**, 1423 (2002).
- [27] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantelehner, H. Kessler und J. P. Spatz, *Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces*, ChemPhysChem **5**, 383 (2004).
- [28] 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*, Journal of Cell Science **117**, 41 (2004).
- [29] N. Xia, C. K. Thodeti, T. P. Hunt, Q. Xu, M. Ho, G. M. Whitesides, R. Westervelt und D. E. Ingber, *Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation*, The FASEB Journal **22**, 1649 (2008).
- [30] D. E. Discher, P. Janmey und Y.-l. Wang, *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*, Science **310**, 1139 (2005).
- [31] T. A. Ulrich, E. M. de Juan Pardo und S. Kumar, *The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells*, Cancer Research **69**, 4167 (2009).
- [32] F. Chowdhury, S. Na, D. Li, Y.-C. Poh, T. S. Tanaka, F. Wang und N. Wang, *Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells*, Nature Materials **9**, 82 (2010).
- [33] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides und D. E. Ingber, *Geometric control of cell life and death*, Science **276**, 1425 (1997).
- [34] 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*, Nature Cell Biology **7**, 947 (2005).
- [35] M. Théry, A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen und M. Bornens, *Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment*, Cell Motility and the Cytoskeleton **63**, 341 (2006).
- [36] M. Théry, A. Jiménez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens und F. Jülicher, *Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation*, Nature **447**, 493 (2007).
- [37] C.-H. Choi, S. H. Hagvall, B. M. Wu, J. C. Dunn, R. E. Beygui und C.-J. Kim, *Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography*, Biomaterials **28**, 1672 (2007).

- [38] B. A. Dalton, X. F. Walboomers, M. Dziegielewski, M. D. M. Evans, S. Taylor, J. A. Jansen und J. G. Steele, *Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves*, Journal of Biomedical Materials Research **56**, 195 (2001).
- [39] M. J. Dalby, N. Gadegaard, M. O. Riehle, C. D. Wilkinson und A. S. Curtis, *Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **36**, 2005 (2004).
- [40] M. J. Dalby, N. Gadegaard und C. D. Wilkinson, *The response of fibroblasts to hexagonal nanotopography fabricated by electron beam lithography*, Journal of Biomedical Materials Research Part A **84A**, 973 (2008).
- [41] L. G. Griffith und M. A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*, Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**, 211 (2006).
- [42] 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** (12), 2519 (2006).
- [43] C. A. DeForest und K. S. Anseth, *Photoreversible patterning of biomolecules within click-based hydrogels*, Angewandte Chemie International Edition **51**, 1816 (2012).
- [44] B. Duan, M. Wang, W. Y. Zhou, W. L. Cheung, Z. Y. Li und W. W. Lu, *Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering*, Acta Biomaterialia **6**, 4495 (2010).
- [45] N. Sudarmadji, J. Tan, K. Leong, C. Chua und Y. Loh, *Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in selective laser-sintered polyhedral for functionally graded scaffolds*, Acta Biomaterialia **7**, 530 (2011).
- [46] X. Zhou, F. Boey, F. Huo, L. Huang und H. Zhang, *Chemically functionalized surface patterning*, Small **7**, 2273 (2011).
- [47] D. L. Coutu, A.-M. Yousefi und J. Galipeau, *Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy*, Journal of Cellular Biochemistry **108**, 537 (2009).
- [48] S. J. Hollister, *Porous scaffold design for tissue engineering*, Nature Materials **4**, 518 (2005).
- [49] C. C. Chang, E. D. Boland, S. K. Williams und J. B. Hoying, *Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **98B**, 160 (2011).
- [50] A. Pfister, R. Landers, A. Laib, U. Hübner, R. Schmelzeisen und R. Mülhaupt, *Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **42**, 624 (2004).

- [51] F. C. Fierz, F. Beckmann, M. Huser, S. H. Irsen, B. Leukers, F. Witte, Özer Degistirici, A. Andronache, M. Thie und B. Müller, *The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds*, *Biomaterials* **29**, 3799 (2008).
- [52] J. A. Lewis, *Direct ink writing of 3D functional materials*, *Advanced Functional Materials* **16**, 2193 (2006).
- [53] J. N. Hanson Shepherd, S. T. Parker, R. F. Shepherd, M. U. Gillette, J. A. Lewis und R. G. Nuzzo, *3D microperiodic hydrogel scaffolds for robust neuronal cultures*, *Advanced Functional Materials* **21**, 47 (2011).
- [54] A. Ovsianikov, S. Schlie, A. Ngezahayo, A. Haverich und B. N. Chichkov, *Two-photon polymerization technique for microfabrication of CAD-designed 3D scaffolds from commercially available photosensitive materials*, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **1**, 443 (2007).
- [55] P. Tayalia, C. R. Mendonca, T. Baldacchini, D. J. Mooney und E. Mazur, *3D Cell-migration studies using two-photon engineered polymer scaffolds*, *Advanced Materials* **20**, 4494 (2008).
- [56] T. Weiss, G. Hildebrand, R. Schade und K. Liefeth, *Two-Photon polymerization for microfabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering application*, *Engineering in Life Sciences* **9**, 384 (2009).
- [57] R. Schade, T. Weiss, A. Berg, M. Schnabelrauch und K. Liefeth, *Two-photon techniques in tissue engineering*, *International journal of Artificial Organs* **33**, 219 (2010).
- [58] A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, L. Möller, G. Dräger und B. Chichkov, *Laser Fabrication of Three-Dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applications in Tissue Engineering*, *Biomacromolecules* **12**, 851 (2011).
- [59] A. Matei, M. Dinescu, E. C. Buruiana, T. Buruiana, I. Petcu und C. Mustaciosu, *Ormosils scaffolds produced by laser processing for fibroblast cell growth*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**, 29 (JAN-MAR 2011).
- [60] A. M. Greiner, M. Jäckel, A. C. Scheiwe, D. R. Stamow, T. J. Autenrieth, J. Lahann, C. M. Franz und M. Bastmeyer, *Multifunctional polymer scaffolds with adjustable pore size and chemoattractant gradients for studying cell matrix invasion*, *Biomaterials* **35**, 611 (2014).
- [61] 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*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1484 (2003).
- [62] M. Ochsner, M. R. Dusseiller, H. M. Grandin, S. Luna-Morris, M. Textor, V. Vogel und M. L. Smith, *Micro-well arrays for 3D shape control and high resolution analysis of single cells*, *Lab Chip* **7**, 1074 (2007).

- [63] Y. Zhao, C. C. Lim, D. B. Sawyer, R. Liao und X. Zhang, *Simultaneous orientation and cellular force measurements in adult cardiac myocytes using three-dimensional polymeric microstructures*, Cell Motility and the Cytoskeleton **64**, 718 (2007).
- [64] A. Mata, E. J. Kim, C. A. Boehm, A. J. Fleischman, G. F. Muschler und S. Roy, *A three-dimensional scaffold with precise micro-architecture and surface micro-textures*, Biomaterials **30**, 4610 (2009).
- [65] C. G. Rolli, T. Seufferlein, R. Kemkemer und J. P. Spatz, *Impact of tumor cell cytoskeleton organization on invasiveness and migration: A microchannel-based approach*, PLoS ONE **5**, e8726 (01 2010).
- [66] M. Ochsner, M. Textor, V. Vogel und M. L. Smith, *Dimensionality controls cytoskeleton assembly and metabolism of fibroblast cells in response to rigidity and shape*, PLoS ONE **5**, e9445 (03 2010).
- [67] P. Tayalia, E. Mazur und D. J. Mooney, *Controlled architectural and chemotactic studies of 3D cell migration*, Biomaterials **32**, 2634 (2011).
- [68] M. Andreasson-Ochsner, G. Romano, M. Hakanson, M. L. Smith, D. E. Leckband, M. Textor und E. Reimhult, *Single cell 3-D platform to study ligand mobility in cell-cell contact*, Lab Chip **11**, 2876 (2011).
- [69] R. Gauvin, Y.-C. Chen, J. W. Lee, P. Soman, P. Zorlutuna, J. W. Nichol, H. Bae, S. Chen und A. Khademhosseini, *Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography*, Biomaterials **33**, 3824 (2012).
- [70] U. Klammert, E. Vorndran, T. Reuther, F. A. Müller, K. Zorn und U. Gbureck, *Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**, 2947 (2010).
- [71] G. Kumar, C. K. Tison, K. Chatterjee, P. S. Pine, J. H. McDaniel, M. L. Salit, M. F. Young und C. G. S. Jr., *The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape*, Biomaterials **32**, 9188 (2011).
- [72] J. W. Lee, J. H. Jung, D. S. Kim, G. Lim und D.-W. Cho, *Estimation of cell proliferation by various peptide coating at the PPF/DEF 3D scaffold*, Microelectronic Engineering **86**, 1451 (2009).
- [73] R. J. Pelham und Y.-l. Wang, *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility*, Proceedings of the National Academy of Sciences **94**, 13661 (1997).
- [74] A. K. Harris, P. Wild und D. Stopak, *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*, Science **208**, 177 (1980).
- [75] A. K. Harris, D. Stopak und P. Wild, *Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis*, Nature **290**, 249 (1981).

- [76] D. A. Flusberg, Y. Numaguchi und D. E. Ingber, *Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells*, Molecular Biology of the Cell **12**, 3087 (2001).
- [77] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi *et al.*, *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates*, Nature Cell Biology **3**, 466 (2001).
- [78] A. Kajzar, C. Cesa, N. Kirchgeßner, B. Hoffmann und R. Merkel, *Toward physiological conditions for cell analyses: Forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars*, Biophysical Journal **94**, 1854 (2008).
- [79] W. R. Legant, A. Pathak, M. T. Yang, V. S. Deshpande, R. M. McMeeking und C. S. Chen, *Microfabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D microtissues*, Proceedings of the National Academy of Sciences **106**, 10097 (2009).
- [80] R. C. Buck, *Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of the substratum*, Experimental Cell Research **127**, 470 (1980).
- [81] J. Sadoshima, T. Takahashi, L. Jahn und S. Izumo, *Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes.*, Proceedings of the National Academy of Sciences **89**, 9905 (1992).
- [82] C. Neidlinger-Wilke, E. S. Grood, J. H.-C. Wang, R. A. Brand und L. Claes, *Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates*, Journal of Orthopaedic Research **19**, 286 (2001).
- [83] K. Hayakawa, N. Sato und T. Obinata, *Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching*, Exp. Cell Res. **268**, 104 (2001).
- [84] A. M. Goldyn, B. A. Rioja, J. P. Spatz, C. Ballestrem und R. Kemkemer, *Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding*, Journal of Cell Science **122**, 3644 (2009).
- [85] U. Faust, N. Hampe, W. Rubner, N. Kirchgeßner, S. Safran, B. Hoffmann und R. Merkel, *Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain*, PLoS ONE **6**, e28963 (2011).
- [86] M. Eastwood, V. Mudera, D. Mcgrouter und R. Brown, *Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: Morphological changes*, Cell Motility and the Cytoskeleton **40**, 13 (1998).
- [87] A. M. Collinsworth, C. E. Torgan, S. N. Nagda, R. J. Rajalingam, W. E. Kraus und G. A. Truskey, *Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch*, Cell and Tissue Research **302**, 243 (2000).

- [88] P. Dartsch, H. Hämmerle und E. Betz, *Orientation of cultured arterial smooth muscle cells growing on cyclically stretched substrates*, Cells Tissues Organs **125**, 108 (1986).
- [89] A. S. Torsoni, T. M. Marin, L. A. Velloso und K. G. Franchini, *RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes*, American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **289**, H1488 (2005).
- [90] S. Dhein, A. Schreiber, S. Steinbach, D. Apel, A. Salameh, F. Schlegel, M. Kostelka, P. M. Dohmen und F. W. Mohr, *Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization*, Progress in Biophysics and Molecular Biology **115**, 93 (2014).
- [91] D. Garnier, *Attachment procedures for mechanical manipulation of isolated cardiac myocytes: a challenge*, Cardiovascular Research **28**, 1758 (1994).
- [92] A. J. Brady, S. T. Tan und N. V. Ricciuti, *Contractile force measured in unskinned isolated adult*, Nature **282**, 728 (1979).
- [93] J. Y. Le Guennec, N. Peineau, J. A. Argibay, K. G. Mongo und D. Garnier, *A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: length dependence of passive and active tension*, Journal of Molecular and Cellular Cardiology **22**, 1083 (1990).
- [94] R. P. Franke, M. Gräfe, H. Schnittler, D. Seiffge, C. Mittermayer und D. Drenckhahn, *Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress*, Nature **307**, 648 (1984).
- [95] P. F. Davies, A. Robotewskyj und M. L. Griem, *Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces*, J. Clin. Invest. **93**, 2031 (1994).
- [96] C. G. Galbraith, R. Skalak und S. Chien, *Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton*, Cell Motility and Cytoskeleton **40**, 317 (1998).
- [97] A. R. Wechezak, R. F. Viggers und L. R. Sauvage, *Fibronectin and F-actin redistribution in cultured endothelial cells exposed to shear stress*, Laboratory Investigation **53**, 639 (1985).
- [98] R. Zhao, T. Boudou, W.-G. Wang, C. S. Chen und D. H. Reich, *Magnetic approaches to study collective three-dimensional cell mechanics in long-term cultures (invited)*, Journal of Applied Physics **115**, (2014).
- [99] D. Choquet, D. P. Felsenfeld und M. P. Sheetz, *Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages*, Cell **88**, 39 (1997).

- [100] F. J. Alenghat, B. Fabry, K. Y. Tsai, W. H. Goldmann und D. E. Ingber, *Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer*, Biochemical and Biophysical Research Communications **277**, 93 (2000).
- [101] B. D. Matthews, D. R. Overby, F. J. Alenghat, J. Karavitis, Y. Numaguchi, P. G. Allen und D. E. Ingber, *Mechanical properties of individual focal adhesions probed with a magnetic microneedle*, Biochemical and Biophysical Research Communications **313**, 758 (2004).
- [102] 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*, Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 14553 (2007).
- [103] S. Maruo, O. Nakamura und S. Kawata, *Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization*, Optics Letters **22**, 132 (Jan 1997).
- [104] S. Maruo und S. Kawata, *Two-photon-absorbed near-infrared photopolymerization for three-dimensional microfabrication*, Microelectromechanical Systems, Journal of **7**, 411 (Dec 1998).
- [105] J. Fischer, G. von Freymann und M. Wegener, *The materials challenge in diffraction-unlimited direct-laser-writing optical lithography*, Advanced Materials **22**, 3578 (2010).
- [106] 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*, Applied Physics Letters **97**, (2010).
- [107] <http://www.nanoscribe.de>, Nanoscribe GmbH.
- [108] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud und P. Vettiger, *SU-8: a low-cost negative resist for MEMS*, Journal of Micromechanics and Microengineering **7**, 121 (1997).
- [109] K. V. Nemani, K. L. Moodie, J. B. Brennick, A. Su und B. Gimi, *In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility*, Materials Science and Engineering: C **33**, 4453 (2013).
- [110] M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A. M. Gigler und R. W. Stark, *Cell proliferation assays on plasma activated SU-8*, Microelectronic Engineering **85**, 1298 (2008).
- [111] T. A. Striebel, *Herstellung und Charakterisierung von dreidimensionalen Mikrostrukturen für Zelleexperimente*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (2011).
- [112] M. Brahm, *Polymerchemie kompakt* (S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2009).

- [113] H. G. Craighead, *10 nm resolution electron beam lithography*, Journal of Applied Physics **55**, 4430 (1984).
- [114] J. B. Mueller, J. Fischer, F. Mayer, M. Kadic und M. Wegener, *Polymerization kinetics in three-dimensional direct laser writing*, Advanced Materials , 6566 (2014).
- [115] <http://www.ormocer.de>, Fraunhofer Institut für Silikatforschung.
- [116] R. Buestrich, F. Kahlenberg, M. Popall, P. Dannberg, R. Müller-Fiedler und O. Rösch, *ORMOCER®s for optical interconnection technology*, Journal of Sol-Gel Science and Technology **20**, 181 (2001).
- [117] J. H. Lee, J. Kopecek und J. D. Andrade, *Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants*, Journal of Biomedical Materials Research **23**, 351 (MAR 1989).
- [118] N. P. Desai und J. A. Hubell, *Biological responses to polyethylene oxide modified polyethylene terephthalate surfaces*, Journal of Biomedical Materials Research **25**, 829 (JUL 1991).
- [119] Ciba Specialty Chemicals, *Ciba® IRGACURE® 369*, Produkt-Datenblatt (2001).
- [120] M. B. Mellott, K. Searcy und M. V. Pishko, *Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization*, Biomaterials **22**, 929 (2001).
- [121] T. Baldacchini, C. N. LaFratta, R. A. Farrer, M. C. Teich, B. E. A. Saleh, M. J. Naughton und J. T. Fourkas, *Acrylic-based resin with favorable properties for three-dimensional two-photon polymerization*, Journal of Applied Physics **95**, 6072 (2004).
- [122] M. Théry, V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita und M. Bornens, *Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity*, Proceedings of the National Academy of Sciences **103** (52), 19771 (2006).
- [123] M. Jaggy, B. G. Wundari, A. C. Scheiwe, B. Richter, T. Autenrieth, A. Greiner und M. Bastmeyer, *Cell behavior in response to 2D vs. 3D substrate geometry*, in Vorbereitung.
- [124] R. L. DeHaan, *The potassium-sensitivity of isolated embryonic heart cells increases with development*, Developmental Biology **23**, 226 (1970).
- [125] C. Horres, M. Lieberman und J. Purdy, *Growth orientation of heart cells on nylon monofilament*, The Journal of Membrane Biology **34**, 313 (1977).
- [126] I. S. Polinger, *Separation of cell types in embryonic heart cell cultures*, Experimental Cell Research **63**, 78 (1970).

- [127] M. Ghibaudo, L. Trichet, J. L. Digabel, A. Richert, P. Hersen und B. Ladoux, *Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration*, Biophysical Journal **97**, 357 (2009).
- [128] S. Kumar und V. M. Weaver, *Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell*, Cancer and Metastasis Reviews **28**, 113 (2009).
- [129] E. Cukierman, R. Pankov und K. M. Yamada, *Cell interactions with three-dimensional matrices*, Current Opinion in Cell Biology **14**, 633 (2002).
- [130] P. Sdek, P. Zhao, Y. Wang, C.-j. Huang, C. Y. Ko, P. C. Butler, J. N. Weiss und W. R. MacLellan, *Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes*, The Journal of Cell Biology **194**, 407 (2011).
- [131] T. N. James, *Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: Part I–structure*, Progress in Cardiovascular Diseases **45**, 235 (2002).
- [132] T. N. James, *Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: Part II–function*, Progress in Cardiovascular Diseases **45**, 327 (2003).
- [133] W. C. Claycomb, N. A. Lanson, B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski und N. J. Izzo, *HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*, Proceedings of the National Academy of Sciences **95**, 2979 (1998).
- [134] M. Ishii, I. Mueller, T. Nakajima, E. Pasquale und K. Ogawa, *EphB signaling inhibits gap junctional intercellular communication and synchronized contraction in cultured cardiomyocytes*, Basic Research in Cardiology **106**, 1057 (2011).
- [135] A. C. Scheiwe, S. C. Frank, T. J. Autenrieth, M. Bastmeyer und M. Wegener, *Subcellular stretch-induced cytoskeletal response of single fibroblasts within 3D designer scaffolds*, Biomaterials **44**, 186 (2015).
- [136] B.-Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K. M. Yamada und B. Geiger, *Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions*, Molecular Biology of the Cell **11**, 1047 (2000).
- [137] E. Zamir und B. Geiger, *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*, Journal of Cell Science **114**, 3583 (2001).
- [138] R. Zaidel-Bar, R. Milo, Z. Kam und B. Geiger, *A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions*, Journal of Cell Science **120**, 137 (2007).
- [139] E. Zamir, B. Katz, S. Aota, K. Yamada, B. Geiger und Z. Kam, *Molecular diversity of cell-matrix adhesions*, Journal of Cell Science **112**, 1655 (1999).

- [140] A. Besser und U. S. Schwarz, *Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction*, New Journal of Physics **9**, 425 (2007).
- [141] A. Livne, E. Bouchbinder und B. Geiger, *Cell reorientation under cyclic stretching.*, Nature communications **5**, 3938 (2014).
- [142] J. T. Parsons, A. R. Horwitz und M. A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **11**, 633 (2010).
- [143] S. Li, M. Kim, Y. L. Hu, S. Jalali, D. D. Schlaepfer, T. Hunter, S. Chien und J. Y. Shyy, *Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases*, Journal of Biological Chemistry **272**, 30455 (1997).
- [144] I. B. Bischofs, F. Klein, D. Lehnert, M. Bastmeyer und U. S. Schwarz, *Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape*, Biophysical Journal **95**, 3488 (2008).
- [145] T. Bückmann, R. Schittny, M. Thiel, M. Kadic, G. W. Milton und M. Wegener, *On three-dimensional dilational elastic metamaterials*, New Journal of Physics **16**, 033032 (2014).
- [146] T. Bückmann, N. Stenger, M. Kadic, J. Kaschke, A. Frölich, T. Kennerknecht, C. Eberl, M. Thiel und M. Wegener, *Tailored 3D mechanical metamaterials made by dip-in direct-laser-writing optical lithography*, Advanced Materials **24**, 2710 (2012).

Danksagung

An diese Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich über die vielen Jahre, die ich am Institut für Angewandte Physik verbracht habe, unterstützten.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Wegener und Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer. Sie haben mir gemeinsam diese interessante interdisziplinäre Arbeit zugetraut und ermöglicht. Ich möchte mich bei beiden gleichermaßen für die sehr gute Betreuung danken. Sie beide hatten auch in schwierigen Phasen der Arbeit immer ein offenes Ohr und viel Verständnis.

Anschließend möchte ich mich bei Dr. Franziska Klein und Dr. Thomas Striebel bedanken, die mich zu Beginn meiner Doktorarbeit sehr unterstützt und mir sehr viel beigebracht haben. Ohne sie hätte ich bei weitem nicht einen so guten Start in die Arbeit gefunden. Für die spätere Betreuung und Unterstützung danke ich Dr. Alexandra Greiner und Dr. Tatjana Autenrieth.

Für die erfolgreiche Kooperation möchte ich Maria Jäckel, Dr. Alexander Greiner und Dr. Clemens Franz danken. Auch bei Mona Jaggy möchte ich mich für die Kooperation bedanken. Es hat immer viel Freude gemacht mit dir zusammen zu Arbeiten! Insbesondere aber danke ich Stephanie Frank für ihre unermüdliche Hilfe beim Daten sammeln und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei all den fleißigen Menschen, die den Wissenschaftsbetrieb am Laufen halten: Den Sekretärinnen, technischen Mitarbeitern und den Mitarbeitern der Werkstätten. Insbesondere danke ich hier Johann Westhauser, Tanja Landmann und Renate Helfen. Alle anderen sollen sich nicht vergessen fühlen, aber die Liste wäre lang.

Mein ganz besonderer Dank gilt Joachim Fischer, Mona Jaggy und Robert Schittny, die es gewagt haben, das Korrekturlesen meiner Dissertation zu übernehmen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Wegener und dem Institut für Angewandte Physik für die großartige Zeit, die ich hier verbringen durfte. Neben der großen fachlichen Unterstützung die jeder hier jedem immer und bedingungslos zukommen lässt, macht es auch einfach Spaß mit Leuten wie euch zu arbeiten!

Literaturverzeichnis

Auch möchte ich der Arbeitsgruppe Bastmeyer mit all ihren Mitgliedern für die freundliche Aufnahme danken und dafür, dass sie mir oft ein Wegweiser in der fremden Welt des Zellbiologie-Labors waren.

Allen Mitgliedern der Physik-Biologie-Fraktion (Benjamin Richter, Thomas Striebel, Alexander Skiera und Sarah Keary) möchte ich für diese lebhafteste Gruppe danken, der anzugehören mir immer viel Freude bereitet hat.

Kurz vor Ende meiner Liste möchte ich denjenigen Menschen danken, die über viele Jahre Karlsruhe für mich ganz persönlich geprägt haben. Zum einen danke ich Steffen Rühl, der für mich immer ein Fels in der Brandung war. Magdalena Abele, die ich mittlerweile leider viel zu selten sehe, möchte ich für ihre Freundschaft danken. Als festem Bestandteil meines Lebens möchte ich dem Sinfonieorchester am KIT für die vielen unvergesslichen musikalischen Momente danken.

Der Ehrenplatz am Ende der Liste gehört meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund Joachim. Ich wäre ohne eure Liebe und Unterstützung nicht da, wo ich jetzt bin!