
Selektive Biofunktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen

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. Benjamin Richter
aus Mühlacker

Tag der mündlichen Prüfung:	7.11.2014
Referent:	Prof. Dr. Martin Wegener
Korreferent:	Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	vii
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Aufbau von tierischen Zellen	3
2.2 Zelladhäsion	4
2.2.1 Die extrazelluläre Matrix	4
2.2.2 Zell-Matrix-Kontakte	6
2.2.3 Aktomyosin Kontraktilität	8
2.2.4 Zell-Zell-Kontakte	8
2.3 Unterschiede in 2D- und 3D-Zellkultivierung	11
2.3.1 Zellkultivierung auf flachen Substraten	12
2.3.2 Zellkultivierung in 3D	16
3 Experimentelle Methoden	21
3.1 Direktes Laserschreiben	22
3.1.1 Nanoscribe Photonic Professional	25
3.1.2 Lithographie Aufbau mit durchstimmbarer Wellenlänge	26
3.2 Fotolacke und ihre Funktionsweise	29
3.2.1 Radikalische Polymerisation	29
3.2.2 Ormocomp	32
3.2.3 Pentaerythritoltriacrylat/-tetraacrylat (PETA/PETTA)	33
3.2.4 Polyethylenglykoldiacrylat (PEG-DA)	34
3.2.5 Thiol-En-Fotolack	38
3.3 Silanisierung	42
3.4 Klick-Funktionalisierung	44
3.4.1 Photoenol	44
3.4.2 Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus	47
3.4.3 SNAP-Tag Mechanismus	50
3.5 Charakterisierung der 3D Strukturen	52
3.6 Zellkultur	56

3.6.1	Zelltypen	56
3.6.2	Routine Zellkultur	57
3.6.3	Aufbringen der Zellen auf die Substrate	57
3.6.4	Immunhistochemie	57
3.7	Mikroskopie	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Radikalisch polymerisierte Fotolacke	60
4.1.1	PEG-DA als passivierender Fotolack	60
4.1.2	Ormocomp und PETA/PETTA als zellkompatible Fotolacke	62
4.1.3	Zweikomponentenstrukturen	64
4.1.4	Kraftmessungen in 3D	67
4.2	Thiol-En-Fotolack	73
4.2.1	Zellkompatibilität	73
4.2.2	3D Strukturen	75
4.3	Photoenol	77
4.3.1	Vorversuche	77
4.3.2	Zwei-Photonen-Anregung	78
4.3.3	Funktionalisierung von 3D Strukturen	80
4.3.4	Mehrfachfunktionalisierung von 3D Strukturen	84
4.3.5	Kontrollierte Zelladhäsion in 3D	87
5	Diskussion	95
5.1	Kraftmessungen	95
5.2	Thiol-En-Fotolack	97
5.3	Photoenol	98
6	Ausblick	101
	Literaturverzeichnis	105

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

- F. Klein, B. Richter, T. Striebel, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener und M. Bastmeyer, “Two-Component Polymer Scaffolds for Controlled Three-Dimensional Cell Culture,” *Advanced Materials* **23**, 1341–1345 (2011).
- A. M. Greiner, B. Richter und M. Bastmeyer, “Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell Culture Studies,” *Macromolecular Bioscience* **12**, 1301–1314 (2012).
- A. S. Quick, J. Fischer, B. Richter, T. Pauloehrl, V. Trouillet, M. Wegener und C. Barner-Kowollik, “Preparation of Reactive Three-Dimensional Microstructures via Direct Laser Writing and Thiol-ene Chemistry,” *Macromolecular Rapid Communications* **34**, 335–340 (2013).
- B. Richter, T. Pauloehrl, J. Kaschke, D. Fichtner, J. Fischer, A. M. Greiner, D. Wedlich, M. Wegener, G. Delaitre, C. Barner-Kowollik und M. Bastmeyer, “Three-Dimensional Microscaffolds Exhibiting Spatially Resolved Surface Chemistry,” *Advanced Materials* **25**, 6117–6122 (2013).

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

- B. Richter, F. Klein, T. Striebel, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener und M. Bastmeyer, “Two-Component Polymer Scaffolds for Controlled Three-Dimensional Cell Culture,” **Vortrag, DPG Frühjahrstagung 2011**, Dresden, Deutschland, März 2011.
- B. Richter, A. M. Greiner, C. M. Franz, M. Wegener und M. Bastmeyer, “Direct Laser Writing for Three-dimensional Biological Application,” **Vortrag, DPG Frühjahrstagung 2012**, Berlin, Deutschland, März 2012.
- B. Richter, A. M. Greiner, C. M. Franz, M. Wegener und M. Bastmeyer, “Selective Bio-Functionalization of Three-Dimensional Microstructures for Controlled Cell Culture using Direct Laser Writing,” **Poster, PhysCell 2012**, Hyères, Frankreich, September 2012.
- B. Richter, T. Pauloehrl, J. Kaschke, J. Fischer, A. M. Greiner, M. Wegener, G. Delaitre, C. Barner-Kowollik und M. Bastmeyer, “Three-Dimensional Cell Culture on Microscaffolds with Spatially Resolved Surface Chemistry,” **Vortrag, CLEO 2014**, San José, USA, Juni 2014.

Zusätzliche Arbeiten zu verwandten Themen, die in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden:

- J. Li, K. Worms, D. Hillerkuss, B. Richter, R. Maestle, W. Freude und J. Leuthold, “Tunable free space optical delay interferometer for demodulation of differential phase shift keying signals,” In Optical Fiber Communication Conference (p. JWA24). Optical Society of America (2010).
- A. 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, 447–448 (2013).
- U. Bog, T. Laue, T. Grossmann, T. Beck, T. Wienhold, B. Richter, M. Hirtz, H. Fuchs, H. Kalt und T. Mappes, “On-chip microlasers for biomolecular detection via highly localized deposition of a multifunctional phospholipid ink,” Lab on a Chip **13**, 2701–2707 (2013).
- A. S. Quick, H. Rothfuss, A. Welle, B. Richter, J. Fischer, M. Wegener und C. Barner-Kowollik, “Fabrication and Spatially Resolved Functionalization of 3D Microstructures via Multiphoton-Induced Diels-Alder Chemistry,” Advanced Functional Materials **24**, 3571–3580 (2014).

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCP	<i>Microcontact Printing</i>
1PA	Ein-Photonenabsorption
2D	zweidimensional
2PA	Zwei-Photonenabsorption
3D	dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)
AJ	<i>Adherens Junction</i>
AOM	akustooptischer Modulator
ATP	Adenosintriphosphat
BRL	Büffelrattenleberzellen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CS	<i>chicken serum</i> , Hühnerserum
cw	<i>continuous wave</i> , Dauerstrich
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DETC	7-Diethylamino-3-thenoylcoumarin
DIC	<i>differential interference contrast</i> , Differentialinterferenzkontrast
DLS	Direktes Laserschreiben
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DMF	Dimethylformamid
EC Domäne	extrazelluläre Cadherindomäne
EOM	elektrooptischer Modulator
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FN	Fibronectin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , standardisierte, gepufferte Salzlösung
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> , humane Vorhautzellen
LED	licht-emittierende Diode
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop (auch Laserrastermikroskop)
NA	numerische Apertur
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

PCF	<i>primary chicken fibroblasts</i> , primäre Hühnerfibroblasten
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEG-DA	Polyethylenglycoldiacrylat
PETA	Pentaerythritoltriacrylat
PETTA	Pentaerythritoltetraacrylat
pFAK	phosphorilierte <i>focal adhesion kinase</i>
REF	<i>rat embryonic fibroblasts</i> , embryonale Fibroblasten aus der Ratte
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure
SAM	<i>self-assembled monolayer</i> , selbstorganisierende Monoschicht
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i> , Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie
UV	ultraviolett
Voxel	Volumenelement

Zusammenfassung

Zellen werden in ihrer natürlichen Umgebung von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen sowohl physikalische Eigenschaften, wie z. B. die Steifigkeit der extrazellulären Matrix, als auch biochemische Einflüsse wie die Proteinzusammensetzung der Umgebung. In den meisten Experimenten werden die verschiedenen Faktoren separat und auf zweidimensionalen (2D) Substraten untersucht. Dabei wird außer Acht gelassen, dass Zellen *in vivo* von einer dreidimensionalen (3D) Matrix umgeben sind. Für zukünftige Zellexperimente wäre es optimal alle Faktoren (Geometrie, Nanotopographie, Steifigkeit, räumliche und quantitative Ligandenverteilung) kontrollieren zu können um Aufschluss über eine optimale Wachstumsumgebung für Zellen zu erhalten. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit die selektive Biofunktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen.

Hierfür hat sich das Direkte Laserschreiben (DLS) etabliert. Beim DLS handelt es sich um eine 3D Lithographiemethode um Polymerstrukturen im Submikrometerbereich mit unterschiedlichsten Eigenschaften herzustellen. Dabei wird ein Laserstrahl in einen Fotolack fokussiert, wodurch eine Zwei-Photonenabsorption (2PA) induzierte Polymerisation in diesem Bereich stattfindet. Die in dieser Arbeit verwendeten Fotolacke werden radikalisch polymerisiert. Das bedeutet, dass die Fotoinitiatormoleküle im Lack in Radikale aufgespalten werden und sich im Laserfokus quervernetzte Polymere aus dem jeweiligen Monomer bilden. Durch Variation des Monomers lassen sich hydrophile oder hydrophobe Polymere herstellen.

Im ersten Teil der Arbeit werden Zweikomponentenstrukturen und deren Anwendung für Zellversuche vorgestellt. Dabei handelt es sich um eine Kombination eines hydrophilen, protein- und zellabweisenden Fotolacks (BR12) mit einem zellkompatiblen, kommerziell erhältlichen Fotolack (Ormocomp). Das zellabweisende Grundgerüst besteht aus Säulen mit einem Durchmesser von 6 μm und einer Höhe von 20 μm im Abstand von ca. 15 μm . Zwischen den Säulen befinden sich Seile mit einem Durchmesser von 1 μm in einer Höhe von 20 μm . In der Mitte der Seile wurden Ormocomp-Punkte polymerisiert. Aufgrund der hohen Flexibilität des BR12-Lacks, sind Zellen, die an den Ormocomp-Punkten haften, in der Lage die Seile zu verbiegen. Daraus lassen sich die Kontraktionskräfte der Zellen in einer 3D Matrix bestimmen. Im zweiten Teil der Arbeit wird ein Lack, dessen Polymerisation auf eine Thiol-En-Reaktion beruht, positiv auf Zellkompatibilität getestet. Der Vorteil des Thiol-En-Lacks ist, dass sich an der Oberfläche des Polymers reaktive Thiol-Gruppen befinden. Es wurde gezeigt, dass Zellen schneller adhären, wenn vor der Kultivierung Biomoleküle (Maleimid-terminiertes zyklisches Peptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure) kovalent an die Oberfläche gebunden wurden. Es wurden auch 3D Zweikomponentenstrukturen aus BR12- und Thiol-En-Lack hergestellt. So war eine selektive Funktionalisierung der 3D Struktur mit einem Farbstoff möglich.

Letztendlich wird die selektive Oberflächenfunktionalisierung mittels Photoenol-Chemie

gezeigt. Photoenole sind Moleküle, die durch Lichtanregung ihre Molekülstruktur zu einem Dien ändern. In Anwesenheit eines Dienophils (z. B. Maleimid) kommt es während der Anregung mit Licht zu einer Diels-Alder-Cycloaddition. Durch die Terminierung einer Silan-Gruppe mit der Photoenol-Gruppe können Silizium-, Glas- und Polymeroberflächen mit dem Photoenol beschichtet werden. Es wurde auf einer Glasoberfläche evaluiert, dass das Photoenol durch 2PA anregbar ist. Dies konnte auch an 3D Mikrostrukturen bewiesen werden und es wurde zudem gezeigt, dass 3D Mikrostrukturen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen mittels orthogonaler Bindungssysteme funktionalisiert werden können. Nach der Implementierung einer geeigneten Passivierungsmethode konnte dieser Mechanismus auch verwendet werden um Proteine selektiv an die Oberfläche zu binden um somit die Zelladhäsion in 3D zu kontrollieren.

Kapitel 1

Einleitung

Die dreidimensionale Zellkultivierung spielt eine wichtige Rolle für das Verständnis einzelner Prozesse im Inneren der Zelle. Bereits im Jahr 1914 kultivierte Harrison [1] embryonale Zellen auf Spinnennetzen und untersuchte die zelluläre Antwort. Das war der erste Versuch Zellen auf einer Art künstlichen, dreidimensionalen extrazellulären Matrix (EZM) zu kultivieren.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Verfahren entwickelt um dreidimensionale Kultivierungsumgebungen für Zellen herzustellen. Dazu zählen z.B. Abformungsmethoden, 3D Druckverfahren, Düsen-basierte-Methoden, sintern von verschiedenen Werkstoffen und Laser basierte Verfahren [2]. Oft wurden auch Hydrogele oder Tiergewebe verwendet um die natürliche Umgebung von Zellen zu imitieren [3]. Die meisten dieser Verfahren ermöglichen es jedoch nicht alle gewünschten Formen herzustellen. Es gibt gewisse Nachteile die nicht überwunden werden können. So lassen sich mittels Abformung nur 2,5D Strukturen herstellen. Die 3D Druckverfahren erzielen in der Regel nicht die gewünschte Auflösung und sind in der Materialwahl sehr eingeschränkt. Das gleiche gilt auch für die Düsen-basierten-Methoden und das Sintern. Das Direkte Laserschreiben (DLS, siehe Kapitel 3.1) hat sich als ideale Methode herauskristallisiert um dreidimensionale Mikrostrukturen für Zellwachstumsstudien herzustellen. Zusätzlich steht eine Vielzahl von Fotolacken mit unterschiedlichsten Eigenschaften zur Verfügung. Es gibt Fotolacke mit einem höheren Vernetzungsgrad, wodurch die gewünschte Struktur eine höhere Steifigkeit besitzt. Ebenfalls gibt es Fotolacke mit protein- und zellabweisenden Eigenschaften. Wiederum andere Fotolacke erlauben es bestimmte Moleküle kovalent an ihre Oberfläche zu binden (siehe auch Kapitel 3.2).

Eines haben jedoch alle Methoden gemeinsam: Um Zellen die Adhäsion an oder in diesen Strukturen zu erleichtern müssen diese mit einem Protein beschichtet werden. Dabei handelt es sich in der Regel um homogen beschichtete Strukturen [4, 5, 6]. Diese Situation spiegelt allerdings nur bedingt die realen, physiologischen Bedingungen wieder. *In vivo* sind die EZM-Proteine strukturiert in der Matrix verteilt, wodurch den Zellen nur eine selektive Adhäsion in der EZM ermöglicht wird. Schon seit längerem werden mittels *Microcontact Printing* strukturierte zweidimensionale Substrate hergestellt um das Zellverhalten (wie z.B. Motilität und Migration) unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen [7, 8, 9, 10]. Bisher war es noch nicht möglich selektiv funktionalisierte 3D Mikrostrukturen herzustellen. Es gab Ansätze von 2,5D Strukturen [11] und auch selektiv funktionalisierte 3D Hydrogele [12]. Jedoch lieferten beide Methoden nicht die Auflösung um die Form einer Zelle in 3D zu steuern indem man ihr nur einzelne Adhäsionspunkte in der Matrix zur Verfügung stellt. Sie sind

deshalb für Einzelzelleexperimente ungeeignet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es verschiedene Methoden zur selektiven Biofunktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen zu eruieren, diese auf ihre Biokompatibilität zu testen und klar definierte Zelleexperimente damit durchzuführen. Die Methoden und ihre Anwendungen sind die Folgenden:

1. Die Kombination von zwei radikalisch polymerisierten Fotolacken mit unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf die Proteinabsorption und Zelladhäsion (Kapitel 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.4). Mit dieser Methode lassen sich Protein- und Zellabweisende Grundgerüste herstellen die sich nachträglich mit Adhäsionspunkten eines zellkompatiblen Lackes funktionalisiert werden können. Nach einer mechanischen Charakterisierung mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM, *atomic force microscope*) wurden die Kontraktionskräfte von Zellen in einer dreidimensionalen Matrix gemessen. (Kapitel 4.1)
2. Strukturen die aus dem Thiol-En-Fotolack (Kapitel 3.2.5) hergestellt wurden besitzen an ihrer Oberfläche eine reaktive Thiolgruppe, die verwendet wurden um spezielle Biomoleküle kovalent an die Strukturen zu binden. Dies ermöglicht Zellen schneller an die Lackoberfläche zu adhären (Kapitel 4.2).
3. Die erfolgversprechendste und eleganteste Methode wird in Kapitel 4.3 beschrieben. Hier wird der Photoenol-Mechanismus an Oberflächen verwendet. Photoenole bilden bei Lichtabsorption reaktive Intermediate, welche sehr effiziente Diene für Diels-Alder Reaktionen darstellen. Als Reaktionspartner dienen Dienophile (wie z. B. Maleimide), die mit speziellen funktionellen Gruppen versehen sind. So lassen sich eine Vielzahl von Peptiden und Proteinen orts aufgelöst an die Oberfläche funktionalisieren.

Kapitel 2

Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden zunächst einige Grundbegriffe für das weitere Verständnis erklärt und der momentane Forschungsstand geschildert.

2.1 Aufbau von tierischen Zellen

Zellen sind die Grundeinheiten von Organismen. Jeder Organismus ist aus unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut. Sie variieren nicht nur in ihrer Morphologie, sondern jeder Zelltyp hat auch eine spezielle Aufgabe [13]. Im Allgemeinen wird zwischen Pflanzenzellen und tierischen Zellen unterschieden. Beide Zellarten sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben – der Plasmamembran. Sie grenzt die Zelle nach außen ab, hat jedoch keine stabilisierende, strukturgebende Funktion¹. Die Hauptaufgabe der Plasmamembran ist die Aufrechterhaltung des Membranpotentials, der Schutz der DNA, die Kontrolle welche Proteine und Botenstoffe passieren dürfen und der Schutz vor äußeren Einflüssen wie z.B. pH-Schwankungen. Intrazellulär schließt sich der Plasmamembran der Aktinkortex an, eine relativ dünne Schicht quervernetzter Aktinfilamente. Er dient zur Stabilisierung der Zelle und ist für das Elastizitätsmodul der Zelle verantwortlich. Die Plasmamembran und der Aktinkortex sind über eine Vielzahl von Proteinen miteinander verknüpft. Das Innere der Zelle² wird als Zytoplasma bezeichnet. Es enthält wichtige Organellen, Endomembransysteme (z. B. Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat) und Polymernetzwerke. Die drei wichtigsten Polymerfilamente bestehen aus: Aktinnetzwerk, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Sie werden auch als Zytoskelett bezeichnet (siehe Abbildung 2.1 a)) [13].

Jede Zelle baut um sich herum ein Netzwerk aus strukturgebenden Proteinen auf. Sie sind also von anderen Zellen und der Extrazellulären Matrix (EZM) umgeben. In der Entwicklung von Lebewesen spielt diese äußere Umgebung eine wichtige Rolle für die Zelle. So wird beispielsweise die Differenzierung von Stammzellen speziell in der Embryonalentwicklung von physikalischen und chemischen Signalen im Umfeld der Zelle beeinflusst [14, 15]. Unter physikalischen Einflüssen versteht man zum Beispiel mechanische Eigenschaften wie Steifigkeit, Topographie oder Form und Größe einzelner Matrix-Bestandteile. Zu den chemischen Bestandteilen der EZM zählen vor allem Wachstumsfaktoren

¹Pflanzenzellen besitzen zusätzlich zur Plasmamembran noch eine strukturgebende Zellwand.

²Ausgenommen hiervon ist der Zellkern (Nukleus), der das Erbgut der Zelle enthält.

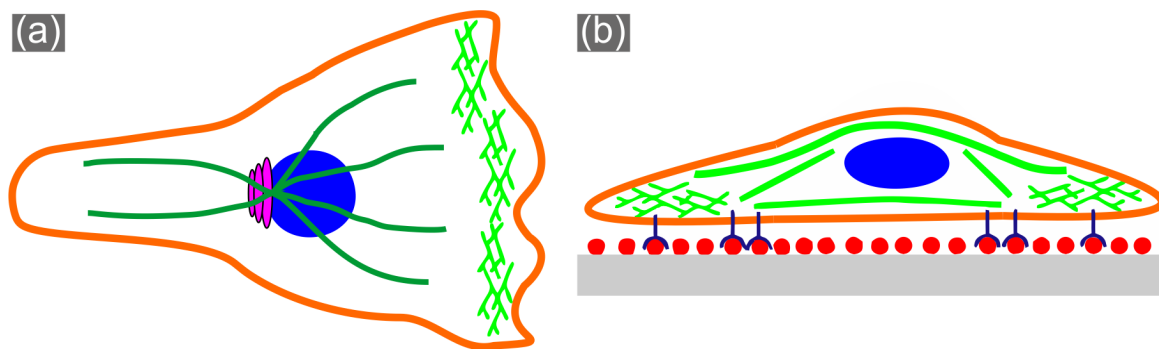


Abbildung 2.1: a) Schematische Darstellung einer tierischen Zelle. Die Zelle ist von einer Lipiddoppelschicht, der Plasmamembran umschlossen. Auf der Plasmamembran befinden sich Proteine, die mit der EZM interagieren. Im Zytoplasma befinden sich der Nukleus und Organellen, wie z. B. Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Stabilisiert wird die Zelle durch die Mikrotubuli und das Aktinzytoskelett. b) Schematische Darstellung einer adhärenz Zelle. Die Zelle ist durch transmembrane Adhäsionsproteine (Integrin) mit EZM-Proteinen verbunden. An den Zell-Matrix-Verbindungen kommt es zur Bündelung der Aktinfilamente. Das verzweigte Aktinnetzwerk im Lamellipodium der Zelle drückt die Plasmamembran nach außen. Abbildung nach [18].

und Multiadhäsionsmatrixproteine wie zum Beispiel Fibronectin (FN). Die Proteine und Wachstumsfaktoren können sowohl in gelöster als auch in strukturgebundener Form vorliegen. Wobei die Anordnung dieser Moleküle meist gerichtet ist (graduelle Verteilung) um eine Polarisierung und Migration der Zelle zu erreichen. Die Zellmigration ist ein wichtiger Prozess in Entwicklungsverläufen und im Wundheilungsprozess. Mit Hilfe von membrangebundenen Rezeptoren ist die Zelle in der Lage die Signale der extrazellulären Matrix auszulesen, wodurch Signaltransduktionswege im Inneren der Zelle aktiviert werden. Als Folge einer solchen Signaltransduktion kommt es zu einer biologische Antwort der Zelle auf ihre Umgebung [16, 17]. Dies kann sich beispielsweise durch die Vergrößerung von Fokalkontakten an bestimmten Stellen der EZM bemerkbar machen was zu einer besseren Adhäsion führt wodurch die Zelle dort größere Kräfte ausübt [18].

2.2 Zelladhäsion

Zellen können sowohl mit ihrer Umgebung als auch mit anderen Zellen interagieren. Gehen Zellen eine Verbindung mit ihrer Umgebung ein, spricht man von Zell-Matrix-Adhäsion. Verbindungen von Zellen untereinander werden als Zell-Zell-Adhäsionen bezeichnet. In den frühen Stadien der Zelladhäsion und -ausbreitung spielen viskoelastische Prozesse eine wichtige Rolle [19]. Die Zelladhäsion spielt eine wichtige Rolle für das Überleben und die Proliferation der Zelle. Haben Zellen nicht die Möglichkeit an Oberflächen, in Geweben oder mit anderen Zellen Bindungen einzugehen so kommt es oft zum programmierten Zelltod (Apoptose) [20].

Die verschiedenen Mechanismen der Zelladhäsion werden im Folgenden im Detail erklärt.

2.2.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexes, dreidimensionales (3D) Netzwerk, welches vor allem zur Stabilisierung und Formgebung des Gewebes beiträgt. Zellen sind in der Lage

die Komposition der EZM auszulesen und können sich somit im Gewebe orientieren und ausrichten. Je nach Gewebetyp ist die Zusammensetzung der EZM unterschiedlich. Die Hauptbestandteile sind jedoch immer Kollagenfasern, Proteoglykane und Multiadhäsionsmoleküle (z. B. Fibronectin). Des Weiteren befinden sich noch Hormone und Wachstumsfaktoren in der Matrix. Kollagene sind die wichtigsten Strukturelemente aller Bindegewebe und werden hauptsächlich von Fibroblasten gebildet. Hauptbestandteil der EZM sind die faserartigen Kollagene. Sie verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit. Proteoglykane bilden das Füllmaterial der EZM und dienen dazu Druckkräfte auf das Gewebe auszugleichen. Ein Mitglied der Proteoglykane, das Syndekan, befindet sich auf der Zellmembran von Fibroblasten. Es dient als Korezeptor für Fokalkontakte und ermöglicht es der Zelle an das Fibronectin in der EZM zu binden. Die Multiadhäsionsmoleküle (Fibronectin, Laminin, Vitronectin) wechselwirken mit vielen anderen EZM- und Adhäsionsmolekülen. So bilden z. B. Laminin und Kollagen IV den Hauptbestandteil der Basallamina, die Adhäsionsmatrix für Epithelzellen. Sie wird hauptsächlich von diesem Zelltyp synthetisiert. Die Adhäsionsmoleküle werden von Zellen durch transmembrane Oberflächenrezeptoren erkannt und sorgen somit für die Zelladhäsion an bestimmten Stellen in der EZM. Dies hat wiederum eine Signaltransduktionskaskade im Inneren der Zelle zur Folge [13]. Da bei den späteren Versuchen hauptsächlich Fibronectin verwendet wird, welches die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten ermöglicht, wird dieses Multiadhäsionsprotein genauer betrachtet.

Fibronectin

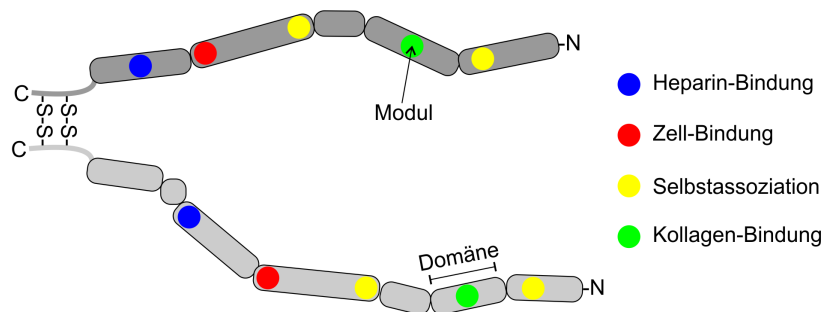


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Glykoproteins Fibronectin mit seinen unterschiedlichen Bindungsstellen. Abbildung nach [13].

Das heterodimere Glykoprotein Fibronectin (siehe Abbildung 2.2) ist ein Multiadhäsionsmolekül der extrazellulären Matrix und ist an vielen physiologischen Abläufen beteiligt. Nach Synthese in der Leber liegt es in gelöster Form im Blutplasma vor. Von dort kann es ins Gewebe diffundieren und in die EZM eingebaut werden [21]. Es kann jedoch auch direkt von Zellen in fibrillärer Form sekretiert und in die EZM eingebaut werden oder sich an der Oberfläche von Zellen befinden. Das ungelöste Fibronectin wird größtenteils von Fibroblasten, Chondrozyten und Epithelzellen gebildet. Es besteht aus zwei stabförmigen Polypeptidketten, die am C-terminalen Ende mit zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Mit einer Länge von 130 nm, einer Breite von 2-3 nm und einer Masse von 420 kDa gehört FN zu den großen Proteinen [22]. Es besitzt eine Vielzahl von Bindungsstellen und eine Zellbindungsregion, was eine Interaktion von Zellen mit Kollagen, Fibrin und Heparin ermöglicht [23]. An der Zelloberfläche befinden sich transmembrane Bindungsproteine (Integrine), die mit den Bindungsstellen des Fibronectins

interagieren können. Die Aminosäuresequenz RGD in der zehnten FN-Domäne vom Typ III ist die kürzeste und wichtigste Erkennungssequenz für den FN-Rezeptor Integrin $\alpha_5\beta_1$ [24]. Die Bindung zwischen Zelle und Fibronectin wird durch weitere Aminosäuresequenzen wie z. B. PHSRN verstärkt [25]. Diese Verbindungen sind wichtig für die Signalübertragung zwischen der Zelle und ihrer Umgebung [26] und werden als Zell-Matrix-Kontakte bezeichnet.

2.2.2 Zell-Matrix-Kontakte

Zell-Matrix-Kontakte sind die Verbindung der Zelle mit der extrazellulären Matrix. Bei der Ausbreitung der Zelle werden ständig neue Zell-Matrix-Kontakte gebildet und alte Kontakte abgebaut. Oberflächenrezeptoren (Integrine) dienen hierbei als Mediatoren und verbinden das Zytoskelett durch die Plasmamembran mit den Proteinen der EZM. Das transmembrane Glykoprotein Integrin ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Es gibt 24 verschiedene Integrine die sich aus 18 unterschiedlichen α - und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen [27]. Die verschiedenen Untereinheiten zeigen eine spezielle Bindungsaffinität für bestimmte Proteine der EZM. So vermitteln Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Integrin $\alpha_v\beta_3$ beispielsweise Bindung an Fibronectin [28]. Integrine ändern ihre Konformation von einer gefalteten, inaktiven Form in eine gestreckten, aktivierte Form als Reaktion auf Stimulation. Dies kann sowohl durch die Bindung der extrazellulären Domäne an ein EZM-Protein als auch durch eine intrazelluläre Bindung an das Zytoskelett hervorgerufen werden. Diese Aktivierung verursacht eine weitere Bindung des noch freien Endes [29]. Dies hat eine Anhäufung von weiteren Integrinen zur Folge (*clustering*) wodurch noch mehr Zell-Matrix-Kontaktproteine rekrutiert werden. So wird eine mechanische Verbindung durch die Zellmembran hindurch hergestellt. An diesem Prozess sind über 160 Proteine beteiligt [28, 30]. Beim Verfestigen der Zell-Matrix-Kontakte sind nicht nur Adhäsionsproteine beteiligt, es kommt auch zu einer Remodellierung des Zytoskeletts. Hierfür werden neue Aktinfilamente gebildet und quervernetzt oder gebündelt (siehe Abbildung 2.1 b). So wird der Fokalkontakt weiter gefestigt und die Zelle ist unempfindlicher gegen Scherkräfte. Zudem wird so die Form und Stabilität der Zelle festgelegt. Da sich das Volumen einer Zelle während der Adhäsion und Ausbreitung nicht ändert, kann sich die Oberfläche beim Abflachen der Zelle auf einem Substrat um bis zu 50% erhöhen [31]. Bei der Ausbreitung der Zelle spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Zum einen kommt es zu einer schnellen Polymerisation des Aktinnetzwerks in der Zellperipherie (Lamellipodium), wodurch die Plasmamembran nach außen gedrückt wird. Das Lamellipodium wächst durch Polymerisation, Verzweigung und Vernetzung der Aktinfilamente [32, 33, 34]. Die einzelnen Aktinfilamente im verästelten Aktinnetzwerk im Lamellipodium bilden einen 70° Winkel zueinander, was vom Arp2/3 Proteinkomplex herrührt. Er verbindet die einzelnen Aktinfilamente untereinander [35]. Eine weitere Möglichkeit der Ausbreitung ist das Verschieben von Aktinfilamenten oder Aktinbündeln zueinander. Sind Aktinfilamente bereits mit ihrer Umgebung verbunden können diese nicht mehr bewegt werden. Hierfür werden andere Filamente relativ zu den verankerten Filamenten verschoben. Dies geschieht durch Myosin II, ein Protein das speziell in Muskelzellen angereichert ist, um die Kontraktion der Muskeln zu ermöglichen [36]. Werden mehrere Aktinfilamente mit Hilfe der Myosine gebündelt, so bilden sie eine bewegliche (kontraktil) Struktur; die (Aktin-)Stressfasern [37, 38].

Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Zell-Matrix-Kontakten: Fokalkomplex, Fokalkontakt und fibrilläre Adhäsion (Tabelle 2.1). Die meisten Kontakte befinden sich in

	Fokalkomplex	Fokalkontakt	fibrilläre Adhäsion	3D-Adhäsion
Protein	Paxillin	Paxillin	-	Paxillin
	Vinculin	Vinculin	-	Vinculin
	Phospho-Tyr	Phospho-Tyr	-	Phospho-Tyr
	FAK	FAK	-	FAK
		FAK-pY ³⁹⁷	-	
	$\alpha_V\beta_3$ Integrin	$\alpha_5\beta_1$ Integrin	$\alpha_5\beta_1$ Integrin	
		Tensin	Tensin	Tensin
Substrat	mind. ein EZM Protein	mind. ein EZM Protein	Fibronectin und ein weiteres EZM Protein	Fibronectin und ein weiteres EZM Protein
Andere Faktoren	Rac	Rac Zellkontraktilität	Zellkontraktilität	Dreidimensionalität

Tabelle 2.1: Übersicht der verschiedenen Zell-Matrix-Kontakte und der daran beteiligten Proteine [60].

der Zellperipherie, was an der großen Dynamik bei der Zellausbreitung im Lamellipodium liegt. Fokalkomplexe werden im Lamellipodium gebildet und bewegen sich in Richtung Zellmitte. Hierfür ist der retrograde Fluss, die Polymerisation des Aktins in Richtung Zellmitte, verantwortlich. Sie haben eine punktförmige Morphologie und sind die kleinste Art von Kontakten mit der kürzesten Lebensdauer. Die Rho GTPase Rac steuert die Bildung solcher Kontakte. Auf dem Weg zur Zellmitte können diese Fokalkomplexe entweder durch Aktivierung der Rho GTPase RhoA (z. B. durch Krafteinwirkung) zu Fokalkontakten reifen oder abgebaut werden. Die Mikrometer großen Fokalkontakte sind meistens oval und größer als Fokalkomplexe. Die Reifung von Fokalkomplexen zu Fokalkontakten geschieht im Übergangsbereich vom verästelten Lamellipodium zur Lamella. Die Lamella besteht hauptsächlich aus Myosin II reichen Aktinbündeln [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. Desweiteren sind die zytoskelettassoziierten Proteine Paxillin und Vinculin, als auch Signaltransduktionsmarker wie Phosphotyrosin (Phospho-Tyr) und das Zink bindende Phosphoprotein Zyxin an der Bildung von Fokalkontakten beteiligt [47, 44]. Kräfte die Zellen über Fokalkontakte oder Fokalkomplexe auf das Substrat ausüben sind nahezu identisch [48]. Hierfür muss die Umgebung jedoch eine gewisse Steifigkeit aufweisen. Ist diese zu weich, kann auch kein Fokalkontakt ausgebildet werden [49]. Die Kraftausübung der Zelle auf die Umgebung über die Fokalkontakte geschieht mit Hilfe von kontraktilen Stressfasern. Da die Zelle mit der extrazellulären Matrix verbunden ist, kann man die Kontraktionskraft der Zelle durch *traction force* Mikroskopie auf elastischen Substraten messen [50, 51, 52, 53, 54, 55]. Die Kraft die Zellen pro Adhäsionsfläche ausüben ist, je nach Zelltyp, konstant ($\sim 5 \text{ nN } \mu\text{m}^{-2}$) und korreliert mit der Quantität der beteiligten Proteine [56, 57]. Die fibrilläre Adhäsion findet vermehrt im Zellzentrum an FN-Fibrillen statt [58, 41]. Dort hat die Zelle zuvor die Proteine der EZM mittels der Fibrillogenese umgewandelt [59, 44]. Im Gegensatz zu Fokalkomplexen und Fokalkontakten sind an diesem Adhäsionstyp die Proteine Integrin $\alpha_V\beta_3$, Paxillin, Vinculin und pFAK nicht beteiligt dafür jedoch das Integrin $\alpha_5\beta_1$ [60].

2.2.3 Aktomyosin Kontraktilität

Myosine sind in der Zelle für die Kontraktilität des Aktinnetzwerks und der Aktinbündel verantwortlich und bewirken dass diese Geflechte unter Spannung stehen [61]. Man teilt die kontraktilen Stressfasern in unterschiedliche Klassen ein:

Es gibt die ventralen Stressfasern, die parallel zur Bewegungsrichtung der Zelle verlaufen und mit Fokalkontakten verbunden sind. Des Weiteren gibt es *transverse arcs* (diagonale Bögen), welche parallel zum *leading edge* (Vorderkante) verlaufen. Sie verlaufen direkt hinter dem Lamellipodium und sind nicht mit Fokalkontakten verbunden. Zu den nicht kontraktilen Stressfasern zählen die dorsalen Stressfasern, das Lamellipodia und die Filopodien [62].

Bisher gibt es 24 bekannte Myosin Klassen [63]. Diese Motorproteine bewegen sich entlang von Aktinfilamenten und sind neben der Kontraktilität und Migration von Zellen auch verantwortlich für Proteintransport, Exozytose und Mitose [64, 65, 66]. Im Zellinneren generieren die Myosine Kräfte die über Fokalkontakte an die Umgebung übertragen werden [28]. Diese Eigenschaft spielt neben der Aktinpolymerisation eine wichtige Rolle in der Zellbeweglichkeit [61]. Die Kraftausübung auf ihre Umgebung ist bedeutend für die Mechanotransduktion [67]. Myosine beeinflussen zudem die Konformation des Aktins im Inneren der Zelle, was auch oft eine Neuorientierung des Zellkerns mit sich bringt [61, 68]. Bei der Zellteilung wird ein Aktomyosinring gebildet dessen Kontraktilität zur Zytokinese führt [69]. Um die internen Kräfte im Gleichgewicht zu halten, dient das Mikrotubuli-Netzwerk als Antagonist zu den kontraktilen Aktinstressfasern [70]. Durch eine gezielte Depolymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol kann man mit Hilfe von *traction force* Mikroskopie eine erhöhte Kontraktilität der Zellen messen [71].

Da die Aktomyosin Kontraktilität eine wichtige Rolle bei der Krafterzeugung spielt, gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Modellen mit denen man versucht die physikalischen Eigenschaften der Stressfasern zu simulieren [72, 73, 74, 75]. Dabei können Stressfasern als Kraft-Dipole betrachtet werden [18]. Grundlegend für diese Modelle ist, dass ein Kräftegleichgewicht zwischen Zelle und Substrat herrscht. So kann man die Antwort der Zelle auf die Substratsteifigkeit prognostizieren [76, 77, 78]. Oft betrachtet und modelliert man Sarkomere, die nur aus Aktinfilamenten, Myosin II und Connectin bestehen und einen sehr regelmäßigen Aufbau haben [79]. Obwohl auf diesem Gebiet schon viel erforscht wurde und sich Stressfasern, kontraktile Aktinringe und Sarkomere sehr ähnlich sind, sollte man diese Komplexe zukünftig weiter untersuchen.

2.2.4 Zell-Zell-Kontakte

Bei der Zell-Zell-Adhäsion spielt das calciumabhängige Transmembranprotein Cadherin eine wichtige Rolle. Cadherine gehören zur Familie der Zell-Adhäsions-Moleküle (*cell adhesion molecule*, CAM). Man unterscheidet zwischen klassischen, desmosalen, Procadherinen und Cadherin-verwandten Signalproteinen. Klassische Cadherine sind am besten erforscht, da sie auf viele unterschiedliche Vorgänge im Organismus Einfluss nehmen. Zu ihnen zählen zum Beispiel E- und N-Cadherin [80]. Die Namensgebung für die klassischen Cadherine leitet sich von der Art der Gewebe ab, in denen sie exprimiert werden. N-Cadherin (neuronales Cadherin) spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und der Embryogenese. Im frühen Entwicklungsstadium reguliert es vor allem die Gastrulation und die Bildung der Neuralleiste. In Tumoren steuern Cadherine die Balance zwischen Unterdrückung und

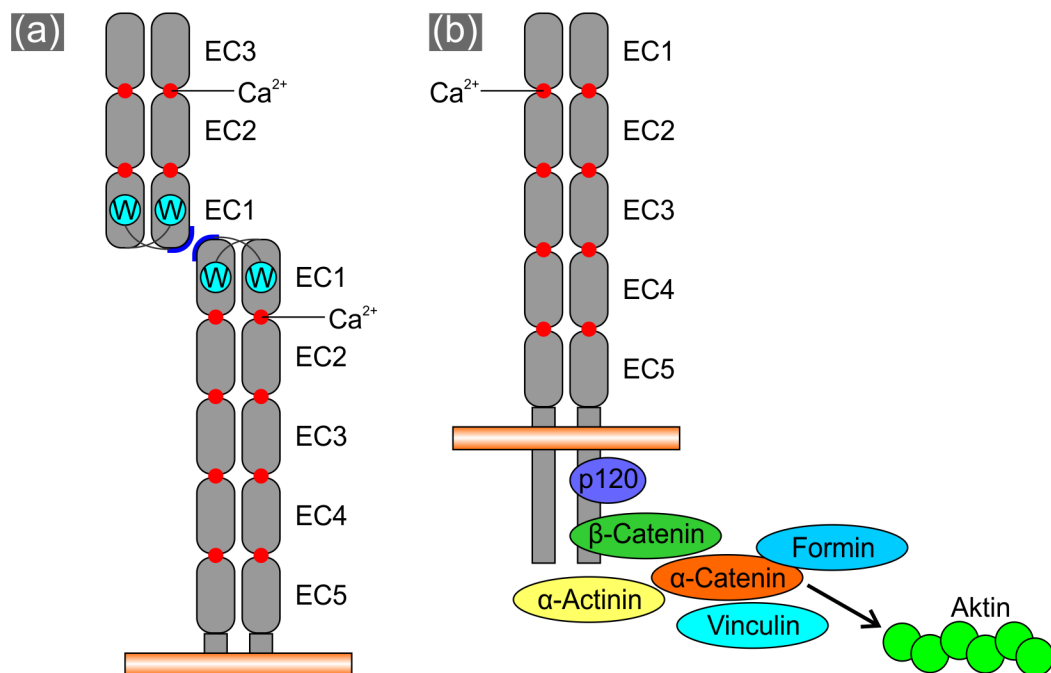


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der *Adherens Junctions*. (a): Klassische Cadherine bestehen aus fünf extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytosolischen Domäne. Tryptophan 2 (W2) aus der ersten EC Domäne bindet an die hydrophobe Seitentasche des gegenüberliegenden Cadherins. (b): Die zytosolische Domäne bindet über p120, β -Catenin und α -Catenin an das Aktinzytoskelett. Abbildung nach [80].

Förderung der Invasion. Dabei dient E-Cadherin als Invasions-Unterdrücker und N-Cadherin als Invasions-Förderer in malignen Tumoren (Karzinomen). Zudem kann die Expression von N-Cadherin in Epithelzellen zu einer Änderung der Zellmorphologie z. B. bei Tumoren führen [81]. E-Cadherine kommen vor allem in Epithelzellen vor, sind für den Zusammenhalt des kortikalen Aktinzytoskeletts verantwortlich und sind in *Adherens Junctions* (AJ) zu finden. AJ sind Adhäsionsverbindungen zwischen zwei Zellen. Sie bestehen aus mehreren, miteinander verbundenen Cadherinen beider Zellen (*trans*-Interaktion). In einem AJ-Komplex kommt es noch zu Zell-Zell-Verbindungen durch das Transmembranprotein Nectin, welches wiederum über Afadin an Aktin bindet [82, 83]. So entsteht eine Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett der einen Zelle mit dem der anderen. Diese Verbindung ist sehr dynamisch, was einen ständigen Einbau, Umbau und Abbau von Cadherinen in den AJ zur Folge hat [84]. Die Länge dieser AJ beträgt 200-500 nm [85].

Klassischen Cadherine weisen immer die selbe Anordnung der Strukturdomänen auf. Sie bestehen aus fünf extrazellulären Cadherindomänen (EC Domänen), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. Zwischen den EC Domänen liegen die Bindungsstellen für Calciumionen. Um eine *trans*-Interaktion zu lösen, muss nur das Calcium entzogen werden, wodurch das Cadherin destabilisiert wird [80, 86, 87]. Damit die EC Domäne in ihrer geraden Form vorliegt und eine Bindung eingehen kann, benötigt man eine 0,5-1 mM Calciumkonzentration [88, 86]. Cadherine vermitteln eine homophile Bindung. Vermischt man Zellen, die hauptsächlich E-Cadherin exprimieren, mit Zellen, die hauptsächlich N-Cadherin exprimieren, so sortieren sie sich und bilden getrennte Zellagglomerationen. Den gleichen Vorgang kann man beobachten, wenn Zellen, die viel oder wenig Cadherin exprimieren,

vermischt werden. Es handelt sich somit um eine qualitative und quantitative Differenzierung. Man unterscheidet zudem zwischen einer *cis*- und *trans*-Interaktion der Cadherine. Von einer *cis*-Interaktion spricht man, wenn die Cadherine derselben Zellen Dimere bilden. Bei der *trans*-Interaktion wechselwirken die Cadherine von gegenüberliegenden Zellen miteinander. In Kristallstrukturen kann es sowohl zu *cis*- als auch zu *trans*-Interaktionen der Cadherine kommen [89]. Bei einer *trans*-Interaktion bindet Tryptophan 2 (W2) aus der ersten EC Domäne an die hydrophobe Seitentasche seines Gegenübers und umgekehrt (Abbildung 2.3 (a)) [86, 80].

Die zytoplasmatische Domäne sorgt dafür, dass das nach außen gerichtete Cadherin mit dem Aktinzytoskelett verbunden wird (Abbildung 2.3 (b)) [90]. Hierfür bindet das Protein p120 an die membrannahe Region der zytoplasmatischen Domäne und stabilisiert das Cadherin [91, 92]. Bereits im endoplasmatischen Retikulum bindet β -Catenin an das Cadherin. Beide Proteine werden somit zusammen an die Membran transportiert [93]. α -Catenin verbindet das β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett. Hierbei kann es sich nicht um eine direkte Verbindung handeln. α -Catenin interagiert mit Aktin als Homodimer und kann deshalb nicht gleichzeitig als Heterodimer an β -Catenin binden [94]. Der genaue Mechanismus, wie das Aktinzytoskelett an das Cadherin über α -Catenin bindet, ist noch weitgehend unbekannt.

Aufgrund des speziellen Bindungsmechanismus der Cadherine ist deren Verwendung für *in vitro* Experimente komplizierter als die Verwendung von EZM Proteinen. Um Zellen eine Zell-Matrix-Adhäsion zu ermöglichen genügt es das entsprechende Substrat³ mit einem EZM Protein zu beschichten. Dieses adhärirt an der Oberfläche und die Zelle ist in der Lage über Integrine an es zu binden. Um jedoch für eine Zelle eine perfekte *in vitro* Situation für Zell-Zell-Adhäsion zu generieren, ist eine einfache Beschichtung mit Cadherinen ungenügend. Die Cadherine müssen ähnlich, wie auch in der *in vivo* Situation mit ihrem N-Terminus von der Zelle bzw. dem Substrat weg zeigen. Das bedeutet, dass die extrazellulären Cadherindomänen in ihrer leicht gebogenen Form vorliegen müssen, damit eine *trans*-Interaktion stattfinden kann. Zudem sollten die c-terminalen Enden des Cadherins fest mit dem Substrat verbunden sein, damit die adhärierende Zelle dieses nicht ausreißen kann. In der *in vivo* Situation wird die nötige Stabilität durch die Verankerung der zytoplasmatischen Domäne mit dem Aktinzytoskelett erreicht. Um das zu erreichen liegt es Nahe, eine kovalente Bindung zwischen dem Cadherin und dem Substrat anzustreben. Hierfür fusioniert man die EC Domänen mit einem SNAP-Tag (siehe Kapitel 3.4.3), den man wiederum an eine selbstorganisierte Monolage von Benzylguanin kovalent binden kann [95]. So wurde gezeigt, dass ein E-Cadherin Konstrukt das nur aus den ersten beiden EC Domänen (EC1-2) besteht, nicht ausreicht um Zell-Zell-Adhäsion zu vermitteln. Zudem ist die Adhäsionskraft einzelner Cadherin-Cadherin Verbindungen sehr schwach. Wohingegen ein E-Cadherin Konstrukt das alle fünf EC Domänen (EC1-5) besitzt sehr wohl die Zellausbreitung begünstigt. Auch die Adhäsionskraft einzelner Cadherine war in diesem Fall größer [96].

³Als Substrat wird etwas bezeichnet auf dem Zellen wachsen können (Träger). Dabei kann es sich um eine Petrischale, ein Deckglas oder ein Deckglas, auf dem sich eine 2D oder 3D Struktur befindetet, handeln.

2.3 Unterschiede in 2D- und 3D-Zellkultivierung

In den letzten Dekaden etablierte man in der Zellbiologie Methoden, um die Zellreaktion auf verschiedene biochemische und physikalische Signale zu untersuchen [2]. Aufgrund der aktuellen Einschränkungen in experimentellen Modellen gibt es noch immer kein globales Verständnis wie Zellen auf verschiedene und zeitgleich eintretende chemische und physikalische Reize reagieren. Zudem wurde erst in den letzten Jahren die Bedeutung der physikalischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix – neben biochemischen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Signal- und Adhäsionsmolekülen – anerkannt, maßgeblich das Zellverhalten und die Differenzierung zu beeinflussen [14, 97, 98, 99, 100, 101]. Diese physikalischen Reize umfassen sowohl mechanische Steifigkeit [14, 97, 99, 102] und Topographie [99, 100, 103, 104, 105] der zellulären Umgebung, als auch die räumliche Strukturierung der Liganden [101, 105, 106, 107, 108, 109]. Die geometrische Verteilung der Liganden erstreckt sich über mehrere Größenordnungen. Sie reicht von nanoskaliger Verteilung an der Zellmembran bis zu mehreren Mikrometern einzelner Zelladhäsionspunkte [28, 107]. Untersuchungen zum Einfluss der räumlichen zweidimensionalen Liganden Verteilungen wurden durch die Einführung des *Microcontact Printing* von extrazellulären Matrix Proteinen und anderen Methoden zur Oberflächenstrukturierung möglich [101, 108, 110, 111]. Diese Studien haben gezeigt, dass die räumliche Verteilung der Liganden eine entscheidende Auswirkung auf mehrere wichtige physiologische Aspekte, einschließlich der Viabilität und der Proliferation von Zellen hat. Zusätzlich zur geometrischen Verteilung der Liganden hat sich die Steifigkeit der Umgebung als wesentlicher Regulator des Zellverhaltens herauskristallisiert. Es wurde gezeigt, dass sich das Zellverhalten, einschließlich der Differenzierung von Stammzellen, dramatisch ändert, wenn Zellen auf zunehmend weicheren Substraten kultiviert werden [14]. Letztendlich wird auch die Topographie und Dreidimensionalität der Umgebung von Zellen erkannt und beeinflusst deren Verhalten [97, 98, 100, 101, 103, 104]. Zellen, die auf zweidimensionalen Geweben kultiviert wurden, variieren oft erheblich in ihrer Morphologie, den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, sowie deren Differenzierungsgrad im Vergleich zu den in physiologisch korrekteren und dreidimensionalen Umgebungen gewachsenen Zellen [112, 113, 114, 60, 115, 116, 117].

Die ersten Experimente, bei denen Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung kultiviert wurden, stammen aus dem Anfang des 20. Jahrhunderts: Ross Harrison kultivierte embryonale Frosch-Zellen auf verschiedenen Substraten und stellte fest, dass sie eine polygone Form auf flachen Deckgläsern haben, während die gleichen Zellen langgestreckt und spindelförmig auf dreidimensionalen Spinnenfäden sind [1]. In der Zwischenzeit wurden umfangreiche Arbeiten durchgeführt, um die Auswirkungen dreidimensionaler Umgebungen auf einer Vielzahl von Zelltypen zu untersuchen. Anfangs verwendete man natürliche gewonnene EZM von Tieren oder Gele aus natürlichen oder synthetischen Polymeren [118, 119, 120, 121]. Diese Methoden haben gezeigt, dass die Kultivierung von Zellen auf flachen, zweidimensionalen Substraten im Vergleich zu einer dreidimensionalen Umgebung deutliche Änderungen in der zellulären Antworten hervorruft. Zum Beispiel setzten sich, verglichen mit den Erkenntnissen der 2D Kultivierung, die Zell-Matrix-Kontakte von Zellen, die in einem dreidimensionalen Gewebe kultiviert wurden, aus anderen Proteinen zusammen [115]. Es gibt bereits mehrere Artikel, welche die Ergebnisse dreidimensionaler Zellkultur in Geweben oder Gelen zusammenfassen [60, 121, 122, 123].

Obwohl unser Verständnis des Zellverhaltens stark von diesen 3D Matrizen profitiert hat, sind

die meisten dieser Gewebe systematisch und quantitativ schwer zu kontrollieren und sind mit Bezug auf ihre Geometrie (z. B. variierende Porengröße), chemische Zusammensetzung und mechanische Eigenschaften schlecht definiert. Deshalb bedarf es der Entwicklung von neuartigen dreidimensionalen Zellkulturgerüsten und Biofunktionalisierungsverfahren um die Auswirkungen von mechanischer Struktursteifigkeit und räumlicher Ligandenverteilung auf das Zellverhalten in 3D-Umgebungen systematisch zu untersuchen. Da der Übergang von mikroskaligen topographischen Zellkultursubstraten zu 3D-Gerüsten eher verschwommen und oft nicht klar definiert ist, wird hier die Definition von Greiner *et al.* übernommen: (i) 2D Substrate sind flache oder strukturierte Oberflächen mit Abmessungen in der z-Achse von einigen hundert Nanometern. Sie dienen vorwiegend zur Steuerung des Zellwachstums in x- und y-Richtung (beispielsweise zur Ausrichtung von Zellen entlang flacher Rillen); (ii) 2,5D-Substrate besitzen einen sich wiederholende, isotropen Aufbau. Ihre Ausdehnung in die dritte Dimension beträgt einige Mikrometer (z. B. Säulenfelder); (iii) 3D-Substrate bestehen aus Strukturen mit einer anisotropen Architektur und einer Ausdehnung von mehreren Mikrometern entlang der z-Achse (z. B. netzartige Strukturen) [2].

2.3.1 Zellkultivierung auf flachen Substraten

Es ist einfacher und oft auch effektiver Zellen auf flachen zweidimensionalen Substraten zu untersuchen. Zudem war es lange Zeit nicht möglich maßgeschneiderte dreidimensionale Strukturen für Zellstudien zu verwenden, weil die technischen Mittel fehlten. Trotzdem ist es wichtig auf die bisherigen Ergebnisse der 2D Zellkultivierung einzugehen. Zu den verwendeten Substraten zählen harte Plastikpetrischalen, Glasplättchen und in manchen Fällen auch weiche Hydrogele auf denen die Zellen kultiviert wurden. Diese 2D Substrate stimulieren nicht nur das Zellwachstum, welches es den Zellen ermöglicht zu überleben und sich zu teilen, sie bieten auch eine vereinfachte Plattform mit der man die chemische Funktionalität, die Materialsteifigkeit, die Oberflächentopographie und die Zellform beeinflussen und die Reaktion der Zelle darauf untersuchen kann (Abbildung 2.4) [3].

Die meisten Informationen die eine Zelle aus ihrer Umgebung erhält sind biochemischer Natur. Die chemische Zusammensetzung der Umgebung spielt deshalb eine große Rolle. Extrazelluläre Proteine interagieren über Transmembranrezeptoren mit der Zelle, wodurch intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden [124]. Nach dem ersten Kontakt einer Zelle mit der EZM oder einer Oberfläche kommt es zu einem Zusammenspiel von Liganden und Rezeptoren, welches die Anheftung, Ausbreitung, Migration, Wachstum und Differenzierung der Zelle beeinflusst [125]. Dabei werden Fokalkontakte zwischen Zelle und EZM gebildet, was wiederum zur Ausbildung von Aktinnetzwerken und der Auswölbung der Zellmembran zu Filopodien und Lamellipodien führt [126, 127]. Zellen können an sehr viele EZM Proteine oder Peptide binden und haben hierfür auch eine Vielzahl von Rezeptoren [128, 129, 130, 131].

Eine wichtiger Regulator der grundlegenden Zellfunktionen ist jedoch die Gesamtkonzentration des jeweiligen Adhäsionsliganden (Abbildung 2.4 a). So korreliert die Morphologie der Zelle stark mit der Konzentration des RGD-Motivs an der Oberfläche eines Substrats. Wenn eine hohe Ligandenkonzentration vorliegt breiten sich die Zellen isotroper aus, im Gegensatz zu Zellen die sich auf Substraten mit geringerer Ligandenkonzentration befinden [132]. Mit zunehmender

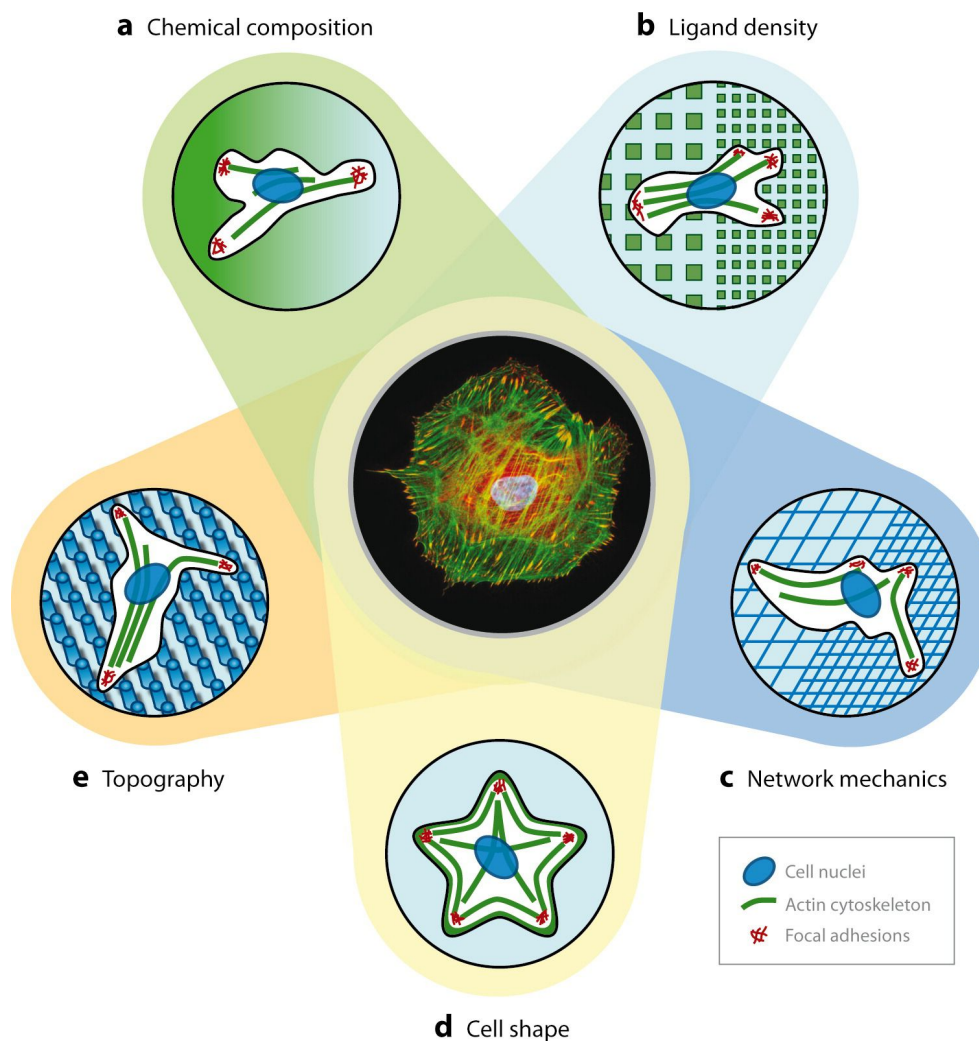


Abbildung 2.4: Die Funktionsweise der Zelle wird beeinflusst durch Veränderungen in (a) der chemischen Zusammensetzung, (b) der Ligandendichte, (c) der Untergrundsteifigkeit, (d) der Zellform (gegeben durch die Umgebung) und (e) der Topographie. Es gibt verschiedene Methoden und Techniken um diese Parameter in der 2D Zellkultivierung zu beeinflussen, jedoch ist vieles davon noch nicht oder nur sehr unpräzise in der 3D Zellkultivierung möglich. Abbildung aus [3].

Ligandenkonzentration nimmt auch die Stärke der Fokalkontakte zwischen Zellen und EZM und die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen zu [133, 134]. Kultiviert man Fibroblasten auf einem RGD funktionalisierten PEG-Hydrogel, kann man eine gesteigerte Adhäsion, Motilität und Bildung von Stressfasern mit zunehmender Ligandendichte beobachten [135, 136].

Nicht nur die reine Ligandenkonzentration, auch der Abstand zwischen den Liganden bzw. den Bereichen in denen sich Liganden befinden spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellfunktionen (Abbildung 2.4 b) [3, 137, 138]. So wurde gezeigt, dass Zellen sich am besten auf dem Substrat ausbreiten, wenn der Abstand der Liganden geringer als 70 nm ist [139]. Lee *et al.* zeigten auch, dass sich die Zellteilung von MC3T3-E1 Zellen und die Ausdifferenzierung zu Osteoblasten erhöht, wenn man den Abstand von RGD-Liganden, bei

gleich bleibender Gesamtligandenkonzentration, von 78 zu 36 nm verringert [140]. Zusätzlich wurden Zellen auch auf regelmäßig strukturierten Substraten kultiviert. Diese bestehen aus meist punktförmigen Bereichen, auf denen sich das EZM Protein befindet und nicht-adhäsiven Bereichen, die den Rest des Substrats abdecken. Zur Herstellung solcher Substrate verwendet man das *Microcontact Printing* (μ CP): Man stempelt ein hydrophobes Thiol mit Hilfe eines PDMS-Stempels auf eine Goldoberfläche und überträgt so das gewünschte Muster. Nach einem Waschschrift wird die restliche Oberfläche mit einem hydrophilen Thiol bedeckt. Gibt man nun eine EZM Proteinlösung auf das Substrat, binden die Proteine nur an die gestempelten, hydrophoben Bereiche. Die hydrophilen Bereiche sind protein- und zellabweisend [141, 142]. Ist der Abstand zwischen den Proteinpunkten kleiner als $5\mu\text{m}$ können sich Zellen wie auf homogen beschichteten Substraten ausbreiten. Erhöht man den Abstand jedoch auf $5\text{-}25\mu\text{m}$ nehmen Zellen die vorgegebene Form an und bilden Aktinstressfasern entlang der Proteinpunkte. Bei Abständen über $25\mu\text{m}$ sind Zellen nicht mehr in der Lage den nichtadhäsiven Bereich zu überbrücken [8]. Xia *et al.* konnten zeigen, dass Zellen aktiv dazu gebracht werden können in eine bestimmte Richtung zu migrieren indem man den Abstand und die Form der Proteinbereiche ändert [9].

Nicht nur chemische, sondern auch mechanische Umgebungsreize, führen zu Änderungen im Zellverhalten in Bezug auf Ausbreitung, Migration und Differenzierung. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Mechanotransduktion (Abbildung 2.4 c) [3, 143]. Allgemeingültig kann man sagen, dass Zellen besser auf harten Oberflächen adhäreren und größere Fokalkontakte ausbilden [144]. Kommen Zellen aus einer Suspension in Kontakt mit dem Substrat adhäreren sie und breiten sich aus. Dabei bilden sie auf einem geeigneten Material mehr und mehr Fokalkontakte und Aktinstressfasern [145, 146, 147]. Zudem migrieren Zellen merklich schneller auf harten Oberflächen und migrieren in Richtung höherer Steifigkeit wenn sie auf einem Steifigkeitsgradienten kultiviert werden. Das wurde mit NIH/3T3-Fibroblasten auf flexiblen Polyacrylamidgelen, die zuvor mit Kollagen beschichtet wurden, gezeigt. Diesen Prozess nennt man Durotaxis [148].

Kultiviert man humane Mesenchymale Stammzellen (hMSCs, *human mesenchymal stem cells*) auf Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Steifigkeit werden je nach Härte der Oberfläche mehr spezifische Markerproteine exprimiert. Auf mittelharten Substraten ($E \sim 10\text{ kPa}$, vergleichbar mit Muskelgewebe) werden mehr myogene und auf harten Substraten ($E \sim 35\text{ kPa}$, vergleichbar mit Knochengewebe) werden mehr osteogene Kennzeichnungsproteine gebildet [14, 149]. Ähnliches kann man auch beobachten, wenn neuronale Stammzellen auf sehr weichen Materialien ($E \sim 0,5\text{ kPa}$, vergleichbar mit Nervengewebe) kultiviert werden. Dann kommt es zu einer Differenzierung in Richtung von Neuronen [150, 151]. Dabei kommt es in der Regel nicht nur zu Änderungen der Proteinzusammensetzung im Inneren der Zelle, es ändert sich auch die Morphologie der Zellen.

Zusätzlich zu den biochemischen und biophysikalischen Materialsauswirkungen spielt auch die durch äußere Faktoren vorgegebene Zellform eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Schicksal der Zelle und wurde deshalb innerhalb der letzten Jahrzehnte genauer untersucht (Abbildung 2.4 d) [152, 153, 154]. Bereits 1997 zeigten Chen *et al.* [141] dass Zellen sehr sensitiv auf ihre Ausbreitungsfläche reagieren. Sie kultivierten kapillare Endothelzellen auf unterschiedlich großen Proteininseln und konnten Apoptose auf kleineren Inseln beobachten.

Wohingegen sich Zellen auf größeren Proteininseln ausbreiteten und proliferierten. Zudem stellten sie fest, dass die Zellgröße eine wichtigere Rolle für das Zellüberleben spielt als die Proteinbedeckung. Diese Beobachtungen waren unabhängig vom verwendeten Protein. Diese Art von Substraten wurde auch verwendet um den Prozess zu untersuchen, wie Zellen an das Substrat binden und ihre Form anpassen [155]. Zudem kann man auch die Zellpolarisierung untersuchen [156, 157, 158, 159].

Stammzellen, die auf solchen Proteininseln kultiviert wurden, zeigten je nach Größe des adhäsiven Bereichs unterschiedliche Entwicklungsrichtungen. So wurde gezeigt, dass humane Mesenchymale Stammzellen sich osteogen entwickeln, wenn sie auf großen Inseln kultiviert werden und die Möglichkeit haben sich auszubreiten. Wohingegen man auf kleinen Proteininseln, auf denen sich die Zellen nicht ausbreiten konnten, eine adipogene Differenzierung beobachtete [160]. Die vergrößerte Zellausbreitungsfläche führt zu höherer Zytoskelett-Zugspannung, was eine Hochregulierung von RhoA und ROCK zur Folge hat [161]. Auch die Form der Proteininseln beeinflusst die Differenzierung von Stammzellen. Kilian *et al.* zeigten, dass sich, wegen der unterschiedlichen Aktomyosin Kontraktilität auf eckigen oder runden Proteininseln, auch die Differenzierungsrichtung von humanen Mesenchymalen Stammzellen ändert [162]. Die Zellform beeinflusst zudem die Festlegung von Stammzellen in Richtung Chondrozyten und Myozyten [163].

Ein weiterer wichtiger biophysikalischer Gesichtspunkt in Bezug auf das Zellverhalten ist die Topographie des Substrats (Abbildung 2.4 e) [3]. Die natürliche Umgebung von Zellen ist in Hinblick auf die Zellgröße nicht flach sondern weist eine spezielle Topographie im Mikrometerbereich auf. Zudem gibt es auch freie Bereiche, was der fibrillären Struktur der EZM geschuldet ist. Deshalb wurde schon vor vielen Jahren versucht, die biologischen Auswirkungen in Bezug auf nano- und mikrotopographischen Veränderungen der Oberfläche zu untersuchen [164, 165]. Mittlerweile wurden Zellen auf Rillen-, Gruben- und Säulen-Strukturen kultiviert und die Veränderungen auf die Adhäsion, Ausrichtung, Migration und Differenzierung vieler Zelltypen untersucht [166, 167]. Durch nano- und mikroskopische Veränderungen der Oberfläche kommt es zu Anisotropien im Inneren der Zelle, wodurch es zu Änderungen im Zytoskelett und der Zellmorphologie kommt [100].

Zu den am häufigsten untersuchten Strukturen zählen die Rillen-Strukturen. Dabei handelt es sich um parallel verlaufende Linien die sich mit einer gewissen Breite und Höhe vom flachen Substrat abheben. Kultiviert man Zellen auf diesen Substraten, so zeigen sie eine erhöhte Adhäsionsrate und sie polarisieren und elongieren ihr Zytoskelett entlang der Rillen. Zudem ist eine gerichtete Migration parallel zur Strukturierung zu beobachten [168, 169]. Eine neuronale Vorläuferzelllinie (PC12) zeigte das Auswachsen von Neuriten entlang solcher Rillen [170]. Zudem wurde bei Fibroblasten eine erhöhte Fibronectin mRNA Transkription beobachtet [171]. Die Abmessungen der Rillen-Strukturen, ab denen sie einen Einfluss auf das Zellverhalten ausüben, liegt bei ungefähr 100 nm Tiefe und 100 nm Breite [172].

Gruben-Substrate sind flache Oberflächen die mit Nanovertiefungen versehen sind und haben einen großen Einfluss auf verschiedene Zellfunktionen. Kultiviert man Zellen auf solchen Substraten mit Vertiefungen > 35 nm, sinkt typischerweise die Adhäsions- und Ausbreitungsrate wohingegen die Anzahl der Filopodien steigt [172, 173]. Des Weiteren bewirkt die Kultivierung von hMSCs auf Nanograben-Substraten eine Differenzierung in Richtung Osteoblasten. Hierfür wurden Substrate mit Vertiefungen von 100 nm Tiefe und 120 nm Durchmesser

verwendet. Der Mittenabstand betrug 300 nm mit einer hexagonalen, quadratischen, zufälligen Anordnung. Zudem gab es eine quadratische Anordnung, bei der die Vertiefungen beliebig um ± 50 nm variiert wurden. Man konnte nur auf den quadratischen und beliebig-quadratischen Substraten eine Differenzierung der hMSCs zu Osteoblasten beobachten. Zudem wurden mehr osteocalcinhaltige Zellen auf den variierten-regelmäßigen Strukturen gefunden, im Vergleich zu den regelmäßigen oder zufälligen Substraten. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Größe und Form der Strukturierung sondern auch die Anordnung eine wichtige Rolle spielt [174]. Mit Hilfe von Gruben-Substraten mit quadratischer Anordnung der Vertiefungen lässt sich der Stammzellcharakter und die Multipotenz von hMSCs bis zu acht Wochen erhalten [175].

Zu den Säulen-Substraten zählen alle Arten von Erhöhungen, die sich von der flachen Oberfläche abheben. Es gibt Nano- und Mikrosäulen und nadelförmige Strukturen. Allgemeingültig kann man sagen, dass Zellen, die auf solchen Substraten kultiviert werden, schlechter adhären und proliferieren. Diese Beobachtung könnte der geringeren Oberfläche des Substrats geschuldet sein und wird ausgeprägter, wenn die Höhe der Strukturen von 50 nm auf 600 nm angehoben wird [168]. Mikrosäulen-Substrate können auch verwendet werden um Zugkräfte von Zellen zu messen [57]. Anhand der Auslenkung der Säulen kann man direkt die Kraft bestimmen, mit der die Zelle an der Säule zieht [176]. Durch Variation der Säulenhöhe kann man die Steifigkeit des Substrats sehr genau einstellen und beispielsweise die Auswirkung auf die Differenzierung von hMSCs untersuchen [177]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man keine grundlegenden Material- oder Oberflächeneigenschaften ändert. Des Weiteren kann man auch magnetische Säulen herstellen, anschließend Kräfte auf Zellen ausüben und ihre Reaktion beobachten [178].

2.3.2 Zellkultivierung in 3D

In den letzten Jahren gab es große Fortschritte in der Herstellung von dreidimensionalen Nano- und Mikrostrukturen für die Zellkultivierung. Mit Hilfe dieser Methoden kann man die Geometrie (z. B. Porengröße) der Strukturen an die natürliche Umgebung von Zellen anpassen und so gezielt bestimmte Prozesse im Inneren der Zelle genauer untersuchen. Zuerst wird hier kurz auf die 3D Hydrogele eingegangen, dann die verschiedenen Methoden und Materialien vorgestellt die bisher verwendet wurden um maßgeschneiderte 3D Strukturen herzustellen und anschließend werden die biologischen Ergebnisse dieser Methoden zusammengefasst.

Zellkultivierung in 3D Hydrogelen

In der dreidimensionalen Zellkultivierung werden häufig Hydrogele verwendet. Sie haben den Vorteil, dass sie die Zelle vollständig umschließen und somit große Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation aufweisen. Meistens enthalten sie EZM-Proteine wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin, die als Bestandteil der künstlichen EZM die Zelladhäsion vermitteln. Durch die Kultivierung von Zellen in unterschiedlich steifen Hydrogelen erhält man unterschiedliche Zellreaktionen wie z. B. die Differenzierungsrichtungen von Stammzellen [3, 179]. Der Nachteil dieser Hydrogele ist, dass die Liganden homogen im Hydrogel verteilt sind. Zudem kann man nur sehr schwer die genaue Ligandendichte bestimmen. Deshalb gibt es verschiedene Ansätze diese Hydrogele gezielt zu funktionalisieren. Hierfür werden in der Regel PEG-basierte Hydrogele hergestellt die nachträglich, z. B. mittels Zwei-Photonenabsorption, funktionalisiert

werden. Das PEG-Hydrogel dient als stützende Matrix, an der die Zellen nicht adhären können. Erst durch die nachträglich angebrachten Liganden sind Zellen in der Lage im Hydrogel zu adhären und proliferieren. Bereits 2006 veröffentlichten Hahn *et al.* eine Methode um photolithographisch PEG-Hydrogele zu strukturieren [180]. Jedoch war nur eine Strukturierung in der x - und y -Ebene möglich, da sie UV-Licht und Masken verwendeten. DeForest *et al.* demonstrierten eine weitaus komplexere Methode zur Strukturierung von Hydrogelen [12]. Sie funktionalisierten PEG-Hydrogele mit zwei unterschiedlichen Liganden mittels Zwei-Photonen-Absorption in 3D und waren zusätzlich in der Lage einen Liganden mittels Flutbelichtung mit UV-Licht wieder zu entfernen. NIH/3T3-Zellen die in diesen Hydrogelen kultiviert wurden, adhärten nur in den funktionalisierten Bereichen. Durch eine ortsaufgelöste Defunktionalisierung bereits bewachsener Bereiche konnten die Zellen gezielt abgelöst werden. Es gibt einige Nachteile der Hydrogele. Das ist die geringe Porengröße, die es für Zellen beinahe unmöglich macht, in die Gele zu migrieren. Deshalb werden die Hydrogele oft mit den Zellen vermischt und dann auf das Substrat gegeben. Zudem sind sie nicht enzymatisch abbaubar. Der größte Nachteil der Hydrogele für Einzelzellstudien ist jedoch die schlechte Auflösung der Funktionalisierung, die es unmöglich macht diese Substrate für Einzelzellstudien zu verwenden.

Methoden zur Herstellung von maßgeschneiderten 3D Substraten

Mittlerweile sind fast alle Methoden zur Herstellung dreidimensionaler Substrate computergestützt. Man modelliert eine 3D Zellkulturgerüst am Computer und teilt das Modell in mehrere Schichten auf die nach und nach übereinander aufgetragen werden. Dieses Aufeinander schichten nennt man auch *Layer-by-Layer*-Verfahren [181, 182]. Dabei bewegt sich entweder der Träger der Struktur oder der Teil mit dem das Material abgeschieden wird [120, 181, 182]. Man teilt die verschiedenen Methoden oft in folgende Kategorien ein: Laser basierende Verfahren, 3D Druckmethoden, Düsen basierte Systeme und Abformmethoden (z. B. *soft lithography*).

Bei den Laser basierten Verfahren gibt es unterschiedliche Klassen. Beim Lasersintern wird ein Pulver mittels eines Lasers so verändert, dass ein Feststoff entsteht. Mit Hilfe dieses Verfahren können knochenähnliche 3D Strukturen hergestellt und zur Zellkultivierung verwendet werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist es, das Entfernen der überschüssigen Pulverreste nach der Herstellung von 3D Strukturen [4, 183, 184]. Ein weiteres Laser basiertes Verfahren ist die Photopolymerisation eines flüssigen Monomers. Man kann das Monomer entweder mittels UV-Licht in einem *Layer-by-Layer*-Verfahren polymerisieren und so die 3D Struktur Schicht für Schicht aufbauen oder man polymerisiert nur kleine Bereiche im Monomer mittels Multiphotonenabsorption und kann so sehr präzise dreidimensionale Nano- und Mikrostrukturen herstellen (mehr dazu in Kapitel 3.1). Dieses Verfahren wurde schon erfolgreich bei Zellkulturstudien angewandt [4, 185, 186, 187, 188, 189].

Bei den 3D Druckmethoden werden beispielsweise flüssige Biomaterialien, Wachs oder chemische Grundstoffe auf der Oberfläche angelagert um dreidimensionale Strukturen herzustellen. Hierzu zählt man auch Tintenstrahl basierte und *direct-write*-Methoden [111, 120, 181, 182, 190, 191, 192, 193]. Bei den Tintenstrahl basierten Methoden wird ein Tropfen nach dem anderen in x - und y - Richtung aufgetragen und anschließend wird entweder die Grundplatte auf der sich die Struktur befindet oder der Druckkopf in der Höhe verfahren. Beim *direct-write*-Verfahren wird das jeweilige Material fadenförmig auf eine Grundplatte aufgetragen [182, 193].

Bei beiden Verfahren werden die gedruckten Materialien noch gehärtet oder polymerisiert, was meist mittels UV-Licht geschieht [190, 191, 192, 193, 194]. Mit Hilfe dieser beiden Verfahren kann man sehr leicht und kosteneffizient 3D Strukturen aus mehreren Materialien herstellen. Sie werden jedoch meistens dazu genutzt um zweidimensionale topographische Strukturen herzustellen [111].

Die Düsen basierten Systeme sind ähnlich wie die 3D Druckmethoden. Es wird ein Material durch eine Düse gepresst und an einer Oberfläche abgelagert. Jedoch wird bei diesem Verfahren das abgelagerte Material anschließend entweder chemisch oder thermisch behandelt oder Lösungsmittel in der Tinte verdunstet, was zu einer Verfestigung führt [120, 181, 190, 193, 195]. Abformmethoden sind meist nicht computergestützt. Man benötigt nur für die Herstellung der so genannten *Master* computergestützte Verfahren. Zur Herstellung eines solchen *Masters* wird ein Silizium-Wafer mit einem Lack (z.B. SU-8) beschichtet. Anschließend wird ein Muster entweder mittels Belichtung mit UV-Licht durch eine Maske oder in einem Elektronenstrahlschreiber auf- bzw. abgetragen. Nach einem Entwicklungsschritt wird das Silizium in einem Ätzverfahren einige Mikrometer abgetragen. Anschließend wird der restliche Lack entfernt. Diesen *Master* kann man nutzen um kosten- und zeit-effizient Abdrücke mit verschiedenen Materialien herzustellen und so 2,5D und 3D Strukturen zu erhalten. Das häufigste Material das man hierfür verwendet ist Polydimethylsiloxan (PDMS), weil es sich leicht verarbeiten lässt und biokompatibel ist [11, 57, 104, 182, 196, 197, 198, 199, 200].

Es gibt noch eine Vielzahl von anderen Methoden zur Herstellung von 3D Strukturen. Hier wurde nur die genannt, welche für Einzelzellstudien wichtig sind.

Materialien zur Herstellung von maßgeschneiderten 3D Substraten

Die Auswahl des richtigen Materials ist essentiell für die Herstellung von maßgeschneiderten 3D Strukturen für Zellwachstumsstudien. Zum einen müssen die passenden physikalischen Eigenschaften erreichbar sein, zum anderen sollten die Materialien ungiftig und biokompatibel sein. Oft werden natürliche oder von Tieren stammende Polymere verwendet. Dabei handelt es sich entweder um Proteine (z.B. Kollagen, Fibrin, Matrigel) oder um Polysaccharide (z.B. Hyaluronsäure, Chitin, Agar) [120, 182]. Diese natürlichen Materialien eignen sich hervorragend zur Kultivierung von Zellen und vermitteln eine optimale Zell-Matrix-Interaktion. Nachteilig ist jedoch dass sie systematisch und quantitativ schwer zu kontrollieren sind; ihre physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften schwer zu bestimmen sind; und dass man sie nur suboptimal in der *soft lithographie* einsetzen kann [118, 119, 121, 201, 202, 203]. Mittlerweile gibt es auch eine Vielzahl von synthetischen Materialien um biokompatible maßgeschneiderte 3D Strukturen herzustellen [201, 204]. Sie bieten im Vergleich zu den natürlichen Materialien mehrere Vorteile. So kennt man ihre genaue chemische Zusammensetzung und man kann die physikalischen und mechanischen Eigenschaften genau definieren, manipulieren und abstimmen. Zudem kann man sie bei den meisten Herstellungsverfahren verwenden [100, 102, 113, 118, 202, 203, 205, 206].

Zu den am häufigsten verwendeten synthetischen Materialien um 2,5D und 3D Mikrostrukturen herzustellen, zählen die organischen Polymere Polydimethylsiloxan [57, 104, 188, 198, 199, 200, 207] und Polyethylenglycol (PEG) [12, 100, 121, 180, 189, 201, 208, 209].

Bei der Mehrphotonen-Polymerisation werden licht-sensitive Materialien wie der Epoxidfotolack SU-8 [185, 210] oder das anorganisch-organische Hybridpolymer Ormocer [5, 186, 187, 211] verwendet. Prinzipiell kann man jedes Acrylat als Fotolack verwenden. Man muss

dazu nur einen passenden Fotoinitiator in dem Acrylat lösen. Mit steigender Anzahl der Acrylgruppen am Molekül erhöht sich bei der Polymerisation der Vernetzungsgrad und somit die Festigkeit des Endprodukts. Häufig wird hierfür Polyethylenglycoldiacrylat (PEG-DA) [209], Pentaerythritoltriacrylat (PETA) [212] oder SR368⁴ [4] verwendet.

Da die biochemische Umgebung die Adhäsion, das Überleben, die Vermehrung und die Differenzierung von Zellen beeinflusst, ist es sehr wichtig die Oberflächenzusammensetzung von künstlich hergestellten 3D Strukturen zu kontrollieren [213]. Da das Grundmaterial von 3D Strukturen keine Botenstoffe enthält die es für Zellen attraktiver machen z.B. eine Bindung einzugehen, ist es notwendig die Oberfläche biochemisch zu funktionalisieren. Eine Möglichkeit besteht darin die 3D Strukturen mit Proteinen aus der EZM, wie zum Beispiel Fibronectin, Laminin oder Kollagen, zu beschichten [97]. Man kann hierfür auch eine kurze Peptidsequenz, die für die Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielt, wie z. B. Arginin-Glycin-Asparginsäure (RGD) verwenden [131, 214, 215]. Oder man funktionalisiert die Oberfläche mit einem Zellmembran-Protein wie E-Cadherin [200].

Die einfachste Art die Oberfläche einer 3D Struktur zu funktionalisieren erreicht man durch Adsorption des jeweiligen Proteins. Indem man die Struktur in eine Lösung des Biomoleküls taucht. Dabei handelt es sich meist um eine homogene Funktionalisierung [216]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteine ihre biologische Aktivität beibehalten. Der Nachteil ist, dass man die Konzentration an der Oberfläche oder die Orientierung der Proteine nicht beeinflussen kann. Um diesen Nachteil zu umgehen wurden Mechanismen entwickelt, wodurch sich Proteine entweder mit einer hohen Bindungsaffinität oder sogar kovalent an die Oberfläche binden lassen. Zu den Mechanismen mit hoher Bindungsaffinität zählt z.B. die Paarbildung von Biotin mit (Strept-)Avidin [217]. Ein häufig verwendeter Mechanismus zur kovalenten Bindung von Proteinen an die Oberfläche ist der SNAP-Tag Mechanismus [96]. Oft werden hierfür auch Click- oder Thiol-Chemie Mechanismen verwendet. Bisher wurden diese Mechanismen entweder auf 2D Oberflächen [101] oder in Hydrogelen angewandt, bei denen die räumliche Auflösung des funktionalisierten Bereichs schlecht war und die Größe einzelner Zellen überstieg [12]. Da die Biomoleküle in der EZM nicht homogen verteilt sind, versucht man nur Teile der künstlichen Umgebung selektiv und strukturiert zu funktionalisieren. Ein Ansatz hierfür ist die Kombination von einem 2,5D Säulensubstrat mit *Microcontact Printing*, um nur einzelne Bereiche an der Oberseite der Säulen mit Fibronectin zu funktionalisieren [57, 218, 219].

Zellkultivierung in maßgeschneiderten 3D Substraten

Normalerweise werden erst nach der Herstellung der 3D Strukturen Zellen auf die Substrate gegeben. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Zellen hierfür verwendet; sowohl primäre Zellen als auch Zellen aus Zelllinien. Dazu zählten unter anderem: Fibroblasten [12, 180, 199, 206, 207], Endothelzellen [103, 185, 201, 220], Kardiomyozyten [5, 221], Chondrozyten [222], Osteoblasten [205, 190, 192], Neuronen [194] und Stammzellen [104, 113, 120, 191, 223]. In den meisten Studien ging es darum das Überleben der Zellen bzw. die Zytotoxizität des verwendeten Materials mit Hilfe einer lebend/tot-Färbung zu untersuchen. Oder die Vermehrung von Zellen nach der Aussaat mit Hilfe von biochemischen *Proliferationskits* zu bestimmen. In all den Studien wurde gezeigt, dass die meisten synthetischen Materialien

⁴Bei SR368 handelt es sich um Tris(2-hydroxyethyl)isocyanuratetriacrylat von der Firma Sartomer.

keine Toxizität aufweisen, die Vermehrung von Zellen unterstützen und somit für weitere Anwendungen geeignet sind.

Zudem wurde gezeigt, dass man mit Hilfe von maßgeschneiderten 3D Zellkulturstrukturen die Differenzierung von Stammzellen z.B. in Richtung Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten beeinflussen kann. Durch dreidimensionale netzartige Strukturen aus Poly(ϵ -caprolacton) oder methacrylierter Gelatine wird eine mehr osteogene oder adipogene Festlegung der Stammzellen unterstützt [113, 223, 224]. Kultiviert man Stammzellen auf fasrigen 3D Strukturen, differenzieren sie eher in Richtung Osteoblasten. Hierbei spielt die Geometrie und die Steifigkeit der Struktur eine wichtigere Rolle, als ihre chemische Zusammensetzung [113]. Diese Erkenntnisse lassen einen darauf hoffen, dass maßgeschneiderte dreidimensionale Zellkulturtemplate in Zukunft eine wichtige Rolle spielen könnten, wenn es darum geht eine künstliche Stammzellnische herzustellen [2].

Zusätzlich wurden auch einige Einzelzell-Studien durchgeführt, bei denen das Hauptaugenmerk auf die Morphologie, Form, Adhäsion und Motilität der Zelle gelegt wurde. Bei den meisten dieser Studien ging es darum eine ja/nein-Antwort zu erhalten [1, 113, 186, 191]. Es wurden jedoch auch das Migrationsverhalten, wie z. B. die Migrationsgeschwindigkeit, untersucht [4, 196, 198]. Einige Gruppen untersuchten auch intrazelluläre Mechanismen, wie das Zytoskelett oder die Zell-Matrix-Adhäsion in synthetischen 3D Strukturen [11, 198, 199, 200, 206]. Ochsner *et al.* kultivierten Zellen in spindelförmigen, harten 3D Mikrovertiefungen und konnten zeigen, dass sich das Aktinzytoskelett und die Zell-Matrix-Adhäsion nicht nur auf den Boden der Vertiefung beschränkte, sondern über die gesamte Struktur dreidimensional verteilt war [11]. Zudem konnten sie zeigen, dass Zellen in weichen 3D Mikrovertiefungen keine Aktinstressfasern bilden konnten [199]. Nikkhah *et al.* kultivierten verschiedene Zelltypen ebenfalls in Mikrovertiefungen und konnten, je nach Zelltyp, Unterschiede in der Konzentration von Vinculin in den Fokalkontakten feststellen. Deshalb könnte man ihre 3D Mikrostrukturen dazu verwenden, neuartige biochemische Marker zu entwickeln, mit denen man gesunde von kranken Zellen unterscheiden kann [206]. Cukierman *et al.* zeigten, dass es einen Unterschied in der molekularen Zusammensetzung von Fokalkontakten gibt, wenn man Zellen entweder in einem 3D Gewebe oder auf flachen 2D Substraten kultiviert [115]. Yamada *et al.* untersuchten eine ähnliche Situation, in der Fibroblasten zum einen auf flachen 2D Substraten und zum anderen in 3D Geweben verglichen werden. Sie konnten beobachten, dass sich die Form der Fibroblasten essentiell ändert. Auf dem 2D Substrat war die Morphologie eher flach und rund. Wohingegen sie in der 3D Proteinmatrix langgestreckt und spindelförmig war [225].

Verschiedene Kraftmessungen, von Zellen auf ihre Umgebung oder andere Zellen, wurden häufig durchgeführt. So entwickelten Liu *et al.* eine Methode mit der sie die Zugkräfte zwischen Zellen messen konnten. Hierfür funktionalisierten sie selektiv die Oberseite eines Säulenfelds mit Fibronectin. Zellen, die auf diesen Substraten kultiviert wurden, befanden sich nur genau gegenüber. Anhand der Verbiegung der Säulen konnte man die Zugkräfte bestimmen, welche die Zellen aufeinander ausübten. Sie konnten zeigen, dass die Größe der *Adherens Junctions* und die Zell-Zell-Zugkräfte von Endothelzellen mit der Myosinaktivität korrelieren [218]. Klein *et al.* konnten die Kontraktionskräfte von schlagenden Kardiomyozyten in elastischen 3D Radstrukturen messen. Die Kardiomyozyten waren in der Lage die Seile zwischen den Säulen während der gleichmäßigen Kontraktion um 0,8 μm zu verbiegen. Diese Auslenkung entspricht 47 nN [5]. Die Kontraktionskraft von Fibroblasten beträgt nur etwa 5-20 nN [56, 57].

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

Das Direkte Laserschreiben (DLS) ist eine 3D Lithographiemethode um Polymerstrukturen herzustellen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die hohe Auflösung, die man damit erreichen kann. Die klassische Anwendung ist die Herstellung von 3D photonischen Kristallen [226], 3D photonischen Quasikristallen [227] oder 3D photonischen Metamaterialien [228, 229]. Metamaterialien besitzen Eigenschaften wie sie in der Natur nicht zu finden sind. Es lassen sich jedoch auch nicht optische Anwendungen finden. Dazu zählt unter anderem der Bereich der mechanischen Metamaterialien [230]. Es lassen sich auch Strukturen herstellen, die Eigenschaften aus der Tierwelt imitieren. So wurde beispielsweise der Haltemechanismus von Geckos nachgebildet [231]. Zudem hat es sich als adäquate Methode erwiesen um verschiedenste Zellsubstrate herzustellen [2, 4, 5, 232].

Beim DLS wird ein Laserstrahl in einen Fotolack fokussiert, wodurch eine Zwei-Photonenabsorption (2PA) induzierte Polymerisation in diesem Bereich stattfindet. So lassen sich beliebige, dreidimensionale Strukturen mit unterschiedlichsten Eigenschaften herstellen. Die nicht vernetzten Stellen werden anschließend mit einem Lösungsmittel entfernt und es bleibt die dreidimensionale Polymerstruktur übrig. Abbildung 3.1 veranschaulicht die einzelnen Arbeitsschritte des Direkten Laserschreibens.

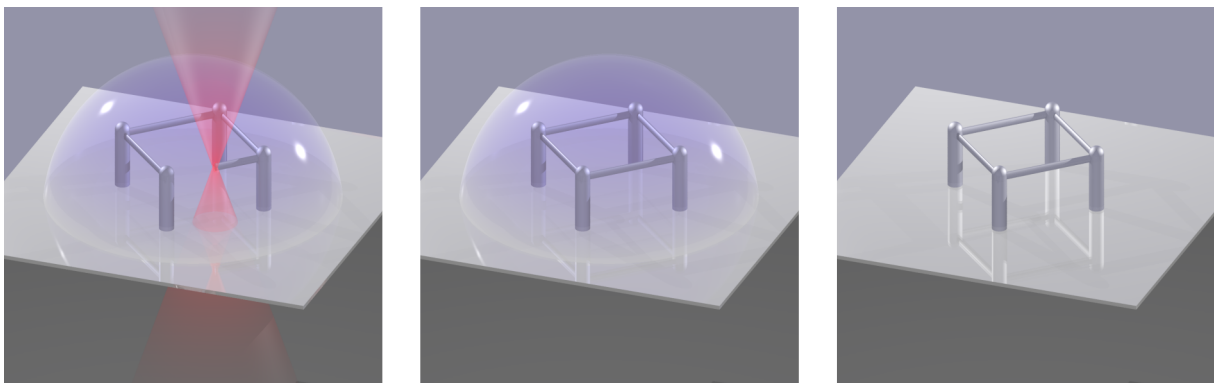


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des DLS. Ein Laserstrahl wird in den Fotolack fokussiert. Im Laserfokus polymerisiert der Lack. Danach werden die unpolymerten Bereiche gelöst und die Strukturen freigelegt. Abbildung nach [2].

3.1 Direktes Laserschreiben

Schon vor dem Direkten Laserschreiben gab es Verfahren um zwei- und dreidimensionale Strukturen herzustellen. Bei einer Methode werden dünne Lackschichten meist mit ultraviolettem (UV) Licht durch eine Maske polymerisiert und nachträglich der nicht belichtete Bereich entfernt. So ist es möglich zwei- und zweieinhalb-dimensionale (2D und 2,5D) Strukturen herzustellen. Abbes Auflösungsformel sagt aus, dass die Auflösung für die optische Fernfeld-Mikroskopie abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ist [233]. Deshalb werden zur Herstellung von Computerchips immer kürzere Wellenlängen, von UV Licht zu kurzwelligem UV (*deep ultraviolet*, DUV) Licht bis hin zu extrem kurzwelligem UV (EUV) Licht, verwendet [234]. Der Nachteil dieser Methode ist es dass für jede Strukturvariation neue Masken hergestellt werden müssen.

Durch die Stereolithographie war es das erste Mal möglich dreidimensionale Mikrostrukturen herzustellen. Dabei wird eine Schicht Fotolack nach der anderen mit einem Laser belichtet [235]. Die Nachteile dieses Verfahrens ist zum einen die geringe axiale Auflösung von ca. 10 μm und zum anderen ist es nicht möglich vollkommen beliebige dreidimensionale Strukturen herzustellen.

Beim DLS wird ein Fotolack auf ein Substrat aufgeschleudert (Rotationsbeschichtung) oder aufgetropft. Als Substrat dient in der Regel ein 170 μm dickes Deckglas. Der Fotolack besteht aus einem Monomer, das mit einem Fotoinitiator versetzt wurde. Anschließend wird ein Laserstrahl durch ein Objektiv in den Fotolack fokussiert. Um den Laserstrahl möglichst stark zu fokussieren verwendet man ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA). Dadurch ergibt sich eine hohe, nach außen schnell abfallende Intensitätsverteilung im Fokus des Laserstrahls. Die Fotolacke werden so hergestellt, dass man eine gewisse Mindestenergie und -leistung (Schwellwert) benötigt, um eine Polymerisation zu erreichen. In unserem Fall würde das bedeuten, dass nur der Bereich im Fokus des Laserstrahls polymerisiert wird. Dieser kleine Bereich wird auch als Voxel bezeichnet. Als Analogon zu dem Bildelement Pixel. Um vollkommen beliebige dreidimensionale Strukturen herstellen zu können, bedarf es einer optischen oder chemischen Nichtlinearität in Bezug auf die Intensität [236].

Bei der linearen Ein-Photonenabsorption (1PA) ist eine chemische Nichtlinearität durch gewisse Hemmsubstanzen wie Sauerstoff oder 4-Methoxyphenol im Fotolack gegeben. So verhindern die Sauerstoffmoleküle, dass sich die Polymerisation ausbreitet oder die frei gewordenen Radikale sofort abgefangen werden und keine Polymerisation stattfindet. Sind diese Hemmsubstanzen aufgebraucht, ist diese Nichtlinearität nicht mehr gegeben. Deshalb ist ein zweiter Belichtungsvorgang an diesen Stellen kritisch [237]. Würden die Hemmsubstanzen schnell genug im Lack diffundieren wäre es durchaus Möglich 3D Strukturen mittels 1PA herzustellen. Ein weiteres Argument das zusätzlich dagegen spricht ist das „Gedächtnis“ des Fotolacks. Sobald der Schwellwert überschritten wird, ist eine vollständige Quervernetzung (Polymerisation) erreicht. Es kommt jedoch schon vor dem Erreichen des Schwellwerts zu einer leichten Quervernetzung des Monomers. Dieser vorpolymerisierten Bereich wird als „Gedächtnis“ bezeichnet. Um diesen Bereich komplett zu Polymerisieren bedarf es einer geringeren Leistung.

Die optische Nichtlinearität kann durch N-Photonenprozesse realisiert werden. Aus diesem Grund hat sich die Zwei-Photonenabsorption (2PA) als weitaus bessere Möglichkeit erwiesen.

Die 2PA wurde schon im Jahre 1931 von Göppert-Mayer beschrieben. Sie zeigte, dass es möglich ist ein Atom oder Molekül in seinen angeregten Zustand zu versetzen, obwohl es nicht mit der eigentlich benötigten Energie angeregt wird, sondern nur jeweils mit der halben [238]. Dies ist jedoch nur möglich, wenn zwei Lichtquanten nahezu zeitgleich den Wirkungsquerschnitt des anzuregenden Moleküls (in unserem Fall der Fotoinitiator) durchqueren. Die Zeitspanne, in der die Photonen mit dem Molekül wechselwirken müssen, beträgt nur einige Femtosekunden.

Um jedoch zu verstehen warum man zur Herstellung und Funktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen auf die Zwei-Photonenabsorption angewiesen ist, wodurch hohe Kosten für gepulste Laserquellen entstehen, ist es notwendig sich erst einmal die Ein-Photonenabsorption genauer anzuschauen.

Man spricht von einer 1PA wenn ein Atom oder ein Molekül durch die Absorption eines Photons in einen energetisch angeregten Zustand übergeht. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Absorption ist proportional zur lokalen Lichtintensität im Absorber. Man könnte auch sagen, dass die Wahrscheinlichkeit für eine 1PA proportional zur Wahrscheinlichkeit ist, mit der ein Photon einen Absorber findet. Sie ist also proportional zur Photonendichte was genau der Lichtintensität I entspricht.

Wird nun Licht innerhalb des Fotolacks mittels 1PA absorbiert, wird der Lichtstrahl auf dem Weg zum Brennpunkt signifikant abgeschwächt. Dafür ergibt sich folgender Zusammenhang und somit das Lambert-Beersche Gesetz:

$$\frac{dI}{dz} = -\sigma_{1PA} \cdot N \cdot I(z) \quad (3.1)$$

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\sigma_{1PA} \cdot N \cdot z} \quad (3.2)$$

Dabei ist I die Lichtintensität, z die Ortskoordinate entlang der Ausbreitung des Lichts, σ_{1PA} ist der lineare Absorptionsquerschnitt des absorbierenden Fotoinitiatormoleküls, N ist die Anzahl der Fotoinitiatormoleküle im Anregungsvolumen. Befinden sich viele Fotoinitiatormoleküle im Fotolack wodurch die optische Dichte hoch ist, wird das meiste Licht bereits auf dem Weg zum Brennpunkt absorbiert und eine dreidimensionale Belichtung ist nicht möglich.

Setzt man die Sensitivität des Fotolacks herab, indem man weniger Fotoinitiatormoleküle hinein mischt, kann der Lichtstrahl tiefer in den Lack eindringen. So kann man erreichen, dass der Großteil des Lichts im fokalen Volumen absorbiert wird. Verständlicherweise kommt es jedoch im kompletten Lichtkegel zur Absorption. Aber dies allein ist kein Indiz dafür, dass Licht nur im Fokus absorbiert wird. Die Lichtintensität im fokalen Volumen ist zwar am größten, schaut man sich jedoch jede einzelne z -Ebene an, so ist klar, dass in jeder Ebene parallel dazu die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wird. Verwendet man jedoch einen Fotolack der ein gewisses Schwellwert-Verhalten hat, wäre es prinzipiell möglich dreidimensionales Laserschreiben zu betreiben. Hier spielt jedoch das „Gedächtnis“ des Fotolacks eine Rolle. Würde man einen größeren Bereich mit dem Laser abrastern, würden immer mehr Photonen an Stellen die nicht belichtet werden sollen absorbiert werden und es käme zu einer unkontrollierten Polymerisation ober- und unterhalb des Brennpunkts. Aus diesem Grund ist es nicht möglich mittels 1PA dreidimensionale Mikrostrukturen herzustellen

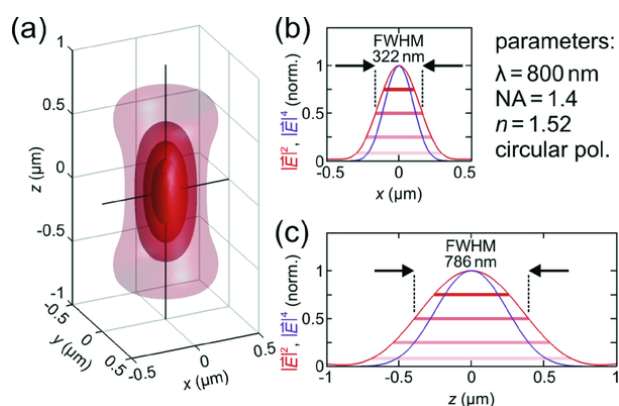


Abbildung 3.2: Berechnete fokale Intensitätsverteilung eines typischen Schreibvoxels. a) Intensitäts-Kontur-Plot. Der Intensitätsquerschnitt entlang der zwei schwarzen Linien ist in b) und c) zu sehen. b) Lateraler Querschnitt von $|\vec{E}|^2$ (rot) und $|\vec{E}|^4$ (blau) entsprechen der Ein-Photonenbelichtung beziehungsweise der Zwei-Photonenbelichtung. c) Axialer Querschnitt von $|\vec{E}|^2$ (rot) und $|\vec{E}|^4$ (blau). Die horizontalen Linien in b) und c) entsprechen den Intensitätswerten der Oberflächen in a). Abbildung aus [236].

oder zu funktionalisieren [236].

Im Gegensatz zur 1PA handelt es sich bei der Zwei-Photonenabsorption um einen nichtlinearen Prozess. Es müssen zwei Photonen nahezu gleichzeitig absorbiert werden, damit der Absorber in einen energetisch angeregten Zustand übergeht. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Prozess ist proportional zur Lichtintensität im Quadrat. Da die Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines ersten Photons proportional zur Intensität ist und im selben Augenblick die Wahrscheinlichkeit, dass auch ein zweites Photon an der selben Stelle absorbiert wird, auch proportional zur Intensität ist, ergibt sich daraus eine Proportionalität von I^2 für eine 2PA. Für eine reine 2PA ergibt sich

$$\frac{dI}{dz} = -\sigma_{2PA} \cdot N \cdot I(z)^2, \quad (3.3)$$

mit σ_{2PA} als Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt. Für die Wellenlänge des verwendeten Lasers ist der Fotolack durchsichtig ($\sigma_{1PA} \approx 0$) und somit kann man die lineare Absorption vernachlässigen und eine Ein-Photonenabsorption ist nicht möglich. Deshalb wird nur im Fokus des Lasers der Fotoinitiator aktiviert und es findet nur innerhalb des Voxels die Polymerisation statt. Außerhalb des Voxels ist wegen der Nichtlinearität die Wahrscheinlichkeit den Fotoinitiator anzuregen zu gering und deshalb findet hier keine Polymerisation statt.

Um die Intensitätsverteilung im Fokus des Lasers zu veranschaulichen sind in Abbildung 3.2 (a) Isointensitäten eines typischen Schreibvoxels dargestellt. Daran kann man erkennen, dass die Intensität sehr schnell nach außen abfällt. Wählt man nun eine geeignete Laserleistung dann ist die Intensität nur im Inneren des Fokus groß genug um den Fotolack zu polymerisieren. Würde man ein Objektiv mit kleinerer numerischer Apertur verwenden, würde das Aspektverhältnis von Voxelhöhe zu Voxelbreite noch größer werden und somit das Auflösungsvermögen verschlechtern.

3.1.1 Nanoscribe Photonic Professional

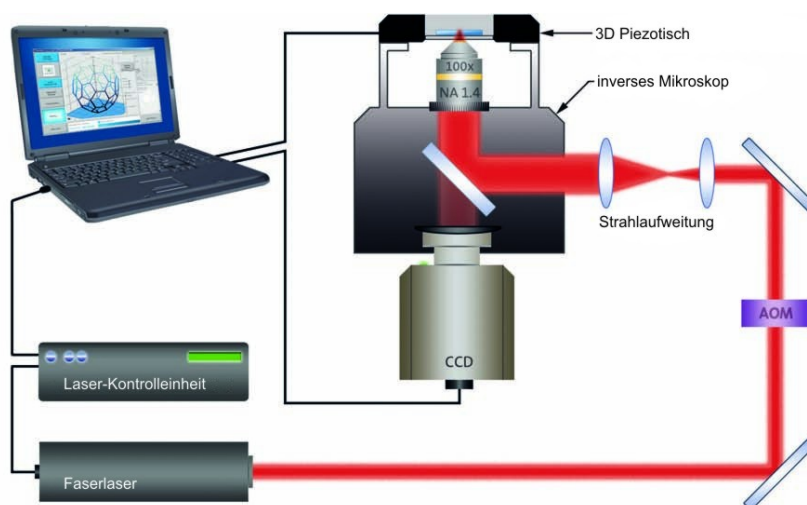


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des DLS-Systems von Nanoscribe. Abbildung nach [239].

Zur Herstellung von 3D Polymerstrukturen wurde das *Photonic Professional*-System der Firma Nanoscribe verwendet (siehe Abbildung 3.3). In diesem System ist ein frequenzverdoppelter, gepulster Faserlaser verbaut (Menlo Systems). Er hat eine Repetitionsrate von 100 MHz und eine Pulslänge von 150 fs. Die mittlere Wellenlänge beträgt 780 nm. Direkt hinter der Austrittsöffnung des Lasers befindet sich eine computergesteuerte mechanische Klappe (*Shutter*). So kann sicher gestellt werden, dass der Laserstrahl vollständig geblockt wird, wenn z. B. das Objektiv gewechselt wird. Anschließend durchläuft der Strahl einen akustooptischen Modulator (AOM), mit dem die Intensität auf einen gewünschten Wert abgeschwächt werden kann. Hinter dem AOM befindet sich ein Strahlteiler, der einen Großteil des Lichts reflektiert. Der transmittierte Anteil wird zur Überwachung der Intensität von einer Diode detektiert. Um die komplette NA des Objektivs auszunutzen und so den Strahl möglichst stark zu fokussieren, wird der reflektierte Strahl aufgeweitet, in ein inverses Mikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1) eingekoppelt und mit einem Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan-Apochromat 100×/1,40 Oil DIC M27) fokussiert. Die maximale Leistung vor dem Objektiv beträgt etwa 30 mW. Da der Strahldurchmesser größer ist als die Öffnung des Objektivs, geht auch hier Leistung verloren. Das Gerät wird so kalibriert, dass bei 100% Laserleistung eine Intensität von 20 mW in das Objektiv gelangt. Die übliche Leistung beim Direkten Laserschreiben beträgt ca. 10 - 20 mW. Diese variiert je nach verwendetem Fotolack und Schreibgeschwindigkeit.

Auf dem Probenhalter können bis zu zehn Deckgläser ($22\text{ mm} \times 22\text{ mm} \times 170\text{ }\mu\text{m}$) aufgebracht werden. Dieser wird an einem Piezotisch (PI P-563.3CD) befestigt. Der Stellweg des Piezos beträgt $300\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m}$, wobei die maximale Arbeitshöhe auf Grund des Arbeitsabstands des Objektivs auf ca. $80\text{ }\mu\text{m}$ begrenzt ist. Prinzipiell lässt sich diese Begrenzung mit der von Nanoscribe entwickelten *DipIn*-Technologie umgehen [230]. Die üblicherweise verwendete Schreibgeschwindigkeit beträgt ca. $200\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$. Der Piezo ist auf einer Bühne von Märzhäuser befestigt. Dadurch hat man auf der Probe einen großen Arbeitsbereich und kann so auch computergesteuert die verschiedenen Proben anfahren. Zudem kann der Schreibfortschritt

mit Hilfe einer CCD-Kamera beobachtet werden.

Das Nanoscribe-System bietet im Vergleich zu den anderen kommerziell erhältlichen Direkten Laserschreibsystemen einige Vorteile. Der größte Vorteil ist der Autofokus (*Interfacefinder*), der komplett in die Software implementiert ist. Die Grenzschicht zwischen Lack und Deckglas wird bestimmt und man setzt einen Wert fest, wie tief die Strukturen im Glas versenkt werden. Ein weiterer Vorteil ist die *Tilt Correction* (Kippwinkelausgleich). Die Software misst über den kompletten Stellweg des Piezos die Höhe der Grenzschichten und legt eine Ebene durch diese Messpunkte, während des Direkten Laserschreibens gleicht die Software die Verkippung automatisch anhand der virtuellen Ebene aus. Diese beiden Besonderheiten ermöglichen es, in Kombination mit der Bühne, voll automatisiert Proben herzustellen.

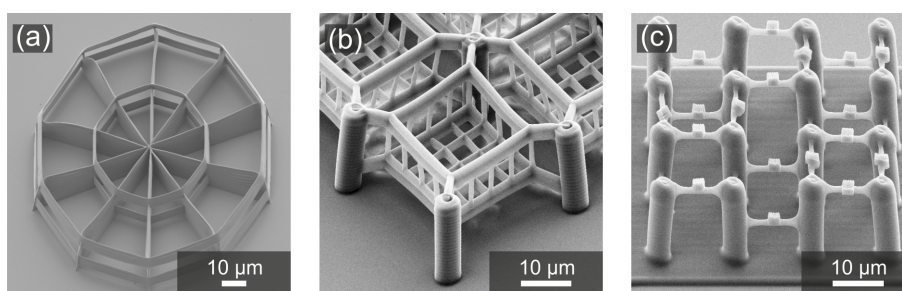


Abbildung 3.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Beispielstrukturen für Zellwachstumsstudien, die mittels DLS hergestellt wurden. a) Radstruktur, die zur Bestimmung von Zellvolumen in 3D Strukturen verwendet wird. Zur Herstellung wurde der PETA Fotolack verwendet (siehe Kapitel 3.2.3 und 4.1.2). b) Boxringe ausOrmocomp für die gezielte Einzelzellanalyse (siehe Kapitel 3.2.2 und 4.1.2). c) Zweikomponentenstruktur für kontrolliertes Zellwachstum. Das Grundgerüst besteht aus proteinabweisendem PEG-DA und wurde nachträglich mit kleinen Würfeln ausOrmocomp versehen (siehe Kapitel 3.2.4 und 4.1.3). Abbildungen aus [2].

Abbildung 3.4 zeigt Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen unterschiedlicher 3D Mikrostrukturen. Diese wurden aus verschiedenen Fotolacken hergestellt und sollen zeigen, welche komplexe, dreidimensionale Strukturen sich mit Hilfe der Zwei-Photonenabsorption herstellen lassen.

3.1.2 Lithographie Aufbau mit durchstimmbarer Wellenlänge

Da die meisten photoaktivierbaren Moleküle ihren Absorptionspeak im kurzwelligen Bereich des nahen UV-Lichts (UV-A, 315 - 380 nm) haben oder teilweise sogar ein Absorptionsmaximum im mittleren UV-Bereich haben (UV-B, 280 - 315 nm) ist es nicht möglich das kommerziell erhältliche *Photonic Professional*-System der Firma Nanoscribe für diesen Zwei-Photonen-Prozess zu verwenden. Es war von Anfang an nicht klar ob sich die photoaktivierbaren Moleküle mittels 2PA aktivieren lassen. Deshalb musste für diese Versuche ein selbst gebautes DLS-System mit durchstimmbarer Wellenlänge verwendet werden.

Abbildung 3.5 zeigt eine schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus. Spiegel, Wellenplättchen und Teleskope, die für das grundlegende Verständnis nötig sind, werden nicht dargestellt. Das Herzstück des Aufbaus ist ein gepulster Titan:Saphir (Ti:Sa) Oszillator (SpectraPhysics MaiTai HP), der mit einer Zentralwellenlänge von 820 nm betrieben wird.

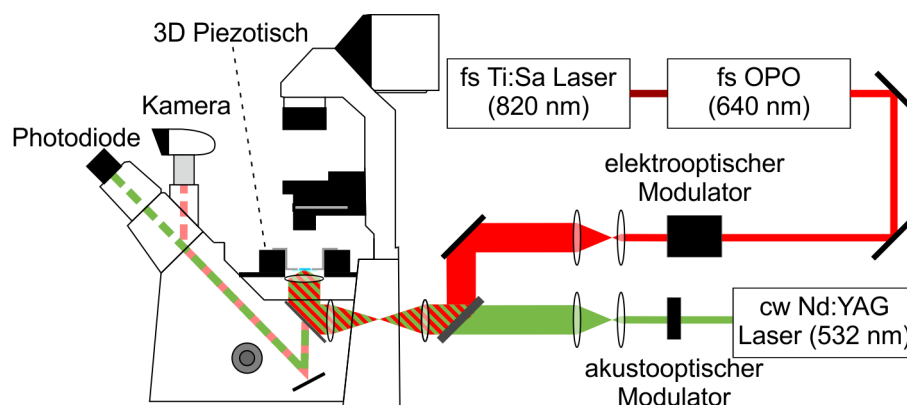


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau des DLS-Systems mit durchstimmbarer Wellenlänge. Der OPO ermöglicht den Wellenlängenbereich von 345 - 2500 nm durchzustimmen. In den späteren Versuchen wurde die Wellenlänge zwischen 600 nm und 700 nm variiert. Abbildung nach [240].

Mit diesem Ti:Sa wird ein optisch parametrischer Oszillator (OPO, Newport Inspire HF100) gepumpt. Der Ti:Sa Laser emittiert 100 fs Pulse mit einer Repetitionsrate von 80 MHz. Im OPO wird als erstes die zweite Harmonische des Pumpstrahls erzeugt. In den folgenden Experimenten wurde immer der Signal-Strahl des OPO verwendet, da sich so die Wellenlänge zwischen 490 nm und 750 nm variieren lässt. Die Repetitionsrate des OPO beträgt ebenfalls 80 MHz und die Pulse haben eine Länge von 200 fs. Der Signalausgang soll im Weiteren als Aktivierungslaser bezeichnet werden. Als erstes wird der Laserstrahl durch eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator abgeschwächt (nicht dargestellt). Die Feinjustage der Intensität geschieht mit Hilfe eines elektrooptischen Modulators (EOM, Linos LM 0202 P VIS KD*P). So lässt sich der Laserstrahl auch an- und ausschalten. Um eine optimale Modenqualität nach dem EOM zu erreichen, wird der Strahldurchmesser mittels Kepler-Teleskop vor dem AOM auf etwa 1 mm reduziert (nicht dargestellt). Um die Qualität der Mode ebenfalls nicht zu verschlechtern sollte die Laserintensität mit dem EOM nie zu stark abgeschwächt werden ($\geq 10\%$). Anschließend wird der Strahl so aufgeweitet, dass er einen größeren Durchmesser als die Objektivöffnung hat. Bevor der Strahl in den Hintereingang des Mikroskops (Leica DM-IRB) eingekoppelt wird, durchläuft er noch zwei Spiegel, mit denen man die laterale Fokusposition einstellen kann und einen Strahlteilerwürfel, der die Laserstrahlen des OPOs und Nd:YAGs (siehe unten) vereint.

Der Strahlteiler im Mikroskop wurde durch einen halbdurchlässigen Silberspiegel ersetzt. So werden alle verwendeten Wellenlängen zu circa 50% reflektiert. Schlussendlich wird das Laserlicht noch mit Hilfe eines $\lambda/4$ -Plättchens (B. Halle RAC 4.4.15L, 500-900 nm) zirkular polarisiert und durch ein Ölimmersionsobjektiv (Leica HCX PL APO 100 \times /1.4-0.7 OIL CS) auf die Probe fokussiert. Die Zirkulapolarisation dient dazu, dass der Voxel rotationssymmetrisch zur optischen Achse ist. Die später angegebenen Laserleistungen sind Durchschnittsleistungen und wurden an der Stelle des Objektivs gemessen. Dazu entfernt man das Objektiv und schraubt eine Blende mit dem gleichen Durchmesser wie das Objektiv (5,6 mm) in den Objektivrevolver. Demzufolge entspricht die gemessene Leistung der Leistung, die ins Objektiv gelangt. Laut Herstellerangabe transmittiert das Objektiv bei 532 nm etwa 86% und bei 640 nm etwa 80% des Lichts.

Zusätzlich zu dem eigentlichen Aktivierungslaser befindet sich im Aufbau noch ein grüner Dauerstrich-Laser (frequenzverdoppelter Nd:YAG, Spectra-Physics Millennia X) mit einer Wellenlänge von 532 nm. Dieser Laser dient jedoch nur dazu die Grenzfläche zwischen Glas und Lack bzw. Lösungsmittel zu finden. Genau wie der Aktivierungslaser wird auch dieser zusätzliche Strahl erst manuell abgeschwächt, im Durchmesser verkleinert und durchläuft dann einen akustooptischen Modulator (AA MQ110-A1.5-VIS-WLG). Anschließend wird er ins Mikroskop eingekoppelt und zirkular polarisiert. Man sollte dafür sorgen, dass beide Fokuse exakt übereinander liegen, weil sich sonst ein Versatz bei der Grenzflächenbestimmung ergibt. Zuerst werden beide Fokuse grob justiert, indem die beiden Strahlen mit Hilfe von Justierkärtchen und Lochblenden übereinander gelegt werden. Die Feinjustage geschieht softwaretechnisch. Dabei werden Goldpartikel mit einem Durchmesser von circa 100 nm durch den Fokus bewegt und das reflektierte Licht mit einer Photodiode konfokal detektiert.

Um die Probe über eine Kamera betrachten zu können befindet sich eine Licht-emittierende Diode (LED) mit einer Wellenlänge von 630 nm über dem Kondensator und dient als nicht erwärmende Lichtquelle. So erhält man ein hellfeldmikroskopisches Bild auf der Kamera (Leica DFC 350FX).

Das zu verwendende Deckglas wird auf einen Halter geklebt, der dann mit einem Piezotisch (Physik Instrumente P-527.3CL) verschraubt wird. Der Piezotisch hat einen Stellweg von $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ und ist auf einer Bühne (Märzhäuser Wetzlar, SCAN IM 120 x 100) befestigt. Der Verfahrweg der Bühne beträgt $120\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$. So kann man computergesteuert verschiedene Punkte auf der Probe anfahren und anschließend mit dem Piezo die gewünschte Trajektorie mit der gewünschten Laserleistung abfahren.

Der Aufbau wird von einem Computer und einer in Matlab und Labview programmierten Software angesteuert. Es werden analoge und digitale Ausgänge von National Instruments PCI-Karten verwendet (NI-6731 und NI-MIO-16XE-10). Der Piezo, der AOM und der EOM werden über ein analoges Spannungssignal betrieben. Die Kamera wird von einer dedizierten PCI-Karte ausgelesen. Die Beschreibung des Aufbaus wurde teilweise aus Referenz [241] übernommen.

3.2 Fotolacke und ihre Funktionsweise

Im folgenden Kapitel wird die Funktionsweise sowie die Vor- und Nachteile der verwendeten Fotolacke beschrieben. Als erstes wird der Mechanismus der radikalischen Polymerisation näher betrachtet, da es sich hierbei um den am häufigsten vorkommenden Mechanismus beim DLS handelt. Anschließend werden die verwendeten Fotolacke genauer beschrieben. Dabei handelt es sich um Ormocomp, einen kommerziell erhältlicher Fotolack der Firma Micro Resist Technology GmbH sowie weiteren selbst hergestellten Fotolacke. Diese enthalten Monomere mit reaktiven Acrylgruppen¹ und einen Fotoinitiator. Wird diese Suspension nun mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, polymerisiert sie und man erhält ein Polyacrylat. Zudem werden einige Verbesserungen in der Herstellung der Strukturen für die Zellversuche eingeführt. So konnte sowohl die Qualität als auch die Reproduzierbarkeit deutlich gesteigert werden. Als letztes wird noch ein anderer Polymerisationsprozess und der daraus resultierende Fotolack vorgestellt. Hierfür wird die Reaktion von Thiolen mit Alkenen ausgenutzt.

3.2.1 Radikalische Polymerisation

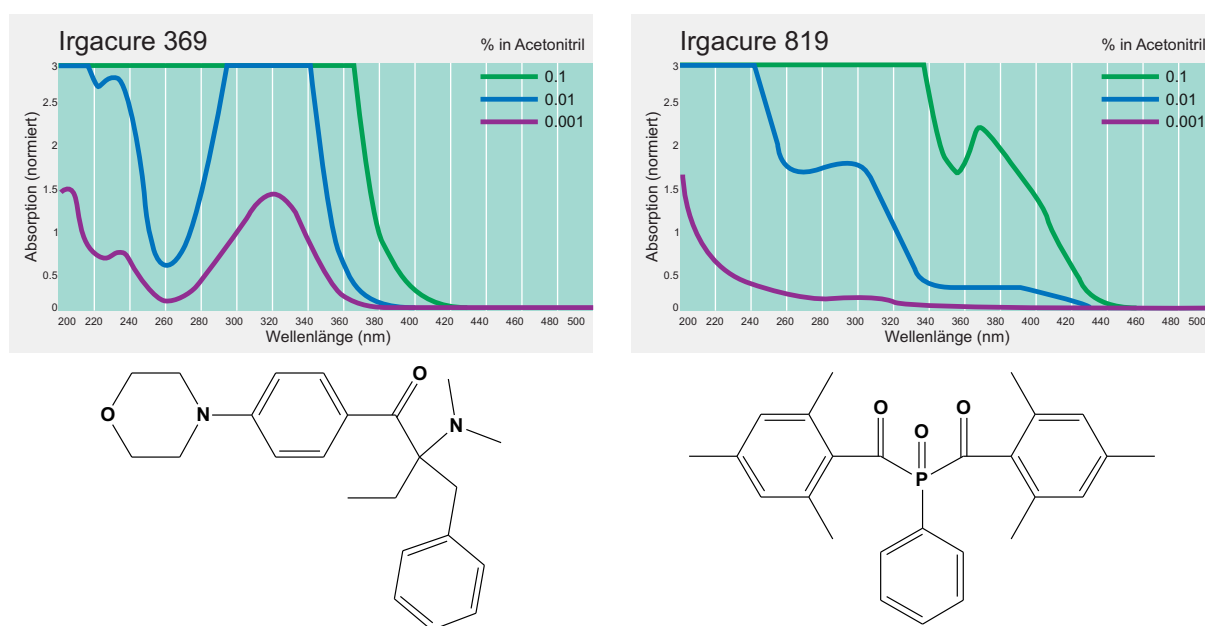


Abbildung 3.6: Absorptionsspektren unterschiedlicher Konzentrationen der Fotoinitiatoren Irgacure 369 und 819 in Acetonitril. Darunter befinden sich die jeweiligen Molekülstrukturen. Abbildung nach [242].

Die Radikalpolymerisation ist eine Kettenpolymerisation, die im richtigen Zusammenhang oft auch nur als Polymerisation bezeichnet wird. Dabei werden Bausteine, die sogenannten Monomere, chemisch miteinander verkettet und so der Polymerisationsgrad² erhöht. Die verketteten Monomere werden als Polymer bezeichnet. Besitzt ein Monomer nur eine funktionelle Gruppe, bilden sich nur lange Polymerketten. Um eine Quervernetzung der

¹ Acrylate zählen zu den Alkenen, dabei handelt es sich um eine organische Verbindung die an einer beliebigen Stelle mindestens eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung besitzt.

² Als Polymerisationsgrad bezeichnet man die Anzahl der Monomereinheiten pro Polymermolekül.

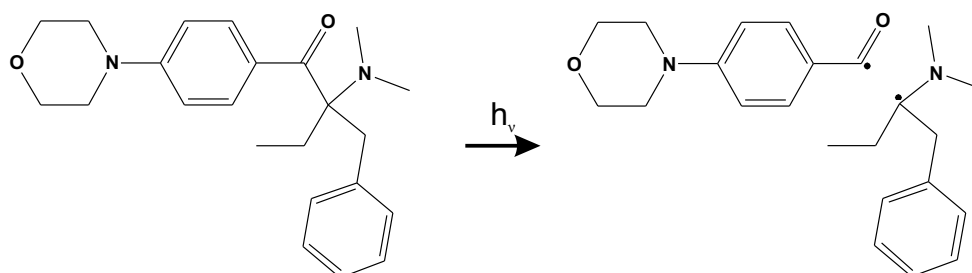


Abbildung 3.7: Vereinfachte Darstellung der Radikalaufspaltung von Irgacure 369.

Monomere zu erreichen müssen diese mindestens bifunktionell sein. In den meisten Fällen kann man sagen, dass weniger stark quervernetzte Polymere der selben Art weicher sind, wohingegen Polymere mit einem hohen Vernetzungsgrad härter sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt für biologische Anwendungen ist, dass schwach vernetzte hydrophile Polymere auch eher anschwellen wenn man sie in eine wässrige Lösung (z.B. Zellkulturmedium) legt. Zum Starten einer Polymerisation ist ein Initiator nötig. Es gibt thermische Initiatoren und Photoinitiatoren. Bei Letzteren handelt es sich um Initiatoren, die durch Licht aktiviert werden. Deshalb werden in dieser Arbeit ausschließlich Photoinitiatoren verwendet.

Die meisten Monomere werden beim Direkten Laserschreiben über eine radikalische Polymerisation miteinander verknüpft. Um eine radikalische Polymerisation zu starten, benötigt man einen Radikalinitiator (I). Dieser wird über einen fotochemischen Vorgang in Radikale aufgespalten, die sich zusammen mit den Monomeren (M) zu Monomerradikalen ($P_1\bullet$) verbinden.



Ein solches Monomerradikal reagiert mit weiteren Monomeren zu einem Polymerradikal ($P\bullet$), welches mit weiteren Monomeren reagiert. Treffen jedoch zwei Polymerradikale aufeinander kommt es zur Termination (Abbruchreaktion) und die Polymerisation wird gestoppt. Die Polymerisation kann auch abgebrochen werden, wenn ein Polymerradikal auf ein Monomerradikal oder ein Initiatorradikal trifft [243].



Den Monomeren werden Hemmsubstanzen (Inhibitor, Quencher) beigemischt, um die Lagerstabilität zu erhöhen. Die in dieser Arbeit verwendeten Monomere enthalten den Inhibitor 4-Methoxyphenol. Sollte in dem Monomer ein Radikal entstehen, dann wird eine Polymerisation meist durch einen solchen Quencher aufgehalten, indem reaktionsträge Radikale gebildet werden. Diese reaktionsträgen Radikale können keine weitere Polymerisation auslösen [243]. Für die Anwendung des Direkten Laserschreibens hat der Inhibitor im Monomer noch einen weiteren Vorteil: Er stoppt die Polymerisation sobald Radikale aus dem Laserfokus hinausdiffundieren, sodass sich der Voxel bzw. die geschriebene Linie nicht weiter ausbreitet. Dieser Prozess des Nachpolymerisierens konnte mit Hilfe einer CCD-Kamera

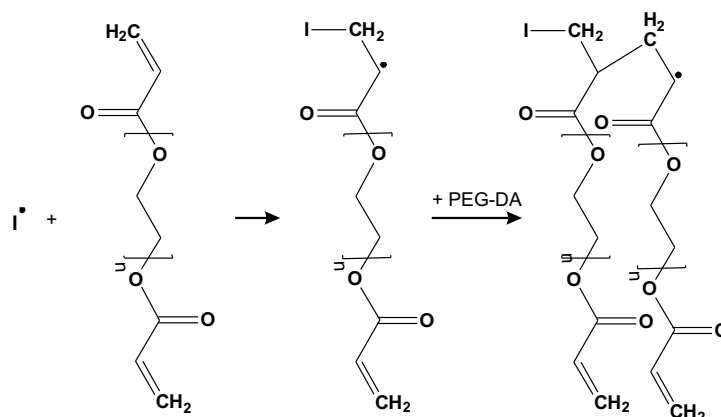


Abbildung 3.8: Schematischer Ablauf der photoinitierten, radikalischen Polymerisationsreaktion am Beispiel von Polyethylenglykoldiacrylat. Ein Initiatorradikal trifft auf die Acrylatgruppe des Polymers, wodurch ein Monomerradikal entsteht. Dieses Monomerradikal kann sich mit anderen Monomeren verketten und lange Polymerketten bilden.

beobachtet werden, als mit quencherfreiem Monomer geschrieben wurde (nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass man unter Sauerstoffatmosphäre beim Direkten Laserschreiben eine höhere Schwellleistung benötigt [244]. Daraus lässt sich schließen, dass Fotolacke und Monomere auch den natürlichen Inhibitor Sauerstoff enthalten und es ratsam ist, diese nicht unter reiner Stickstoffatmosphäre aufzubewahren oder zu verwenden.

Die selbst hergestellten Fotolacke enthalten als Initiator den kommerziell erhältlichen Fotoinitiator Irgacure 369, 379³ oder 819 von BASF (früher Ciba Chemicals). Diese Initiatoren eignen sich aufgrund ihrer Eigenschaften hervorragend für das DLS. Das liegt zum einen daran, dass die Absorptionsspektren (siehe Abbildung 3.6) knapp über die halbe Wellenlänge des Lasers reichen, weshalb sich die oben genannten Irgacure Initiatoren in unserem Fall für die Zwei-Photonenabsorption eignen. Ein weiterer Grund ist die hohe Quanteneffizienz⁴. Irgacure 369 besteht aus dem Molekül 2-Benzyl-2-dimethylamino-1-(4-morpholino phenyl)-butanon-1 und Irgacure 819 besteht aus dem Molekül Bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphinoxid. Treffen Photonen mit einer bestimmten Mindestenergie auf dieses Molekül, so wird es angeregt und zerfällt in zwei Radikale. Dabei wird in den meisten Fällen eine C-C-Einfachbindung aufgebrochen (siehe Abbildung 3.7 für die Radikalaufspaltung am Beispiel von Irgacure 369). Die freien Radikale greifen nun an der CH_2 -Gruppe des Acrylats an und generieren so das Monomerradikal [245]. Dieses Monomerradikal kann weitere Kettenwachstumsreaktionen durchführen. In Abbildung 3.8 wird schematisch gezeigt wie die Kettenwachstumsreaktion von Polyethylenglykoldiacrylat an einer der beiden Acrylatgruppen abläuft. Besitzt das Monomer nur eine funktionelle Acrylat-Gruppe, so bilden sich lange, unverzweigte Polymerketten. Sobald das Monomer mehrere funktionelle Acrylat-Gruppen besitzt, kommt es zu einer Quervernetzung der Monomere und die Polymere werden unter anderem mechanisch stabiler.

³Irgacure 369 und 379 sind nahezu identisch. Sie unterscheiden sich nur in der Position der Dimethylamino- und Benzylgruppe. Diese wurden einfach vertauscht. Deshalb sind die Absorptionsspektren sehr ähnlich und werden nicht gesondert gezeigt.

⁴Die Quanteneffizienz gibt ein Verhältnis aus absorbierten Photonen und der Anzahl der daraus folgenden Reaktionen an.

3.2.2 Ormocomp

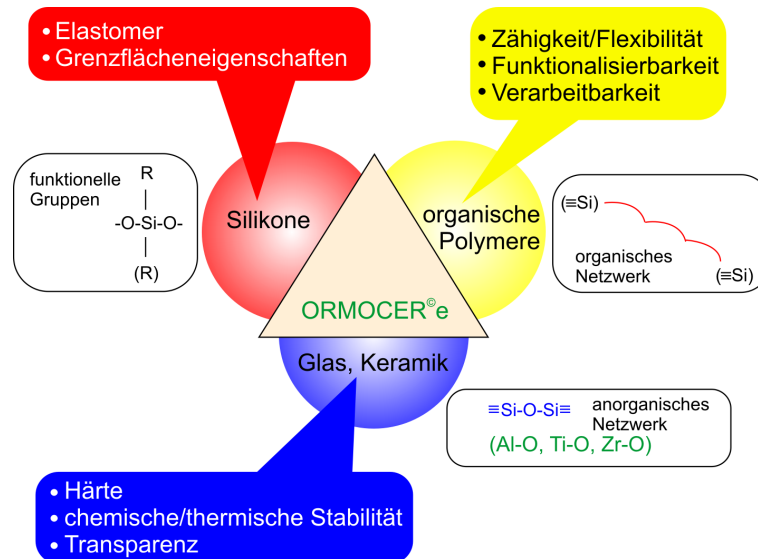


Abbildung 3.9: Zusammensetzung und Eigenschaften von Ormoceren. Abbildung aus [246].

Sowohl in der Diplomarbeit von Joachim Fischer als auch in mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass sich aus Ormocomp (Micro Resist Technology GmbH) dreidimensionale Mikrostrukturen herstellen lassen, die man mit EZM-Proteinen funktionalisieren kann [247, 5, 186]. Die ersten dreidimensionalen Strukturen aus Ormocer wurden bereits 2003 von einer Arbeitsgruppe am Laser Zentrum Hannover hergestellt [248].

Ormocomp gehört zur Familie der Ormocere, die vom Fraunhofer Institut für Silikatforschung in Würzburg entwickelt wurden. Das Akronym Ormocer steht für **OR**ganically **MO**dified **CER**amics. Es ist also ein anorganisch-organisches Hybridpolymer, das die Eigenschaften von Silikonen, Keramiken und Polymeren vereint. Ursprünglich wurden die Ormocere zur Konservierung und Verklebung historischer Gläser entwickelt. Mittlerweile weisen sie ein breites Anwendungsspektrum auf. Dazu zählt die Herstellung von dentalen Werkstoffen, Folien und Fasern. Des Weiteren werden sie auch in der Optik eingesetzt.

Ormocere setzen sich aus verschiedenen Strukturelementen zusammen, welche die resultierenden Struktureigenschaften beeinflussen. So wirkt sich z.B. die relative Anzahl von funktionellen Gruppen auf die Härte und Polarität des polymerisierten Lackes aus. Die Art und Anzahl der Heteroatome (Al, Ti, Zr) in der anorganischen Struktureinheit wirkt sich eher auf die Brechzahl aus. Das anorganische Silikatnetzwerk und die organische Quervernetzung wirken sich auf die thermische Verformbarkeit aus (siehe auch Abbildung 3.9).

Da Ormocomp keine Lösungsmittel enthält, die vor dem Belichten noch ausgebacken werden müssten, kann einfach ein Tropfen auf das Deckglas gegeben und mit dem Direkten Laserschreiben begonnen werden. Nach der Belichtung des Lackes werden die nicht belichteten Monomere mit einer 1:1 Mischung aus Methylisobutylketon (MIBK) und Isopropanol gelöst und vom Deckglas gespült. Da der Brechungsindex von Ormocomp ($n = 1,518$) an den von einem Deckglas ($n = 1,5255$) angepasst ist, mussten anfangs die Deckgläser mit einer ca. 5 nm

dicken Schicht Titandioxid überzogen werden. Dies geschah mittels Atomlagenabscheidung⁵. Die verwendete Anlage ist von Cambridge NanoTech und wird von Andreas Frölich und Tobias Frenzel betreut. Dieser Prozessschritt wurde wegen einer Verbesserung des *Interfacefinders* in der Nanoscribe-Software überflüssig.

3.2.3 Pentaerythritoltriacrylat/-tetraacrylat (PETA/PETTA)

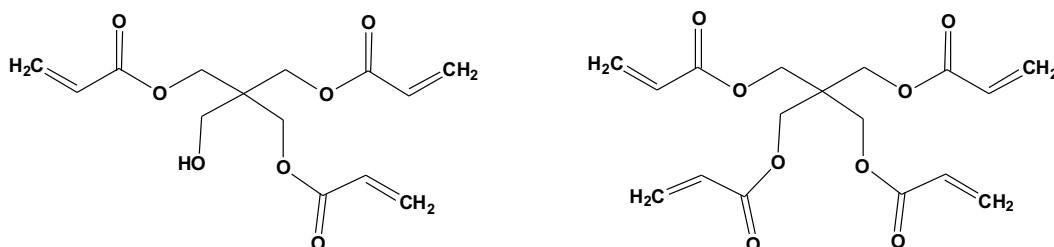


Abbildung 3.10: Strukturformel von Pentaerythritoltriacrylat (links) und -tetraacrylat (rechts).

Häufig besteht das Interesse Strukturen mit hoher Festigkeit herzustellen, beziehungsweise der Fotolack muss eine hohe Festigkeit aufweisen, damit bestimmte Strukturen realisiert werden können. Wie in Kapitel 3.2.1 schon erwähnt ist der Vernetzungsgrad ein Indikator für stabile Polymere. In unserer Arbeitsgruppe werden seit Jahren die Monomere Pentaerythritoltriacrylat (PETA) oder Pentaerythritoltetraacrylat (PETTA) verwendet (beide von Sigma Aldrich, siehe Abbildung 3.10) [236]. Beide Monomere eignen sich aufgrund der drei beziehungsweise vier Acrylat-Gruppen hervorragend um hochfeste Polymere herzustellen. Sie weisen eine hohe Viskosität auf, weshalb bereits geschriebene, freistehende Bereiche nicht so schnell ihre Position durch Diffusion verlassen. Es lassen sich dennoch verschiedene Fotoinitiatoren gut darin lösen und man benötigt kein Lösungsmittel. Man sollte möglichst immer Lacke ohne Lösungsmittel verwenden, da sich sonst die Schreibeigenschaften während des DLS durch verdunsten des Lösungsmittels ändern können. Zudem kann man Fotolacke ohne Lösungsmittel auch für das sogenannte *Dip-in*-Verfahren⁶ [230] verwenden, da einige Lösungsmittel das Objektiv beschädigen.

Ein häufig verwendetes Einsatzgebiet von PETA in unserer Arbeitsgruppe ist die hochauflösende Lithographie (auch: STED⁷ inspiriertes Direktes Laserschreiben). Da hier nur sehr feine Strukturen hergestellt werden, ist ein stabiles Polymer essentiell.

⁵Der gebräuchlichere Name ist *atomic layer deposition* (ALD). Mit diesem Verfahren ist es möglich atomare Schichten eines gewünschten Atoms oder Moleküls an der Oberfläche eines nahezu beliebigen Stoffes abzuscheiden.

⁶Beim *Dip-in*-DLS wird nicht in der normalerweise üblichen Konfiguration (Objektiv, Immersionsöl, Deckglas, Fotolack) geschrieben, sondern das Immersionsöl wird durch den Fotolack ersetzt. So wird der Laserstrahl direkt durch den Fotolack auf die Deckglasunterseite fokussiert. Dadurch ist die Strukturhöhe nicht mehr durch Arbeitsabstand des Objektivs beschränkt. Und da der Fotolack durch eine 2PA polymerisiert wird, läuft man nicht Gefahr, den Fotolack an der Objektivlinse zu polymerisieren, wodurch das Objektiv unbrauchbar wird.

⁷STED steht für *stimulated emission depletion*. STED wurde ursprünglich für die Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Es ermöglicht einem, durch gezieltes Umschalten von Molekülzuständen, eine Auflösung unterhalb des Beugungslimits zu erreichen. Stefan Hell hat diese Mikroskopie-Methode theoretisch vorhergesagt und auch experimentell bewiesen [249, 250]. Joachim Fischer nutzt diese Methode für hochauflösende Lithographie [212].

Die mechanischen Eigenschaften von PETTA sind mit denen von SU-8 vergleichbar ($E = 2\text{--}5$ GPa) [251, 252, 253], jedoch ist der Umgang mit PETA benutzerfreundlicher als der mit SU-8. Da SU-8 Lösungsmittel enthält muss er aufgeschleudert und anschließend gebacken werden. Nach dem Belichten ist ein weiterer Backschritt zur Quervernetzung nötig. Ein weiterer Vorteil von PETA gegenüber SU-8 ist, dass es auf dem Glassubstrat besser haftet, wenn dieses vorher silanisiert wurde. Zudem kann man mit PETA 3D Mikrostrukturen auf dünnen und porösen Polymerfolien herstellen und so das Verhalten von Zellen auf spezielle Botenstoffe erforschen [6].

3.2.4 Polyethylenglykoldiacrylat (PEG-DA)

Polyethylenglykol wird schon seit einigen Jahren in der Zellbiologie verwendet. Bei Molekularmassen ab 500 Da ist PEG schon zähflüssig und wird ab einer Molekularmasse von 1500 Da bei Raumtemperatur fest. Das pulverförmige, feste PEG mischt man mit einem flüssigen PEG um daraus Gele herzustellen, auf denen Zellen kultiviert werden können. Diese Gele sind wasserlöslich, wobei sich Polyethylenglykol selbst in festem Zustand noch in Wasser lösen lässt.

Zudem ist PEG hygroskopisch wodurch ein Anschwellen von PEG-Gelelen in Wasser beobachtet werden kann. Durch radikalische Polymerisation ist es ebenfalls möglich Gele aus PEG herzustellen. Meistens verwendet man Polyethylenglykoldiacrylat (PEG-DA, siehe auch Abbildung 3.8) als Monomer [254]. Die Proteinadsorption und die Zelladhäsion ist auf diesen Hydrogelen im Vergleich zu anderen Materialien wesentlich reduziert [255][256]. Das ist ein erster Hinweis dafür, dass man aus PEG-DA dreidimensionale Strukturen herstellen könnte, die proteinabweisend sind und somit als antiadhäsive Basis dienen könnten. In den ersten Experimenten wurden dreidimensionale Strukturen in PEG-DA-Hydrogelen hergestellt, indem man eine fotoaktivierbare Lösung in das Gel diffundieren ließ und dann bestimmte Bereiche mit Hilfe eines Lasers polymerisierte. Das Elastizitätsmodul verdoppelte sich an diesen Stellen, weil die Quervernetzung dort erhöht wurde [257]. Leider gehen die Angaben für das Elastizitätsmodul weit auseinander. Hahn *et al.* geben ein Wert zwischen 3 kPa und 8 kPa an [257]. Nemir *et al.* bestimmt das Elastizitätsmodul auf fast 300 kPa [258] und Brey *et al.* sogar auf 2 MPa [259]. Diese großen Unterschiede hängen zum einen von den unterschiedlich langen PEG-DA Monomeren ab, andererseits spielt die hygroskopische Eigenschaft von PEG auch eine große Rolle. So sinkt das Elastizitätsmodul mit steigender Wasseraufnahme. Um unterschiedlich weiche Gele herzustellen, kann man auch die hydrophile Eigenschaft von PEG nutzen und es schon vor dem Belichten in verschiedenen Konzentrationen mit Wasser mischen. Polyethylenglykol ist viel weicher als Ormocomp, das ein Elastizitätsmodul von 800 MPa aufweist [5].

Bereits 2003 wurde ein PEG-DA mit einer molaren Masse von 575 Da verwendet um Kompartimente mittels UV Lithographie herzustellen, in denen Zellen gezielt kultiviert werden konnten [260, 261]. Als Photoinitiator wurde 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon verwendet.

Die ersten freistehenden, dreidimensionalen Strukturen aus PEG-DA stellten Ovsianikov *et al.* her [262], welche relativ groß (Gitterkonstante: ca. 400 μm) waren. Sehr viel kleinere Strukturen, die für Einzelexperimente geeignet sind, wurden von Lasagni *et al.* zum ersten mal

hergestellt [263]. Dabei handelt es sich um Säulen mit einem Durchmesser von 1 μm .

Wir nehmen an, dass PEG-DA gut geeignet ist, um dreidimensionale Strukturen herzustellen, die protein- und zellabweisend sind. Wegen seiner für uns geeigneten Eigenschaften wird Irgacure 369 als Fotoinitiator verwendet. Um den Fotolack herzustellen, gibt man 3 gew.% Irgacure 369 zu dem Monomer PEG-DA ($M \approx 700 \text{ g mol}^{-1}$ oder 575 g mol^{-1} , Sigma Aldrich) und stellt es für eine Stunde ins Ultraschallbad, um eine homogene Mischung zu erhalten. Das restliche Monomer wird nach der Herstellung der Strukturen in Isopropanol gelöst und abgespült.

Bereits in meiner Diplomarbeit beschäftigte ich mich mit Fotolacken auf PEG Basis. Es wurde relativ schnell ersichtlich, dass ein Fotolack, der nur aus PEG-DA besteht, ungewollte Eigenschaften besitzt. Polythylenglykol ist ein hydrophiles Molekül. Das hat zum einen den Vorteil, dass, wie oben bereits erwähnt, Zellen und Proteine nicht daran haften. Jedoch hat es den Nachteil, dass ein Polymer, hergestellt aus PEG, aufgrund seiner Hydrophilität Wassermoleküle einlagert, was ein Anschwellen zur Folge hat. Um dies zu unterbinden, muss man für eine höhere Quervernetzung im Polymer sorgen. Deshalb war die Idee ein zweites Monomer mit möglichst vielen Acrylat-Gruppen in den zellabweisenden Lack zu mischen. Wie in Kapitel 3.2.3 bereits beschrieben wird in unserer Arbeitsgruppe das Monomer Pentaerythritoltetraacrylat (PETTA) verwendet, um möglichst kleine und stabile Strukturen herzustellen. Es besitzt vier Acrylat-Gruppen und würde sich deshalb gut als zusätzlicher Quervernetzer eignen.

Aus dieser Kombination wurden bereits Gele und 2,5D-Strukturen hergestellt. Mellott *et al.* [264] untersuchten, wie sich Hydrogele in Wasser verhalten, die aus PEG575 und Pentaerythritoltriacylat hergestellt wurden. Sie fanden heraus, dass der Volumenzuwachs bei einem Mischungsverhältnis von 10:2 um ca. 50% reduziert ist, im Vergleich zu reinen PEG-Gelen. Tsutsui *et al.* [265] stellten 2,5D-Strukturen her. Als erstes untersuchten sie, wie sich die Zugabe von PETA das Ablösen der Strukturen in PBS von der mit 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan funktionalisierten Glasoberfläche auswirkt. Sie konnten die Haltbarkeit von nicht einmal einem Tag auf 30 Tage steigern, indem sie einen Fotolack bestehend aus PEG575, 20 gew.% PETTA und 20 vol.% Wasser herstellten. Dann kultivierten sie HeLa-Zellen⁸ in diesen Mikrovertiefungen. Selbst nach 6 Tagen waren die Strukturen noch intakt und die Zellen blieben in den Vertiefungen. Außerdem fanden Brey *et al.* [259] heraus, dass sich der Elastizitätsmodul verdoppelt, wenn man 10 gew.% Pentaerythritoltriacylat zu PEG575 mischt und Gele daraus herstellt. Und zudem, dass die passivierenden Eigenschaften, im Vergleich zu reinem PEG575-Gelen, teilweise erhalten blieben. Daraus lässt sich schließen, dass ein Fotolack aus PEG575 und geringen Mengen PETTA sich für unsere Zwecke eignen könnte.

Da sich diese Änderungen am Fotolack auch auf die Proteinadsorption auswirken kann, musste dies noch untersucht werden. Hierzu wurden zweidimensionale Teststrukturen aus den jeweiligen Fotolacken hergestellt. Diese sind $240 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$ groß. Im Inneren befinden sich vier äquidistante, $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ große Freiräume. Diese Freiräume werden in einem zweiten DLS-Schritt mit Ormocomp bedeckt (siehe Abbildung 3.11). Um eine statistische Aussage

⁸HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen.

über die Fibronectin- und Zelladhäsion machen zu können, wurden auf jedes Deckglas 16 dieser Felder leicht überlappend geschrieben.

Für die folgenden Experimente wurden primäre Hühnerfibroblasten verwendet, da primäre Fibroblasten größer als die meisten Zellen von Zelllinien sind und sich daher besser für die späteren 3D-Strukturen eignen. Zudem besitzen sie eine hohe Motilität und wachsen aufgrund ihrer eigentlichen Lokalisierung sehr gut in den 3D Polymerstrukturen. Deshalb wird auch die statistische Auswertung der Fibronectin- und Paxillinbedeckung schon mit diesem Zelltyp durchgeführt.

Nach dem Fixieren und der Immunfärbung der Zellen wurden von den Substraten LSM-Bilder aufgenommen. Die Übersichtsbilder wurden mit einem $10\times$ Luftobjektiv und die $240\ \mu\text{m} \times 240\ \mu\text{m}$ großen Felder wurden mit einem $40\times$ Wasserobjektiv gemacht. Es wurden vier Fluoreszenzkanäle (Zellkern-DAPI, Aktin-Alexa488, Fibronectin-Cy3, Paxillin-Cy5) und das Durchlichtbild aufgenommen. Anschließend wurde eine Maximalprojektion⁹ aller Bildstapel gemacht und die einzelnen Kanäle wurden zusätzlich als Graustufenbilder abgespeichert. Der Helligkeitswert der einzelnen Pixel gibt Aufschluss darüber, ob und wie stark das Protein an dieser Stelle adsorbiert wurde. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm Metamorph (Molecular Devices).

An zellfreien Stellen wird die durchschnittliche Fibronectinintensität der Fotolacke auf PEG-Basis und von Ormocomp gemessen. Aus den daraus resultierenden Mittelwerten bildet man den Quotient von PEG-DA/PETTA zu Ormocomp. Um eine einheitliche Form zu erhalten, normiert man das Verhältnis PETA/Ormocomp auf eins und gleicht die anderen Verhältnisse dementsprechend an (siehe Abbildung 3.11 a)).

Um die Paxillinbedeckung zu messen, wurde ein Schwellwert für die Pixelhelligkeit eingestellt, ab dem ein bestimmter Pixel als Zellkontaktfläche gewertet wird. Da man die Zellkonzentration auf den Substraten nicht genau kontrollieren kann, bildet man den Quotienten aus der mit Paxillin bedeckten Fläche und der Gesamtfläche für die verschiedenen Lacke. Anschließend bildet man den Quotienten aus dem gemittelten Verhältnis von Paxillinbedeckung pro Lackfläche auf PEG-Basis und der gemittelten Paxillinbedeckung pro Ormocompfläche (siehe Abbildung 3.11 (b)). Mit dem $40\times$ Wasserobjektiv konnten Felder der Größe $240\ \mu\text{m} \times 240\ \mu\text{m}$ aufgenommen werden. Zur Auswertung wurde immer die gesamte Fläche verwendet. Deshalb kann es vorkommen, dass es kontaktfreie Stellen gibt, wodurch der große Fehlerbalken bei der Paxillinbedeckung entsteht.

Wie zu erwarten war, korreliert die Paxillinbedeckung und somit die der Zellkontakte auf den Lacken mit der Fibronectinbedeckung der Lacke.

Die proteinabweisenden Eigenschaften sind für das reine PEG-DA und das PEG-DA mit 4,8 gew.% PETTA am besten. Zudem sind kaum Zellkontakte auf den flachen Strukturen aus diesen Lacken zu finden. Ab einer Zugabe von 9,1 gew.% PETTA zu PEG-DA adsorbiert der Lack deutlich mehr Fibronectin und auch die Zellen bilden vermehrt Zell/Matrix-Kontakte auf den 2D-Strukturen aus. Der Lack mit 33,3 gew.% PETTA folgt dem Trend, dass die

⁹Bei einer Maximalprojektion wird an jeder Stelle der jeweils hellste Pixel der übereinanderliegenden Bilderstapel verwendet.

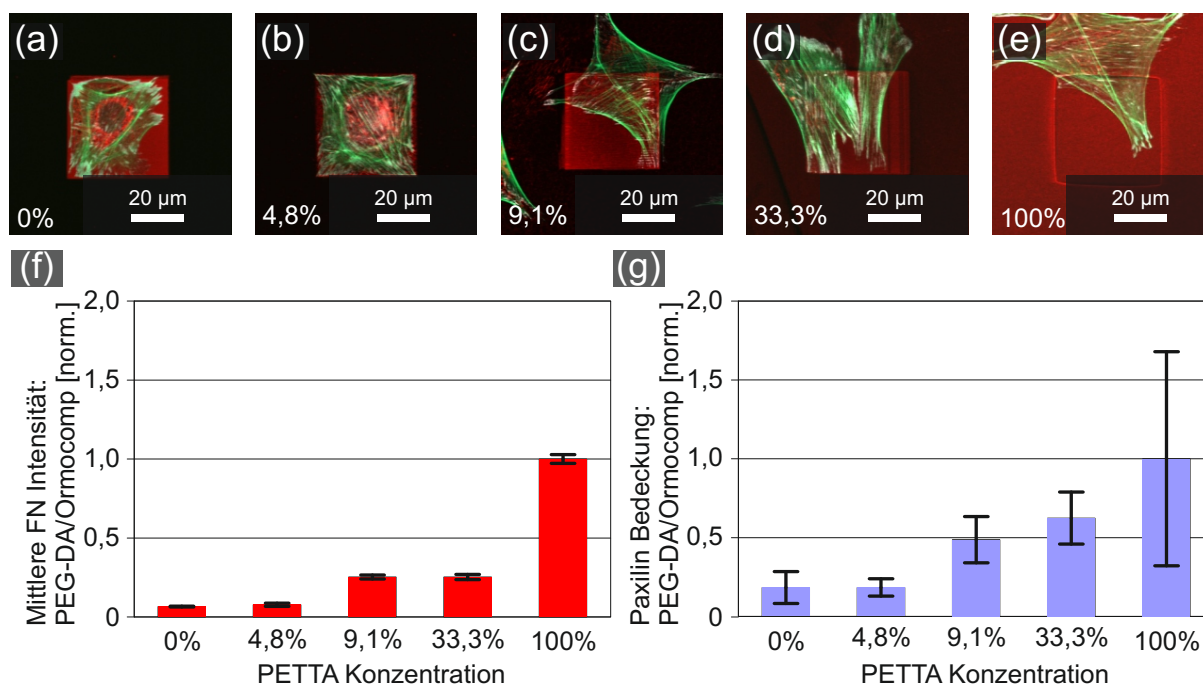


Abbildung 3.11: (a)-(e): Fluoreszenzaufnahmen von $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ großen Feldern aus Ormocomp, die von den unterschiedlichen Fotolacken (Anteil von PETTA in % angegeben) umgeben sind und auf denen Fibroblasten kultiviert wurden. Aktin (grün), Fibronectin (rot), Paxillin (weiß). (f): Durchschnittsintensität von Fibronectin. (g): Paxillinbedeckung auf den 2D-Strukturen. Der Quotient aus PETTA und Ormocomp wurde jeweils auf eins normiert und die anderen Quotienten wurden angeglichen. Abbildung nach [266].

Paxillinbedeckung mit der Zunahme von PETTA im Lack korreliert. Die Fibronectinadsorption von PETTA, Ormocomp und Glas (nicht gezeigt) ist fast gleich, demnach wachsen Zellen auf allen drei Materialien gleich gut und bilden auch auf allen Zell/Matrix-Kontakte. PETTA eignet sich deshalb auch, um harte 3D-Strukturen für Zellexperimente herzustellen [266].

3.2.5 Thiol-En-Fotolack

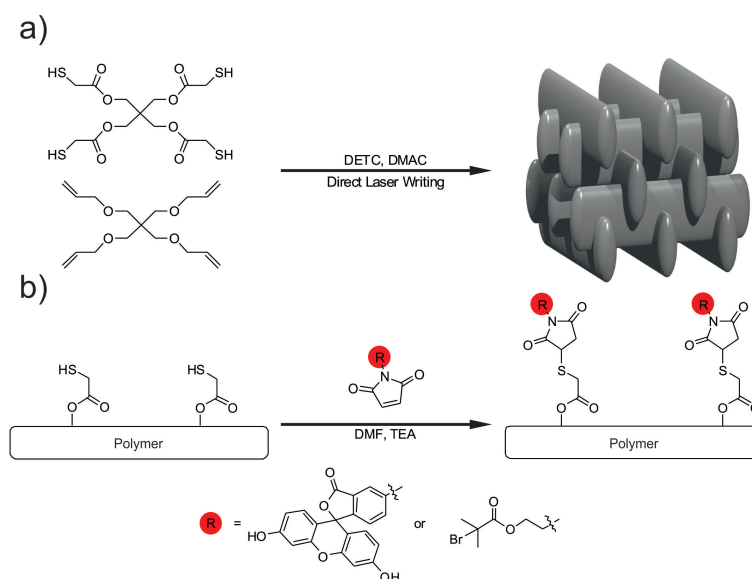


Abbildung 3.12: a) Schematische Darstellung der radikalischen Thiol-En-Polymerisation während des Direkten Laserschreibens und einer daraus resultierenden *Woodpile*-Struktur. b) Funktionalisierung der Strukturoberfläche über die freie Thiolgruppe mittels Michael-Addition. Abbildung aus [267].

Der hier vorgestellte Thiol-En-Fotolack wurde von Alexander Quick entwickelt und für die späteren Versuche bereitgestellt [267]. Wie oben bereits geschrieben wurde, basiert die Polymerisation bei Acrylatfotolacken auf radikalisches Kettenwachstum. In diesem Kapitel wird ein Fotolack vorgestellt, dessen Polymerisation auf einer radikalischen Thiol-En-Reaktion an elektronenreichen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen basiert [267, 268].

Die Namensgebung dieses Reaktionstyps stammt von den beteiligten Molekülen ab. Zum einen ist eine Thiol-Gruppe (-SH), zum anderen ein Alken an der Polymerisation beteiligt. Die Reaktion der beiden Edukte miteinander läuft sehr effizient ab und wurde das erste mal 1905 erwähnt [269].

Bei der Thiol-En-Reaktion handelt es sich im klassischen Sinn um eine Klick-Reaktion die alle Charakteristika erfüllt: quantitative Ausbeute, geringe Konzentration unproblematischer Katalysatoren, hohe Reaktionsgeschwindigkeit, umweltschonende Lösungsmittel, keine Aufbereitung, unempfindlich gegen Luft und Wasser [268]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist zu erwarten, dass sich die Thiol-Klickreaktion hervorragend dazu eignet, Polymere für biologische Anwendungen herzustellen.

Bereits 2004 wurden Polymerfilme mittels radikalischer Thiol-En-Polymerisation hergestellt [270]. Zudem werden diese Polymere häufig in der Mikrofluidik [271], der Fotolithographie [272] und der Softlithographie [273] eingesetzt.

Ebenfalls wurde schon 2003 von Belfield und Schafer eine Zwei-Photonen-Polymerisation gezeigt. Sie benutzten als Fotoinitiator Isopropylthioxanthon und stellten Polymerfilme mit unterschiedlicher Dicke her [274]. Kürzlich gelang es Adzima *et al.* die Thiol-En-Chemie mit der Diels-Alder-Chemie zu kombinieren. Sie stellten so die ersten wirklichen 3D

Mikrostrukturen mittels 2PA her. Die Gitterkonstante der hergestellten Strukturen war jedoch noch groß. Der Abstand von aufeinander gestapelten „Balken“ betrug 50 μm und die „Balken“ an sich hatten einen Durchmesser von 20 μm [275].

Eine der wichtigsten Eigenschaften der mittels Thiol-En hergestellten Strukturen, was sie auch für die biologische Anwendung sehr interessant macht, ist, dass das Endprodukt freie Thiol-Gruppen an der Oberfläche besitzt. Diese funktionellen Gruppen lassen sich dazu verwenden Biomoleküle oder spezielle Adhäsionsmoleküle an die Oberfläche zu binden. Dies geschieht in der Regel durch die Michael-Addition. Der nukleophile Michael-Donator wird durch eine Base deprotoniert und das dadurch entstandene Anion reagiert anschließend mit dem Michael-Akzeptor. In unserem Fall ist der Michael-Donator die Thiol-Gruppe sein und der Michael-Akzeptor ein Maleimide welches eine funktionelle Gruppe trägt.

Der Thiol-En-Fotolack besteht aus kommerziell erhältlichen oder einfach herzustellenden Komponenten: dem Fotoinitiator, einem multifunktionellen Thiol und einem multifunktionellen Allylether. Zudem wird ein Lösungsmittel und ein Quencher im endgültigen Fotolack benötigt. Für diese Arbeit wurden die einzelnen Komponenten zusammengefügt und später Funktionalisierungs- und Zellversuche durchgeführt. Um die genaue Funktionsweise zu erläutern, werden hier kurz Ergebnisse von Alexander Quicks Arbeit vorgestellt. Wichtig ist, dass man beim Zusammenfügen der einzelnen Komponenten eine bestimmte Reihenfolge einhält:

- 9,5 mg Bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphinoxid (Irgacure 819)
- 1 mg Hydrochinon
- 170 mg Pentaerythritol tetraallyl ether (PETE)
- 250 mg Pentaerythritol tetrakis(mercaptoacetat)
- 225 μl Dimethylacetamid (DMAC)

Nachdem die Komponenten grob miteinander vermischt wurden, wurde der Fotolack noch für 30 Minuten ins Ultraschallbad gestellt um eine homogene Mischung zu erhalten. Da der Fotolack ein Lösungsmittel enthält das verdunstet, muss der Lack während des DLS annähernd dicht verschlossen werden. Dazu wird ein PDMS-Ring auf das Deckglas gedrückt. In das Innere des Rings gibt man ein paar Tropfen des Fotolacks. Am Ende wird von oben noch ein kleines Glasplättchen auf den PDMS-Ring gelegt. Diese Methode erlaubt es über mehrere Stunden in den Lack zu schreiben. Nach dem Schreiben wurden die Strukturen in Aceton entwickelt (20 min), mit Aceton abgspült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Ein in unserer Arbeitsgruppe üblicher Test um die Performance eines neuen Fotolackes zu testen, ist das Herstellen einer *Woodpile*-Struktur¹⁰ (Holzstapel-Struktur, Abbildung 3.12). Da der Thiol-En-Fotolack normale Fotoinitiatoren enthält kann man zur Herstellung der

¹⁰Die *Woodpile*-Struktur zählt zu den Photonischen Kristallen, die eine periodische Brechungsindexverteilung besitzen. Auf Grund dessen haben sie in einem bestimmten Wellenlängenbereich ein Stopband. Es wird also keine elektromagnetische Welle mit diesen bestimmten Wellenlängen transmittiert.

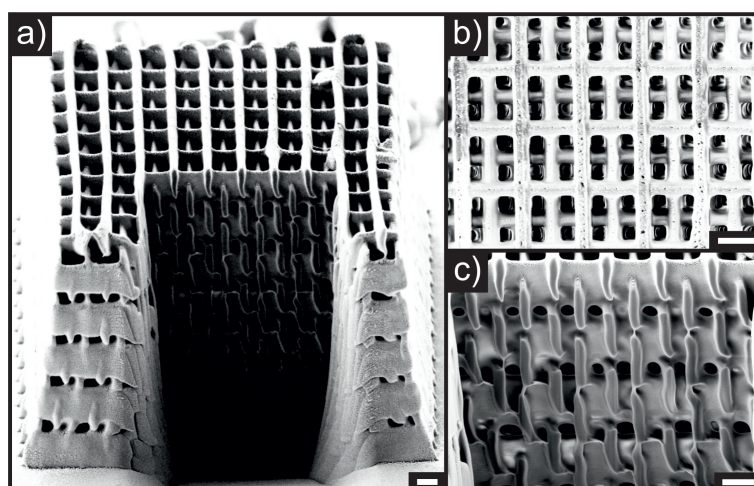


Abbildung 3.13: REM Bilder einer *Woodpile*-Struktur, die mittels radikalischer Thiol-En-Polymerisation und DLS hergestellt wurde. Das Innere der Struktur wurde mittels fokussiertem Ionenstrahlfräsen freigelegt. Die ganze Struktur wird in a) dargestellt. b) und c) zeigen detailliertere Ausschnitte. b) zeigt eine Aufsicht und in c) kann man das Innere der Struktur sehen. Der Skalenbalken beträgt in allen Bildern 1 μm . Abbildung aus [267].

3D Strukturen das Nanoscribe Professional System verwenden. Die in Abbildung 3.13 gezeigte *Woodpile*-Struktur besteht aus 22 Lagen und hat einen lateralen Stababstand von $2\ \mu\text{m}$. Die verwendete Laserleistung betrug $8\ \text{mW}$ und die Schreibgeschwindigkeit betrug $100\ \mu\text{m s}^{-1}$. Um das Innere der *Woodpile*-Struktur zu sehen, wurde ein Teil mittels fokussiertem Ionenstrahlfräsen abgetragen. Die angestrebte Größe der Struktur war $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 15,4\ \mu\text{m}$. Die tatsächliche Höhe des *Woodpiles* beträgt jedoch nur $12,8\ \mu\text{m}$. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungen. Zum einen schrumpfen Fotolacke nach dem Entwickeln. Dieser Effekt kann je nach Fotolack und verwendeter Schreibleistung stark oder weniger stark zur Geltung kommen und hängt mit der Quervernetzung des Polymers zusammen. Zum anderen hat dieser Fotolack nicht den selben Brechungsindex wie Glas. Deshalb kann es auch zu Defokussierungsaberrationen kommen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich mittels radikalischer Thiol-En-Polymerisation dreidimensionale Mikrostrukturen herstellen lassen, musste noch die Oberflächenfunktionalisierung durch eine Michael-Addition gezeigt werden. Dieser Schritt ist essentiell für biologische Anwendungen. Der prinzipielle Mechanismus der Michael-Addition ist in Abbildung 3.12 b) gezeigt. Ein Maleimide mit einer funktionellen Gruppe oder einem Farbstoff bindet kovalent an die freie Thiol-Gruppe an der Oberfläche des Polymers.

Die Funktionalisierung der Oberfläche wurde folgendermaßen durchgeführt: Eine $0,7\ \text{mmol}$ Lösung von N-(5-fluoresceinyl)maleimide in Dimethylformamid (DMF) wurde für 24 Stunden auf die Strukturen gegeben. Um die Michael-Addition zu beschleunigen wurde noch Triethylamin als Katalysator der Lösung beigefügt. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten in DMF entwickelt, mit Aceton abgespült und trocken geblasen. Um die Probe optimal zu mikroskopieren, wurde sie noch in Mowiol eingebettet.



Abbildung 3.14: LSM Aufnahmen von a) einer *Woodpile*-Struktur und b) des MacroArc-Logos nachdem die jeweiligen Strukturen mit Maleimide-Fluorescein funktionalisiert wurden. Bei nicht funktionalisierten Strukturen war keine Fluoreszenz zu beobachten (nicht gezeigt). Der Skalenbalken hat in beiden Abbildungen eine Länge von $10\ \mu\text{m}$. Abbildung aus [267].

In Abbildung 3.14 a) sieht man eine *Woodpile*-Struktur, die mit Maleimide-Fluorescein funktionalisiert wurde. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) aufgenommen. Der Farbstoff wurde mit einer Wellenlänge von $532\ \text{nm}$ angeregt und zwischen $570\ \text{nm}$ und $614\ \text{nm}$ detektiert. Es wurden zudem verschiedene Proben zur Kontrolle hergestellt. So zeigten Strukturen, die nicht mit dem Farbstoff funktionalisiert wurden, auch keine Fluoreszenz (nicht gezeigt). Zudem kann man in Abbildung 3.14 b) die Selektivität der Michael-Addition sehen. Der Farbstoff befindet sich nur an der Oberfläche des MacroArc Logos, das sich leicht vom Deckglas abhebt. Das Glassubstrat an sich weist keine Fluoreszenz auf.

Zudem wurde die Anzahl der an der Oberfläche gebundenen Fluoreszenzmoleküle bestimmt. Hierfür bestimmte man die durchschnittliche Fluoreszenzintensität an der Oberfläche von Polymerquadraten ($100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$). Zudem wurde eine Eichkurve für verschiedene Konzentrationen des Maleimide-Fluorescein in DMF aufgenommen. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der Oberfläche und Eichkurve kann man eine Aussage über die Anzahl der Moleküle in der Lösung und somit an der Oberfläche machen. Durch die Annahme dass die Farbstoffmoleküle nur kovalent an die Oberfläche binden und es keine Oberflächenadsorption gibt, kann man die Anzahl der freien Thiol-Gruppen pro Flächenelement bestimmen. In dem Fall für den hier verwendeten Thiol-En-Fotolack befinden sich etwa 200 freie Thiol-Gruppen pro Quadratmikrometer auf der Oberfläche des Polymers [267].

3.3 Silanisierung

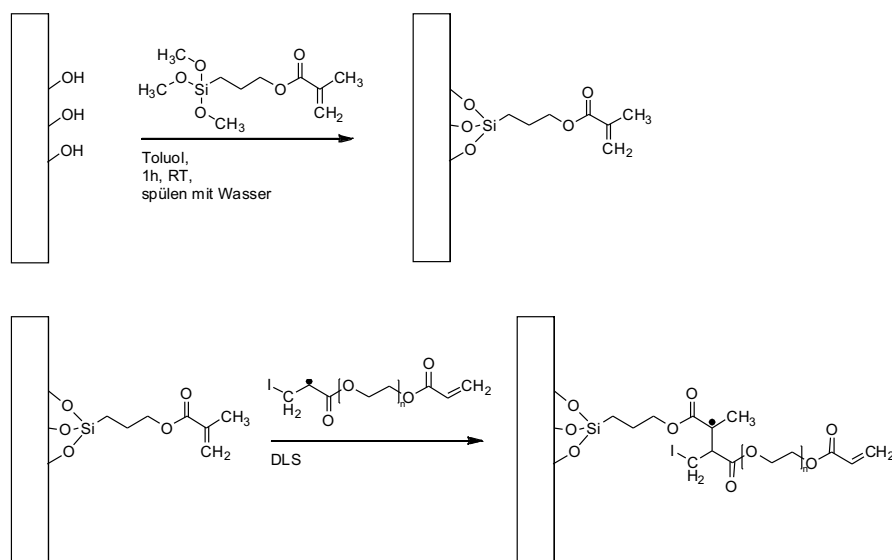


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung von 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan und der Funktionsweise der Silanisierung. (a): Das Silan bindet an die durch das Plasmaätzen aufgebrochenen SiO_2 -Verbindungen an der Oberfläche des Glassubstrats. (b): PEG-DA bindet radikalisch an die Methacrylat-Gruppe am Silan. Die polymerisierten Strukturen sind dadurch kovalent mit der Oberfläche verbunden.

Ormocere haften wegen den enthaltenen anorganischen Silikatnetzwerken (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan, siehe Abbildung 3.15) sehr gut an Glasoberflächen [276]. Die Methacrylat-Gruppe des 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilans (Si-Methacrylat) verbindet sich über radikalische Polymerisation mit dem organischen Netzwerk und den Seitengruppen. Dadurch wird das Silan in die Polymerstruktur eingebunden und die Haftung des Polymers am Glassubstrat erhöht.

Um die Haftung von PEG-DA an der Glasoberfläche zu erhöhen, kann man nicht auf den gleichen Mechanismus wie bei den Ormoceren zurückgreifen. Eine Veränderung der Polymerstruktur könnte die protein- und somit auch die zellabweisenden Eigenschaften des Lacks zunichte machen. Deshalb wird die Glasoberfläche bereits vor dem Aufbringen des Lackes mit dem 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan funktionalisiert (siehe Abbildung 3.15).

Die Deckgläser werden dazu mit Isopropanol gereinigt und mit Stickstoff abgeblasen. Um eine gleichmäßige Silanschicht zu erhalten, werden die Deckgläser anschließend für zehn Minuten im Plasmaätzer (PlasmaPrep5 von Gala Instrumente) mit Argonplasma geätzt, dadurch wird die Oberfläche der Deckgläser hydrophilisiert. Die vorbehandelten Deckgläser werden darauffolgend für eine Stunde in eine 1 mM Lösung aus 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan und Toluol¹¹ gelegt. Im Anschluss werden die Deckgläser mit Wasser gespült und mit Stickstoff

¹¹Die 1 mM Lösung aus 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan und Toluol sollte man unter Stickstoffatmosphäre herstellen, da das Silan hygroskopisch ist und die Methoxysilan-Gruppe mit Wasser zu Silikat (Siliziumhydroxid) und Methanol reagiert. Silikate sind unlöslich in organischen Lösungsmitteln und flocken aus. Das Silan wäre unbrauchbar.

trocken geblasen. Wasser wirkt hierbei zusätzlich als Reaktionsbeschleuniger und sorgt dafür, dass die Glasoberfläche vollständig mit dem Silan bedeckt wird.

Polymerisiert man PEG-DA (oder andere Fotolacke auf Acrylbasis) mittels DLS auf diesen silanisierten Deckgläsern, verbindet sich das Methacrylat auf deren Oberfläche mit den Acrylaten des Polyethylenglykols. Das Polymer bindet nun kovalent an das Glassubstrat [277, 265, 278], was ein Ablösen der Strukturen während der Zellkultivierung verhindert.

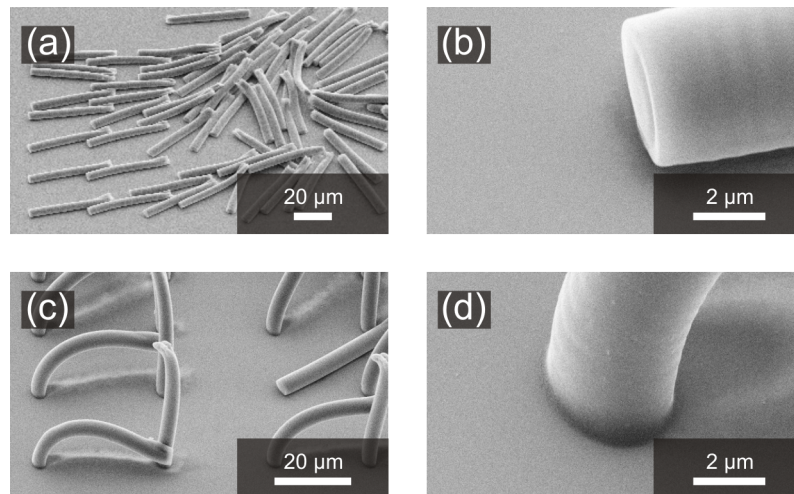


Abbildung 3.16: REM-Bilder von: (a): Säulen auf nicht-funktionalisiertem Deckglas. (b): Höhere Vergrößerung einer Säule. (c): Säulen auf silanisierendem Deckglas. (d): Höhere Vergrößerung einer Säule. Nachdem ein konstanter N_2 -Strom auf sie ausgeübt wurde. Die Haftung des Fotolacks konnte durch die Silanisierung des Deckglases deutlich gesteigert werden.

Zunächst wurden testweise einige Deckgläser wie oben beschrieben funktionalisiert. Als Teststruktur wurde ein Feld aus ca. $50\mu\text{m}$ hohen Säulen, mit einem Radius von $3\mu\text{m}$, gewählt. Diese Struktur wurde mit Direktem Laserschreiben auf ein funktionalisiertes und ein nicht-funktionalisiertes Deckglas geschrieben. Nach dem Entwickeln wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops gezeigt, dass die Hälfte der Säulen des nicht-funktionalisierten Deckglases umgefallen waren (nicht gezeigt). Auf dem funktionalisierten Deckglas standen noch alle Säulen. Die restlichen Säulen konnten durch einen konstanten Stickstoffstrom auf die Strukturen des nicht-funktionalisierten Deckglases umgeworfen werden. Anschließend wurde mit den Strukturen auf dem funktionalisierten Deckglas ebenso verfahren und während dessen unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Stoppte man den Stickstoffstrom, standen die Säulen wieder gerade (Abbildung 3.16).

3.4 Klick-Funktionalisierung

In den letzten Jahren besteht nicht nur in der Chemie, sondern auch in der Biologie und Physik das Interesse an schnell ablaufenden und effizienten chemischen Reaktionen [279, 280]. Diese als Klick-Reaktionen bezeichnete Reaktionstypen müssen jedoch folgende Kriterien erfüllen: hohe Reaktionsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur, große Ausbeute, spezifisch (Orthogonalität), lösungsmittelunabhängig. Zudem ist man mehr und mehr daran interessiert diese Reaktionen nicht nur ortsaufgelöst, sondern auch zeitaufgelöst ablaufen zu lassen. Für diese Herausforderung eignet sich Licht als Initiator für Klick-Reaktionen [281]. Es gibt auch schon Ansätze in denen lichtinduzierte Klick-Reaktionen in Hydrogelen mittels Azid-Alkin-Cycloaddition durchgeführt wurden [282]. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass Kupfer-Derivate im Reaktionsprozess involviert sind. Für biologische Experimente sind Kupfer-Verbindungen eher ungeeignet, da sie die Biokompatibilität des Endprodukts beeinflussen können. Gerade in Hydrogelen lassen sich nicht gewollte Atome, Moleküle oder Ionen nur schwer herauswaschen. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Prozess durch Radikale aktiviert wird, welche im Gel diffundieren und somit die Auflösung verschlechtern. Deshalb ist ein Reaktionsmechanismus der ohne Kupfer gezielt an der Oberfläche ohne Diffusion abläuft vorzuziehen.

3.4.1 Photoenol

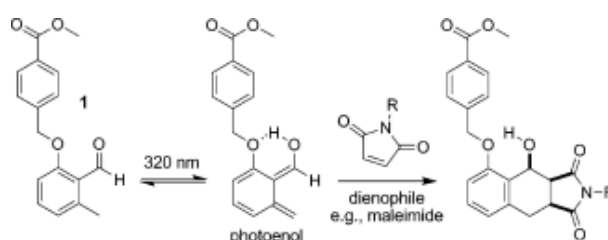


Abbildung 3.17: Photoinduzierte Isomerisierung des 2-Formyl-3-methylphenoxy(FMP)-Derivats und nachfolgende Diels-Alder-[4+2]-Cycloaddition mit einem Dienophil. Abbildung aus [283].

Die Klasse der Photoenole eignet sich hervorragend um solche lichtinduzierten Klick-Reaktionen durchzuführen. Zu den Photoenolen zählen verschiedene Moleküle. Das Grundprinzip ist jedoch, dass ein Molekül durch eine Photoisomerisierung eine Diels-Alder-Reaktion eingeht. Schon länger bekannte Moleküle sind zum Beispiel *o*-Methylphenylketone oder -aldehyde die in ein Hydroxy-*o*-chinodimethan übergehen und eine Klick-Reaktion mit entsprechenden Partnern eingehen [284, 285].

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass eine 2-Formyl-3-methylphenoxy(FMP)-Einheit für unser Vorhaben geeignet ist. Die durch die Photoisomerisierung gebildete Wasserstoffbrücke beschleunigt zum einen die Diels-Alder-Reaktion und sorgt zum anderen dafür, dass die Photoenol-Zwischenstufe (*Z*-Isomer) langlebiger ist und effizienter gebildet wird. In diesem Zustand ist das Photoenol ein Dien¹² und reagiert mit Dienophilen wie z. B. Maleimid-Derivaten (siehe Abbildung 3.17)[283].

Erste Versuche mit dem FMP wurden in Lösung durchgeführt. Hierfür wurde das FMP mit

¹²Bei einem Dien handelt es sich um organische Verbindung mit zwei benachbarten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen.

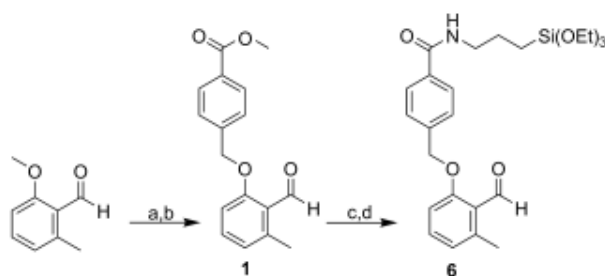


Abbildung 3.18: Synthese des FMP-funktionalisierten Silans. Reagenzien und Bedingungen: a) AlCl_3 , DCM; b) 4-(Brommethyl)benzoat, K_2CO_3 , Aceton; c) NaOH , DCM/Methanol (9:1 v/v); d) Ethylchlorformiat, 3-(Triethoxysilyl)propan-1-amin, THF. Abbildung aus [283].

einem Poly(ethylenglycol)methylether versehen und in Anwesenheit eines Maleimides mit einer UV-Lampe ($\lambda_{max} = 320 \text{ nm}$) bestrahlt. Bereits nach 15 Minuten wurde ein vollständiger Umsatz bei Raumtemperatur erreicht. Die Cycloaddition lief nicht nur in den üblichen Lösungsmitteln (Acetonitril oder Dichlormethan) ab, sondern auch in polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder Dimethylformamid (DMF). Jedoch läuft die Reaktion ineffizienter ab, da längere Bestrahlungszeiten benötigt wurden um einen vollständigen Umsatz zu erhalten. Es wurde auch gezeigt, dass ein Maleimid-terminiertes Peptid eine Photokonjugation mit FMP-Derivaten eingeht [283].

Es handelt sich bei dieser photoinduzierten Diels-Alder-Cycloaddition um die Methode der Wahl um Biokonjugationen ohne Katalysatoren schnell, effizient und in milden Lösungsmitteln durchzuführen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass es sehr viele Maleimido-funktionalisierte (Bio)Moleküle gibt die später verwenden werden können. Da wir daran interessiert sind die Oberfläche einer 3D Mikrostruktur mit dem photoaktivierbaren Molekül zu beschichten um anschließend eine orts aufgelöste Biokonjugation zu ermöglichen. Eine häufig verwendete Methode um Glas oder Silizium kovalent mit einem Molekül zu beschichten ist die Silanisierung (siehe auch Kapitel 3.3). Deshalb wurde von Thomas Pauloehrl ein FMP-funktionalisiertes Silan hergestellt. In Abbildung 3.18 ist schematisch dargestellt wie die Synthese des Photoenol-Silans abläuft [283].

Die nun silanisierten Silizium-Oberflächen konnten anschließend getestet werden. Zum einen wurde mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie gezeigt, dass sich das Photoenol-Silan an der Oberfläche befindet. Zum anderen wurde gezeigt, dass sich Maleimido-Derivate über die Diels-Alder-Cycloaddition an die Oberfläche binden lassen. Ein weiterer Vorteil des hier verwendeten Photoenols ist, dass die während der Bestrahlung gebildete Dien-Spezies vollständig umkehrbar ist, sobald das UV-Licht ausgeschaltet ist. Da die FMP-Gruppe nur während sie bestrahlt wird reaktiv ist und zum selben Zeitpunkt auch ein Dienophil anwesend sein muss, damit es zu einer Cycloaddition kommt, ist ein nachträgliches Schützen der FMP-Gruppe nicht notwendig. Das erleichtert die Handhabung und Lagerung der Proben. Die FMP-Gruppe ist somit ein lichtschtbares Molekül. Im Gegensatz zu vielen anderen photoaktivierbaren Molekülen, bei denen eine Schutzgruppe durch Bestrahlung abgelöst und eine reaktive Gruppe freigelegt wird. Diese Schaltbarkeit der beiden Zustände bringt noch andere Vorteile (siehe Kapitel 6).

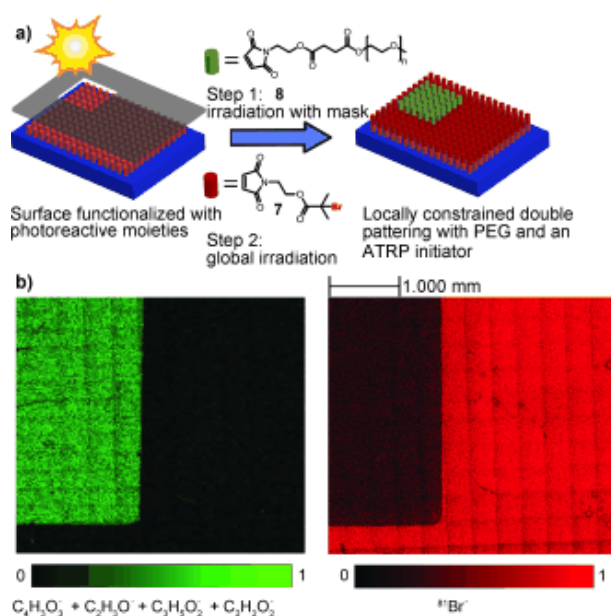


Abbildung 3.19: a) Prinzip der doppelten photoinduzierten Musterung mit Maleimido-PEG und dem ATRP-Initiator. b) ToF-SIMS-Daten belegen die erfolgreiche Musterung mit dem Polymer (links). Die ursprüngliche Photoreaktivität bleibt auf den unbestrahlten Bereichen erhalten und kann für eine weitere Diels-Alder-Funktionalisierung durch vollständige Bestrahlung in Gegenwart des Maleimid-ATRP-Initiators verwendet werden. Abbildung aus [283].

Um das nun existente System zu testen wurde ein mit dem Photoenol-Silan beschichteter Siliziumwafer in Anwesenheit eines Maleimido-terminierten PEG-Methylethers (Mal-PEG, **8** in Abbildung 3.19) durch eine Maske belichtet. Nach einem Waschschriff wurde der komplette Wafer in Gegenwart eines Brom-haltigen Dienophils (Mal-Br, **7** in Abbildung 3.19) bestrahlt (siehe auch Abbildung 3.19 a)). Mittels Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS), eine Methode zur räumlich aufgelösten Analyse von molekularen Mustern auf Oberflächen, wurde bestimmt welche Moleküle sich auf der Probe befinden. In Abbildung 3.19 b) kann man deutlich erkennen, dass auf dem durch die Maske bestrahlten Bereich nur PEG-Verbindungen nachweisbar sind (links), während sich auf dem global bestrahlten Bereich Brom-haltige Verbindungen befinden (rechts). Interessanterweise konnte durch die Verwendung dieser beider unterschiedlicher Moleküle gezeigt werden, dass man die Oberfläche entweder direkt mit Mal-PEG funktionalisieren kann (*Grafting-to*-Ansatz) oder das verwendete Mal-Br für einen *Grafting-from*-Ansatz nutzen kann. So lassen sich mit Hilfe des Mal-Br Polymere direkt von der Oberfläche mittels metallkatalysierter radikalischer Polymerisation wachsen [286, 287]. Eine solche kontrollierte Radikalpolymerisation, die *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), wird in Kapitel 4.3.5 genauer behandelt.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich das hier vorgestellte Photoenol-Silan dazu eignet, Silizium- oder Glas-Oberflächen damit zu beschichten und anschließend ortsaufgelöst mit mehreren Molekülen zu funktionalisieren. Die photoinduzierte Reaktion der FMP-Gruppe mit Dienophil-Derivaten läuft dabei so schnell und effektiv ab, dass keine Kontamination der unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen mit den jeweiligen anderen Molekülen festzustellen ist. Es handelt sich bei der hier vorgestellten Diels-Alder-Konjugation um eine

Klick-Reaktion, die ohne Katalysatoren und unter milden Bedingungen abläuft. Deshalb eignet sich das Photoenol-Silan für unsere Zwecke.

Die Silanisierung erfolgte immer folgendermaßen:

Die Proben werden mit Isopropanol gereinigt und mit Stickstoff abgeblasen. Um eine gleichmäßige Silanschicht zu erhalten, werden die Deckgläser anschließend für zehn Minuten im Plasmaätzer (PlasmaPrep5 von Gala Instrumente) mit Argonplasma geätzt, dadurch wird die Oberfläche der Deckgläser und Ormocomp-Strukturen hydrophilisiert. Die vorbehandelten Proben werden darauffolgend für eine Stunde in eine 1 mM Lösung aus FMP-terminierten Silan und Toluol gelegt. Im Anschluss werden die Deckgläser mit Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Es wurden unterschiedliche Maleimid-terminierte Moleküle verwendet. Einige davon wurden direkt gekauft, andere wurden entweder von Guillaume Delaittre oder Thomas Paulöhrle hergestellt:

- Maleimid-Biotin¹³ (Sigma Aldrich)
- Maleimid-Benzylguanin¹³ (New England Biolabs)
- Maleimid-Polyethylenglykol (750 g mol⁻¹, Thomas Paulöhrle)
- Maleimid-Polyethylenglykol (2200 g mol⁻¹, Thomas Paulöhrle)
- Maleimid-Poly(oligo(ethylenglykol) Methacrylat) (Mal-POEGMA) (6550 g mol⁻¹, Guillaume Delaittre)
- Maleimid-Bromid bzw. Maleimid-ATRP-Initiator (Guillaume Delaittre)

Aus den verschiedenen Maleimido-Derivaten wurden 0,1 mM Lösungen in DMF hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

3.4.2 Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus

Beim Biotin-Avidin-Mechanismus handelt es sich nicht direkt um eine Klick-Reaktion der beiden Moleküle, da sie nicht kovalent miteinander reagieren. Biotin (Vitamin H) und Avidin binden jedoch mit einer sehr hohen Affinität ($10^{15} \text{ L} \times \text{mol}^{-1}$) aneinander [289]. Die Affinität ist mehr als drei Größenordnungen höher als für die Interaktion von Liganden mit ihren Antikörpern. Dieser Mechanismus ist schon seit Jahrzehnten bekannt und wurde bereits 1975 von Green beschrieben [290]. Noch effektiver und spezifischer als an Avidin bindet Biotin an Streptavidin. Streptavidin ist im Gegensatz zu Avidin kein Glykoprotein, hat eine geringere Ladung und bindet deshalb nicht an Kohlenhydrat-Rezeptoren. An ein Streptavidin oder Avidin Protein können bis zu vier Biotine binden; an jede Untereinheit eines.

Ein Vorteil des Biotins ist seine geringe Masse von 244,31 Da, wodurch es biologische

¹³In Lösung wurde die Cycloaddition zwischen einem Photoenol-Derivat und Maleimid-Biotin und Maleimid-Benzylguanin bereits nachgewiesen [288].

Farbstoff	Absorptionsmaxima	Emissionsmaxima
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm
Alexa Fluor 647	650 nm	665 nm
Cyanin 3	550 nm	570 nm
Cyanin 5	650 nm	670 nm

Tabelle 3.1: Übersicht der verschiedenen Farbstoffe und Wellenlänge ihrer Absorptionsmaxima bzw. Emissionsmaxima [292, 293].

Makromoleküle nicht in ihrer Aktivität beeinflusst [289]. Deshalb eignet es sich entweder als Angriffspunkt für Farbstoffe und wird somit zur Antikörperfärbung verwendet oder durch Biotinylierung von Proteinen kann man ihre räumliche Position auf Substraten beeinflussen (Biokonjugation, [291]).

In dieser Arbeit wird der Biotin-(strept)Avidin Mechanismus für zwei unterschiedliche Aufgaben verwendet:

- Als Fluoreszenzindikator um nachzuweisen, dass die orts aufgelöste Funktionalisierung von Oberflächen mittels Direktem Laserschreiben und der in Kapitel 3.4.1 eingeführten photoaktivierbaren Diels-Alder-Konjugation funktioniert. Hierfür wird ein Maleimido-terminiertes Biotin (Mal-Bt) an die Oberfläche geklickt. Dieses lässt sich mit einem Streptavidin-gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff nachweisen. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in den Kapiteln 4.3.2, 4.3.3 und 4.3.4 zu finden.
- Zur gezielten orts aufgelösten Funktionalisierung von 3D Mikrostrukturen mit EZM Proteinen. Hierfür wird die oben erwähnte Biotinylierung der Proteine vorgenommen. Die so terminierten Proteine binden so mit hoher Affinität an die zuvor photofunktionalisierten Bereiche auf den 3D Mikrostrukturen. Die Ergebnisse dieser Methode werden in Kapitel 4.3.5 gezeigt.

Fluoreszenzmarkierung durch Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus

In den Kapiteln 4.3.2, 4.3.3 und 4.3.4 wird der Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus verwendet um funktionalisierte Bereiche auf der Probe sichtbar zu machen. Bei diesen Proben handelt es sich in der Regel um Substrate die mit dem Photoenol-Silan beschichtet wurden. In einem DLS Schritt wurden Maleimido-terminierte Biotine durch eine Diels-Alder-Konjugation orts aufgelöst an die Oberfläche gekoppelt. Um diese Bereiche im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen und damit zu zeigen, dass die FMP-Gruppe wie erwartet reagiert, wurden sie mit einem Farbstoff-Derivat markiert. Bei dem Derivat handelt es sich um (Strept)Avidin das mit einem Farbstoff markiert wurde. Üblicherweise sind es Farbstoffe, die in der Biologie zur Immunhistochemie verwendet werden. Dazu zählen Alexa Fluor 488, 568 und 647 oder die Cyanin-Farbstoffe (Cy) 3 und 5. Die entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima sind in Tabelle 3.1 gezeigt.

Der Färbeprozess eines strukturierten Substrats erfolgte immer folgendermaßen:

Die Substrate wurden nach dem letzten Funktionalisierungsschritt in DMF gewaschen,

mit Isopropanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. In 200 μl PBS wurden 2 μl der Stammlösung (1 mg ml^{-1} in Wasser, z. B. Streptavidin-Cy3) gemischt und für 30 min auf die Probe gegeben. Um ein Austrocknen der Probe während des Färbeschritts zu verhindern befand diese sich in einer sogenannten Feuchtekammer. Damit der Farbstoff nicht von der Probe herunterfließt, wurde das Deckglas auf Parafilm (hydrophob) gelegt. Anschließend wurde das Substrat dreimal jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Die Probe wurde dann 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt um ein vollständiges Aushärten des Mowioms zu gewährleisten. Die Langzeitlagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank. Zudem sollte der Lagerort stets dunkel sein, damit es nicht zu Photobleichung der Farbstoffe kommt.

Biokonjugation durch Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus

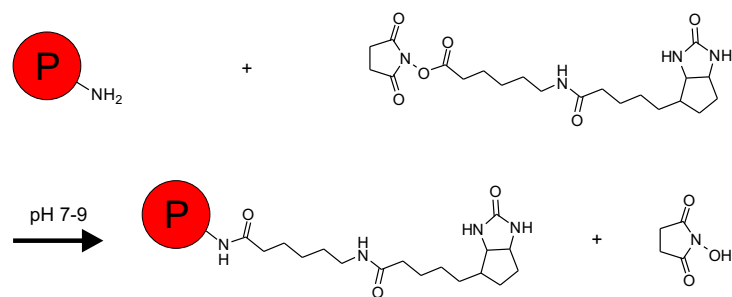


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der Biotinylierung. Das NHS-terminierte Biotin reagiert mit der primären Amin-Gruppe zu einem Amid und das N-hydroxysuccinimid wird abgespalten. Abbildung nach [294].

Um eine gezielte orts aufgelöste Biokonjugation von Proteinen zu erreichen wird häufig auf den Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus zurückgegriffen. Durch eine Biotinylierung des entsprechenden Proteins erreicht man die Funktionalisierung mit dem Affinitätsmarker. Biotin ist wegen seiner geringen Masse besser dafür geeignet, da die Wahrscheinlichkeit für eine Inaktivierung des Proteins geringer ist. Zur Verwendung kommen hierfür sogenannte (Sulfo-)NHS-Biotine. Der (Sulfo-)NHS-Ester bindet unter neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen (pH 7,2 bis 9) kovalent an freie, primäre Amin-Gruppen. Dabei entsteht eine Amidverbindung und ein N-hydroxysuccinimid (NHS) bzw. Sulfo-NHS wird freigegeben (siehe Abbildung 3.20).

Bei der Biotinylierung ist darauf zu achten, dass die wässrige Lösung die das (Sulfo-)NHS-Biotin enthält schnell verwendet wird, weil das NHS in Wasser hydrolysiert und Carboxy-Gruppen bildet. Zudem muss die Konzentrationen der jeweiligen Lösungen ((Sulfo-)NHS-Biotin-Lösung und Protein-Lösung) genau angepasst sein. Befinden sich zu viele NHS-Ester in der Lösung, werden alle Amino-Gruppen des Proteins mit dem Affinitätsmarker versehen und so kann es trotz der geringen Masse des Markers zu einer Inaktivierung des Proteins kommen.

Zur Herstellung von Biotin-Fibronektin (Bt-FN) oder Biotin-Vitronectin (Bt-VN) wurde das Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin Kit und humanes Fibronektin bzw. Vitronectin (Sigma) verwendet. Die Biotinylierung und Aufreinigung erfolgte genau nach Anleitung. Das Endprodukt (1 mg ml^{-1} in PBS) wurde aliquotiert (10 μl pro Eppi) und bei

-20 °C eingefroren.

Die Biokonjugation an der Oberfläche mit dem biotinylierten Fibronectin erfolgte folgendermaßen:

Die mit Maleimid-Biotin gemusterten Substrate wurden nach dem letzten Funktionalisierungsschritt in DMF gewaschen, mit Isopropanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die Proben wurden anschließend in Ethanol (70 %) und PBS gewaschen. In 200 µl PBS wurden 2 µl einer (Strept)Avidin-Lösung (1 mg ml^{-1} in PBS) gemischt und für 30 min auf die Probe gegeben. Dieser Zwischenschritt ist nötig, weil sich Biotin an der Oberfläche und am Protein befindet. Wenn man davon ausgeht, dass an jedes Biotin an der Oberfläche ein (Strept)Avidin bindet, dann sind drei freie Bindestellen für das Biotin-Fibronectin oder Biotin-Vitronectin vorhanden. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS alle 10 Minuten. Um nun das Bt-FN bzw. Bt-VN an das Avidin zu binden wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:50 mit PBS gemischt und 200 µl für 30 Minuten auf eine Probe gegeben. Nach einem letzten Waschschrift (PBS, $3 \times 10 \text{ min}$) wurden Zellen auf den Substraten ausgesät.

3.4.3 SNAP-Tag Mechanismus

Ähnlich wie der oben genannte Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus kann man den SNAP-Tag Mechanismus entweder zur Markierung von Proteinen mit Farbstoffen oder zur (ortsaufgelösten) Funktionalisierung von Oberflächen verwenden. Es gibt jedoch ein paar Unterschiede. Beim SNAP-Tag Mechanismus kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen Agonist (SNAP-Tag) und Antagonist (Benzylguanin). Zudem wird der SNAP-Tag bzw. das SNAP-Tag Protein durch Manipulation der DNA-Sequenz direkt in der Zelle gebildet. Nun hat man die Möglichkeit das Protein im Inneren der Zelle durch einen Benzylguanin-terminierten Farbstoff sichtbar zu machen. Ist man am Protein an sich interessiert, kann man dieses auch von Bakterien bilden lassen und aufreinigen.

In Abbildung 3.21 wird gezeigt, wie der SNAP-Tag mit dem Benzylguanin (BG) reagiert. Der SNAP-Tag, der ein Derivat der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist, besitzt eine S^- -Gruppe die das BG zwischen der Benzyl- und Guanin-Gruppe angreift und kovalent an die Benzyl-Gruppe bindet. Dabei wird das Guanin abgespalten [295].

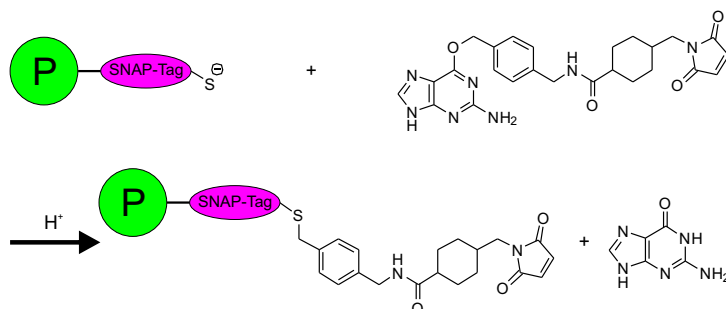


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung des SNAP-Tag Mechanismus. Das SNAP-Tag Protein bindet kovalent an Benzylguanin durch Abspaltung der Guanin-Gruppe. Abbildung nach [295].

In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf der Modifikation der extrazellulären Matrix, weshalb verschiedene SNAP-Tag Proteine verwendet wurden. Zum einen grün fluoreszierendes Protein (GFP) das mit einem His-Tag und einem SNAP-Tag versehen ist, welches zur Visualisierung der Funktionalisierung verwendet wurde und zum anderen ein His- und SNAP-terminiertes Cadherin. Die Herstellung erfolgte durch Dagmar Fichtner. Die genauen Protokolle sind in den Referenzen [95] und [96] zu finden. Hier wird nur beschrieben wie sie auf die funktionalisierten Oberflächen und 3D Mikrostrukturen angebracht wurden:

Die mit Maleimid-Benzylguanin gemusterten Substrate wurden nach dem letzten Funktionalisierungsschritt in DMF gewaschen, mit Isopropanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die Proben wurden anschließend in Ethanol (70 %) und PBS gewaschen. Teilweise wurden die Proben zusätzlich mit einer Lösung aus 10 gew. % Pluronic F-108 in Wasser für eine Stunde inkubiert und mit PBS gewaschen um eine zusätzliche Passivierung zu erreichen. Die jeweilige Stammlösung (GFP oder Cadherin) wurde mit HBS auf eine 4 μM Lösung verdünnt und bei 4 °C mit 13000 U min^{-1} für 10 Minuten abzentrifugiert um keine Proteinagglomerationen in der Lösung zu haben. Die erhaltene Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit der 10 %-igen Lösung von Pluronic F-108 in Wasser vermischt. Das Pluronic F-108 wirkt hier, ähnlich wie BSA in der Immunhistochemie (siehe Kapitel 3.6.4), unspezifischer Bindung entgegen. Anschließend wurden 200 μl der Endlösung (2 μM Protein, 5 % Pluronic-108) auf die Probe gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Es folgten Waschschrte mit HBS (3 \times 10 min). Wurden die Substrate zur Zellkultivierung verwendet, erfolgte sie zu diesem Zeitpunkt (siehe Kapitel 3.6.3 und 3.6.4). Wurden die Substrate für Visualisierungszwecke hergestellt, wurden die Proben für zehn Minuten mit 4 % PFA in PBS fixiert, mit PBS gewaschen (3 \times 10 min) und in Mowiol eingebettet.

3.5 Charakterisierung der 3D Strukturen

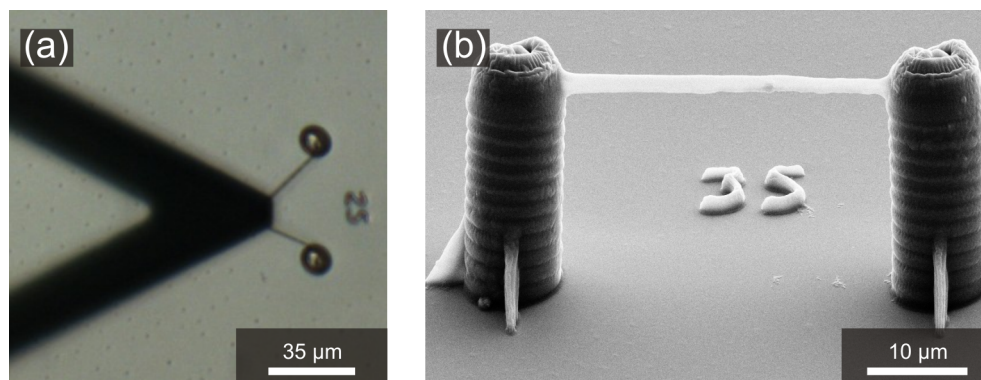


Abbildung 3.22: (a): Lichtmikroskopbild des AFM-Kantilevers nach der Messung. Das elastische PEG-DA haftet am Kantilever. (b): REM-Aufnahme einer Teststruktur.

In Kapitel 3.2.4 wurde beschrieben wie ein stabilerer und dennoch passivierender PEG-Fotolack entwickelt wurde. Da es jedoch auch wichtig ist nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Aussage über die Änderung der Steifigkeit machen zu können wird hier eine passende Methode gezeigt.

Die Hydrogele aus vorhergehenden Publikationen wurden durch das Belichten mit einer UV-Lampe hergestellt, teilweise wurde zusätzlich Wasser beigemischt [264, 265, 259]. Deshalb können wir keine Aussage darüber treffen, wie der Vernetzungsgrad eines solchen Mischlacks nach dem DLS ist und wie sich das auf die Festigkeit des polymerisierten Lackes auswirkt. Zudem wird das Monomer nach dem Belichten mit Isopropanol entfernt, wodurch unpolymersierte Bereiche in der Struktur herausgelöst werden könnten. Um herauszufinden, wie sich verschiedene Mischungsverhältnisse auf die Festigkeit der Strukturen auswirken, wurden diese mit Hilfe eines Raster-Kraft-Mikroskops (AFM, *atomic force microscope*) kalibriert (Abbildung 3.22 (a)). Hierzu wurden spezielle Teststrukturen, wie in der Diplomarbeit von Joachim Fischer, hergestellt [247]. Die Säulen waren 30 µm hoch und durch 35 µm lange Seile verbunden (siehe Abbildung 3.22 (b)). Die Seile wurden mit unterschiedlichen Energien geschrieben um verschieden dicke Seile zu erzeugen. Das erstaunliche bei PEG-DA ist, dass man durch Schreiben einer Linie runde Seile erhält, obwohl der Voxel elliptisch ist, deshalb mussten keine Anpassungen diesbezüglich gemacht werden. Der Grund dafür ist die geringe Festigkeit von PEG-DA. Die Seile ziehen sich nach dem Entwickeln zusammen und nehmen einen runden Querschnitt an.

Um die Kraftkurven aufzunehmen, wird ein kalibrierter AFM-Kantilever ohne Spitze auf die Seile gesenkt, bis eine Kraft von 80 bzw. 100 nN erreicht ist. Dabei wird die ausgeübte Kraft F über die Position der Piezobühne z_P aufgetragen. Die daraus resultierenden Kurven sind in Abbildung 3.23 (a) dargestellt. Wird eine Kraft auf den Kantilever ausgeübt, so verbiegt dieser sich, weshalb die Position des Piezos nicht direkt der Auslenkung der Seile entspricht. Um von der Position des Piezos auf die Auslenkung der Seile schließen zu können, muss für jeden Kantilever eine Referenzkurve $F(z_{P0})$ aufgenommen werden. Dazu wird der Kantilever auf das als unendlich hart angenommene Glassubstrat gedrückt. Nimmt man an, dass die Verbiegung des Kantilevers für gleiche Kräfte immer gleich ist, kann man nun die

Seilauslenkung berechnen. Die Strecke, die der Piezo bis zum Erreichen einer bestimmten Kraft zurücklegt (z_P), setzt sich aus der Verbiegung des Kantilevers (z_{P0}) und des Seils (z_S) bei einer bestimmten Kraft F_n zusammen. Also gilt für die Seilverbiegung

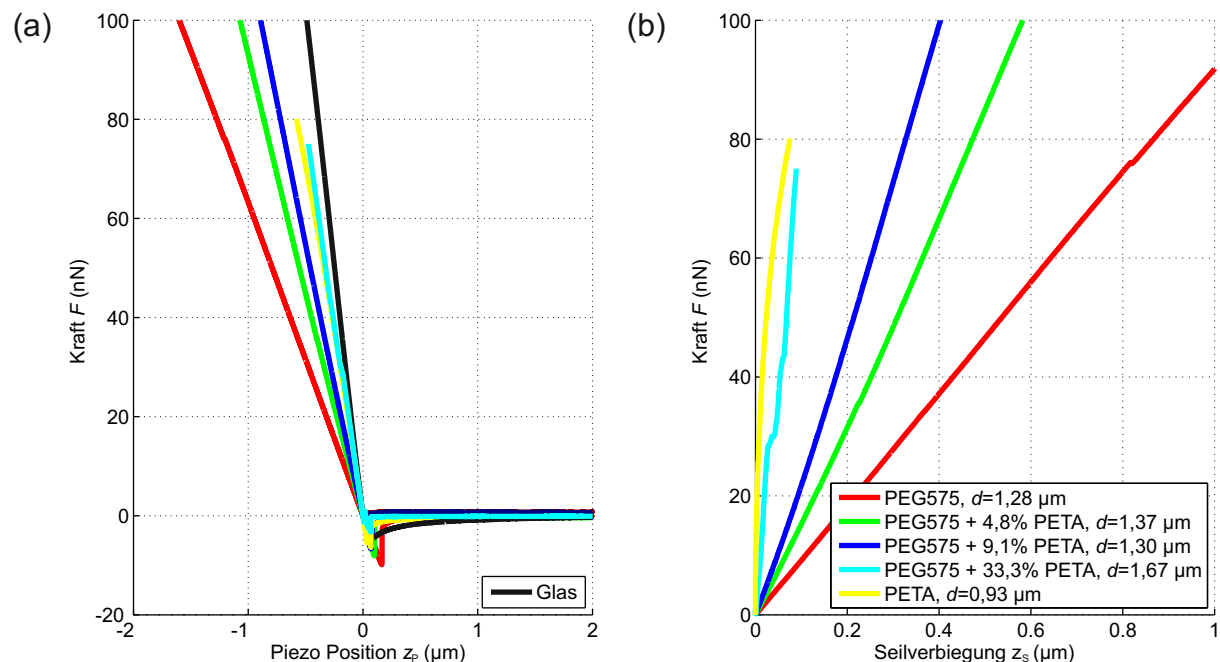
$$z_S(F_n) = z_P(F_n) - z_{P0}(F_n). \quad (3.8)$$

Die Seile, die in Abbildung 3.23 (a) gezeigten Kraftkurven, wurden mit verschiedenen Lacken geschrieben. Als Grundmonomer diente in vier Fällen PEG575 dem unterschiedliche Massen-Anteile von PETTA (0 %; 4,8 %; 9,1 % und 33,3 %) beigemischt wurden. Außerdem wurde eine Kraftkurve von einer reinen PETTA-Struktur aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Balken immer möglichst den gleichen Durchmesser hatten, um die Daten miteinander vergleichen zu können. Wie erwartet, lassen sich die Seile der reinen PEG575-Struktur am leichtesten verbiegen. Mit steigendem PETTA-Anteil steigt auch die Kraft, die nötig ist, um das Seil auszulenken. Also hängt die Steifigkeit mit dem Quervernetzungsgrad zusammen. Die Referenzkurve ist in Abbildung 3.23 (a) schwarz dargestellt und wurde wie oben beschrieben aufgenommen. Die tatsächliche Auslenkung der Seile ist in Abbildung 3.23 (b) dargestellt.

Beim Aufnehmen der Daten konnten gummiartige Eigenschaften des Polyethylenglykols beobachtet werden. So ist zum einen die auslenkende Kraft nahezu linear zur Auslenkung, wodurch das Hookesche Gesetz in guter Näherung erfüllt ist. Und zum anderen schnappten die am Kantilever klebenden PEG-Seile, beim Wegfahren des Kantilevers von den Seilen, nach dem Erreichen einer Mindestkraft zurück in ihren Ausgangszustand (siehe Abbildung 3.22 (a)). Dieser Vorgang konnte mehrere Male wiederholt werden, ohne dass sich Änderungen in den Kraftkurven zeigten. Die Strukturen befanden sich während des Aufnehmens der Kraftkurven nicht in Flüssigkeit, weil wir nur testen wollten ob sich das Beimischen von PETTA auf die Steifigkeit der Strukturen an sich auswirkt.

Von Joachim Fischer wurde im Rahmen seiner Diplomarbeit gezeigt, dass der Elastizitätsmodul für alle Seildicken des gleichen Lackes beinahe gleich sind [247]. Trotzdem wurden zunächst Seile mit unterschiedlichen Durchmessern hergestellt, indem die Energie während des DLS variiert wurde. So war es möglich Seile zu finden, die den gleichen Durchmesser haben, deren Kraftkurven man miteinander vergleichen kann. Die Durchmesser der Seile wurden aus REM-Bildern bestimmt, indem einmal die Breite in der Aufsicht bestimmt wurde und danach der Probenstisch um 70° geneigt wurde, um die Höhe der Seile zu bestimmen. Der Durchschnitt dieser nahezu identischen Werte ist dann der Durchmesser des Seils. Um nun den Elastizitätsmodul der verschiedenen Fotolacke zu berechnen wurde zunächst die Biegelinie eines Schubstarren Balkens der Länge L mit zwei eingespannten Enden berechnet. Zudem wird von kleinen Auslenkungen und perfekt starren Säulen ausgegangen. Da der Kantilever im vorderen Bereich $10\ \mu\text{m}$ breit ist, wird die Flächenlast auf die mittleren $10\ \mu\text{m}$ des Balkens ausgeübt.

Experiment



Theorie

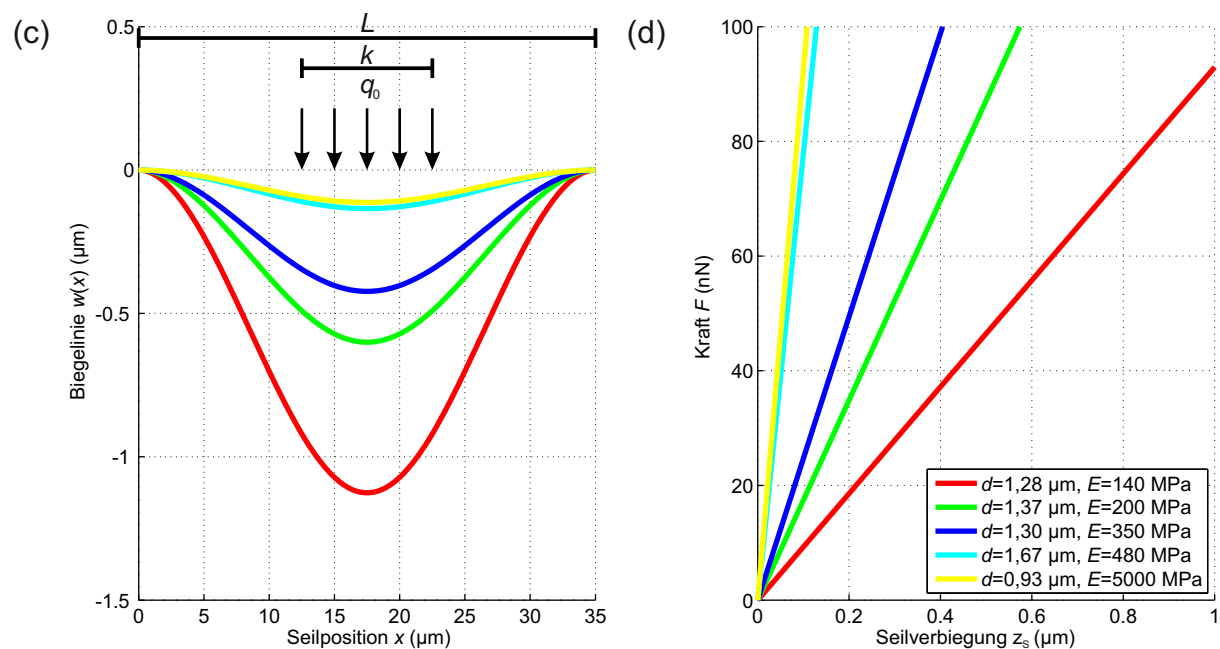


Abbildung 3.23: (a): Gemessene AFM-Kraftkurven. Die schwarze Linie ist für Glas. (b): Berechnete Seilauslenkung. (c): Theoretische Biegelinien bei 100 nN Last. (d): Theoretische Seilauslenkung nahezu identischer Seildurchmesser. Abbildung nach [266].

Für die Differentialgleichung der Biegelinie $w(x)$ gilt nach [296]

$$E \cdot I \cdot \frac{d^4}{dx^4} w(x) = q. \quad (3.9)$$

Der Elastizitätsmodul ist durch E , das Flächenträgheitsmoment durch I und die Last auf den Balken durch q gegeben. Die Variable x gibt die Position auf dem Seil an. Mit Hilfe der Heaviside-Funktion wird die Last als Flächenlast um den inneren Bereich k des Balkens modelliert:

$$E \cdot I \cdot \frac{d^4}{dx^4} w(x) = q_0 \cdot \left(\Theta \left(x - \frac{L}{2} + \frac{k}{2} \right) - \Theta \left(x - \frac{L}{2} - \frac{k}{2} \right) \right). \quad (3.10)$$

Die Flächenlast q_0 ist proportional zur auf das Seil wirkenden Kraft. Da wir annehmen, dass die Enden der Seile fest eingespannt sind, muss sowohl die Auslenkung als auch die Steigung in diesen Bereichen Null sein. Daraus ergeben sich folgende Nebenbedingungen um die Gleichung lösen zu können:

$$w(x=0) = 0 \quad w(x=L) = 0 \quad \frac{d}{dx} w(x=0) = 0 \quad \frac{d}{dx} w(x=L) = 0. \quad (3.11)$$

Unter Annahme kreisförmiger Querschnitte der Seile, ergibt sich für das Flächenträgheitsmoment

$$I = \frac{\pi \cdot d^4}{64}. \quad (3.12)$$

Daran kann man erkennen, dass die Biegelinie $w(x)$ proportional zu d^{-4} sein muss. Integriert man die Differentialgleichung, setzt die Nebenbedingungen, bestimmte Elastizitätsmoduln und Seildurchmesser ein, dann erhält man die in Abbildung 3.23 (c) gezeigten Biegelinien. Sie zeigen die theoretische Auslenkung der Seile, wenn eine Kraft von 100 nN auf den Seilen lastet. Das Verhältnis der Achsen in Abbildung 3.23 (c) wurde mit Absicht so verändert, dass die Verbiegungen besser sichtbar sind. Die theoretische Balkenauslenkung bei $x = \frac{L}{2}$ über $q_0 \propto F$ für verschiedene Elastizitätsmoduln und fast gleiche Balkendurchmesser ist in Abbildung 3.23 (d) zu sehen. Der Elastizitätsmodul wurde jeweils so gewählt, dass die theoretischen Kraft-Biegekurven mit den experimentellen übereinstimmen. Die verschiedenen Werte für das Elastizitätsmodul sind ebenfalls in Abbildung 3.23 (d) dargestellt.

Der von uns gemessene Elastizitätsmodul für PEG-DA (575 Da) weicht jedoch sehr stark von dem bisher bekannten Literaturwert ab: Brey *et al.* [259] hatten den Elastizitätsmodul auf 2 MPa bestimmt, unser Wert ist jedoch $E = 140$ MPa. Das könnte daran liegen, dass Brey *et al.* kurz belichtete Gele verwendet haben, dafür ist der gleiche Trend bei Zugabe von PETTA zu beobachten. Sowohl in unserem Fall als auch bei Brey *et al.* hat sich der Elastizitätsmodul etwa verdoppelt. Der Elastizitätsmodul für PETTA wurde von uns auf $E = 5000$ MPa bestimmt. Schuster *et al.* bestimmten den E-Modul für Pentaerythritoltriacrylat, das dem von uns verwendeten Monomer sehr ähnlich ist. Sie erhielten einen Wert von $E = 2200$ MPa [253]. In diesem Fall stimmt die Größenordnung der von uns und Schuster *et al.* bestimmten Elastizitätsmoduln überein. Daraus schließen wir, dass unsere Methode zur Bestimmung von Elastizitätsmoduln richtig sein muss.

3.6 Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man im wesentlichen die Kultivierung von Zellen einer speziellen Gewebeart. Spricht man von Zelllinien, so handelt es sich dabei um immortalisierte Zellen. Diese können sich unter bestimmten Bedingungen beliebig oft teilen. In diesem Kapitel wird kurz auf die verschiedenen Zelltypen eingegangen, wie die Kultivierung und Aussaat erfolgt und wie anschließend die Zellen immunhistochemisch gefärbt werden.

3.6.1 Zelltypen

In dieser Arbeit wurden teilweise Zellen aus vier adhärennten Zelllinien verwendet. Zellen aus Zelllinien wurden auf Grund ihrer regelmäßigeren Verfügbarkeit für Vorversuche verwendet. Die 3D Kultivierung erfolgte jedoch mit primären Hühnerfibroblasten, da sie wegen ihrer Größe und Motilität hierfür besser geeignet sind.

- Büffelrattenleberzellen (BRL) zählen zu den parenchymalen Zellen. Sie wurden 1968 aus der Leber einer 5 Wochen alten Büffelratte entnommen und kultiviert. In dieser Arbeit wurde der Subklon BRL-2A (CRL-1442) von ATCC verwendet. Als Kultivierungsmedium wird DMEM¹⁴ mit 10 % FCS¹⁵ verwendet.
- Humane Vorhautzellen (HFF, *human foreskin fibroblasts*) werden als fibroblastenartig beschrieben und stammen aus der Vorhaut neugeborener Säuglinge aus dem Jahr 2003. Sie wurden von PromoCell bezogen und werden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.
- NIH/3T3-Zellen (ATCC) sind embryonale Fibroblasten aus der Maus. Sie werden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert.
- Die embryonalen Rattenfibroblasten (REF, *rat embryonic fibroblasts*) stammen aus Rattenembryonen. Bezogen wurden sie von der Firma ATCC. Als Kultivierungsmedium wurde ebenfalls DMEM mit 10 % FCS verwendet.

Die primären Hühnerfibroblasten (PCF, *primary chicken fibroblasts*) werden aus der Rückenhaut von acht Tage alten Hühnerembryonen gewonnen. Die Bebrütung erfolgte zuvor in einem Brutschrank bei 37 °C und 60 %. Die herausgeschnittenen Hautstücke werden mit Hanksmedium gespült, in eine Petrischale mit F12-Medium (mit 10 % FCS und 2 % CS¹⁶) gegeben und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke werden auf den Boden der Petrischale gedrückt und für eine Woche im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 98 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. In dieser Zeit wachsen die Zellen aus den Gewebestücken aus und können anschließend normal kultiviert werden. Die ersten Experimente werden ab Passage¹⁷ 5 durchgeführt. Im Laufe der Zeit verlieren primäre Zellen jedoch ihre Agilität,

¹⁴DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ist ein standardisiertes Nährmedium für Zellen in Kultur.

¹⁵FCS (*fetal calf serum*) oder auch fetales Kälberserum wird aus dem Blut von Kuhfeten gewonnen. Es ist oft in Nährmedien enthalten, da es wichtig für die Zellen ist.

¹⁶CS (*chicken serum*) oder auch Hühnerserum wird aus dem Blut von Hühnern gewonnen.

¹⁷In regelmäßigen Abständen (2-3 Tage) muss das Nährmedium in der Kulturflasche erneuert werden oder die Zellen müssen abgelöst und verdünnt in neue Kulturflaschen aufgeteilt werden, wenn die Zelldichte zu hoch ist. Wird eine dieser Aktionen durchgeführt, spricht man von einer Passage.

weshalb sie maximal bis Passage 12 verwendet werden. Als Kultivierungsmedium wird F12-Medium mit 10 % FCS und 2 % CS verwendet. Die Gewinnung und Kultivierung der primären Hühnerfibroblasten erfolgte durch Stephanie Frank.

3.6.2 Routine Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien und der primären Hühnerfibroblasten erfolgt unter Standardbedingungen. Die Temperatur im Inkubator beträgt 37 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 98 %. Zusätzlich wird Kohlenstoffdioxid (5 %) zum puffern eingeleitet. Zudem müssen die Zellen dreimal pro Woche unter sterilen Bedingungen passagiert werden. Für die entsprechenden Zelltypen werden die in Kapitel 3.6.1 genannten Medien verwendet.

Um die Zellen von der Kulturflasche abzulösen, werden sie zweimal mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS¹⁸) gewaschen, mit 150 µl Trypsin/EDTA (1:5 in HBSS, Invitrogen) bedeckt und für 2-4 Minuten im Brutschrank inkubiert. Um die Trypsin/EDTA-Lösung zu inaktivieren, werden die Zellen in 5 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 U min⁻¹ abzentrifugiert. Das restliche Medium wird abgesaugt und das Zellpellet wird in 5 ml Medium resuspendiert. Am Ende werden neue Kulturflaschen mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:15) befüllt und in den Brutschrank gestellt.

3.6.3 Aufbringen der Zellen auf die Substrate

Als erstes werden die Substrate in Ethanol (70%) gewaschen um Keime abzutöten. Nach dem Waschen mit PBS, werden die Strukturen für 30 Minuten mit 200 µl einer Fibronectin-Lösung (10 µg ml⁻¹) bedeckt und danach wieder mit PBS gewaschen. Falls die Proben nicht schon vorher mit Bt-FN oder Bt-VN beschichtet wurden. Die Zellen werden von den Kulturschalen gelöst, in serumhaltigem Medium gewaschen, zentrifugiert und auf den Substraten ausgesät (siehe auch Kapitel 3.6.2). Nach zweistündiger Kultivierung, werden die Zellen für zehn Minuten in einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung in PBS fixiert.

3.6.4 Immunhistochemie

Damit die Farbstoffe ins Innere der Zelle gelangen können, wird die Zellmembran durch dreimaliges Waschen mit PBS-Triton¹⁹ permeabilisiert. Um verschiedene Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, werden diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: die indirekte und die direkte Immunfärbung. Bei der indirekten Immunfärbung wird das Protein zuerst mit einem primären Antikörper markiert. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, an den primären Antikörper gekoppelt, weil sich der sekundäre Antikörper nur gegen das Antigen des primären Antikörpers richtet. Bei der direkten Immunfärbung koppeln Substanzen, die schon mit dem Farbstoff markiert sind oder eine Autofluoreszenz aufweisen, direkt an das

¹⁸PBS ist eine Pufferlösung, die den pH-Wert konstant auf 7,4 hält. Dieser entspricht dem osmotischen Druck von Zellen und soll ein Platzen oder Austrocknen der Zellen während der Kultivierung verhindern.

¹⁹PBS-Triton ist PBS das 0,1% Triton X-100 enthält.

Protein. Die Antikörper werden in 1 % BSA in PBS verdünnt. Die Zellen wurden auf folgende Art und Weise immunhistochemisch gefärbt:

- Fibronectin wird über indirekte Immunfärbung erst mit Anti-Fibronectin (1:400) markiert. Am Anti-Fibronectin haftet das Antigen Ziege Anti-Hase das mit Cy3²⁰ versehen ist (1:500).
- Paxillin (fokales Adhäsionsprotein) wird zuerst mit Anti-Paxillin (1:500) markiert, an welches der mit dem Farbstoff Cy5²⁰ versehene Antikörper Ziege Anti-Maus (1:200) haftet.
- Aktin wird über direkte Immunfärbung markiert. Dazu wird Phalloidin²¹, das mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488²² verbunden ist benutzt (1:200).
- Der Zellkern wird mit DAPI²³ über eine direkte Immunfärbung eingefärbt (1:1000).

Für die Immunfärbung werden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Triton, werden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den fluoreszierenden direkten und sekundären Antikörpern inkubiert. Zum Schluss werden die Deckgläser mit Mowiol²⁴ kopfüber auf Objektträger eingebettet und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss zum Aushärten aufbewahrt. Nach dem Mikroskopieren werden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.7 Mikroskopie

Die fluoreszenten Proben wurden mit einem Zeiss LSM 510 Meta mikroskopiert.

Die 3D Rekonstruktionen der Konfokalschnitte wurden mit dem Programm Volocity (Version 4.3.2, Perkin Elmer) erstellt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss SUPRA 55VP erstellt.

²⁰Cy3 und Cy5 sind Fluoreszenzfarbstoffe. Sie gehören zu den geschlossenkettigen Cyaninen. Die Zahl gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen den beiden Indol-Verbindungen an. Cy3 absorbiert maximal bei 550 nm und emittiert bei 570 nm. Cy5 hat sein Absorptionsmaximum bei 649 nm und sein Emissionsmaximum bei 670 nm.

²¹Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilzes und bindet an F-Aktin.

²²Alexa Fluor 488 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach seinem Erfinder Alex Haugland benannt wurde. Er absorbiert maximal bei 495 nm und emittiert bei 519 nm.

²³4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA des Kerns bindet.

²⁴Mowiol ist ein wasserlöslicher Polyvinylalkohol. Das hier verwendete Mowiol enthält außerdem als Antioxidationsmittel noch Propylgallat.

Kapitel 4

Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist es Mikrostrukturen herzustellen und diese selektiv zu funktionalisieren. Dadurch werden Zellen nur wohl definierte Anheftungspunkte zur Verfügung gestellt, an denen sie Zell-Matrix-Kontakte ausbilden können.

Im ersten Unterkapitel werden die Ergebnisse der radikalisch polymerisierten Fotolacke vorgestellt. Es werden erste Strukturen aus dem Fotolack BR12¹ gezeigt und auf dessen protein- und zellabweisenden Eigenschaften eingegangen. Als nächstes wird die Zellkompatibilität und mögliche Anwendungen des Ormocomp- und PETA-Fotolacks² demonstriert. Anschließend werden dreidimensionale Kompositstrukturen aus zwei verschiedenen Lacken gezeigt und auf die Schwierigkeiten bei deren Herstellung eingegangen. Zuletzt werden in diesem Unterkapitel Strukturen gezeigt, mit denen man die Möglichkeit hat, Kontraktionskräfte von Zellen in einer 3D Umgebung durch Verformung der Struktur zu messen. Die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Strukturen werden mit Hilfe eines Raster-Kraft-Mikroskops (AFM) charakterisiert um aus der Verformung auf die jeweiligen Kräfte zu schließen.

Im zweiten Unterkapitel wird auf den Thiol-En-Fotolack eingegangen. Als erstes wird wieder die Zellkompatibilität getestet und anschließend 3D Kompositstrukturen gezeigt. Weiterhin wird diskutiert in wie weit sich der Fotolack für nachfolgende Experimente eignet.

Im letzten und wichtigsten Unterkapitel werden die Ergebnisse zur selektiven Funktionalisierung mittels Photoenol-Chemie gezeigt. Nach ersten Vorversuchen wird gezeigt, dass eine Zwei-Photonenabsorption (2PA) durch das Photoenol-Molekül möglich ist. Dadurch können 3D Mikrostrukturen mit einem oder mehreren Molekülen selektiv funktionalisiert werden. Zu guter Letzt werden Zellversuche in Verbindung mit Photoenol-silanisierten Deckgläsern und 3D Strukturen gezeigt, wobei auf die Schwierigkeiten bei der Passivierung der Oberflächen gegen Proteinadsorption und Zelladhäsion eingegangen wird. Es wird jedoch eine Methode gezeigt

¹Als BR12 wird der Fotolack aus PEG-DA ($M = 575 \text{ g mol}^{-1}$) mit 4,8 gew.% PETTA bezeichnet. Ist von den reinen Polyethylenglykoldiacrylat-Fotolacken die Rede, werden diese als PEG575 oder PEG700 bezeichnet. Dabei gibt die Zahl die jeweilige Molekularmasse des Monomers an. Alle PEG-basierten Fotolacke enthalten zusätzlich 3 gew.% Irgacure 369 als Fotoinitiator.

²Äquivalent zu den PEG-basierten Fotolacke enthält der PETA/PETTA-Fotolack noch einen Fotoinitiator. Für die PETA/PETTA-Fotolacke hat sich Irgacure 379 als Optimum herausgestellt. Der Fotolack enthält 3 gew.% Irgacure 379.

mit der man perfekt passivierende Oberflächen erhalten kann. Diese Methode wird noch auf selektiv funktionalisierte 3D Strukturen angewandt, womit eine selektive Adhäsion von Zellen erreicht wird.

4.1 Radikalisch polymerisierte Fotolacke

4.1.1 PEG-DA als passivierender Fotolack

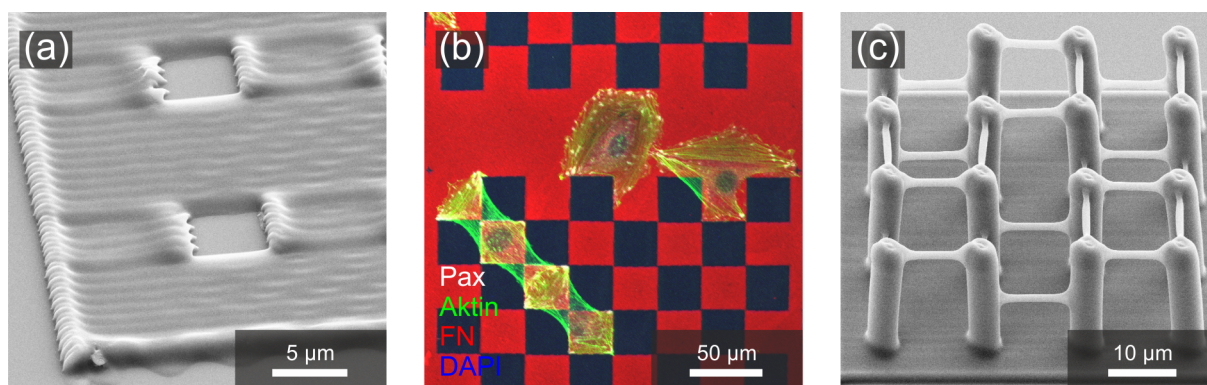


Abbildung 4.1: (a): REM-Bild einer 2D Struktur, die aus PEG700 hergestellt wurde. (b): Fluoreszenzaufnahme eines Schachbrettmusters, das aus BR12 hergestellt wurde. Weder Fibronectin (rot) noch die darauf kultivierten NIH/3T3-Zellen (Aktin: grün, Zellkern: blau, Paxillin: weiß) adhären auf dem protein- und zellabweisenden Fotolack. (c): REM-Bild einer 3D Struktur, die aus BR12 hergestellt wurde.

Um zu testen ob BR12 wirklich protein- und zellabweisend ist, wurden zuerst zweidimensionale Strukturen für Zellversuche hergestellt. Dabei orientierten wir uns an den in der Zellbiologie üblichen zweidimensionalen Substraten, die mit dem μ CP-Verfahren hergestellt werden [8]. In diesem Fall erfolgte die Passivierung durch den Fotolack BR12, da Glas bereits Proteinadsorption und Zelladhäsion erlaubt. Die lackfreien Stellen sind $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ groß und wiederholen sich in beide Raumrichtungen alle $15\ \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 4.1 (a)). Zudem wurden schachbrettartige Strukturen hergestellt (Abbildung 4.1 (b)).

Die Beschichtung mit Fibronectin und die Zellkultivierung erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Fibronectin befand sich nur auf dem Glassubstrat und nicht auf den Strukturen. Auf vielen Strukturen reagierten die Zellen wie erwartet. Sie mieden die mit BR12 bedeckten Bereiche und bildeten ausschließlich Fokalkontakte auf dem mit FN beschichteten Glas. Es wurde beobachtet, dass die Zellen ihre Morphologie an die adhäsive Umgebung anpassten. Auf den FN beschichteten Bereichen (BR12 frei) bildeten die Zellen starke Aktinfasern entlang der Fokalkontakte (siehe Abbildung 4.1 (b)).

Analog zu den 2D-Versuchen wurden auch 3D-Versuche mit BR12 durchgeführt (siehe Abbildung 4.1 (c)). Bei diesen ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen auf den 3D-Strukturen keine Paxillin-Kontakte bilden. Auch das Fibronectin haftete nicht an der Oberfläche des BR12-Lacks. Somit konnte gezeigt werden, dass Zellen über 3D BR12-Strukturen wachsen, es jedoch meiden, Zell-Matrix-Kontakte auf ihnen zu bilden (nicht

dargestellt).

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Silanisierung mit dem Si-Methacrylat auch auf die Zellversuche positiv auswirkt. Alle Strukturen haften am Glassubstrat und wurden nicht von Fibronectin unterwandert. Die Strukturen sind im blauen Kanal und je nach Mikroskop und Aufnahmeeinstellung auch im grünen Kanal autofluoreszent. Wichtig ist nur, dass sie im Bereich längerer Wellenlängen keine Autofluoreszenz aufweisen, da hier die Cy3- bzw. Cy5-Farbstoffe die Proteine Fibronectin und Paxillin markieren. Diese Färbungen weisen eine geringe Intensität auf und bereits eine minimale Autofluoreszenz führt dazu, dass die Proteinsignale nicht mehr eindeutig sind. Zudem ist es auch nicht möglich, die fertigen Strukturen mit einer UV-Lampe auszubleichen.

Das Silan enthält polare und unpolare Anteile, weshalb Fibronectin an den unpolaren Enden der silanisierten Oberfläche haftet. Die Zellen reagierten so wie erwartet. Sie bildeten in den BR12-freien Zwischenräumen Fokalkontakte aus. Auf großflächigeren Bereichen neben den Strukturen verhalten sich die Zellen wie auf homogen mit Fibronectin beschichtetem Glas. Somit kann man sagen, dass die Silanisierung mit dem Si-Methacrylat keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität hat.

Man sollte in regelmäßigen Abständen die passivierenden Eigenschaften des BR12-Lacks mit den oben genannten Teststrukturen überprüfen, da es von Zeit zu Zeit vorkommt, dass diese verloren gehen. Eine genaue Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Es wird vermutet, dass durch häufiges öffnen und herausnehmen des Lackes aus dem Behältnis Schmutz hinein gelangt. Diese Verunreinigung könnte dazu führen, dass der Lack nicht mehr hydrophil genug ist um eine Proteinadsorption und Zelladhäsion zu verhindern. Zudem könnte sein, dass die Moleküle mit der Zeit degradieren.

4.1.2 Ormocomp und PETA/PETTA als zellkompatible Fotolacke

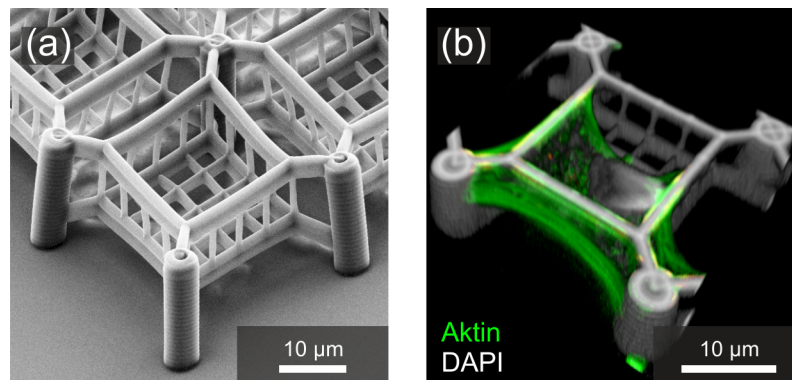


Abbildung 4.2: (a): REM-Bild einer Boxringstruktur, die aus Ormocomp hergestellt wurde. (b): 3D-Rekonstruktion aus Konfokalschnitten einer Boxringstruktur (Autofluoreszenz in weiß dargestellt) in der eine Zelle (Aktin: grün, Zellkern: weiß) kultiviert wurde. Abbildung nach [2].

Es wurde zwar schon in mehreren Publikationen gezeigt, dass ORMOCERE oder im speziellen Ormocomp biokompatible Fotolacke sind [5, 185], jedoch sollte dies hier noch einmal gezeigt werden und kurz auf mögliche Anwendungen eingegangen werden.

Abbildung 4.2 (a) zeigt ein REM-Bild einer Boxringstruktur. Die Anwendung einer solchen Struktur ist folgende:

Die komplex aufgebaute Struktur besteht aus vielen miteinander verbundenen Streben und bilden eine Art Auffangkorb für Zellen. Dieser ist wiederum an stabilen Säulen aufgehängt. So ist es möglich den Durchmesser der Streben zu variieren. Das hat zur Folge, dass die frei schwebenden Boxringe in ihrer Steifigkeit beeinflusst werden können. Man kann auch sehr definiert unterschiedliche Bereiche dicker oder dünner gestalten um eine asymmetrische Struktur zu erhalten. Zellen, die in diesen Strukturen kultiviert werden, müssten auf Grund der Symmetriebrechung unterschiedlich reagieren.

Dass es prinzipiell möglich ist, Zellen in diesen 3D Strukturen zu kultivieren kann man in Abbildung 4.2 (b) sehen. Der Kardiomyoblast (Aktin: grün) nimmt die Struktur an und wächst in ihr. Dass er sich vollkommen im Boxring befindet, kann man daran sehen, dass der Zellkern (weiß) von der netzartigen Struktur gehalten wird. Die Maschenweite ist so gering, dass der Zellkern nicht hindurch gelangt. Die Zelle ist mehr oder weniger in der Struktur gefangen. Sie kann jedoch mit Hilfe ihres Zytoskeletts die Plasmamembran durch die dünnen Maschen ausdehnen und ihre Umgebung weiter erkunden.

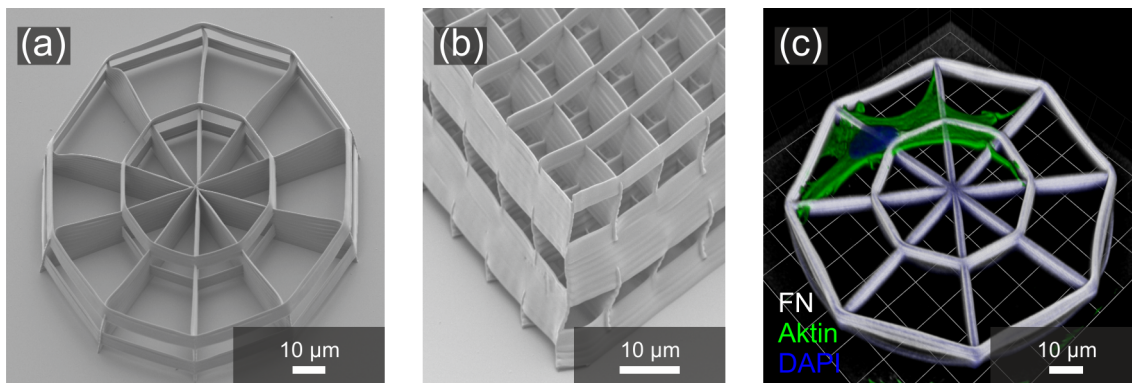


Abbildung 4.3: (a): REM-Bild einer Radstruktur, die aus PETTA hergestellt wurde. (b): REM-Bild einer Gitterstruktur, die aus PETTA hergestellt wurde. (c): 3D-Rekonstruktion aus Konfokalschnitten einer Radstruktur (sichtbar, weil die Struktur mit Fibronectin (weiß) beschichtet wurde) in der eine HFF Zelle (Aktin: grün, Zellkern: blau) kultiviert wurde. Abbildung nach [2].

Wir [2, 6, 266] und andere [253, 297] konnten zeigen, dass man aus PETA/PETTA³ einen biokompatiblen Fotolack herstellen kann. Das neue in dieser Arbeit ist jedoch nicht die verschiedenen Lacke auf Biokompatibilität zu testen, falls das schon vorher gezeigt wurde, sondern eine passende Anwendung für diese Lacke zu finden.

In Abbildung 4.3 (a) und (b) sind REM-Bilder einer Rad- und Gitterstruktur aus PETTA zu sehen. Aufgrund des hohen Elastizitätsmoduls des Lackes lassen sich wohldefinierte, harte Strukturen herstellen. Die Kräfte, die Zellen ausüben können, sind zu gering um Teile der Struktur zu verbiegen. In einem solchen Fall ist die Zelle gezwungen die vorgegebene Form anzunehmen. Ein interessanter Aspekt an der Radstruktur sind die unterschiedlichen Winkel zwischen den Streben. Hinzu kommt, dass der Zelle entweder kleinere, dreieckige oder größere, trapezförmige Kompartimente zur Verfügung stehen. Zudem besteht die Möglichkeit zwischen der oberen und unteren Strebe in ein anderes Kompartiment zu gelangen. Werden nun solche Radstrukturen mit Fibronectin beschichtet und z. B. HFF Zellen darauf kultiviert, sind die oben beschriebenen Behauptungen zu beobachten. HFF Zellen sind eher große Zellen⁴, weshalb sie sich eher in den größeren Kompartimenten aufhalten oder über die ganze Struktur ausbreiten. Die in Abbildung 4.3 (c) gezeigte Zelle schiebt auch einen Teil ihres Zytoskeletts durch die Streben. Da HFF als fibroblastenartig beschrieben werden, eignen sich die 3D Strukturen als Zellsubstrate. Zudem bilden die HFF-Zellen auch Zell-Matrix-Kontakte an den Strukturen (nicht gezeigt).

Die Nachteile der beiden Fotolacke liegen klar auf der Hand. Man kann die Zellen weder dazu bringen perfekt in die Strukturen einzuwachsen, noch kann man die Adhäsionspunkte gezielt bestimmen, weil die Strukturen homogen mit EZM-Proteinen beschichtet werden. An diesem Punkt setzt die selektive Funktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen an.

³Hier könnte man noch Trimethylolpropantriacrylat erwähnen, das von seiner Molekülstruktur dem PETA sehr ähnlich ist.

⁴Die HFFs können auf flachen Substraten einen Durchmesser von 100 µm erreichen.

4.1.3 Zweikomponentenstrukturen

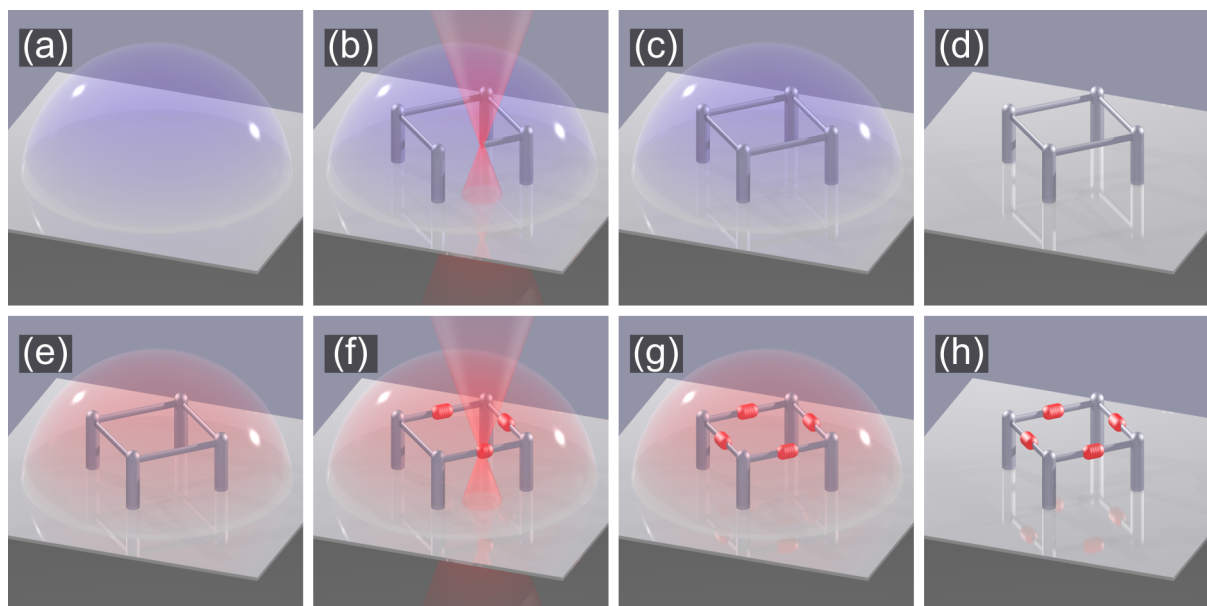


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung zur Herstellung dreidimensionaler Zweikomponentenstrukturen. (a): Aufbringen des passivierenden Fotolacks auf das Deckglas. (b): Im Fokus des Lasers polymerisiert der Lack. (c): Polymerstruktur in dem flüssigen Lack. (d): 3D Mikrostruktur nach dem Entwickeln. (e): Bedecken der passivierenden Struktur mit Ormocomp. (f): Direktes Laserschreiben von Punkten an die Seile des Grundgerüsts. (g): Zweikomponentenstruktur im Ormocomp-Fotolack. (h): Fertige Zweikomponentenstruktur nach dem Entwickeln. Abbildung nach [2].

Um die Reproduzierbarkeit der 3D-Funktionalisierung zu erhöhen, wurden die Deckgläser nach dem ersten DLS-Schritt (Abbildung 4.4 (a)-(d)) nicht mehr aus dem Halter ausgebaut. Die Proben wurden im Halter entwickelt. Dazu muss das Immersionsöl und der Fotolack mit Isopropanol heruntergespült und der Halter und das Deckglas mit Stickstoffgas getrocknet werden. Wird die Probe nun ein zweites mal mit dem Objektiv angefahren, befindet man sich an der richtigen Stelle und die Probe hat die richtige Orientierung. So ist eine präzise Funktionalisierung der Seile mit dem adhäsiven Lack problemlos möglich (Abbildung 4.4 (e)-(h)).

Um eine 3D-Funktionalisierung zu erreichen wurde eine Struktur mit Seilen auf zwei Höhen hergestellt (siehe Abbildung 4.5). Befindet sich nun eine Zelle auf dieser Struktur, kann sie sich in alle drei Raumrichtungen ausbreiten. Die Ormocomp-Punkte in Abbildung 4.5 (b)-(c) geben ihr dann vor, wo sie Zell-Matrix-Kontakte bilden kann. Der Abstand von Säulenmitte zu Säulenmitte beträgt $15\ \mu\text{m}$. Die oberen Seile sind auf einer Höhe von $23\ \mu\text{m}$. Der Höhenunterschied der Seile beträgt $10\ \mu\text{m}$. Die Punkte sind ca. $2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$ groß.

Um die Seile in den Fluoreszenzaufnahmen sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Cumarin 102⁵ (Sigma Aldrich) in den BR12-Lack gemischt. Cumarin 102 eignet sich hierfür, weil

⁵Cumarine sind fluoreszierende Farbstoffe.

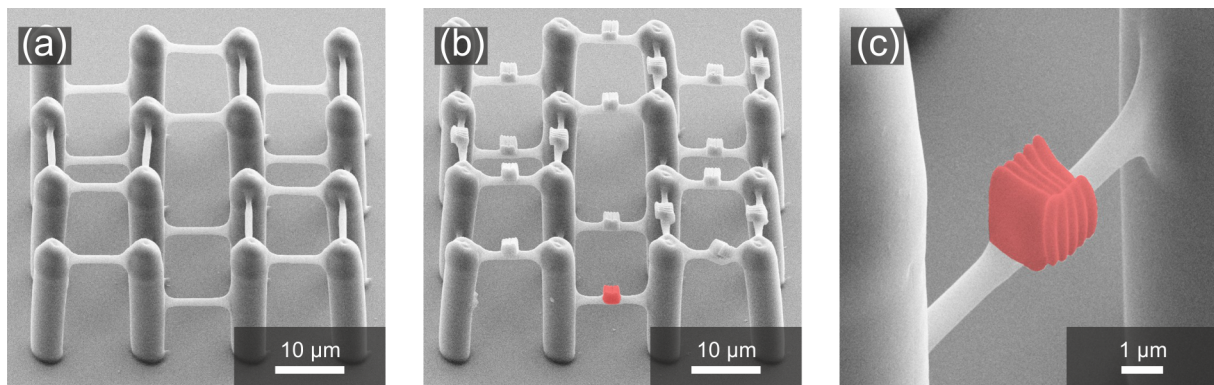


Abbildung 4.5: (a): REM-Bild einer Struktur aus BR12 undOrmocomp. Die Seile befinden sich auf zwei verschiedenen Höhen. (b): REM-Bild einer ähnlichen Struktur. An die Seile wurden Punkte ausOrmocomp geschrieben. Einer dieser Punkte wurde rot eingefärbt. (c): Nahaufnahme einesOrmocomp-Punktes (rot eingefärbt). Abbildung nach [266].

es vom Absorptions- und Emissionsbereich (390 nm bzw. 466 nm) sehr gut mit DAPI übereinstimmt. So dient der Farbstoff im Lack zur Unterstützung der Eigenfluoreszenz von BR12. Es wurde weiterhin die gleiche Struktur hergestellt, nur dass im ersten DLS-Schritt die Säulen aus normalem BR12 geschrieben wurden, in einem zweiten Schritt wurden die Seile mit dem eingefärbten BR12-Lack geschrieben und zum Schluss wurden die Punkte ausOrmocomp an die Seile geschrieben. In Abbildung 4.6 (a) ist eine Konfokalmikroskopaufnahme einer solchen Struktur zu sehen auf der Fibroblasten (PCF) kultiviert wurden. Der Abstand von Säulenmitte zu Säulenmitte wurde bei diesen Strukturen auf 20 μm erhöht. Dadurch wird es der Zelle erschwert, sich über mehrere Säulen hinweg auszubreiten. Da sie sich zwischen denOrmocomp-Punkten aufspannen soll.

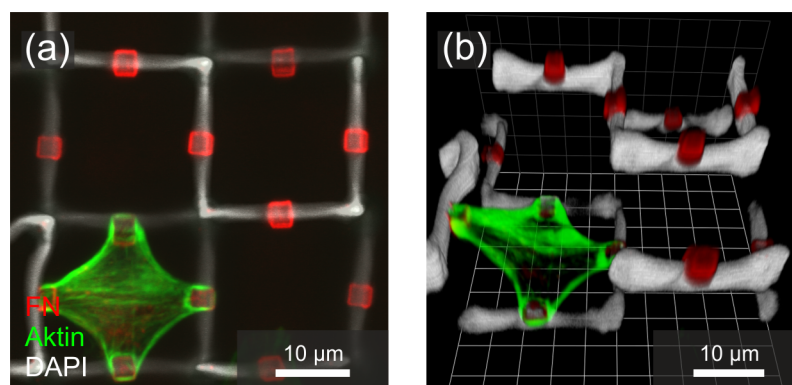


Abbildung 4.6: (a): Maximalprojektion einer Struktur aus BR12 undOrmocomp auf der Fibroblasten kultiviert wurden. Die Seile befinden sich auf unterschiedlichen Höhen. Dem Lack, aus dem die Seile sind wurde Cumarin 102 beigemischt, um die Seile besser sichtbar zu machen. BR12 (weiß), Fibronectin (rot), Aktin (grün). (b): 3D-Rekonstruktion aus den Konfokalschnitten. Der Fibroblast spannt sich bogenförmig zwischen denOrmocomp-Punkten auf. Drei Punkte befinden sich auf einer Höhe, der vierte ist 10 μm weiter oben. Abbildung nach [266].

Abbildung 4.6 zeigt eine Zelle in einer solchen Struktur. Anhand der Maximalprojektion (Abbildung 4.6 (a)) kann man erkennen, dass sich diese Zelle zwischen vierOrmocomp-Punkten aufspannt. Die 3D-Rekonstruktion aus den Konfokalmikroskopaufnahmen zeigt, dass

sich drei dieser Punkte auf einer Ebene befinden und der vierte $10\ \mu\text{m}$ weiter oben ist. Es ist also durch die Kombination verschiedener Fotolacke möglich, einer Zelle eine wohldefinierte, dreidimensionale Umgebung zu schaffen, an der sich die Zelle anpasst. In Abbildung 4.6 sieht man keine Säulen, weil im eingefärbten BR12-Lack zu viel Cumarin 102 enthalten ist. Der eingefärbte BR12-Lack wurde deshalb für weitere Versuche nicht verwendet.

In Abbildung 4.7 sind REM-Bilder von Fibroblasten in Strukturen mit verschiedenen hohen Seilen zu sehen. REM-Bilder haben gegenüber Konfokalbildern den Vorteil, dass man in kürzerer Zeit mehrere Strukturen aufnehmen kann. Durch das Kippen des Probenhalters im REM erhält man einen dreidimensionalen Eindruck der Struktur und Zelle. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Auflösung des REM. Der Nachteil im Vergleich zu den Konfokalmikroskop-Bildern ist, dass man die Proteine nicht sichtbar machen kann und somit auch nichts über das Innere der Zelle aussagen kann. Um Zellen im REM unter Vakuum betrachten zu können, müssen die Zellen superkritisch getrocknet werden, so behalten sie Form und Volumen. Zudem sind filigrane Ausläufer der Zelle, wie z.B. die Filopodien in Abbildung 4.7 (a) und (c), weiterhin gut sichtbar.

In Abbildung 4.7 (a) ist zu sehen, wie die Zellen ihre Umgebung abtasten und verstärkt an die Ormocomp-Punkte binden und an diesen ziehen. Da sich am Boden des Substrats verhältnismäßig viel FN befindet, breiten sich die Zellen auch über die passivierende Struktur aus. Deshalb sitzen sie nicht nur wie in den Abbildungen 4.6 zwischen den Seilen. Beim Aussäen der Zellen ist eine adäquate Zellzahl zu wählen, um Einzelzellen in den Strukturen zu erhalten.

Die Fibroblasten in Abbildung 4.7 (b) und (c) wachsen ebenfalls vom Boden aus über die Strukturen, ziehen aber an den Ormocomp-Punkten, so dass sich die Seile um einige Mikrometer verbiegen. Auf den REM-Bildern kann man nicht erkennen ob die Zellen auch Zell-Matrix-Kontakte auf der Struktur aus BR12 ausbilden. Sie zeigen jedoch, wie groß die Kräfte sind, die von einer Zelle aufgebracht werden können, wenn ihr genug Fibronectin zur Verfügung steht.

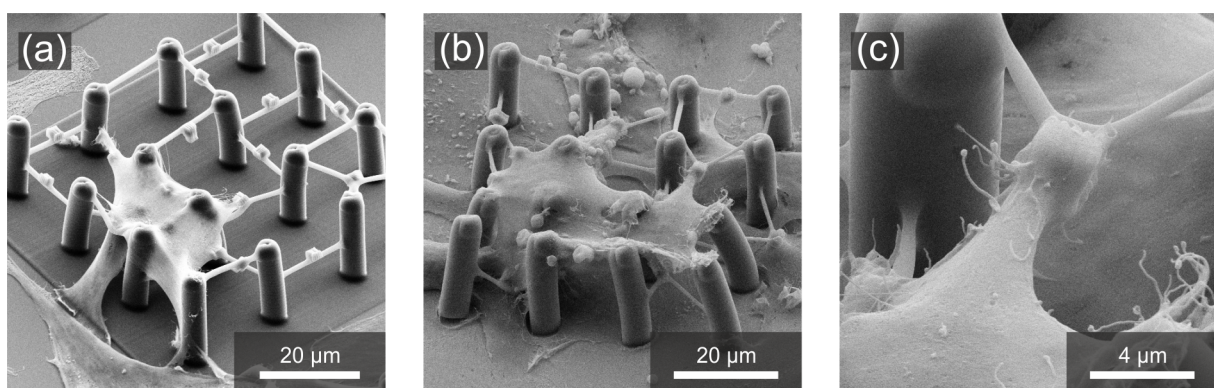


Abbildung 4.7: REM-Bilder von Fibroblasten in Kompositstrukturen. (a): Die Zelle richtet ihre Aktinfilamente auf den Ormocomp-Punkt in der Mitte des Bilds und zieht daran. (b): Die Zellen wachsen über die Strukturen, ziehen aber gezielt an den Ormocomp-Punkten an den Seilen. (c): Nahaufnahme eines Ormocomp-Punkts an dem die Zelle Zell-Matrix-Kontakte bildet und Kräfte auf ihre Umgebung ausübt.

4.1.4 Kraftmessungen in 3D

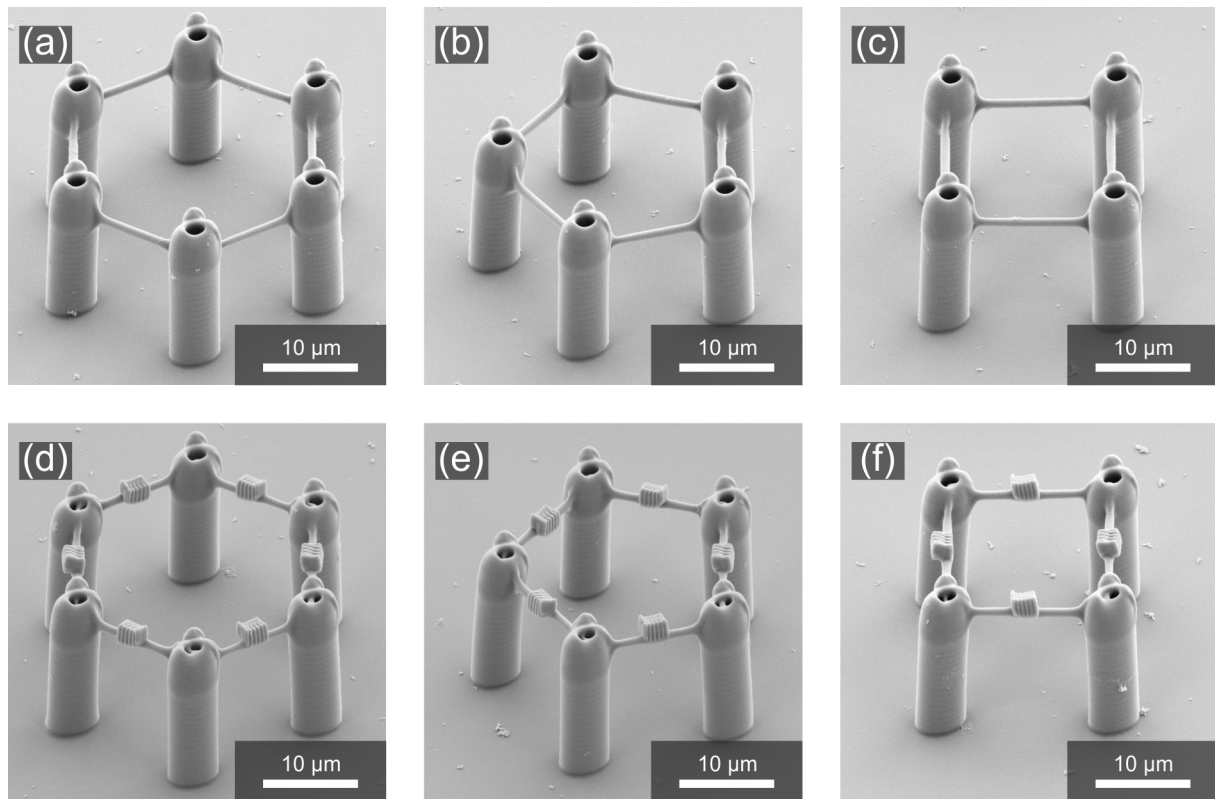


Abbildung 4.8: REM-Bilder der reinen BR12-Strukturen (oben) und der Kompositstrukturen aus BR12 und Ormocomp (unten). (a)+(d): Sechseck. (b)+(e): Fünfeck. (c)+(f): Quadrat.

Wie am Ende des vorherigen Kapitels zu sehen war, sind die primären Hühnerfibroblasten in der Lage die Seile der 3D Strukturen zu verformen. Die dickeren Säulen waren davon weniger betroffen. Sie blieben in der Regel in ihrer Ausgangsposition. Außer in Abbildung 4.7 (b). Hier wachsen jedoch mehrere Fibroblasten über die gesamte Struktur und können deshalb größere Kräfte ausüben. Befindet sich nur eine Zelle zwischen den Seilen an den Punkten, sind die Kontraktionskräfte so gering, dass nur die Seile verformt werden.

Deshalb wurden Kompositstrukturen mit verschiedenen angeordneten Ormocomp-Punkten hergestellt, um herauszufinden wie Zellen darauf reagieren (Abbildung 4.8). Die Säulen sind ca. 20 µm hoch und haben einen Durchmesser von 6 µm. Die Seile zwischen den Säulen sind ca. 1 µm dick. Alle Punkte sind gleich groß (ca. 2 µm × 2 µm × 2 µm) und haben zu ihrem nächsten Nachbar einen festen Abstand von 13 µm. Dieser festgelegte Abstand wurde in verschiedenen Vorversuchen ermittelt, in denen gezeigt wurde, dass PCF 13 µm im freien Raum noch gut überbrücken können. Ist der Abstand größer, können sich die Zellen nicht richtig ausbreiten und haben zu wenig Fibronectin zur Verfügung. Dies führt unweigerlich zur Apoptose. Ist der Abstand geringer, sitzen die Zellen nur auf den Punkten/Strukturen und spannen sich nicht zwischen den Punkten auf. So werden keine Aktinstressfasern gebildet und auch keine Kontraktionskräfte auf die Ankerpunkte ausgeübt (nicht gezeigt). Ein konstanter Abstand von 13 µm zwischen den Punkten hat zudem den Vorteil, dass die folgenden Ergebnisse besser miteinander zu vergleichen sind.

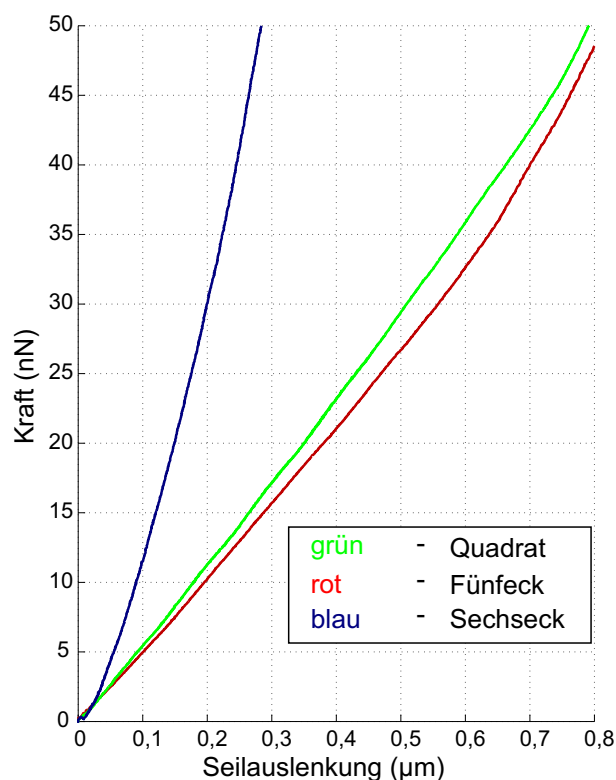


Abbildung 4.9: Kraft-Biegekurven aus AFM Messung mit denen man die benötigte Kraft für bestimmte Seilauslenkungen bestimmen kann.

Mit Hilfe von REM-Bildern konnte bereits herausgefunden werden, dass die Strukturen optisch reproduzierbar sind. Die Seile haben immer die gleiche Dicke und auch die Punkte sahen identisch aus und befanden sich immer an der gleichen Stelle.

Um die Strukturen mechanisch zu charakterisieren wurden sie zuerst bei 37 °C für zwei Stunden in Zellkulturmedium gelegt, damit sie von der Beschaffenheit den Strukturen inklusive Zellen in Kultur ähneln. Das ist notwendig, weil der BR12-Lack in wässrigen Lösungen anschwillt und sich der Elastizitätsmodul ändert. Auch während der Messung der Kraft-Biegekurven mit dem AFM befanden sich die Proben in Zellkulturmedium und die Temperatur wurde auf 37 °C gehalten⁶. Die Berechnung der endgültigen Daten (Abbildung 4.9) erfolgte wie in Kapitel 3.5 beschrieben.

Es wurden für mehrere gleiche Strukturen Messungen durchgeführt. Alle Kraft-Biegekurven hatten einen ähnlichen Verlauf. Die in Abbildung 4.9 dargestellten Kurven zeigen für den jeweiligen Strukturtypen charakteristische Messungen und dienen zur Orientierung, in welchem Größenbereich die Kontraktionskräfte der Zellen liegen. Es ist jedoch deutlich zu sehen, dass zur Verbiegung der Seile des Sechsecks größere Kräfte nötig sind als für eine gleich große Verbiegung im Fünfeck oder Quadrat. Das liegt an den kürzeren Seilen.

⁶Die AFM Messungen wurden von Clemens Franz (*Leader Young Scientist Group Nanobiology, CFN*) durchgeführt

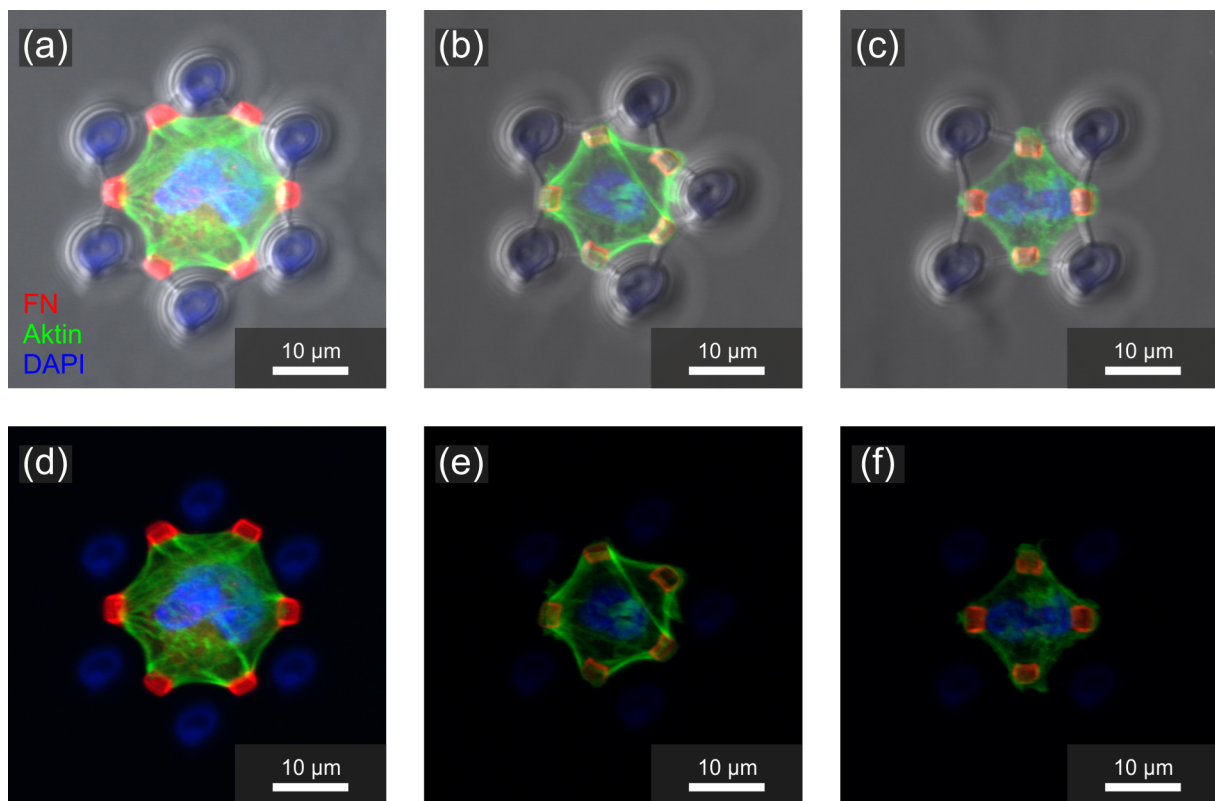


Abbildung 4.10: Maximalprojektionen aus Konfokalschnitten der Vieleck-Strukturen in denen PCFs kultiviert wurden. Aktin (grün), Fibronectin (rot), Zellkern (blau). (a)-(c): Zusätzliche Überlagerung mit dem DIC-Bild um die Verbiegung der Seile sichtbar zu machen. (d)-(f): Reine Fluoreszenzbilder in denen die Aktinstressfasern und die selektive Adhäsion der Zellen an die Ormocomp-Punkte deutlicher zu sehen ist.

Die in Abbildung 4.8 gezeigten Strukturen wurden für 30 Minuten mit Fibronectin beschichtet. Es folgte eine zweistündige Kultivierung mit PCF. Die Zellen wurden fixiert, gefärbt und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Viele Zellen spannten sich perfekt zwischen den Ormocomp-Punkten auf, kontrahierten und verbogen so die Seile zwischen den Säulen. Sie bildeten nicht nur Aktinstressfasern zu den nächsten Nachbarn (Adhäsionspunkten) sondern auch teilweise zu gegenüberliegenden (Abbildung 4.10 (e)). Nicht alle Zellen adhärten an allen zur Verfügung stehenden Ormocomp-Punkten (siehe Abbildung 4.11). Hätte man die Zellen länger kultiviert, hätten sie vielleicht ihre komplette Umgebung erkundet und an die restlichen mit Protein beschichteten Punkte adhärten. Die Idee war es jedoch, Zellen, die eine unterschiedliche Anzahl von Adhäsionspunkten im dreidimensionalen Raum besitzen, miteinander zu vergleichen. Es war auch interessant zu sehen ob sich die dadurch geänderte Geometrie auf die Kontraktionskräfte auswirkt. Bei der Wahl der auszuwertenden Zellen wurde darauf geachtet, dass es sich um einzelne (nur ein Zellkern) und nur in der Struktur wachsende (kein Kontakt zum Boden) Zellen handelt.

Zur Berechnung der Verbiegung der Seile wurden die DIC-Aufnahmen der deformierten Struktur mit einer DIC-Aufnahme einer leeren überlagert und der minimale Abstand zwischen dem Mittelpunkt des ausgelenkten und nicht ausgelenkten Ormocomp-Punktes gemessen. Die Auswertung für die Quadrat- und Fünfeck-Strukturen ist in Abbildung 4.11 zu sehen. Die Auswertung der Sechsecke erwies sich als unmöglich, da die Auslenkung der Seile zu

gering war und sich Größenordnungsmäßig nahe der Auflösungsgrenze bewegte. Es wurde die Seilauslenkung pro Seil für die verschiedenen Strukturen und für unterschiedliche Anzahlen von Adhäsionspunkte aufgetragen. Betrachtet wurden Zellen die in den Fünfecken an allen, an vier oder an drei und in den Quadraten an allen oder drei Ormocomp-Punkten adhären. Überraschenderweise waren die Seilauslenkungen pro Seil für die verschiedenen Fälle gleich. Das bedeutet, dass die insgesamt aufgebrauchten Kontraktionskräfte unterschiedlich sind und mit der Anzahl der Adhäsionspunkte und somit mit der Menge an Fibronectin korrelieren.

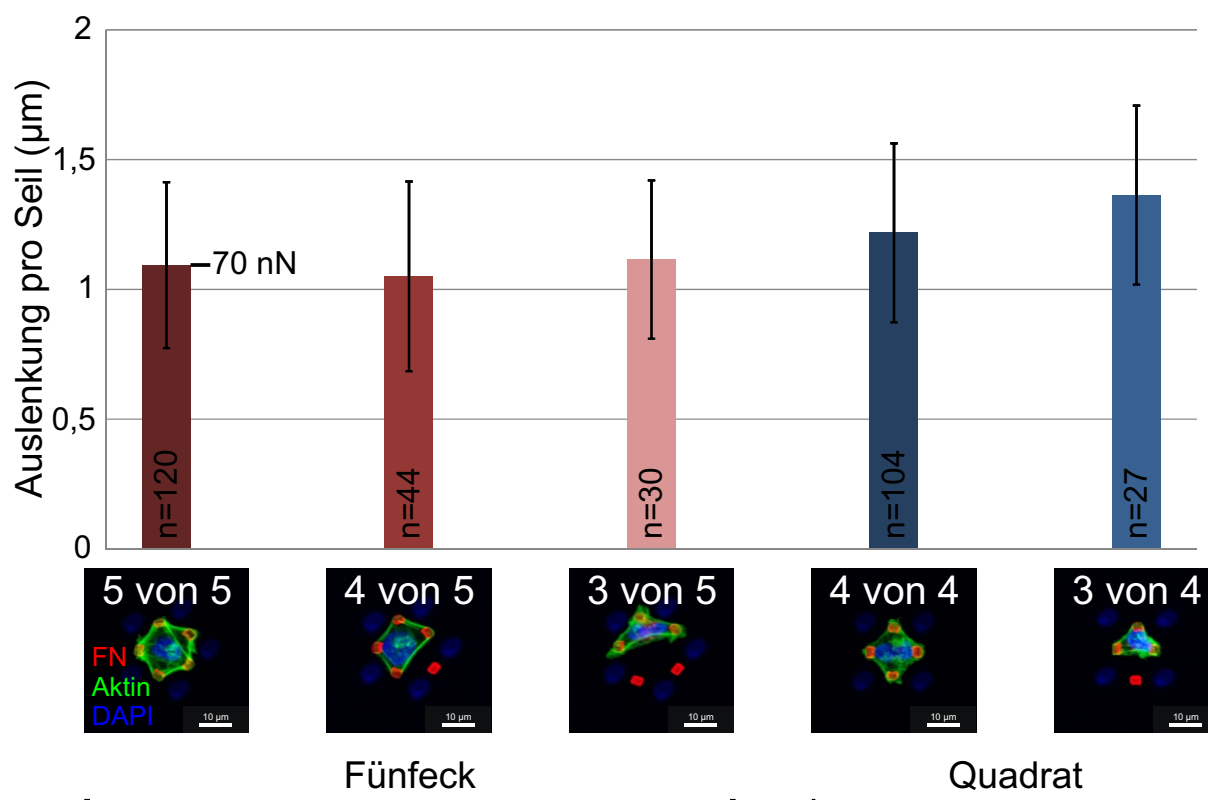


Abbildung 4.11: Durchschnittliche Auslenkung pro Seil. Dargestellt für verschiedene Geometrien und einer unterschiedlichen Anzahl von Adhäsionspunkten der Zellen in den Strukturen. Für die durchschnittliche Auslenkung pro Seil durch einen Fibroblasten, der an allen fünf Adhäsionspunkten im Fünfeck adhärert, werden etwa 70 nN benötigt.

Bischofs *et al.* haben herausgefunden, dass Zellen, die auf strukturierten 2D Substraten kultiviert werden und sich nur zwischen kleinen Proteininseln aufspannen können, nach innen gewölbte Bögen ausbilden [298]. An diese Bögen lassen sich Kreise anpassen. Der Radius des Bogens vergrößerte sich wenn der Abstand zwischen den Adhäsionspunkten vergrößert wurde. Das Young-Laplace-Gesetz sagt zwar aus, dass sich Oberflächen unter Spannung kreisrund wölben, es erklärt jedoch nicht warum sich der Bogenradius mit dem Abstand der Ankerpunkte ändern soll. Deshalb wurde ein angepasstes Computermodell für den untersuchten 2D Fall entwickelt. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass sich der Bogenradius vergrößert wenn ausgeprägtere Aktinstressfasern zwischen den Adhäsionspunkten zu beobachten waren. Es besteht somit eine lineare Korrelation zwischen Bogenstärke und Bogenradius. Da sich dieses Modell und die experimentell bestimmten Korrelationen nur auf 2D Substrate beziehen, wäre es sinnvoll dieses auf dreidimensionale Zellkultur auszuweiten. Deshalb besteht weiterhin die

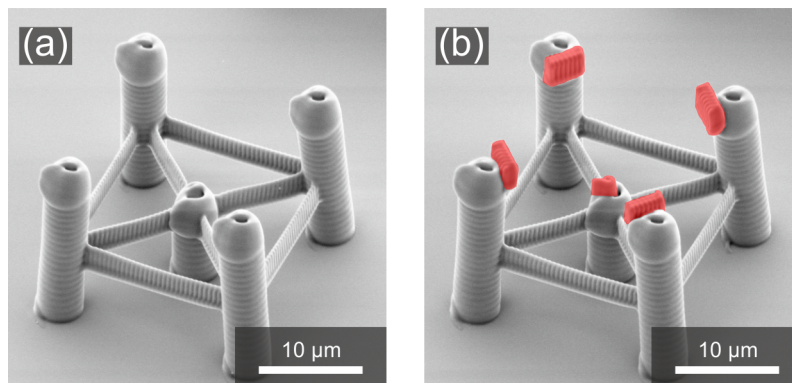


Abbildung 4.12: REM-Bilder von Mikrostrukturen um dreidimensionale Aktinbögen zu erzeugen (Bogenstruktur). (a): Grundgerüst aus BR12. (b): Kompositstruktur mit Punkten an den vier hohen Säulen, die in der Größe variiert werden. In der Mitte auf der niedrigeren Säule befinden sich immer gleich große Punkte. Zur Veranschaulichung wurden die Punkte rot eingefärbt.

Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Ulrich Schwarz (Universität Heidelberg).

Für dieses Projekt wurden Kompositstrukturen aus BR12 und Ormocomp hergestellt (Abbildung 4.12). Die Grundstruktur besteht aus vier hohen Säulen ($20\ \mu\text{m}$ hoch, $4,5\ \mu\text{m}$ im Durchmesser) im Abstand von $20\ \mu\text{m}$, einer niedrigen Säule ($10\ \mu\text{m}$ hoch, $4,5\ \mu\text{m}$ im Durchmesser) zwischen den vier hohen und Balken, die alle Säulen miteinander verbinden. Die Balken dienen zum einen zur Stabilisierung und zum anderen als eine Art Auffangnetz für Zellen, die langsam aus der Zellsuspension absinken. So soll die Ausbeute von Zellen in den Strukturen erhöht werden. An die Innenseite der hohen Säulen und auf die Spitze der niedrigen Säule wurden in einem zweiten DLS Schritt Punkte aus Ormocomp geschrieben. Die Länge der Ormocomp-Punkte wurde zwischen $1,5$ und $6\ \mu\text{m}$ variiert (nicht gezeigt). Die Höhe ($2\ \mu\text{m}$) und Tiefe ($1\ \mu\text{m}$) blieb dabei konstant. Dadurch sollen unterschiedlich stark ausgeprägte Aktinstressfasern zwischen den Adhäsionspunkten erreicht werden. Was wiederum auf stärkere oder schwächere Kontraktionskräfte hinweisen könnte (Abbildung 4.12 (b)).

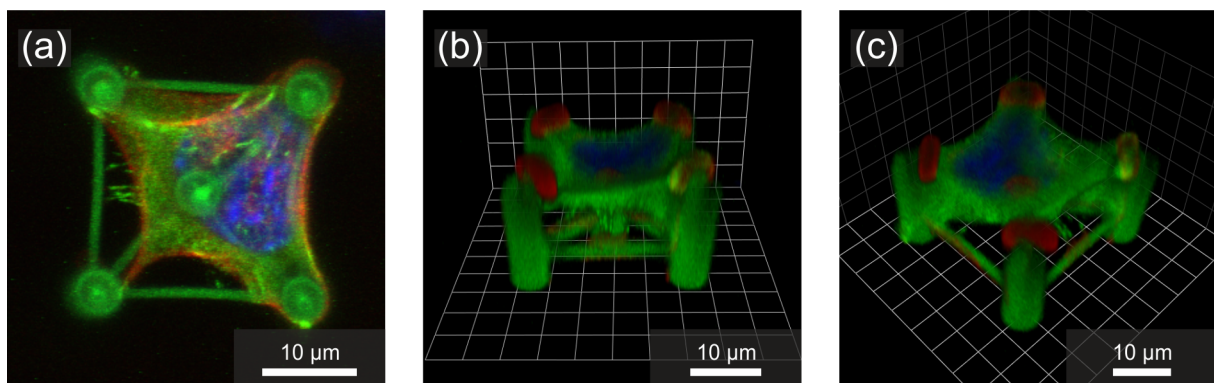


Abbildung 4.13: (a): Maximalprojektion aus Konfokalschnitten einer Bogenstruktur in der NIH/3T3-Zellen kultiviert wurden. Aktin (grün), Fibronectin (rot), Zellkern (blau). (b)+(c): Unterschiedliche Blickwinkel auf eine 3D Rekonstruktion der Konfokalschnitte.

Die in Abbildung 4.13 und 4.14 gezeigten Strukturen wurden für 30 Minuten mit Fibronectin beschichtet. Es folgte eine zweistündige Kultivierung mit NIH/3T3-Zellen. Die Zellen wurden fixiert, gefärbt und die Proben wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mikroskopiert. Bei diesen Versuchen wurde der Zelltyp von PCF zu NIH/3T3 gewechselt, weil die NIH/3T3-Zellen bei ähnlicher Größe ein besseres Verhältnis von Zellvolumen zu Zellkernvolumen haben als die NIH/3T3-Zellen. Das ist bei der hier verwendeten Art der Strukturen wichtig, da sie im Gegensatz zu den oben verwendeten Strukturen dieses Kapitels noch einen Adhäsionspunkt mittig und etwas tiefer gelegen besitzen. Dadurch wird die Form der Zelle zwar dreidimensionaler und ist nicht so scheibenförmig, sie wird jedoch auch rundlicher und der Zellkern blockiert die spitz nach unten zulaufenden Aktinfilamente. Weshalb die kreisrunde Form der Aktinstressfasern gestört werden könnte. Wie oben schon erwähnt wurde, kann der Abstand der Ormocomp-Punkte auch nicht beliebig vergrößert werden, da die Zellen nicht mehr alle Adhäsionspunkte erreichen würden. Als nachteilig hat sich herausgestellt, dass die Aktinfärbung bei den NIH/3T3 nicht so stark ist wie mit dem PCF. Auch die Aktinstressfasern sind nicht so deutlich zu erkennen. Durch das anpassen der Scaneinstellungen am LSM kommt es zu einem Durchbluten der Autofluoreszenz im grünen Kanal. Darunter leidet die Bildqualität erheblich und die Proben lassen sich nicht so gut auswerten wie erhofft.

Die verwendeten Strukturen bieten einen guten Kompromiss in Bezug auf ihre Größe. Die Zellen können sich gut zwischen allen Punkten aufspannen und der Zellkern stört die bogenförmigen Aktinstressfasern nicht (Abbildung 4.13). Es kommt jedoch auch häufig vor dass Zellen nicht in Kontakt mit allen Adhäsionspunkten sind (Abbildung 4.14).

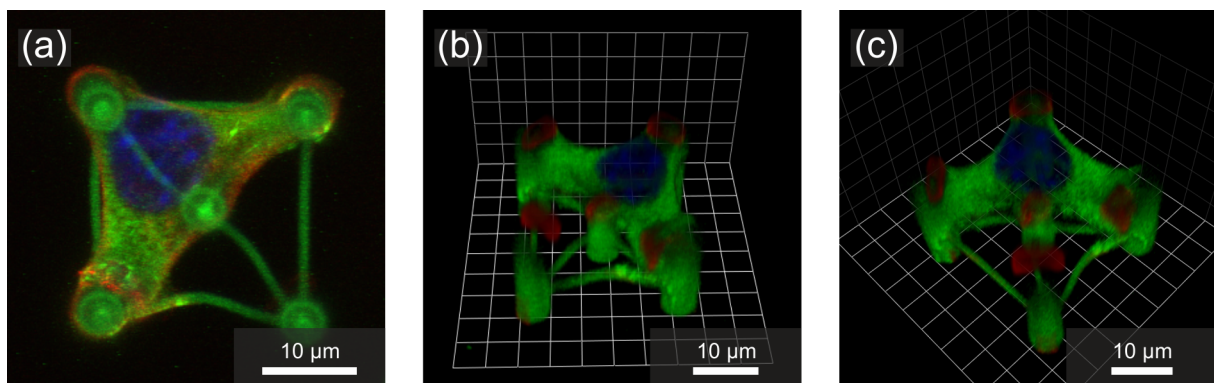


Abbildung 4.14: (a): Maximalprojektion aus Konfokalschnitten einer Bogenstruktur in der NIH/3T3-Zellen kultiviert wurden. Aktin (grün), Fibronectin (rot), Zellkern (blau). (b)+(c): Unterschiedliche Blickwinkel auf eine 3D Rekonstruktion der Konfokalschnitte.

4.2 Thiol-En-Fotolack

Im vorherigen Kapitel wurde schon eine Methode zur selektiven Funktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen vorgestellt. Der Thiol-En-Lack könnte Vorteile gegenüber dem bereits behandelten System bringen. Das verwendete Protein wurde immer durch Adhäsion an der Oberfläche angelagert. Das hat mehrere Nachteile. Zum einen kann man so nur selektiv mit einem Matrixprotein funktionalisieren und zum anderen ist die Bindung zwischen dem EZM-Protein und der Polymerstruktur geringer als bei kovalenten Bindungen. Zudem kann man die Proteindichte auf der Oberfläche nicht oder nur sehr ungenau bestimmen oder kontrollieren. Hier setzt der Thiol-En-Lack an. Wie in Kapitel 3.2.5 schon besprochen kann man die freien Thiol-Gruppen nutzen um Maleimido-Derivate kovalent an die Oberfläche zu binden. Dabei kann es sich entweder um ein Maleimid-terminiertes Peptid handeln oder um einen orthogonalen Bindungspartner (z. B. Biotin) der an eine Maleimid-Gruppe gekoppelt wurde.

4.2.1 Zellkompatibilität

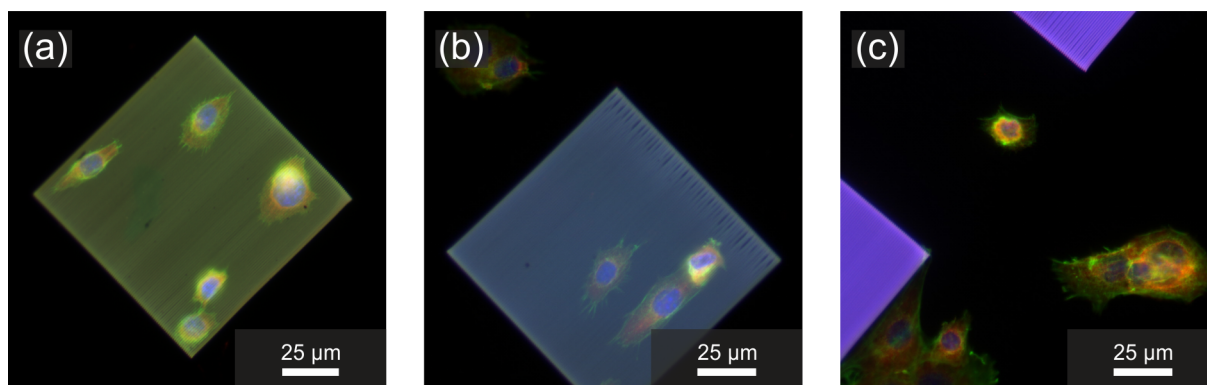


Abbildung 4.15: Fluoreszenzaufnahmen von 2D Teststrukturen aus Thiol-En-Lack. Die Oberfläche der Strukturen wurde erst mit speziellen Maleimido-Derivaten funktionalisiert um anschließend NIH/3T3-Zellen darauf zu kultivieren (für zwei Stunden). Aktin (grün), Fibronectin (rot), Zellkern (blau). (a): Keine Oberflächenfunktionalisierung. (b): Funktionalisierung mit Mal-cRGD. (c): Funktionalisierung mit Mal-GDR.

Da es sich bei dem hier verwendeten Thiol-En-Lack um einen neu entwickelten Fotolack handelt und dieser noch nie auf Biokompatibilität getestet wurde, sollte das hier als erstes untersucht werden. Dabei könnten mehrere Komponenten im Lack dazu führen, dass er nicht biokompatibel ist. Zum einen enthält er das Lösungsmittel Dimethylacetamid (DMAC) das als giftig eingestuft ist. Nach dem Entwicklungsschritt und dem Trocknen der Struktur sollte jedoch kein Lösungsmittel mehr enthalten sein. Zum anderen ist der enthaltene Pentaerythritol tetraallyl ether reizend. Die meisten Monomere sind jedoch reizend (GHS07), wie z. B. das PETA-Monomer. Liegen diese als Polymer vor, so sind sie zellverträglich⁷.

⁷Bekanntestes Beispiel hierfür ist Acrylamid. Das Monomer ist giftig und gesundheitsgefährdend, steht unter Verdacht krebserregend zu sein und kann als Nervengift verwendet werden. Liegt es jedoch als langkettiges Polymer vor, ist es ungiftig und es lassen sich damit Hydrogele herstellen, welche auch zur Zellkultivierung verwendet werden.

Um die Biokompatibilität des Thiol-En-Lacks zu testen, wurden $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ große Flächen hergestellt und mit Zellen (NIH/3T3) besiedelt (Abbildung 4.15). Es wurden drei unterschiedliche Arten von Funktionalisierungen gewählt: keine Funktionalisierung, Maleimid-terminiertes zyklisches Peptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure⁸ (Mal-cRGD), Maleimido-Derivat mit unspezifischer Aminosäuresequenz (Mal-GDR)⁹. So kann man zum einen feststellen ob der Lack an sich biokompatibel ist und falls nicht ob eine Funktionalisierung mit dem Mal-cRGD sich positiv auf das Zellverhalten auswirkt. Die Polymerflächen, die mit dem Mal-GDR terminiert wurden, sollen als Negativkontrolle dienen. Die Zellen wurden unterschiedlich lange auf den Substraten kultiviert. Nach dem Fixieren und Färben der Proben wurden sie mikroskopiert und die Zellfläche auf und neben den Strukturen wurde gemessen (nicht gezeigt). Die Fluoreszenzbilder in Abbildung 4.15 zeigen repräsentative Strukturen und Zellen nach zweistündiger Kultivierung.

Die reinen Flächen aus Thiol-En-Lack weisen keine Zytotoxizität auf (Abbildung 4.15 (a)). Zellen breiten sich auf den Strukturen aus und die Zellgröße ist vergleichbar mit der auf dem Glassubstrat. Auf den Strukturen, die mit dem Mal-cRGD funktionalisiert wurden, breiten sich die Zellen etwas schneller aus. Das liegt daran, dass die Integrine direkt an das Peptid binden können und die Zellen nicht erst eigenes Protein sekretieren müssen um an die Oberfläche adhären zu können. Jedoch nach zwei Stunden hat die Funktionalisierung keinen Einfluss auf die endgültige Zellgröße, die Vergleichbar mit den unfunktionalisierten Flächen ist (Abbildung 4.15 (b)). Werden Zellen auf den Mal-GDR funktionalisierten Flächen kultiviert, ist zu beobachten, dass sie diese Bereiche meiden und eher auf dem Glassubstrat adhären (Abbildung 4.15 (c)). Einzelne Zellen, die sich auf den Strukturen befinden, sind klein und kugelig. Das ist ein Anzeichen dafür, dass die Kultivierungsbedingungen nicht optimal sind oder schon vor dem fixieren Apoptose auftrat. Und da die Oberfläche schon mit einem Peptid beschichtet war, konnten die Zellen auch nicht ihr eigenes Protein auf die Strukturen sekretieren.

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass der Thiol-En-Lack biokompatibel ist und für weitere Zellversuche verwendet werden kann.

⁸Die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure oder kurz RGD kommt in EZM-Proteinen wie Fibronectin vor und ermöglicht es Zellen mittels Integrinen an diese zu binden.

⁹Die hier verwendete Aminosäuresequenz vermittelt keine Zelladhäsion. Das Mal-cRGD und Mal-GDR wurde von Ljiljana Fruks Arbeitsgruppe (CFN *Young Scientist Group*) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

4.2.2 3D Strukturen

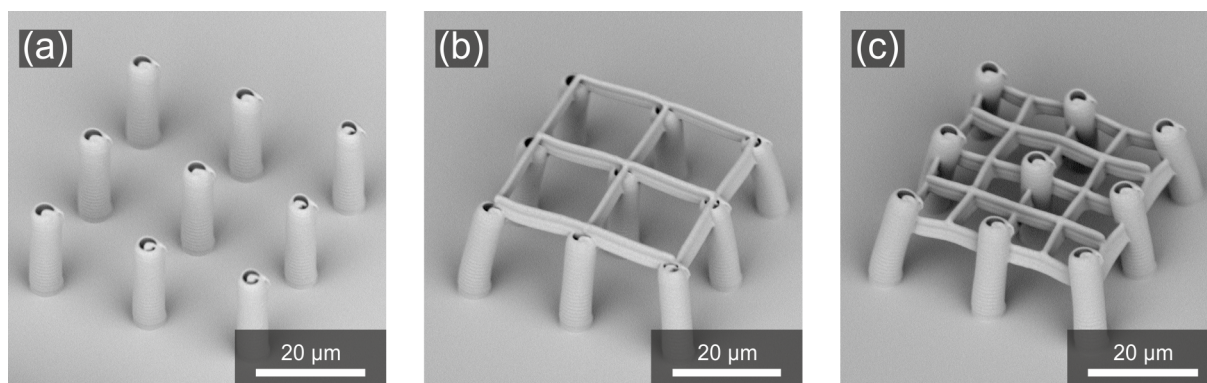


Abbildung 4.16: REM-Bilder unterschiedlicher Strukturen aus BR12 und Thiol-En-Lack. (a): Säulen aus BR12. (b)+(c): Säulen aus BR12. Seile aus Thiol-En-Lack.

Da das Ziel dieser Arbeit eine selektive Biofunktionalisierung von 3D Mikrostrukturen ist, wurden folgende 3D Struktur gewählt:

Als Grundgerüst wurden Säulen aus BR12 hergestellt (Abbildung 4.16 (a)), die anschließend mit Balken aus Thiol-En-Lack verbunden wurden (Abbildung 4.16 (b)+(c)). In zukünftigen Versuchen soll diese Art von Struktur dafür sorgen, dass die Zellen frei schwebend auf den funktionalisierten Balken sitzen und sie nicht am Boden oder an den Säulen adhärieren. Wenn man sowohl die Balken aus Abbildung 4.16 (b) und (c) an die BR12-Säulen schreibt kann man Boxringe ähnlich wie in Abbildung 4.2 erzeugen.

Die Kompositstrukturen wurden nach dem Entwickeln mit Maleimid-Biotin funktionalisiert. Das Biotin soll später dazu dienen Proteine an die Thiol-En-Struktur zu binden. Um das Biotin an der Oberfläche nachzuweisen wurde es mit Streptavidin-Cy3 gefärbt. Anhand der 3D Rekonstruktion in Abbildung 4.17 (a) ist zu sehen, dass das Biotin mittels Michael-Addition hauptsächlich an die Balken bindet, da hier die stärkste Fluoreszenz ist. Es befinden sich jedoch Farbstoffmoleküle an den Säulenköpfen. Und auch zwischen den kleinen Rechtecken in Abbildung 4.17 (b) ist eine Verunreinigung durch Farbstoffanlagerung auf dem Deckglas zu sehen. Unzureichende Waschschrte nach den jeweiligen Funktionalisierungen können ausgeschlossen werden, da die Waschschrte jeweils sehr gründlich durchgeführt und auch passende Lösungsmittel verwendet wurden. Wahrscheinlicher ist, dass während dem zweiten DLS Schritt eine ungewollten Michael-Addition zwischen dem Methacrylat auf der Glasoberfläche oder dem Acrylat auf der BR12-Oberfläche und dem Pentaerythritol tetrakis(mercaptoacetat) im Thiol-En-Lack stattfindet.

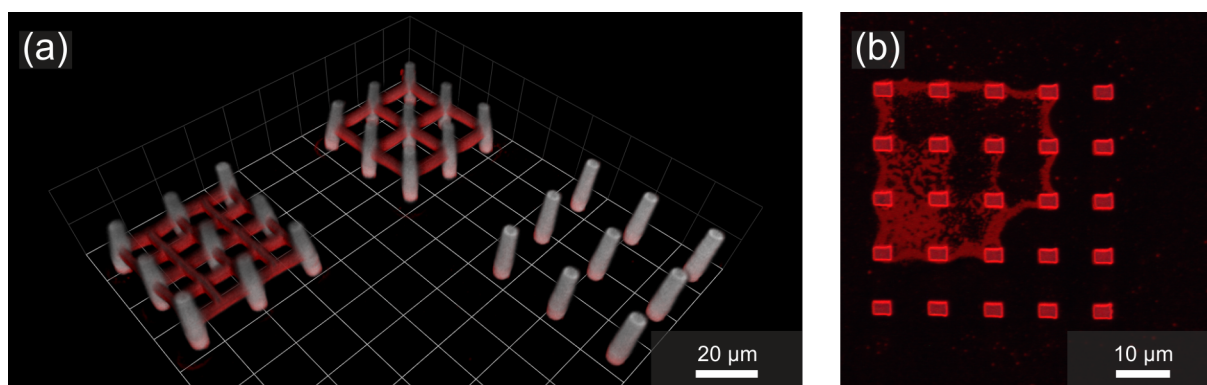


Abbildung 4.17: (a): 3D Rekonstruktion von Konfokalschnitten einer Kompositstruktur bestehend aus Säulen aus BR12 und Seilen aus Thiol-En-Lack. An die freien Thiol-Gruppen der Seile wurde zuerst ein Maleimid-Biotin und anschließend ein Streptavidin-Cy3 gebunden. (b): Maximalprojektion aus Konfokalschnitten. Das Muster wurde aus dem Thiol-En-Lack hergestellt und befindet sich auf der Glasoberfläche. Die Funktionalisierung erfolgte wie in (a).

Die spontane und ungewollte Michael-Addition zwischen dem Tetrathiol im Fotolack und dem Meth-/Acrylat an der Oberfläche ist suboptimal und bringt das Konzept der Struktur durcheinander. Es wäre zwar möglich erst die komplette Struktur aus Thiol-En-Lack herzustellen und nachträglich die Bereiche die passiviert sein sollen mit BR12-Lack zu ummanteln, das würde jedoch die Form der Struktur negativ beeinflussen. An eine Mehrfachfunktionalisierung der Struktur ist so nicht zu denken.

Weitere Nachteile des hier verwendeten Thiol-En-Lack sind zudem, dass er Lösungsmittel enthält und sich die optimale Laserdosis mit der Zeit ändert. Und dass es im Lack auch zu spontaner und ungewollter Michael-Addition der einzelnen Komponenten kommt. Diese Reaktion wird durch den Fotoinitiator katalysiert und hat zur Folge, dass der Lack nach ein bis zwei Tagen durchpolymerisiert ist und nicht mehr verwendet werden kann. Es müsste vor jedem Versuch ein neuer Lack hergestellt werden. Würde man anstatt dem Alken ein Alkin verwenden würde es nicht zur spontanen Reaktion zwischen den Komponenten kommen und der Lack wäre über einen längeren Zeitraum lagerbar. Das Entwickeln einer Methode zur nachträglichen, orts aufgelösten Funktionalisierung des Thiol-En-Lacks wäre ein großer Fortschritt.

4.3 Photoenol

Die Klick-Chemie zwischen Photoenol und Maleimid bestimmt den Hauptteil dieser Arbeit, da es die effizienteste und eleganteste Methode zur selektiven Biofunktionalisierung ist. Im Gegensatz zu den vorherig vorgestellten Methoden handelt es sich hierbei nur um eine Addition von Molekülen an die Oberfläche. Wodurch Bereiche funktionalisiert oder passiviert werden können ohne dass sich die Topographie der Struktur ändert.

4.3.1 Vorversuche

Die im Kapitel 3.4.1 vorgestellte Methode wurde nur unter kontrollierten Bedingungen (sauerstoff- und wasserfrei) getestet. Deshalb musste erst überprüft werden ob die Methode unter normalen Bedingungen funktioniert. Weiterhin wurde das Lösungsmittel von Acetonitril zu Dimethylformamid (DMF) gewechselt, weil DMF nicht so schnell verdunstet und deshalb besser für die folgenden Experimente geeignet ist.

Dafür wurden Deckgläser mit dem Photoenol-Silan (Si-PE), wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, silanisiert und mit einem PDMS-Ring bedeckt. Das Innere des Rings wurde mit einer Lösung aus Maleimid-Biotin (Mal-Bt) und DMF gefüllt. Die komplette Probe wurde mit UV-Licht flutbelichtet (Abbildung 4.18 oben links). Anschließend wurde die Probe mit Avidin-Rhodamin (Av-Rho) gefärbt. Beim Färben wird ein Tropfen der Lösung auf das Deckglas gegeben, weshalb sich ein kreisrunder Farbfleck mit einer scharfen Kante nach außen bildet (Abbildung 4.18 links Mitte). Da später Bereiche, die mit Mal-Bt funktionalisiert wurden, besser sichtbar gemacht werden sollen¹⁰ muss man noch eine passende Methode zur Passivierung der Oberfläche gegen den Farbstoff evaluiert werden. Auch hier wird auf Polyethylenglykol (PEG) zurückgegriffen. Damit es durch Cycloaddition mit der FMP-Gruppe verbunden werden kann, wurde das PEG mit einem Maleimid terminiert (Mal-PEG). Um verschiedene Situationen zu testen, wurde eine kurze (750 g mol^{-1}) und eine lange (2200 g mol^{-1}) Version hergestellt. Mit den verschiedenen Mal-PEG-Lösungen wurde das gleiche Experiment wie mit dem Mal-Bt durchgeführt (Abbildung 4.18 oben Mitte). Die Ergebnisse (Fluoreszenzbilder) sind jeweils rechts von den schematischen Darstellungen gezeigt. Die Zahlen stellen den abgebildeten Bereich des Deckglases dar.

Anhand der Fluoreszenzbilder in Abbildung 4.18 (oben) ist zu sehen, dass der biotinylierte Bereich heller erscheint als der auf dem sich nur das Photoenol befindet. Das zeigt, dass die Funktionalisierung einen Zugewinn an Fluoreszenz bringt und somit mehr Farbstoff gebunden wurde als in den äußeren Bereichen, wo er nur durch Adhäsion an der Oberfläche adsorbiert wurde. Sowohl die Passivierung mit dem langen als auch mit dem kurzen Mal-PEG ist erfolgreich, was an der geringeren Fluoreszenz zu erkennen ist. Die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität bestätigt, dass sich das kurze Mal-PEG besser zum passivieren der nicht funktionalisierten Bereiche gegen den Farbstoff eignet (Abbildung 4.18 unten). Alle Aufnahmen wurden mit den gleichen Einstellungen am LSM aufgenommen um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe von ImageJ durchgeführt.

¹⁰Aufgrund von Adhäsion des Farbstoffs an nicht funktionalisierte Bereiche bekommt man beim Aufnehmen der Fluoreszenzbilder ein Hintergrundrauschen wodurch die Bildqualität schlechter wird.

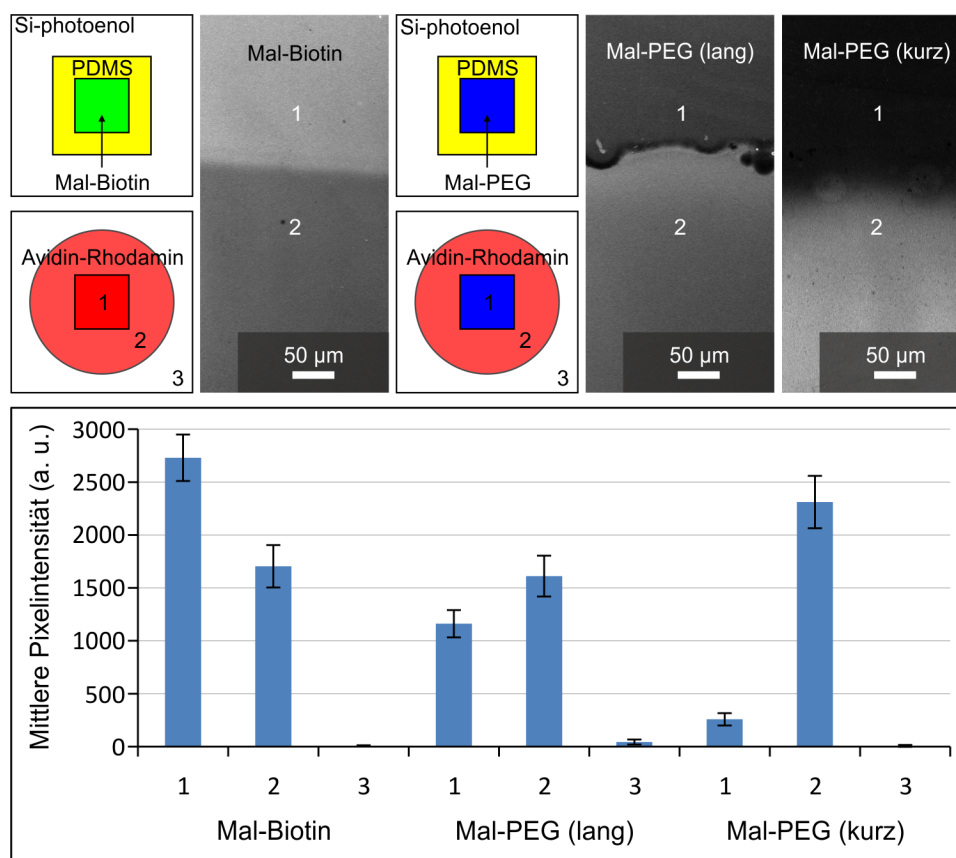


Abbildung 4.18: oben: Photoenol silanisierte Deckgläser wurden entweder mit Maleimide-Biotin oder mit Maleimide-PEG belichtet. Um eine orts aufgelöste Funktionalisierung zu erreichen wurde ein PDMS-Ring verwendet. Anschließend wurde das komplette Deckglas mit Avidin-Rhodamin gefärbt. Man kann einen deutlichen Unterschied in der Helligkeit der verschiedenen Fluoreszenzbilder erkennen. unten: Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität. Im Bereich des Maleimide-Biotins ist die stärkste Fluoreszenz zu beobachten. Die reine Oberflächenadhäsion des Avidin-Farbstoffes ist relativ ausgeglichen. Das Mal-PEG mit der geringeren Molmasse (kurz) passiviert am besten das Avidin-Rhodamin.

Wegen der besseren Passivierung des kurzen Mal-PEG gegen den Farbstoff Avidin-Rhodamin wird für die folgenden Experimente immer das kurze Mal-PEG verwendet und nicht mehr explizit darauf hingewiesen.

4.3.2 Zwei-Photonen-Anregung

Als nächstes wurde evaluiert, ob das Photoenol durch Zwei-Photonenabsorption (2PA) anregbar ist und wie es sich unter solchen Bedingungen verhält. Deshalb wurde ein Deckglas mit Si-PE silanisiert und mit der Mal-Bt-Lösung bedeckt. Es folgte eine Strukturierung des Substrats indem ein femtosekunden gepulster Laser auf die Glasoberfläche fokussiert und die Probe relativ dazu bewegt wurde. Dies erfolgte für verschiedene Wellenlängen (560-700 nm, im Intervall von 20 nm) an verschiedenen Stellen auf dem Substrat (Experimenteller Aufbau siehe Kapitel 3.1.2). Nach einem Waschschrift in DMF wurden die unfunktionalisierten Bereiche mit Mal-PEG mittels Flutbelichtung passiviert und abermals mit DMF gewaschen. Es folgte der Färbeschrift mit Av-Rho und ein Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden

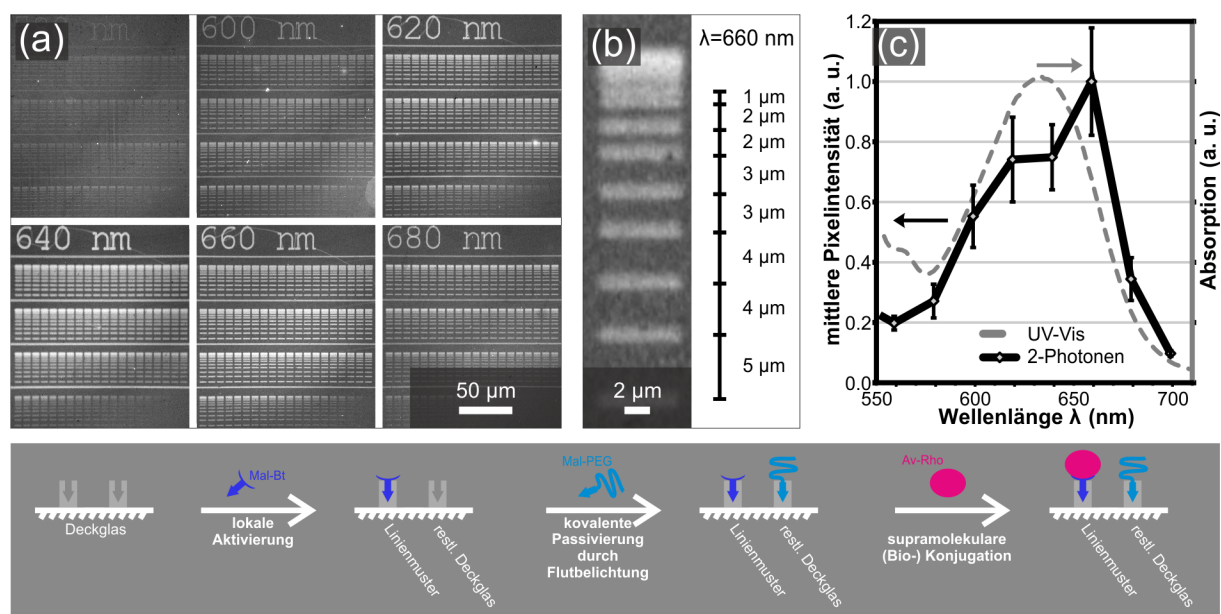


Abbildung 4.19: (a): Konfokale Fluoreszenzbilder von 2D funktionalisierten Glasplättchen durch zwei-photonen-angeregte Diels-Alder-Cycloaddition bei verschiedenen Wellenlängen (580-680 nm). Darauf folgte eine supramolekulare (Bio-) Konjugation mit Avidin-Rhodamin. (b): Vergrößerung des Musters aus (a) für $\lambda = 660$ nm und eine mittlere Laserleistung von 4,75 mW. Der geringste Abstand zwischen zwei deutlich auflösbaren Linien beträgt 2 μm . (c): Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität der Cycloaddition/Biokonjugation für verschiedene Wellenlängen (aus (a)) (schwarze, durchgezogene Linie) und dem UV/Vis-Absorptionsspektrum des Photoenol-Grundstoffs das über die doppelte Wellenlänge aufgetragen wurde (graue, gestrichelte Linie). Unten: Schematische Darstellung der Vorgehensweise inklusive der verwendeten Chemikalien. Abbildung nach [288].

Fluoreszenzbilder mit Hilfe des konfokalen LSM aufgenommen (Abbildung 4.19 (a)). Für jede Wellenlänge wurde die Laserleistung von 0 bis 19,75 mW in 0,25 mW Intervallen variiert. Die Laserleistung wurde von der rechten Spalte der unteren Zeile beginnend nach links oben erhöht. Der Linienabstand in einer Spalte der jeweiligen Laserleistung wurde von 5 bis 0,25 μm verkleinert.

Ab einer Laserleistung von etwa 5 mW wurde die maximale Fluoreszenzintensität der jeweiligen Wellenlänge beobachtet. Für höhere Laserleistungen nahm die Fluoreszenzintensität nicht mehr signifikant zu. Der geringste Abstand zwischen zwei Linien und somit die maximale Auflösung die erreicht werden kann, liegt bei 2 μm (Abbildung 4.19 (b)). Die maximale Auflösung dieser Methode hängt im Gegensatz zum normalen DLS nicht von der Laserleistung ab [236]. Die hier verwendete Cycloaddition eines Maleimido-Derivats erfolgt nur an der Oberfläche eines Deckglases. Diffusion spielt hier keine Rolle. Bei der Radikalpolymerisation werden bei höheren Laserleistungen mehr Radikale erzeugt, die sich durch Diffusion ausbreiten und so für eine schlechtere Auflösung sorgen.

Abbildung 4.19 (a) bescheinigt, dass das Photoenol durch eine 2PA aktiviert werden kann, da die Diels-Alder-Cycloaddition schnell abläuft und das UV/Vis-Spektrum von Photoenol keine Absorption in dem verwendeten Wellenlängenbereich aufweist [283, 288]. Um zu sehen welche Wellenlänge für spätere Versuche am besten geeignet ist und ob es einen Zusammenhang mit dem UV/Vis-Spektrum von PE gibt, wurde die Fluoreszenzintensität für die verschiedenen Wellenlängen bei einer Laserleistung von 4,75 mW und vom Hintergrund direkt daneben gemessen. Anschließend wurde der Hintergrund abgezogen. Die gemessenen Werte

sind in Abbildung 4.19 (c) aufgetragen. Sie korrelieren mit dem UV/Vis-Absorptionsspektrum des Photoenols das über die doppelte Wellenlänge aufgetragen wurde. Für die folgenden Experimente wurde immer eine Wellenlänge von 640 nm gewählt, was dem doppelten Ein-Photonenabsorptionsmaximum von 320 nm entspricht.

4.3.3 Funktionalisierung von 3D Strukturen

Da wir zeigen konnten, dass eine Zwei-Photonenanregung des Photoenols und somit eine 2D orts aufgelöste Funktionalisierung möglich ist, sollte gezeigt werden, dass man diese Methode auch zur 3D Funktionalisierung verwenden kann.

Um die Photoenol-Chemie auch an 3D Strukturen anwenden zu können, wählten wir Ormocomp als Fotolack, da man dieses genau wie Glas silanisieren kann. Nachdem die 3D Strukturen mittels normalem DLS (Nanoscribe Gerät) hergestellt wurden, folgte eine homogene Beschichtung mit dem Si-PE durch Silanisierung (Abbildung 4.20 (a)+(b)). Um die licht-angeregte Diels-Alder-Cycloaddition auszulösen wurde der Laserfokus in Anwesenheit des Maleimido-Derivats Maleimid-Biotin (Mal-Bt) oder Maleimid-Benzylguanin (Mal-BG) kreisförmig über die zu aktivierende Stelle bewegt (Abbildung 4.20 (b)+(c)). Nur in der Zeit, während das PE durch das Licht aktiviert wird und in seiner Dien-Form vorliegt, ist eine chemische Ligation möglich. Um die funktionalisierten Bereiche sichtbar zu machen, werden sie mittels supramolekularer Biokonjugation gefärbt (Abbildung 4.20 (c)+(d)). Zwischen Funktionalisierung und Färbe-Schritt sollte die restliche Struktur mit einem passenden Molekül passiviert werden.

Was in der Theorie simpel klingt ist in der Praxis nicht ganz so leicht durchzuführen bzw. es sollten einige Dinge beachtet werden. Beim Aufkleben der silanisierten Proben auf den Probenhalter muss darauf geachtet werden die Probe nicht schief aufzukleben. Sonst erhält man einen Versatz der funktionalisierten Bereiche. Man könnte die Verdrehung der Probe zwar herausrechnen, gibt man sich jedoch Mühe beim Aufkleben der Proben erspart man sich diesen Schritt. Die Maleimido-Derivate sind immer in DMF gelöst. Gibt man einen Tropfen der Lösung direkt auf das Deckglas, zerfließt dieser und läuft zwischen Deckglas und Halter. So erhält man enorme Schwankungen in z -Richtung, was dazu führen würde dass sich die 3D Struktur nicht mehr im Fokus befinden würde. Zudem würde das Lösungsmittel aufgrund der vergrößerten Oberfläche zu schnell verdunsten. Deshalb verwendet man hierfür einen PDMS-Ring um das zu unterbinden. In ersten Versuchen wurde noch Acetonitril als Lösungsmittel verwendet. Es stellte sich heraus, dass es zu schnell verdunstet und den PDMS-Ring auflöst. Obwohl DMF nicht so schnell verdunstet wie Acetonitril, muss stets überprüft werden ob sich noch eine ausreichende Menge der Lösung auf der Probe befindet. Neben die eigentliche Strukturen wurden kleine Kreuze auf das Deckglas geschrieben. Diese dienen dazu, ein Feld vor dem Funktionalisieren auszurichten. Auf einer Probe befinden sich 9-16 Felder. Diese haben zwar einen definierten Abstand von 200 μm , die Märzhäuser Bühnen verfahren jedoch nicht so genau, dass die Probe von Feld zu Feld nicht immer wieder neu ausgerichtet werden müsste. Hinzu kommt die leichte Rotation der Probe um die z -Achse, die sich durch das Aufkleben ergibt.

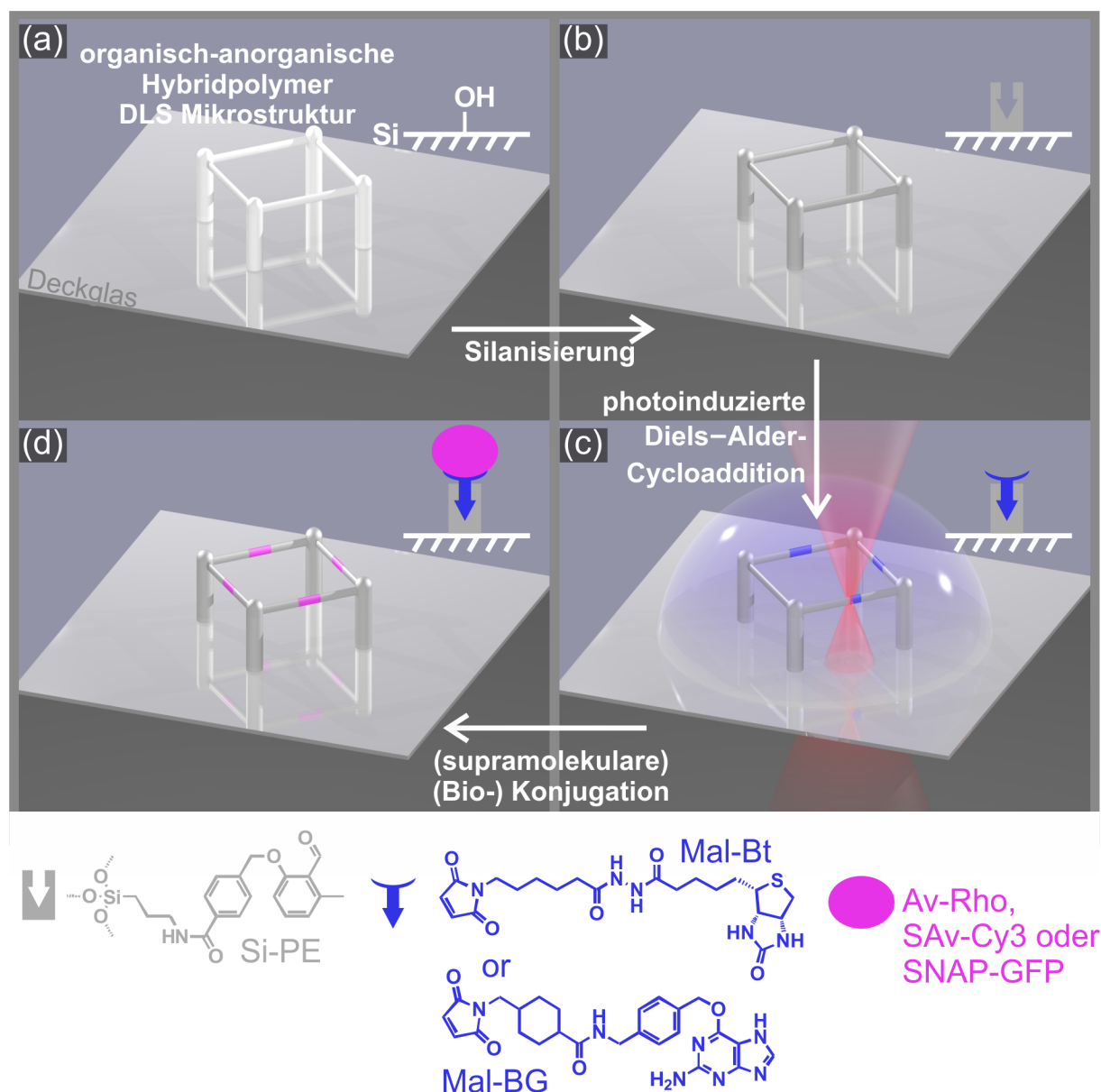


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der allgemeinen Vorgehensweise zur kontrollierten, photochemischen Funktionalisierung anorganisch-organischer 3D Strukturen. Die Oberfläche der Ormocomp-Struktur wird durch ein Argon-Plasma aktiviert (a), wodurch das Photoenol-Silan kovalent an diese binden kann (b). Die silanisierte Mikrostruktur wird mit einer Maleimido-Derivat (Maleimid-Biotin oder Maleimid-Benzylguanin) Lösung bedeckt. Es folgt eine orts aufgelöste Diels-Alder-Cycloaddition des Maleimids mittels 2PA (c). Letztendlich werden die lokal aktivierten Bereiche noch mittels nichtkovalenter oder kovalenter Biokonjugation mit fluoreszenten Farbstoffen oder Proteinen markiert (Streptavidin-Cy3, SNAP-GFP bzw. O6-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase - grün fluoreszentes Protein) (d). Abbildung nach [288].

Die verwendete mittlere Laserleistung vor dem Objektiv betrug 5 mW. Die Schreibgeschwindigkeit variierte zwischen 100 und 200 $\mu\text{m s}^{-1}$. Die tatsächliche Verweildauer an einem Punkt war jedoch länger, da mehrere kreisförmige Trajektorien an der jeweiligen Stelle abgefahren wurden. Die endgültige Schreibdauer für einen funktionalisierten Bereich (Punkt) lag bei ca. 2-5 Sekunden. Übliche Zeiten um eine Struktur (180 $\mu\text{m} \times 180 \mu\text{m}$, Abstand zwischen Säulen: 20 μm , 180 Punkte) zu funktionalisieren lagen zwischen 6 und 15 Minuten.

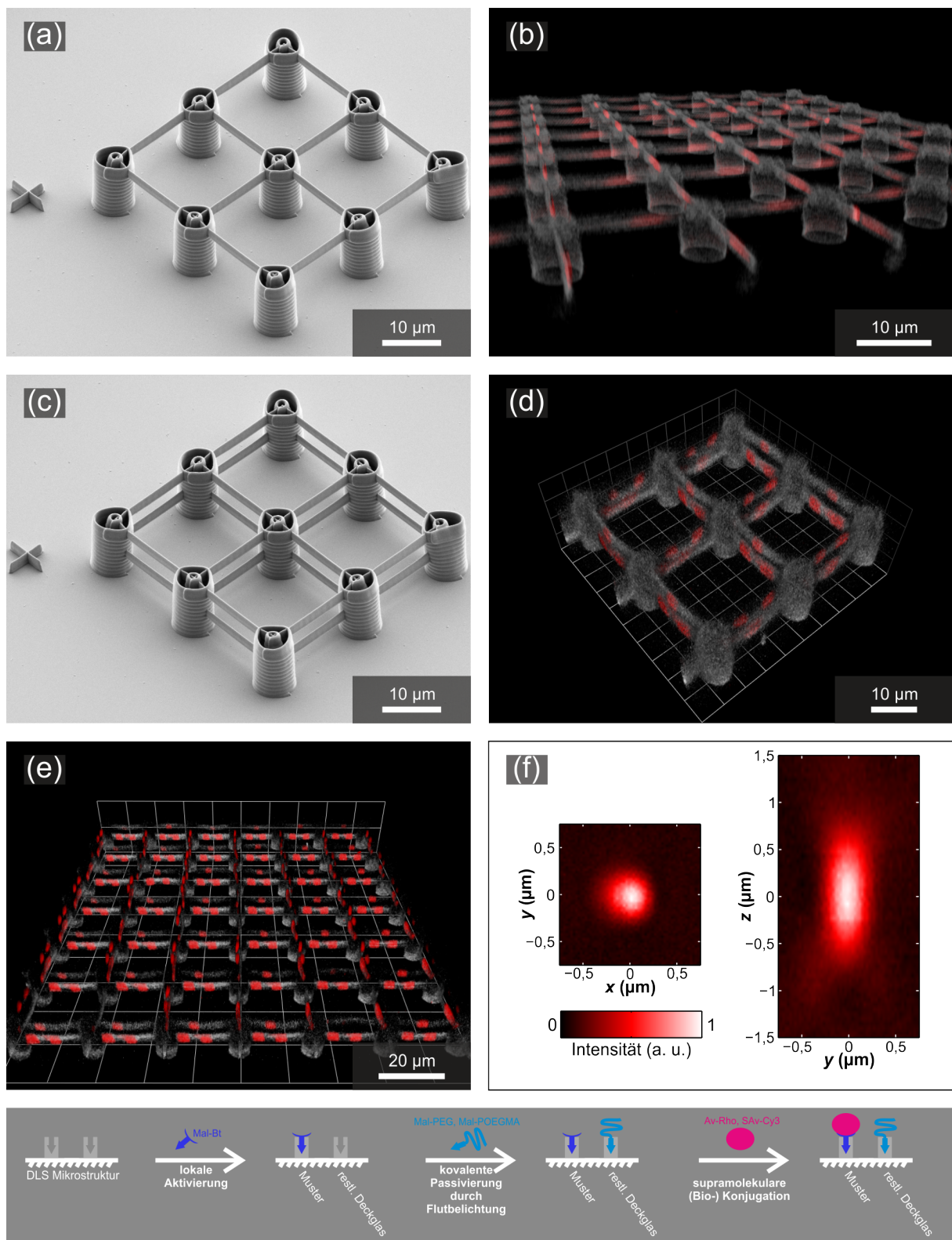


Abbildung 4.21: (a)+(c): REM-Bilder von Mikrostrukturen aus Ormocomp. Solche Strukturen wurden in (b) und (d) verwendet. Das Kreuz auf dem Deckglasboden wurde zur Ausrichtung der Struktur im lasergestützten 2PA-Prozess benötigt. (b)+(d): 3D Rekonstruktion von Konfokalschnitten einer Mikrostruktur aus Ormocomp, die mit Photoenol silanisiert und mit Maleimide-Biotin lokal funktionalisiert wurde. Die funktionalisierten Bereiche wurden mit Avidin-Rhodamin bzw. Streptavidin-Cy3 (rot) sichtbar gemacht. Die Autofluoreszenz der Ormocomp-Struktur ist in weiß dargestellt. In (d) wurden die Seile auf unterschiedlichen Höhen geschrieben und abwechselnd in axialer Richtung funktionalisiert, damit die 3D Funktionalisierung sichtbar wird. (e): Darstellung der vollständigen Struktur aus (d). (f): Schnitte in x - y - und x - z -Richtung durch das gemessene Intensitätsprofil des Laserfokus, der zur Photoaktivierung verwendet wurde ($\lambda = 640$ nm). Unten: Schematische Darstellung der Vorgehensweise inklusive der verwendeten Chemikalien. Abbildung nach [288].

In Abbildung 4.21 (a) und (c) sind REM-Bilder von Ormocomp-Strukturen zu sehen, die für die selektive 3D Funktionalisierung verwendet wurden. Die Mikrostrukturen bestehen aus Säulen mit einer Höhe von $10\ \mu\text{m}$ und einem lateralen Abstand von $20\ \mu\text{m}$. Die Säulen sind mit Seilen verbunden, die sich entweder nur auf einer Höhe befinden oder auf zwei Höhen übereinander. Für den letzteren Fall, beträgt der axiale Abstand $5\ \mu\text{m}$. Nach der Silanisierung der 3D Strukturen mit Si-PE erfolgte die selektive Funktionalisierung mittels 2PA mit Mal-Bt. Die nicht-funktionalisierten Bereiche wurden passiviert. In Abbildung 4.21 (b) wurde das Mal-PEG verwendet. In Abbildung 4.21 (d) und (e) wurde ein Maleimid-Poly(oligo(ethylenglykol) Methacrylat) (Mal-POEGMA) verwendet. Dieses besteht im Vergleich zu dem Mal-PEG nicht aus einer linearen PEG-Kette sondern aus Polymerbürsten aus PEG. Durch die längere und verästelte Kette aus PEG-Einheiten passiviert dieses Molekül, im Vergleich zur linearen Variante, nicht nur gut gegen Farbstoffe sondern auch gegen Proteine (siehe Kapitel 4.3.5). Nachdem die Strukturen gefärbt waren (Abbildung 4.21 (b): Av-Rho, (d)+(e): SAv-Cy3), wurden sie mit Hilfe eines konfokalen LSM mikroskopiert.

In den 3D Rekonstruktionen ist sehr gut zu erkennen, dass die Funktionalisierung auch selektiv an 3D Strukturen funktioniert (Abbildung 4.21 (b)) und dass es sich tatsächlich um einen Zwei-Photonenprozess handelt (Abbildung 4.21 (d) und (e)). Die Seile sind punktuell funktionalisiert, wobei unterhalb der Funktionalisierung des höher gelegenen Seils keine Funktionalisierung zu erkennen ist.

Abbildung 4.21 (f) zeigt die Intensitätsverteilung im Laserfokus für eine Wellenlänge von $640\ \text{nm}$, die an einem $100\ \text{nm}$ großen Goldkugelchen¹¹ durch Rückreflektion gemessen wurde. Aus den gemessenen Werten sollte sich eine Auflösung in lateraler x - y -Richtung von etwa $300\ \text{nm}$ und in axialer z -Richtung $800\ \text{nm}$ ergeben [212]. Lateral auf der Glasoberfläche wurden ca. $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ erreicht. Die laterale Ausdehnung der funktionalisierten Bereiche auf den 3D Strukturen beträgt $3\ \mu\text{m}$. Dies entspricht jedoch nicht dem erreichbaren Minimum. Diese Größe wurde gewählt, weil es zum einen besser zu mikroskopieren ist und zum anderen ist das die optimale Größe für spätere Zellversuche. Axial wurde eine Auflösung von $2,5\ \mu\text{m}$ erreicht. Das kann deutlich an den nur auf einer Höhe funktionalisierten Bereichen gesehen werden. (Der Abstand Mitte zu Mitte der Seile beträgt $5\ \mu\text{m}$, die Seile haben eine axiale Ausdehnung von $2,5\ \mu\text{m}$.) Aufgrund des Brechungsindex des Lösungsmittels (DMF, $n = 1,430$), in dem das Mal-Bt gelöst ist, kann die oben erwähnte theoretische axiale Auflösung nicht erreicht werden. Deshalb ist die gezeigte axiale Auflösung zufriedenstellend.

Somit konnte gezeigt werden dass man mit dieser Methode mit passabler Auflösung und in angemessener Zeit dreidimensional funktionalisieren kann (Abbildung 4.21 (e)).

¹¹Die Goldkugelchen wurden in Lösung auf dem Deckglas aufgesponnen und im PETA-Monomer eingebettet.

4.3.4 Mehrfachfunktionalisierung von 3D Strukturen

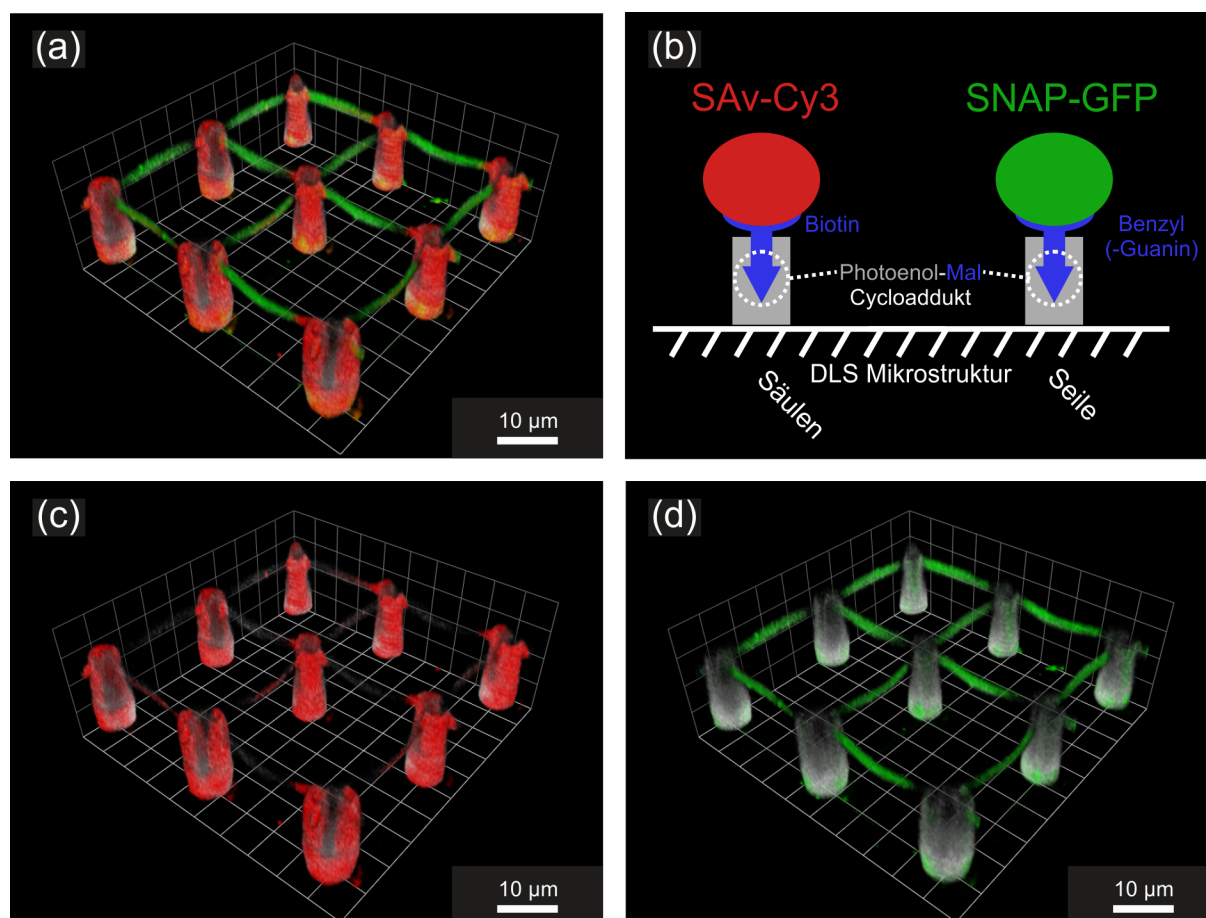


Abbildung 4.22: 3D Rekonstruktion von Konfokalschnitten einer 3D DLS Struktur die selektiv mit Biotin (mit Streptavidin-Cy3 gefärbt, rot) und Benzylguanin (mit SNAP-GFP gefärbt, grün) funktionalisiert wurde. Die Autofluoreszenz der Ormocomp-Struktur ist in weiß dargestellt. (a): Funktionalisierung mit Biotin an den Säulen und Benzylguanin an den Seilen. (b): Schematische Darstellung der Funktionalisierung und Färbung einer Struktur, wie sie in (a) dargestellt ist. (c): Weißer und roter Kanal der Struktur aus (a). (d): Weißer und grüner Kanal der Struktur aus (a). Die Autofluoreszenz der Seile ist zu gering um sie zu sehen. Abbildung nach [288].

Da für spätere Zellversuche nicht nur ein sondern mehrere Proteine selektiv an eine 3D Struktur gebunden werden sollen, musste gezeigt werden, dass die Photoenol-Chemie sich hierfür ebenfalls eignet. Als erstes musste ein weiterer orthogonaler Bindemechanismus gefunden werden. Der in Kapitel 3.4.3 vorgestellte SNAP-Tag-Mechanismus wurde als passend evaluiert.

Eine 3D Mikrostruktur wurde mit Si-PE silanisiert und mit einer Lösung aus Maleimid-Biotin und DMF bedeckt. Es folgte eine Funktionalisierung der Säulen mit dem Mal-Bt, ein Waschschriff und nach dem Bedecken mit einer Lösung aus Maleimid-Benzylguanin und DMF wurden die Seile mit Mal-BG funktionalisiert. Die Probe wurde nochmals gewaschen, anschließend mit SA_v-Cy3 gefärbt, abermals gewaschen und letztendlich mit SNAP-GFP gefärbt (schematische Darstellung in Abbildung 4.22 (b)). Der Farbstoff (Cy3: 580-650 nm) und das fluoreszente Protein (GFP: 500-550 nm) fluoreszieren in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und sind deshalb beim mikroskopieren klar voneinander unterscheidbar.

In Abbildung 4.22 (a) ist eine selektive Färbung der Säulen mit SAV-Cy3 und der Seile mit SNAP-GFP zu sehen. Beim betrachten der einzelnen Fluoreszenzkanäle (Abbildung 4.22 (c) und (d)) wird deutlich, dass es auch zu keiner Kreuzreaktion der verwendeten Moleküle kommt. Die Fluoreszenz ist jeweils nur in dem Bereich zu sehen wo es auch erwartet wird. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine selektive Funktionalisierung mit mehreren Molekülen, wie z. B. Biotin und Benzylguanin, möglich ist. Prinzipiell wäre es mit der hier verwendeten Methode realisierbar noch mehr Moleküle selektiv über die Diels-Alder-Cycloaddition anzubringen. Dafür müssten jedoch noch mehr biokompatible und orthogonale Bindemechanismen evaluiert werden um dies nachzuweisen.

Um schlussendlich zu zeigen, mit welcher Auflösung und Präzision die 3D Mikrostrukturen funktionalisiert werden können, wurden nur kleine Bereiche der Seile (Abbildung 4.23 (a) und (b)) oder alternierend (Abbildung 4.23 (c) bis (f)), mit Biotin und mit Benzylguanin, funktionalisiert. In den 3D Rekonstruktionen ist wieder zu sehen, wie gut diese Methode funktioniert. Zudem ist die präzise Aneinanderreihung der 3 µm großen funktionalisierten Bereiche zu sehen, ohne dass eine Kreuzreaktion zu beobachten ist.

Bei den in Abbildung 4.23 gezeigten Experimenten wurde eine andere Methode zum passivieren der nicht-funktionalisierten Bereiche gewählt, da die übliche Methode zur Passivierung (Flutbelichtung mit Mal-PEG oder Mal-POEGMA) in Kombination mit dem SNAP-GFP nicht effektiv genug war. Das SNAP-GFP adhärierte an der restlichen Struktur und den mit Mal-BG funktionalisierten Bereichen (nicht gezeigt). Es hat sich herausgestellt, dass sich Pluronic F-108¹² sehr gut zum passivieren eignet. Es passiviert sowohl gegen den SAV-Cy3 Farbstoff, als auch gegen das SNAP-GFP.

Es wurde eine Lösung aus 10 gew. % Pluronic F-108 in Wasser für eine Stunde auf die Probe gegeben. Es folgte ein Waschschrift, das Färben mit SAV-Cy3, ein weiterer Waschschrift und letztendlich die Färbung mit SNAP-GFP (genaue Vorgehensweise und Konzentrationen sind in Kapitel 3.4 zu finden).

¹²Pluronic F-108 (Poly(ethylenglykol)-Block-Poly(propylenglykol)-Block-Poly(ethylenglykol), PEG-PPG-PEG) ist ein Blockcopolymer. Es besitzt zwei hydrophile Polymerketten und eine hydrophobe Polymerkette zwischen den beiden anderen. So kann es an hydrophobe Oberflächen (wie z. B. Si-PE) adhären. Die beiden hydrophilen Ketten stehen nach oben ab, wenn sich die Probe in wässrigen Lösungsmitteln befindet. So erhält man ebenfalls eine hydrophile Oberfläche die gut gegen Proteine passiviert.

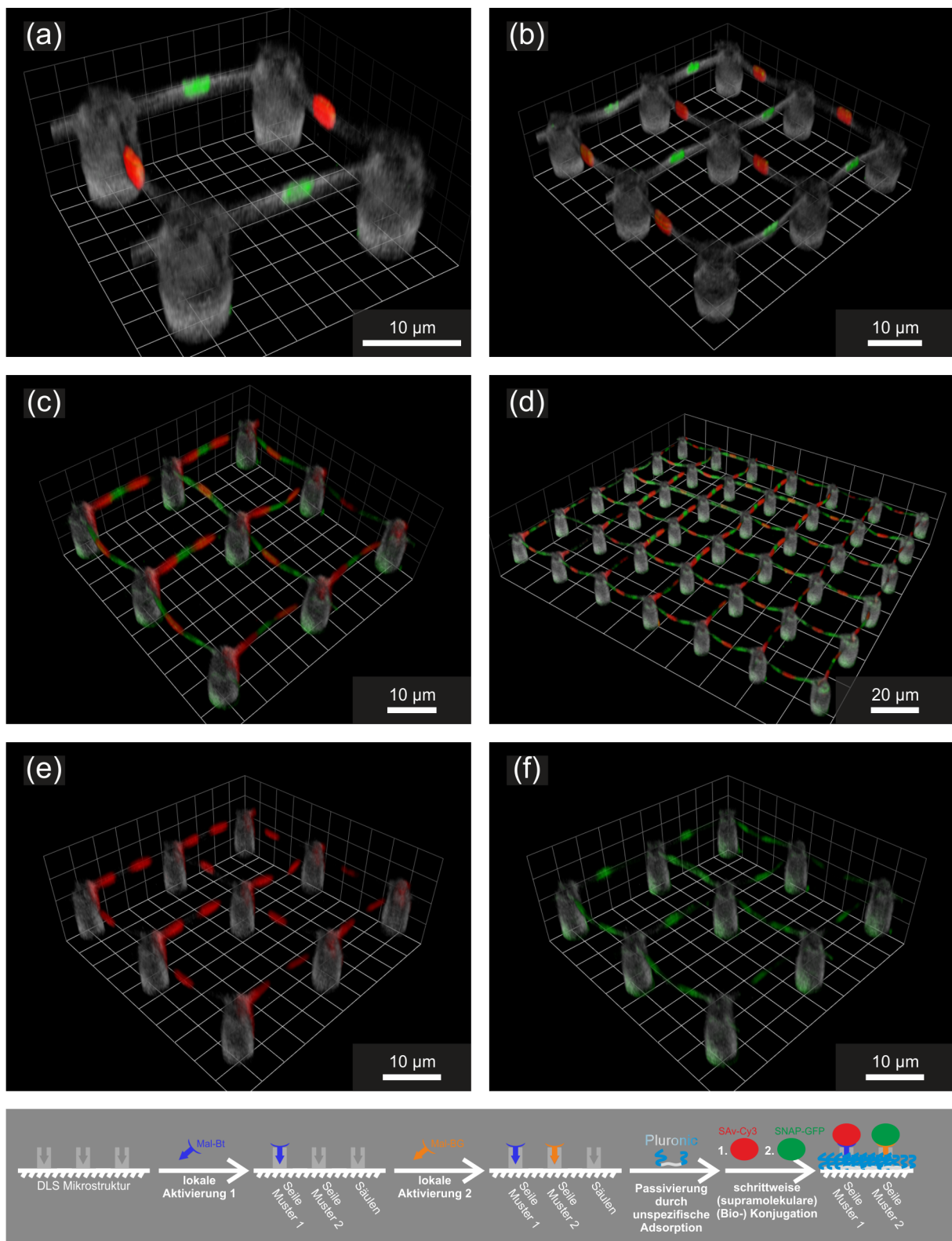


Abbildung 4.23: (a)-(d): 3D Rekonstruktionen von Konfokalschnitten von 3D DLS Strukturen. Die Seile wurden selektiv und abwechselnd mit Biotin (mit Streptavidin-Cy3 gefärbt, rot) und Benzylguanin (mit SNAP-GFP gefärbt, grün) funktionalisiert. Die Autofluoreszenz der Ormocomp-Struktur ist in weiß dargestellt. (e): Weißer und roter Kanal der Struktur aus (c). (f): Weißer und grüner Kanal der Struktur aus (c). Die Autofluoreszenz der Seile ist zu gering um sie zu sehen. Unten: Schematische Darstellung der Vorgehensweise inklusive der verwendeten Chemikalien. Abbildung nach [288].

4.3.5 Kontrollierte Zelladhäsion in 3D

Erste Versuche mit Zellen und Proteinen

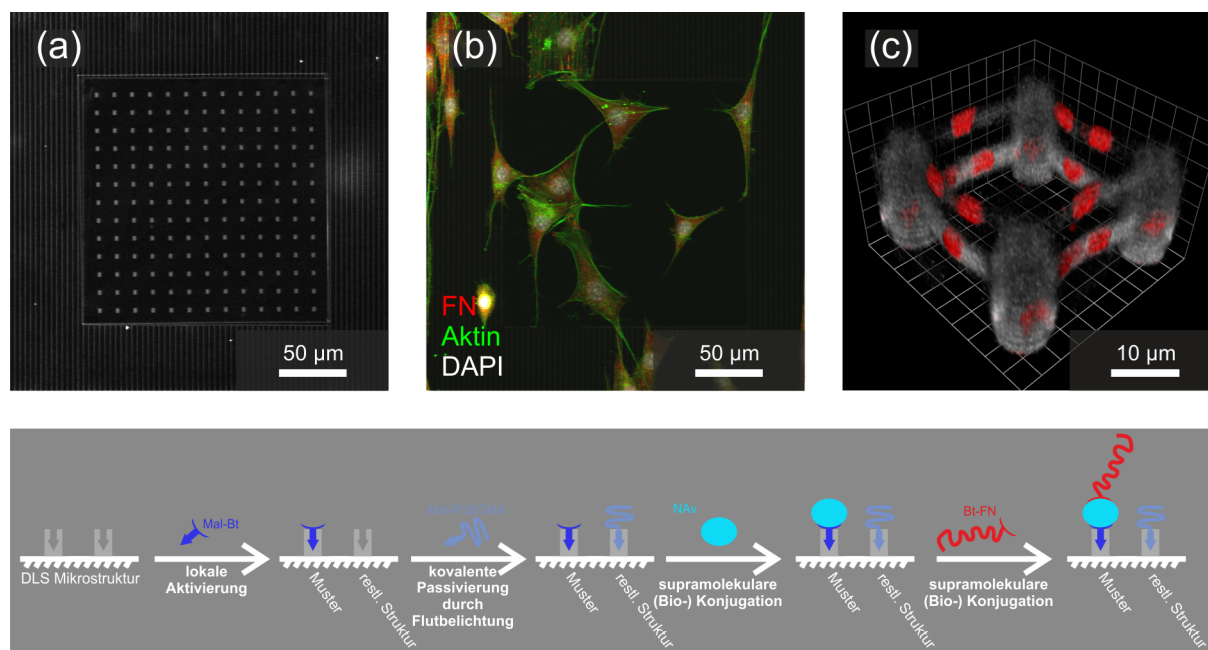


Abbildung 4.24: (a): Fluoreszenzbild einer Rahmenstruktur aus Ormocomp. Das Innere des Rahmens wurde mit Biotin gemustert und anschließend mit Streptavidin-Cy3 gefärbt. Diese Struktur dient als Kontrolle. (b): Fluoreszenzbild einer Rahmenstruktur wie in (a), nur dass die Oberfläche mit Mal-cRGD gemustert wurde. Aufgrund der schlechten Passivierung reagieren die PCF nicht auf das Peptidmuster und wachsen unkontrolliert. (c): Wegen der besseren Passivierung durch das Mal-POEGMA konnte eine 3D Struktur mit Biotin-Fibronektin (Bt-FN, rot) selektiv funktionalisiert und durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden. Unten: Schematische Darstellung der Vorgehensweise inklusive der verwendeten Chemikalien und Proteine in (c).

Da gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe der Photoenol-Chemie und passenden orthogonalen Bindemechanismen Farbstoffe und fluoreszierende Proteine selektiv an 3D Mikrostrukturen angebracht werden können und sogar nicht-funktionalisierte Bereiche passiviert wurden, wurde dieser Mechanismus auch für die kontrollierte Zelladhäsion genutzt.

Zuerst wurden Proben mittels DLS hergestellt, auf denen sich ein Liniengitter aus Ormocomp befand. Zwischen den Liniengittern waren $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ große Freiräume. In diesen sollte die Oberfläche funktionalisiert werden. Abbildung 4.24 (a) zeigt ein Fluoreszenzbild wie die Proben nach dem silanisieren mit Si-PE gemustert wurden und dient zur Kontrolle ob die Diels-Alder-Cycloaddition weiterhin funktioniert. Sie wurde wie die Proben in den vorherigen Kapiteln hergestellt: Cycloaddition mit Mal-Bt, passivieren mit Mal-PEG und färben mit SAv-Cy3. Vorbild für die Art der Musterung war das *Microcontact Printing* (μCP) [8], bei dem kleine Proteininseln auf ein Deckglas gestempelt werden. Die Größe der funktionalisierten Bereiche beträgt $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ mit einem Mittenabstand von $13\ \mu\text{m}$.

In Abbildung 4.24 (b) wurde anstelle dem Mal-Bt das Mal-cRGD verwendet (siehe Kapitel 4.2.1). Passiviert wurde die Probe mit Mal-PEG. Werden auf dieser Probe Zellen (PCF) kultiviert, sollten sie nur dort wo sich das Mal-cRGD befindet in der Lage sein Fokalkontakte auszubilden. Die Zellen passen jedoch ihre Form nicht an das Muster an, wie man es

von den μ CP-Versuchen kennt [8]. Die Zellen wachsen unkontrolliert über den gesamten Bereich hinweg. Nur eine Ausrichtung entlang des Liniengitters ist zu erkennen. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung des Mal-cRGD ist, dass man nur die Fokalkontakte an den funktionalisierten Stellen durch Immunhistochemie nachweisen könnte und nicht das Mal-cRGD an sich. Deshalb war auch die Kontrolle nötig (Abbildung 4.24 (a)). Es musste eine Methode zur Funktionalisierung mit Proteinen und nicht nur eines Peptids gefunden werden.

Am geeignetsten hierfür ist der Biotin-(Strept)Avidin-Mechanismus. Mit Hilfe eines sogenannten Biotinylierung-Kits lassen sich alle Proteine der EZM biotinylieren (siehe Kapitel 3.4.2). Um das biotinylierte Protein (z. B. Biotin-Fibronektin, Bt-FN) an das Mal-Bt an der Oberfläche zu binden, muss man in einem Zwischenschritt das Mal-Bt mit einem Avidin (Av), Streptavidin (SAv) oder Neutravidin (NAv) versehen. Da die verschiedenen Avidine über vier Bindestellen für Biotin verfügen, können sich an jedem Mal-Bt bis zu drei Bt-FN befinden. Um diesen Zwischenschritt zu umgehen, könnte auch ein Maleimid-Streptavidin (Mal-SAv) verwendet werden. Das ist jedoch deutlich teurer als das Mal-Bt und auch aufgrund seiner Größe von ca. 60 kDa, schlechten Löslichkeit in DMF und der damit verbundenen geringen Konzentration in der Lösung nicht für die Photoaktivierung geeignet (nicht gezeigt).

Deshalb wurde eine 3D Mikrostruktur aus Ormocomp (Abbildung 4.21 (c)) mit Si-PE silanisiert und die Seile punktuell mit Mal-Bt funktionalisiert. Zur Passivierung wurde das Mal-POEGMA verwendet, weil es sich als geeigneter herausgestellt hat um die Strukturen gegen Proteine zu passivieren. Es folgte der Zwischenschritt mit NAv und die Kopplung

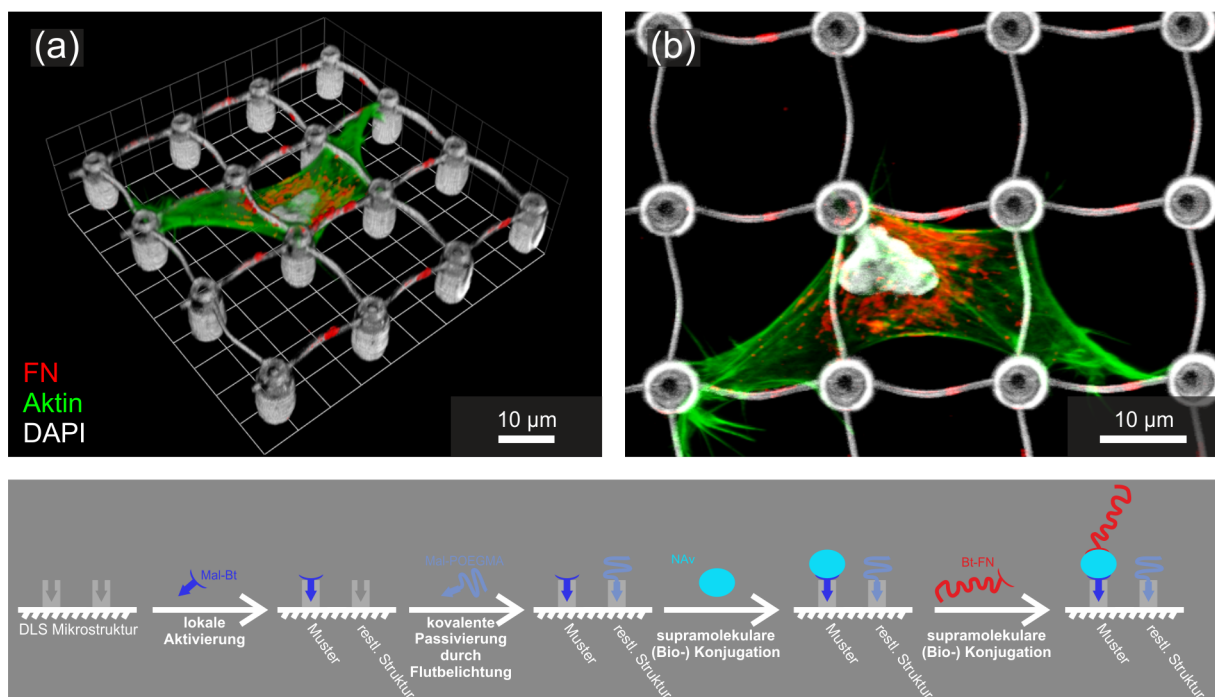


Abbildung 4.25: (a): 3D Rekonstruktion von Konfokalschnitten einer 3D DLS Struktur die selektiv mit Biotin funktionalisiert wurde. Nach einem Passivierungsschritt wurde Neutravidin und dann Biotin-Fibronektin (rot) an die funktionalisierten Stellen gebunden. Anschließend wurden PCFs auf den Strukturen kultiviert. Ormocomp/Zellkern (weiß), Fibronektin (rot), Aktin (grün). (b): Maximalprojektion der Konfokalschnitte aus (a). Unten: Schematische Darstellung der Vorgehensweise inklusive der verwendeten Chemikalien und Proteine.

mit Bt-FN. Das Fibronectin (rot) konnte durch eine immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht und somit nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 (c)).

Auf so funktionalisierten Strukturen wurden Zellen (PCF) kultiviert (Abbildung 4.25). Anhand der roten Punkte (Fibronectin) an den Seilen ist zu erkennen, dass die Funktionalisierung mit dem Protein erfolgreich war und auch die nicht-funktionalisierten Bereiche mit Hilfe des Mal-POEGMA gut gegen das Protein passiviert wurden. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist jedoch, dass die Zelle in dem hier gezeigten und repräsentativen Ausschnitt über die komplette Struktur hinweg wächst. Sie ist in der Lage Fokalkontakte an beliebigen Stellen zu bilden und auch ihr eigenes Protein auf die Struktur zu sekretieren. Somit war eine kontrollierte Zelladhäsion sowohl in 2D als auch in 3D nicht möglich.

Polymerbürsten

Zur vollständigen Passivierung gegen Zelladhäsion, waren alle erdenklichen *Grafting-to*-Ansätze, um die Oberfläche hydrophil (verschiedene Mal-PEG, verschiedene Mal-POEGMA) oder auch extrem hydrophob (Octadecylmaleimid, nicht gezeigt) zu bekommen, getestet. Sie erwiesen sich jedoch als ungeeignet. Auch verschiedene Pluronic Blockcopolymere brachten keinen Erfolg. Teilweise führte die Passivierung mit diesen Methoden zu verringerter Proliferation oder veränderter Morphologie, jedoch nicht zur Apoptose. Die Zellen waren immer in der Lage Fokalkontakte zu bilden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nicht alle PE Moleküle an der Oberfläche mit den Maleimiden reagieren können. Ist erst einmal ein großes und sperriges Molekül wie das Mal-POEGMA an ein PE gebunden, so kann es sein, dass es die nächsten Nachbarn verdeckt und sich kein homogener Film an der Oberfläche bildet. Die kleinen Fehlstellen könnten den Zellen ausreichen um auf dem Substrat zu adhären.

Deshalb sollte ein *Grafting-from*-Ansatz dieses Problem lösen. Das ist zwar komplizierter und nicht so elegant wie ein *Grafting-to*-Ansatz, es wurden mit einer solchen Methode jedoch schon perfekt passivierte Oberflächen hergestellt [299, 300]. Die Idee dahinter ist simpel: Zuerst wird ein sogenanntes Startermolekül auf die Oberfläche gebracht. Dieses ist in der Regel ein kleines Molekül, damit die Oberfläche dicht mit dem Molekül bedeckt ist. Geschieht dies nur durch das Benetzen einer Oberfläche mit einer Lösung in der das Startermolekül enthalten ist, handelt es sich um eine selbstorganisierende Monolage (*self-assembled monolayer*, SAM). Nun besteht die Möglichkeit mittels verschiedener Methoden Polymere von dem Startermolekül aus zu wachsen. Die hier verwendete Methode nennt sich *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP). Mit Hilfe eines Übergangsmetallkomplexes lässt sich so die Konzentration an Radikalen an der Oberfläche kontrollieren. Die in Lösung befindlichen Acrylate oder Methacrylate reagieren mit den Radikalen an der Oberfläche. Im Reaktionsgleichgewicht, werden die Radikale immer wieder abgedeckt, so dass die Polymerisation von der Oberfläche langsam und kontrolliert abläuft (siehe Abbildung 4.26 (b)). In Abbildung 4.26 (a) ist der experimentelle Aufbau zu sehen, mit dem das Wachstum der Polymerbürsten ermöglicht wurde. Er besteht aus einer Schlenklinie (im Hintergrund), einem Schlenkkolben und einem Rundkolben. Die beiden Kolben können mit Hilfe von Septen aus Gummi verschlossen werden. Für das Wachsen der Polymerbürsten werden folgende Chemikalien benötigt:

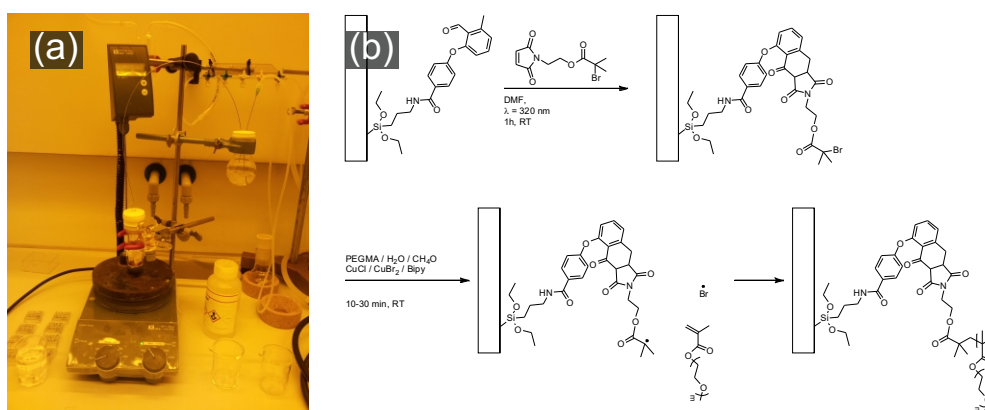


Abbildung 4.26: (a): Aufbau zum Wachsen der Polymerbürsten. (b): Schematische Darstellung der Bindung von Mal-Br an Photoenol und vom Wachstum der Polymerbürsten.

- 8,5 g Poly(ethyleneglykol) methyl ether methacrylat¹³ (PEGMA, Sigma Aldrich)
- 10 ml Wasser
- 5 ml Methanol
- 217,5 mg Bipyridyl
- 55,5 mg CuCl
- 12,2 mg CuBr₂

Bevor alle Chemikalien zusammengefügt werden können, muss der Sauerstoff aus dem System entfernt werden. Der vollständige Versuchsablauf ist folgendermaßen:

Das CuCl, das CuBr₂, die Proben (auf denen sich der ATRP-Initiator befindet, Abbildung 4.26 (b) oben) und ein Magnetrührer werden in den Schlenkkolben gegeben. Dieser wird mit einem Septum verschlossen. Anschließend wird Vakuum (~ 10 mbar) gezogen und wieder mit Stickstoff belüftet. Dieser Vorgang wird 4-5 mal wiederholt. Währenddessen wird das PEGMA, Wasser, Methanol, Bipyridyl und ein Magnetrührer in den Rundkolben gegeben und ebenfalls mit einem Septum verschlossen. Um den gelösten Sauerstoff zu entfernen erfolgte eine Entgasung durch das ständige Einleiten des Inertgases Stickstoff (Strippung). Nach 30-60 Minuten wird die PEGMA-Lösung mit Hilfe einer Transferkanüle in den Schlenkkolben unter ständigem rühren überführt. Nachdem der vollständige Transfer erreicht ist, wird mit der Zeitnahme begonnen. Je nachdem wie lange die Polymerbürsten werden sollen wird ein Zeitintervall zwischen 5 und 30 Minuten gewählt (Abbildung 4.26 (b) unten zeigt schematisch den Ablauf). Nach entsprechender Zeit, wird das Septum entfernt, die Proben werden gründlich gewaschen¹⁴ (10 min Methanol, 10 min Wasser, 10 min Methanol, 10 min Wasser, 10 min Isopropanol), mit Isopropanol gespült und mit Stickstoff getrocknet.

¹³Der Inhibitor wurde zuvor entfernt, da er die ATRP blockieren würde.

¹⁴Kupfer und Kupfersalze sind schädlich für lebende Organismen. Deshalb sollte sichergestellt werden, dass sich keine Spuren davon auf der Probe befinden. Dies könnte zum Zelltod auf der kompletten Probe führen.

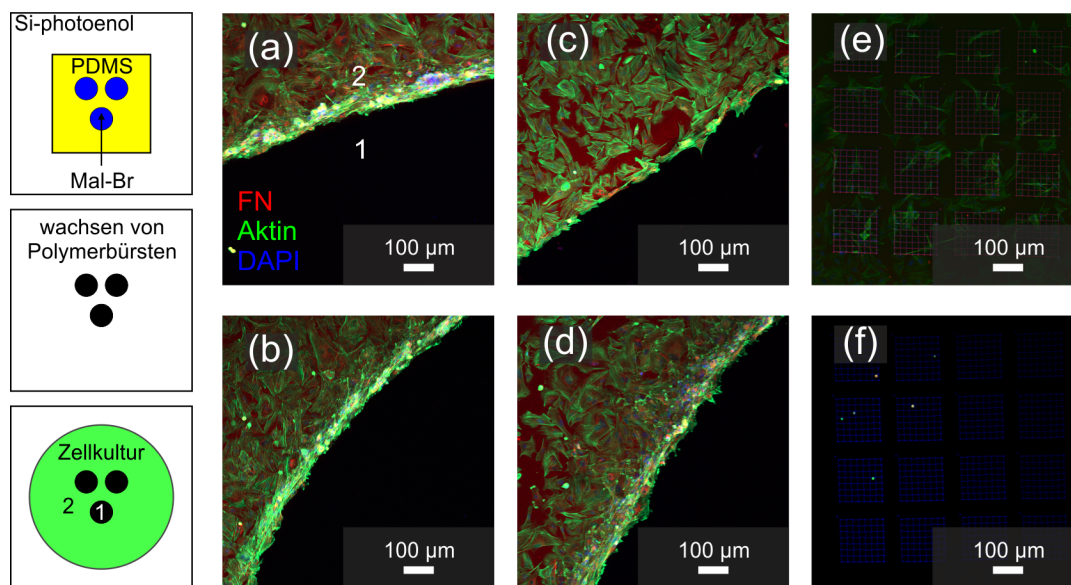


Abbildung 4.27: links: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Auf ein Si-PE silanisiertes Deckglas wird eine Maske aus PDMS gelegt und die Zwischenräume werden mit einer Mal-Br Lösung in DMF aufgefüllt. Die ganze Struktur wird flutbelichtet. Nach dem Wachsen der Polymerbürsten werden PCFs auf den Proben kultiviert. (a)-(d): Fluoreszenzbilder der passivierten und nicht passivierten Bereiche. Das Wachsen der Polymerbürsten erfolgte für unterschiedlich lange Zeitintervalle. (a): 30 Minuten. (b): 20 Minuten. (c): 10 Minuten. (d): 5 Minuten. (e): Fluoreszenzbild einer Anordnung von Mikrostrukturen aus Ormocomp und darauf kultivierten Zellen (PCF). Die Probe wurde mit Photoenol silanisiert und anschließend mit Mal-Br funktionalisiert. (f): Wie (e), jedoch erfolgte ein 30-minütiges Wachstum von Polymerbürsten. Aktin (grün), Fibronectin (rot), Zellkern/Autofluoreszenz (blau)

Als erstes wurde auf flachen Substraten untersucht ob eine perfekte Passivierung zu erreichen ist. Dafür wurden Deckgläser mit Si-PE silanisiert und einer PDMS-Maske bedeckt (Abbildung 4.27 links oben). Die freien Bereiche wurden mit einer Lösung von Maleimid-Bromid (Mal-Br, ATRP-Initiator) in DMF aufgefüllt und mit UV-Licht flutbelichtet. Anschließend erfolgte ein Wachstum von Polymerbürsten für unterschiedliche Zeitintervalle (30 min, 20 min, 10 min, 5 min) (Abbildung 4.27 links mitte). Die Proben wurden mit Fibronectin beschichtet und mit Zellen kultiviert (Abbildung 4.27 links unten). Nur in Bereich 2, wo keine ATRP stattfand, können die Zellen adhären und proliferieren (Abbildung 4.27 (a)-(d)). Die Kante zwischen passiviertem und nicht-passiviertem Bereich ist deutlich sichtbar. Die Passivierung wirkt quasi wie eine unüberwindbare Wand, die die Zellen nicht überwinden können. Bevor die Zellen fixiert und gefärbt wurden, waren die passivierten Bereiche mit bereits gestorbene Zellen bedeckt, da diese nicht in der Lage waren auf der hydrophilen Oberfläche zu adhären. Diese wurden bei den Waschschrritten jedoch von der Probe gespült (nicht gezeigt).

Um herauszufinden ob die Apoptose durch das Mal-Br ausgelöst wird und ob die Polymerbürsten auch auf 3D Strukturen wachsen, wurden zwei Proben auf denen sich 3D Ormocomp-Strukturen befanden mit Si-PE silanisiert. Der Bereich in dem sich die Mikrostrukturen befanden wurde mit Mal-Br durch Flutbelichtung funktionalisiert. Auf einer der beiden Proben erfolgte das Wachstum von Polymerbürsten. Es folgten Waschschrritte, die Beschichtung mit Fibronectin und die Kultivierung mit Zellen. Auf der Kontrolle (Abbildung 4.27 (e)) sind sowohl die 3D Strukturen als auch das Deckglas mit Fibronectin (rot) bedeckt. Zudem wachsen Zellen (Aktin: grün) auf und unter den Strukturen. Die Probe, auf der das

Bürstenwachstum stattfand, passiviert perfekt gegen Fibronectin und Zellen (Abbildung 4.27 (f)). Nur einzelne Zellen, die wohl schon vor dem fixieren tot waren, befanden sich auf den passivierten Bereichen.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe eines *Grafting-from*-Ansatzes perfekt passivierte 3D Strukturen mittels ATRP von PEGMA-Polymerbürsten herstellen lassen.

Etabliertes System

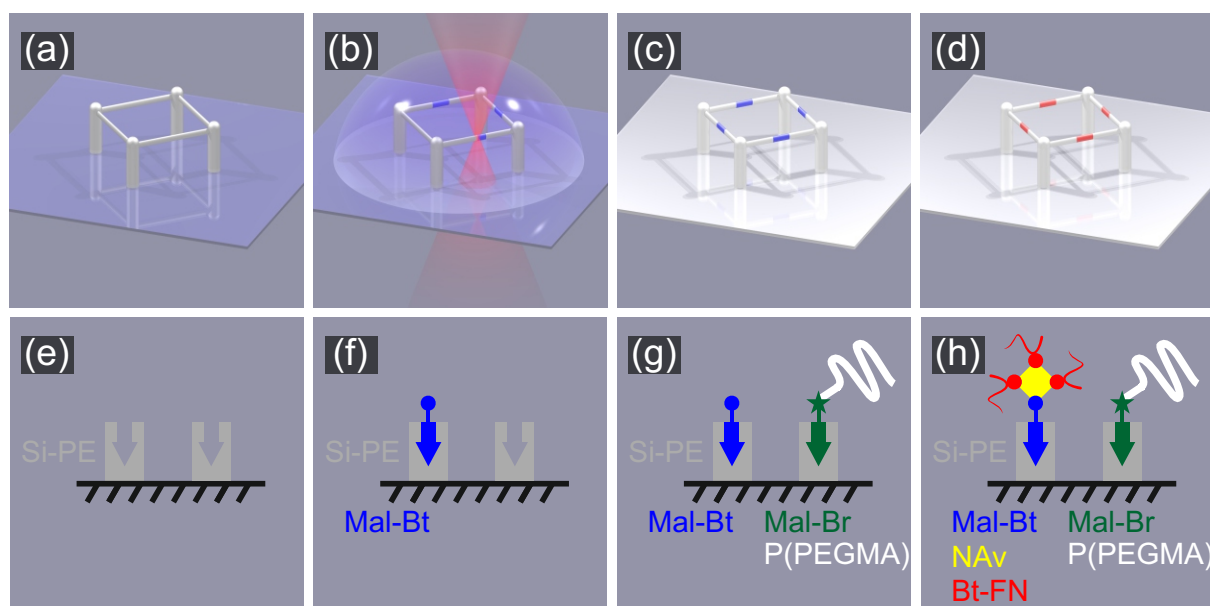


Abbildung 4.28: Schematische Darstellung zum Ablauf der selektiven Funktionalisierung 3D Mikrostrukturen für kontrolliertes Zellwachstum (a)+(e): Silanisierung der 3D Mikrostruktur mit Photoenol. (b)+(f): Bedecken der Struktur mit einer Lösung aus Maleimid-Biotin in DMF und selektive Funktionalisierung mittels 2PA. (c)+(g): Cycloaddition des Mal-Br an die restliche Oberfläche und Passivierung durch das Wachsen der Polymerbürsten. (d)+(h): Biokonjugation der funktionalisierten Bereiche erst mit Neutravidin und dann mit biotinyliertem Fibronectin. Abbildung nach [301].

Nachdem gezeigt wurde, dass sich das Photoenol über einen Zwei-Photonenprozess anregen lässt, sich so 3D Strukturen mit Proteinen funktionalisieren lassen und dass mit Hilfe der PEGMA-Polymerbürsten sich auch Mikrostrukturen vollständig passivieren lassen, wurden diese beiden Methoden kombiniert um die Zelladhäsion in 3D nur durch chemische Modifikation der Oberfläche zu kontrollieren.

Deshalb wurden Mikrostrukturen aus Ormocomp auf ein Deckglas geschrieben und mit Si-PE silanziiert¹⁵ (Abbildung 4.28 (a) und (e)). Anschließend wurde ein Tropfen der Mal-Bt-Lösung auf die Probe gegeben und die Stelle punktuell in der Mitte mit dem Laser ($\lambda = 640 \text{ nm}$) belichtet. Dies führte zu einer orts aufgelösten und photoinduzierten Diels-Alder-Cycloaddition (Abbildung 4.28 (b) und (f)). Die restliche Probe (Substrat- und Strukturoberfläche), die nicht funktionalisiert wurde, wurde mit dem ATRP-Initiator Mal-Br flutbelichtet. Um nun diese

¹⁵Die verschiedenen Waschschrte werden nicht mehr genau erläutert. Sie erfolgten so, wie es in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde.

nicht-funktionalisierten Bereiche gegen Protein- und Zelladhäsion zu passivieren erfolgte ein 30 minütiges Wachstum der PEGMA-Polymerbürsten (Abbildung 4.28 (c) und (g)). An die biotinylierten Bereiche wurde erst Neutravidin gekoppelt. Letztendlich konnte an jedes NAV bis zu drei Biotin-Fibronectin gebunden werden, um eine dichte Bedeckung mit FN zu erreichen (Abbildung 4.28 (d) und (h)).

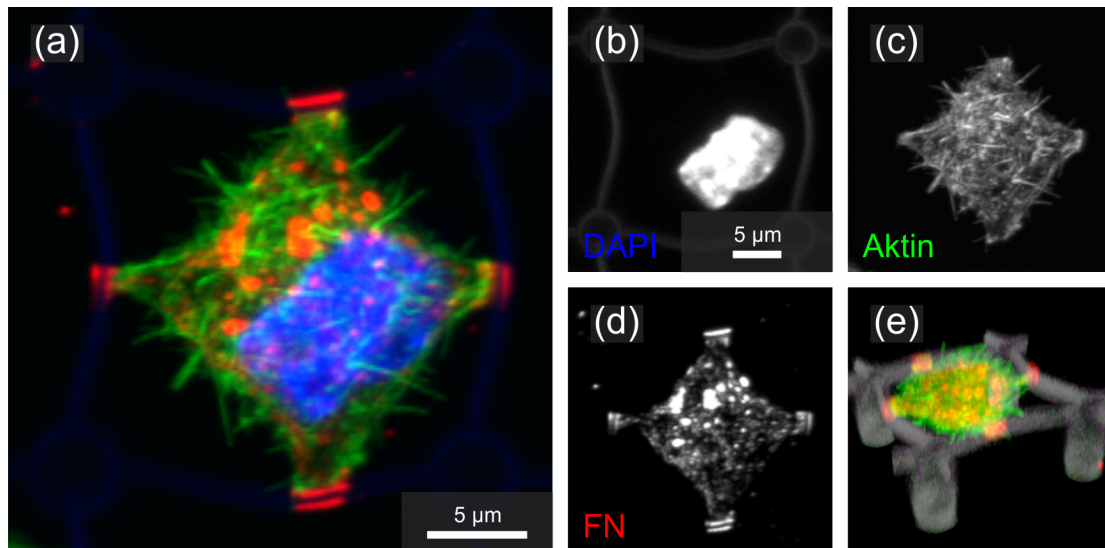


Abbildung 4.29: (a)-(d): Maximalprojektion aus Konfokalschnitten einer wie in Abbildung 4.28 hergestellten Struktur nachdem Zellen (PCF) darin kultiviert wurden. Die Zelle kann nur an den mit Fibronectin funktionalisierten Bereichen adhären, da die restliche Struktur perfekt passiviert ist. (a): Mischbild aus den verschiedenen Kanälen. (b): Autofluoreszenz/Zellkern (blau). (c): Aktin (grün). (d): Fibronectin (rot). (e): 3D Rekonstruktion. Mikrostruktur in weiß dargestellt. Abbildung nach [301].

Primären Hühnerfibroblasten, die in solchen Strukturen kultiviert werden, haben nur die Möglichkeit an den vorher definierten Stellen zu adhären. Die gezeigte Zelle ist perfekt zwischen den biotinylierten Bereichen aufgespannt (Abbildung 4.29). Beim betrachten der einzelnen Fluoreszenzkanäle ist zu sehen, dass die Zelle viel zytoplasmatisches Fibronectin besitzt, jedoch nicht in der Lage ist das eigens gebildete Fibronectin als Haftvermittler auf die Struktur aufzubringen (Abbildung 4.29 (d)). Sie ist zu gut passiviert. Die vielen Filopodien bzw. die Spike-artige Morphologie ist entweder ein Hinweis darauf, dass die Zelle versucht ihre Umgebung zu erkunden und/oder zu wenig Zell-Matrix-Kontakte bilden kann, da die gegebene Fibronectinmenge/-fläche zu gering ist (Abbildung 4.29 (c)). Durch Anwendung der Photoenol-Methode ist auch das Glassubstrat passiviert, was zur Folge hat, dass die Zelle trotz der geringen Strukturhöhe von $10\ \mu\text{m}$ keinen Kontakt zum Deckglas hat (Abbildung 4.29 (e)). Die Kompositstrukturen aus BR12 und Ormocomp haben dagegen eine Höhe von mindestens $20\ \mu\text{m}$. Dort ist der Glasboden nicht passiviert, sondern mit Fibronectin bedeckt. Würde man die Strukturen niedriger machen, würden die Zellen beim Erkunden ihrer Umgebung auch in Kontakt mit dem Boden kommen und aufgrund der höheren Proteinbedeckung eher in diese Richtung migrieren.

Schlussendlich wird noch gezeigt, dass nicht nur biotinyliertes Fibronectin sondern auch biotinyliertes Vitronectin (Bt-VN) verwendet werden kann um 3D Mikrostrukturen zu funktionalisieren. Zudem wurde eine neue Art von Struktur verwendet (Abbildung 4.30 (a)). Sie soll an die bereits in Kapitel 4.1.2 und 4.2.2 verwendeten Strukturen anlehnen und

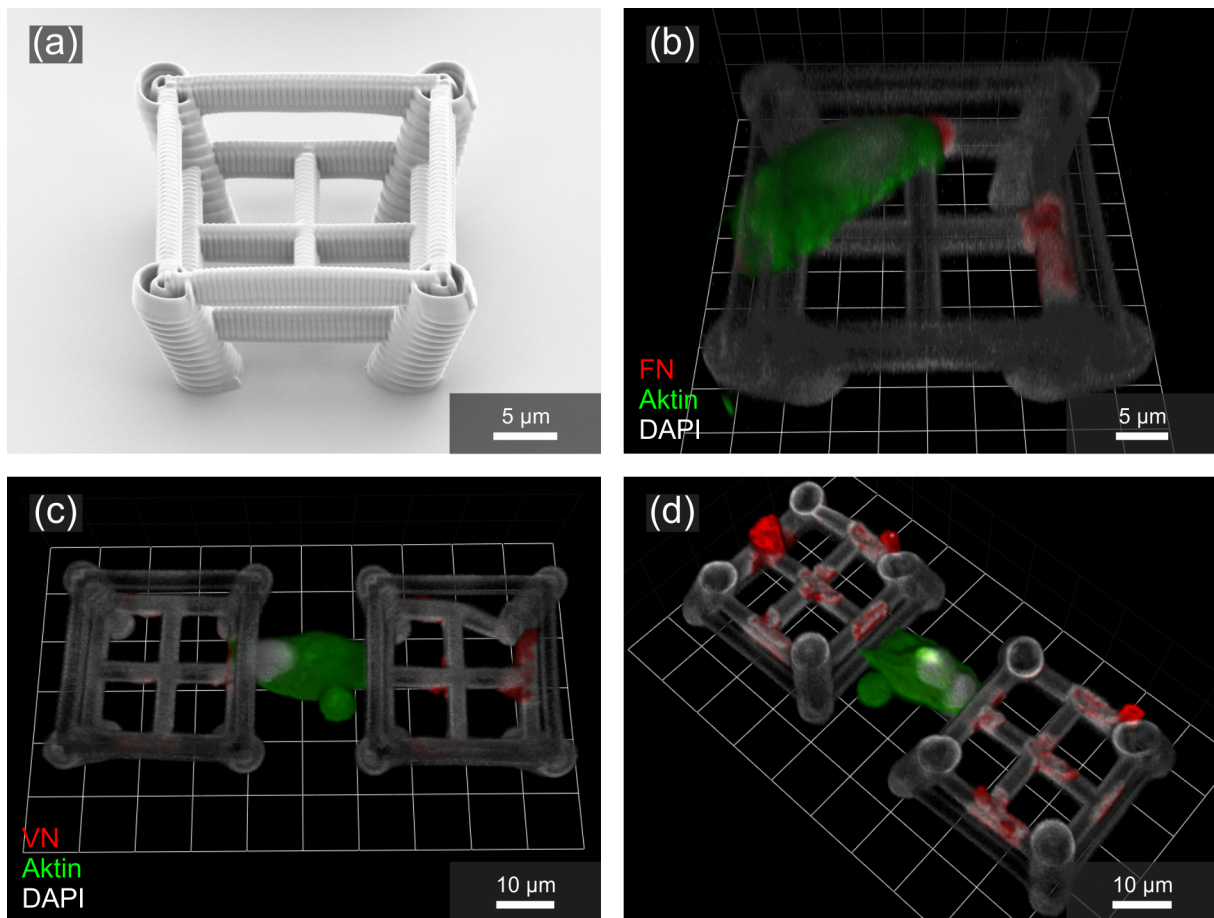


Abbildung 4.30: (a): REM-Bild der zukünftigen Boxringstruktur. (b): 3D Rekonstruktion aus Konfokalschnitten einer wie in Abbildung 4.28 hergestellten Struktur nachdem Zellen (PCF) darin kultiviert wurden. Die Zelle kann nur an den mit Fibronectin funktionalisierten Bereichen adhären. Die Verteilung der Punkte wurde zufällig gewählt. (c): Ähnliche Struktur wie in (b), nur dass anstelle des Biotin-Fibronectin ein Biotin-Vitronectin verwendet wurde. (d): Anderer Blickwinkel auf die Struktur aus (c).

für Zellversuche in der Zukunft eine optimierte Form darstellen (siehe Kapitel 5.3 und 6). Die Funktionalisierung, Passivierung und Beschichtung (Bt-FN oder Bt-VN) erfolgte wie in Abbildung 4.28 beschrieben. Die Anzahl der funktionalisierten Bereiche wurde hier zufällig gewählt, so dass eine unterschiedliche Anzahl auf den Strukturen zu finden ist. Nach dem Aussäen befanden sich nur wenige Zellen in den Strukturen, weshalb die Ergebnisse nicht ganz so aussehen wie es zu erwarten wäre.

Abbildung 4.30 (b) zeigt einen Fibroblasten (PCF) der sich zwischen zwei der gegebenen drei funktionalisierten Punkte (Bt-FN, rot) aufspannt. Die Punkte befinden sich auf unterschiedlichen Höhen. Auf der anderen Probe, die mit Bt-VN funktionalisiert wurde, spannt sich die Zelle (PCF) zwischen zwei Strukturen auf (Abbildung 4.30 (c) und (d)). Die Antikörperfärbung gegen das Vitronectin (rot) ist gelungen, was zeigt, dass dieses Protein ebenfalls verwendet werden kann.

Kapitel 5

Diskussion

Um die vorgestellten Ergebnisse besser zu verstehen und um etwaige Ungereimtheiten aus dem Weg zu schaffen, wird nun auf bestimmte Unterkapitel genauer eingegangen. Dabei handelt es sich um eine kritische Betrachtung der guten Ergebnisse und soll deren Bedeutung keinesfalls mindern.

5.1 Kraftmessungen

In der aktuellen Erforschung von Zellen spielen Kraftmessungen eine große Rolle. Es gibt verschiedenste Methoden mit denen versucht wird die Kontraktionskräfte von Zellen zu messen. Häufig werden hierfür weiche Gele verwendet, die zuvor mit kleinen fluoreszenten Kugeln versehen wurden. Die darauf kultivierten Zellen deformieren die Gele und anhand der Verschiebung der Kügelchen kann die Kontraktionskraft bestimmt werden [302]. Nachteile dieser Methode sind, dass die Zellen auf weichen Substraten adhärieren müssen um überhaupt eine Verschiebung messen zu können. Die Steifigkeit des Substrats spielt jedoch eine wichtige Rolle im Zellverhalten, der Morphologie und der Proliferation [303]. Deshalb ist diese Methode weniger geeignet. Eine weitere Möglichkeit die Kontraktionskräfte zu messen, besteht darin Zellen auf Mikro- oder Nanosäulen zu kultivieren. Diese wurden so funktionalisiert, dass die Zellen nur auf der Oberseite der Säulen adhärieren können [141, 304]. Anhand von Radius, Länge und Verbiegung der Mikrosäulen lassen sich die Kräfte bestimmen die auf die Säule wirken, was wiederum der Kraft entspricht die von der Zelle ausgeübt wurde. Diese Methode ist deutlich besser geeignet, da sie die *in vivo* Situation eher widerspiegelt. Die Proteine sind nicht homogen, sondern räumlich verteilt. Jedoch handelt es sich hierbei nicht um eine Kraftmessung in 3D.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zeigt einen Ansatz Kontraktionskräfte in 3D zu messen. Bei genauerer Betrachtung fallen jedoch mehrere Dinge auf die nicht beachtet wurden: Die Zellen wurden nach dem Kultivieren fixiert, dann gefärbt und mikroskopiert. Das chemische Fixieren mit 4% PFA in PBS dient zur Strukturhaltung und die Zellen sollten ihre Morphologie beibehalten. Es kann jedoch auch vorkommen, dass die Zellen sich beim Fixieren aufgrund von Osmose etwas zusammenziehen oder ausdehnen und somit die Kraftmessungen beeinflusst werden. Dieser Aspekt wurde hier außer Acht gelassen. Um die tatsächliche Morphologie der Zelle zu dokumentieren, sollten vor dem Fixieren DIC Aufnahmen der

Proben gemacht werden, da diese zur Ausmessung verwendet wurden. Nach dem Färben müsste anhand der Fluoreszenzbilder entschieden werden ob es sich um einzelne Zellen handelt und ob die jeweiligen Zellen nur Kontakt zu den Ormocomp-Punkten haben oder ob sie auch Kontakt zu anderen Zellen bzw. zum Glassubstrat haben.

Ein weiterer Punkt ist die Reproduzierbarkeit der Strukturen. Jedoch legen sowohl REM Bilder als auch AFM Messungen nahe, dass sich Strukturen aus unterschiedlichen Schreibprozessen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Obwohl während dem DLS die Leistung minimal schwankt und somit die Dicke der Seile ebenfalls minimal variiert. Was wiederum die Steifigkeit der Seile verändert. Solche Schwankungen können nur durch eine Vielzahl von Experimenten ausgeglichen werden.

Werden die Ormocomp Punkte mit der Messnadel des AFM (*Cantilever*) nicht exakt getroffen, kann es auch hier Fehlern bei der Messung kommen.

Aber nicht nur in der Fabrikation und Charakterisierung der Strukturen kann es zu Fehlern kommen. Auch durch die Zellen wird eine Ungenauigkeit in das System gebracht. Da die Ormocomp-Punkte um die Seile herum geschrieben wurden, kann es vorkommen, dass die Zelle nicht nur eine laterale Auslenkung sondern auch eine Rotation des Punktes auslöst. Diese Rotation kann nicht gemessen werden. Es ist jedoch eine Kraft nötig um den Punkt zu rotieren. Die eigentliche Kraft könnte somit höher sein als die gemessene Kraft. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die Kontraktionskraft immer zur Zellmitte bzw. zum Zellkern gerichtet ist. Zwischen den Ormocomp-Punkten befinden sich teilweise prominente Aktinstressfasern. Wie in Kapitel 2.2.3 bereits beschrieben, werden Kräfte auch entlang solcher *transverse arcs* (diagonale Bögen) ausgeübt [62]. Dies führt dazu, dass die Seile nicht perfekt mittig ausgelenkt werden und eine Asymmetrie entsteht, die wiederum nicht genau bestimmt werden kann.

Die hier vorgestellte Methode eignet sich jedoch sehr gut um eine Vorstellung für die Kontraktionskräfte von Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung zu erhalten. Durch die Messungen lässt sich die Größenordnung der Kräfte abschätzen. Die hier abgeschätzten Kontraktionskräfte pro Ormocomp-Punkt mit ca. 70 nN stimmen mit bereits veröffentlichten Werten überein. Oft wird die Kraft pro Kontaktfläche angegeben. Sie beträgt $5,5 \pm 2 \text{ nN } \mu\text{m}^{-2}$ für HFF Zellen [56]. Die Ormocomp Punkte haben eine Größe von ca. $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$. Das ergibt eine Oberfläche von ca. $24 \mu\text{m}^2$. Wenn die Zelle an einem Ormocomp-Punkt zieht, befinden sich die Fokalkontakte nur auf einer Seite des Punktes. Das wäre eine Fläche von $12 \mu\text{m}^2$ und nach Balaban *et al.* würde das einer Kontraktionskraft von $66 \pm 24 \text{ nN}$ entsprechen. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von uns abgeschätzten Wert überein. Obwohl es sich bei den HFF Zellen und ein andere Zelllinie handelt, kann man sie mit den hier verwendeten PCF Zellen gut vergleichen, da es sich bei beiden Zelllinien um Fibroblasten handelt.

Eine weitere Methode um Kontraktionskräfte von Zellen zu messen wurde im zweiten Teil von Kapitel 4.1.4 vorgestellt. Das Ziel war es herauszufinden ob die Zellen, ähnlich wie auf strukturierten 2D Substraten, kreisförmige Bögen bilden [298]. Anhand der gemessenen Bogenradien könnte man die Kräfte bestimmen. Bisher ist noch unklar, ob man eine 2D Projektion der Daten erstellt und daran einen Kreis anpasst oder ob eine Kugel in einer 3D Rekonstruktion besser geeignet ist.

Die Zellen sollen nicht nur flach zwischen lateral verteilten Punkten aufgespannt sein, wie in dem anderen Projekt zu den Kraftmessungen, sondern auch zwischen axial verteilten Haltepunkten. Die angestrebte Zellform ähnelt deshalb einer Pyramide. Entscheidend für die

Auswertung der Daten ist eine gute axiale Auflösung, die am LSM jedoch, je nach Wellenlänge, nur 600-700 nm beträgt. Da diese Datenqualität nicht ausreichend ist wurden Aufnahmen mit einem hochauflösenden Mikroskop angefertigt. Die Bandpassfilter an diesem Mikroskop unterscheiden sich von denen am LSM, weshalb auch Autofluoreszenz der Strukturen im grünen und teilweise sogar im roten Fluoreszenzkanal zu beobachten war. Dies war auch der Fall, wenn PCF Zellen verwendet wurden, die eine intensivere Färbung der Aktinfilamente aufweisen (nicht gezeigt). Dies macht es unmöglich die Aktinstressfasern getrennt von den Strukturen aufzunehmen. Die deutlichste Färbung des Aktins ist jedoch mit Phalloidin Alexa Fluor 488. Die anderen gängigen Phalloidin gekoppelten Farbstoffe (Phalloidin Alexa Fluor 568 oder 647) liefern ein deutlich schwächeres Signal. Deshalb wäre die Überlegung entweder den Zelltyp zu ändern, weil sich unterschiedliche Zelltypen unterschiedlich gut färben lassen oder den Fotoinitiator zu ändern, um weniger Autofluoreszenz in grünen Kanal zu bekommen. Ein möglicher Kandidat wäre Irgacure 819, das bereits für andere Experimente verwendet wurde. Trotzdem sollten verschiedene Tests durchgeführt werden, wie z. B. Zellkompatibilität, bevor der Fotoinitiator gewechselt wird. Dazu zählen verschiedene Konzentrationen mit entsprechenden Schreibleistungstests zu untersuchen. Zudem sollten die passivierenden Eigenschaften des BR12-Lackes nicht verloren gehen.

Eine weitere Verbesserung, was sowohl die Ausbeute an Zellen in den Strukturen als auch die Mikroskopie verbessern würde, wäre eine effektive Passivierung des Glassubstrats unterhalb der Strukturen. Es wurden teilweise schon flächige Strukturen auf das Substrat geschrieben (wie z. B. in Abbildung 4.1 (b)). Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und zudem wird das Fluoreszenzsignal teilweise absorbiert. Eleganter wäre deshalb das Glassubstrat komplett zu passivieren. Da die Deckgläser mit dem Si-Methacrylat silanisiert werden, könnte das Methacrylat an der Oberfläche für eine Michael-Addition mit einem Thiol-ATRP-Initiator verwendet werden, um mittels ATRP Polymerbürsten zu wachsen. Eine weitere Möglichkeit ist der Photoenol-Mechanismus. Nachteilig wäre, dass der Lithographie Aufbau mit durchstimmbarer Wellenlänge verwendet werden muss. Deshalb wäre die erst genannte Variante vorzuziehen, weil sie für einen höheren Probendurchsatz sorgen würde.

5.2 Thiol-En-Fotolack

Wie bereits gezeigt wurde, stellt der Thiol-En-Fotolack eine Alternative zu den Acrylat-basierten Fotolacken dar. Er ist nicht nur biokompatibel sondern ermöglicht auch eine bessere Zelladhäsion durch eine vorherige kovalente Funktionalisierung mit Mal-cRGD. Deshalb wäre es ebenfalls denkbar, die in Kapitel 4.3.5 verwendeten orthogonalen Bindemechanismen und die Passivierung mittels Polymerbürsten mit diesem Lacksystem zu kombinieren. Der schwerwiegendste Nachteil des Thiol-En-Lacks ist dessen geringe Haltbarkeit (ca. 1-2 Tage) und dass ein Lösungsmittel im Lack enthalten ist. Dies kann dazu führen, dass der Lacktropfen noch während des DLS durchpolymerisiert und somit die Probe nicht mehr verwendet werden kann. Diese Reaktion wurde von dem Fotoinitiator Irgacure 819 katalysiert. Bei der Verwendung von 7-Diethylamino-3-thenoylcoumarin (DETC) als Fotoinitiator, ist der Thiol-En-Lack deutlich haltbarer. Auch die Zugabe von größeren Mengen an Hydrochinon ändert an der Haltbarkeit nichts. Es dient als Radikalabsorber der verhindert, dass spontan entstandene Radikale den Lack durchpolymerisieren, es kann jedoch die Michael-Addition nicht unterdrücken. Das erreicht man nur indem das Alken (Pentaerythritol tetraallyl ether)

durch ein Alkin ersetzt wird. Alkine und Thiole reagieren weniger gut miteinander als Alkene mit Thiolen. So würde der Lack haltbarer werden. Es gibt auch schon Veröffentlichungen von z. B. Lomba *et al.*, die einen Thiol-In-Lack entwickelt und damit Strukturen mittels DLS hergestellt haben. Sie konnten zudem zeigen, dass es möglich ist Zellen auf den Strukturen zu kultivieren [305, 306]. Durch das Verdunsten des Lösungsmittel kann es zudem zu Schwankungen während des DLS kommen, sodass Bereiche über- oder unterbelichtet sind. Deshalb wäre es sinnvoll das Thiol und das Alken bzw. Alkin so zu wählen, dass sich beide, ohne Zugabe von Lösungsmitteln, mischen lassen.

Bei der Herstellung der 3D Strukturen traten ebenfalls ungewollte Nebeneffekte auf. Durch die Michael-Addition des Pentaerythritol tetrakis(mercaptoacetat) mit den Meth- bzw. Acrylaten am Deckglas oder der BR12-Struktur, war Farbstoff an unerwarteten Stellen zu finden (siehe Abbildung 4.17). Um diese ungewollte Reaktion zu unterdrücken, besteht die Möglichkeit, die Meth- bzw. Acrylate am Deckglas oder den BR12-Säulen mittels einer kontrollierten Michael-Addition mit Poly(ethylenglykol) methyl ether thiol (PEG-Thiol) zu schützen.

5.3 Photoenol

Der Mechanismus der Photoenole oder auch des hier verwendeten 2-Formyl-3-methylphenoxy(FMP)-Derivats ist nicht neu. Bereits 1965 stellten Henderson und Ullmann verschiedene 2-Benzyl- und 2-Benzhydryl-3-benzoylchromone vor, die durch Absorption ihre Molekülstruktur änderten [307]. Ein ähnlicher Mechanismus, zu dem hier verwendet, wurde von Albert Pratt im Jahr 1974 vorgestellt [308]. Durch Bestrahlung von 1-Phenyl-1-*o*-tolylethylen in Anwesenheit eines Maleimido-Derivats in Cyclohexan wird eine Diels-Alder-Cycloaddition der beiden Edukte bewirkt. Es waren jedoch auch viele andere Photoenolisierungen bekannt [309]. In den letzten Jahren rückten diese licht-aktivierbaren Moleküle in den Fokus von Polymerchemikern für die sogenannte Klick-Chemie. Zu den vielfältigen Anwendungen zählen z. B. die Kombination verschiedener Photoenole in Lösung, wodurch eine orthogonale Funktionalisierung von Polymeren erreicht wird [310]. Durch eine intramolekulare Diels-Alder-Cycloaddition lassen sich aus langen Polymerketten, an denen sich Photoenole und Maleimide befinden, Nanopartikel herstellen [311]. Zudem gibt auch Ansätze Zellulose-Oberflächen mit Photoenolen zu funktionalisieren [312]. Was jedoch alle Diels-Alder-Reaktionen der verschiedenen Photoenole mit den entsprechenden Dienophilen gemeinsam haben, ist dass sie sehr effizient und unter milden Bedingungen ablaufen.

Das hier verwendete Photoenol hat sich als besonders effizient herausgestellt, da bei der Umwandlung zum Dien eine Wasserstoffbrücke gebildet wird, wodurch die reaktive Form länger aufrechterhalten wird. Dies führt dazu, dass selbst kurz nach der Belichtung das Photoenol noch reaktiv ist. Dies ist eine wichtige Eigenschaft, die für das DLS essentiell ist. Da hier der Laserfokus sehr schnell über die Probe bewegt wird und somit die Aufenthaltsdauer an einem Punkt nur bei wenigen Millisekunden liegt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das hier verwendete FMP-Derivat für das DLS eignet. Das bezieht sich nicht nur auf die kurze Belichtungszeit der einzelnen Bereiche sondern auch auf die demonstrierte Zwei-Photonenabsorption des Photoenols (Abbildung 4.19). Dabei ist es möglich die Anregungswellenlänge über einen Bereich von 150 nm zu variieren und trotzdem eine Funktionalisierung der Oberfläche zu erreichen. Dieser Aspekt bietet einige Vorteile. Da

eine 2PA selbst mit einer Wellenlänge von 700 nm noch möglich ist, kann der Versuchsaufbau vereinfacht werden. Einige femtosekunden gepulste Titan:Saphir (Ti:Sa) Oszillatoren sind durchstimmbare (maximal 670-1070 nm), was den hier verwendeten optisch parametrischen Oszillator (OPO) überflüssig machen würde. Somit würde sich eine Wellenlänge von 800 nm¹ zum eigentlichen Herstellen der 3D Mikrostrukturen eignen und eine Wellenlänge im Bereich zwischen 670 und 700 nm würde für die Zwei-Photonenanregung des FMP-Derivats verwendet werden. Dass der Photoenol-Mechanismus mit 2PA, einem Ti:Sa Oszillator und einer Wellenlänge von 700 nm möglich ist wurde bereits von Quick *et al.* gezeigt [313].

Neben der Möglichkeit, den Photoenol-Mechanismus zweidimensional anzuwenden, wurde eine selektive Funktionalisierung dreidimensionaler Mikrostrukturen gezeigt. Aufgrund der Tatsache, dass das FMP-Derivat nur während der Aktivierung durch Licht reaktiv ist und sobald es mit einem Dienophil ein Cycloaddukt gebildet hat auch keine Bindung mit anderen Molekülen mehr eingehen kann, ist es optimal geeignet Oberflächen mit mehreren Molekülen zu funktionalisieren (Abbildung 4.23). Der einzige begrenzende Faktor ist die Anzahl an biokompatiblen orthogonalen Bindungssystemen. Es gibt viele Klick-Mechanismen die dazu verwendet werden können Farbstoffe kovalent an andere Moleküle zu binden, z. B. mit Hilfe der Azid-Alkin-Cycloaddition. Diese und auch die meisten anderen Klick-Reaktionen haben jedoch den Nachteil, dass sie Kupfer oder Kupfersalze als Katalysatoren benötigen, die wiederum nicht biokompatibel sind [314].

Die Auflösung, die bei der Funktionalisierung des Glassubstrats als auch der 3D Strukturen erreicht wurde, entsprach nicht der theoretisch möglichen Auflösung. Das war jedoch für diese Arbeit nicht entscheidend. Trotzdem sollte die Ursache hierfür etwas genauer betrachtet werden, da eine hohe Auflösung für zukünftige Experimente eine wichtige Rolle spielen könnte. Zum einen war die gewählte 2D Strukturierung nicht optimal um eine möglichst gute Auflösung zu erreichen. Sinnvoller wäre gewesen, zwei Linien mit einem Abstand x_1 zu schreiben und dann einen Abstand x_2 von einigen Mikrometern zu den nächsten beiden Linien zu lassen. Nun könnte der Abstand x_1 immer weiter minimiert werden, bis die beiden Linien nicht mehr räumlich voneinander getrennt werden könnten. Die erreichte laterale Auflösung ist für Zellexperimente völlig ausreichend. Würden die funktionalisierten Bereiche immer kleiner werden und somit die Proteinmenge immer geringer werden, könnten die Zellen nicht richtig kultiviert werden und proliferieren. Viel wichtiger für zukünftige Versuche wäre es die axiale Auflösung zu verbessern, die aktuell aufgrund des verwendeten Lösungsmittels Dimethylformamid (DMF) und dessen geringen Brechungsindexes ($n = 1,43$) begrenzt ist. Es hat sich jedoch als ideales Lösungsmittel für die verwendeten Maleimido-Derivate herauskristallisiert. Zudem besitzt es einen geringen Dampfdruck wodurch es nur sehr langsam verdunstet. Sollten zukünftig andere Maleimido-Derivate zum Einsatz kommen, besteht die Möglichkeit aromatische oder halogenhaltige Lösungsmittel zu verwenden um so den Brechungsindex an den von Glas ($n = 1,523$) anzupassen.

Ein wichtiges Einsatzgebiet des Photoenol-Mechanismus ist die selektive Adhäsion von Zellen in einer 3D Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass dies möglich ist, wenn eine passende Passivierung und der Biotin-(Strept)Avidin Mechanismus zur Bindung des Proteins verwendet wird (siehe Abbildung 4.29). Das EZM-Protein Fibronectin an der Oberfläche der

¹Bei 800 nm liegt das Intensitätsmaximum der Ti:Sa Oszillatoren.

3D Mikrostruktur vermittelt die Zell-Matrix-Adhäsion. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen nur an den Bereichen adhären, die mit Biotin-Fibronectin (Bt-FN) funktionalisiert wurden, auch das Fibronectin konnte mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Allerdings konnte nicht gezeigt werden ob das Bt-FN nach der Biotinylierung noch aktiv ist. Es ist jedoch davon auszugehen, da die Zellen positiv darauf reagieren und auch Zell-Matrix-Kontakte bilden. Weiterhin wurde beobachtet, dass Zellen auch an mäßig gut passivierten Oberflächen adhären. Deshalb sollte eine Methode entwickelt werden um nachweisen zu können, dass das Bt-FN an der 3D Struktur noch aktiv ist.

Wünschenswert wäre es gewesen, nicht nur ein Protein der extrazellulären Matrix (wie z. B. Fibronectin oder Vitronectin) sondern noch zusätzlich ein Protein das bei Zell-Zell-Interaktionen involviert ist einzusetzen (z. B. E-Cadherin). Da gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe des Photoenol-Mechanismus und zwei unterschiedlicher orthogonaler Bindemechanismen auch zwei unterschiedliche Farbstoffe an die Oberfläche der Mikrostrukturen funktionalisiert werden können. Der SNAP-Tag Mechanismus wurde auch genau aus diesem Grund gewählt, da in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Doris Wedlich (Zoologisches Institut, KIT) mehrere stabil transfixierte Zelllinien vorhanden sind, die SNAP-Cadherine exprimieren und sekretieren. Dabei kam es jedoch zu mehreren Komplikationen. Zum einen war anfangs die Passivierung noch nicht gut genug und zum anderen konnte keine eindeutige Immunfärbung an den 3D Strukturen durchgeführt werden.

Die größte Herausforderung, die sich durch die komplette Arbeit wie einen roten Faden gezogen hat, war die jeweils passende Passivierung zu finden. Für die (Strept-)Avidin-Farbstoffe hat sich herausgestellt, dass die einfache *Grafting-to*-Methode, bei der das Mal-PEG direkt an das FMP-Derivat an der Oberfläche geklickt wird, die besten Ergebnisse liefert. Selbst mit einem *Grafting-from*-Ansatz mit PEGMA-Polymerbürsten konnte die Passivierung gegen das SA_v-Cy3 nicht signifikant gesteigert werden. Sollen Oberflächen gegen Proteine passiviert werden, sind einfache *Grafting-to*-Methoden mit dem linearen Mal-PEG nicht mehr ausreichend. Hierfür musste eine Art „hydrophiler Teppich“ erzeugt werden. Dies konnte zum einen mit Hilfe von Pluronic F-108 oder zum anderen mit Mal-POEGMA erreicht werden. Der hydrophobe Mittelteil des Pluronic F-108 adhärert an die ebenfalls hydrophobe Si-PE Oberfläche. In wässriger Lösung ragen die hydrophilen Polymerketten nach oben und bilden so ein dichtes Netzwerk. Ähnlich ist es beim Mal-POEGMA. Bei der POEGMA-Einheit handelt es sich auch um Polymerbürsten, die gut gegen Proteine wie z. B. das Bt-FN passivieren. Nachteil der *Grafting-to*-Methoden ist jedoch, dass die Oberfläche nicht sehr dicht mit großen Molekülen besetzt werden kann. Befindet sich auf einer Photoenol-Bindestelle ein Mal-POEGMA, verdeckt es nächstgelegene Bindestellen. So entstehen Hohlräume, die wiederum dazu führen, dass die Oberfläche nicht hundertprozentig passiviert wird. Zellen, die sich auf der Oberfläche befinden und versuchen dort zu adhären, sind in der Regel erfolgreich. Deshalb war, neben der Evaluierung des Photoenol-Mechanismus für die Zwei-Photonenanregung, die Implementierung der *Grafting-from*-Methode der wichtigste Fortschritt dieser Arbeit. Durch die perfekte Passivierung gegen Zellen mit Hilfe der PEGMA-Polymerbürsten war es letztendlich möglich eine selektive Zelladhäsion in 3D zu realisieren.

Kapitel 6

Ausblick

Um das Verhalten von Zellen auf definierte Faktoren zu untersuchen und somit das Zellverhalten zu kontrollieren ist die Reproduktion der nativen Wachstumsumgebung unabdingbar. Es ist entscheidend (passende Experimente auszuwählen um) relevante Parameter zur Optimierung einer künstlichen EZM zu untersuchen.

Wie schon in der Diskussion beschrieben stellen beispielsweise Kraftmessungen einen wichtigen Punkt der Beobachtung des Zellverhaltens dar. Dabei spielt die räumliche Verteilung der Adhäsionspunkte eine wichtige Rolle. Um dies weiter zu untersuchen könnten, unter Berücksichtigung der erwähnten Kriterien, Kraftmessungen in Strukturen durchgeführt werden, in denen die sechs Adhäsionspunkte nicht hexagonal angeordnet sind (Abbildung 6.1 (a)).

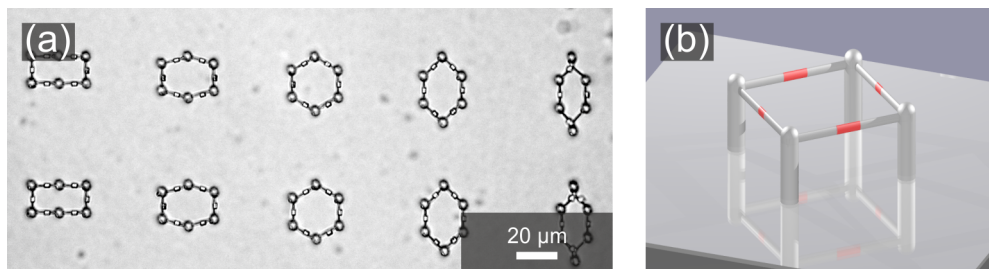


Abbildung 6.1: (a): DIC-Bild von Kompositstrukturen in denen in Zukunft Kraftmessungen durchgeführt werden könnten. Die sechs Adhäsionspunkte sind unterschiedlich angeordnet. (b): Schematische Darstellung einer Struktur mit unterschiedlich großen Proteinpunkten.

Durch die Elongation der Strukturen ändert sich auch die Form der Zelle. Dabei ist es von Interesse, ob sich dadurch die Kontraktionskräfte an den verschiedenen Punkten ändern oder diese allein von der Größe bzw. der Fläche der Fokalkontakte abhängen. Um dies genauer zu untersuchen, könnten Strukturen mit unterschiedlich großen Proteinpunkten hergestellt werden (Abbildung 6.1 (b)). Je nach Strukturtyp (Quadrat, Fünfeck, Sechseck) könnte ebenfalls die Anzahl größerer bzw. kleinerer Proteinpunkte variiert werden. Zellen, die in solchen Strukturen kultiviert werden, sollten an den größeren Proteinpunkten größere Kräfte ausüben. Dies würde zu einer stärkeren Auslenkung der Seile führen. Weiterhin könnte untersucht werden, ob die Symmetrie eine Rolle spielt. Liegen sich Punkte mit gleicher oder unterschiedlicher Größe gegenüber, könnte dies Auswirkungen auf die Auslenkung beider oder eines Seils haben. Zudem könnte neben der optimalen Geometrie auch die optimale Steifigkeit der Struktur

entscheidend sein. Es ist noch unklar ob es eine maximale Kontraktion von Fibroblasten in solchen 3D Strukturen gibt, ähnlich wie sie für Herzzellen beobachtet wurde [221].

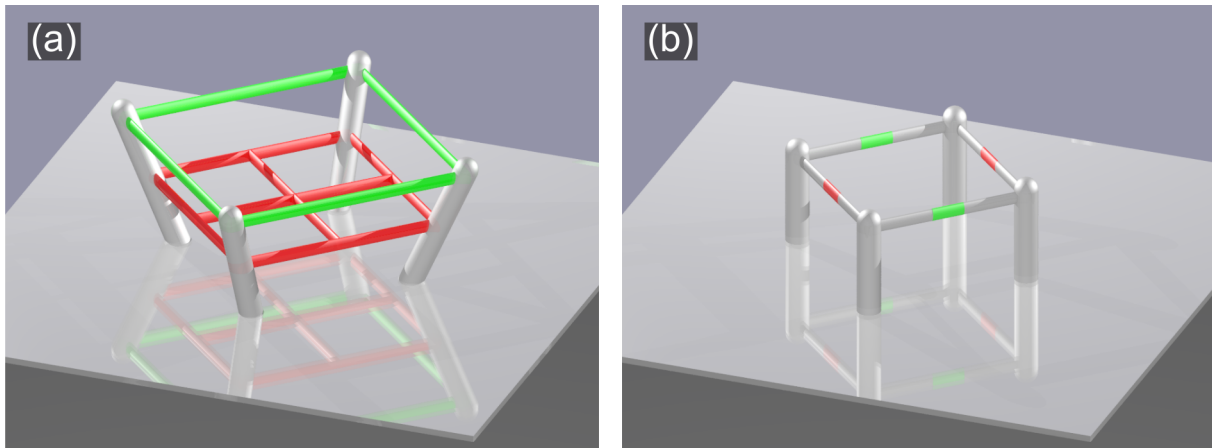


Abbildung 6.2: (a): Schematische Darstellung einer Boxringstruktur. Die grünen Balken repräsentieren eine Funktionalisierung mit Cadherin, die roten Balken und Querverstrebungen repräsentieren eine Funktionalisierung mit Fibronectin. (b): Schematische Darstellung einer Struktur, die mit unterschiedlichen Proteinen der EZM (rot: Fibronectin, grün: Vitronectin) funktionalisiert ist.

Wenn in Zukunft die Aufreinigung der SNAP-Cadherine erfolgreich ist, könnte eine Struktur wie in Abbildung 6.2 (a) hergestellt werden. Sie simuliert einer Zelle, die in dieser Struktur adhärert, sie würde sich in einem Epithel befinden. Die grünen Balken repräsentieren eine Funktionalisierung mit Cadherin und erlauben nur die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wie sie auch im Epithel zu finden sind. Die roten Balken repräsentieren eine Funktionalisierung Proteinen der EZM (z. B. Fibronectin), welche die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten erlauben. Das soll der Zelle vermitteln, sie würde sich auf der Basalmembran befinden. So wäre es beispielsweise möglich, Stammzellen aktiv durch eine künstliche EZM in Epithelzellen zu differenzieren.

Ein weiterer Ansatz ist die Wirt-Gast-Chemie, die in den letzten Jahren häufig verwendet wurde um Oberflächen mit Proteinen zu funktionalisieren. Dabei werden aus zwei oder mehr Molekülen oder Ionen sogenannte (Supra-)Strukturen gebildet, deren Bindung nicht kovalent ist. Lee *et al.* nutzten diesen Mechanismus um Proteine an Mikropartikel zu binden [315].

Es ist ebenfalls möglich ein Polyacrylamidgel mit einem NHS-Ester funktionalisiert und daran einen Fc-Antikörper zu binden, an den ein Fc-Cadherin bindet [316]. Mit Fc-Tag versehene Cadherine und NHS-terminierte Maleimide sind kommerziell erhältlich. Daher könnten 3D Strukturen mit dieser Methode funktionalisiert werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin Proteine kovalent über verschiedene Klick-Chemie-Mechanismen an die Strukturen zu funktionalisieren. Ein verbreiteter Klick-Chemie-Mechanismus ist die Azid-Alkin-Cycloaddition. Der Nachteil der meisten dieser Reaktionen ist, dass Kupfer oder Kupfersalze als Katalysatoren oder eine hohe Temperatur (60-100°C) benötigt wird. Auch hier wird an verschiedenen Molekülen geforscht, die aufgrund ihrer Elektronenverteilung eine Cycloaddition erleichtern. Es existieren auch schon Maleimido-Derivate, wie z. B. Maleimid-Dibenzocyclooctin (Mal-DBCO), die zur Cycloaddition mit einem

Azid ohne Kupfer geeignet sind. Des Weiteren kann NHS-Azid käuflich erworben werden. Dieses kann genutzt werden um Amin-Gruppen von Proteinen mit Aziden zu versehen. Dieser Vorgang entspricht den Ablauf entsprechend einer Biotinylierung und wird Azidierung genannt. Somit könnten Teile einer 3D Struktur mit Mal-Bt und andere Teile mit Mal-DBCO funktionalisiert werden und anschließend mit Bt-FN und Azid-VN versehen werden (Abbildung 6.2 (b)). Mit solchen Strukturen könnte die Zelladhäsion in 3D genauer untersucht werden, ähnliche wie es Pinon *et al.* auf 2D strukturierten Substraten mit Hilfe selektierter NIH/3T3-Zellen mit sehr geringer β_3 Integrin Expression gezeigt haben [317].

Nicht nur die Methoden um die Strukturen mit verschiedenen Proteinen zu funktionalisieren können verbessert und erweitert werden, auch die vorherigen Schritte sind noch nicht optimal. Bisher müssen die Strukturen erst im Plasma-Ofen aktiviert und mit dem Photoenol silanisiert werden. Da dieser Schritt zeitaufwendig ist, manche Polymere hierfür nicht geeignet sind und etwaige vorherige Funktionalisierungen zerstört werden hat Alexander Quick einen Fotolack entwickelt, dessen Polymerisierung mit Hilfe der Photoenol-Chemie und nicht durch Radikalbildung erzielt wird. Der Lack besteht aus einem kleinen Molekül, das vier Photoenol-Gruppen trägt und einem Copolymer mit einer Molekulargewicht von 10500 g mol^{-1} , das in regelmäßigen Abständen eine Maleimido-Gruppe trägt. Nach der Herstellung der Strukturen befinden sich freie Photoenol-Gruppen an der Oberfläche, die für eine nachträgliche Funktionalisierung verwendet werden können [313].

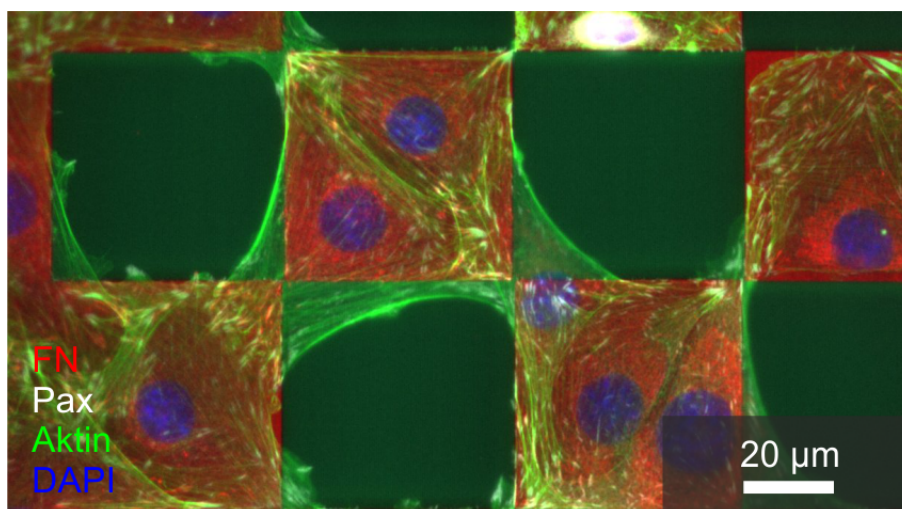


Abbildung 6.3: Das Schachbrettmuster wurde aus dem TPE-TA-Fotolack hergestellt. Anschließend wurde die Probe mit Fibronectin (rot) beschichtet und es wurden REF Zellen (grün: Aktin, blau: Zellkern, weiß: Paxillin) darauf kultiviert.

Ein anderer Ansatz wäre, ein Photoenol-(Meth)Acrylat in den PETA-Fotolack zu mischen. Durch die Acrylat- bzw. Methacrylat-Gruppe wird das Photoenol in das Polymer Netzwerk eingebunden. Dabei kommt es zu einer Reduktion des Elastizitätsmoduls des Fotolacks, jedoch sollten sich auf der Oberfläche der Polymerstruktur Photoenol-Gruppen befinden, die nachträglich selektiv funktionalisiert werden könnten. Optimal wäre, wenn anstatt des PETA-Fotolacks ein passivierender Fotolack verwendet werden könnte. So könnten passivierende, selektiv funktionalisierbare Strukturen hergestellt werden. Das PEG-DA wird sich hierfür nicht eignen, da die Quervernetzung wegen des Monoacrylats noch weiter herab gesetzt werden

würde.

Seit kurzem sind verschiedene Trimethylolpropanethoxylat-Triacrylate (TPE-TA, Sigma Aldrich) erhältlich. Sie sind ähnlich aufgebaut wie das PETA-Monomer nur dass zwischen der Pentaerythritol-Gruppe und den Acrylaten mehrere Ethoxy-Gruppen eingefügt wurden (Ethoxylierung), weshalb das polymerisierte TPE-TA hydrophil sein müsste. Aus dem Monomer kann ein Fotolack durch die Hinzugabe von 3 gew.% Irgacure 369 hergestellt werden. Aufgrund der drei Acrylat-Gruppen sollte die Quervernetzung dieses Fotolacks höher sein als für den PEG-DA- oder den BR12-Lack. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich mittels DLS Strukturen herstellen lassen und dass diese protein- und zellabweisend sind (Abbildung 6.3).

Literaturverzeichnis

- [1] R. G. Harrison, *The reaction of embryonic cells to solid structures*, Journal of Experimental Zoology **17** (4), 521 (1914). (S. 1, 11, 20)
- [2] A. M. Greiner, B. Richter und M. Bastmeyer, *Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell Culture Studies*, Macromolecular Bioscience **12** (10), 1301 (2012). (S. 1, 11, 12, 20, 21, 26, 62, 63, 64)
- [3] 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** (1), 421, PMID: 22524507 (2012). (S. 1, 12, 13, 14, 15, 16)
- [4] 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** (23), 4494 (2008). (S. 1, 17, 19, 20, 21)
- [5] 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** (8), 868 (2010). (S. 1, 18, 19, 20, 21, 32, 34, 62)
- [6] 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** (2), 611 (2014). (S. 1, 34, 63)
- [7] A. Kumar und G. M. Whitesides, *Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol 'ink' followed by chemical etching*, Applied Physics Letters **63** (14), 2002 (1993). (S. 1)
- [8] 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** (1), 41 (2004). (S. 1, 14, 60, 87, 88)
- [9] 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** (6), 1649 (2008). (S. 1, 14)

- [10] S. G. Ricoult, M. Pla-Roca, R. Safavieh, G. M. Lopez-Ayon, P. Grütter, T. E. Kennedy und D. Juncker, *Large Dynamic Range Digital Nanodot Gradients of Biomolecules Made by Low-Cost Nanocontact Printing for Cell Haptotaxis*, *Small* **9** (19), 3308 (2013). (S. 1)
- [11] 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). (S. 1, 18, 20)
- [12] C. A. DeForest und K. S. Anseth, *Photoreversible Patterning of Biomolecules within Click-Based Hydrogels*, *Angewandte Chemie International Edition* **51** (8), 1816 (2012). (S. 1, 17, 18, 19)
- [13] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle* (WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004). (S. 3, 5)
- [14] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney und D. E. Discher, *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*, *Cell* **126** (4), 677 (2006). (S. 3, 11, 14)
- [15] W. Li, K. Jiang, W. Wei, Y. Shi und S. Ding, *Chemical approaches to studying stem cell biology*, *Cell research* **23** (1), 81 (2013). (S. 3)
- [16] A. D. Bershadsky, N. Q. Balaban und B. Geiger, *Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19** (1), 677, PMID: 14570586 (2003). (S. 4)
- [17] A. Bershadsky, M. Kozlov und B. Geiger, *Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize*, *Current Opinion in Cell Biology* **18** (5), 472, cell-to-cell contact and extracellular matrix (2006). (S. 4)
- [18] U. S. Schwarz und S. A. Safran, *Physics of adherent cells*, *Rev. Mod. Phys.* **85**, 1327 (Aug 2013). (S. 4, 8)
- [19] D. Cuvelier, M. Thiéry, Y.-S. Chu, S. Dufour, J.-P. Thiéry, M. Bornens, P. Nassoy und L. Mahadevan, *The Universal Dynamics of Cell Spreading*, *Current Biology* **17** (8), 694 (2007). (S. 4)
- [20] S. M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti und P.-Y. Chan-Hui, *Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase.*, *The Journal of Cell Biology* **134** (3), 793 (1996). (S. 4)
- [21] F. A. Moretti, A. K. Chauhan, A. Iaconig, F. Porro, F. E. Baralle und A. F. Muro, *A Major Fraction of Fibronectin Present in the Extracellular Matrix of Tissues Is Plasma-derived*, *Journal of Biological Chemistry* **282** (38), 28057 (2007). (S. 5)
- [22] J. Engel, E. Odermatt, A. Engel, J. A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde und R. Timpl, *Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two*

- multifunctional proteins of the extracellular matrix*, Journal of Molecular Biology **150** (1), 97 (1981). (S. 5)
- [23] M. Leiss, K. Beckmann, A. Girós, M. Costell und R. Fässler, *The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo*, Current Opinion in Cell Biology **20** (5), 502, cell-to-cell contact and extracellular matrix (2008). (S. 5)
- [24] R. Pytela, M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti, *Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor*, Cell **40** (1), 191 (1985). (S. 6)
- [25] S. E. Ochsenhirt, E. Kokkoli, J. B. McCarthy und M. Tirrell, *Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement*, Biomaterials **27** (20), 3863 (2006). (S. 6)
- [26] E. A. Evans und D. A. Calderwood, *Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion*, Science **316** (5828), 1148 (2007). (S. 6)
- [27] R. O. Hynes, *Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines*, Cell **110** (6), 673 (2002). (S. 6)
- [28] B. Geiger, J. P. Spatz und A. D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*, Nature Reviews Molecular Cell Biology **10** (1), 21 (2009). (S. 6, 8, 11)
- [29] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, J.-H. Wang und T. A. Springer, *Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics*, Nature **432** (7013), 59 (2004). (S. 6)
- [30] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar und B. Geiger, *Functional atlas of the integrin adhesome*, Nature Cell Biology **9** (8), 858 (2007). (S. 6)
- [31] N. C. Gauthier, M. A. Fardin, P. Roca-Cusachs und M. P. Sheetz, *Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading*, Proceedings of the National Academy of Sciences (2011). (S. 6)
- [32] T. D. Pollard und G. G. Borisy, *Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments*, Cell **112** (4), 453 (2003). (S. 6)
- [33] T. D. Pollard und J. A. Cooper, *Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement*, Science **326** (5957), 1208 (2009). (S. 6)
- [34] A. J. Ridley, *Life at the Leading Edge*, Cell **145** (7), 1012 (2011). (S. 6)
- [35] T. M. Svitkina und G. G. Borisy, *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*, The Journal of cell biology **145** (5), 1009 (1999). (S. 6)
- [36] A. B. Verkhovsky und G. G. Borisy, *Non-sarcomeric mode of myosin II organization in the fibroblast lamellum.*, The Journal of cell biology **123** (3), 637 (1993). (S. 6)

- [37] S. Pellegrin und H. Mellor, *Actin stress fibres*, Journal of Cell Science **120** (20), 3491 (2007). (S. 6)
- [38] K. Burridge und E. S. Wittchen, *The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers*, The Journal of cell biology **200** (1), 9 (2013). (S. 6)
- [39] C. D. Nobes und A. Hall, *Rho, Rac, and Cdc42 {GTPases} regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*, Cell **81** (1), 53 (1995). (S. 7)
- [40] E. A. Clark, W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons und R. O. Hynes, *Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases*, The Journal of Cell Biology **142** (2), 573 (1998). (S. 7)
- [41] E. Zamir, B. Katz, S. Aota, K. Yamada, B. Geiger und Z. Kam, *Molecular diversity of cell-matrix adhesions*, Journal of Cell Science **112** (11), 1655 (1999). (S. 7)
- [42] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger und A. D. Bershadsky, *Focal Contacts as Mechanosensors: Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an Mdia1-Dependent and Rock-Independent Mechanism*, The Journal of Cell Biology **153** (6), 1175 (2001). (S. 7)
- [43] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons und A. R. Horwitz, *Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back*, Science **302** (5651), 1704 (2003). (S. 7)
- [44] R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi und B. Geiger, *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes*, Biochemical Society Transactions **32** (3), 416 (2004). (S. 7)
- [45] U. S. Schwarz und M. L. Gardel, *United we stand – integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction*, Journal of Cell Science **125** (13), 3051 (2012). (S. 7)
- [46] T. Shemesh, A. D. Bershadsky und M. M. Kozlov, *Physical Model for Self-Organization of Actin Cytoskeleton and Adhesion Complexes at the Cell Front*, Biophysical Journal **102** (8), 1746 (2012). (S. 7)
- [47] R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kam und B. Geiger, *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*, Journal of Cell Science **116** (22), 4605 (2003). (S. 7)
- [48] P. W. Oakes und M. L. Gardel, *Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity*, Current Opinion in Cell Biology **30** (0), 68, cell adhesion and migration (2014). (S. 7)
- [49] R. L. Juliano, *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily Members*, Annual Review of Pharmacology and Toxicology **42** (1), 283, PMID: 11807174 (2002). (S. 7)

- [50] M. Dembo und Y.-L. Wang, *Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts*, *Biophysical Journal* **76** (4), 2307 (1999). (S. 7)
- [51] J. P. Butler, I. M. Tolić-Nørrelykke, B. Fabry und J. J. Fredberg, *Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings*, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **282** (3), C595 (2002). (S. 7)
- [52] U. S. Schwarz, N. Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger und S. A. Safran, *Calculation of Forces at Focal Adhesions from Elastic Substrate Data: The Effect of Localized Force and the Need for Regularization*, *Biophysical Journal* **83** (3), 1380 (2002). (S. 7)
- [53] B. Sabass, M. L. Gardel, C. M. Waterman und U. S. Schwarz, *High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances*, *Biophysical Journal* **94** (1), 207 (2008). (S. 7)
- [54] S. V. Plotnikov, A. M. Pasapera, B. Sabass und C. M. Waterman, *Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration*, *Cell* **151** (7), 1513 (2012). (S. 7)
- [55] W. R. Legant, C. K. Choi, J. S. Miller, L. Shao, L. Gao, E. Betzig und C. S. Chen, *Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110** (3), 881 (2013). (S. 7)
- [56] 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** (5), 466 (2001). (S. 7, 20, 96)
- [57] 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** (4), 1484 (2003). (S. 7, 16, 18, 19, 20)
- [58] T. M. Olski, A. A. Noegel und E. Korenbaum, *Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily*, *Journal of Cell Science* **114** (3), 525 (2001). (S. 7)
- [59] 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** (3), 1047 (2000). (S. 7)
- [60] E. Cukierman, R. Pankov und K. M. Yamada, *Cell interactions with three-dimensional matrices*, *Current Opinion in Cell Biology* **14** (5), 633 (2002). (S. 7, 11)
- [61] J. Howard, *Mechanics of motor proteins*, in *Physics of bio-molecules and cells. Physique des biomolécules et des cellules* (Springer, 2002), 69–94. (S. 8)

- [62] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes und J. Plastino, *Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility*, *Physiological reviews* **94** (1), 235 (2014). (S. 8, 96)
- [63] 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** (10), 3681 (2006). (S. 8)
- [64] M. Krendel und M. S. Mooseker, *Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity*, *Physiology* **20** (4), 239 (2005). (S. 8)
- [65] L. M. Bond, H. Brandstaetter, J. R. Sellers, J. Kendrick-Jones und F. Buss, *Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways*, *Biochemical Society Transactions* **39** (5), 1115 (2011). (S. 8)
- [66] F. Matsumura, Y. Yamakita und S. Yamashiro, *Myosin light chain kinases and phosphatase in mitosis and cytokinesis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **510** (2), 76, *protein Kinases and Phosphatases: regulators of motile systems* (2011). (S. 8)
- [67] A. W. Orr, B. P. Helmke, B. R. Blackman und M. A. Schwartz, *Mechanisms of Mechanotransduction*, *Developmental Cell* **10** (1), 11 (2006). (S. 8)
- [68] E. R. Gomes, S. Jani und G. G. Gundersen, *Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes {MTOC} Polarization in Migrating Cells*, *Cell* **121** (3), 451 (2005). (S. 8)
- [69] I. M. Pinto, B. Rubinstein, A. Kucharavy, J. R. Unruh und R. Li, *Actin Depolymerization Drives Actomyosin Ring Contraction during Budding Yeast Cytokinesis*, *Developmental Cell* **22** (6), 1247 (2012). (S. 8)
- [70] B. A. Danowski, *Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors*, *Journal of Cell Science* **93** (2), 255 (1989). (S. 8)
- [71] A. Rape, W.-h. Guo und Y.-l. Wang, *Microtubule depolymerization induces traction force increase through two distinct pathways*, *Journal of Cell Science* **124** (24), 4233 (2011). (S. 8)
- [72] K. Kruse und F. Jülicher, *Actively Contracting Bundles of Polar Filaments*, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 1778 (Aug 2000). (S. 8)
- [73] F. Ziebert und W. Zimmermann, *Pattern formation driven by nematic ordering of assembling biopolymers*, *Phys. Rev. E* **70**, 022902 (Aug 2004). (S. 8)
- [74] N. Yoshinaga, J.-F. Joanny, J. Prost und P. Marcq, *Polarity Patterns of Stress Fibers*, *Phys. Rev. Lett.* **105**, 238103 (Dec 2010). (S. 8)
- [75] M. R. Stachowiak, P. M. McCall, T. Thoresen, H. E. Balcioglu, L. Kasiewicz, M. L. Gardel und B. O'Shaughnessy, *Self-Organization of Myosin II in Reconstituted Actomyosin Bundles*, *Biophysical Journal* **103** (6), 1265 (2012). (S. 8)

- [76] D. Mitrossilis, J. Fouchard, A. Guirouy, N. Desprat, N. Rodriguez, B. Fabry und A. Asnacios, *Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior*, Proceedings of the National Academy of Sciences **106** (43), 18243 (2009). (S. 8)
- [77] A. Besser und U. S. Schwarz, *Hysteresis in the Cell Response to Time-Dependent Substrate Stiffness*, Biophysical Journal **99** (1), L10 (2010). (S. 8)
- [78] P. Marcq, N. Yoshinaga und J. Prost, *Rigidity Sensing Explained by Active Matter Theory*, Biophysical Journal **101** (6), L33 (2011). (S. 8)
- [79] F. Jülicher und J. Prost, *Cooperative Molecular Motors*, Phys. Rev. Lett. **75**, 2618 (Sep 1995). (S. 8)
- [80] B. M. Gumbiner, *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*, Nature Reviews Molecular Cell Biology **6** (8), 622 (2005). (S. 8, 9, 10)
- [81] L. D. M. Derycke und M. E. Bracke, *N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling*, International Journal of Developmental Biology **48**, 463 (2004). (S. 9)
- [82] K. Takahashi, H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi und Y. Takai, *Nectin/PRR: An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein*, The Journal of Cell Biology **145** (3), 539 (1999). (S. 9)
- [83] W. Ikeda, H. Nakanishi, J. Miyoshi, K. Mandai, H. Ishizaki, M. Tanaka, A. Togawa, K. Takahashi, H. Nishioka, H. Yoshida, A. Mizoguchi, S.-i. Nishikawa und Y. Takai, *Afadin: A Key Molecule Essential for Structural Organization of Cell-Cell Junctions of Polarized Epithelia during Embryogenesis*, The Journal of Cell Biology **146** (5), 1117 (1999). (S. 9)
- [84] B. Baum und M. Georgiou, *Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling*, The Journal of Cell Biology **192** (6), 907 (2011). (S. 9)
- [85] M. G. Farquhar und G. E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*, The Journal of Cell Biology **17** (2), 375 (1963). (S. 9)
- [86] T. J. Boggon, J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner und L. Shapiro, *C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms*, Science **296** (5571), 1308 (2002). (S. 9, 10)
- [87] J. Klingelhöfer, O. Y. Laur, R. B. Troyanovsky und S. M. Troyanovsky, *Dynamic Interplay between Adhesive and Lateral E-Cadherin Dimers*, Molecular and Cellular Biology **22** (21), 7449 (2002). (S. 9)
- [88] O. Pertz, D. Bozic, A. W. Koch, C. Fauser, A. Brancaccio und J. Engel, *A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation*, The EMBO Journal **18** (7), 1738 (1999). (S. 9)

- [89] O. J. Harrison, X. Jin, S. Hong, F. Bahna, G. Ahlsen, J. Brasch, Y. Wu, J. Vendome, K. Felsovalyi, C. M. Hampton, R. B. Troyanovsky, A. Ben-Shaul, J. Frank, S. M. Troyanovsky, L. Shapiro und B. Honig, *The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins*, *Structure* **19** (2), 244 (2011). (S. 10)
- [90] J. Klingelhöfer, R. B. Troyanovsky, O. Y. Laur und S. Troyanovsky, *Exchange of catenins in cadherin–catenin complex*, *Oncogene* **22** (8), 1181 (2003). (S. 10)
- [91] R. C. Ireton, M. A. Davis, J. van Hengel, D. J. Mariner, K. Barnes, M. A. Thoreson, P. Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L. M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy und A. B. Reynolds, *A novel role for p120 catenin in E-cadherin function*, *The Journal of Cell Biology* **159** (3), 465 (2002). (S. 10)
- [92] M. A. Davis, R. C. Ireton und A. B. Reynolds, *A core function for p120-catenin in cadherin turnover*, *The Journal of Cell Biology* **163** (3), 525 (2003). (S. 10)
- [93] L. Hinck, I. S. Näthke, J. Papkoff und W. J. Nelson, *Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly*, *The Journal of Cell Biology* **125** (6), 1327 (1994). (S. 10)
- [94] S. Yamada, S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis und W. J. Nelson, *Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex*, *Cell* **123** (5), 889 (2005). (S. 10)
- [95] S. Engin, V. Trouillet, C. M. Franz, A. Welle, M. Bruns und D. Wedlich, *Benzylguanine Thiol Self-Assembled Monolayers for the Immobilization of SNAP-tag Proteins on Microcontact-Printed Surface Structures*, *Langmuir* **26** (9), 6097, PMID: 20369837 (2010). (S. 10, 51)
- [96] D. Fichtner, B. Lorenz, S. Engin, C. Deichmann, M. Oelkers, A. Janshoff, A. Menke, D. Wedlich und C. M. Franz, *Covalent and Density-Controlled Surface Immobilization of E-Cadherin for Adhesion Force Spectroscopy*, *PLoS ONE* **9** (3), e93123 (03 2014). (S. 10, 19, 51)
- [97] C. Frantz, K. M. Stewart und V. M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*, *Journal of Cell Science* **123** (24), 4195 (2010). (S. 11, 19)
- [98] C. C. DuFort, M. J. Paszek und V. M. Weaver, *Balancing forces: architectural control of mechanotransduction*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12** (5), 308 (2011). (S. 11)
- [99] A. M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer und J. Lahann, *Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity*, *Small* **8** (3), 336 (2012). (S. 11)
- [100] C. J. Bettinger, R. Langer und J. T. Borenstein, *Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function*, *Angewandte Chemie International Edition* **48** (30), 5406 (2009). (S. 11, 15, 18)

- [101] D. Falconnet, G. Csucs, H. M. Grandin und M. Textor, *Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays*, *Biomaterials* **27** (16), 3044 (2006). (S. 11, 19)
- [102] S. Nemir und J. West, *Synthetic Materials in the Study of Cell Response to Substrate Rigidity*, *Annals of Biomedical Engineering* **38** (1), 2 (2010). (S. 11, 18)
- [103] K. Seunarine, D. Meredith, M. Riehle, C. Wilkinson und N. Gadegaard, *Biodegradable polymer tubes with lithographically controlled 3D micro- and nanotopography*, *Microelectronic Engineering* **85** (5-6), 1350, proceedings of the Micro- and Nano-Engineering 2007 Conference (MNE) 2007 (2008). (S. 11, 19)
- [104] 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** (27), 4610 (2009). (S. 11, 18, 19)
- [105] J. Digabel, M. Ghibaudo, L. Trichet, A. Richert und B. Ladoux, *Microfabricated substrates as a tool to study cell mechanotransduction*, *Medical & Biological Engineering & Computing* **48** (10), 965 (2010). (S. 11)
- [106] A. Shekaran und A. J. Garcia, *Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1810** (3), 350, nanotechnologies - Emerging Applications in Biomedicine (2011). (S. 11)
- [107] I. Wheeldon, A. Farhadi, A. G. Bick, E. Jabbari und A. Khademhosseini, *Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions*, *Nanotechnology* **22** (21), 212001 (2011). (S. 11)
- [108] K. L. Christman, V. D. Enriquez-Rios und H. D. Maynard, *Nanopatterning proteins and peptides*, *Soft Matter* **2**, 928 (2006). (S. 11)
- [109] O. Guillame-Gentil, O. Semenov, A. S. Roca, T. Groth, R. Zahn, J. Vörös und M. Zenobi-Wong, *Engineering the Extracellular Environment: Strategies for Building 2D and 3D Cellular Structures*, *Advanced Materials* **22** (48), 5443 (2010). (S. 11)
- [110] R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber und G. M. Whitesides, *Patterning proteins and cells using soft lithography*, *Biomaterials* **20** (23-24), 2363 (1999). (S. 11)
- [111] X. Zhou, F. Boey, F. Huo, L. Huang und H. Zhang, *Chemically Functionalized Surface Patterning*, *Small* **7** (16), 2273 (2011). (S. 11, 17, 18)
- [112] 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** (1), 357 (2009). (S. 11)
- [113] 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** (35), 9188 (2011). (S. 11, 18, 19, 20)

- [114] S. Kumar und V. Weaver, *Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell*, *Cancer and Metastasis Reviews* **28** (1-2), 113 (2009). (S. 11)
- [115] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens und K. M. Yamada, *Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension*, *Science* **294** (5547), 1708 (2001). (S. 11, 20)
- [116] S. I. Fraley, Y. Feng, R. Krishnamurthy, D.-H. Kim, A. Celedon, G. D. Longmore und D. Wirtz, *A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility*, *Nature Cell Biology* **12** (6), 598 (2010). (S. 11)
- [117] K. E. Kubow und A. R. Horwitz, *Reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices*, *Nature Cell Biology* **13** (1), 3 (2011). (S. 11)
- [118] C. J. Bettinger, *Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering and Cell-Biomaterial Interactions*, *Macromolecular Bioscience* **11** (4), 467 (2011). (S. 11, 18)
- [119] C. K. Choi, M. T. Breckenridge und C. S. Chen, *Engineered materials and the cellular microenvironment: a strengthening interface between cell biology and bioengineering*, *Trends in Cell Biology* **20** (12), 705 , special issue - CellBio-X (2010). (S. 11, 18)
- [120] 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** (3), 537 (2009). (S. 11, 17, 18, 19)
- [121] S. C. Owen und M. S. Shoichet, *Design of three-dimensional biomimetic scaffolds*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **94A** (4), 1321 (2010). (S. 11, 18)
- [122] J. A. Pedersen und M. A. Swartz, *Mechanobiology in the Third Dimension*, *Annals of Biomedical Engineering* **33** (11), 1469 (2005). (S. 11)
- [123] E. Carletti, A. Motta und C. Migliaresi, *Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture*, in *3D Cell Culture*, edited by John W. Haycock, volume 695 of *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, 2011), 17–39. (S. 11)
- [124] E. Ruoslahti, *Integrins.*, *The Journal of Clinical Investigation* **87** (1), 1 (1 1991). (S. 12)
- [125] M. Théry, *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*, *Journal of Cell Science* **123** (24), 4201 (2010). (S. 12)
- [126] S. M. Schoenwaelder und K. Burridge, *Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins*, *Current Opinion in Cell Biology* **11** (2), 274 (1999). (S. 12)
- [127] J. Small, T. Stradal, E. Vignat und K. Rottner, *The lamellipodium: where motility begins*, *Trends in Cell Biology* **12** (3), 112 (2002). (S. 12)
- [128] E. Ruoslahti und M. Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*, *Science* **238** (4826), 491 (1987). (S. 12)
- [129] C. A. Buck und A. F. Horwitz, *Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Molecules*, *Annual Review of Cell Biology* **3** (1), 179, pMID: 2825736 (1987). (S. 12)

- [130] M. Humphries, *The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions*, Journal of Cell Science **97** (4), 585 (1990). (S. 12)
- [131] U. Hersel, C. Dahmen und H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*, Biomaterials **24** (24), 4385, synthesis of Biomimetic Polymers (2003). (S. 12, 19)
- [132] C. A. Reinhart-King, M. Dembo und D. A. Hammer, *The Dynamics and Mechanics of Endothelial Cell Spreading*, Biophysical Journal **89** (1), 676 (2005). (S. 12)
- [133] P. A. DiMilla, J. A. Stone, J. A. Quinn, S. M. Albelda und D. A. 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** (3), 729 (1993). (S. 13)
- [134] 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** (6616), 537 (1997). (S. 13)
- [135] 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** (10), 1677 (2000). (S. 13)
- [136] 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** (7), 1423 (2002). (S. 13)
- [137] E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger und J. P. Spatz, *Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands*, Biophysical Journal **92** (8), 2964 (2007). (S. 13)
- [138] J. Huang, S. V. Gräter, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. Ding und J. P. Spatz, *Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion*, Nano Letters **9** (3), 1111 (2009). (S. 13)
- [139] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kanteleiner, H. Kessler und J. P. Spatz, *Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces*, ChemPhysChem **5** (3), 383 (2004). (S. 13)
- [140] K. Y. Lee, E. Alsberg, S. Hsiong, W. Comisar, J. Linderman, R. Ziff und D. Mooney, *Nanoscale Adhesion Ligand Organization Regulates Osteoblast Proliferation and Differentiation*, Nano Letters **4** (8), 1501 (2004). (S. 14)
- [141] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides und D. E. Ingber, *Geometric Control of Cell Life and Death*, Science **276** (5317), 1425 (1997). (S. 14, 95)
- [142] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides und D. E. Ingber, *Micropatterned Surfaces for Control of Cell Shape, Position, and Function*, Biotechnology Progress **14** (3), 356 (1998). (S. 14)

- [143] C. S. Chen, *Mechanotransduction – a field pulling together?*, *Journal of Cell Science* **121** (20), 3285 (2008). (S. 14)
- [144] D. E. Discher, P. Janmey und Y.-l. Wang, *Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate*, *Science* **310** (5751), 1139 (2005). (S. 14)
- [145] D. E. Discher, D. J. Mooney und P. W. Zandstra, *Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells*, *Science* **324** (5935), 1673 (2009). (S. 14)
- [146] 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** (10), 4167 (2009). (S. 14)
- [147] 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** (1), 82 (2010). (S. 14)
- [148] 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** (1), 144 (2000). (S. 14)
- [149] A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bönnemann, H. L. Sweeney und D. E. Discher, *Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments*, *The Journal of Cell Biology* **166** (6), 877 (2004). (S. 14)
- [150] K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V. Schaffer und K. E. Healy, *Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior*, *Biophysical Journal* **95** (9), 4426 (2008). (S. 14)
- [151] N. D. Leipzig und M. S. Shoichet, *The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior*, *Biomaterials* **30** (36), 6867 (2009). (S. 14)
- [152] R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides und D. E. Ingber, *Engineering cell shape and function*, *Science* **264** (5159), 696 (1994). (S. 14)
- [153] N. Wang und D. Ingber, *Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension*, *Biophysical Journal* **66** (6), 2181 (1994). (S. 14)
- [154] D. E. Ingber, D. Prusty, Z. Sun, H. Betensky und N. Wang, *Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis*, *Journal of Biomechanics* **28** (12), 1471 (1995). (S. 14)
- [155] 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** (6), 341 (2006). (S. 15)
- [156] 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** (10), 947 (2005). (S. 15)

- [157] 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). (S. 15)
- [158] M. Théry, A. Jiménez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens und F. Jülicher, *Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation*, Nature **447** (7143), 493 (2007). (S. 15)
- [159] D. E. Ingber, *Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction*, Annual Review of Physiology **59** (1), 575, PMID: 9074778 (1997). (S. 15)
- [160] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju und C. S. Chen, *Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment*, Developmental Cell **6** (4), 483 (2004). (S. 15)
- [161] K. Bhadriraju, M. Yang, S. A. Ruiz, D. Pirone, J. Tan und C. S. Chen, *Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension*, Experimental Cell Research **313** (16), 3616 (2007). (S. 15)
- [162] K. A. Kilian, B. Bugarija, B. T. Lahn und M. Mrksich, *Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences **107** (11), 4872 (2010). (S. 15)
- [163] L. Gao, R. McBeath und C. S. Chen, *Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin*, STEM CELLS **28** (3), 564 (2010). (S. 15)
- [164] A. Curtis und C. Wilkinson, *Topographical control of cells*, Biomaterials **18** (24), 1573 (1997). (S. 15)
- [165] R. O. Hynes, *The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils*, Science **326** (5957), 1216 (2009). (S. 15)
- [166] K. Anselme und M. Biggerelle, *Role of materials surface topography on mammalian cell response*, International Materials Reviews **56** (4), 243 (2011). (S. 15)
- [167] H. V. Unadkat, M. Hulsman, K. Cornelissen, B. J. Papenburg, R. K. Truckenmüller, A. E. Carpenter, M. Wessling, G. F. Post, M. Uetz, M. J. T. Reinders, D. Stamatialis, C. A. van Blitterswijk und J. de Boer, *An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate*, Proceedings of the National Academy of Sciences **108** (40), 16565 (2011). (S. 15)
- [168] 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** (9), 1672 (2007). (S. 15, 16)
- [169] 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** (2), 195 (2001). (S. 15)

- [170] J. D. Foley, E. W. Grunwald, P. F. Nealey und C. J. Murphy, *Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor*, *Biomaterials* **26** (17), 3639 (2005). (S. 15)
- [171] L. Chou, J. Firth, V. Uitto und D. Brunette, *Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts*, *Journal of Cell Science* **108** (4), 1563 (1995). (S. 15)
- [172] 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** (10), 2005 (2004). (S. 15)
- [173] 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** (4), 973 (2008). (S. 15)
- [174] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. Wilkinson und R. O. Oreffo, *The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder*, *Nature Materials* **6** (12), 997 (2007). (S. 16)
- [175] R. J. McMurray, N. Gadegaard, P. M. Tsimbouri, K. V. Burgess, L. E. McNamara, R. Tare, K. Murawski, E. Kingham, R. O. Oreffo und M. J. Dalby, *Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency*, *Nature Materials* **10** (8), 637 (2011). (S. 16)
- [176] M. T. Yang, N. J. Sniadecki und C. S. Chen, *Geometric Considerations of Micro- to Nanoscale Elastomeric Post Arrays to Study Cellular Traction Forces*, *Advanced Materials* **19** (20), 3119 (2007). (S. 16)
- [177] M. T. Yang, J. Fu, Y.-K. Wang, R. A. Desai und C. S. Chen, *Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity*, *Nature Protocols* **6** (2), 187 (2011). (S. 16)
- [178] 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** (37), 14553 (2007). (S. 16)
- [179] W. P. Daley, S. B. Peters und M. Larsen, *Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine*, *Journal of Cell Science* **121** (3), 255 (2008). (S. 16)
- [180] 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). (S. 17, 18, 19)
- [181] S. J. Hollister, *Porous scaffold design for tissue engineering*, *Nature Materials* **4** (7), 518 (2005). (S. 17, 18)

- [182] 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** (1), 160 (2011). (S. 17, 18)
- [183] 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** (12), 4495 (2010). (S. 17)
- [184] 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** (2), 530 (2011). (S. 17)
- [185] 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** (6), 443 (2007). (S. 17, 18, 19, 62)
- [186] 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** (1), 29 (Jan-Mar 2011). (S. 17, 18, 20, 32)
- [187] 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** (5), 384 (2009). (S. 17, 18)
- [188] R. Schade, T. Weiss, A. Berg, M. Schnabelrauch und K. Liefeth, *Two-photon techniques in tissue engineering*, International Journal of Artificial Organs **33** (4), 219 (APR 2010). (S. 17, 18)
- [189] 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** (4), 851 (2011). (S. 17, 18)
- [190] A. Pfister, R. Landers, A. Laib, U. Hübner, R. Schmelzeisen und R. Mülhaupt, *Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D biplotting versus 3D printing*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **42** (3), 624 (2004). (S. 17, 18, 19)
- [191] 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** (28), 3799 (2008). (S. 17, 18, 19, 20)
- [192] 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** (11), 2947 (2010). (S. 17, 18, 19)

- [193] J. A. Lewis, *Direct Ink Writing of 3D Functional Materials*, *Advanced Functional Materials* **16** (17), 2193 (2006). (S. 17, 18)
- [194] 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** (1), 47 (2011). (S. 18, 19)
- [195] G. Vozzi, A. Rechichi, F. Dini, C. Salvadori, F. Vozzi, S. Burchielli, F. Carlucci, M. Arispici, G. Ciardelli, P. Giusti und A. Ahluwalia, *PAM-Microfabricated Polyurethane Scaffolds: in vivo and in vitro Preliminary Studies*, *Macromolecular Bioscience* **8** (1), 60 (2008). (S. 18)
- [196] P. Tayalia, E. Mazur und D. J. Mooney, *Controlled architectural and chemotactic studies of 3D cell migration*, *Biomaterials* **32** (10), 2634 (2011). (S. 18, 20)
- [197] 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** (9), 718 (2007). (S. 18)
- [198] 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** (1), e8726 (01 2010). (S. 18, 20)
- [199] 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** (3), e9445 (03 2010). (S. 18, 19, 20)
- [200] 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). (S. 18, 19, 20)
- [201] M. R. Dusseiller, M. L. Smith, V. Vogel und M. Textor, *Microfabricated three-dimensional environments for single cell studies*, *Biointerphases* **1** (1), P1 (2006). (S. 18, 19)
- [202] R. Langer und D. A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*, *Nature* **428** (6982), 487 (2004). (S. 18)
- [203] F. P. W. Melchels, J. Feijen und D. W. Grijpma, *A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering*, *Biomaterials* **31** (24), 6121 (2010). (S. 18)
- [204] M. M. Stevens und J. H. George, *Exploring and Engineering the Cell Surface Interface*, *Science* **310** (5751), 1135 (2005). (S. 18)
- [205] 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** (4-6), 1451 (2009). (S. 18, 19)

- [206] M. Nikkhah, J. S. Strobl, R. D. Vita und M. Agah, *The cytoskeletal organization of breast carcinoma and fibroblast cells inside three dimensional (3-D) isotropic silicon microstructures*, *Biomaterials* **31** (16), 4552 (2010). (S. 18, 19, 20)
- [207] S.-H. Lee, J. J. Moon und J. L. West, *Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration*, *Biomaterials* **29** (20), 2962 (2008). (S. 18, 19)
- [208] S. A. Lee, S. E. Chung, W. Park, S. H. Lee und S. Kwon, *Three-dimensional fabrication of heterogeneous microstructures using soft membrane deformation and optofluidic maskless lithography*, *Lab Chip* **9**, 1670 (2009). (S. 18)
- [209] A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbler, K. Sternberg, K.-P. Schmitz und A. Haverich, *Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications*, *Acta Biomaterialia* **7** (3), 967 (2011). (S. 18, 19)
- [210] A. del Campo und C. Greiner, *SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography*, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **17** (6), R81 (2007). (S. 18)
- [211] A. Ovsianikov, B. Chichkov, P. Mente, N. A. Monteiro-Riviere, A. Doraiswamy und R. J. Narayan, *Two Photon Polymerization of Polymer-Ceramic Hybrid Materials for Transdermal Drug Delivery*, *International Journal of Applied Ceramic Technology* **4** (1), 22 (2007). (S. 18)
- [212] J. Fischer, G. von Freymann und M. Wegener, *The Materials Challenge in Diffraction-Unlimited Direct-Laser-Writing Optical Lithography*, *Advanced Materials* **22** (32), 3578 (2010). (S. 19, 33, 83)
- [213] M. D. Mager, V. LaPointe und M. M. Stevens, *Exploring and exploiting chemistry at the cell surface*, *Nature Chemistry* **3** (8), 582 (2011). (S. 19)
- [214] K. G. Sreejalekshmi und P. D. Nair, *Biomimeticity in tissue engineering scaffolds through synthetic peptide modifications – Altering chemistry for enhanced biological response*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **96A** (2), 477 (2011). (S. 19)
- [215] M. P. Lutolf und J. A. Hubbell, *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*, *Nature Biotechnology* **23** (1), 47 (2005). (S. 19)
- [216] D. N. Woolfson und Z. N. Mahmoud, *More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials*, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3464 (2010). (S. 19)
- [217] G. U. Lee, D. A. Kidwell und R. J. Colton, *Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy*, *Langmuir* **10** (2), 354 (1994). (S. 19)

- [218] Z. Liu, J. L. Tan, D. M. Cohen, M. T. Yang, N. J. Sniadecki, S. A. Ruiz, C. M. Nelson und C. S. Chen, *Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions*, Proceedings of the National Academy of Sciences **107** (22), 9944 (2010). (S. 19, 20)
- [219] S. Weng und J. Fu, *Synergistic regulation of cell function by matrix rigidity and adhesive pattern*, Biomaterials **32** (36), 9584 (2011). (S. 19)
- [220] 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** (15), 3824 (2012). (S. 19)
- [221] A. Kajzar, C. M. 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** (5), 1854 (2008). (S. 19, 102)
- [222] T. Weiss, R. Schade, T. Laube, A. Berg, G. Hildebrand, R. Wyrwa, M. Schnabelrauch und K. Liefeth, *Two-Photon Polymerization of Biocompatible Photopolymers for Microstructured 3D Biointerfaces*, Advanced Engineering Materials **13** (9), B264 (2011). (S. 19)
- [223] A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, M. Pflaum, M. Wilhelmi, P. Dubruel und B. Chichkov, *Laser Fabrication of 3D Gelatin Scaffolds for the Generation of Bioartificial Tissues*, Materials **4** (1), 288 (2011). (S. 19, 20)
- [224] H. Seyednejad, D. Gawlitta, W. J. Dhert, C. F. van Nostrum, T. Vermonden und W. E. Hennink, *Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications*, Acta Biomaterialia **7** (5), 1999 (2011). (S. 20)
- [225] K. M. Yamada und E. Cukierman, *Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D*, Cell **130** (4), 601 (2007). (S. 20)
- [226] M. Deubel, G. von Freymann, M. Wegener, S. Pereira, K. Busch und C. M. Soukoulis, *Direct laser writing of three-dimensional photonic-crystal templates for telecommunications*, Nature Materials **3** (7), 444 (July 2004). (S. 21)
- [227] A. Ledermann, L. Cademartiri, M. Hermatschweiler, C. Toninelli, G. A. Ozin, D. S. Wiersma, M. Wegener und G. von Freymann, *Three-dimensional silicon inverse photonic quasicrystals for infrared wavelengths*, Nature Materials **5** (12), 942 (December 2006). (S. 21)
- [228] M. Thiel, M. S. Rill, G. von Freymann und M. Wegener, *Three-Dimensional Bi-Chiral Photonic Crystals*, Advanced Materials **21** (46), 4680 (2009). (S. 21)
- [229] J. K. Gansel, M. Thiel, M. S. Rill, M. Decker, K. Bade, V. Saile, G. von Freymann, S. Linden und M. Wegener, *Gold Helix Photonic Metamaterial as Broadband Circular Polarizer*, Science **325** (5947), 1513 (2009). (S. 21)

- [230] 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** (20), 2710 (2012).
(S. 21, 25, 33)
- [231] M. Röhrig, M. Thiel, M. Worgull und H. Hölscher, *3D Direct Laser Writing of Nano- and Microstructured Hierarchical Gecko-Mimicking Surfaces*, *Small* **8** (19), 3009 (2012).
(S. 21)
- [232] F. Claeysens, E. A. Hasan, A. Gaidukeviciute, D. S. Achilleos, A. Ranella, C. Reinhardt, A. Ovsianikov, X. Shizhou, C. Fotakis, M. Vamvakaki, B. N. Chichkov und M. Farsari, *Three-Dimensional Biodegradable Structures Fabricated by Two-Photon Polymerization*, *Langmuir* **25** (5), 3219 (2009).
(S. 21)
- [233] E. Abbe, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, *Archiv für mikroskopische Anatomie* **9** (1), 413 (1873).
(S. 22)
- [234] W. Bogaerts, V. Wiaux, D. Taillaert, S. Beckx, B. Luyssaert, P. Bienstman und R. Baets, *Fabrication of photonic crystals in silicon-on-insulator using 248-nm deep UV lithography*, *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of* **8** (4), 928 (Jul 2002).
(S. 22)
- [235] X. Zhang, X. Jiang und C. Sun, *Micro-stereolithography of polymeric and ceramic microstructures*, *Sensors and Actuators A: Physical* **77** (2), 149 (1999).
(S. 22)
- [236] J. Fischer und M. Wegener, *Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit*, *Laser & Photonics Reviews* **7** (1), 22 (2013).
(S. 22, 24, 33, 79)
- [237] 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** (22), (2010).
(S. 22)
- [238] M. Göppert-Mayer, *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, *Annalen der Physik* **401** (3), 273 (1931).
(S. 23)
- [239] <http://www.nanoscribe.de>, Nanoscribe GmbH.
(S. 25)
- [240] J. Fischer und M. Wegener, *Ultrafast Polymerization Inhibition by Stimulated Emission Depletion for Three-dimensional Nanolithography*, *Advanced Materials* **24** (10), OP65 (2012).
(S. 27)
- [241] J. Fischer, *Three-dimensional optical lithography beyond the diffraction limit*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (2012).
(S. 28)
- [242] *Photoinitiators for Printing Applications*, Ciba Chemicals: Produktbroschüre (2005).
(S. 29)
- [243] M. Brahm, *Polymerchemie kompakt* (S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2009).
(S. 30)

- [244] J. B. Mueller, J. Fischer und M. Wegener, *In-Situ Measurement of the Intrinsic Polymerization Time During Three-Dimensional Direct Laser Writing*, in *CLEO: 2014* (Optical Society of America, 2014). (S. 31)
- [245] U. Streppel, *Selbstorganisierte Strukturbildung in UV sensitiven optischen Polymeren*, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2005). (S. 31)
- [246] <http://www.ormocer.de>, Fraunhofer Institut für Silikatforschung. (S. 32)
- [247] J. Fischer, *Herstellung und Charakterisierung von elastischen dreidimensionalen Mikrostrukturen für biologische Zellexperimente*, Diplomarbeit (2008). (S. 32, 52, 53)
- [248] J. Serbin, A. Egbert, A. Ostendorf, B. N. Chichkov, R. Houbertz, G. Domann, J. Schulz, C. Cronauer, L. Fröhlich und M. Popall, *Femtosecond laser-induced two-photon polymerization of inorganic organic hybrid materials for applications in photonics*, *Opt. Lett.* **28** (5), 301 (Mar 2003). (S. 32)
- [249] S. W. Hell und J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, *Opt. Lett.* **19** (11), 780 (Jun 1994). (S. 33)
- [250] T. A. Klar und S. W. Hell, *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*, *Opt. Lett.* **24** (14), 954 (Jul 1999). (S. 33)
- [251] M. Hopcroft, T. Kramer, G. Kim, K. Takashima, Y. Higo, D. Moore und J. Brugger, *Micromechanical testing of SU-8 cantilevers*, *Fatigue & Fracture of Engineering Materials & Structures* **28** (8), 735 (2005). (S. 34)
- [252] H. Yu, O. Balogun, B. Li, T. W. Murray und X. Zhang, *Building embedded microchannels using a single layered SU-8, and determining Young's modulus using a laser acoustic technique*, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **14** (11), 1576 (2004). (S. 34)
- [253] M. Schuster, C. Turecek, A. Mateos, J. Stampfl, R. Liska und F. Varga, *Evaluation of Biocompatible Photopolymers II: Further Reactive Diluents*, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **138** (4), 261 (2007). (S. 34, 55, 63)
- [254] K. T. Nguyen und J. L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*, *Biomaterials* **23** (22), 4307, *injectable Polymeric Biomaterials* (2002). (S. 34)
- [255] W. R. Gombotz, W. Guanghai, T. A. Horbett und A. S. Hoffman, *Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces*, *Journal of Biomedical Materials Research* **25** (12), 1547 (1991). (S. 34)
- [256] J. L. Hill-West, S. M. Chowdhury, R. C. Dunn und J. A. Hubbell, *Efficacy of a resorbable hydrogel barrier, oxidized regenerated cellulose, and hyaluronic acid in the prevention of ovarian adhesions in a rabbit model*, *Fertility and sterility* **62** (3), 630 (September 1994). (S. 34)

- [257] M. S. Hahn, J. S. Miller und J. L. West, *Three-Dimensional Biochemical and Biomechanical Patterning of Hydrogels for Guiding Cell Behavior*, *Advanced Materials* **18** (20), 2679 (2006). (S. 34)
- [258] S. Nemir, H. N. Hayenga und J. L. West, *PEGDA hydrogels with patterned elasticity: Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity*, *Biotechnology and Bioengineering* **105** (3), 636 (2010). (S. 34)
- [259] D. M. Brey, J. L. Ifkovits, R. I. Mozia, J. S. Katz und J. A. Burdick, *Controlling poly(β -amino ester) network properties through macromer branching*, *Acta Biomaterialia* **4** (2), 207 (2008). (S. 34, 35, 52, 55)
- [260] W.-G. Koh, A. Revzin, A. Simonian, T. Reeves und M. Pishko, *Control of Mammalian Cell and Bacteria Adhesion on Substrates Micropatterned with Poly(ethylene glycol) Hydrogels*, *Biomedical Microdevices* **5** (1), 11 (2003). (S. 34)
- [261] A. Revzin, R. G. Tompkins und M. Toner, *Surface Engineering with Poly(ethylene glycol) Photolithography to Create High-Density Cell Arrays on Glass*, *Langmuir* **19** (23), 9855 (2003). (S. 34)
- [262] A. Ovsianikov, A. Ostendorf und B. Chichkov, *Three-dimensional photofabrication with femtosecond lasers for applications in photonics and biomedicine*, *Applied Surface Science* **253** (15), 6599, proceedings of the Fifth International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (5-ICPEPA) (2007). (S. 34)
- [263] A. F. Lasagni, D. Yuan, P. Shao und S. Das, *Periodic Micropatterning of Polyethylene Glycol Diacrylate Hydrogel by Laser Interference Lithography Using Nano- and Femtosecond Pulsed Lasers*, *Advanced Engineering Materials* **11** (3), B20 (2009). (S. 35)
- [264] 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** (9), 929 (2001). (S. 35, 52)
- [265] H. Tsutsui, H. Wu und C.-M. Ho, *Stable Poly(Ethylene Glycol) Microwell Arrays for Long-Term Cell Patterning*, *The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2006)* **242** (2006). (S. 35, 43, 52)
- [266] 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** (11), 1341 (2011). (S. 37, 54, 63, 65)
- [267] A. S. Quick, J. Fischer, B. Richter, T. Pauloehrl, V. Trouillet, M. Wegener und C. Barner-Kowollik, *Preparation of Reactive Three-Dimensional Microstructures via Direct Laser Writing and Thiol-ene Chemistry*, *Macromolecular Rapid Communications* **34** (4), 335 (2013). (S. 38, 40, 41)
- [268] C. E. Hoyle und C. N. Bowman, *Thiol-En-Klickchemie*, *Angewandte Chemie* **122** (9), 1584 (2010). (S. 38)

- [269] T. Posner, *Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe*, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **38** (1), 646 (1905). (S. 38)
- [270] C. E. Hoyle, T. Y. Lee und T. Roper, *Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **42** (21), 5301 (2004). (S. 38)
- [271] Z. T. Cygan, J. a. T. Cabral, K. L. Beers und E. J. Amis, *Microfluidic Platform for the Generation of Organic-Phase Microreactors*, Langmuir **21** (8), 3629 (2005). (S. 38)
- [272] M. Natali, S. Begolo, T. Carofiglio und G. Mistura, *Rapid prototyping of multilayer thiolene microfluidic chips by photopolymerization and transfer lamination*, Lab Chip **8**, 492 (2008). (S. 38)
- [273] V. S. Khire, Y. Yi, N. A. Clark und C. N. Bowman, *Formation and Surface Modification of Nanopatterned Thiol-ene Substrates using Step and Flash Imprint Lithography*, Advanced Materials **20** (17), 3308 (2008). (S. 38)
- [274] K. D. Belfield und K. J. Schafer, *Two-Photon Photoinitiated Polymerization*, Kapitel 40 (2003), 464–481. (S. 38)
- [275] B. J. Adzima, C. J. Kloxin, C. A. DeForest, K. S. Anseth und C. N. Bowman, *3D Photofixation Lithography in Diels-Alder Networks*, Macromolecular Rapid Communications **33** (24), 2092 (2012). (S. 39)
- [276] R. Buestrich, F. Kahlenberg, M. Popall, P. Dannberg, R. Müller-Fiedler und O. Rösch, *ORMOCERs for Optical Interconnection Technology*, Journal of Sol-Gel Science and Technology **20** (2), 181 (2001). (S. 42)
- [277] 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** (11), 6072 (2004). (S. 43)
- [278] R. A. Farrer, C. N. LaFratta, L. Li, J. Praino, M. J. Naughton, B. E. A. Saleh, M. C. Teich und J. T. Fourkas, *Selective Functionalization of 3-D Polymer Microstructures*, Journal of the American Chemical Society **128** (6), 1796 (2006). (S. 43)
- [279] H. C. Kolb, M. G. Finn und K. B. Sharpless, *Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen*, Angewandte Chemie **113** (11), 2056 (2001). (S. 44)
- [280] C. Barner-Kowollik, F. E. Du Prez, P. Espeel, C. J. Hawker, T. Junkers, H. Schlaad und W. Van Camp, *Clicking Polymers or Just Efficient Linking: What Is the Difference?*, Angewandte Chemie International Edition **50** (1), 60 (2011). (S. 44)
- [281] M. Conradi und T. Junkers, *Photoinduced Conjugation of Aldehyde Functional Polymers with Olefins via [2 + 2]-Cycloaddition*, Macromolecules **44** (20), 7969 (2011). (S. 44)

- [282] B. J. Adzima, Y. Tao, C. J. Kloxin, C. A. DeForest, K. S. Anseth und C. N. Bowman, *Spatial and temporal control of the alkyne-azide cycloaddition by photoinitiated Cu(II) reduction*, *Nature Chemistry* **3** (3), 256 (March 2011). (S. 44)
- [283] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer und C. Barner-Kowollik, *Adding Spatial Control to Click Chemistry: Phototriggered Diels-Alder Surface (Bio)functionalization at Ambient Temperature*, *Angewandte Chemie International Edition* **51** (4), 1071 (2012). (S. 44, 45, 46, 79)
- [284] T. Gruending, K. K. Oehlenschlaeger, E. Frick, M. Glassner, C. Schmid und C. Barner-Kowollik, *Rapid UV Light-Triggered Macromolecular Click Conjugations via the Use of o-Quinodimethanes*, *Macromolecular Rapid Communications* **32** (11), 807 (2011). (S. 44)
- [285] M. Glassner, K. K. Oehlenschlaeger, T. Gruending und C. Barner-Kowollik, *Ambient Temperature Synthesis of Triblock Copolymers via Orthogonal Photochemically and Thermally Induced Modular Conjugation*, *Macromolecules* **44** (12), 4681 (2011). (S. 44)
- [286] B. Charleux, F. D'Agosto und G. Delaittre, *Preparation of Hybrid Latex Particles and Core-Shell Particles Through the Use of Controlled Radical Polymerization Techniques in Aqueous Media*, in *Hybrid Latex Particles*, edited by Alex M. van Herk und Katharina Landfester, volume 233 of *Advances in Polymer Science* (Springer Berlin Heidelberg, 2010), 125–183. (S. 46)
- [287] Z. Nie und E. Kumacheva, *Patterning surfaces with functional polymers*, *Nature Materials* **7** (4), 277 (April 2008). (S. 46)
- [288] B. Richter, T. Pauloehrl, J. Kaschke, D. Fichtner, J. Fischer, A. M. Greiner, D. Wedlich, M. Wegener, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik und M. Bastmeyer, *Three-Dimensional Microscaffolds Exhibiting Spatially Resolved Surface Chemistry*, *Advanced Materials* **25** (42), 6117 (2013). (S. 47, 79, 81, 82, 84, 86)
- [289] E. P. Diamandis und T. K. Christopoulos, *The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology.*, *Clinical Chemistry* **37** (5), 625 (1991). (S. 47, 48)
- [290] N. M. Green, *Avidin*, volume 29 of *Advances in Protein Chemistry* (Academic Press, 1975), 85 – 133. (S. 47)
- [291] J.-F. Lutz und H. G. Börner, *Modern trends in polymer bioconjugates design*, *Progress in Polymer Science* **33** (1), 1 (2008). (S. 48)
- [292] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung und R. P. Haugland, *Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates*, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **47** (9), 1179 (1999). (S. 48)
- [293] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis und A. S. Waggoner, *Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters*, *Bioconjugate Chemistry* **4** (2), 105 (1993). (S. 48)

- [294] G. Elia, *Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins*, *PROTEOMICS* **8** (19), 4012 (2008). (S. 49)
- [295] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel und K. Johnsson, *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*, *Nature Biotechnology* **21** (1), 86 (January 2003). (S. 50)
- [296] D. Gross, W. Hauger, J. Schröder und W. Wall, *Technische Mechanik 2, Elastostatik* (Springer Verlag, Heidelberg, 2007). (S. 55)
- [297] M. Schuster, C. Turecek, B. Kaiser, J. Stampfl, R. Liska und F. Varga, *Evaluation of Biocompatible Photopolymers I: Photoreactivity and Mechanical Properties of Reactive Diluents*, *Journal of Macromolecular Science, Part A* **44** (5), 547 (2007). (S. 63)
- [298] 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** (7), 3488 (2008). (S. 70, 96)
- [299] H. Ma, J. Hyun, P. Stiller und A. Chilkoti, *“Non-Fouling“ Oligo(ethylene glycol)-Functionalized Polymer Brushes Synthesized by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization*, *Advanced Materials* **16** (4), 338 (2004). (S. 89)
- [300] C. Rodriguez-Emmenegger, C. M. Preuss, B. Yameen, O. Pop-Georgievski, M. Bachmann, J. O. Mueller, M. Bruns, A. S. Goldmann, M. Bastmeyer und C. Barner-Kowollik, *Controlled Cell Adhesion on Poly(dopamine) Interfaces Photopatterned with Non-Fouling Brushes*, *Advanced Materials* **25** (42), 6123 (2013). (S. 89)
- [301] B. Richter, T. Pauloehrl, J. Kaschke, J. Fischer, A. M. Greiner, M. Wegener, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik und M. Bastmeyer, *Three-Dimensional Cell Culture on Microscaffolds with Spatially Resolved Surface Chemistry*, in *CLEO: 2014* (Optical Society of America, 2014). (S. 92, 93)
- [302] R. J. Pelham und Y.-l. Wang, *High Resolution Detection of Mechanical Forces Exerted by Locomoting Fibroblasts on the Substrate*, *Molecular Biology of the Cell* **10** (4), 935 (1999). (S. 95)
- [303] T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver und P. A. Janmey, *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*, *Cell Motility and the Cytoskeleton* **60** (1), 24 (2005). (S. 95)
- [304] O. du Roure, A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Siberzan und B. Ladoux, *Force mapping in epithelial cell migration*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (7), 2390 (2005). (S. 95)
- [305] M. Lomba, L. Oriol, R. Alcalá, C. Sánchez, M. Moros, V. Grazú, J. L. Serrano und J. M. De la Fuente, *In Situ Photopolymerization of Biomaterials by Thiol-yne Click Chemistry*, *Macromolecular Bioscience* **11** (11), 1505 (2011). (S. 98)

- [306] M. Lomba, L. Oriol, C. Sánchez-Somolinos, V. Grazú, M. Moros, J. L. Serrano und J. M. D. la Fuente, *Cell adhesion on surface patterns generated by the photocrosslinking of hyperbranched polyesters with a trisdiazonium salt*, *Reactive and Functional Polymers* **73** (3), 499 (2013). (S. 98)
- [307] W. A. Henderson und E. F. Ullman, *Photochemistry of 2-Benzyl- and 2-Benzhydryl-3-benzoylchromones*, *Journal of the American Chemical Society* **87** (23), 5424 (1965). (S. 98)
- [308] A. C. Pratt, *Diels-Alder trapping of a photochemically generated o-xylene intermediate from 1-phenyl-1-o-tolyethylene*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 183 (1974). (S. 98)
- [309] P. G. Sammes, *Photoenolisation*, *Tetrahedron* **32** (4), 405 (1976). (S. 98)
- [310] M. Winkler, J. O. Mueller, K. K. Oehlenschlaeger, L. Montero de Espinosa, M. A. R. Meier und C. Barner-Kowollik, *Highly Orthogonal Functionalization of ADMET Polymers via Photo-Induced Diels-Alder Reactions*, *Macromolecules* **45** (12), 5012 (2012). (S. 98)
- [311] O. Altintas, J. Willenbacher, K. N. R. Wuest, K. K. Oehlenschlaeger, P. Krolla-Sidenstein, H. Gliemann und C. Barner-Kowollik, *A Mild and Efficient Approach to Functional Single-Chain Polymeric Nanoparticles via Photoinduced Diels-Alder Ligation*, *Macromolecules* **46** (20), 8092 (2013). (S. 98)
- [312] T. Tischer, T. K. Claus, M. Bruns, V. Trouillet, K. Linkert, C. Rodriguez-Emmenegger, A. S. Goldmann, S. Perrier, H. G. Börner und C. Barner-Kowollik, *Spatially Controlled Photochemical Peptide and Polymer Conjugation on Biosurfaces*, *Biomacromolecules* **14** (12), 4340, PMID: 24127628 (2013). (S. 98)
- [313] A. S. Quick, H. Rothfuss, A. Welle, B. Richter, J. Fischer, M. Wegener und C. Barner-Kowollik, *Fabrication and Spatially Resolved Functionalization of 3D Microstructures via Multiphoton-Induced Diels-Alder Chemistry*, *Advanced Functional Materials* **24** (23), 3571 (2014). (S. 99, 103)
- [314] M. Meldal und C. W. Tornøe, *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, *Chemical Reviews* **108** (8), 2952, PMID: 18698735 (2008). (S. 99)
- [315] D.-W. Lee, K. M. Park, M. Banerjee, S. H. Ha, T. Lee, K. Suh, S. Paul, H. Jung, J. Kim, N. Selvapalam, S. H. Ryu und K. Kim, *Supramolecular fishing for plasma membrane proteins using an ultrastable synthetic host-guest binding pair*, *Nature Chemistry* **3** (2), 154 (February 2011). (S. 102)
- [316] J. C. M. Vega L., M. K. Lee, J. H. Jeong, C. E. Smith, K. Y. Lee, H. J. Chung, D. E. Leckband und H. Kong, *Recapitulating Cell-Cell Adhesion Using N-Cadherin Biologically Tethered to Substrates*, *Biomacromolecules* **15** (6), 2172, PMID: 24773064 (2014). (S. 102)

- [317] P. Pinon, J. Pärssinen, P. Vazquez, M. Bachmann, R. Rahikainen, M.-C. Jacquier, L. Azizi, J. A. Määttä, M. Bastmeyer, V. P. Hytönen und B. Wehrle-Haller, *Talin-bound NPLY motif recruits integrin-signaling adapters to regulate cell spreading and mechanosensing*, *The Journal of Cell Biology* **205** (2), 265 (2014). (S. 103)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich noch allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich die letzten Jahre unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Wegener und bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer bedanken, die es mir ermöglichten dieses interessante Thema zu bearbeiten und mir Freiräume für eigene Ideen gaben. Die Betreuung, die ich bei der Bearbeitung dieser interdisziplinären Arbeit genießen konnte, war hervorragend und könnte als Paradebeispiel dienen. Sowohl die sehr guten Laborbedingungen als auch die regelmäßigen und konstruktiven Diskussionen waren extrem förderlich und stets motivierend. Hinzu kommt eine umfangreiche finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglicht hat alle Ideen zu realisieren.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Christopher Barner-Kowollik für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Dr. Guillaume Delaittre, Dr. Thomas Pauloehrl und Tanja Claus danke ich für die Synthese zahlreicher Chemikalien und die erhellenden Diskussionen chemischer Natur. Danke Guillaume für deinen unermüdlichen Einsatz.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Joachim Fischer und Johannes Kaschke, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir die Photoaktivierung in Labor 3 erst ermöglicht haben. Durch ihr Engagement haben sie einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Betreuerin aus der Biologie, Dr. Alexandra Greiner, möchte ich von Herzen danken. Sie hatte immer ein offenes Ohr und gab mir entscheidende Ratschläge.

Meiner Mitstreiterin aus der kleinen Biogruppe, Andrea Scheiwe, möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen im Labor und im Büro bedanken.

Dr. Clemens Franz ist an dieser Stelle auch zu danken. Er hat nicht nur die AFM-Kraftkurven für mich aufgenommen, sondern konnte mich auch für kleine Seitenprojekte begeistern.

Der KSOP möchte ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit als Stipendiat und für die vielen wissenschaftlichen Veranstaltungen danken, die zum Austausch mit anderen jungen Wissenschaftlern beigetragen haben. Danke auch an meinen Mentor Dr. Franco Weth.

Ein herzliches Dankeschön geht natürlich auch an Sarah Baur, Johannes Kaschke und Alexander Quick, die sich vor allem durch die Korrektur meiner Arbeit hervortaten.

Eine solche Arbeit gelingt nur gut, wenn im Hintergrund alles reibungslos abläuft. Deshalb möchte ich mich noch bei den technischen Angestellten des Zoologischen Instituts Tanja Landmann, Rainer Müller, Kerstin Weber und Wolfgang Woditschka bedanken. In der Angewandten Physik möchte ich Johann Westhauser und der gesamten feinmechanischen Werkstatt danken. Darüber hinaus danke ich der Elektronikwerkstatt mit Michael Hippe, Helmuth Lay und Werner Gilde für den reibungsfreien Betrieb der Computer und des Netzwerks. Danke auch an die Sekretariate des Zoologischen Instituts mit Marion Gaß und Manuela Lehmann und der Angewandten Physik mit Claudia Alaya, Monika Brenkmann, Renate Helfen und Ursula Mösle für die Unterstützung in allen administrativen Aufgaben.

Zudem möchte ich auch den restlichen Mitgliedern des Zoologischen Instituts danken, die nicht nur dafür gesorgt haben, dass immer Zellen für meine Experimente zur Verfügung standen sondern auch unentwegt einem Physiker biologische Fragen beantworteten. Die konstruktiven Diskussionen während und nach der Arbeitszeit waren stets hilfreich und erheiternd. Ein spezielles Dankeschön an alle Zellbiologen.

Danke auch an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Angewandten Physik für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Die zahlreichen Denkanstöße, die durch Diskussionen im Computerraum hervorgingen, brachten mich immer voran. Das Arbeitsklima ist unbeschreiblich gut und deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass neben dem produktiven Arbeiten auch zahlreiche Freundschaften entstanden sind.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern für die Unterstützung vor und während meiner Zeit als Doktorand bedanken. Leider haben sie mich in den letzten Wochen viel zu selten zu Gesicht bekommen.