

Entwicklung und Anwendung thermisch schaltbarer Polymere auf Oberflächen zur Beeinflussung der Zelladhäsion

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Oliver Ernst

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl
Berichter: Prof. Dr. R. Lauster
Berichter: PD Dr. C. Duschl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.06.2008

Berlin 2008
D 83



Fraunhofer Institut
Biomedizinische
Technik



Inhaltsverzeichnis

Vorwort	6
Veröffentlichungen	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
Zusammenfassung	12
1. Einführung	13
2. Grundlagen	17
2.1 Thermoresponsive Polymere und ihre Anwendungen	17
2.1.1 Funktionsprinzip von thermoresponsiven Polymeren	17
2.1.2 Oberflächenfunktionalisierungsmöglichkeiten	20
2.2 Funktionalisierung und Charakterisierung von Goldoberflächen .	21
2.2.1 Selbstorganisierende Monolagen (SAM) an Goldoberflächen	21
2.2.2 Kontaktwinkelmessung	25
2.2.3 Röntgenelektronenspektroskopie (XPS)	27
2.3 Zellbiologischer Hintergrund	29
2.3.1 Zelladhäsion auf Substrat	29
2.3.2 Beeinflussung der Zelladhäsion	31
2.3.3 Zellverhalten auf mikrostrukturierten Oberflächen	32
2.4 Mikrofluidische Systeme für zelluläre Anwendungen	33

3. Material und Methoden	37
3.1 Zellkultur	37
3.2 Zellfixierung und Färbung mit Fluoreszenzstoffen	37
3.3 Oberflächenpräparation und Oberflächenanalytik	38
3.3.1 Oberflächenpräparation	38
3.3.1.1 Reinigung von Glas- und PDMS-Oberflächen	38
3.3.1.2 Reinigung von Goldoberflächen	39
3.3.1.3 Mikrostrukturierung von Oberflächen	39
3.3.1.4 Chemisorption von Thiolen auf Goldoberflächen	43
3.3.2 Kontaktwinkelmessung	44
3.4 Mikrofluidik	45
3.4.1 PDMS-Abformung	45
3.4.2 Zusammenbau des mikrofluidischen Systems	45
3.4.3 Zellkultivierung und Zellablösung im mikrofluidischen System	46
3.4.4 Berechnung der Zellumströmungsgeschwindigkeit im rechteckigen mikrofluidischen Kanal	47
3.5 Mikroskopie	48
3.5.1 Durchlichtmikroskopie und Auswertung	48
3.5.2 Konfokale Laserscanning- Mikroskopie (CLSM)	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Funktion und Zellverträglichkeit von P15-Au	50
4.2 Einfluss von P15-Au auf das Einzelzellverhalten von L929	54
4.3 Kontrollierte Einzelzellablösung im mikrofluidischen System	55
4.4 Oberflächenstabilität	58
4.4.1 Haltbarkeit von P15-Au	58
4.4.2 Wiederverwendbarkeit von P15-Au	60
4.5 Anpassung schaltbarer Oberflächen für eine zelltypspezifische Adhäsionskontrolle	61
4.5.1 Charakterisierung von P15-Au und P19-Au	61

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.2	Modifikation von P19-Au für stark adhären	66
4.5.3	Modifikation von P19-Au für schwach adhären	69
4.6	Mikrostrukturierung von Oberflächen	72
4.6.1	Mikrostrukturierte Biotin-Streptavidin Oberflächen	73
4.6.2	Mikrostrukturierte, schaltbare Polymeroberflächen	76
4.6.2.1	Verhalten von 3T3-Zellen auf mikrostrukturierten Polymeroberflächen	76
4.6.2.2	Mikrostrukturierung von P15-Au mit Fibronektin	77
5.	Diskussion	79
5.1	Gold-Thiol-Chemie als Methode zur Herstellung von Polymeroberflächen	79
5.2	Funktion und Zellverträglichkeit von P15-Au	80
5.3	Anpassung schaltbarer Oberflächen für eine zelltypspezifische Adhäsionskontrolle	84
6.	Ausblick	89
	Literaturverzeichnis	91
	Anhang	99
	Lebenslauf	104

Vorwort

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zum erfolgreichen Erreichen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich bei

Prof. Dr. Günther Fuhr, der mir eine interessante und anwendungsbezogene Fragestellung zur Bearbeitung übertragen hat.

Dr. Claus Duschl für seine hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Seine äußerst zugängliche und freundliche Art trugen neben den konstruktiven und offenen Gesprächen wesentlich zu dieser Arbeit bei.

Dr. Andreas Lankenau für seine Unterstützung, wertvollen Diskussionen sowie hilfreichen Anregungen während meiner Promotionszeit.

Prof. Dr. Roland Lauster (Technische Universität Berlin) für die hervorragende, externe Betreuung dieser Arbeit. Die wissenschaftlichen Gespräche mit Ihm erweiterten meinen Blick für neue wissenschaftliche Ansätze.

Dr. Antje Lieske (Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Potsdam (IAP)) für die Synthese und Charakterisierung der Polymere. Durch ihre offene und unkomplizierte Art ermöglichte sie im Rahmen dieser Arbeit wesentliche Optimierungsschritte an den schaltbaren Oberflächen. Die Gespräche mit Ihr bereicherten mein Wissen und Verständnis über die komplexe „Welt der Polymere“.

Dr. Hans Börner (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam) für die Synthese und Charakterisierung des RGD-Peptids sowie für den wissenschaftlichen Austausch während meiner Promotionszeit.

Dr. Magnus Jäger, der mir stets hilfsbereit zur Seite stand und mich mit leckeren „Spezialitäten“ aus Nürnberg versorgte.

Beate Morgenstern, die immer ein offenes Ohr für die „kleinen Probleme“ im Labor hatte und für einen reibungslosen Ablauf in der Zellkultur sorgte.

Ines Westphal, die mir Denkanstöße für neue Ansätze gab und ein angenehmer Gesprächspartner war.

meiner Arbeitsgruppe Armin, Katja, Christine, Björn sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IBMT für eine angenehme und bereichernde Zeit.

Ganz besonderem Dank geht an meine Eltern sowie an Linda für Ihre große Unterstützung, ihr Verständnis und Interesse an meiner Arbeit.

Dieses Projekt wurde finanziert durch das MAVO-Programm der Fraunhofer-Gesellschaft.

Veröffentlichungen

Poster

Renner A, Westphal I, Kirchhof V, Ernst O, Lankenau A, Duschl C.

A lab-on-chip device for the guidance of cell migration and the analysis of cell traces.
Cell Migration Meeting 2006, Heidelberg

Publikation

Joos U, Biskup T, Ernst O, Westphal I, Gherasim C, Schmidt R, Edinger K, Pilarczyk G, Duschl C. Investigation of cell adhesion to structured surfaces using total internal reflection fluorescence and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Cell Biol* 2006 85(3-4):225-8.

Ernst O, Lieske A, Jäger M, Lankenau A, Duschl C. Control of cell detachment in a microfluidic device using a thermoresponsive copolymer on a gold substrate. *Lab Chip*. 2007, 7(10):1322-9.

J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, J.-F. Lutz, H.G. Börner: "Easy Access to Bioactive Peptide-polymer Conjugates via RAFT", *Macromolecules* (2008), 41: 1073.

Ernst O, Lieske A, Holländer A, Lankenau A, Duschl C. Tuning of thermo-responsive self-assembly monolayers on gold for cell type specific control of adhesion. *submitted 02.04.2008, Langmuir*.

Abkürzungsverzeichnis

3T3	Mausfibroblast
Au	Gold
CLSM	confocal laser scanning microscope
ConA	Concanavalin A
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fötales Kälberserum
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
L929	Mausfibroblast
LCST	lower critical solution temperature
MG63	humanes Osteosarkom
P15	PNIPAAm-PEG(15%)-SH
P19	PNIPAAm-PEG(19%)-SH
PBS	phosphate buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDEAAm	Poly(N-diethylacrylamid)
PEGMA	Polyethylenglykolmethacrylat
PEG	Polyethylenglykol
PG	PEG
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamid)
PTFE	Polytetrafluorethylen
RGD	CGGRGDS-Peptid
RT	Raumtemperatur
SAM	self-assembling monolayer

Die Abkürzungen für die Aminosäuren entsprechen dem internationalen Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur des thermoresponsiven Copolymers PNIPAAm-PEG	18
2.2	Strukturverhalten von PNIPAAm-PEG in Lösung sowie immobilisiert an Oberflächen mit Zellverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen	19
2.3	Aufbau und Organisation von SAM auf Goldoberflächen	23
2.4	Kontaktwinkelbildung auf einer Festkörperoberfläche nach YOUNG	25
2.5	Messprinzip der dynamischen Wasserkontaktwinkelmessung an Festkörpern	26
2.6	Energieschema eines XPS-Prozesses	28
2.7	MicCell™-System (Gesim GmbH, Deutschland) als mikrofluidisches System	36
3.1	Prinzip der Mikrostrukturierung von Oberflächen mittels Stempelvorrichtung	41
3.2	Aufbau und Funktionsprinzip des mikrofluidischen Systems MicCell™	46
3.3	Flussprofil in einem mikrofluidischen Kanal im Bezug auf unterschiedliche Zellmorphologien	47
4.1	Ermittlung der charakteristischen LCST (lower critical solution temperature) des PNIPAAm-PEG15%-COOH Copolymers	51
4.2	Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P15-Au und gereinigtem Gold als Funktion der Temperatur	52
4.3	Zellverträglichkeit und Schaltbarkeit von P15-Au. L929-Zellablösung auf P15-Au ausgelöst durch Temperaturänderung von 37°C auf 25°C zu unterschiedlichen Zeitpunkten	53
4.4	L929-Einzelzellabrundung auf P15-Au ausgelöst durch Temperaturänderung von 37°C auf 25°C nach unterschiedlichen Zeiten	54
4.5	Auswirkung von laminarer Strömung auf L929 Fibroblasten auf P15-Au in einem mikrofluidischen PDMS-Kanal	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.6	Oberflächenstabilität von P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und- bedingungen	59
4.7	Wiederverwendbarkeit von P15-Au Oberflächen bei unterschiedlichen Lagerungszeiten für den Gebrauch als Zellkultursubstrat	61
4.8	Vergleich der charakteristischen LCST (lower critical solution temperature) der PNIPAAm-PEG Copolymere mit unterschiedlichem PEG-Gehalt	62
4.9	Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P15-Au, P19-Au und gereinigtem Gold als Funktion der Temperatur	63
4.10	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) von P19-Au	64
4.11	Zellabrundung auf P15-Au und P19-Au über die Zeit	66
4.12	Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P19-Au, P19/PG(1:6)-Au, PG-Au und gereinigtem Gold als Funktion der Temperatur	67
4.13	Adhäsionsverhalten von MG63 auf P19/PG-Au mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen	69
4.14	Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P19-Au, P19/RGD(1:8)-Au, RGD-Au und gereinigtem Gold als Funktion der Temperatur	70
4.15	Adhäsionsverhalten von L929 auf P19/RGD-Au mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen	72
4.16	PDMS-16Pin-Stempel für die Mikrostrukturierung von Oberflächen ...	74
4.17	Mikrostrukturierung von BSA-Biotin-Oberflächen mit Streptavidin488 mit Hilfe eines PDMS-16Pin-Stempel bei unterschiedlichem Anpressdruck	75
4.18	Mikrostrukturierung von BSA-Biotin-Oberflächen über Streptavidin488 mit Hilfe eines PDMS-16Pin-Stempel bei 43,1 kPa ...	75
4.19	Verhalten von 3T3-Zellen auf mikrostrukturiertem P15-Au bei Temperaturänderung	77
4.20	Verhalten von L929-Zellen auf mikrostrukturiertem Fibronectin-P15-Au Substrat	78

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Zelllinien mit deren charakteristischen Trypsinierungsbedingungen	37
3.2	Verwendete Substanzen für die Strukturierung von Glasoberflächen ...	41
3.3	Verwendete Thiole und deren optimierte Arbeitskonzentration für die Funktionalisierung von Goldoberflächen	43
A1	Kontaktwinkeldaten funktionalisierter / unfunktionalisierter Goldoberflächen im Temperaturbereich von 20 – 45 °C	100
A2	Zellablösungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au in einem mikrofluidischen Kanal bei unterschiedlichen Flussraten	101
A3	Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au und P19-Au nach Temperaturänderung (37 °C- 25 °C) über die Zeit	102
A4	Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und mehreren Schaltzyklen	102
A5	Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und- bedingungen	102
A6	Zellabrundungsanteil von MG63 Osteoblasten auf P19/PG(1:6)-Au	102
A7	Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P19/RGD-Au mit unterschiedlichen molaren Mischungsverhältnissen	103
A8	Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P19/RGD(1:8)-Au ...	103

Zusammenfassung

In der zellulären Biotechnologie besteht eine große Nachfrage nach Methoden für eine möglichst schonende Handhabung von Zellen. Ein wichtiger Ansatz hierfür ist die kontrollierte und schonende Ablösung adhärenter Zellen von Oberflächen, um zelluläre Veränderungen zu vermeiden.

Die vorliegende Arbeit erweitert bisherige Ansätze thermoresponsiver Polymeroberflächen hinsichtlich der Erzeugung und Anwendung mit besonderem Blick auf die Einzelzellablösung. Im Fokus dieser Arbeit stand, die Erzeugung thermoresponsiver Polymeroberflächen zu erleichtern und eine exakte Kontrolle über Zellen mit unterschiedlichem Adhäsionsverhalten durch einstellbare Oberflächeneigenschaften zu ermöglichen. Das thermoresponsive Copolymer Poly(N-isopropylacrylamid)-poly(ethylenglykol) PNIPAAm-PEG(15%)-SH (P15) wurde an Goldoberflächen (P15-Au) gebunden, um eine Kontrolle über die Zelladhäsion zu gewährleisten. Die Kontaktwinkeldaten von P15-Au lassen eine Änderung der Oberflächenbenetzbarkeit erkennen, welche dem Übergang von einem hydratisierten (bei 20 °C) zu einem dehydratisierten Polymerzustand (bei 45 °C) entspricht. L929 Fibroblasten konnten gut auf P15-Au bei 37 °C kultiviert werden und rundeten sich bei Temperaturänderung auf 25 °C innerhalb von 30 Minuten von der Oberfläche ab. Durch die Integration von P15-Au in ein mikrofluidisches System konnte die für eine komplette Zellablösung notwendige Kraft kontrolliert werden. Auf P15-Au wurde Fibronectin strukturiert aufgebracht, um ein Substrat mit einem zellattraktiven und einem schaltbaren Bereich herzustellen. Dadurch konnten die Zellen, die auf die zellattraktiven Fibronectinbereiche migrierten, von den Zellen getrennt werden, die auf den schaltbaren Polymerbereich verweilten.

Für die Optimierung der Schaltkinetik und der Schalteffizienz von schaltbaren Polymeroberflächen wurde ein neues Copolymer mit einem intramolekularen PEG-Gehalt von 19%wt an Goldoberflächen gebunden (P19-Au). Bei 25 °C war die Ablösung adhärenter Fibroblasten bei gleich bleibendem Zellabrundungsanteil doppelt so schnell wie auf P15-Au. Da stark adhärente Zellen (z.B. Osteoblasten) auf P19-Au bei Temperaturwechsel (37 °C → 25 °C) sich nicht abrundeten bzw. ablösten, wurde P19-Au mit dem zellrepellierendem Polymer CH₃O-PEG-SH (PG) modifiziert (P19/PG-Au). Die Daten der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) bestätigten die erwartete Oberflächenzusammensetzung von P19-Au und der modifizierten P19/PG-Au. Der Vergleich der Kontaktwinkeldaten beider Polymeroberflächen zeigte, dass die Schaltbarkeit von P19/PG-Au durch die Modifikation mit PG nicht verändert wurde. Ca. 74 % der stark adhärenenten MG63 Zellen lösten sich nach Temperaturänderung innerhalb von 30 Minuten von der Oberfläche. Um die Kultivierungsdauer für schwach adhärente Zellen auf P19-Au zu verkürzen, wurde P19-Au mit dem Fibroblasten-attraktiven Peptidmotiv CGGRGDS (RGD) modifiziert (P19/RGD-Au). Bei Temperaturänderung war der Abrundungsanteil adhärenter Zellen auf dieser Oberfläche vergleichbar mit dem Zellabrundungsanteil auf P19-Au.

1. Einführung

In der zellulären Biotechnologie ist es von großer Relevanz, neue Methoden zu entwickeln, die eine Nachbildung der *in vivo* Umgebung von Zellen ermöglichen. Damit kann das teilweise heterogene Verhalten von Zellen besser kontrolliert und analysiert werden. Ein nach wie vor kritischer Punkt ist das Ernten von adhärenenten Zellen auf Oberflächen, welcher einen großen Einfluss auf das morphologische Erscheinungsbild von Zellen haben kann. Dies kann weit reichende Auswirkungen auf die Zellvitalität, Zellproliferation sowie auf zelluläre Differenzierungsprozesse haben.

Bis heute existiert eine Reihe von Methoden, um adhärenente Zellen von Oberflächen zu lösen und zu ernten. Das wohl am meisten eingesetzte Verfahren in der Zellbiologie ist die enzymatische Behandlung von adhärenenten Zellen. Dabei werden Zellen mit einem Enzym (Trypsin) in Kombination mit einem Komplexbildner (Ethyldiamintetracetat: EDTA) für eine definierte Zeit inkubiert und anschließend geerntet. Über den Komplexbildner werden der Zelle für die Adhäsion nötige Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -Ionen entzogen. Das Enzym zerstört sowohl die Verbindung zwischen Membranprotein und der zellulären Umgebung (extrazelluläre Matrix: EZM) als auch die Zell-Zell-Verbindung. In der anschließenden Kultivierung müssen Zellen erst wieder ihre ursprünglichen Oberflächenproteine aufbauen, um ihre volle Aktivität entwickeln zu können, was die Signifikanz von Experimenten beeinflussen kann. Besonders im „Tissue Engineering“, wo Gewebe aufgebaut werden soll, kann eine solche Methode von großem Nachteil sein.

Die vollständige Entfernung adhärenenter Einzelzellen aus mikrofluidischen Kanälen stellt ein weiteres Problem in der Zellbiologie dar, da Zellen bisher nur mittels enzymatischer Komponenten oder mit hohen Strömungskräften aus den Kanälen entfernt werden können. Dadurch werden Zellen geschädigt und für nachfolgende Experimente in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Eine zweite Methode neben der enzymatischen Behandlung ist das Ablösen der Zellen mittels mechanischer Kräfte. Dabei werden die adhärenenten Zellen mittels eines so genannten „Zellschabers“ von der Oberfläche gekratzt und anschließend geerntet.

EINFÜHRUNG

Canavan *et al.*, 2005 verglich den Einfluss unterschiedlicher Zellablösungsmethoden auf Zellmorphologie und EZM. Hierbei zeigte sich, dass Zellen und EZM durch die enzymatische und mechanische Zellablösung enorm beschädigt werden, was eine ungünstige Voraussetzung für nachfolgende Kultivierungen ist. Als eine zellschonende Ablösungsmethode stellte sich in dieser Studie die Verwendung von thermoresponsiven Polymeroberflächen als Zellkultursubstrat dar. Diese Oberflächen wechseln über eine Temperaturänderung ihre Konformation und können dadurch zwischen einem zellattraktiven und einem zellrepellierenden Zustand schalten. Die Zellen können schonend von der Oberfläche entfernt werden, ohne jegliche enzymatische oder mechanische Behandlung. Darüber hinaus kann mit dieser Methode die unter der Zellschicht liegende EZM komplett vom Substrat gelöst werden, wodurch sich die physiologische Umgebung der Zellen kaum verändert. In einer anschließenden Kultivierung wurden die abgetrennten Zellen und ihre EZM weiterkultiviert, wobei eine Schädigung der Zellmorphologie, der Zelloberflächenproteine sowie der EZM nicht beobachtet werden konnte.

Die Anwendung von temperaturschaltbaren Oberflächen zur Ablösung von Zellschichten wurde von Takezawa *et al.*, 1990 erstmals berichtet. Seitdem zeigen temperaturschaltbare Oberflächen ihr Potential besonders in der Anwendung für die regenerative Medizin. Beispiele hierfür sind die Arbeiten von der Gruppe um Dr. T. Okano, die Zellschichten auf temperaturschaltbaren Oberflächen generierten und in einen Organismus transferierten. Unter Temperaturänderung konnte die Zellschicht komplett erhalten von der Oberfläche abgelöst werden und in ein funktionell inaktives Gewebe erfolgreich transplantiert werden konnten. Dadurch konnte die Funktionsfähigkeit des inaktiven Gewebes wiederhergestellt werden, ohne dabei Entzündungsreaktionen auszulösen (Hirose *et al.*, 2000; Akiyama *et al.*, 2004; Ide *et al.*, 2006).

Neben diesen Polymeroberflächen wurden Copolymeroberflächen als Zellkultursubstrat etabliert. Diese Copolymersysteme unterscheiden sich in ihrem Polymeraufbau von reinen Polymeroberflächen. Sie setzen sich aus einem Grundpolymer sowie daran gekoppelte Einheiten eines zweiten Polymers zusammen. Durch die Kopplung zweier Polymere können die Schalteigenschaften hinsichtlich der Ablösung adhärenter Zellen optimiert werden. Schmaljohann *et al.*, 2003 konnte durch den Einsatz solcher thermoresponsiver Copolymeroberflächen als

EINFÜHRUNG

Zellkultursubstrat die Ablösungsrate adhärenter Fibroblasten nach Temperaturreduktion deutlich erhöhen.

Nachteilig an den vorgestellten thermoresponsiven Zellkultursubstraten ist die zeitintensive und kostenaufwendige Erzeugung solcher Oberflächen. Zu dem sind die Oberflächeneigenschaften mit den bisher verwendeten Präparationsmethoden auf molekularer Ebene schwer kontrollierbar. Da Zellen unterschiedliche Adhäsionseigenschaften besitzen, sind diese bisherigen thermoresponsiven Systeme für eine individuelle Kontrolle von Zellen eher unzureichend. Ein möglicher Ansatz wäre ein einfaches und flexibles „Baukastenprinzip“, in welchem die erforderlichen Oberflächeneigenschaften mit Hilfe unterschiedlicher Moleküle zelltypspezifisch eingestellt werden können. Diese individuell entwickelten, thermoresponsiven Oberflächen können dann beispielsweise für die Untersuchung und Manipulation von Einzelzellen angewendet werden, die eine präzisere Information über die Zellheterogenität innerhalb einer Zellpopulation geben als ein Zellverband (Svahn und van den Berg, 2007).

Das Ziel und die Motivation der vorliegenden Arbeit liegen darin, die Erzeugung thermoresponsiver Oberflächen zu erleichtern und mittels kontrollierbarer Oberflächeneigenschaften eine schonende Handhabung von Zellen mit unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften zu erreichen. Dabei steht die Einzelzellablösung im Vordergrund dieser Arbeit, um die Handhabung von Zellen für die Einzelzellanalytik zu vereinfachen. Über die Integration schaltbarer Oberflächen in mikrofluidische Kanäle soll eine schonende und kontrollierte Entfernung von Zellen aus Mikrokanälen umgesetzt werden. Basierend auf diesen Zielsetzungen sollen eine Reihe von Fragen beantwortet werden:

- Eignet sich die ausgewählte Oberflächenfunktionalisierungsmethode als eine einfache und effiziente Methode für die funktionelle Anbindung thermoresponsiver Polymere?
- Sind die ausgewählten, thermoresponsiven Polymere zellverträglich und funktionell, um eine schonende Kontrolle der Einzelzelladhäsion zu ermöglichen?
- Eignen sich diese Polymeroberflächen für die Integration in ein mikrofluidisches System, um darin Einzelzelladhäsion zu kontrollieren?

EINFÜHRUNG

- Sind die thermoresponsiven Polymeroberflächen für eine effiziente Nutzung mehrmals einsetzbar?
- Über welchen Zeitraum und unter welchen Bedingungen können thermoresponsive Polymeroberflächen gelagert werden, ohne dabei ihre Schaltbarkeit zu verändern?
- Können aus einem „Sortiment von Molekülen“ individuelle, temperaturschaltbare Polymeroberflächen entwickelt werden, durch die eine Kontrolle über das Adhäsionsverhalten unterschiedlicher Zelltypen ermöglicht wird?
- Kann durch die Mikrostrukturierung von schaltbaren Polymeroberflächen das Zellverhalten zweidimensional kontrolliert werden?

2. Grundlagen

In den heutigen Materialwissenschaften, der Biotechnologie sowie in der Medizin sind Polymere bzw. Hydrogele von Relevanz, die ihre Eigenschaften über physikalische oder chemische Stimuli ändern können. Sie finden u.a. Anwendung als Drug-Delivery-Systeme, Biosensoren, Molekülseparationssysteme oder als implantierbare Materialien (Kopecek, 2007). Ferner werden Hydrogele nach stimuliresponsiven oder nichtresponsiven Gelen eingeteilt (Nayak und Lyon, 2005). Nichtresponsive Gele sind Materialien, die durch Adsorption von Wasser quellen. Stimuliresponsive Gele werden als „schaltbare Polymere“ oder auch als „intelligente Polymere“ bezeichnet, da sie mit einem unterschiedlichen Quellverhalten auf diverse Stimuli wie beispielsweise pH-Wert (Lee und Shieh, 1999), Ionenstärke (Duracher *et al.*, 1998), elektrische Felder (Tanaka *et al.*, 1982), Biomoleküle (Miyata *et al.*, 2002), Licht (Suzuki und Tanaka, 1990) oder Temperatur (Li und Tanaka, 1990) reagieren können. Die Reaktivität des jeweiligen Polymers hängt von der Herstellungsart und der Modifikation ab, die nach der Polymerisation vorgenommen werden (Nayak und Lyon, 2005). Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf thermoresponsiven Polymeren liegt, wird im Nachfolgenden auf deren Funktionsprinzip und Anbindungsmöglichkeiten näher eingegangen.

2.1 Thermoresponsive Polymere und ihre Anwendungen

2.1.1 Funktionsprinzip von thermoresponsiven Polymeren

Thermoresponsive Polymere stellen für pharmazeutische sowie biomedizinische Anwendungen ein attraktives System dar, da einige Vertreter dieser Polymere Phasenübergangstemperaturen von 30 – 34 °C aufweisen, was nahe dem Bereich der menschlichen Körpertemperatur ist (Schmaljohann, 2006).

Sinnvolle Anwendungen finden thermoresponsive Polymere beispielsweise in der Kontrolle der Oberflächenbenetzbarkeit für die kontrollierte Proteinadsorption in mikrofluidischen Kanälen (Huber *et al.*, 2003) sowie in der Kontrolle der Zelladhäsion an Oberflächen (Yamada *et al.*, 1990). Basierend hierauf wurden schaltbare Polymere für die Anwendung in der Zellkultur sowie im Tissue Engineering näher untersucht (Bae *et al.*, 1990, Yoshida *et al.*, 1993, Okano *et al.*, 1990).

GRUNDLAGEN

Eukaryotische Zellen konnten auf diesen Substraten adhären, ausbreiten und eine Zellschicht bilden. Nach Temperaturveränderung lösten sich diese schonend von der Oberfläche ab, ohne dabei eine Schädigung zu erfahren. Canavan *et al.*, 2005 konnte im Rahmen einer großen Studie über Methoden zur Zellablösung adhärenter Zellen zeigen, dass durch die Trypsinbehandlung die Zellvitalität, die extrazelluläre Matrix sowie die Zell-Zell-Verbindung durch die Zerstörung von Zelloberflächenproteinen beeinflusst werden. Als Folge können zudem intrazelluläre Signaltransduktionswege funktionell beeinträchtigt sein.

Eine der bekanntesten Vertreter der thermoresponsiven Polymere ist das wasserlösliche, nicht-ionische Polymere Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm). Dieses gehört zur Gruppe der N-Alkylacrylamide und wurde auf seine thermoresponsiven Eigenschaften untersucht (Heskin und Guillet, 1968). Aufgrund von Temperaturänderungen zeigt dieses Polymer thermisch reversible Phasenübergänge entlang der Löslichkeitsgrenze, welche als LCST (lower critical solution temperature = untere kritische Löslichkeitstemperatur) bezeichnet wird. Die LCST ist für jedes Polymer charakteristisch und liegt im Falle von reinem PNIPAAm bei ~32 °C.

Der Aufbau des PNIPAAm-Moleküls, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist in Abbildung 2.1 dargestellt. An das PNIPAAm-Molekül (n) wurde in der Synthese ein jeweilig definierter Anteil PEGMA (m) gekoppelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt zwei Copolymere mit unterschiedlichen PEG-Anteilen synthetisiert. Der detaillierte Syntheseweg ist in Ernst *et al.*, 2007 beschrieben.

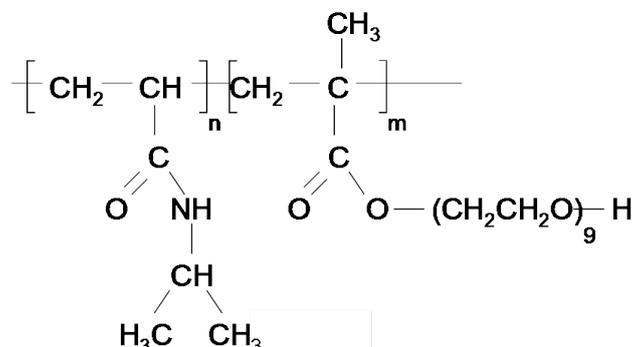


Abbildung 2.1: Struktur des thermoresponsiven Copolymers PNIPAAm-PEG. n definiert den PNIPAAm-Anteil, m definiert den PEGMA-Anteil. Es wurden in dieser Arbeit zwei Copolymere basierend auf dem dargestellten Copolymer synthetisiert. Im Falle von PNIPAAm-PEG(15%) beträgt die molare Zusammensetzung ein Verhältnis von 95:5 (n:m), bei PNIPAAm-PEG(19%) 93:7 (n:m).

GRUNDLAGEN

Als Vorlage für die dargestellte Copolymerstruktur dienten die Copolymere aus der Arbeit von Schmaljohann et al., 2003. Darin wurden an PTFE-Oberflächen thermoresponsive PNIPAAm-PEG-Copolymere polymerisiert, die eine LCST nahe der Zellkultivierungstemperatur bei 37°C aufweisen und durch den PEG-Anteil einen stärkeren Zellablösungseffekt bei Temperaturänderung erzielen können. Das Copolymer PNIPAAm-PEG mit einem PEG-Gehalt von 15 wt. % zeigte eine LCST im Bereich von 35 – 36 °C. Durch Erhöhung des intramolekularen PEG-Gehalts auf 19 wt. % ergab sich eine LCST für das Copolymer von 36 – 37 °C, wodurch die Zellablösung im Vergleich zu PNIPAAm-PEG(15%) beschleunigt und erhöht werden konnte. Dieser Effekt wurde auf die bekannten protein –und zellrepellierenden Eigenschaften von PEG sowie auf die Erhöhung des intramolekularen PEG-Gehalts zurückgeführt (Harris, 1992).

Basierend hierauf wird in Abbildung 2.2 das Funktionsprinzip eines solchen Copolymers in Lösung sowie immobilisiert an einer Oberfläche näher erläutert (Takei et al., 1994).

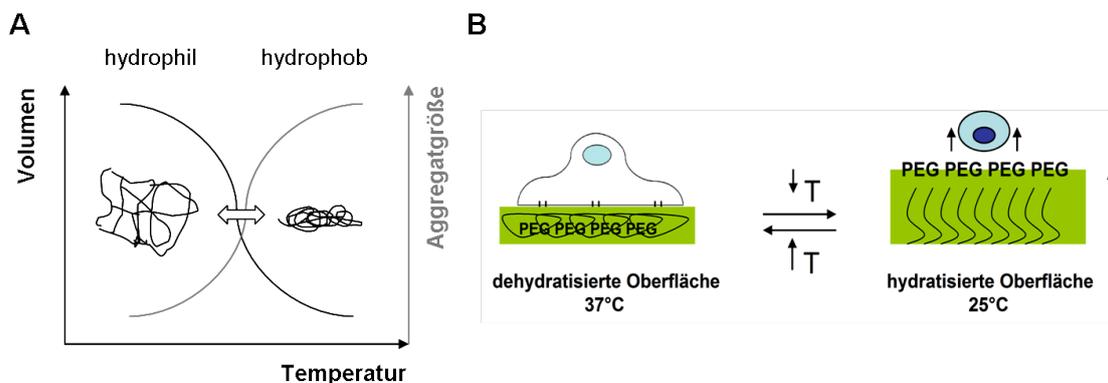


Abbildung 2.2: Strukturverhalten von PNIPAAm-PEG in Lösung sowie immobilisiert an Oberflächen mit Zellverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen. (A) Mit steigender Temperatur reduziert sich der Hydratisierungsgrad des Polymers in Lösung. Als Folge reduziert sich das Molekülvolumen, die Aggregation der Moleküle nimmt zu. **(B)** Bei hoher Temperatur (37 °C) zeigt das Polymer einen kollabierten, dehydratisierten Zustand an der Oberfläche. Es ist mehr PNIPAAm als PEG an der Oberfläche exponiert, wodurch die Zellen an die Oberfläche adhären und sich ausbreiten können. Bei Temperaturreduktion (25 °C) wird das Copolymer hydratisiert, wodurch mehr PEG als PNIPAAm an der Oberfläche exponiert wird. Als Folge runden sich die Zellen von der Oberfläche ab und können entfernt werden.

GRUNDLAGEN

Oberhalb der charakteristischen LCST kommt es zu einem dehydratisierten, kollabierten Zustand des Copolymers (Abbildung 2.2 A). Dies ist auf die Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Isopropylamidgruppen des Polymers und den Wassermolekülen zurückzuführen, wodurch im Polymer die intra- und intermolekularen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Isopropylamidgruppen zunehmen (Plate *et al.*, 1999). Darüber hinaus kommt es zu einer erhöhten intramolekularen Wechselwirkung zwischen PEG und PNIPAAm-Einheiten. Der exponierte PEG-Anteil ist in diesem Zustand relativ gering, wodurch Zellen an die Copolymeroberfläche adhären und sich ausbreiten können (Abbildung 2.2 B). Bei Temperaturen unterhalb der LCST löst sich das Copolymer in dem jeweiligen Lösungsmittel, was durch die Hydratisierung der Isopropylamidgruppen im Copolymer induziert wird. Das Copolymer befindet sich in einem hydratisierten, gequollen Zustand, in welchem ein größerer PEG-Anteil aufgrund der Hydratisierung an der Oberfläche exponiert wird (Abbildung 2.2 A). Sowohl durch den Quellungsseffekt von PNIPAAm als auch durch den hohen exponierten, zellrepellierenden PEG-Anteil werden adhären Zellen von der Polymeroberfläche abgelöst (Abbildung 2.2 B) (Kwon *et al.*, 2000).

2.1.2 Oberflächenfunktionalisierungsmöglichkeiten

In bisherigen Studien wurden unterschiedliche thermoresponsive Polymere auf ihre Anwendbarkeit für die Kontrolle der Zell-Substrat-Adhäsion untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Funktionalisierungsmöglichkeiten von Oberflächen mit thermoresponsiven Polymeren beschrieben (da Silva *et al.*, 2007).

Im Zusammenhang mit PNIPAAm-Oberflächen ist die Elektronenstrahlpolymerisation die am häufigsten beschriebene Methode, in welcher an kommerziell erhältlichen Polystyrensubstraten über einen Elektronenstrahlverdampfer thermoresponsives PNIPAAm polymerisiert und kovalent gebunden werden konnte (Yamada *et al.*, 1990; Akiyama *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2000). Hierüber konnten zur Zellablösung funktionelle Polymerschichtdicken bis 20 nm erzeugt werden (Yamato *et al.*, 2001). Schichtdicken oberhalb dieses Bereichs erwiesen sich als zellunverträglich hinsichtlich der Zelladhäsion.

Eine zweite Möglichkeit, thermoresponsive Zellkultursubstrate zu erzeugen, ist die

UV-Bestrahlung von Oberflächen. Hierfür werden unter UV-Bestrahlung Polymere wie bspw. PNIPAAm mit photoreaktiven Gruppen an der Oberfläche polymerisiert und gebunden. Dieses Verfahren wurde mit photolithographischen Masken kombiniert, um mikrostrukturierte Oberflächen mit thermoresponsiven Bereichen zu entwickeln (Ito *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Adhärenz Fibroblasten konnten nach Temperaturänderung von den thermoresponsiven Bereichen abgelöst werden.

Die dritte Möglichkeit für die Erzeugung thermoresponsiver Zellkultursubstrate zeigte die Gruppe um Schmaljohann (Schmaljohann *et al.*, 2003). Sie polymerisierten thermoresponsive PEG (Polyethylenglycol)-basierende Copolymere von PNIPAAm und Poly (N-diethylacrylamid) PDEAAm und immobilisierten es auf PTFE (Polytetrafluorethylen) -Substraten mittels eines Niederdruckargonplasmas. Diese Methode ist limitiert durch die erzeugten Schichtdicken im Bereich von 10-20 nm.

2.2 Funktionalisierung und Charakterisierung von Goldoberflächen

Die in Kapitel 2.1.2 vorgestellten Funktionalisierungsmethoden haben alle die Nachteile, dass die Verfahren einen hohen Geräteaufwand, teuer und teilweise schlecht kontrollierbare Parameter im Bezug auf die Oberflächeneigenschaften aufweisen.

Deshalb soll in dieser Arbeit eine leicht handhabbare Funktionalisierungsmethode eingesetzt werden, die eine flexiblere Kontrolle über die Oberflächeneigenschaften erlaubt. Als geeignete Methode für diese Anforderung hat sich die Thiol-Goldchemie herausgestellt, die im Bezug auf PNIPAAm-Oberflächen erstmalig von Cho *et al.*, 2004 im Rahmen von Proteinadsorptionsstudien vorgestellt wurde. In der vorliegenden Arbeit sollen Thiol-terminierte Copolymere an Goldoberflächen kovalent gebunden werden und als thermoresponsive Zellkultursubstrate getestet werden.

2.2.1 Selbstorganisierende Monolagen (SAM) an Goldoberflächen

Die Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Thiolmolekülen findet in der heutigen in der Biochemie und Biotechnologie breite Anwendung (Ostuni *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird diese Methode für die pharmakologische Dosierung, die Entwicklung von Biosensoren und speziell benetzbaren Oberflächen sowie in der

GRUNDLAGEN

Entwicklung von Nanosystemen für die Elektronik eingesetzt (Vericat *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächeneigenschaften auf molekularer Ebene durch Variation der molekularen Packungsdichte sowie der funktionellen Gruppen entsprechend angepasst werden können (Delamarche *et al.*, 1996). Damit konnte dann beispielsweise die Proteinadsorption an Oberflächen (Prime und Whitesides, 1993) bzw. Zelladhäsion an Oberflächen (Mrksich, 2000) kontrolliert werden.

Aufgrund der selbstablaufenden, spontanen Adsorption der Thiole zu einer Einzelmolekülschicht auf Goldoberflächen werden solche Oberflächen als selbstorganisierende Monoschichten (SAM: Self-Assembling Monolayer) bezeichnet. SAM sind ultradünne, organische Schichten, deren Dicke einer Moleküllage entspricht. Ein Thiol-Molekül besteht in der Regel aus drei Bereichen (Abbildung 2.3 A), welche ausschlaggebend für die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Oberflächen sind. Die terminale Thiolgruppe wird für die kovalente Anbindung von Thiolen an Goldoberflächen benötigt. Diese ist eine wichtige Voraussetzung für die thermische Stabilität von SAMs. Die Methylgruppen können in ihrer Länge variieren und stabilisieren die aneinander gereihten Thiole über van der Waalsche Wechselwirkung. Die funktionelle Kopfgruppe verleiht der Goldoberfläche die physikalischen und chemischen Eigenschaften, wodurch bspw. die Benetzbarkeit gesteuert werden kann. Ist die Kopfgruppe z.B. eine OH-Gruppe, so wird eine Oberfläche mit hydrophilen Eigenschaften erzeugt. Wird hingegen als Kopfgruppe eine CH₃-Gruppe eingesetzt, so wird die Hydrophobizität der Oberfläche erhöht.

Die Bildung einer Monolage basiert zum einen auf der Physisorption der Thiole, zum anderen auf der Chemisorption von Thiol-Molekülen auf Goldoberflächen unter Abspaltung des Wasserstoffatoms aus der terminalen Thiolgruppe (Kang und Rowntree, 2007):



Die Adsorptionskinetik hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, wie z.B. Thiollänge, Temperatur, Konzentration und Lösungsmittel. Porier und Pylant, 1996 zeigten in Ihren Studien einen zweistufigen Adsorptionsmechanismus der selbstorganisierenden Alkanthiole auf Goldoberflächen (Abbildung 2.3 B).

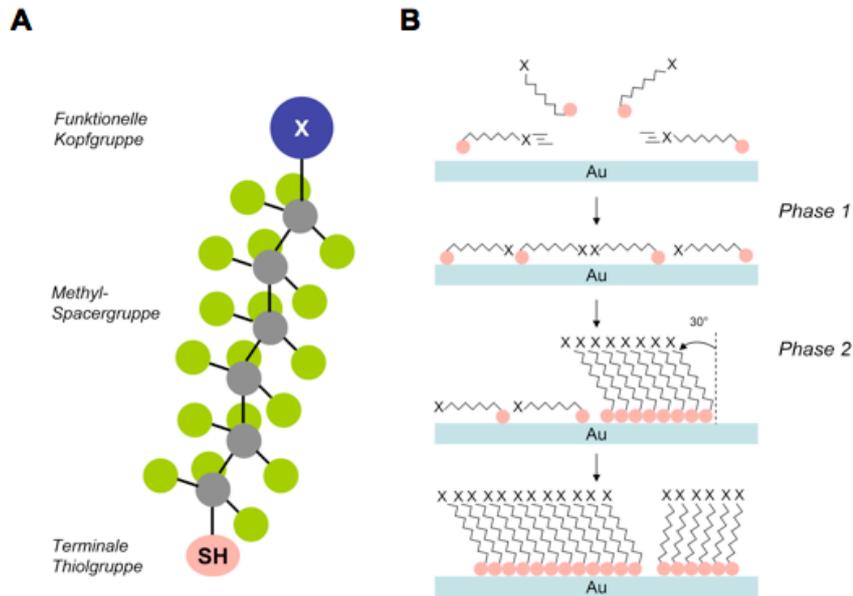


Abbildung 2.3: Aufbau und Organisation von SAM auf Goldoberflächen. (A) Schematischer Aufbau eines Alkanthiols. **(B)** Mechanismus der Selbstorganisation von Thiolen an Goldoberflächen. In der ersten Phase erfolgt die Thioladsorption und Oberflächenabsättigung. In der zweiten Phase werden zur Maximierung der van der Waalschen Kräfte zwischen den Methylgruppen die Thiol-Ketten in einem Winkel von 30° zur Oberflächennormalen ausgerichtet, um eine noch höhere Packungsdichte zu erreichen. Die Adsorptionsdauer (2 - 24 h) hängt von der jeweiligen Molekülgröße und Konzentration ab. (nach Porier und Pylant, 1996)

In der ersten Phase adsorbieren Thiol-Moleküle an der Oberfläche und bilden aufgrund ihrer parallelen Ausrichtung zur Oberfläche eine Schicht mit geringer Dichte. Dichte und Ordnungsgrad der Schicht hängen vom Substrat, der Alkankettenlänge sowie vom Typ und der Größe der funktionellen Gruppen ab. Nach Oberflächenabsättigung werden in der zweiten Phase zur Maximierung der van der Waalschen Kräfte zwischen den Methylgruppen die Thiol-Ketten in einem Winkel von 30° zur Oberflächennormalen ausgerichtet, um eine noch höhere Packungsdichte zu erreichen. Die Wechselwirkung von Schwefelatomen untereinander wird als sehr gering angenommen (Dubois und Nuzzo, 1992). Monoschichten auf Goldoberflächen sind nach Präparation stabil, d.h. sie sind hydrolyseunempfindlich, sie polymerisieren nicht, im Gegensatz zu SAM von Silanen, welche hydrolysieren und Polymere ausbilden, die dann die Oberfläche kontaminieren können. Die Eigenschaften der Thiol-Monoschicht auf Goldoberflächen werden durch drei Faktoren bestimmt (Xu und Li, 1995):

GRUNDLAGEN

1. Die Adsorption von oberflächenaktiven Thiol-Gruppen auf dem Substrat
2. Die disperse Wechselwirkung zwischen den Alkyl-Ketten
3. Die Wechselwirkung zwischen den terminalen funktionellen Gruppen und deren Umgebung.

Neben Thiol-Molekülen können auch Moleküle mit einer Disulfidgruppe für die Funktionalisierung an Goldoberflächen verwendet werden, die jedoch eine langsamere Adsorptionskinetik als Thiolmoleküle aufweisen (Jung *et al.*, 1998).

Coadsorptive SAM's bieten die Möglichkeit, die Oberflächeneigenschaften mittels Konzentrationsvariation der unterschiedlichen Thiol-Moleküle exakt für die jeweiligen Anforderungen einzustellen. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Adsorption von Biomolekülen, da diese mit einer höheren Affinität an coadsorptive Oberflächen binden können als an adsorptive Oberflächen (Fujita *et al.*, 2004). Für die Zellbiologie wird die Coadsorption eingesetzt, um Zellen in ihrer Migration und Adhäsion an Oberflächen räumlich zu kontrollieren (Veiseh *et al.*, 2007). Als kritischer Faktor während der Coadsorption hat sich die Entmischung der Thiole erwiesen, welche zu Oberflächendefekten führen können. Dies kann durch die richtige Wahl des Lösungsmittels für beide Thiole sowie durch nicht zu große Unterschiede in der Thiolkettengröße verhindert werden.

Für den Nachweis von SAM an Goldoberflächen existieren unterschiedliche Methoden. Durch die Anwendung von AFM (atomic force microscopy) erhält man Information über die 2D-Struktur der Oberfläche. Mittels Raman Spektroskopie lässt sich auf die molekulare Anordnung sowie funktionelle Gruppen schließen. Die dynamische Kontaktwinkelmessung gibt Aussage über die Benetzbarkeit der Oberfläche, wodurch auf die Verteilung funktioneller Gruppen geschlossen werden kann. Der Einsatz von Photoelektronenspektroskopie (XPS) ist eine oberflächensensitive Methode, die erlaubt, chemische Elemente zu identifizieren und zu quantifizieren. Damit sind Aussagen über die Oberflächenzusammensetzung bis zu einer Tiefe von 10 nm möglich (Vericat *et al.*, 2005).

2.2.2 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessung findet als Methode zur Oberflächencharakterisierung eine breite Anwendung, wie z.B. bei der Bestimmung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten an Festkörpern oder bei der Optimierung von Beschichtungsverfahren (Lackieren, Kleben, Drucken, etc.) an Oberflächen.

Die Kontaktwinkelmessung wurde in dieser Arbeit als Charakterisierungsmethode an funktionalisierten Goldoberflächen durchgeführt. Sie bietet die Möglichkeit, eine Information über die Benetzbarkeit der Oberfläche zu erhalten. Daraus kann dann auf die Verteilung funktioneller Gruppen an der Oberfläche geschlossen werden.

Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, den Kontaktwinkel zwischen einer Flüssigkeit (Wassertropfen) und einem Festkörper (Substrat) zu messen und darüber eine Aussage über die energetische Wechselwirkung zwischen dem Festkörper und der Flüssigkeit zu treffen. Die Spreitung des Tropfens gibt eine Information über die Oberflächenbenetzbarkeit an. Aufgrund des Kontakts des Wassertropfens mit dem Festkörper ergeben sich drei Phasen mit drei Oberflächenspannungstypen (Abbildung 2.4). Die Oberflächenspannung σ entspricht der Oberflächenenergie pro Fläche, d.h. die zur Vergrößerung der Oberfläche definierte Arbeit bezogen auf die Fläche.

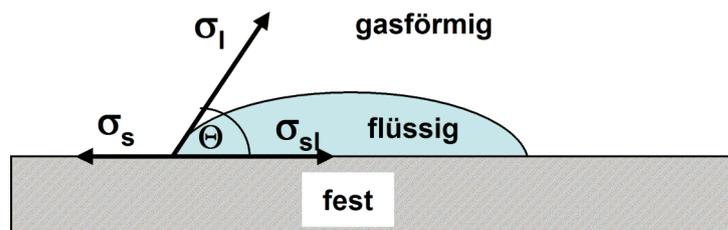


Abbildung 2.4: Kontaktwinkelmessung auf einer Festkörperoberfläche nach YOUNG. Der Kontaktwinkel θ ist der Winkel, den eine Tangente im drei-Phasen-Punkt bildet. Aus dem Kontakt des Wassertropfens mit dem Festkörper ergeben sich drei Oberflächenspannungen entlang der Phasengrenzen: σ_l : Oberflächenspannung der Flüssigkeit an der Phasengrenze flüssig/gasförmig, σ_s : Oberflächenspannung des Festkörpers an der Phasengrenze fest/gasförmig, σ_{sl} : Oberflächenspannung der Flüssigkeit an der Phasengrenze fest/flüssig. (nach Dörfler, 2002)

Das Gleichgewicht an dem drei-Phasen-Punkt bestimmt den Kontaktwinkelwert θ , welcher sich bei dem Kontakt zwischen der Grenzfläche flüssig/ gasförmig und dem Festkörper ergibt. Er wird über Young`s Gleichung definiert:

$$\cos \theta = (\sigma_s - \sigma_{sl}) / \sigma_l \quad (1)$$

Neben der Messmethode des „sitzenden Tropfens“, bei dem der Randwinkel des ruhenden Tropfens auf dem Festkörper gemessen wird, existiert die dynamische Kontaktwinkelmessung. Diese hat den Vorteil, neben dem Kontaktwinkel eine zusätzliche Information über Rauheit bzw. chemische Homogenität der Festkörperoberfläche zu erhalten, welche über die so genannte Kontaktwinkelhysterese bestimmt wird. Diese ergibt sich aus der Differenz von Vorzugs- zu Rückzugswinkel. Bei Vergrößerung des Wassertropfens auf der Festkörperoberfläche misst man den Vorzugswinkel. Durch die Verkleinerung des Tropfens wird der Rückzugswinkels bestimmt (Abbildung 2.5).

Aufgrund der Änderung des Kontaktwinkels bei unterschiedlichen Temperaturen können darüber hinaus Rückschlüsse auf die Schaltkinetik von thermoresponsiven Oberflächen gezogen werden, die aus der Änderung der Benetzungseigenschaften bei solchen Oberflächen resultiert.

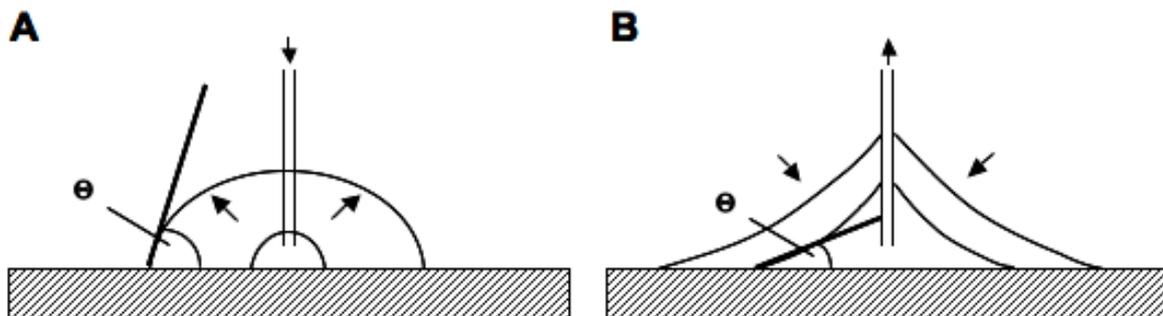


Abbildung 2.5: Messprinzip der dynamischen Wasserkontaktwinkelmessung an Festkörpern. (A) Ermittlung des Vorzugswinkels bei maximaler Vergrößerung des Wassertropfens. (B) Ermittlung des Rückzugswinkels bei maximaler Verkleinerung des Wassertropfens. (nach Dörfler, 2002)

2.2.3 Röntgenelektronenspektroskopie (XPS)

Die XPS-Methode (X-ray photoelectron spectroscopy) ist eine der am häufigsten eingesetzten Analytikmethoden zur quantitativen Untersuchung der molekularen Zusammensetzung an Oberflächen. XPS findet Anwendung in vielen Bereichen der Materialwissenschaften (Polymerchemie, Keramik –und Metallverarbeitung) (Seah, 1980; Ebberink *et al.* 1984). Sie bietet die Identifikation chemischer Elemente auf Oberflächen und gibt eine Information über Bindungszustände dieser Elemente, deren Oxidationsgrad bzw. funktionelle Gruppen. Außer Wasserstoff und Helium können alle Elemente mit dieser Methode untersucht werden.

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit atomaren Orbitalen aus Atomen, Molekülen, wobei Elektronen emittiert werden, deren kinetische Energie gemessen wird (Abbildung 2.6). Während der Bestrahlung eines Festkörpers mit Röntgenstrahlung kann es zu zwei Wechselwirkungsphänomenen kommen. Zum einen läuft eine Absorption der Röntgenstrahlung sowie Emission mittels Röntgenfluoreszenz ab. Diese kann über separate Verfahren untersucht werden, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird.

Zum zweiten wird aufgrund der energiereichen Röntgenstrahlung ein Elektron aus dem Atomverband herausgeschlagen. Dadurch kommt es zum Austritt eines Photoelektrons und ein Elektron fällt aus einer energetisch höheren Lage in das entstandene Loch zurück (XPS-Elektron). Durch die Energieabgabe wird ein drittes Elektron aus dem Atomverband herausgelöst (Auger-Elektron), welches innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Das XPS-Elektron wird auf seine kinetische Energie analysiert und mit Standardwerten verglichen. Daraus kann dann auf die Elementzusammensetzung an der Oberfläche geschlossen werden. Der Zusammenhang zwischen der eingestrahlten Photonenenergie und der kinetischen Energie der emittierten Elektronen wird über das photochemische Quanten-Äquivalenzgesetz dargestellt:

$$E_{\text{Kin}} = E_{\text{Photon}} - E_{\text{B}} - e\Phi \quad (2)$$

Ausgehend von der bekannten Photonenenergie E_{Photon} kann dann die Bindungsenergie E_{B} aus der kinetischen Energie der Photoelektronen E_{Kin} bestimmt werden. E_{B} ist charakteristisch für das jeweilige Orbital eines Atoms.

GRUNDLAGEN

Ein Elektron kann nur den Festkörper verlassen, wenn die Photonenergie größer ist als die Elektronenbindungsenergie und das Elektron ausreichend Energie besitzt um die Austrittsarbeit $e\Phi$ des Festkörpers zu überwinden. Deshalb muss in die Bestimmung der kinetischen Energie die Austrittsarbeit $e\Phi$ an der Oberfläche miteinbezogen werden.

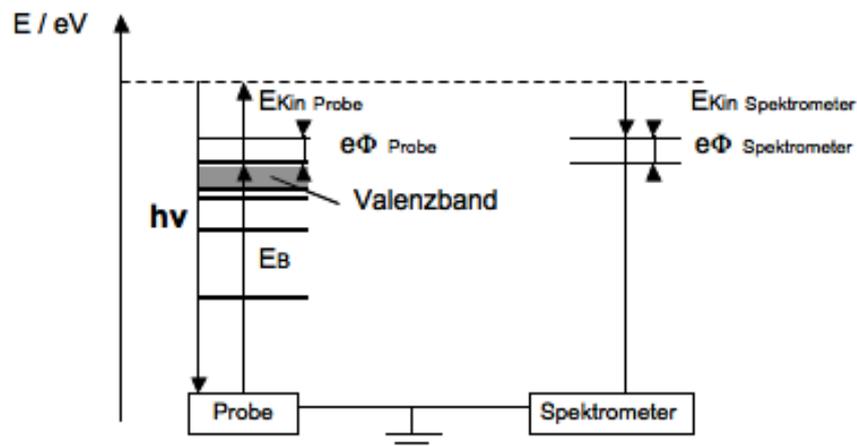


Abbildung 2.6: Energieschema eines XPS-Prozesses. Die Photonen der Röntgenstrahlung ($h\nu$) werden am Festkörper (Probe) absorbiert, worauf die Elektronen in einen angeregten Zustand überführt werden und aus der Probe austreten können. Dieser Elektronenaustritt ist möglich, da die Photonenenergie größer ist als Elektronenbindungsenergie (E_B), wodurch die Austrittsarbeit ($e\Phi$) an der Oberfläche überwunden werden kann. Die kinetische Energie sowie die Austrittsarbeit können dann vom Analysator des Spektrometers detektiert werden. (nach Moulder *et al.*, 1995)

Die quantitative Auswertung der Messung erfolgt über die Intensität dieser Messungen, die proportional zur Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Elemente in der Probe ist. Die Tiefeninformation einer Oberfläche bei dieser Messung hängt von der mittleren freien Weglänge der emittierten Elektronen ab, welche wiederum von der kinetischen Energie abhängig ist. Diese können je nach Material der untersuchten Probe aus einer Oberflächentiefe bis zu 10 nm emittieren und damit detektiert werden. Mit zunehmender Tiefe reduziert sich der Intensitätsbeitrag zum Spektrum exponentiell. Die Tiefensensitivität einer XPS-Messung kann durch die winkelabhängige Photoelektronenspektroskopie erhöht werden.

2.3 Zellbiologischer Hintergrund

Die Kontrolle über das Adhärenzverhalten von Zellen an Oberflächen spielt in der heutigen Entwicklung von biokompatiblen Oberflächen eine entscheidende Rolle. Die Zelladhäsion wird über die Wechselwirkung zwischen Proteinen an der jeweiligen Oberfläche und den Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Dabei treten sowohl spezifische Wechselwirkungen (Rezeptor-Ligand) als auch unspezifische Wechselwirkungen auf. Letztere können von der Oberflächentopographie, Oberflächenbenetzbarkeit, Oberflächenladung sowie von der Oberflächenzusammensetzung beeinflusst werden (Wei *et al.*, 2007).

2.3.1 Zelladhäsion auf Substrat

Bevor die Zelle in unmittelbarem Kontakt mit der jeweiligen Oberfläche tritt, kommt es zu einer passiven Adhäsion mit unspezifischen, physikochemischen Wechselwirkungen. Diese beinhalten sterische, hydrophobe, elektrostatische und van der Waal'sche Wechselwirkungen. Der Einfluss der Oberflächenbenetzbarkeit auf die initiale Zelladhäsion ist noch ein ungeklärter Mechanismus. Diverse Studien konnten zeigen, dass eine Oberflächenbenetzbarkeit mit Kontaktwinkeln zwischen 0° bis 80° eine optimale Zelladhäsion ermöglichen (Brunett, 2001; Wei *et al.*, 2006). Dies wurde damit begründet, dass an solchen Oberflächen die adsorbierten Proteine in einer Konformation angeordnet sind, dass für die Zellen passende Bindungsmotive präsentiert werden. Proteinadsorptionsstudien an stark hydrophoben Oberflächen zeigen, dass aufgrund der Maximierung hydrophober Wechselwirkung der Oberflächen mit den hydrophoben Aminosäureseitenketten Proteine in eine veränderte Konformation überführt werden, wodurch den Zellen andere Peptidmotive präsentiert werden als auf hydrophileren Oberflächen (Grinell und Feld, 1982; Horbett und Lew, 1994). Dies kann zu einem schwächeren Zelladhäsionsverhalten führen.

Bei unmittelbarem Kontakt der Zelle mit der Oberfläche nehmen die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Proteinen an der Materialoberfläche zu. Über die zellspezifischen Integrinrezeptoren erkennt die Zelle bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) aus ihrer Umgebung und bindet daran. Danach erfolgt ein Ausbreiten des adhärenen Zellkörpers mittels der ATP-abhängigen Reorganisation des Zytoskeletts, um die Zelle mechanisch an der Oberfläche (EZM)

GRUNDLAGEN

zu stabilisieren (Hersel *et al.*, 2003). Die EZM kann von der Zelle entweder selbst generiert oder in Form von adsorbierten Serumproteinen an der Oberfläche gebildet werden. Die Integrine fungieren in der Zelle als Ca^{2+} -abhängige heterodimere Transmembranproteine mit großen Liganden-bindenden extrazellulären Domänen und einem kurzen intrazellulären Anteil (Horwitz und Parson, 1998). Die intrazelluläre Domänen der Integrinrezeptoren sind über diverse Adapterproteine an die Aktinfilamente (Zytoskelett) gekoppelt. Über die Integrinrezeptoren können Signaltransduktions-kaskaden induziert werden, welche Prozesse wie Zellproliferation bzw. Apoptose steuern. Wird ein Signal von der EZM auf die Integrine übertragen, kann dies zu einer Reorganisation des Cytoskeletts führen, worüber Zellmigration und Zellproliferation gesteuert wird. Signale aus der Zelle zur EZM führen in der Regel zur Aktivierung der Integrinrezeptoren für eine mögliche Ligandenbindung (Hynes, 1992).

Die Ligandenspezifität des Integrinrezeptors wird durch die Kombination der 18 alpha/ 8 beta-Untereinheiten bestimmt. Als Liganden existieren unterschiedliche EZM-Proteine (Fibronectin, Kollagen, etc.), die von den Zelltypen mit der jeweiligen Integrinrezeptorkombination unterschiedlich stark gebunden werden. Pierschbacher und Rouslathi, 1984 identifizierten innerhalb des Fibronektins das für die Zelladhäsion nötige Tripeptid „RGD“ (Arginin-Glycin-Aspartat). In weiteren Studien wurde herausgefunden, dass RGD ebenso in anderen EZM-Proteinen (Fibrinogen, Vitronectin, Laminin, etc.) ein für die Zelladhäsion notwendiges Motiv ist (Pfaff, 1997). Dabei zeigt sich, dass gelöstes RGD die Zelladhäsion an Fibronectin inhibiert. Dagegen steigert immobilisiertes RGD die Zelladhäsion. Neben RGD existieren für die Zelladhäsion eine Reihe weiterer Zellerkennungsmotive, wie z.B. „GFOGER“ in Kollagen (Knight *et al.*, 2000), die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher betrachtet werden.

2.3.2 Beeinflussung der Zelladhäsion

In der Zellbiologie werden häufig Oberflächen mit EZM-Proteinen beschichtet, um die Zelladhäsion zu verstärken und Zellwachstum sowie Differenzierung zu beschleunigen (Vohra *et al.*, 1991; Kaehler *et al.*, 1989).

Jedoch bringt die Verwendung von EZM-Proteinen etliche Nachteile mit sich (Hersel *et al.*, 2003; Weiß *et al.*, 2001). Die EZM-Proteine müssen für den Gebrauch aus anderen Organismen isoliert und aufgereinigt werden. Aufgrund dessen kann es zu ungewünschten Immunantworten sowie zu einem erhöhten Infektionsrisiko kommen. Darüber hinaus sind die EZM-Proteine durch ihren proteolytischen Abbau relativ instabil und müssen somit für die Zellen immer wieder an der Oberfläche erneuert werden. Des Weiteren ergeben sich Schwierigkeiten in der Proteinanbindung an Oberflächen, da auf hydrophoben Oberflächen Proteine dazu neigen, die Wechselwirkung mit hydrophoben Seitenketten zu maximieren, wodurch Proteine teilweise denaturiert werden können und es somit zu einer undefinierten Präsentation von Bindungsmotiven an der Oberfläche kommt. EZM-Proteine enthalten eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellerkennungsmotiven, wodurch eine selektive Bindung eines bestimmten Zelladhäsionsrezeptors nicht gegeben ist. Dies kann für viele Anwendungen von Nachteil sein. Aus den genannten Gründen sind EZM-Proteine für eine Langzeitanwendung ungeeignet (Elbert und Hubbell, 1996).

Für viele zellbiologische Anwendungen eignen sich immobilisierte Zellerkennungsmotive in Form von Peptiden besser als EZM-Proteine. Sie gewährleisten eine höhere Stabilität bzgl. Sterilisation, Hitzebehandlung, pH-Änderung sowie Lagerung. Die Charakterisierung solcher Peptide ist einfacher und kostengünstiger. Über die Präsentation eines Zellerkennungsmotivs an der Oberfläche kann selektiv ein bestimmter Zelltyp mit einem bestimmten Zelladhäsionsrezeptor gebunden werden. Dabei kann die Peptidpackungsdichte an der Oberfläche entsprechend dem jeweiligen Zelltyp eingestellt werden. Aufgrund der geringen Peptidgröße können nahezu homogene Oberflächen mit einer hohen Peptidpackungsdichte erzeugt werden. Zur Steigerung der Stabilität können sogenannte Cyclo-Peptide an Oberflächen gekoppelt werden, die aufgrund Ihrer Struktur eine noch längere Anwendung ermöglichen als lineare Peptide (Weiß *et al.*, 2001).

GRUNDLAGEN

Damit eine Zelle ein Zellerkennungsmotiv wie RGD als Ligand an seine Integrinrezeptoren binden und damit die Adhäsion steigern kann, mussten im Rahmen dieser Arbeit einige Faktoren für das Design eines linearen Peptids beachtet werden. Pierschbacher und Rouslathi, 1984 entdeckten, dass das alleinige RGD-Motiv für eine zellaffine und –spezifische Bindung nicht ausreichend ist, sondern eine Flankierung des RGD-Motivs mit anderen Aminosäuren nötig ist. Als geeignetes Zellerkennungsmotiv für Fibroblasten konnte aus der Literatur die Sequenz CGGRGDS identifiziert werden (Hersel *et al.*, 2003). Durch die im Cystein vorhandene SH-Gruppe konnte das Peptid an Gold direkt immobilisiert werden.

Eine effiziente Methode, Zelladhäsion zu minimieren bzw. zu verhindern wird durch die Oberflächenfunktionalisierung mit Polyethylenglykol (PEG) erreicht. Die protein – und zellrepellentem Eigenschaften von PEG richten sich nach dessen Molekulargewicht, der Polymerlänge und dem Polymerverzweigungsgrad. PEG ist in seiner Eigenschaft wasserlöslich, inert, nicht immunogen oder toxisch. In wässriger Lösung exponiert PEG die ungeladenen, hydrophilen Gruppen nach außen mit einer hohen Beweglichkeit. Durch das annähernde Protein wird diese Beweglichkeit deutlich reduziert. Das Protein erfährt dabei an der Polymerschicht eine osmotische Abstoßung sowie eine konformationsbedingte repulsive Kraft, um die Beweglichkeit der PEG-Ketten wiederherzustellen. Dadurch ist eine Proteinadsorption an PEG-Oberflächen stark reduziert, wodurch auch Zellen an ihrer Adhäsion gehindert werden können (Harris, 1992; Siegers *et al.*, 2004).

2.3.3 Zellverhalten auf mikrostrukturierten Oberflächen

In der heutigen Zellbiologie werden mikrostrukturierte Oberflächen häufig für die Untersuchung des zellulären Verhaltens an Oberflächen eingesetzt, da mikrostrukturierte Oberflächen den zellulären Gegebenheiten *in vivo* eher entsprechen als beschichtete Oberflächen (Xia und Whitesides, 1998). Mittels mikrostrukturierten Oberflächen erhält man eine zweidimensionale Information über zelluläres Verhalten. So beschrieb Mrksich *et al.*, 1997 das strukturierte Aufbringen von hydrophoben und hydrophilen Alkanthiolen auf Gold- und Silberoberflächen unter Anwendung des so genannten „microcontact-printing“-Verfahrens (μ CP). An

GRUNDLAGEN

diese Oberflächen wurde das EZM-Protein Fibronectin adsorbiert, welches ausschließlich auf den hydrophoben Alkanthiolbereichen gebunden hat, da die hydrophilen Bereiche proteinrepellierend waren. Dadurch konnte ein Kontrast zwischen zelladhäsiven und zellrepellierenden Bereichen erzeugt werden. Die auf diesem strukturierten Substrat kultivierten Zellen adhärten ausschließlich auf den Fibronectinbereichen und passten deren Zellkörper der unterschiedlichen Mikrostruktur an.

Neben Kontrolle der Zellgröße und Zellform zeigte Jungbauer *et al.*, 2004, dass über mikrostrukturierte Oberflächen genetisch modifizierte Zellen in ihre ursprüngliche Morphologie (wildtyp) zurückgeführt werden können.

Das μ CP-Verfahren stellt ein nicht-photolithographisches Verfahren dar, bei dem ein strukturiertes Elastomer (Stempel) mit einer Substanz benetzt wird und dessen Struktur als Negativ auf eine Oberfläche durch Andrücken des Stempels übertragen wird (Kumar und Whitesides, 1993). Die Strukturierung des Elastomer erfolgt über einen strukturierten Silizium-Wafer, welcher vorher lithographisch strukturiert wurde. Dieses Verfahren ist im Vergleich zu photolithografischen Verfahren einfach in der Durchführung, kostengünstig und kann auf unterschiedlichen Substraten (Glas, Silber, Silizium, Gold) durchgeführt werden. Als elastomeres Material kommt Polydimethylsiloxan (PDMS) zum Einsatz, welches sich durch Stabilität, optische Transparenz, Elastizität und hohe geometrische Genauigkeit bis in den sub- μ m-Bereich auszeichnet (Xia und Whitesides, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen strukturierte, thermoresponsive Oberflächen mittels μ CP hergestellt werden, um über die Oberflächenschaltbarkeit das zelluläre Adhäsions- und Migrationsverhalten zu kontrollieren.

2.4 Mikrofluidische Systeme für zelluläre Anwendungen

Mikrofluidische Systeme bieten in der heutigen biomedizinischen Forschung ein breites Anwendungsspektrum, um mit kleinen Reaktionsvolumina (10^{-9} bis 10^{-18} Liter) schnellere Analysezeiten sowie höhere Effizienz für parallelablaufende Reaktionen zu erzielen (Beebe *et al.*, 2002). Aufgrund der Miniaturisierung können ganze Laboratorien in einen Einzelchip „Lab on a chip“ integriert werden, wodurch eine

GRUNDLAGEN

kostengünstige Anwendung möglich wird (Figeys und Pinto, 2000). Typische Kanalgeometrien mikrofluidischer Systeme liegen in einem Größenbereich von 10 – 100 μm (Whitesides, 2006). Einen Einsatz finden diese Systeme als DNA-Chip für PCR-Reaktionen (Shoffner *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1996), als Kapillarelektrophorese-Chip zur Auftrennung von Proteinen und DNA (Duffy *et al.*, 1998), als Enzymchip für Enzymkinetikuntersuchungen (Moser *et al.*, 1997) sowie als Immunoassay-System für high-throughput screening (HTS) mittels Antikörper-Antigen-Detektion (Bernard *et al.*, 2001).

Die zelluläre Analyse in mikrofluidischen Systemen hat an großer Bedeutung gewonnen, da neben der Systemminiaturisierung auch eine geringere mechanische Belastung von Zellen aufgrund der laminaren Strömung in mikrofluidischen Systemen gegeben ist (Sia und Whitesides, 2003). Von besonderem Interesse sind mikrofluidische Zytometriesysteme, welche Partikelquantifizierungen bis zu 1 μm Durchmesser ermöglichen (Schrum *et al.*, 1999). Zell-basierte Biosensoren sind für toxikologische Fragestellungen relevant, bei denen prokaryotische und eukaryotische Zellen als Sensor für Toxindetektion sowie physiologische Analysen eingesetzt werden (Vo-Dinh *et al.*, 2001). Des Weiteren finden mikrofluidische Systeme häufigen Einsatz in der Kultivierung eukaryotischer Zellen. In solchen Systemen kann die Mikroumgebung von Zellen sowie die entsprechende Zellzahl eingestellt werden, wodurch die Untersuchung des individuellen Einzelzellverhaltens erleichtert wird (Inoue *et al.*, 2001). Li Jeon *et al.*, 2002 erzeugten in einem mikrofluidischen System stabile Cytokin-Gradienten, mit denen die gerichtete Migration von Neutrophilen induziert wurde. Neben der Miniaturisierung dieser Systeme ist ein großer Vorteil, dass kultivierte Zellen in der Mikroumgebung eine andere Wachstumscharakteristik zeigen als in der Makroumgebung (Zellkulturschale) und schon bei viel geringeren Zellzahlen proliferieren können (Raty *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2002).

Als Materialien für mikrofluidische Systeme werden in der heutigen Zeit Glas und Silizium eingesetzt. Diese stellen sich aber häufig als ungeeignet heraus, da die Herstellung von mikrofluidischen Systemen mit solchen Materialien für eine Laboranwendung aufwendig und teuer ist. Deshalb kommen nun seit mehreren Jahren polymere Materialien wie z.B. PMMA (Polymethylmethacrylat), PTFE (Polytetrafluorethylen) oder PDMS (Polydimethylsiloxan) zum Einsatz, die etliche Vorteile gegenüber Glas und Silizium für biologische Untersuchungen bieten

GRUNDLAGEN

(Ng *et al.*, 2002; Becker und Locascio, 2002). Besonders PDMS findet als polymeres Material häufigen Einsatz in mikrofluidischen Systemen. Es ist ein kostengünstiges Material, flexibel und optisch transparent (bis 230 nm), wodurch die Mikroskopie deutlich erleichtert wird. Zudem ist es gasdurchlässig, nicht toxisch für Zellen und wasserundurchlässig (Sia und Whitesides, 2003). PDMS setzt sich aus wiederholenden Einheiten von $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ zusammen. Die hydrophobe Eigenschaft von PDMS ist auf die CH_3 -Gruppen zurückzuführen. Diese Eigenschaft hat für protein- oder zellbasierende Untersuchungen den Vorteil, dass eine unspezifische Protein- und Zelladsorption an PDMS auf ein Minimum reduziert ist, wodurch eine mögliche Fehlerquelle bei vielen Untersuchungen vermieden werden kann.

Ein besonderer Vorteil von PDMS liegt in der einfachen Herstellung, welche unter Standardlaborbedingungen durchgeführt werden kann. Voraussetzung für die Abformung eines PDMS-Mikrokanals ist der Silizium-Master (Si-Master). Dieser wird über ein Standard-Photolithographie-Verfahren erzeugt, welches als kommerzielle Dienstleistung angeboten wird. Die gewünschte Mikrokanalstruktur wird über ein CAD-Programm (computer aided design) gezeichnet und auf ein Transparent gedruckt, welches als Photomaske auf einen mit Photolack beschichtetem Siliziumwafer aufgebracht wird. Mittels UV-Photolithographie wird dann die Mikrostruktur entwickelt und nicht ausgehärtete Komponenten entfernt. Der strukturierte Si-Master kann nun für vielfache Abformung eines PDMS-Mikrokanals verwendet werden. Dabei werden die flüssigen PDMS-Komponenten gemischt, auf den strukturierten Si-Master gegossen und über Nacht in einem Ofen auspolymerisiert. Die abgeformte, elastomere Mikrokanalstruktur zeichnet sich durch eine hohe geometrische Genauigkeit aus (Sia und Whitesides, 2003).

Für eine mikrofluidische Nutzung muss der PDMS-Kanal mit einem Substrat abgedeckt werden. Prinzipiell bieten sich hierfür zwei Möglichkeiten an. In dem hydrophoben Zustand kann das PDMS adhäsiv und reversibel an Substrate wie bspw. Goldoberflächen unter Ausnutzung der van-der-Waals-Kräfte gekoppelt werden. Durch Austausch des jeweiligen Substrats kann die PDMS-Kanalstruktur mehrmals verwendet werden. Für eine irreversible Kopplung des PDMS an ein Substrat muss das zweite Substrat ein Si-basiertes Material wie bspw. Glas sein und das PDMS oberflächenaktiviert werden. Die Oberflächenaktivierung wird üblicherweise in einem Sauerstoffplasma durchgeführt, wodurch es zu einer kurzzeitigen Hydrophilizitätszunahme aufgrund der Bildung von Silanolgruppen

GRUNDLAGEN

(Si-OH) an der PDMS-Oberfläche kommt. An das Si-basierte Material wird das oberflächenaktivierte PDMS kontaktiert und durch Ausbildung von O-Si-O-Gruppen irreversibel gekoppelt (Sia und Whitesides, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem mikrofluidischen PDMS-Systems MicCell™ (Gesim GmbH, Deutschland) gearbeitet, da es einige Vorteile gegenüber anderen mikrofluidischen Systemen bietet. Beispielsweise ermöglicht es ein individuelles Kanaldesign, beschichtbare und austauschbare Substrate, eine mehrmalige Verwendbarkeit des Mikrokanals und ist zudem für die hochauflösende Mikroskopie geeignet. Abbildung 2.7 soll den Aufbau eines solchen mikrofluidischen Systems veranschaulichen. Der experimentelle Aufbau dazu ist in dem Kapitel „Material und Methoden“ näher beschrieben.

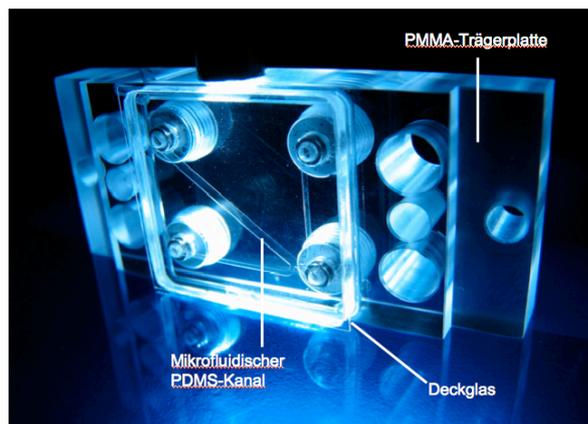


Abbildung 2.7: MicCell™-System (Gesim GmbH, Deutschland) als mikrofluidisches System. Auf einer PMMA-Trägerplatte ist das PDMS-Substrat mit der mikrofluidischen Kanalstruktur aufgebracht. Der mikrofluidische Kanal wird über ein 22 x 22 mm Deckglas abgedeckt. Das Deckglas ist austauschbar und kann beliebig durch andere Substrate ausgetauscht werden.

Diverse Anwendungen wie bspw. die mikrofluidische Integration eines optischen „Zellstretchers“ zur Zellcharakterisierung, Einzelmolekülanalyse mittels FCS (Fluoreszenz Korrelation Spektroskopie) sowie die Erzeugung von Konzentrationsgradienten verdeutlichen die vielfältigen Einsatzbereiche des MicCell™-Systems (Gast *et al.*, 2006).

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in DMEM/ HEPES ohne Pyruvat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/ Streptomycin (alles Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert. Die 80-90%ige konfluente Zellschicht wurde alle zwei Tage umgesetzt. Dazu wurden die Zellen zweimal mittels PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und anschließend mittels Trypsin / EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 25°C passagiert. Hierbei variierten die Trypsinierungsbedingungen entsprechend der Substrathaftungsstärke der jeweiligen Zelllinien (Tabelle 3.1). Für die Einzelzelleexperimente wurden die Zellen auf 22x22 mm Goldsubstraten soweit nicht anders angegeben in einer Konzentration von 2x10⁴ Zellen/cm² ausgesät. Alle Zelllinien wurden ausschließlich von Passage 1 – 30 für Versuche kultiviert, um eine mögliche, signifikante Änderung im Adhäsionsverhalten bei älteren Passagen zu verhindern.

Tabelle 3.1: Verwendete Zelllinien mit deren charakteristischen Trypsinierungsbedingungen.

Zelllinie	Registrierungsnr.	Zelltyp	Trypsinierungszeit [min.] bei RT	Trypsin / EDTA
L929	DSMZ, ACC 2	Mausfibroblast	4	0,05% / 0,02% w/v
3T3	DSMZ, ACC 173	Mausfibroblast	6	0,05% / 0,02% w/v
MG63	ATCC, CRL-1427	Humanes Osteosarkom	12	0,05% / 0,02% w/v

3.2 Zellfixierung und Färbung mit Fluoreszenzstoffen

Durch die Fixierung werden die intrazellulären Proteine immobilisiert und somit die Proteinanordnung erhalten. Für die Fixierung der Zellen in dem Kulturgefäß wurden die Zellen in ein Eisbad gestellt, das Medium entfernt und die Zellen jeweils zweimal 5 Minuten mit 4 °C kaltem PBS (Ca²⁺/ Mg²⁺) (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen. Ausgehend von einer 8 %-igen Paraformaldehyd-Stammlösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in PBS (Ca²⁺/ Mg²⁺) wurde mit 2 ml einer vorgekühlten 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung 20 Minuten auf Eis fixiert.

MATERIAL UND METHODEN

Anschließend wurden die Zellen jeweils zweimal 5 Minuten mit 4 °C kaltem PBS auf Eis gewaschen, um vorhandenes Paraformaldehyd zu entfernen.

Bei Concanavalin A (ConA) handelt es sich um ein Lektin aus der Schwertbohne mit 104 kDa, welches in neutralen und alkalischen Lösungen vier Bindungsstellen für Saccharide besitzt. ConA kann an die äußere Zellmembran (Glykokalix) sowie an extrazelluläre Matrixkomponenten (Fibronektin, Kollagen, etc.) binden, welche Kohlenhydratanteile beinhalten (Derewenda *et al.*, 1989). Als fluorophore Gruppe besitzt das verwendete ConA eine Alexa Fluor 594 Markierung. Dieser Farbstoff adsorbiert bei 590 nm maximal, wobei die maximale Emission im roten Bereich bei 617 nm liegt. Die entsprechende Probe wurde mit einer Arbeitskonzentration von 15 µg / ml für 30 Minuten bei 4 °C angefärbt. Danach wurde die Färbelösung entfernt und zweimal mit PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+}) gewaschen.

3.3 Oberflächenpräparation und Oberflächenanalytik

3.3.1 Oberflächenpräparation

3.3.1.1 Reinigung von Glas- und PDMS-Oberflächen

Für die Reinigung der Glas- und PDMS-Oberflächen wurden für die jeweilige Waschlösung separate Glasgefäße gereinigt. Die Reinigung dieser Gefäße und Oberflächen wurde wie folgt durchgeführt: In einer 2 %-igen Hellmanex[®] II-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland) wurden entsprechende Gegenstände für 20 Minuten in einem Ultraschallbad gereinigt. Danach erfolgte eine 20x Waschung der Gegenstände mit dH₂O (Millipore, Deutschland), um Hellmanex[®]-Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die gereinigten Gegenstände in dH₂O für weitere 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Es folgte eine weitere 20x Waschung der Gegenstände in dH₂O. Abschließend wurden die Gegenstände in 100 % EtOH (LiChrosolv[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und für den weiteren Gebrauch in N₂ getrocknet.

3.3.1.2 Reinigung von Goldoberflächen

Die hier verwendeten Goldoberflächen wurden von der Firma GeSiM (Dresden, Deutschland) bezogen. Auf ein 22 x 22 x 0,17 mm Dünnglas wurde 20 nm Titan als Haftvermittler für die 80 nm Goldschicht aufgebracht. Um eine hohe makroskopische Sauberkeit der Goldoberfläche zu gewährleisten, wurden diese vor jeder Adsorption in N₂ von Staubpartikeln befreit und anschließend in ein gereinigtes Becherglas mit 10 ml Piranha-Lösung überführt. Das Becherglas wurde in einem Eisbad positioniert, um mögliche Wärmeentwicklung während des Ansetzens der Piranha-Lösung zu puffern. Die Piranha-Lösung setzt sich aus einem Teil H₂O₂ (pro analysis 30 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) und zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure (95-98 %) zusammen. Die Reinigung der Goldoberflächen in Piranha erfolgte für 30 Minuten bei RT. Piranha wurde nach der täglichen Verwendung mit NaOH (Sigma-Aldrich, Deutschland) neutralisiert. Für die Neutralisierung von 10 ml Piranha wurden ca. 10 g NaOH (fest) durch langsame Zugabe eingesetzt. Hierbei war auf zu rasche Gasentwicklung und Aufschäumen der Lösung zu achten. Die gereinigten Goldoberflächen wurden von der Piranha-Lösung zügig in ein Becherglas mit dH₂O. Zur Entfernung der Piranha-Rückstände von der Goldoberfläche wurde diese 10x mit dH₂O gespült. Für den weiteren Gebrauch der gereinigten Goldoberflächen wurde darauf geachtet, diese immer in Lösung zu lagern, um ungewollte Adsorbate aus der Luft zu vermeiden.

3.3.1.3 Mikrostrukturierung von Oberflächen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Mikrostrukturierung von Oberflächen basiert auf dem sogenannten „microcontact printing“ (μCP) nach Xia und Whitesides, 1998.

PDMS-Abformung

Die zur Mikrostrukturierung benötigten strukturierten PDMS-Stempel wurden nach folgendem Protokoll abgeformt (Abbildung 3.1 A):

PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, Michigan, USA) wurde entsprechend der Herstellerangaben im Verhältnis 10:1 gemischt und 2 g pro Stempel angesetzt. Hierbei wurde auf eine intensive Durchmischung beider Komponenten für eine spätere optimale Polymerisation geachtet. Aufgrund der bei der Durchmischung auftretenden

MATERIAL UND METHODEN

Luftblasen im flüssigen PDMS, wurde dieses in einen Exicator überführt und die Luftblasen über ein Vakuum für 40 Minuten entfernt.

Der strukturierte Master (Gesim GmbH, Deutschland) wurde in die aus Messing gefertigte Abgußform gelegt und das luftblasenfreie PDMS in die Abgußform überführt. Zur einfachen Handhabung des PDMS-Stempels wurde von einem Objektträger (Roth, Deutschland) ein Glasstück in der Größe 30 x 30 mm zugeschnitten und im O₂-Plasma bei Stufe „High“ für 2 Minuten (Harrick Plasma Cleaner, PDC-002, Laseranalytik Starus GmbH, Pfungstadt, Germany) aktiviert, um die Adhäsion zwischen PDMS und Glasoberfläche zu erhöhen. Anschließend wurde das Glas oben auf die Abgußform aufgelegt, so dass das Glas Kontakt mit der Rückseite dem flüssigen PDMS hat. Die Abgussform (Gesim GmbH Deutschland) mit Si-Master, PDMS und Objektträger wurde bei 60°C über Nacht im Trockenschrank auspolymerisiert. Nach der Polymerisation wurde der PDMS-Stempel vorsichtig aus der Form gelöst. Der abgeformte Stempel in 100 % EtOH gelagert und vor jeder Benutzung entsprechend gereinigt (siehe Kapitel 3.3.1.1).

Strukturierung von Glasoberflächen

Der gereinigte Stempel wurde mittels O₂-Plasma oberflächenaktiviert, um die Hydrophilizität des hydrophoben PDMS für die Benetzung von Proteinen in wässriger Lösung zu steigern (Abbildung 3.1 A). Hierbei greift das O₂-Plasma die Si-C-Bindungen im PDMS an, die Methylgruppen trennen sich und erhöhen so den Anteil von Sauerstoffgruppen an der PDMS-Oberfläche. Die erzeugte Hydrophilizität nimmt u.a. aufgrund der Diffusion der polarisierten Gruppen in die Hauptmasse des Polymers (Morra *et al.*, 1990) über die Zeit ab.

MATERIAL UND METHODEN

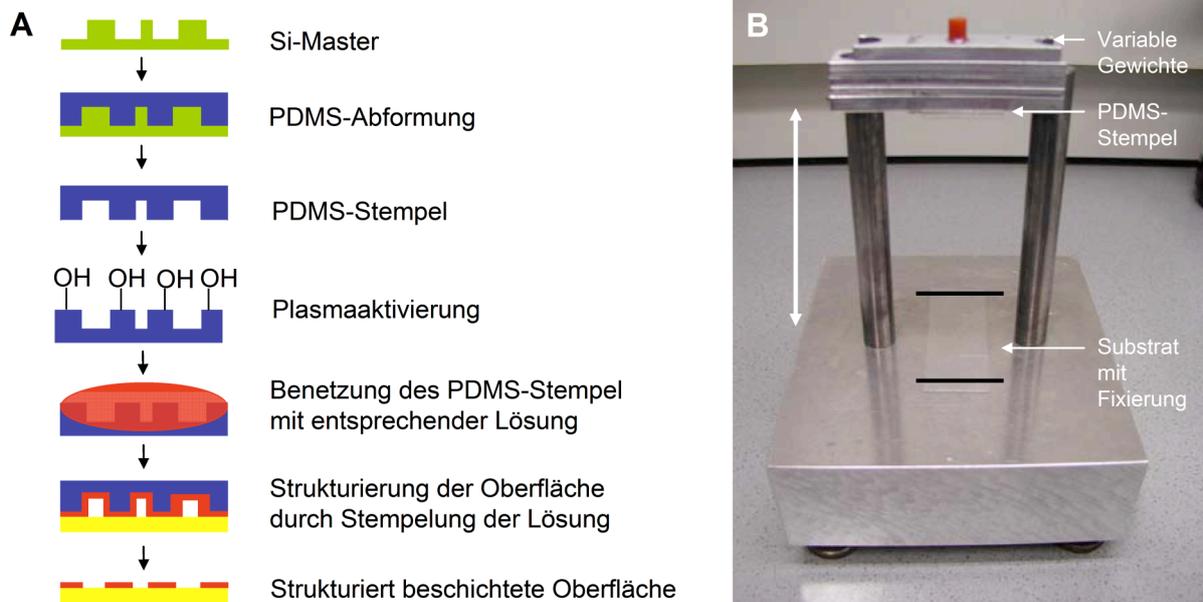


Abbildung 3.1: Prinzip der Mikrostrukturierung von Oberflächen mittels Stempelvorrichtung. (A) Ablauf der Strukturierung von Oberflächen: Auf den mikrostrukturierten Si-Master wird flüssiges PDMS auspolymerisiert. Der mikrostrukturierte PDMS-Stempel wird mittels O_2 -Plasma hydrophilisiert, um eine gleichmäßige Benetzung der zu stempelnden Substanz zu ermöglichen. Die Substanz wird nach erfolgter Benetzung abgenommen und der Stempel in N_2 getrocknet. Danach wird auf die entsprechende Oberfläche die jeweilige Substanz mittels einer Stempelvorrichtung gestempelt. (B) Prinzip der Stempelvorrichtung: An variable Gewichtsplatten wird über ein doppelseitiges Klebeband der Glas/PDMS-Stempel befestigt. Der PDMS-Stempel wird dann über zwei parallele Stege in Kontakt mit dem Substrat gebracht, wodurch ein Verrutschen des Stempels auf dem Substrat verhindert wird. Ein mögliches Verrutschen des Substrates konnte durch Klebebandfixierung der Substratenden mit dem Aluminiumblock vermieden werden.

Der oberflächenaktivierte Stempel wurde dann mit 200 μ l entsprechender Substanzen (Tabelle 3.2) benetzt und für 30 Minuten in einer Feuchtigkeitsbox inkubiert, um ein Austrocknen des PDMS-Substrats zu vermeiden.

Tabelle 3.2: Verwendete Substanzen für die Strukturierung von Glasoberflächen.

Substanz	Arbeitskonzentration	Hersteller	Katalogno.
BSA-Biotin	40 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Deutschland	A8549
Streptavidin, Alexa Fluor® 488	10 μ g/ml	Invitrogen, Deutschland	S11223
Streptavidin	50 μ g/ml	Invitrogen, Deutschland	S888

MATERIAL UND METHODEN

Anschließend wurde die Stempel-Lösung wieder abgenommen, die Stempel mit N₂ getrocknet und umgehend auf gereinigte Glasoberflächen mittels einer konstruierten Stempelvorrichtung (Abbildung 3.1 B) für 30 Minuten aufgebracht. Die überstehenden Enden des Glassubstrates wurden mittels Klebeband auf dem Aluminiumblock der Stempelvorrichtung fixiert, um ein Verrutschen während des Stempelprozesses zu vermeiden. Die Stempelvorrichtung wurde hinsichtlich eines geeigneten Anpressdruck durch Variation der austauschbaren Aluminiumgewichte optimiert, um einen möglichst homogenen Übertrag von dem PDMS-Stempel auf das Substrat zu erreichen.

Die Berechnung des Anpressdrucks erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Anpressdruck} = (\text{eingesetztes Gewicht} * 9,81 \text{ m/s}^2) / \text{Stempelfläche} \quad (3)$$

In dieser Berechnung wurde das Stempelleigengewicht sowie die geringe Kraft beim Aufsetzen des Stempels auf das Substrat vernachlässigt.

Als Kontrolle für den jeweiligen Anpressdruck diente das mikroskopische Fluoreszenzbild der Stempelstruktur, in welchen ungewollte Stempelstrukturen erkannt werden konnten. Abschließend wurde der Stempel von der Goldoberfläche vorsichtig nach oben hin entfernt, um ein weiteres Verrutschen der gestempelten Struktur auf dem Substrat zu vermeiden.

Strukturierung von Goldoberflächen

Die Strukturierung von Goldoberflächen wurde nach selbigem Protokoll durchgeführt wie die Strukturierung von Glasoberflächen. Es wurde darauf geachtet, dass die gereinigte bzw. funktionalisierte Goldoberfläche erst kurz vor der Stempelung aus dem Wassergefäß entnommen und getrocknet wurde, um eine zu lange Exposition an Luft mit daraus resultierender Oberflächenverschmutzung zu vermeiden. Die Stempelverweildauer auf der Oberfläche betrug ebenfalls 30 Minuten. Für einen möglichst sauberen Stempelübertrag wurde der Stempel wie schon erwähnt vorsichtig von der Goldoberfläche entfernt.

3.3.1.4 Chemisorption von Thiolen auf Goldoberflächen

Die gereinigte Goldoberfläche (siehe Kapitel 3.3.1.2) wurde aus dH₂O entnommen und unmittelbar in die jeweilige Thiollösung (Tabelle 3.3) überführt. Hierbei wurden ausschließlich Glasgefäße verwendet, um die Adsorption von Weichmacheranteilen aus Plastikgefäßen an der Goldoberfläche zu vermeiden, welche die spezifische Thioladsorption verhindern können.

Für die Coadsorption (P19/PG, P19/RGD) wurden die Thiole separat eingewogen und gelöst. Anschließend wurden die jeweiligen Thiollösungen zusammengeführt und die gereinigte Goldoberfläche in die Thiollösung überführt. Die Adsorptionszeit betrug soweit nicht anders angegeben 3h bei RT ohne Schütteln. Während der Adsorption wurde der jeweilige Adsorptionsansatz in einer Box mit Tüchern gelagert, welche mit dem reinen Lösungsmittel des gelösten Thiols benetzt wurden, um ein Austrocknen der Thiollösung zu vermeiden. Bis auf das Peptid CGGRGDS wurden alle verwendeten Polymere (Tabelle 1.3) in 100% EtOH gelöst. Das Peptid wurde in 2 : 1 dH₂O : EtOH gelöst, da dieses Mischungsverhältnis die optimale Löslichkeit des Peptids gewährleistete.

Tabelle 3.3: Verwendete Thiole und deren optimierte Arbeitskonzentration für die Funktionalisierung von Goldoberflächen.

Bezeichnung	Polymer	MW [g/mol]	Arbeitskonzentration [mg/ml]	Thiolkonzentration [mM]	Bezugsquelle
P15	PNIPAAm-PEG15%-SH	11000	0,1	0,0014	Fraunhofer IAP, Dr.A.Lieske
P19	PNIPAAm-PEG19%-SH	11000	1,0	0,021	Fraunhofer IAP, Dr.A.Lieske
PG	CH ₃ O-PEG-SH	750	4,0	5,0	Rapp Polymere, Deutschland
RGD	CGGRGDS	650	0,65	1,0	MPI, Dr.H.Börner
P19/PG	PNIPAAm-PEG19%-SH : CH ₃ O-PEG-SH	11000 : 750	9 : 1	1 : 6	siehe oben
P19/RGD	PNIPAAm-PEG19%-SH : CGGRGDS	11000 : 650	9 : 1	1 : 8	siehe oben

Nach der dreistündigen Adsorption wurde die Thiollösung entfernt und die Oberfläche mit dem eingesetzten Lösungsmittel dreimal gewaschen. Abschließend wurde das Lösungsmittel für eine 1h auf der Oberfläche belassen, um unspezifische Molekülbindungen zu entfernen. Für den weiteren Gebrauch wurde die funktionalisierte Goldoberfläche aus der jeweiligen Lösung entnommen und mittels N₂ getrocknet.

3.3.2 Kontaktwinkelmessung

Der dynamische Kontaktwinkel wurde mittels des Kontaktwinkelmessgeräts G10 der Firma Krüss (Krüss Surface Science, Deutschland) auf einem unbehandelten Goldsubstrat, auf einem gereinigten Goldsubstrat sowie auf beschichtetem Goldsubstrat in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 45 °C ermittelt. Die Temperatur am Substrat wurde über eine Mikroskopheizplatte MS 100 der Firma Linkam (Linkam Scientific Instruments, Großbritannien) eingestellt. Zur Vermeidung der Substratverunreinigung aufgrund von Luftzirkulation wurde ein Kunststoffgestell aus Makrolon (Bayer Material Science AG, Deutschland) an dem Probenstisch aufgestellt. Die Messung des dynamischen Kontaktwinkels erfolgte wie folgt:

Bei der Kontaktwinkelmessung des Vorzugswinkels wurde mittels einer Mikroliterspritze ein Tropfen von dH₂O auf das entsprechende Substrat aufgebracht. Dabei verbleibt die Kanüle der Mikroliterspritze im Tropfen. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Kanüle immer in der Mitte des Tropfens befindet, da bei ungleichmäßiger Tropfenausbreitung die Messwerte nicht repräsentativ sind. Durch Erhöhung des Tropfenvolumens breitet sich der Tropfen auf der Oberfläche aus. Während seiner fortschreitenden Bewegung wurde der Vorzugswinkel bestimmt, welcher über ein Okular am Mikroskop betrachtet wurde. In dem Okular befindet sich ein bewegliches Fadenkreuz mit einstellbarem Winkel. Ein Schenkel des Fadenkreuzes wurde mit der Grenzfläche Substrat/Tropfen zur Deckung gebracht, der andere Schenkel wurde als Tangente an das Tropfenprofil angelegt. Der Winkel zwischen den beiden Schenkeln wurde als Vorzugswinkel abgelesen.

Auf jedem Substrat wurden fünf Messungen an unterschiedlichen Stellen gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) eingeführt, welcher Auskunft über die Reproduzierbarkeit der Messungen gibt. Dieser wurde für jede Probe berechnet und ist definiert als:

$$SEM = s / (n)^{1/2} \quad (4)$$

wobei s die Standardabweichung angibt, n definiert den Stichprobenumfang.

3.4. Mikrofluidik

In dieser Arbeit wurde mit dem mikrofluidischen System „MicCell™“ (GeSiM GmbH, Deutschland) kontrollierte Einzelzellablösungsversuche auf schaltbaren Oberflächen durchgeführt. Dieses System zeichnet sich durch die austauschbaren Substrate aus, welche in das mikrofluidische System der Anforderung entsprechend integriert werden können.

3.4.1 PDMS-Abformung

Der mikrofluidische Kanal wird bei diesem System über PDMS-Abformung erzeugt. Hierbei wurde das PDMS wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben angesetzt. Der strukturierte Si-Master des Längskanals wurde in eine Teflonabgussstation (GeSiM GmbH, Deutschland) eingelegt, welche mit der PMMA-Kanalträgerplatte über zwei Halteschrauben fixiert wurde. Zudem wurden alle vier Zugänge in der PMMA-Platte separat verschraubt, um ein Verstopfen des PDMS in den benötigten Zugängen zu vermeiden. Das blasenfreie PDMS (2ml) wurde in eine Spritze mit spezieller Injektionskanüle überführt, welche in eine separate Öffnung in der PMMA-Platte eingeführt und das PDMS zwischen PMMA und Si-Master injiziert wurde. Dabei wurde auf einen gleichmäßigen Druck an der Injektionsspritze geachtet, um eine eventuelle Luftblasenbildung zu vermeiden, welche zu einer verminderten Adhäsion zwischen PDMS und Substrat führen kann. Das PDMS wurde in dieser Vorrichtung bei 60°C über Nacht auspolymerisiert und am nächsten Tag für weitere 2 Stunden bei 80°C inkubiert, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Abschließend wurden die vier Schrauben der Zugänge sowie die zwei Halteschrauben von der PMMA-Platte entfernt und die PMMA-Platte mit dem PDMS-Längskanale aus der Vorrichtung vorsichtig entnommen.

3.4.2 Zusammenbau des mikrofluidischen Systems

Die funktionalisierte Goldoberfläche wurde durch vorsichtigen manuellen Druck direkt mit dem PDMS-Längskanal kontaktiert (Abbildung 3.2 A). Der Ein- und Ausgang des Kanals wurde über Schrauben verschlossen, in welche die PTFE-Schläuche mit entsprechenden Dichtungen (Upchurch Scientific, USA) eingebracht wurden. Der Kanalausgang wurde über einen Schlauch, Schrauben und Dichtungen mit einem Abfallbehälter verbunden, um überschüssiges Kanalvolumen zu sammeln (Abbildung

3.2 B). Der Schlauch am Kanaleingang verläuft zu einem manuell-justierbaren Ventil, welches über entsprechende Schraube und Dichtung abgedichtet ist. Von diesem Ventil läuft eine weitere Verbindung zu einem Abfallbehälter. Diese Verbindung dient dazu, das mikrofluidische System frei von Luftblasen zu bekommen. Eine dritte Verbindung verläuft von dem Ventil zu der Injektionspritze (ILS GmbH, Stützerbach) mit der jeweiligen Flüssigkeit. Die Kontrolle der Flußgeschwindigkeit in dem mikrofluidischen System wurde über eine Spritzenpumpe SP 230WZ (World Precision Instruments, Deutschland) realisiert.

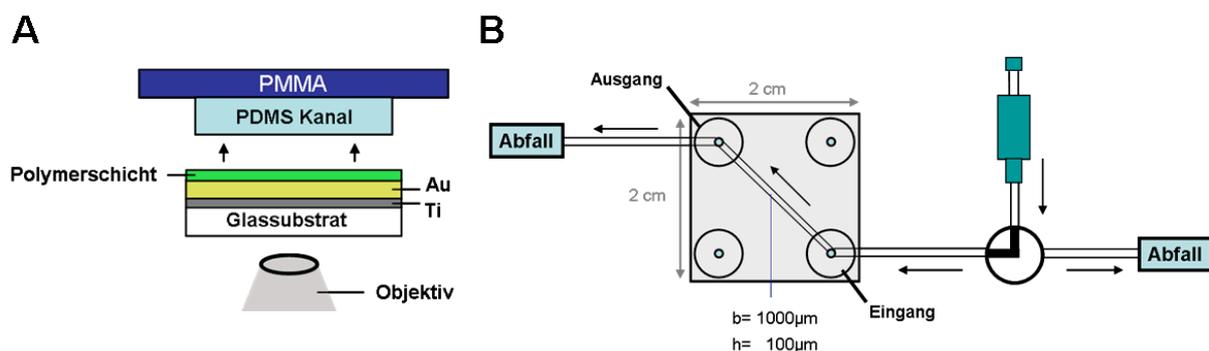


Abbildung 3.2: Aufbau und Funktionsprinzip des mikrofluidischen Systems MicCell™. (A) Die funktionalisierte Goldoberfläche wird in Kontakt mit dem PDMS-Kanal gebracht. Die Fixierung des Kanals auf dem Substrat erfolgt über die Adhäsionskraft des PDMS. Dieses System wird dann in einer Vorrichtung verschraubt, welche ein planares Aufliegen des mikrofluidischen Systems auf dem Mikroskopisch ermöglicht. (B) Das blasenfreie Befüllen des mikrofluidischen Längskanals erfolgt über ein Ventil, welches die Zellsuspension in PTFE-Schläuchen zu dem Abfallbehälter umleitet. In einem zweiten Schritt wird die Zellsuspension über das Ventil in den Längskanal eingeleitet. Überschüssiges Suspensionsvolumen wird dann von dem Kanalausgang in einen Abfallbehälter gesammelt.

3.4.3 Zellkultivierung und Zellablösung im mikrofluidischen System

Im mikrofluidischen System wurden für die Einzelzellablösungsexperimente auf den schaltbaren Oberflächen L929 Mausfibroblasten als Modellsystem kultiviert. Abweichend von der Medienzusammensetzung aus Tabelle 3.1 wurden diese Zellen in RPMI 1640-Medium mit 25 mM HEPES, 10% FCS, 3.6 mM L-Glutamin und 1% Gentamycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Hierbei betrug die Zellkonzentration 5×10^5 Zellen/cm², da diese eine passende Zelldichte gewährleistete. Die Passagierung der Zellen wurde wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt.

Die Zellen wurden für 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in dem mikrofluidischen Kanal kultiviert. Für die Einzelzellablösungsexperimente wurde die Zellablösung über die Temperaturreduktion auf 25°C für 30 Minuten induziert. Anschließend wurden die abgerundeten Zellen unter definierten Flußgeschwindigkeiten aus dem Kanal entfernt. Als Kontrollexperiment wurden kultivierte Zellen in dem mikrofluidischen System mittels einer Mikroskoptischheizplatte Linkam MS100 (Linkam Scientific Instruments, UK) auf 37°C gehalten, um die Funktionalität der schaltbaren Oberfläche zu testen. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben.

3.4.4 Berechnung der Zellumströmungsgeschwindigkeit im rechteckigen mikrofluidischen Kanal

Alle Berechnungen der Zellumströmungsgeschwindigkeit wurden über das Programm Mathematica 5.2 (Wolfram Research, Europa) durchgeführt. Für die Berechnung wurden Parameter wie Kanalgeometrie, Zellmorphologie sowie Zellgröße miteinbezogen. Die aus dem Ablöseversuch resultierenden Zellmorphologien (ausgebreitet und abgerundet) wurden mittels geometrischen Objekten für die Berechnung modelliert (Abbildung 3.3).

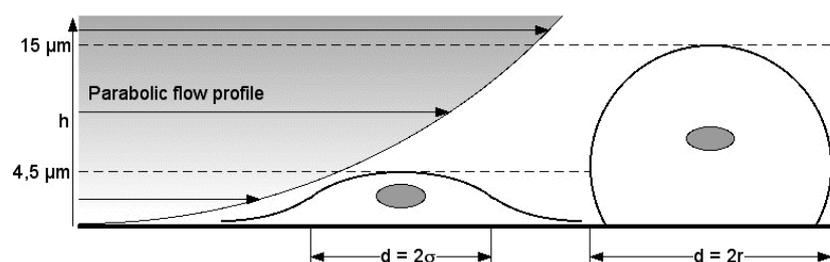


Abbildung 3.3: Flussprofil in einem mikrofluidischen Kanal im Bezug auf unterschiedliche Zellmorphologien. Für die Berechnung der Zellumströmungsgeschwindigkeit in dem mikrofluidischen Kanal wurden zwei Zellmorphologien (ausgebreitet, rund) mathematisch angenähert, welche aus den Experimenten resultierten. Die geometrischen Parameter (Zellhöhe, Zellbreite) wurden über 3D-Aufnahmen im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop abgeleitet.

Dabei wurde die Morphologie der ausgebreiteten Zellen über eine Gaußsche Querschnittsfläche (Höhe $h = 4,5 \mu\text{m}$, Breite $2r = 2\sigma = 35 \mu\text{m}$) als rotationssymmetrisch angenommen. Dagegen wurden runde Zellen über ein

MATERIAL UND METHODEN

sphärisches Modell mit $h = 15 \mu\text{m}$, $2r = 20 \mu\text{m}$ abzüglich einer Segmenthöhe von $r/2$ betrachtet. Die geometrischen Parameter wurden aus Aufnahmen mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop über einen 3D Stack in z-Richtung abgeleitet. Zuerst wurde für die Berechnung der Zellumströmungsgeschwindigkeit u_{Zelle} die mittlere Fließgeschwindigkeit \bar{u} berechnet, welche über

$$\bar{u} = \dot{V} / A \quad (5)$$

definiert ist (Spurk, 2003). \dot{V} steht für die angelegte Flußrate über die Spritzenpumpe und A bezeichnet die Querschnittsfläche des rechteckigen mikrofluidischen Kanals. Darüber hinaus wurde in die Berechnung von u_{Zelle} ein Formfaktor a miteinbezogen, welcher die lokale Fließgeschwindigkeit in x und y Richtung auf \bar{u} bezieht.

$$a = \frac{\int_{-r}^{h+r} \int u(x, y) dx dy}{2rh * \bar{u}} \quad (6)$$

wobei h für die Zellhöhe und r für den Zellradius steht.

Abschließend wurde u_{Zelle} aus den bisher berechneten Faktoren wie folgt berechnet:

$$U_{\text{Zelle}} = a * \bar{u} \quad (7)$$

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Durchlichtmikroskopie und Auswertung

Die Zellablösung auf den Polymeroberflächen wurde durch Temperaturschaltung von 37°C auf 25°C für 30 Minuten induziert und mittels Lichtmikroskop Leica DMIL (Leica, Deutschland) über ein $10\times/0,25$ Objektiv im Phasenkontrastmodus beobachtet. Die Dokumentation des Zellverhaltens über die Zeit erfolgte mittels Kamera Nikon Digital Sight DS-L1 (Nikon, Deutschland), welche an das Lichtmikroskop angeschlossen war. Die dokumentierten Bilder wurden mittels Grauabgleich nachbearbeitet und der Kontrast für eine optimale Auswertung angepasst. Die Zahl adhärenter und abgerundeter Zellen wurde manuell ausgezählt, wobei Zellen mit uneindeutiger Morphologie und abgerundete Zellen bei 37°C nicht berücksichtigt wurden. Als abgerundete Zellen bei 25°C wurden ausschließlich Zellen mit einem Durchmesser bis zu $20 \mu\text{m}$ identifiziert und gezählt. Zellen, die oberhalb dieses Größenbereichs lagen wurden als ausgebreitet betrachtet und gezählt.

3.5.2 Konfokale Laserscanning- Mikroskopie (CLSM)

Die fluoreszenzmarkierten Zellen auf dem angefärbten Substrat wurden mittels des Konfokalen Laser Scanning Mikroskops LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert. Da die CLSM inzwischen zu den Standardtechniken gehört, wird die Funktionsweise nicht näher beschrieben.

Als Objektiv wurde das 10x/ 0,3 Objektiv sowie das 40x/1,3 Öl DIC eingesetzt und der Scanzoom nach Bedarf variiert. Die spezifische Anregung von 488 nm für Streptavidin Alexa Fluor 488 sowie für die fluoreszenten Biotin-Beads erfolgte über den Argonlaser (488 nm). Als Hauptfarbteiler (HFT) wurde 488 mit dem NebenfARBteiler (NFT) 490 eingesetzt.

Die spezifische Anregung von ConA erfolgte mittels eines Helium-Neon-Lasers bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm. Dabei wurde der Hauptfarbteiler HFT 405 / 488 / 543 mit dem NFT 545 verwendet. Die Pixelverweilzeit betrug 12 μ s. Die Zellen wurden übersteuert aufgenommen, um das strukturiert aufgebraachte Fibronectin sowie die Migrationsrichtung der Zellen in Form von Zellspuren deutlich darstellen zu können. Darüber hinaus wurden Aufnahmen im Reflexionsmodus mittels des Argonlasers bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm durchgeführt, um eine höhere strukturelle Auflösung der Zellmorphologie im Bezug auf das Adhäsionsverhalten zu erhalten. Dabei wurde der Hauptfarbteiler HFT 488 mit dem NebenfARBteiler NFT 490 verwendet.

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von temperaturschaltbaren Polymeroberflächen zur Kontrolle der Zell-Substrat-Adhäsion. Dazu wurden PNIPAAm-basierte Copolymere mit Thioolfunktionalisierung an Goldoberflächen gebunden. Die entwickelten Polymeroberflächen erwiesen sich als zellverträglich und ermöglichten eine kontrollierte Ablösung adhärenter, lebender Zellen durch milde Temperaturänderung. Modifikationen an diesen schaltbaren Oberflächen ermöglichten eine Anpassung an das stark unterschiedliche Adhäsionsverhalten verschiedener Zellarten. Die Anwendbarkeit der schaltbaren Polymeroberflächen konnte sowohl in mikrofluidischen Systemen als auch auf mikrostrukturierten Oberflächen gezeigt werden.

4.1 Funktion und Zellverträglichkeit von P15-Au

LCST-Bestimmung von PNIPAAm-PEG15%-COOH

Die LCST (lower critical solution temperature) gibt die Temperatur an, bei der ein Polymer von einem hydratisierten Zustand ($<LCST$, geringe Partikelgröße) in einen dehydratisierten Zustand ($>LCST$, große Partikelgröße) wechselt. Während der Synthese von PNIPAAm-PEG15%-SH (P15) entstand die Polymervorstufe PNIPAAm-PEG15%-COOH, die sich lediglich durch die Endgruppe von P15 unterscheidet. Da man davon ausgehen konnte, dass die Endgruppe keinen Einfluss auf die LCST des jeweiligen Polymers hat, konnte über die Vorstufe die LCST von P15 bestimmt werden, ohne einen Einfluss der chemisch labilen SH-Gruppe auf die Messung befürchten zu müssen. Abbildung 4.1 zeigt die Daten der LCST-Bestimmung für PNIPAAm-PEG15%-COOH. Die LCST lag zwischen 35 und 36 °C, was sich anhand der signifikanten Partikelvergrößerung von PNIPAAm-PEG15%-COOH in Lösung bei Temperaturänderung von 35 °C auf 36 °C erkennen lässt. Diese Messungen sowie die Synthese wurde von unserem Projektpartner Fraunhofer IAP, Potsdam (Dr. A.Lieske) durchgeführt.

ERGEBNISSE

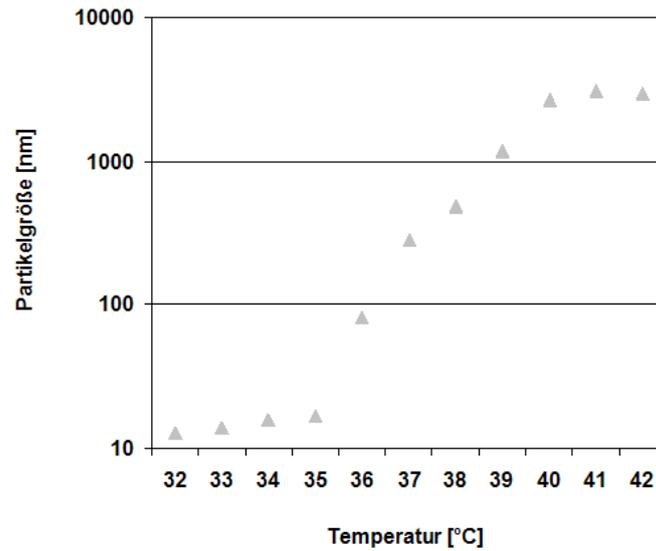


Abbildung 4.1: Ermittlung der charakteristischen LCST (lower critical solution temperature) des PNIPAAm-PEG15%-COOH Copolymers. PNIPAAm-PEG(15%)-COOH (\blacktriangle) zeigt eine LCST zwischen 35°C und 36°C.

Kontaktwinkelmessung auf P15-Au

P15 wurde adsorptiv an eine Goldfläche angebunden (siehe Kapitel 3.3.1.4), woraus die schaltbare Polymeroberfläche P15-Au entstand. Ihre Schaltbarkeit wurde zunächst über Kontaktwinkelmessungen charakterisiert (Abbildung 4.2). Die Daten dieser Messung zeigten eine Kontaktwinkeländerung mit der Temperatur von 54° bei 20 °C bis 65° bei 45 °C. Die Änderung der Benetzungseigenschaften von P15-Au entspricht dem Übergang von einem hydratisierten Zustand unterhalb der LCST bei 20 °C hin zu einem dehydratisierten Zustand oberhalb der LCST bei 45 °C (vgl. Abbildung 4.1). Auf unbehandelter Goldoberfläche blieb der Kontaktwinkel bei Temperaturänderung nahezu konstant bei ca. 70°.

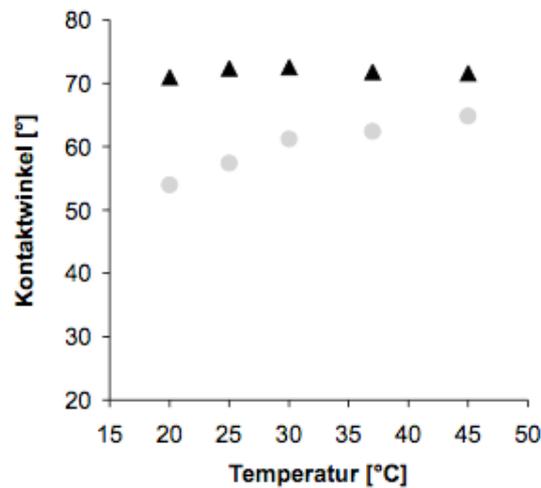


Abbildung 4.2: Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P15-Au (●) und gereinigtem Gold (▲) als Funktion der Temperatur. Die Änderung des Kontaktwinkels bei P15-Au über die Temperatur basiert auf dem Wechsel von einem hydratisierten Zustand bei 20 °C zu einem dehydratisierten Zustand bei 37 °C. Eine gereinigte, nicht beschichtete Goldoberfläche zeigt keine Änderung der Benetzungseigenschaften bei Temperaturänderung. Die Daten geben einen Mittelwert von jeweils fünf Messungen an. Die Standardabweichungen des Mittelwerts wurden nicht grafisch dargestellt, da sie nie die Symbolgröße überschritten. Rohdaten: siehe Tabelle A1 im Anhang.

Zellkultivierung und Zellablösung auf P15-Au

Zur Charakterisierung der Zellverträglichkeit sowie der Schaltbarkeit (Schaltverhalten) der Polymeroberfläche wurden darauf L929 Mausfibroblasten kultiviert (Abbildung 4.3). Das Schaltverhalten der Polymeroberfläche wurde mit dem damit verbundenen Zellverhalten korreliert.

Die Zellen zeigten auf P15-Au nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen bei 37 °C ein Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten vergleichbar zu kommerziell erhältlichen Polystyren-Zellkultursubstraten (Abbildung 4.3 A). Auch ein beobachtbarer Unterschied in der Zellmorphologie konnte nicht festgestellt werden. Auf beiden Oberflächen ließen sich L929 Zellen gut kultivieren. Dabei zeigten sich sowohl vereinzelte Zellen wie auch größere Zellgruppierungen.

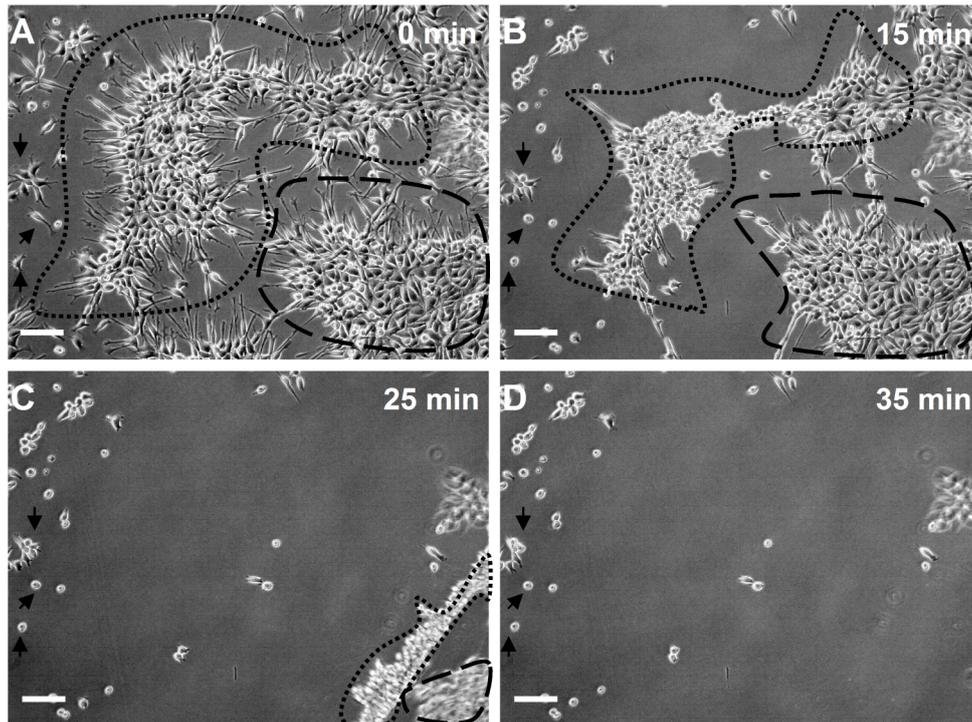


Abbildung 4.3: Zellverträglichkeit und Schaltbarkeit von P15-Au. L929-Zellablösung auf P15-Au ausgelöst durch Temperaturänderung von 37°C auf 25°C zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (A) Zelladhäsion und Zellausbreitung bei 37°C auf der Polymeroberfläche. **(B)** Nach 15 minütiger Inkubation bei 25°C beginnen sich die Zellgruppierungen (gepunktete und gestrichelte Bereiche) und die Einzelzellen (schwarze Pfeile) zusammenzuziehen und sich abzurunden. **(C)** Nach 25 minütiger Inkubation bei 25°C wird die Zellgruppierung (gepunkteter Bereich) mit der benachbarten Zellgruppierung (gestrichelter Bereich) von der Polymeroberfläche gezogen. **(D)** Nach 35 Minuten bei 25°C sind die Zellgruppierungen komplett von der Polymeroberfläche gelöst. Abgerundete Einzelzellen verbleiben auf der Polymeroberfläche. Maßstab: 100 µm.

Nach Temperaturänderung von 37 °C auf 25 °C zeigten sowohl die Zellgruppierungen (gepunktete, gestrichelte Linie - Abbildung 4.3 B) als auch die Einzelzellen (schwarze Pfeile - Abbildung 4.3 B) eine langsame Kontraktion der Zellkörper nach 15 Minuten. Dieses Zellverhalten deutet auf die erwartete Konformationsänderung der Polymeroberfläche hin. Nach 25 Minuten begannen beide Zellgruppierungen sich vom Substrat abzulösen, wobei Zell-Zellverbindungen erhalten blieben (Abbildung 4.3 C). Nach weiteren 10 Minuten lösten sich die Zellgruppierungen vom Substrat komplett ab, lediglich einzelne Zellen verblieben abgerundet auf der Oberfläche (Abbildung 4.3 D).

4.2 Einfluss von P15-Au auf das Einzelzellverhalten von L929

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Kontrolle der Einzelzellablösung von schaltbaren Substraten lag, wurden L929-Zellen vereinzelt auf der Polymeroberfläche kultiviert. Anhand des Einzelzellverhaltens (Zellausbreitung / Zellabrundung) bei Temperaturänderung ließen sich dann Rückschlüsse auf die Schaltkinetik sowie die Polymerbelegungsichte an der Goldoberfläche ziehen (Abbildung 4.4).

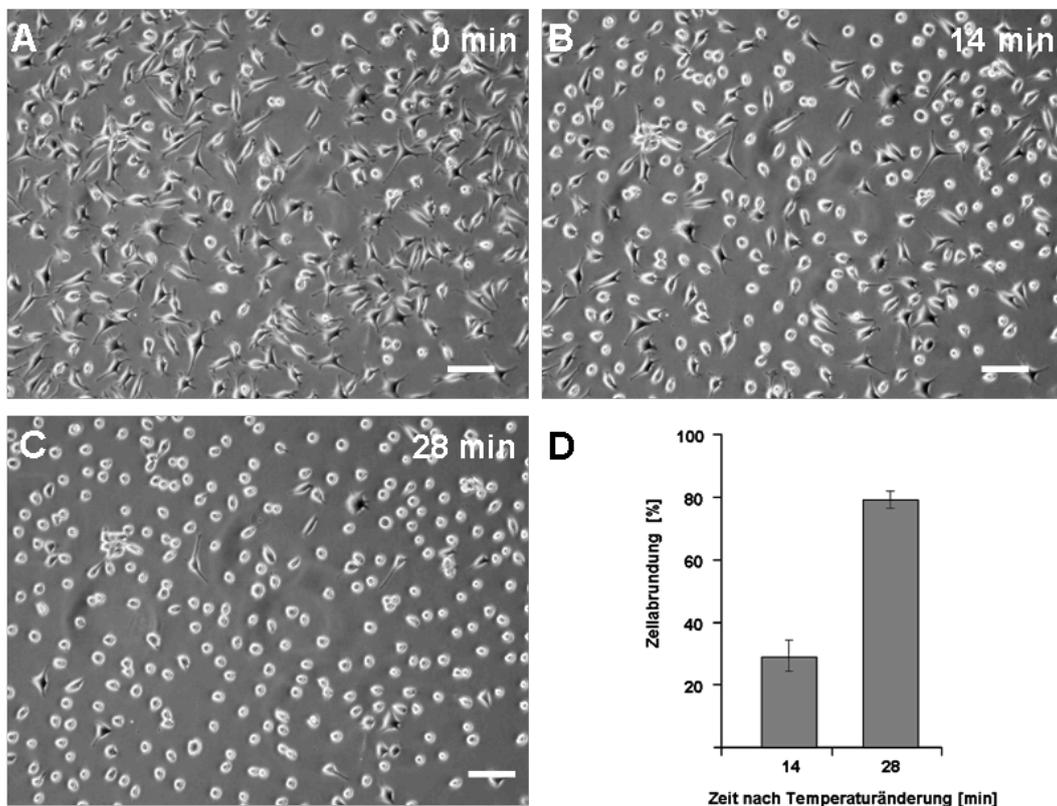


Abbildung 4.4: L929-Einzelzellabrundung auf P15-Au ausgelöst durch Temperaturänderung von 37°C auf 25°C nach unterschiedlichen Zeiten. (A) Zelladhäsion und Zellausbreitung bei 37°C auf der Polymeroberfläche. **(B)** Nach 14 minütiger Inkubation bei 25°C beginnen sich die Einzelzellen zusammenzuziehen und sich abzurunden. **(C)** Nach 28 minütiger Inkubation ist der Zellabrundungsprozess abgeschlossen. Wenige Zellen verbleiben ausgebreitet auf der Polymeroberfläche. Maßstab: 100 µm. **(D)** Prozentuale Einzelzellabrundung von L929 auf P15-Au nach der Temperaturänderung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Zellzahl wurde pro Gesichtsfeld ausgezählt und entsprechend der jeweiligen Zeitpunkte prozentual auf die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bezogen. Der Hintergrund (Zahl abgerundeter Zellen bei 37°C) wurde hierbei nicht berücksichtigt. Die Daten stellen Durchschnittswerte dreier unabhängiger Experimente dar. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Nach 14 minütiger Inkubation bei 25°C sind 29 % der Zellen abgerundet, nach 28 Minuten bei 25°C sind es 79%. Rohdaten: siehe Tabelle A3 im Anhang.

ERGEBNISSE

Nach 2 Tagen Kultivierung waren die Zellen adhärent und ausgebreitet auf der Polymeroberfläche (Abbildung 4.4 A). Bei einer Temperaturabsenkung auf 25 °C begannen die Einzelzellen sich abzurunden. Nach 14 Minuten bei 25 °C waren ca. 29 % der Zellen abgerundet (Abbildung 4.4 B, D). Der Einzelzellabrundungsanteil lag nach 28 Minuten bei 79 % (Abbildung 4.4 C, D). Ein weiterer Anstieg des Zellabrundungsanteils mit zunehmender Zeit konnte nicht beobachtet werden. Ca. 90 % aller abgerundeten Zellen verblieben auf der Polymeroberfläche, wohingegen sich 10 % von der Oberfläche komplett ablösten und aufschwammen. Die abgerundeten Zellen konnten mittels einer Pipette von der Oberfläche abgelöst und für weitere Kultivierungen eingesetzt werden. Als Kontrolle wurden L929 aus der jeweils selben Zellpassage auf herkömmlichen Polystyrenoberflächen für 2 Tage bei 37 °C kultiviert und anschließend bei 25°C für 30 Minuten beobachtet. Während dieses Beobachtungszeitraums konnten weder Zellabrundung noch Zellablösung der ausgebreiteten L929 festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

4.3 Kontrollierte Einzelzellablösung im mikrofluidischen System

Die in Kapitel 4.2 beschriebene Einzelzellabrundung mittels temperaturschaltbaren Oberflächen wurde auf ein mikrofluidisches System übertragen, um die notwendige Kraft für eine komplette Ablösung abgerundeter Zellen auf temperaturschaltbaren Oberflächen besser kontrollieren zu können.

Hierzu wurde die temperaturschaltbare Polymeroberfläche P15-Au in ein mikrofluidisches System integriert (siehe Kapitel 3.4.2) und L929 Fibroblasten in dem mikrofluidischen Kanal (Breite=1000 µm, Höhe= 100 µm) kultiviert (Abbildung 4.5). In diesem Kanal herrschte ausschließlich laminare Strömung, da aufgrund der verwendeten Kanalgeometrie eine Reynoldszahl von $Re \sim 1$ angenommen werden konnte. Die eingespülten Zellen waren nach 20 h - 24 h Kultivierung bei 37 °C adhärent und ausgebreitet (Abbildung 4.5 A). Das Zellverhalten (Adhäsion/ Ausbreitung) sowie die Zellmorphologie auf P15-Au in dem mikrofluidischen Kanal glichen dem Zellverhalten auf P15-Au. Anschließend wurde das mikrofluidische System mit den auf P15-Au kultivierten Zellen bei 25 °C inkubiert, um eine Zellabrundung auf der temperaturschaltbaren Polymeroberfläche zu induzieren. Nach

ERGEBNISSE

30 Minuten bei 25 °C rundeten sich 80 – 90 % aller ausgebreiteten Zellen ab (Abbildung 4.5 B).

Durch Anlegen eines Flusses in dem mikrofluidischen Kanal wurden die abgerundeten Zellen laminar von Medium umströmt. Die Kontrolle der Flussgeschwindigkeit in dem mikrofluidischen System wurde über eine Spritzenpumpe erreicht (siehe Kapitel 3.4.2). Die abgerundeten Zellen wurden unter definierten Flussgeschwindigkeiten aus dem Kanal entfernt. Als Zelumströmungsdauer wurde für jede Flussgeschwindigkeit ein Zeitbereich von 30 Sekunden festgelegt. Basierend auf den resultierenden Zellmorphologien (ausgebreitet und abgerundet) wurde für jede Flussgeschwindigkeit die Zelumströmungsgeschwindigkeit über ein geometrisches Modell berechnet (siehe Kapitel 3.4.4) und mit dem jeweiligen Zellabrundungsanteil korreliert (Abbildung 4.5 E).

ERGEBNISSE

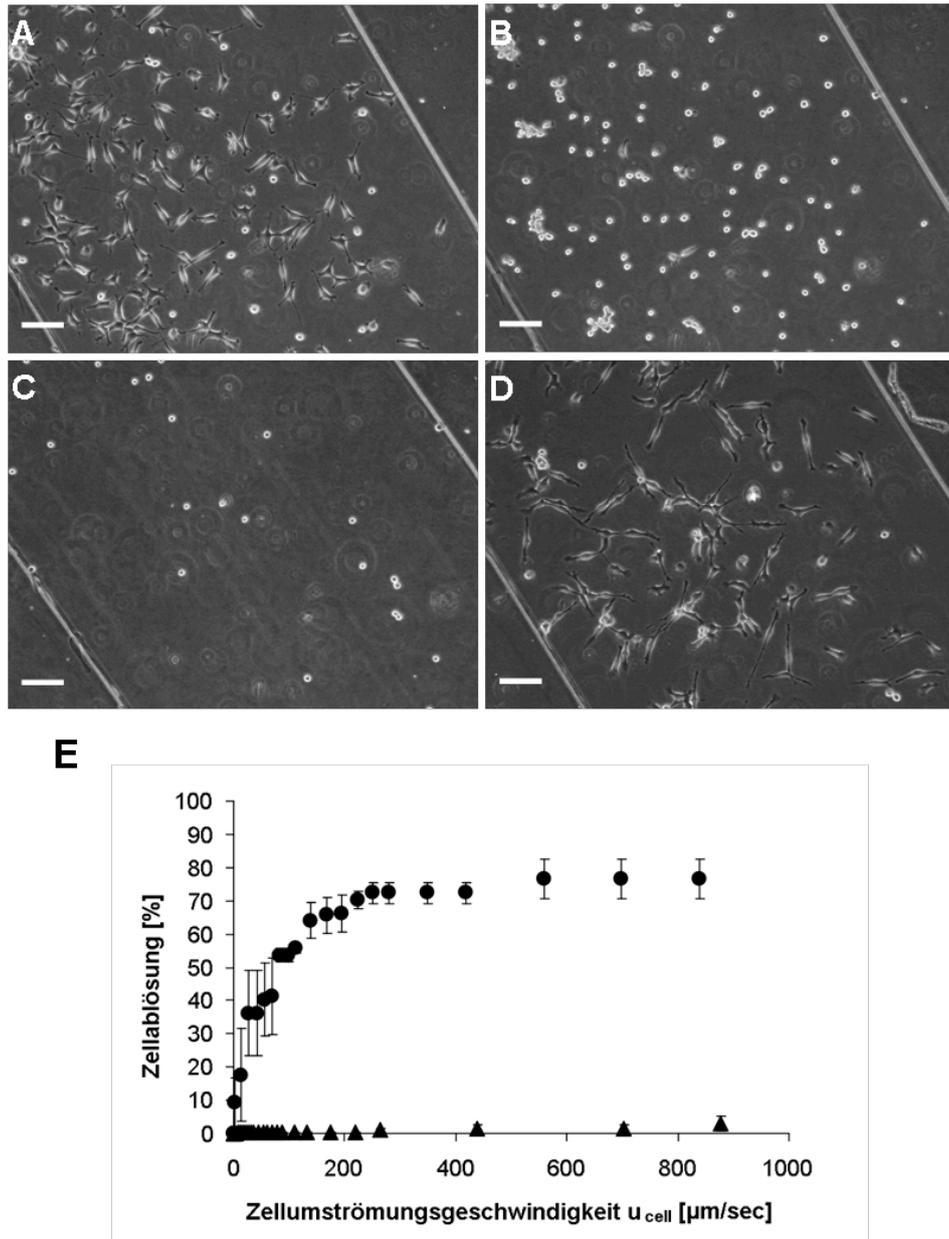


Abbildung 4.5: Auswirkung von laminarer Strömung auf L929 Fibroblasten auf P15-Au in einem mikrofluidischen PDMS-Kanal. (A) Fibroblasten adhären und breiten sich auf der Polymeroberfläche bei 37 °C aus. (B) Vollständige Zellabrundung in Folge der Temperaturänderung von 37 °C auf 25 °C nach 30 Minuten. (C) Einzelzellablösung abgerundeter Zellen in Folge des angelegten laminaren Flusses bei einer Zellumströmungsgeschwindigkeit von 560 $\mu\text{m}/\text{s}$ (Berechnung siehe Kapitel 4.4). (D) Bei 37 °C und einer angelegten Zellumströmungsgeschwindigkeit von 700 $\mu\text{m}/\text{s}$ können die ausgebreiteten Zellen von der Polymeroberfläche nicht abgelöst werden (dieses Bild wurde an einer anderen Position aufgenommen). Nur eine geringfügige morphologische Veränderung konnte aufgrund des laminaren Flusses beobachtet werden. Maßstab: 100 μm . (E) Prozentuale Einzelzellablösung der L929 Fibroblasten auf P15-Au in einem mikrofluidischen System als Funktion der Zellumströmungsgeschwindigkeit. Bei 25 °C (●) runden sich die Zellen ab und lösen sich aufgrund des angelegten laminaren Flusses ab. Ungefähr 80 % aller abgerundeten Zellen lösen sich von der Polymeroberfläche bei einer Zellumströmungsgeschwindigkeit von 560 $\mu\text{m}/\text{s}$. Bei 37 °C (▲)

ERGEBNISSE

bleiben die Zellen adhärent und ausgebreitet bei allen angelegten Flussgeschwindigkeiten. Die Daten stellen Durchschnittswerte dreier unabhängiger Experimente dar. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Rohdaten: siehe Tabelle A2 im Anhang.

Bei einer Zellumströmungsgeschwindigkeit u_{Cell} von 560 $\mu\text{m/s}$ konnten ca. 80 % aller abgerundeten Zellen aus dem mikrofluidischen Kanal entfernt werden (Abbildungen 4.5 C, E). Die Vitalität der ausgespülten Zellen wurde nicht beeinflusst. Die Zellen konnten für weitere Kultivierungen verwendet werden.

Zur Überprüfung der Schaltbarkeit der Polymeroberfläche bei unterschiedlichen Temperaturen wurden L929 auf P15-Au in dem mikrofluidischen Kanal bei 37°C einer laminaren Strömung ausgesetzt. Die Zellen zeigten bei allen angewandten Flussgeschwindigkeiten keine Zellabrundung oder Zellablösung (Abbildung 4.5 D, E). Nur geringfügige morphologische Veränderungen, die auf die angewandten Flussgeschwindigkeiten zurückzuführen sind, konnten beobachtet werden.

4.4 Oberflächenstabilität

Für eine mögliche kommerzielle Nutzung der entwickelten temperaturschaltbaren Polymeroberfläche wurde deren Stabilität untersucht.

4.4.1 Haltbarkeit von P15-Au

In diesem Ansatz wurde geklärt, welche Langzeitstabilität die temperaturschaltbare Polymeroberfläche P15-Au hinsichtlich ihrer Schaltbarkeit aufweist. Hierzu wurden zwei unabhängige Versuche über einen Zeitraum von jeweils 6 Wochen durchgeführt. Als Bewertungsparameter für die Oberflächenschaltbarkeit wurde die prozentuale Zellabrundung nach Schaltung definiert (Abbildung 4.6). Ein erster Einfluss der Lagerung auf die Oberflächenschaltbarkeit konnte nach Woche 2 beobachtet werden. Hier reduzierte sich der Zellabrundungsanteil von 80 – 90 % auf 60 – 70 %.

ERGEBNISSE

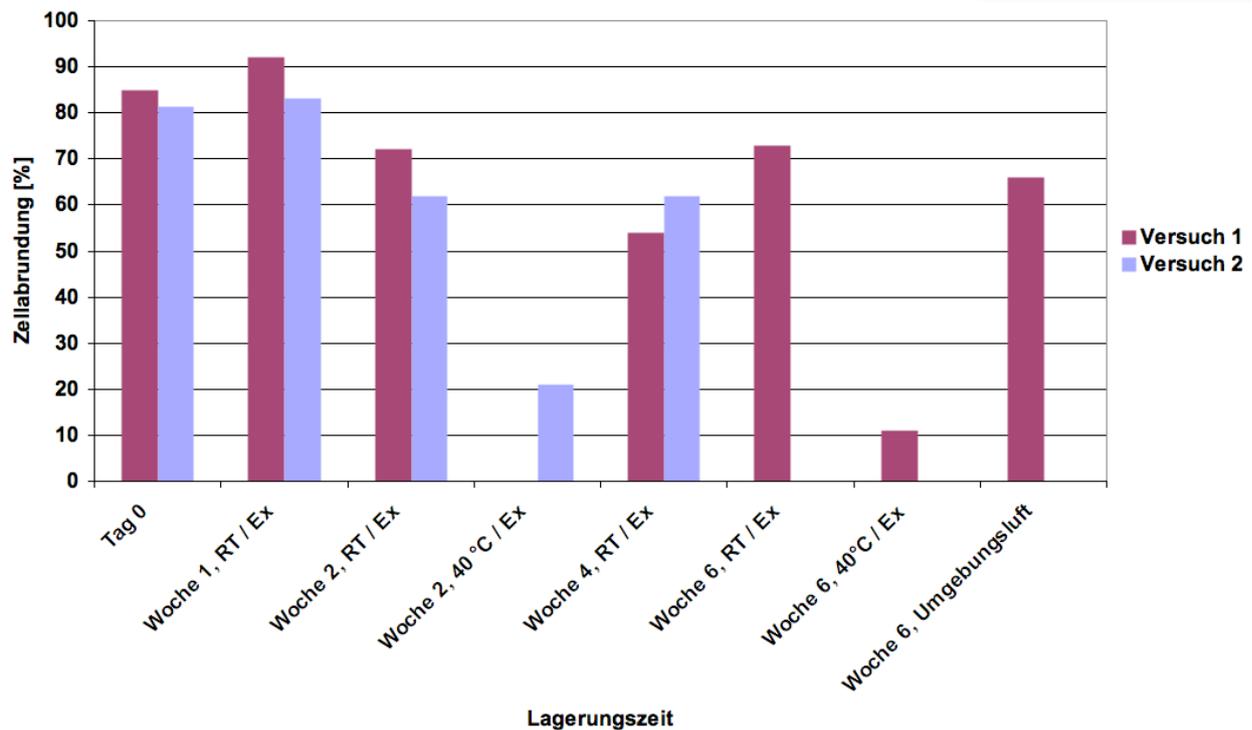


Abbildung 4.6: Oberflächenstabilität von P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und -bedingungen. RT: 25 °C , Ex: Exsikator. Es wurden 8 x P15-Au Präparate zeitgleich hergestellt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die Kultivierung von L929 Fibroblasten eingesetzt. Die Zellen wurden über 2 Tage bei 37 °C kultiviert und bei 25 °C für 30 Minuten abgerundet. Die jeweilige prozentuale Zellabrundung wurde als Funktion der entsprechenden Lagerungsdauer aufgetragen. Die Lagerung von temperaturschaltbaren Oberflächen ist bis 6 Wochen unkritisch. Bei der Lagerung der Polymeroberfläche bei 40 °C zeigen sich nach Woche 2 und Woche 6 signifikant niedrigere Zellabrundungsanteile. Für die Lagerung der Polymeroberfläche an Umgebungsluft ergibt sich eine prozentuale Zellabrundung zwischen 60 – 70 %. Die Zellabrundungsanteile in Woche 6 des 2.Versuchs konnten aufgrund einer Kontamination während der Zellkultivierung nicht ermittelt werden. Rohdaten: siehe Tabelle A5 im Anhang.

Nach Woche 4 konnte eine weitere Absenkung des Zellabrundungsanteils um 10 % verzeichnet werden. Die Oberflächenschaltbarkeit nach Woche 6 zeigte ein ähnliches Niveau wie ein 2 Wochen altes Präparat. Die Simulation einer Alterung der Polymeroberfläche bei 40 °C im Vakuum zeigte in Woche 2 und Woche 6 eine Reduktion des Zellabrundungsanteils auf 10 -20 %.

Der Vergleich der Lagerungsbedingungen (Vakuum, Umgebungsluft) zeigte, dass die Lagerung bei Vakuum eine größere Langzeitstabilität gewährleistete als die Lagerung bei Umgebungsluft.

4.4.2 Wiederverwendbarkeit von P15-Au

Eine interessante Fragestellung bei der Anwendung temperaturschaltbarer Oberflächen in der Zellkultur betrifft deren Wiederverwendbarkeit. Für eine effiziente Nutzung solcher Polymeroberflächen wäre eine mehrmalige Anwendung vorteilhaft. Deshalb wurde die Reproduzierbarkeit des Schaltvorgangs auf temperaturschaltbaren Oberflächen P15-Au bei mehrmaliger Verwendung (Schaltzyklen) untersucht (Abbildung 4.7). Ein Schaltzyklus verläuft von 37 °C (adhärenter Zellzustand) auf 25 °C (abgerundeter Zellzustand) und wurde anschließend auf 37 °C zurückgeführt (Abbildung 4.7 A).

Auf zwei P15-Au-Präparaten mit unterschiedlichem Alter (Tag 0, Woche 1) wurde der Zellabrundungsanteil pro Schaltzyklus untersucht (Abbildung 4.7 B). Vor dem ersten Schaltzyklus wurden die Zellen auf den Oberflächen für 48 h kultiviert. Danach wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C für 30 Minuten gesenkt, wodurch die Zellen sich abrundeten und durch vorsichtiges Pipettieren vollständig von der Oberfläche entfernt werden konnten. Vor jeder erneuten Zellkultivierung wurden die Oberflächen bei 25 °C in PBS gewaschen, um vermutlich adsorbierte Proteine von der Oberfläche zu entfernen, welche die Schalteffizienz der Polymeroberfläche beeinflussen könnten. Die abgelösten Zellen wurden auf die gewaschenen Oberflächen erneut ausgesät und für 48 h kultiviert. Danach wurde ein erneuter Schaltzyklus vollzogen. Auf beiden präparierten Polymeroberflächen konnte über einen Zeitbereich von zwei Schaltzyklen ein ähnliches Zellabrundungsniveau beobachtet werden. Die Unterschiede des Zellabrundungsanteils zwischen den beiden Polymeroberflächen waren gering und vermutlich nicht signifikant. Nach dem dritten Schaltzyklus zeigte sich eine Reduktion des Zellabrundungsanteils auf 50 %.

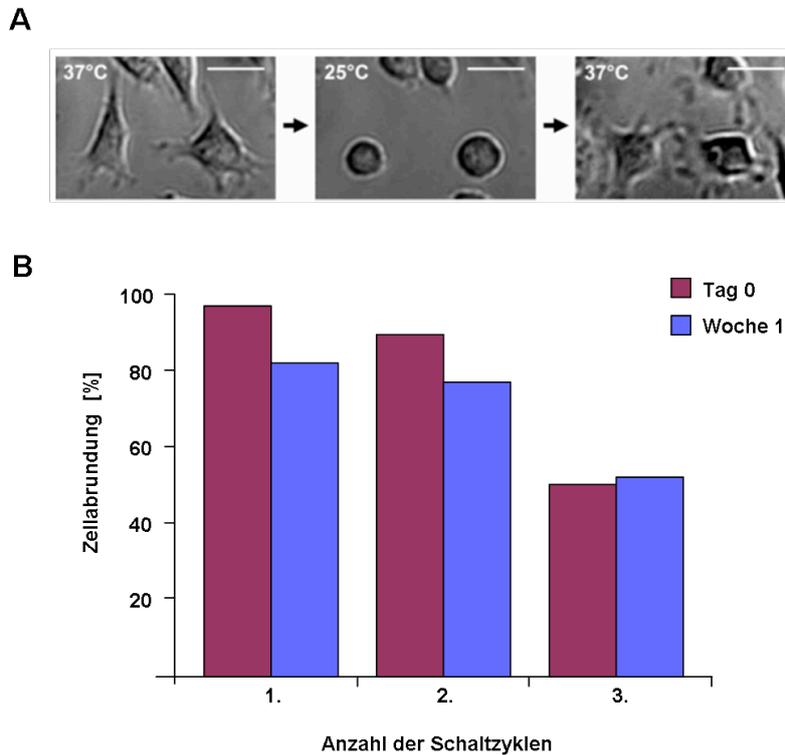


Abbildung 4.7: Wiederverwendbarkeit von P15-Au Oberflächen bei unterschiedlichen Lagerungszeiten für den Gebrauch als Zellkultursubstrat. (A) Schaltzyklus von L929 auf P15-Au. Zelladhäsion bei 37 °C, Zellabrundung nach 30 Minuten bei 25 °C, erneute Zelladhäsion nach 1h bei 37 °C. Maßstab: 50 µm. **(B) Tag 0 (■):** P15-Au wurde am Tag der Präparation für eine mehrmalige Kultivierung eingesetzt. **Woche 1 (■):** P15-Au wurde für eine Woche bei RT unter Vakuum gelagert und dann für eine mehrmalige Kultivierung eingesetzt. Die ausgebreiteten Zellen auf P15-Au wurden über Temperaturschaltung von 37 °C auf 25 °C abgerundet und anschließend mittels einer Pipette von der Oberfläche gespült. Die Oberfläche wurde in PBS gewaschen und für eine erneute Zellkultivierung mit den vorher weggespülten Zellen eingesetzt. Vor jeder Schaltung wurden die Zellen für 2 Tage kultiviert. Der Zellabrundungsanteil wurde nach einer Temperaturänderung (37 °C → 25 °C) bestimmt. Rohdaten: siehe Tabelle A4 im Anhang.

4.5 Anpassung schaltbarer Oberflächen für eine zelltypspezifische Adhäsionskontrolle

Da unterschiedliche Zelltypen in ihrem Adhäsionsverhalten stark variieren, wurden über Oberflächenmodifikationen die dem jeweiligen Zelltyp entsprechenden Oberflächeneigenschaft eingestellt.

4.5.1 Charakterisierung von P15-Au und P19-Au

Ein möglicher Ansatz zur Optimierung der Schaltkinetik und der Schalteffizienz ist die Erhöhung des intramolekularen PEG-Gehalts im Copolymer. Dadurch ergeben sich

ERGEBNISSE

für die Schaltkinetik und Schalteffizienz der Polymeroberfläche zwei nützliche Effekte. Zum einen wird die LCST des Copolymers in Richtung der Kultivierungstemperatur von Zellen (37 °C) verschoben, wodurch es zu einem früheren Schalten der Polymeroberfläche kommt. Zum anderen gewährleistet der höhere PEG-Gehalt im Copolymer eine stärkere Hydratisierung der Polymerschicht. Beide Effekte können zu einer schnelleren und höheren Zellabrundung auf schaltbaren Polymeroberflächen beitragen (Schmaljohann *et al.*, 2003).

LCST-Vergleich von PNIPAAm-PEG15%-COOH und PNIPAAm-PEG19%-COOH

Entsprechend der LCST-Charakterisierung von P15 (Kapitel 4.1) wurde für das neu erhaltene Copolymer PNIPAAm-PEG19%-SH (P19) die LCST anhand der Polymervorstufe PNIPAAm-PEG19%-COOH ermittelt. Während P15-Au eine LCST bei 35 – 36 °C aufwies, zeigte P19 seine LCST zwischen 36 – 37 °C (Abbildung 4.8). Dies ließ sich anhand der signifikanten Partikelvergrößerung von PNIPAAm-PEG19%-COOH in Lösung bei Temperaturänderung von 36 °C auf 37 °C erkennen. Diese Messungen sowie die Synthese wurde von unserem Projektpartner Fraunhofer IAP, Potsdam (Dr. A. Lieske) durchgeführt.

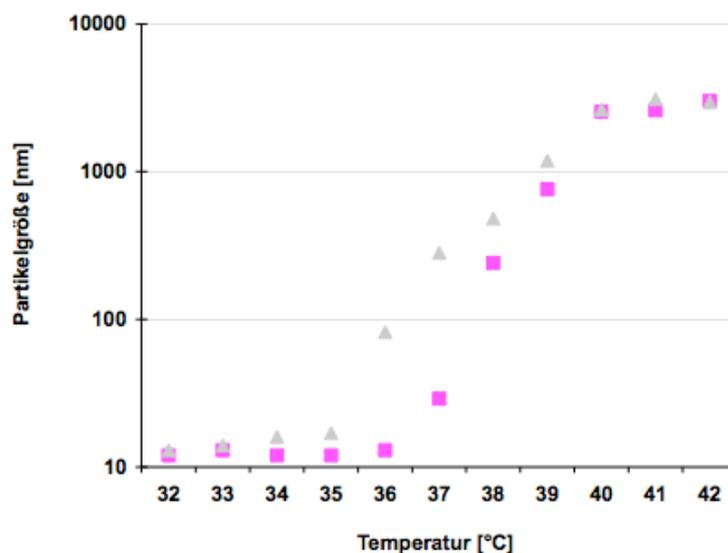


Abbildung 4.8: Vergleich der charakteristischen LCST (lower critical solution temperature) der PNIPAAm-PEG Copolymere mit unterschiedlichem PEG-Gehalt. PNIPAAm-PEG(15%)-COOH (\blacktriangle) zeigt eine LCST zwischen 35°C - 36°C. PNIPAAm-PEG(19%)-COOH (\blacksquare) weist eine LCST im Bereich von 36°C - 37°C auf.

Vergleich der Kontaktwinkeldaten von P15-Au und P19-Au

P19 wurde wie P15 adsorptiv an eine Goldoberfläche gebunden. Daraus entstand die schaltbare Polymeroberfläche P19-Au, welche über Kontaktwinkelmessung bei unterschiedlichen Temperaturen charakterisiert wurde. Die Kontaktwinkeldaten von P19-Au wurden mit denen von P15-Au bei den jeweiligen Temperaturen gegenübergestellt (Abbildung 4.9). P19-Au zeigte im untersuchten Temperaturbereich von 20 °C – 45 °C eine höhere Hydrophilie als P15-Au. Bei 20 °C ergab sich auf P19-Au ein Kontaktwinkel von 48 °, auf P15-Au ein Kontaktwinkel von 54 °. Bei 45 °C auf P19-Au zeigte sich Kontaktwinkel von 61 °, auf P15-Au ein Kontaktwinkel von 65 °, was mit dem höheren PEG-Gehalt von P19 im Einklang steht. An beiden Oberflächen wurde ein nahezu paralleler Temperaturabhängigkeitsverlauf festgestellt.

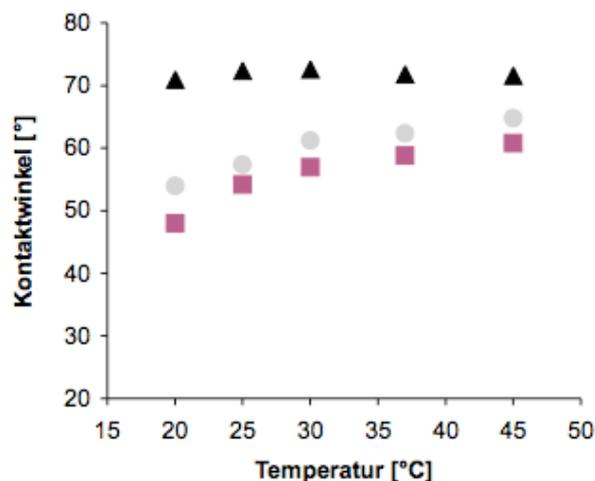


Abbildung 4.9: Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P15-Au (○), P19-Au (■) und gereinigtem Gold (▲) als Funktion der Temperatur. Der Temperaturabhängigkeitsverlauf von P15-Au (54 ° - 65 °) und P19-Au (48 ° - 61 °) zeigt im Bereich von 20 °C – 45 °C ein ähnliches Schaltverhalten. P19-Au ist aufgrund des höheren PEG-Gehalts hydrophiler als P15-Au. Die gereinigte, unfunktionalisierte Goldoberfläche zeigt keine Änderung der Benetzungseigenschaften. Die Daten geben einen Mittelwert von jeweils fünf Messungen an. Die Standardabweichungen des Mittelwerts wurden nicht grafisch dargestellt, da sie nie die Symbolgröße überschritten. Rohdaten: siehe Tabelle A1 im Anhang.

Untersuchung der Oberflächenzusammensetzung von P19-Au

Die Oberflächenzusammensetzung von P19-Au wurde qualitativ und quantitativ untersucht, um Information über chemische Strukturen an der Oberfläche zu erhalten. Hierzu wurde die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) eingesetzt. Die Oberfläche wurde in einem Bereich von 0,3 mm x 0,7 mm bis zu einer Tiefe von ca. 7 nm erfasst. Die elementare Analyse ergab von dem Substrat einen Goldanteil von 30 at%. Unter der Annahme, dass die Polymerschicht eine homogene Belegung aufwies sowie unter Vernachlässigung der Oberflächenrauigkeiten, konnte anhand der relativen Intensitätssignale eine Schichtdicke von P19-Au im Bereich von 3 – 4 nm angenommen werden. Das charakteristische Kohlenstoff C1s Spektrum von P19-Au ergab fünf Typen von Kohlenstoffsignalen mit unterschiedlichen Bindungsenergien (BE) (graue Linie, Abbildung 4.10).

Drei dieser Typen konnten PNIPAAm zugeordnet werden: Die C-C-Verbindung mit einer BE = 285,0 eV, C-N-Verbindungen mit einer BE = 285,7 eV und die O=C-N mit einer BE = 287,8 eV. Das Kohlenstoffsignal C-O mit einer BE = 286,4 eV konnte dem intramolekularen PEGMA zugeordnet werden. Das schwache Signal der O=C-O Verbindung mit einer BE = 289,0 eV konnte nicht mit der Zusammensetzung von P19-Au korreliert werden. Es stammt vermutlich von einer unspezifischen Adsorbatschicht auf P19-Au. Die XPS-Messung wurden von unserem Projektpartner Fraunhofer IAP, Potsdam (Dr. A. Holländer) durchgeführt und ausgewertet.

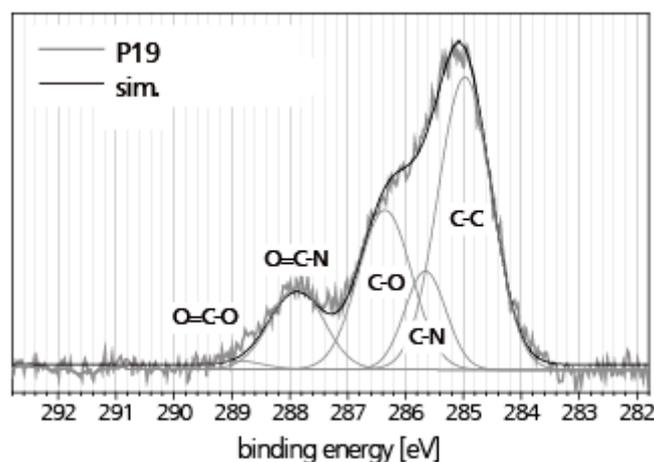


Abbildung 4.10: Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) von P19-Au. Dargestellt ist ein repräsentatives Kohlenstoff C1s-Spektrum von P19 (graue Linie) und ein simuliertes Spektrum für eine molare PEGMA-Fraktion von 12 mol%. Die Daten dieser Messung konnten durch eine zweite Messung bestätigt werden.

ERGEBNISSE

Auf der Grundlage dieser Signale wurde über ein simuliertes Spektrum (schwarze Linie, Abbildung 10) der molare Monomeranteil beider Teile des Copolymers ermittelt. Hieraus ergab sich eine Zusammensetzung von 88 mol% PNIPAAm zu 12 mol% PEGMA für P19. Das charakteristische O1s-Spektrum wurde auf dieselbe Weise angenähert und bestätigte die Ergebnisse des C1s-Spektrums bzgl. der Oberflächenzusammensetzung von P19. Insgesamt spricht die Reinheit der XPS-Signale für eine nahezu saubere, unkontaminierte Oberfläche.

Vergleich des Zellverhaltens auf P15-Au und P19-Au

Der intramolekulare PEG-Gehalt von P15-Au und P19-Au hat einen signifikanten Einfluss auf die Zellabrundungszeit nach Temperaturänderung (Abbildung 4.11). Abbildung 4.11 A stellt das Zellverhalten auf beiden Oberflächen zu bestimmten Zeitpunkten gegenüber. Hierbei zeigte sich, dass bei 37 °C nach 3 Tagen Kultivierung die Zellen auf beiden Oberflächen adhärent und ausgebreitet waren. Beide Oberflächen erwiesen sich als zellverträglich.

Der Zellabrundungsanteil ist als Funktion der Zeit in Abbildung 11B aufgetragen. Nach 14 Minuten bei 25 °C wurde der Unterschied im Zellverhalten auf beiden Oberflächen deutlich (Abbildung 4.11 A, mittig). Während auf P19-Au bis zu 74 % der ausgebreiteten Zellen abgerundet waren, rundeten sich auf P15-Au lediglich 23 % ab. Nach 28 Minuten erreichte der Zellabrundungsanteil auf P15-Au ein ähnliches Niveau wie nach 14 Minuten auf P19 (Abbildung 4.11 A, rechts). Auf P19-Au konnte nach 28 Minuten ein Zellabrundungsanteil von mehr als 90 % beobachtet werden. Somit ermöglicht P19-Au im Vergleich zu P15-Au eine doppelt so schnelle Zellablösung.

ERGEBNISSE

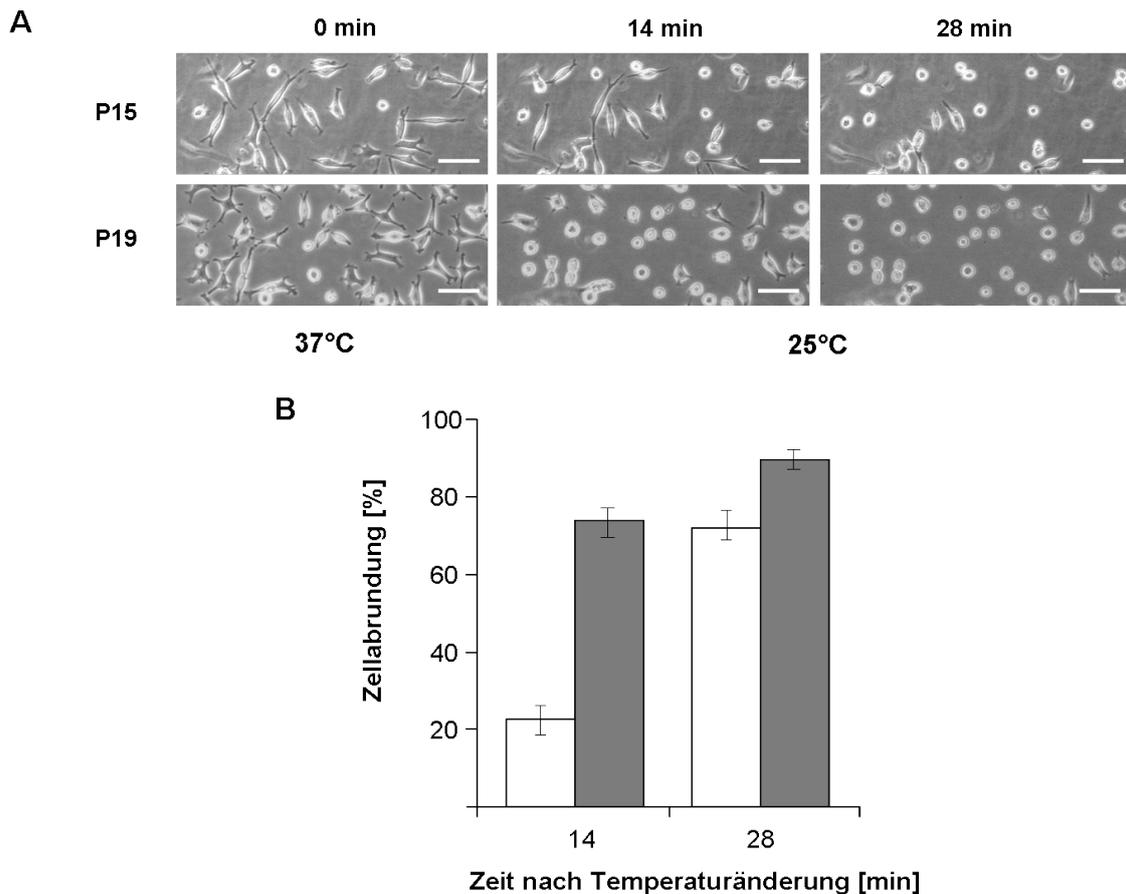


Abbildung 4.11: Zellabrundung auf P15-Au und P19-Au über die Zeit. (A) Zellabrundung von adhären, ausgebreiteten L929 auf P15-Au und P19-Au im Vergleich nach Temperaturänderung von 37 °C auf 25 °C (Kultivierungsdauer war 3 Tage). Es wurden Bilder zu den Zeitpunkten 0, 14 und 28 Minuten nach Temperaturänderung aufgenommen. Maßstab: 100 µm. (B) Abgerundete Zellen auf P15-Au (weißer Balken) und P19-Au (grauer Balken) wurden pro Gesichtsfeld ausgezählt und als prozentuale Zellabrundung über die jeweiligen Zeitpunkte aufgetragen. Die Daten wurden bzgl. des Hintergrunds (abgerundete Zellen bei 37 °C) korrigiert und als Mittelwert dreier unabhängiger Versuche mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Rohdaten: siehe Tabelle A3 im Anhang.

4.5.2 Modifikation von P19-Au für stark adhärenente Zelltypen

Die kontrollierte Zellabrundung auf P19-Au wurde unter anderem mit stark adhärenenten Zellen (Osteoblasten, Chondrozyten) getestet. Dabei wurde deutlich, dass stark adhärenente Zellen auf P19-Au bei Temperaturwechsel nicht oder kaum reagierten, sondern adhärenent und ausgebreitet auf der Polymeroberfläche verblieben. Um solch stark adhärenente Zellen von schaltbaren Oberflächen kontrolliert ablösen zu können, mussten schaltbare Polymeroberflächen mit größeren protein- bzw. zellrepellierenden Eigenschaften entwickelt werden.

ERGEBNISSE

Die Erhöhung des intramolekularen PEG-Anteils von P19 scheidet dabei als Möglichkeit aus, da dies die LCST des Copolymers über die Kultivierungstemperatur von 37 °C verschieben würde, also kein Schalten in einem Temperaturbereich unterhalb von 37 °C erlauben würde. Es wurde stattdessen ein Vorteil der Thiol-Chemie auf Goldoberflächen genutzt, nämlich die Möglichkeit, Moleküle kontrolliert als vermischte Coadsorbate anzubinden. Hierzu wurde P19 mit dem zellrepellierendem Polymer CH₃O-PEG-SH („PG“) gemischt und auf der Goldoberfläche adsorbiert. Die LCST der modifizierten Polymeroberfläche P19/PG-Au wurde dabei nicht verändert.

Kontaktwinkelmessung auf modifizierten Polymeroberflächen

Als eine passende Oberfläche hat sich die modifizierte Polymeroberfläche P19/PG mit einem molaren Mischungsverhältnis von 1:6 (P19/PG(1:6)-Au) erwiesen. Deren Charakterisierung wurde über Kontaktwinkelmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abbildung 4.12). Zum Vergleich wurden Kontaktwinkeldaten von P19-Au, einer reinen PEG-Oberfläche (PG-Au) sowie von einer unfunktionalisierten Goldoberfläche bei unterschiedlichen Temperaturen gegenübergestellt.

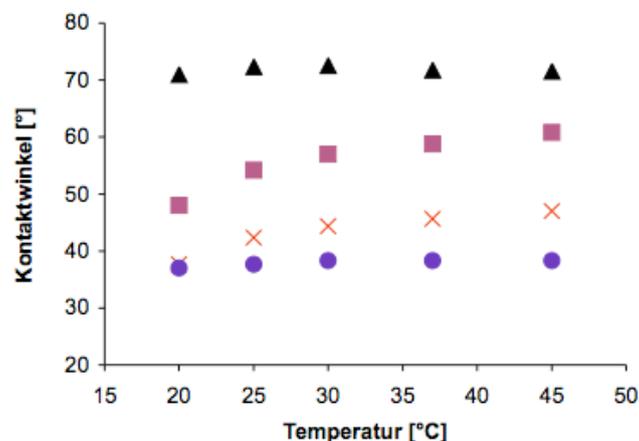


Abbildung 4.12: Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P19-Au (■), P19/PG(1:6)-Au (x), PG-Au (●) und gereinigtem Gold (▲) als Funktion der Temperatur. Der Temperaturabhängigkeitsverlauf von P19-Au und P19/PG(1:6)-Au zeigt ein ähnliches Schaltverhalten. Aufgrund des zusätzlichen hygroskopischen PEG-Anteils bei P19/PG(1:6)-Au wird im Vergleich zu P19-Au eine hydrophilere Oberfläche erzeugt. Gereinigte, unfunktionalisierte Goldoberflächen und PG-Au zeigen keine Änderung der Benetzungseigenschaften. Die Daten geben einen Mittelwert von jeweils fünf Messungen an. Die Standardabweichungen des Mittelwerts wurden nicht grafisch dargestellt, da sie nie die Symbolgröße überschritten. Rohdaten: siehe Tabelle A1 im Anhang.

ERGEBNISSE

P19/PG(1:6)-Au ist eine vergleichsweise hydrophile Oberfläche mit Kontaktwinkeln von 37 ° bei 20 °C bis hin zu 46 ° bei 45 °C. Der Temperaturabhängigkeitsverlauf von P19/PG(1:6)-Au ist im Vergleich zu P19-Au flacher. Die Kontaktwinkel auf PG-Au und auf unfunktionalisierten Goldoberflächen änderten sich bei Temperaturänderung praktisch nicht.

Untersuchung der Oberflächenzusammensetzung von P19/PG(1:6)-Au

Neben der XPS-Messung von P19-Au (siehe Kapitel 4.5.1) wurde zudem eine XPS-Messung der Polymeroberfläche P19/PG(1:6)-Au durchgeführt. Diese Messung gab anhand der Oberflächenzusammensetzung eine Information darüber, ob die Thiol-Moleküle in Lösung (P19:PG(1:6)) auch in einem ähnlichen Konzentrationsverhältnis an der Goldoberfläche gebunden werden können. Die XPS-Untersuchung der P19/PG(1:6)-Au ergab ein molares Mischungsverhältnis von 1:6,8 (P19:PG), welches im Bereich der molaren Zusammensetzung der eingesetzten Thiollösung von 1:6 (P19:PG) liegt.

Zellabrundung stark adhärenter Zellen auf modifizierten Polymeroberflächen

Als Modellzelllinie wurde MG63 (humanes Osteosarkom) für die Zellabrundungsversuche auf modifizierten Polymeroberflächen eingesetzt (Abbildung 4.13). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass adhärente MG63 sich weder von P15-Au (Daten nicht dargestellt) noch von P19-Au (Abbildung 4.13 A) bei Temperaturänderung abrunden bzw. ablösen. Die Anpassung der schaltbaren Polymeroberfläche an das Adhäsions- bzw. Ablösungsverhalten der MG63 erfolgte über eine Adsorption von P19 und PG in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an Goldoberflächen. Dabei zeigte sich, dass auf einer Polymeroberfläche aus einer Mischung von 1:9 (P19:PG) MG63 nicht adhären können, was sehr wahrscheinlich an dem zu hohen PG-Anteil liegt (Abbildung 4.13 C). Folglich konnten auf diesen Oberflächen keine Ablöseversuche durchgeführt werden.

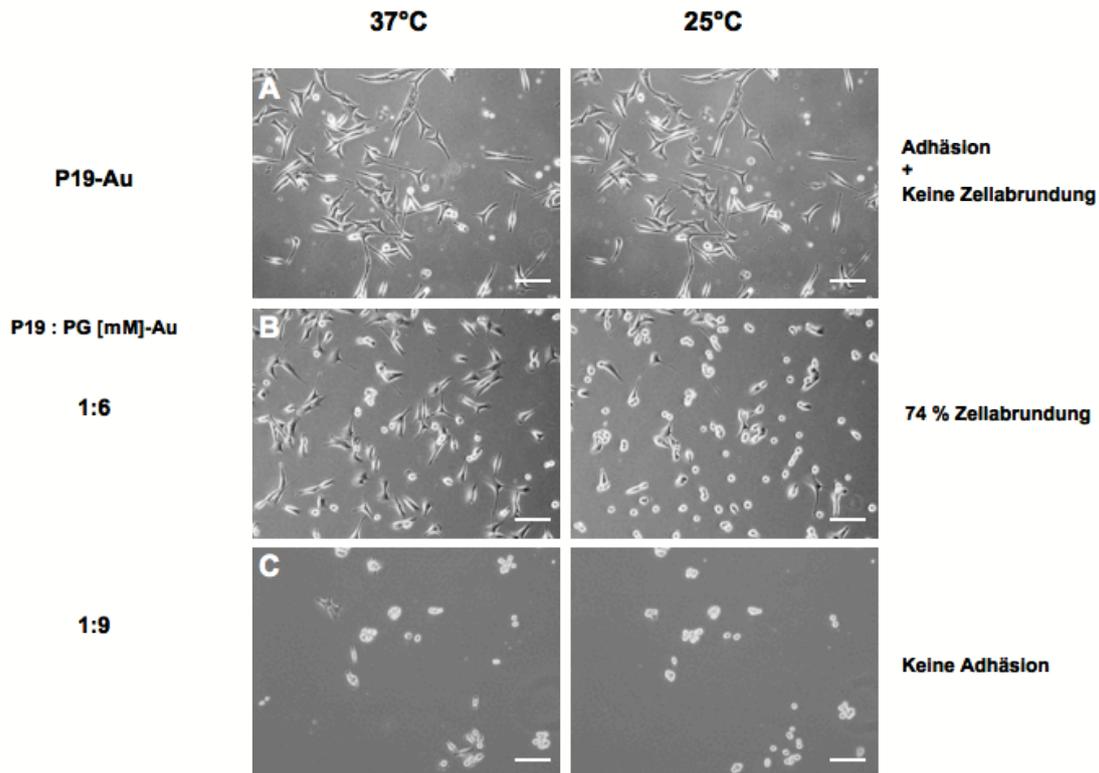


Abbildung 4.13: Adhäsionsverhalten von MG63 auf P19/PG-Au mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Zellen wurden für 36h auf der jeweiligen Oberfläche kultiviert. Anschließend wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C reduziert und das Zellverhalten für 30 Minuten dokumentiert. **(A)** Auf P19-Au sind die Zellen adhären und ausgebreitet. Nach 30 Minuten bei 25 °C ist keine signifikante Zellabrundung zu beobachten. **(B)** P19/PG(1:6)-Au ermöglicht Zelladhäsion und Zellausbreitung. 74% der adhären Zellen runden sich bei 25 °C ab. **(C)** P19/PG(1:9)-Au verhindert Zelladhäsion vollständig. Maßstab: 100 µm. Rohdaten: siehe Tabelle A6 im Anhang.

Dagegen adhärten und breiteten sich die Zellen nach 36 h Kultivierung bei 37 °C auf der Polymeroberfläche P19/PG(1:6)-Au aus (Abbildung 4.13 B). Nach Temperaturänderung auf 25 °C für 30 Minuten rundeten sich 74 % aller ausgebreiteten Zellen ab und konnten durch vorsichtiges Pipettieren von der Oberfläche entfernt werden.

4.5.3 Modifikation von P19-Au für schwach adhären Zelltypen

In Kapitel 4.5.1 konnte gezeigt werden, dass L929 Fibroblasten für Adhäsion und Ausbreitung auf P19-Au 3 Tage Kultivierung benötigen. Da dies für die praktische Verwendung eine sehr lange Zeit ist, wurde versucht, die Oberfläche derart zu modifizieren, dass sie für L929 Zellen eine bessere und schnellere Adhäsion ermöglicht.

ERGEBNISSE

Es wurde eine Coadsorption von P19 mit einem zellattraktiven Peptid in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an Goldoberflächen durchgeführt. Aus der Literatur konnte ein Fibroblasten-attraktives Peptidmotiv CGGRGDS (RGD) identifiziert werden, welches von Dr. H. Börner (MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam) synthetisiert und mittels Massenspektrometrie charakterisiert wurde (Hersel *et al.*, 2003). Aufgrund des Cysteins in der Peptidsequenz lag eine SH-Gruppe vor, welche eine Anbindung des RGDs an die Goldoberfläche ermöglichte.

Kontaktwinkelmessung auf modifizierten Polymeroberflächen

Als eine passende Oberfläche hat sich die modifizierte Polymeroberfläche P19/RGD mit einem molaren Mischungsverhältnis von 1:8 (P19/RGD(1:8)-Au) erwiesen. Deren Charakterisierung wurde über Kontaktwinkelmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abbildung 4.14). Zum Vergleich wurden Kontaktwinkeldaten von P19-Au, einer unfunktionalisierten Goldoberfläche sowie von einer reinen RGD-Oberfläche (RGD-Au) bei unterschiedlichen Temperaturen gegenübergestellt.

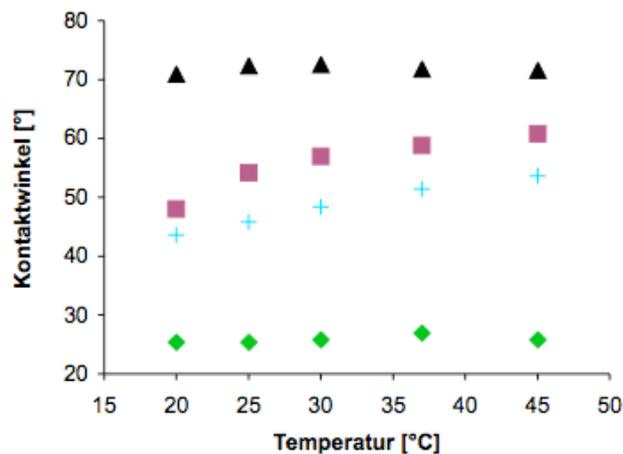


Abbildung 4.14: Fortschreitkontaktwinkel von Wasser auf P19-Au (■), P19/RGD(1:8)-Au (+), RGD-Au (◆) und gereinigtem Gold (▲) als Funktion der Temperatur. Das Schaltverhalten von P19-Au und P19/RGD(1:8)-Au zeigt eine ähnliche Temperaturabhängigkeit. Aufgrund des hydrophilen RGD-Anteils verhält sich P19/RGD(1:8)-Au hydrophiler als P19-Au. Es ergeben sich keine Änderung der Benetzungseigenschaften auf RGD-Au sowie auf der unfunktionalisierten Goldoberfläche. Die Daten geben einen Mittelwert von jeweils fünf Messungen an. Die Standardabweichungen des Mittelwerts wurden nicht grafisch dargestellt, da sie nie die Symbolgröße überschritten. Rohdaten: siehe Tabelle A1 im Anhang.

ERGEBNISSE

Die Änderung des Kontaktwinkels auf P19/RGD(1:8)-Au verläuft von 43 ° bei 20 °C bis 52 ° bei 45 °C. Verglichen zu P19-Au ist der Temperaturabhängigkeitsverlauf von P19/RGD(1:8)-Au nur geringfügig flacher. Die Hydrophilie von P19/RGD(1:8)-Au ist höher als die von P19-Au, was konsistent mit der Hydrophilie des RGDs ist. Eine Änderung der Benetzbarkeit bei Temperaturänderung ist auf RGD-Au nicht zu beobachten.

Erhöhung der Zelladhäsion auf modifizierter P19-Au

Ziel der Mischung von P19 und RGD auf einer Goldoberfläche war es, das Mischungsverhältnis der beiden Thiole so einzustellen, dass die Schalteffizienz von P19 wirksam bleibt und die Zellen eine schnellere Adhäsion und Ausbreitung auf der Polymeroberfläche vollziehen können. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche molare Mischungsverhältnisse von P19 und RGD auf Goldoberflächen erzeugt. Die Schaltbarkeit der erzeugten Oberflächen wurde über den Zellabrundungsanteil bei Temperaturänderung untersucht (Abbildung 4.15).

Die Polymeroberfläche P19/RGD(1:8)-Au ermöglichte einen Zellabrundungsanteil von 91 % (Abbildung 4.15 A, rechtes Bild), was dem Zellabrundungsanteil auf P19-Au entspricht (siehe Kapitel 4.5.1). Die Polymeroberfläche mit einer noch höheren RGD-Konzentration P19/RGD(1:17)-Au brachte keine weitere Verstärkung des Adhäsions- bzw. Ausbreitungsverhaltens (Abbildung 4.15 A, linkes Bild). Zudem reduzierte sich der Zellabrundungsanteil auf 74 % (Abbildung 4.15 A, rechtes Bild). Jede weitere Erhöhung des intermolekularen RGD-Anteils führte auf der Polymeroberfläche zu einer weiteren Absenkung des Zellabrundungsanteils (Daten nicht abgebildet).

Es zeigte sich, dass auf der Polymeroberfläche P19/RGD(1:8)-Au die Zellen nur 36 h kultiviert werden mussten, bis sie adhärent und ausgebreitet waren (Abbildung 4.15 B, linkes Bild). Auf P19-Au dagegen mussten die Zellen für eine Adhäsion und vollständige Ausbreitung 72 h kultiviert werden (Abbildung 4.15 B, rechtes Bild).

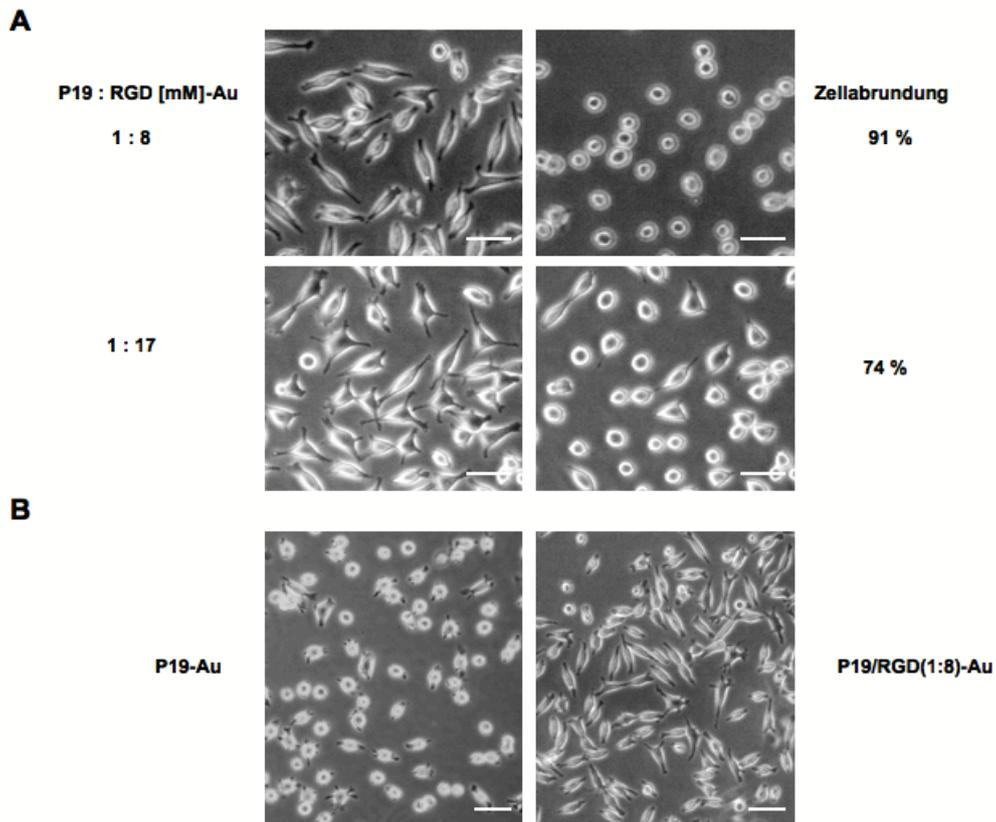


Abbildung 4.15: Adhäsionsverhalten von L929 auf P19/RGD-Au mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Zellen wurden für 36 h auf der jeweiligen Oberfläche kultiviert und das Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten beobachtet. Anschließend wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C geändert und das Zellverhalten für 30 Minuten dokumentiert. **(A)** Bei einem P19/RGD-Mischungsverhältnis von 1:8 sind die Zellen nach 36 h adhären und ausgebreitet (*linkes Bild*). Nach 30 Minuten bei 25 °C ergibt sich ein Zellabrundungsanteil von 91 % (*rechtes Bild*). Durch Erhöhung der RGD-Konzentration auf ein Mischungsverhältnis von 1:17 kann das Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten nicht erhöht werden (*linkes Bild*). Nach 30 Minuten bei 25 °C beträgt der Zellabrundungsanteil nur 74 % (*rechtes Bild*). **(B)** Zelladhäsion von L929 auf P19-Au (*linkes Bild*) und P19/RGD(1:8)-Au (*rechtes Bild*) nach 36 h Kultivierung im Vergleich. Auf P19-Au sind die Zellen adhären, jedoch nicht ausgebreitet. Dagegen sind sie auf P19/RGD(1:8)-Au adhären und ausgebreitet. Maßstab: 100 µm. Rohdaten: siehe Tabelle A7, A8 im Anhang.

4.6 Mikrostrukturierung von Oberflächen

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Oberflächen können über die Anwendung als flächige, schaltbare Kultursubstrate hinaus eine Komponente in zukünftigen, komplexen Systemen sein. Eine interessante Anwendung könnte die oberflächenbasierte Trennung von Zellen aufgrund ihres Migrationsverhalten sein, um migrationsaktive Zellen für weiterführende Arbeiten wie Analyse oder Manipulation in einer Population anzureichern. In Vorarbeiten wurden

mikrostrukturierte Oberflächen mit zellattraktiven (Fibronektin) und zellabstoßenden Bereichen (PEG) entwickelt (nicht veröffentlichte Daten, Ines Westphal, Fraunhofer IBMT). Mittels dieser Oberflächen konnte gezeigt werden, dass viele Zellen von den zellabstoßenden auf die zellattraktiven Bereiche migrieren. Dieser Ansatz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt. Durch die Mikrostrukturierung von Goldoberflächen mit temperaturschaltbarem Polymer und Fibronektin migrierten darauf kultivierte Zellen von dem Copolymerbereich auf das Fibronektin. Migrationsnegative Zellen verweilten auf dem Copolymerbereich und konnten mit Hilfe der Temperaturschaltung von der Oberfläche abgelöst werden. Dadurch verblieb eine Zellpopulation mit angereicherten migrationspositiven Zellen auf dem Fibronektin.

4.6.1 Mikrostrukturierte Biotin-Streptavidin Oberflächen

Zunächst wurde die Methodik der Oberflächenstrukturierung für spätere Anwendungen (gezielte Ausrichtung und Wanderung von Zellen) weiterentwickelt. Die bisher angewandte Methode des sogenannten „microcontact printing“ (μ CP) basiert auf manuellem Druck des PDMS-Stempels auf das jeweilige Substrat (siehe Kapitel 3.3.1.3). Da dies zu Inhomogenitäten im Übertrag sowie zum Verwischen der gestempelten Struktur führen kann, wurde die Mikrostrukturierung von Goldoberflächen in dieser Arbeit mittels einer einfachen Stempelvorrichtung realisiert. Dabei war das Ziel, eine Oberflächenstrukturierung mit hoher Homogenität über einen Bereich von mehreren 100 μ m, eine hohe Strukturschärfe sowie eine gute Handhabbarkeit zu erreichen.

Als Modellsystem zur Optimierung dieses Stempelverfahrens wurde das Biotin-Streptavidin-System ausgewählt. Hierbei wurde ein Biotin-Molekül, welches mit BSA (bovines Serumalbumin) gekoppelt ist, auf eine Glasoberfläche adsorbiert. BSA ist dafür bekannt, aufgrund hydrophober Wechselwirkung sehr gut an Glasoberflächen zu adsorbieren (Larsericsdotter *et al.*, 2005). Aufgrund der Kopplung des BSA an das Biotin wurde eine starke Oberflächenhaftung des Biotins auf der Glasoberfläche erreicht, was zur Herstellung homogener Biotin-Oberflächen beitrug. Für die Strukturierung von BSA-Biotin-Oberflächen eignet sich Streptavidin, da es mit vier Biotin-Bindungsstellen eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin ($K_D \sim 10^{-15} \text{ M}^{-1}$) aufweist. Um die gestempelte Struktur am CLSM zu visualisieren, wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Streptavidin488) verwendet. In Vorversuchen

ERGEBNISSE

konnte gezeigt werden, dass Streptavidin488 ausschließlich an Biotin-Oberflächen und nicht an freie Glasoberflächen bindet. Basierend hierauf wurde auf BSA-Biotin-Oberflächen mit Hilfe eines 16-Pin-Stempels (Abbildung 4.16) das Streptavidin488 strukturiert aufgebracht.

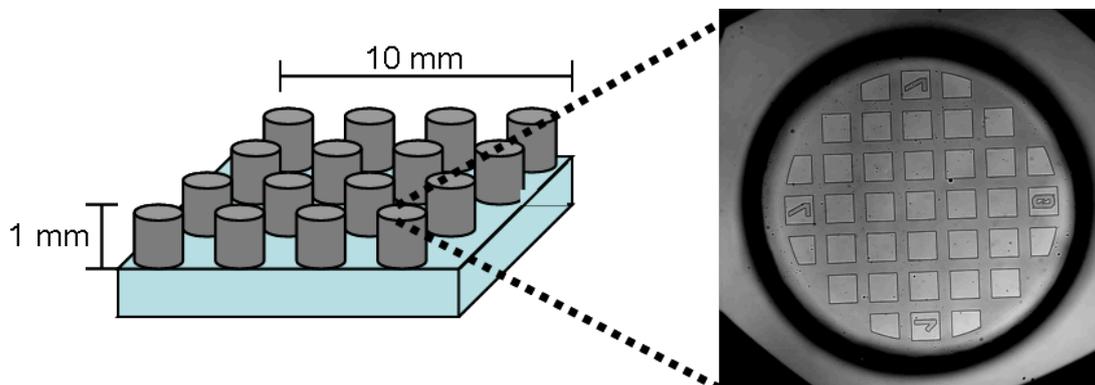


Abbildung 4.16: PDMS-16Pin-Stempel für die Mikrostrukturierung von Oberflächen. Die Stempelgröße beträgt 10 x 10 mm mit einer Pinhöhe von 1 mm und einer Fläche pro Pin von 1,2 mm². In jedem Pin befindet sich eine 5 µm erhabene Mikrostruktur mit 29 Kleinquadraten, die jeweils eine Abmessung von 100 x 100 µm aufweisen. (Die Stempelstruktur wurde freundlicherweise von Dr. Christian Albrecht, Lehrstuhl für Angewandte Physik, LMU München zur Verfügung gestellt).

In einem ersten Schritt wurden unterschiedliche Biotin-Beschichtungen getestet, um einen möglichst hohen Stempelübertrag des fluoreszenzmarkierten Streptavidins (Streptavidin488) zu ermöglichen. Über die Gewichte auf dem PDMS-Stempel wurde ein reproduzierbarer Anpressdruck in der Stempelmaschine hergestellt. Dies half, eine hohe Homogenität und Strukturschärfe der gestempelten Kleinquadrate zu erreichen. Bei einem eingesetzten Gewicht von 32 g ergibt sich bei einer Stempelfläche von 18 mm² ein Anpressdruck von 17,2 kPa. Der Übertrag des Stempels bei diesem Anpressdruck war inhomogen, da eine planare Auflage der 16-Pins auf dem Substrat nicht gegeben war (Abbildung 4.17 A). Wurde hingegen der Anpressdruck durch ein Gewicht von 100 g auf 54,5 kPa erhöht, wurde der PDMS-Stempel so deformiert, dass Bereiche zwischen den Kleinquadraten unerwünschterweise auf das Substrat übertragen wurden (Abbildung 4.17 B).

ERGEBNISSE

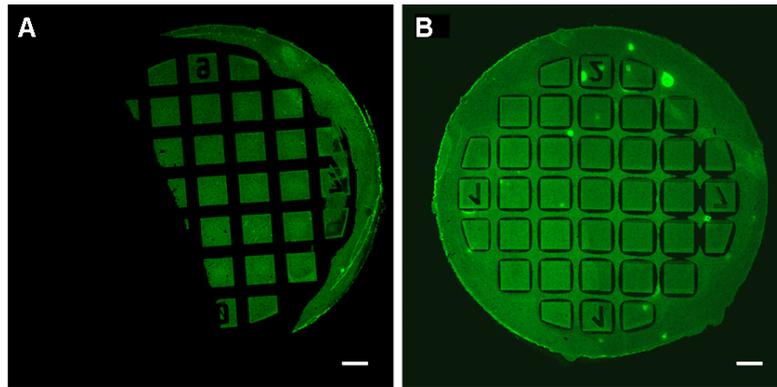


Abbildung 4.17: Mikrostrukturierung von BSA-Biotin-Oberflächen mit Streptavidin488 mit Hilfe eines PDMS-16Pin-Stempel bei unterschiedlichem Anpressdruck. **(A)** CLSM-Aufnahme des Streptavidin488-Stempelübertrags (1 Pin mit 29 Kleinquadraten). Der Stempelübertrag erfolgte bei 17,2 kPa. Der Stempelübertrag ist inhomogen, da der PDMS-Stempel bei diesem Anpressdruck nicht plan auf dem Substrat aufliegt. **(B)** Stempelübertrag bei 54,5 kPa, wodurch in den Bereichen zwischen den Quadraten unerwünschte Strukturen übertragen wurden. Maßstab: 100 μm .

Ein homogener Stempelübertrag mit hoher Strukturschärfe war bei einem Anpressdruck von 43,1 kPa (eingesetztes Gewicht: 79 g) gegeben (Abbildung 4.18). Um die Homogenität im Stempelübertrag zu bewerten, wurde der Stempelübertrag mittels eines CLSM visualisiert und als kalibriertes TIFF-Bild dokumentiert.

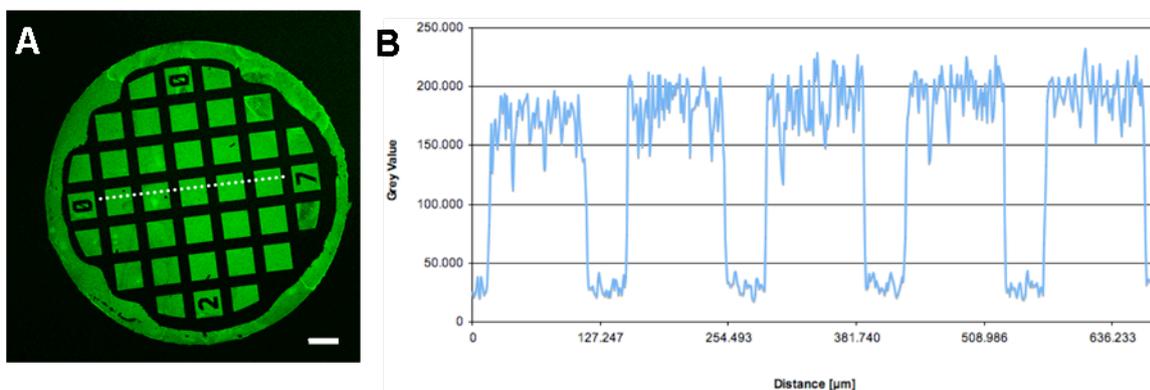


Abbildung 4.18: Mikrostrukturierung von BSA-Biotin-Oberflächen über Streptavidin488 mit Hilfe eines PDMS-16Pin-Stempel bei 43,1 kPa. **Links:** CLSM-Aufnahme des Streptavidin488-Stempelübertrags (1 Pin mit 29 Kleinquadraten). Weiße, gestrichelte Linie markiert den angelegten Linienplot zur Untersuchung der Homogenität und Strukturschärfe der Stempelung. **Rechts:** Linienplot-Profil der Stempelstruktur. Die jeweilige Peakschärfe ist konsistent mit der Kleinquadratbreite. Die nahezu konstante Signalstärke der Peaks lässt eine hohe Homogenität in den gestempelten Streptavidin488-Kleinquadraten erkennen. Maßstab: 100 μm .

ERGEBNISSE

Über die Mitte des TIFF-Bildes wurde in dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (National Institutes of Health, USA) ein horizontaler Linienplot angelegt (Abbildung 4.18 A; weiße, gestrichelte Linie) und als Linienplot-Profil dargestellt (Abbildung 4.18 B). Das Linienplot-Profil der gestempelten Mikrostruktur lässt eine gute Strukturschärfe anhand der jeweiligen Peakschärfe erkennen, welche konsistent zu der Breite eines Kleinquadrats (100 μm) ist. Die nahezu gleichbleibende Signalstärke der jeweiligen Peaks deutet auf eine hohe Homogenität innerhalb der jeweiligen Kleinquadrate hin.

4.6.2 Mikrostrukturierte, schaltbare Polymeroberflächen

4.6.2.1 Verhalten von 3T3-Zellen auf mikrostrukturierten Polymeroberflächen

Es wurde untersucht, ob das Polymer P15 auf Goldoberflächen gestempelt werden kann, ohne dabei das Schaltverhalten zu beeinflussen. Hierzu wurden 35 μm breite Linien mit schaltbarem Polymer erzeugt. 50 μm breite Zwischenräume stellten den unfunktionalisierten Bereich der Goldoberfläche dar.

Auf diese Oberfläche wurden 3T3 Fibroblasten ausgesät und beobachtet (Abbildung 4.19). Zellen auf einem unstrukturierten Bereich der Goldoberfläche zeigten innerhalb von 4 h Kultivierung Adhärenz und Ausbreitung (Abbildung 4.19 A). Durch Temperaturänderung konnte weder Zellabrundung noch Zellablösung in diesem Bereich beobachtet werden (Abbildung 4.19 B). Auf dem strukturierten Bereich der Goldoberfläche hingegen ordneten sich die Zellen nach 4 h Kultivierung in Linienform auf der Oberfläche an (Abbildung 4.19 C). Dieses Muster entspricht der Anordnung der gestempelten P15-Linien. Bemerkenswert ist, dass zwischen den Linien kaum Zellen zu finden waren, obwohl diese zunächst gleichmäßig verteilt ausgesät worden waren.

30 Minuten nach Änderung der Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ auf 25 $^{\circ}\text{C}$ waren ca. 70 - 80 % der Zellen pro Gesichtsfeld rund und konnten dann durch vorsichtiges Spülen mit einer Pipette von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 4.19 D).

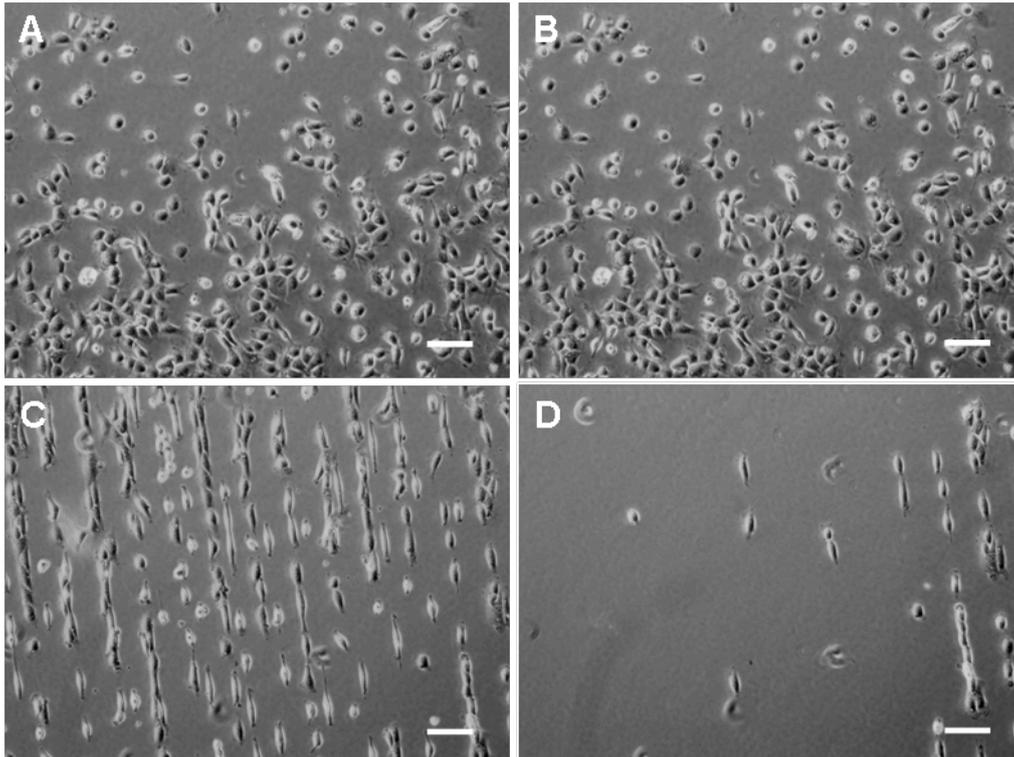


Abbildung 4.19: Verhalten von 3T3-Zellen auf mikrostrukturiertem P15-Au bei Temperaturänderung. Es wurde P15 in 35x50 µm Linien strukturiert auf einem Goldsubstrat aufgebracht. 3T3 Fibroblasten wurden auf der strukturierten Polymeroberfläche für 4 h bei 37 °C kultiviert. **(A)** Zelladhäsion und Zellausbreitung auf einem unstrukturierten Bereich des Goldsubstrats. **(B)** Nach Temperaturänderung auf 25 °C runden sich die Zellen in diesem Bereich weder ab noch können sie durch vorsichtiges Wegspülen von dem Substrat abgelöst werden. **(C)** Die Zellen sind nach 4 h Kultivierung bei 37 °C auf der strukturierten Polymeroberfläche adhären und ausgebreitet. **(D)** Nach Temperaturänderung auf 25 °C für 30 Minuten runden sich die Zellen ab und können anschließend durch vorsichtiges Wegspülen vom Substrat entfernt werden. Maßstab: 100 µm.

4.6.2.2 Mikrostrukturierung von P15-Au mit Fibronectin

Es wurde das Zellverhalten auf mikrostrukturierten Oberflächen mit einem zellattraktiven Bereich (extrazelluläre Matrixkomponente) und einem schaltbaren Adhäsionsbereich (P15) beobachtet. Hierzu wurde auf P15-Au das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin strukturiert in Form von 100 x 100 µm Linien gestempelt. L929 wurden auf dieser strukturierten Oberfläche kultiviert und bei Temperaturänderung beobachtet. Anschließend wurden die Zellen auf der strukturierten Oberfläche über fluoreszenzmarkiertes Concanavalin (ConA) angefärbt (siehe Kapitel 3.2). Mittels der ConA-Färbung können Zellen, Fibronectin sowie migrationsbedingte Zellproteinreste (Zellspuren) auf der Oberfläche identifiziert werden (Abbildung 4.20). Bei den Zellspuren handelt es sich um membranumhüllte

ERGEBNISSE

Strukturen, welche aus der Vor- und Rückzugsbewegung der Membran mit dem Zytoskelett resultieren. Während der Rückzugsbewegung bleiben Aktinfilamente aufgrund deren größeren Widerstands zurück, wodurch es zur Zellspurbildung auf dem Substrat kommt (Fuhr *et al.*, 1998). Die Zellspuren sind ein nützliches Werkzeug, um die von der Zelle vollzogene Migrationsbewegung nachverfolgen zu können.

Pro Gesichtsfeld sind etwa 80 – 90 % der Zellen auf den Fibronectin-Linien adhärent und ausgebreitet (Abbildung 4.20 A). Bemerkenswert ist, dass trotz Temperaturänderung (37 °C → 25 °C) in den auf P15-Au gestempelten Fibronectin-Bereichen keine signifikante Protein- bzw. Zellablösung beobachtet werden konnte. Offensichtlich sind die gestempelten Fibronectinschichten auf P15-Au zu dick, um durch ein Schalten der Oberfläche bei Temperaturänderung abgelöst zu werden.

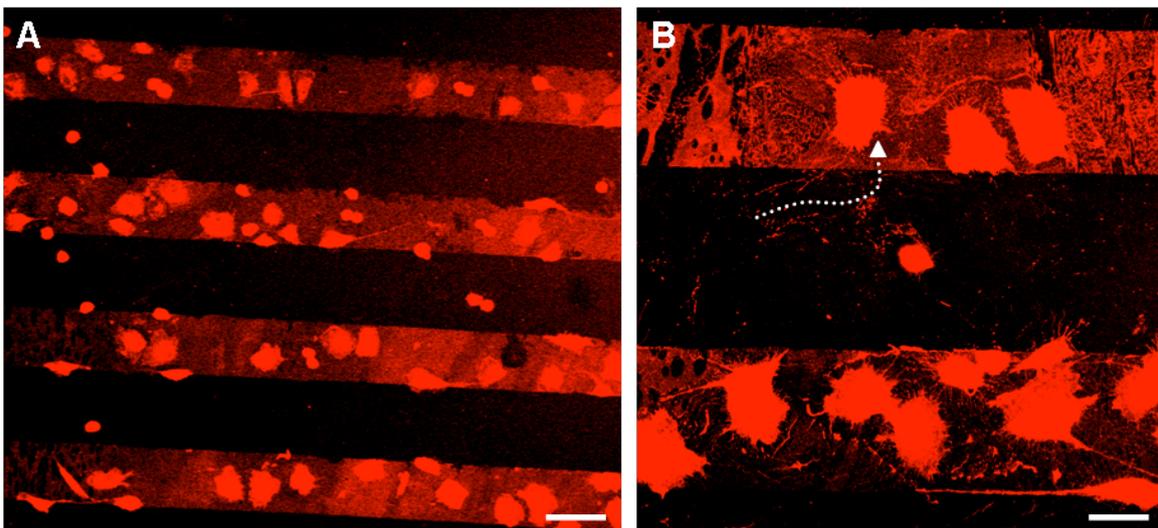


Abbildung 4.20: Verhalten von L929-Zellen auf mikrostrukturiertem Fibronectin-P15-Au Substrat. Gestempeltes Fibronectin und L929 wurden über ConA angefärbt, um die Mikrostrukturierung und das Wanderungsverhalten von Zellen sichtbar zu machen. **(A)** 80 - 90 % der Zellen sind auf den Fibronectin-Linien (rot) adhärent und ausgebreitet. Zellen, die auf den P15-Au-Bereichen (schwarz) sich befinden, sind aufgrund der Temperaturschaltung abgerundet. Maßstab: 100 µm. **(B)** Es gab Zellen, die von P15-Au (schwarz) auf Fibronectin (rot) migriert waren (weißer, gestrichelter Pfeil). Diese konnten anhand der angefärbten Zellspuren (Definition: siehe Text) identifiziert werden. Maßstab: 50 µm.

Darüber hinaus wurden Zellen anhand der angefärbten Zellspuren beobachtet, die von P15-Au auf Fibronectinbereiche migriert waren (Abbildung 4.20 B). Zellen, die auf P15-Au verblieben, wurden aufgrund der Temperaturschaltung abgerundet bzw. abgelöst.

5. Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung temperaturschaltbarer Polymeroberflächen zur Kontrolle der Einzelzelladhäsion an Oberflächen. Neben Funktionalität und Zellverträglichkeit wurden Haltbarkeit sowie Wiederverwendbarkeit solcher Oberflächen näher untersucht. Durch die Integration dieser Polymeroberflächen in mikrofluidische Systeme konnten adhärente Zellen kontrolliert aus Mikrokanälen entfernt werden. Die Modifikation der schaltbaren Polymeroberfläche erlaubte eine exakte Kontrolle über die Adhäsion unterschiedlicher Zelladhäsionstypen (Fibroblasten, Osteoblasten). Mit Hilfe mikrostrukturierter, temperaturschaltbarer Polymeroberflächen wurde der Ansatz einer oberflächenbasierten Trennung migrationsaktiver und -inaktiver Zellen weiterentwickelt.

5.1 Gold-Thiol-Chemie als Methode zur Herstellung von Polymeroberflächen

Die Motivation der in dieser Arbeit eingesetzten Oberflächenfunktionalisierungsmethode liegt in der Kontrollierbarkeit der Oberflächeneigenschaften auf molekularer Ebene, um die Anwendungsmöglichkeiten thermoresponsiver Polymeroberflächen zu verbessern und zu erweitern. Die Kontrolle über die Eigenschaften thermoresponsiver Polymeroberflächen auf molekularer Ebene ist mit den bisher beschriebenen Funktionalisierungsmethoden nicht möglich (Yamada *et al.*, 1990; Schmaljohann, 2005; Akiyama *et al.*, 2004). Mit Hilfe der Gold-Thiol-Chemie konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduzierbare, thermoresponsive Polymeroberflächen entwickelt werden, die sich sowohl durch eine gute Kontrollierbarkeit der Oberflächeneigenschaften als auch durch eine hohe Stabilität auszeichneten. Besonders die leichte Handhabbarkeit verbunden mit einem geringen Material- und Geräteaufwand vereinfachten die Präparation solcher Oberflächen. Der Grund für diese robusten Polymeroberflächen liegt an den gebildeten, stabilen SAMs Thiol-terminierter, thermoresponsiver Copolymere (Vericat *et al.*, 2005). Durch die Untermischung unterschiedlicher Thiol-Moleküle an der Goldoberfläche konnten thermoresponsive Polymeroberflächen individuell an unterschiedliche Zelltypen angepasst werden.

5.2 Funktion und Zellverträglichkeit von P15-Au

Als Vorlage für die in dieser Arbeit verwendeten Copolymere dienten die PNIPAAm-PEG-basierten Copolymere aus der Arbeit von Schmaljohann *et al.*, 2003. Darin wurden an PTFE-Oberflächen thermoresponsive PNIPAAm-PEG-Copolymere mit unterschiedlichen, intramolekularen PEG-Gehalten polymerisiert, die eine LCST nahe der Zellkultivierungstemperatur bei 37°C aufwiesen und aufgrund des PEG-Anteils einen starken Zellablösungseffekt bei Temperaturänderung erzielen konnten. Das Copolymer PNIPAAm-PEG(15%) wurde in der vorliegenden Arbeit als Thiol-terminiertes Polymer (P15) an Goldoberflächen gebunden. Die Kontaktwinkelwerte auf P15-Au waren etwas größer als die Kontaktwinkelwerte auf vergleichbaren Polymeroberflächen (Schmaljohann *et al.*, 2003). Aufgrund des geringeren PEG-Gehalts von P15-Au ergeben sich größere Kontaktwinkelwerte, was auf eine hydrophobere Oberfläche schließen lässt. L929 Fibroblasten konnten gut auf P15-Au kultiviert werden und organisierten sich sowohl als Einzelzelle als auch als Zellgruppen, was auf eine gute Zellverträglichkeit von P15-Au schließen lässt (Abbildung 4.3 A, 4.4 A). Nach Temperaturänderung betrug die Zeit für eine vollständige Ablösung eines adhärenen Zellverbands ca. 35 Minuten (Abbildung 4.3). Im Vergleich dazu berichtete Schmaljohann, 2005 eine Ablösung eines adhärenen L929-Zellverbands auf einer PNIPAAm-PEG(23%)-Oberfläche nach 20 Minuten bei Temperaturänderung. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass die Polymeroberfläche von Schmaljohann, 2005 einen höheren intramolekularen PEG-Gehalt als P15-Au aufweist. Da PEG eine hygroskopische Eigenschaft besitzt, erhöht sich mit steigendem PEG-Gehalt die Hydratisierung der gesamten Polymerschicht (Harris, 1992), wodurch sich Zellen schneller von der Oberfläche ablösen. Andere Studien über die Zellablösung an PNIPAAm-PEG-Oberflächen berichten, dass deren hergestellten Copolymeroberflächen einen maximalen intramolekularen PEG-Gehalt von 0,5 wt% aufweisen, damit die LCST noch unterhalb von 37 °C liegt und somit Zellen auf der Oberfläche adhären können (Kwon *et al.*, 2003). Dies steht im Widerspruch zu den Daten der vorliegenden Arbeit sowie der Arbeit von Schmaljohann, 2005. Gründe hierfür könnten andere Polymerisations- oder Funktionalisierungsmethoden (z.B. Elektronenstrahlverdampfer) sein, welche zu einer anderen Polymerstruktur bzw. -verhalten an der Oberfläche führen. Dadurch können sich auch Änderungen im Zelladhäsionsverhalten ergeben.

DISKUSSION

Die Ablösung von Einzelzellen auf P15-Au konnte mit nahezu gleich bleibendem Zellabrundungsanteil (ca. 79 %) und Zellablösungszeiten reproduziert werden (Abbildung 4E). Die gute Reproduzierbarkeit und hohe Stabilität von P15-Au bestätigte sich durch die Untersuchung von Haltbarkeit und Wiederverwendbarkeit solcher Oberflächen (Kapitel 4.4). Bisherige Studien auf PNIPAAm-PEG-basierten Oberflächen haben diese Parameter bisher nicht näher betrachtet. Die Haltbarkeit von P15-Au wurde im Bezug auf unterschiedliche Lagerungsbedingung (Vakuum, Umgebungsluft, Temperatur) über einen Zeitraum von 6 Wochen näher untersucht (Abbildung 4.6). Eine effiziente Zellablösung (70 – 90 %) war auf 2 Woche alten P15-Au-Oberflächen, die bei Raumtemperatur unter Vakuum gelagert wurden, gegeben. Eine längere Lagerung der Oberflächen ergab Schwankungen in der Zellablösungsrate. Ursache hierfür könnten strukturelle Veränderungen oder Kontaminationen an der Oberfläche während der Lagerung sein. Möglicherweise könnten auch Inhomogenitäten an der Goldoberfläche während der Oberflächenpräparation aufgetreten sein, die sich erst bei längerer Lagerung auf die Oberflächenschaltbarkeit auswirkten. Anhand der Daten des 1. Versuchs nach 6 Wochen Lagerung lässt sich erkennen, dass die bis zu 6 Wochen alten P15-Au-Oberflächen eine effiziente Oberflächenschaltbarkeit gewährleisteten. Für eine genauere Aussage müssten hierzu noch mehrere Versuche durchgeführt werden. Eine Lagerung bei Umgebungsluft ist aufgrund der undefinierten Luftbedingung nicht zu empfehlen. Die Oberflächenschaltbarkeit der bei 40 °C gelagerten Oberflächen reduzierte sich bei der Zellablösung deutlich, so dass diese für eine effiziente Nutzung nicht einsetzbar sind.

Die Wiederverwendbarkeit von P15-Au wurde an einer frisch präparierten Oberfläche (Tag 0) sowie an einer 1 Woche alten Oberfläche (Woche 1) untersucht. Auf beiden Polymeroberflächen waren bei zweimaliger Nutzung hohe Zellablösungsraten (79 % - 97 %) gegeben. Nach dreimaliger Nutzung war die Wiederverwendbarkeit der Polymeroberfläche stark beeinträchtigt. Für beide Oberflächen sank die Zellablösungsrate auf unter 50 %. Eine mögliche Ursache könnte die Proteinadsorption auf P15-Au bei mehrmaliger Kultivierung sein. Durch PBS-Behandlung der Oberflächen zwischen der jeweiligen Kultivierung sollten die adsorbierten Proteine entfernt werden. Es wäre denkbar, dass die Proteine in die Zwischenräume der einzelnen Polymere an die Goldoberfläche adsorbieren und damit die Flexibilität der Polymerketten während des Schaltens beeinflussen.

DISKUSSION

Dadurch wäre das Hydratisierungsvermögen der Polymeroberfläche so vermindert, dass für jeden weiteren Schaltzyklus die Oberflächenschaltbarkeit weiter abnimmt.

Die Anwendung schaltbarer Oberflächen soll die Handhabung adhärenter Zellen für zellbiologische Fragestellungen erleichtern. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Anwendungen für die schaltbare Polymeroberfläche P15-Au aufgezeigt werden, welche einen Beitrag zu einer einfacheren Handhabung adhärenter Zellen liefern soll.

Die erste Anwendung ermöglicht eine definierte Kontrolle über das Zelladhäsionsverhalten in mikrofluidischen Systemen. Durch die Integration der schaltbaren Oberfläche P15-Au in ein mikrofluidisches System wurde ein System entwickelt, welches zwei wesentliche Vorteile gegenüber bisherigen Methoden bietet. Ein erster Vorteil dieses Systems liegt in der kontrollierten Zellablösung. Durch die in mikrofluidischen Kanälen üblicherweise vorherrschenden laminaren Strömungen konnten abgerundete bzw. abgelöste Zellen schonend und kontrolliert aus dem Kanal transportiert werden. Mit der angelegten Strömung im Kanal konnte die zur kompletten Zellablösung nötige Zellumströmungsgeschwindigkeit bestimmt werden. Ein zweiter Vorteil dieses Systems liegt in der schonenden Zellablösung in dem mikrofluidischen Kanal (Abbildung 4.5). Darin wurden Zellen auf P15-Au kultiviert und durch Temperaturänderung schonend und effizient von der Polymeroberfläche abgelöst, ohne dabei eine enzymatische Behandlung durchführen zu müssen. Bisherige Untersuchungen über schonende Methoden zur Ablösung von Zellen konnten zeigen, dass durch diese Art der Behandlung Zellen weniger geschädigt bzw. weniger in Ihrem Verhalten beeinflusst werden als bei enzymatischen oder mechanischen Ablösemethoden (Canavan *et al.*, 2005). Die enzymatische Ablösung von Zellen wird häufig in mikrofluidischen Kanälen eingesetzt (Weibel *et al.*, 2005; Takayama *et al.*, 1999). Dadurch können nachfolgende Kultivierungen aufgrund von enzymatischen Rückständen in den mikrofluidischen Kanälen erschwert werden.

Die Korrelation des Zellablösungsanteils mit der jeweils angelegten Zellumströmungsgeschwindigkeit zeigte, dass 20 % aller abgerundeten Zellen von der Polymeroberfläche nicht abgelöst werden konnten (Abbildung 4.5 E). Hierfür können zwei Ursachen verantwortlich sein. Zum einen könnten sich während der Oberflächenpräparation Inhomogenitäten ergeben haben, wodurch die verbliebenen Zellen stärker auf der Oberfläche adhäreren konnten. Zum anderen ist es eine

DISKUSSION

Tatsache, dass nicht jede Zelle innerhalb einer Zellpopulation mit derselben Adhäsionskraft auf der Oberfläche verweilt. Dies zeigt sich beispielsweise bei der üblichen Zellkultivierung in Zellkulturschalen. Dort benötigen Zellen innerhalb einer Population für Adhäsion und Ausbreitung unterschiedlich lange. Zudem können enzymatische Behandlungen von Zellen dieses unterschiedliche Zellverhalten verstärken, was wiederum zu einer Änderung des Zellteilungszyklus beitragen kann. Die zweite Anwendung temperaturschaltbarer Oberflächen erweitert den Ansatz für eine oberflächenbasierte Trennung von Zellen mit unterschiedlicher Migrationsaktivität. Ziel der oberflächenbasierten Zelltrennung ist es, Zellen aufgrund ihrer eigenen Aktivität zu trennen und diese dann für weiterführende Untersuchungen verwenden zu können. Die oberflächenbasierte Zelltrennung erfolgt mit Hilfe von mikrostrukturierten, schaltbaren Oberflächen. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst die Methode der Mikrostrukturierung mittels einer Stempelvorrichtung an Biotin-Streptavidin-Oberflächen optimiert, um Oberflächen mit einer höheren Strukturschärfe, Homogenität und Reproduzierbarkeit zu erzeugen. An der Stempelvorrichtung konnte mit Hilfe von Gewichten der Anpressdruck des Stempels auf dem Substrat optimal eingestellt werden. Durch einen Anpressdruck von 43,1 kPa konnten mikrostrukturierte Biotin-Streptavidin-Oberflächen mit einem reproduzierbaren, homogenen und strukturscharfen Stempelübertrag erzielt werden (Abbildung 4.17, 4.18).

Mit dieser optimierten Oberflächenstrukturierungsmethode wurde nun versucht, schaltbare, mikrostrukturierte Oberflächen für eine oberflächenbasierte Zelltrennung zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass das temperaturschaltbare Polymer P15 funktionell auf Goldoberflächen gestempelt werden konnte und darauf kultivierte Fibroblasten sich entlang der P15-Linienstruktur anordneten (Abbildung 4.19 C, D). Interessant dabei war, dass sich die Zellen auf den Polymerbereichen anordnen und nicht auf der unfunktionalisierten Goldoberfläche. Auf unstrukturierten Goldoberflächen adhärten und breiteten sich die Zellen nach 4 h Kultivierung aus (Abbildung 4.19 A). Hingegen auf unstrukturierter Polymeroberfläche betrug die Kultivierungsdauer für Adhärenz und vollständige Zellausbreitung ca. 48 h. Dieser Sachverhalt verhielt sich auf der strukturierten P15-Au-Oberfläche genau umgekehrt. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass für die Zelladhäsion nicht nur das Substrat entscheidend ist, sondern auch die Oberflächentopographie (Tan und Saltzman, 2002; Liliensiek *et al.*, 2006).

DISKUSSION

In einem zweiten Experiment wurde untersucht, ob auf P15-Au Fibronectin mikrostrukturiert aufgebracht werden konnte, um ein Substrat mit einem zellattraktiven und einem schaltbaren Bereich herzustellen. Auf dieser strukturierten, schaltbaren Oberfläche adhärten und migrierten Zellen auf die Fibronectinbereiche (Abbildung 4.20). Zellen, die auf den Polymerbereichen adhärten und keine Migration auf Fibronectin vollzogen haben, konnten durch Temperaturänderung von der Oberfläche abgerundet bzw. abgelöst werden. Dabei ist anzumerken, dass die gestempelte Fibronectinschicht von der Polymeroberfläche bei Temperaturänderung nicht abgelöst wird. Im Gegensatz dazu zeigt eine bisherige Studie, dass sich bei Temperaturänderung kultivierte Zellschichten zusammen mit der EZM von der thermoresponsiven Polymeroberfläche ablösen (Cheng *et al.*, 2006). Vermutlich ist die gestempelte Fibronectinschicht auf thermoresponsiver Polymeroberfläche bei Temperaturänderung stabiler als aus Lösung adsorbierte Proteine.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz der oberflächenbasierten Trennung von Zellen ist bisher durch die Positionierung der Zellen auf dem Substrat limitiert. Für eine effizientere Trennung von migrationspositiven und –negativen Zellen müssten die Zellen zu Beginn der Kultivierung ausschließlich auf dem schaltbaren Polymerbereich adhären, um deren Migrationsaktivität auf die Fibronectinbereiche besser untersuchen zu können. Für dieses technische Problem konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit keine Lösung gefunden werden.

5.3 Anpassung schaltbarer Oberflächen für eine zelltypspezifische Adhäsionskontrolle

Die in dieser Arbeit entwickelten, thermoresponsiven Polymeroberflächen wurden speziell für die Adhäsionskontrolle von Einzelzellen entwickelt, um die Untersuchung von Einzelzellen zu erleichtern. Durch die Einzelzellanalytik kann eine präzisere Information über die Zellheterogenität innerhalb einer Zellpopulation erhalten werden als bei der Untersuchung eines Zellverbands (Svahn und van den Berg, 2007).

Aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen (Fibroblasten, Osteoblasten) mit den verschiedenen Adhäsionseigenschaften war eine Modifikation der Polymeroberfläche nötig, um eine zelltypspezifische, effiziente und schonende Zellablösung zu ermöglichen. Für die Optimierung der Schaltkinetik und der Schalteffizienz von schaltbaren Polymeroberflächen wurde der PEG-Gehalt der Polymeroberfläche

DISKUSSION

erhöht, da PEG dafür bekannt ist, die Proteinadsorption bzw. Zelladhäsion an Oberflächen zu reduzieren (Harris, 1992). Für die Erhöhung des PEG-Gehalts wurden zwei Ansätze verfolgt. Zuerst wurde ein neues Copolymer mit einem intramolekularen PEG-Gehalt von 19% wt. (P19) eingesetzt, da dieses Copolymer eine LCST aufwies, welche noch unterhalb der optimalen Kultivierungstemperatur von 37 °C lag (Abbildung 4.8). Dieses Ergebnis ist konsistent zu den bisherigen LCST-Daten vergleichbarer Polymeroberflächen (Schmaljohann, 2005). Aus den Kontaktwinkeldaten der hergestellten Polymeroberflächen P15-Au und P19-Au kann man erkennen, dass P19-Au im Vergleich zu P15-Au niedrigere Kontaktwinkelwerte im untersuchten Temperaturbereich aufweist (Abbildung 4.9). Dies deutet auf eine höhere Hydrophilie von P19-Au hin. Aufgrund dessen, dass PEG eine hygroskopische Eigenschaft besitzt (Harris, 1992), ist es nahe liegend, dass auf P19-Au durch den höheren intramolekularen PEG-Gehalt eine höhere Hydrophilie gegeben ist, als auf P15-Au. Der Temperaturabhängigkeitsverlauf der Kontaktwinkeldaten von P15-Au und P19-Au war nahezu parallel. Das lässt auf eine ähnliche Polymerstruktur und Schaltverhalten beider Polymeroberflächen schließen. In einem zweiten Ansatz wurde die leichte Handhabbarkeit und Flexibilität der Gold-Thiol-Chemie ausgenutzt. Mit Hilfe dieser Methode können Oberflächen mit unterschiedlicher molarer Zusammensetzung und Funktionalität hergestellt werden. Dazu wurde der intermolekulare PEG-Gehalt an der Polymeroberfläche P19-Au erhöht (P19/PG-Au). Aufgrund des höheren, intermolekularen PEG-Gehalts ergaben sich auf P19/PG(1:6)-Au niedrigere Kontaktwinkelwerte als auf P19-Au. Dies lässt eine höhere Hydrophilie von P19/PG(1:6)-Au erkennen. Der Temperaturabhängigkeitsverlauf der Kontaktwinkeldaten von P19-Au und P19/PG(1:6)-Au war nahezu parallel (Abbildung 4.12). Daraus lässt sich schließen, dass das Verhalten der modifizierten, schaltbaren Polymeroberfläche ähnlich zu dem Verhalten der unmodifizierten Polymeroberfläche ist. Die geringfügigen Abweichungen des Temperaturabhängigkeitsverlaufs im Temperaturbereich unterhalb der LCST (20 °C - 30 °C) zwischen P19-Au und P19/PG(1:6)-Au könnte auf intermolekulare und intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Auf P19-Au existieren theoretisch intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von P19 und intermolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen P19 und Goldoberfläche. Dagegen wäre auf P19/PG(1:6)-Au denkbar, dass die intermolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen

DISKUSSION

zwischen P19 und Goldoberfläche aufgrund des PG minimiert werden, wodurch überwiegend intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von P19 auftreten. Dieser Umstand könnte dazu führen, dass auf P19/PG(1:6)-Au für eine vollständige Entfaltung des Polymers unterhalb der LCST (Hydratisierung) nur intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen überwunden werden müssen, was wiederum zu niedrigeren Kontaktwinkeln und einem flacheren Verlauf der Kontaktwinkel im Temperaturbereich von 20 °C – 30 °C auf P19/RGD(1:8)-Au beitragen könnte.

Ergänzend zu den Kontaktwinkeldaten wurde von P19-Au sowie von P19/PG(1:6)-Au die Oberflächenzusammensetzung mittels XPS näher charakterisiert. Über einen Abgleich des ermittelten Spektrums mit einem simulierten Spektrum konnte die erwartete Oberflächenzusammensetzung von P19-Au bestätigt werden (Abbildung 4.10). Basierend auf den erhobenen Daten konnte eine Schichtdicke von ca. 3-4 nm für P19-Au abgeleitet werden, was mit bisherigen Untersuchungsergebnissen von Schichtdicken auf PNIPAAm-Au konsistent ist (Cho *et al.*, 2004). Die XPS-Daten von P19/PG(1:6)-Au deuteten daraufhin, dass das in Lösung eingestellte Thiol-Verhältnis in einem nahezu ähnlichen Verhältnis an der Goldoberfläche gebunden wurde.

Die Zellverträglichkeit und die Schaltbarkeit der in dieser Arbeit entwickelten, thermoresponsiven Polymeroberflächen wurden über das Zelladhäsionsverhalten getestet. Nach 3-tägiger Kultivierung von L929 Fibroblasten auf P15-Au und P19-Au wurde im Vergleich deutlich, dass die adhären Zellen auf P19-Au nach 3 Tagen geringfügig weniger ausgebreitet waren als auf P15-Au (Abbildung 4.11). Dies kann möglicherweise aus dem höheren intramolekularen PEG-Gehalt von P19-Au resultieren, der auf einer dehydratisierten Polymeroberfläche (37 °C) zu einer langsameren Zellausbreitung beitragen kann. Die Zellablösung bei 25 °C war auf P19-Au bei gleich bleibendem Zellabrundungsanteil doppelt so schnell. Dieser erwartete Effekt ergibt sich aus dem höheren intramolekularen PEG-Gehalt, welcher zu einer stärkeren Hydratisierung der Oberfläche beiträgt.

Die Schaltbarkeit von der modifizierten Polymeroberfläche P19/PG(1:6)-Au wurde über das Zelladhäsionsverhalten von MG63 Zellen getestet (Abbildung 4.13B), die als stark adhären Zellen bekannt sind (Kieswetter *et al.*, 1996). MG63 konnten gut auf P19/PG(1:6)-Au kultiviert werden, was auf eine gute Zellverträglichkeit schließen lässt. Nach Temperaturänderung lösten sich ca. 74 % der Zellen innerhalb von 30

DISKUSSION

Minuten ab. Auf Polymeroberflächen mit einem höheren oder niedrigeren intermolekularen PEG-Gehalt konnten die Zellen entweder nicht adhären oder sich bei Temperaturänderung nicht ablösen.

Die Betrachtung der Ergebnisse der Zellablösung sowie der Kontaktwinkelmessung auf P19-Au und P19/PG(1:6)-Au zeigen, dass durch Modifikation von P19-Au mit PG die Oberflächenbenetzbarkeit zwar verändert wurde, aber der Schaltmechanismus der Polymeroberfläche dadurch nicht beeinflusst wurde.

Ein Grund für die relativ langandauernde Zelladhäsion und –ausbreitung (3 Tage) auf unmodifizierter P19-Au war vermutlich der zu hohe intramolekulare PEG Anteil. Da dies für die praktische Verwendung eine sehr lange Zeit ist, wurde versucht, die Oberfläche derart zu modifizieren, dass sie für L929 Zellen eine bessere und schnellere Adhäsion ermöglicht. Es wurde eine Coadsorption von P19 mit dem aus der Literatur bekannten Fibroblasten-attraktiven CGGRGDS-Peptid in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an Goldoberflächen durchgeführt (Hersel *et al.*, 2003). Die Modifikation von P19-Au für schwach adhären Zelltypen ermöglichte eine Verkürzung der Kultivierungsdauer auf diesen Oberflächen, was für weiterführende Experimente einen großen zeitlichen Gewinn bot. Es wurden modifizierte Polymeroberflächen mit unterschiedlichen Anteilen von P19 und RGD hergestellt. Der Vergleich der Kontaktwinkeldaten zwischen P19-Au und P19/RGD(1:8)-Au zeigte, dass der Temperaturabhängigkeitsverlauf von P19/RGD(1:8)-Au gegenüber P19-Au flacher war (Abbildung 4.14). Dies könnte auf intermolekulare und intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Auf P19-Au existieren vermutlich intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von P19 und intermolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen P19 und Goldoberfläche. Dagegen wäre auf P19/RGD(1:8)-Au denkbar, dass die intermolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen P19 und Goldoberfläche aufgrund des RGD minimiert werden, wodurch überwiegend intramolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von P19 auftreten. Dieser Umstand könnte dazu führen, dass auf P19/RGD(1:8)-Au für eine vollständige Entfaltung des Polymers unterhalb der LCST (Hydratisierung) nur intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen überwunden werden müssen, was wiederum zu niedrigeren Kontaktwinkeln und einem flacheren Verlauf der Kontaktwinkel im Temperaturbereich von 20 °C – 30 °C auf P19/RGD(1:8)-Au

DISKUSSION

beitragen könnte. Die Schaltbarkeit von P19/RGD(1:8)-Au wurde über das Zelladhäsionsverhalten von L929 Zellen getestet (Abbildung 4.15). Auf P19/RGD(1:8)-Au war die Zelladhäsion und Zellausbreitung deutlich schneller als auf P19-Au (Abbildung 4.15 B). Dieses Zellverhalten ist auf das RGD-Peptid zurückzuführen, wodurch die Affinität der Zelle zum Substrat verstärkt wird. Dies ist konsistent zu bisherigen Zelladhäsionsstudien an RGD-funktionalisierten Oberflächen (Hersel *et al.*, 2003; Ebara *et al.*, 2004). Der Zellabrundungsanteil auf P19/RGD(1:8)-Au blieb im Vergleich zu P19-Au auf einem gleich hohen Niveau.

Die Anwendung der Gold-Thiol-Chemie zur Modifikation temperaturschaltbarer Polymeroberflächen hat gezeigt, dass mit Hilfe dieser Methode schaltbare Oberflächen hergestellt werden können, die der komplexen Anforderung an eine individuelle Zelladhäsionskontrolle gerecht werden. Durch die bisherig beschriebenen Oberflächenfunktionalisierungsmethoden (Schmaljohann *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 1990) wäre die Herstellung solcher Oberflächen für eine individuelle Zelladhäsionskontrolle ein äußerst schwierig kontrollierbarer Prozess.

6. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bieten einen Ansatz für weiterführende Entwicklungen und Anwendungen im Hinblick auf eine effiziente, kontrollierte und schonende Ablösung adhärenter Zellen.

Die Gold-Thiol-Chemie hat sich als eine einfache und effiziente Oberflächenfunktionalisierungsmethode für die funktionelle Anbindung thermoresponsiver Polymere herausgestellt. Sie gewährleistet eine große Oberflächenstabilität und gute Reproduzierbarkeit. Mit Hilfe dieser Methode konnten schaltbare Oberflächen für eine zelltypspezifische Kontrolle des Adhäsionsverhaltens entwickelt werden. Die individuell-angepassten Polymeroberflächen für unterschiedliche Zelltypen (Osteoblasten, Fibroblasten) können für Einzelzell-basierte Analysen eingesetzt werden. Diese haben zum Ziel, die Wechselwirkung einzelner Zellen mit ihrer Umgebung zu untersuchen, um eine präzisere Information über die Heterogenität einer Zellpopulation zu erhalten. Eine wichtige Voraussetzung für diese Untersuchungen ist, Zellen so wenig wie nur möglich in ihrem Verhalten zu beeinflussen, um eine Verfälschung der Information bzgl. der Zellheterogenität zu vermeiden. Hierzu werden die in dieser Arbeit entwickelten Oberflächen einen wesentlichen Beitrag leisten können.

Um das Potential schaltbarer Oberflächen zu erweitern, könnte die Oberflächeneigenschaft für eine beschleunigte Adhäsion schwach adhärenter Zellen (z.B. HEK293) noch individueller angepasst werden. Hierzu wären für die Modifikation von Polymeroberflächen statt RGD-Peptide auch andere zellattraktive Peptidmotive (z.B. GFOGER (Kollagen), NRDKETKV (Cadherin)) denkbar. Damit würde das „Sortiment an Molekülen“ für die Modifikation schaltbarer Oberflächen erweitert werden, wodurch dieses System für eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen einsetzbar wäre.

Für eine beschleunigte Zellablösung stark adhärenter Zelltypen (z.B. Chondrozyten) wäre es sinnvoll, eine noch genauere Charakterisierung thermoresponsiver Polymeroberflächen im Bezug auf deren Schalteigenschaft (Schaltkinetik / Schalteffizienz) durchzuführen.

Ein möglicher Ansatz hierzu wäre die Messung der Abrisskraft von Zellen an thermoresponsiven Oberflächen bei unterschiedlichen Temperaturen. Daraus könnte

AUSBLICK

man eine Information über die jeweilige Zelladhäsionskraft an diesen Oberflächen ableiten und die Kontrolle über die Adhäsion unterschiedlicher Zelltypen durch entsprechende Oberflächenmodifikation optimieren. Im Rahmen einer Kooperation mit der TU Dresden konnten erste, viel versprechende Ergebnisse hinsichtlich der Oberflächencharakterisierung erzielt werden, die künftig weiterverfolgt werden sollte. In der Untersuchung wurde eine Zelle an einen Kantilever eines AFM (engl. atomic force microscope) fixiert und die thermoresponsive Oberfläche mit der Zelle in Kontakt gebracht. Danach wurde der Kantilever mit der Zelle wieder von der Oberfläche entfernt und die Abrisskraft der Zelle an der Oberfläche gemessen. Dies wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (37 °C, 25 °C) durchgeführt. Die ersten Ergebnisse deuten auf ein schwächeres Adhäsionsverhalten bei 25 °C als bei 37 °C hin.

Die Untersuchung der Stabilität von P15-Au zeigte, dass diese Oberfläche eine lange Haltbarkeit sowie eine häufige Wiederverwendbarkeit für Zellablösungsversuche ermöglicht. Aufgrund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit konnten die modifizierten Polymeroberflächen (P19/PG-Au, P19/RGD-Au) hinsichtlich ihrer Stabilität (Haltbarkeit, Wiederverwendbarkeit) nicht näher untersucht werden. Für eine zukünftige, kommerzielle Nutzung solcher Oberflächen ist dies jedoch ein wichtiger Parameter, der künftig näher betrachtet werden sollte.

Der Ansatz mikrostrukturierter, schaltbarer Oberflächen für eine oberflächenbasierte Trennung ist eine interessante Anwendung für die Separation migrationsaktiver und –inaktiver Zellen. Dieses Prinzip bietet den wesentlichen Vorteil gegenüber anderen Systemen wie z.B. der FACS-Messung (engl. fluorescence activated cell sorter), dass für eine Separation von Zellen keine Antikörper oder Färbungen nötig sind, die ein weiteres Arbeiten mit separierten Zellen unmöglich machen. Für eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes müsste das technische Problem der Zellpositionierung auf den schaltbereichen Bereichen des mikrostrukturierten Substrats gelöst werden.

Alle aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten auf andere gebräuchlichere Oberflächenmaterialien übertragen werden, um eine effizientere Nutzung sowie eine Erweiterung der Anwendbarkeit solcher Systeme zu erreichen.

Literaturverzeichnis

- Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M. & Okano, T. (2004) Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* **20**, 5506-5511.
- Bae, Y., Okano, T. & Kim, S. (1990) Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N-alkyl substituted acrylamides) in water. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **28**, 923-936.
- Becker, H. & Locascio, L. E. (2002) Polymer microfluidic devices. *Talanta* **56**, 267.
- Beebe, D. J., Mensing, G. A. & Walker, G. M. (2002) Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* **4**, 261-286.
- Bernard, A., Michel, B. & Delamarche, E. (2001) Micromosaic immunoassays. *Anal. Chem.* **73**, 8-12.
- Brunette, D. (2001) Principles of cell behaviour on titanium surfaces and their application to implanted devices; Titanium in medicine. *Springer-Verlag, Heidelberg*, 485-512.
- Canavan, H. E., Cheng, X., Graham, D. J., Ratner, B. D. & Castner, D. G. (2005) Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: a surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *J Biomed Mater Res A* **75**, 1-13.
- Chen, G., Imanishi, Y. & Ito, Y. (1998) Effect of protein and cell behavior on pattern-grafted thermoresponsive polymer. *Journal of Biomedical Materials Research* **42**, 38-44.
- Cheng, J., Shoffner, M. A., Hvichia, G. E., Kricka, L. J. & Wilding, P. (1996) Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. *Nucl. Acids Res.* **24**, 380-385.
- Cheng, X., Canavan, H. E., Graham, D. J., Castner, D. G. & Ratner, B. D. (2006) Temperature dependent activity and structure of adsorbed proteins on plasma polymerized N-isopropyl acrylamide. *Biointerphases* **1**, 61-72.
- Cho, E. C., Kim, Y. D. & Cho, K. (2004) Thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide) monolayer on gold: synthesis, surface characterization, and protein interaction/adsorption studies. *Polymer* **45**, 3195.
- da Silva, R. M. P., Mano, J. F. & Reis, R. L. (2007) Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *Trends in Biotechnology* **25**, 577-583.
- Delamarche, E., Michel, B., Biebuyck, H. & Gerber, C. (1996) Golden interfaces: The surface of self-assembled monolayers. *Advanced Materials* **8**, 719-729.

LITERATURVERZEICHNIS

- Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J., Kalb, A., Dodson, E., Papiz, M. & Wan, T. (1989) The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. *Embo J* **8**, 2189-2193.
- Dörfler, H. (2002) Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Physik und Chemie. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Dubois, L. H. & Nuzzo, R. G. (1992) Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annual Review of Physical Chemistry* **43**, 437-463.
- Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A. & Whitesides, G. M. (1998) Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **70**, 4974-4984.
- Duracher, D., Sauzedde, F., Elaissari, A., Perrin, A. & Pichot, C. (1998) Cationic amino-containing N -isopropyl- acrylamide–styrene copolymer latex particles: 1-Particle size and morphology vs. polymerization process. *Colloid & Polymer Science* **276**, 219.
- Ebara, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Kikuchi, A., Sakai, K. & Okano, T. (2004) Temperature-responsive cell culture surfaces enable "on-off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands. *Biomacromolecules* **5**, 505-510.
- Ebberink, J., Ehrmann, R. & Menken, G. (1984) Anwenderbezogene ESCA-Oberflächenuntersuchungen in der industriellen Technik. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **319**, 809-811.
- Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. (1996) Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annual Review of Materials Science* **26**, 365-294.
- Ernst, O., Lieske, A., Jager, M., Lankenau, A. & Duschl, C. (2007) Control of cell detachment in a microfluidic device using a thermo-responsive copolymer on a gold substrate. *Lab on a Chip* **7**, 1322-1329.
- Figeys, D. & Pinto, D. (2000) Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences. *Anal.Chem.* **72**, 330A-335A.
- Fuhr, G., Richter, E., Zimmermann, H., Hitzler, H., Niehus, H. & Hagedorn, R. (1998) Cell traces- footprints of individual cells during locomotion and adhesion. *Biol. Chem* **379**, 1161-1173.
- Fujita, K., Nakamura, N., Ohno, H., Leigh, B. S., Niki, K., Gray, H. B. & Richards, J. H. (2004) Mimicking Protein-Protein Electron Transfer: Voltammetry of pseudomonas aeruginosa azurin and the thermus thermophilus CuA Domain at w-derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13954-13961.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gast, F. U., Dittrich, P. S., Schwille, P., Weigel, M., Mertig, M., Opitz, J., Queitsch, U., Diez, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Schinkinger, S., Guck, J., Käs, J., Smolinski, J., Salchert, K., Werner, C., Duschl, C., Jäger, M. S., Uhlig, K., Geggier, P. & Howitz, S. (2006) The microscopy cell (MicCell), a versatile modular flowthrough system for cell biology, biomaterial research, and nanotechnology. *Microfluidics and Nanofluidics* **2**, 21.
- Grinell, F. & Feld, M. (1982) Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J. Biol. Chem.* **257**, 4888-4893.
- Harris, J. M. (1992) Introduction to biotechnical and biomedical application of poly(ethylene glycol). In: Harris JM, editor. Poly(ethylene glycol) chemistry. New York: Plenum Press.
- Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385.
- Heskins, M. & Guillet, J. E. (1968) Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* **A2**, 1441-1455.
- Hirose, M., Yamato, M., Kwon, O. H., Harimoto, M., Kushida, A., Shimizu, T., Kikuchi, A. & Okano, T. (2000) Temperature-responsive surface for novel co-culture systems of hepatocytes with endothelial cells: 2-D patterned and double layered co-cultures. *Yonsei Med J* **41**, 803-813.
- Horbett, T. & Lew, K. (1994) Residence time effects on monoclonal antibody binding to adsorbed fibrinogen. *J Biomater Sci Polym Ed* **6**, 15-33.
- Horwitz, A. R. & Parsons, J. T. (1999) Cell biology: cell migration- movin' on. *Science* **286**, 1102-1103.
- Huber, D. L., Manginell, R. P., Samara, M. A., Kim, B.-I. & Bunker, B. C. (2003) Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device. *Science* **301**, 352-354.
- Hynes, R. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Ide, T., Nishida, K., Yamato, M., Sumide, T., Utsumi, M., Nozaki, T., Kikuchi, A., Okano, T. & Tano, Y. (2006) Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* **27**, 607-614.
- Inoue, I., Wakamoto, Y., Moriguchi, H., Okanob, K. & Yasuda, K. (2001) On-chip culture system for observation of isolated individual cells. *Lab Chip* **1**, 50-55.
- Ito, Y., Chen, G., Guan, Y. & Imanishi, Y. (1997) Patterned immobilization of thermoresponsive polymer. *Langmuir* **13**, 2756-2759.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jung, C., Dannenberger, O., Xu, Y., Buck, M. & Grunze, M. (1998) Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: A comparison between sulfides, disulfides, and thiols. *Langmuir* **14**, 1103-1107.
- Jungbauer, S., Kemkemer, R., Gruler, H., Kaufmann, D. & Spatz, J. (2004) Cell shape normalization, dendrite orientation, and melanin production of normal and genetically altered (haploinsufficient NF1)-melanocytes by microstructured substrate interactions. *Chemphyschem* **5**, 85-92.
- Kaehler, J., Zilla, P., Fasol, R., Deutsch, M. & Kadletz, M. (1989) Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc. Surg.* **9**, 535-541.
- Kang, J. & Rowntree, P. A. (2007) Gold film surface preparation for self-assembled Monolayer Studies. *Langmuir* **23**, 509-516.
- Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Chochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D., Boyan, B.D. (1996) Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cell. *J Biomed Mater Res* **32**, 55-63.
- Knight, C., Morton, L., Reachey, A., Tuckwell, D., Farndale, R. & Barnes, M. (2000) The collagen-binding A-domains of integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35-40.
- Kopecek, J. (2007) Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* **28**, 5185-5192.
- Kumar, A. & Whitesides, G. M. (1993) 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**, 2002-2004.
- Kwon, O. H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y. & Okano, T. (2000) Rapid cell sheet detachment from Poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *Journal of Biomedical Materials Research* **50**, 82-89.
- Larsericdotter, H., Oscarsson, S. & Buijs, J. (2005) Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *Journal of Colloid and Interface Science* **289**, 26-35.
- Lee, W.-F. & Shieh, C.-H. (1999) pH-thermoreversible hydrogels. I. Synthesis and swelling behaviors of the (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) copolymeric hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* **71**, 221-231.
- Li Jeon, N., Baskaran, H., Dertinger, S. K. W., Whitesides, G. M., Van De Water, L. & Toner, M. (2002) Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotech* **20**, 826-830.

LITERATURVERZEICHNIS

- Li, Y. & Tanaka, T. (1992) Phase transitions of gels. *Annual Review of Materials Science* **22**, 243-277.
- Liliensiek, S., Campbell, S., Nealey, P. & Murphy, C. (2006) The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79A**, 185-192.
- Miyata, T., Uragami, T. & Nakamae, K. (2002) Biomolecule-sensitive hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 79-98.
- Morra, M., Occhiello, E., Marola, R., Garbassi, F., Humphrey, P. & Johnson, D. (1990) On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **137**, 11-24.
- Moser, I., Jobst, G., Svasek, P., Varahram, M. & Urban, G. (1997) Rapid liver enzyme assay with miniaturized liquid handling system comprising thin film biosensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical* **44**, 377.
- Moulder, J., Stickle, W., Sobol, P. & Bomben, K. (1995) Handbook of X Ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of Xps Data. *Physical Electronics*.
- Mrksich, M. (2000) A surface chemistry approach to studying cell adhesion. *Chemical Society Reviews* **29**, 267-273.
- Mrksich, M., Dike, L., Tien, J., Ingber, D. & Whitesides, G. M. (1997) Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Experimental Cell Research* **235**, 305-313.
- Nayak, S. & Lyon, L. A. (2005) Weiche Nanotechnologie mit weichen Nanopartikeln. *Angewandte Chemie* **117**, 7862-7886.
- Ng, J., Gitlin, I., Stroock, A. & Whitesides, G. (2002) Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *ELECTROPHORESIS* **23**, 3461-3473.
- Okano, T., Bae, Y. H. & Kim, S. W. (1990) Temperature responsive controlled drug. In: Kost J (editor). Pulsed and self-regulated drug delivery. *Bac Ration, FL: CRC Press*, 17-46.
- Ostuni, E., Yan, L. & Whitesides, G. (1999) The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **15**, 3-30.
- Pfaff, M. (1997) Recognition sites of RGD-dependent integrins; Integrin-ligand interaction. *Springer-Verlag, Heidelberg*, 101-121.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30.
- Platé, N. A., Lebedeva, T. L. & Valuev, L. I. (1999) Lower critical solution temperature in aqueous solutions of N-alkyl-substituted polyacrylamides. *Polymer Journal* **31**, 21-27.
- Poirier, G. E. & Pylant, E. D. (1996) The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au(111). *Science* **272**, 1145-1148.
- Prime, K. & Whitesides, G. M. (1993) Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10714-10721.
- Raty, S., Davis, J., Beebe, D., Rodriguez-Zas, S. & Wheeler, M. (2001) Culture in microchannels enhances in vitro embryonic development of preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* **55**, 241.
- Schmaljohann, D. (2005) Thermo-responsive polymers and hydrogels in tissue engineering. *e-polymers* **no.21.**, 1-17.
- Schmaljohann, D. (2006) Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1655-1670.
- Schmaljohann, D., Oswald, J., Jorgensen, B., Nitschke, M., Beyerlein, D. & Werner, C. (2003) Thermo-responsive PNiPAAm-g-PEG films for controlled cell detachment. *Biomacromolecules* **4**, 1733-1739.
- Schrum, D. P., Culbertson, C. T., Jacobson, S. C. & Ramsey, J. M. (1999) Microchip flow cytometry using electrokinetic focusing. *Anal. Chem.* **71**, 4173-4177.
- Seah, M. (1980) The quantitative analysis of surfaces by XPS: A Review. *Surface and Interface Analysis* **2**, 222-239.
- Shoffner, M. A., Cheng, J., Hvichia, G. E., Kricka, L. J. & Wilding, P. (1996) Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. *Nucl. Acids Res.* **24**, 375-379.
- Sia, S. & Whitesides, G. (2003) Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS* **24**, 3563-3576.
- Siegers, C., Biesalski, M. & Haag, R. (2004) Self-assembled monolayers of dendritic polyglycerol derivatives on gold that resist the adsorption of proteins. *Chem. Eur. J* **10**, 2831-2838.
- Spurk, J. H. (2003) Strömungslehre. Eine Einführung in die Theorie der Strömungen. *Springer-Verlag, Berlin*.

LITERATURVERZEICHNIS

- Suzuki, A. & Tanaka, T. (1990) Phase transition in polymer gels induced by visible light. *Nature* **346**, 345.
- Svahn, H. A. & van den Berg, A. (2007) Single cells or large populations? *Lab Chip* **7**, 544-546.
- Takayama, S., McDonald, J. C., Ostuni, E., Liang, M., Kenis, P., Ismagilov, R. & Whitesides, G. M. (1999) Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks. *Cell Biology* **96**, 5545-5548.
- Takei, Y. G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Sakurai, Y. & Okano, T. (1994) Dynamic contact angle measurement of temperature-responsive surface properties for poly(N-isopropylacrylamide) grafted surfaces. *Macromolecules* **27**, 6163-6166.
- Takezawa, T., Mori, Y. & Yoshizato, K. (1990) Cell culture on a thermo-responsive polymer surface. *Biotechnology (N Y)* **8**, 854-856.
- Tan, J. & Saltzman, W. (2002) Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. *Biomaterials* **23**, 3215-3225.
- Tanaka, T., Nishio, I., Sun, S.-T. & Ueno-Nishio, S. (1982) Collapse of gels in an electric field. *Science* **218**, 467-469.
- Veisoh, M., Veisoh, O., Martin, M., Bertozzi, C. & Zhang, M. (2007) Single-cell-based sensors and synchrotron FTIR spectroscopy: A hybrid system towards bacterial detection. *Biosensors and Bioelectronics* **23**, 253-260.
- Vericat, C., Vela, M. E. & Salvarezza, R. C. (2005) Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. *Phys Chem Chem Phys* **7**, 3258-3268.
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M. & Stokes, D. L. (2001) Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical* **74**, 1-3, 2-11.
- Vohra, R., Thomson, G., Carr, H., Sharma, H. & Walker, M. (1991) Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *Br J Surg* **78**, 417-420.
- Walker, G. M., Ozers, M. S. & Beebe, D. J. (2002) Insect cell culture in microfluidic channels. *Biomedical Microdevices* **4**, 161-166.
- Wei, J., Yoshinari, M., Takemoto, S., Hattori, M., Kawada, E., Liu, B. & Oda, Y. (2007) Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **81 B**, 66-75.
- Weibel, D. B., Garstecki, P. & Whitesides, G. M. (2005) Combining microscience and neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 560-567.

LITERATURVERZEICHNIS

- Weiß, N., Klee, D. & Höcker, H. (2001) Konzept zur bioaktiven Ausrüstung von Metallimplantatoberflächen. *Biomaterialien* **2**, 81-86.
- Whitesides, G. M. (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373.
- Xia, Y. & Whitesides, G. M. (1998) Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 153-184.
- Xu, J. & Li, H. (1995) The chemistry of self-assembled long-Chain alkanethiol monolayers on gold. *Journal of Colloid and Interface Science* **176**, 138-149.
- Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y. & Sakurai, Y. (1990) Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **11**, 571-576.
- Yamato, M., Utsumi, M., Kushida, A., Konno, C., Kikuchi, A. & Okano, T. (2001) Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispase by reducing temperature. *Tissue Eng* **7**, 473-480.
- Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T. & Sakurai, Y. (1993) Pulsatile drug delivery systems using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **11**, 85-108.

Anhang

ANHANG

A1: Kontaktwinkeldaten funktionalisierter / unfunktionalisierter Goldoberflächen im Temperaturbereich von 20 – 45 °C. Die Nummerierungen 1-5 stellen die jeweilige Messung dar.
 stat.: statisch ermittelter Kontaktwinkelwinkel; fw.: Fortschrittswinkel; rev.: Rückzugswinkel; MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung; SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	66	72	35	65	71	36	67	69	38	69	71	40	66	72	39	66,6	71	37,6	1,3565	1,0954	1,8547	0,60663004	0,48989795	0,82945765
25	64	73	36	69	72	35	68	72	37	69	74	42	65	71	38	67	72,4	37,6	2,0976	1,0198	2,4166	0,93808315	0,45607017	1,08074049
30	69	74	35	67	71	37	68	74	34	69	73	40	70	71	39	68,6	72,6	37	1,0198	1,3565	2,2804	0,45607017	0,60663004	1,0198039
37	68	70	39	67	74	36	67	70	38	68	73	38	66	72	39	67,2	71,8	38	0,7483	1,6	1,0954	0,33466401	0,71554175	0,48989795
45	69	72	35	67	71	38	67	74	37	69	70	39	69	71	37	68,2	71,6	37,2	0,9798	1,3565	1,3266	0,43817805	0,60663004	0,59329588

P15-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	47	54	36	48	52	38	51	55	37	52	55	38	51	54	36	49,8	54	37	1,9391	1,0954	0,8944	0,86717934	0,48989795	0,4
25	54	57	40	56	58	40	55	58	42	57	57	40	58	57	43	56	57,4	41	1,4142	0,4899	1,2649	0,63245553	0,21908902	0,56568542
30	60	62	41	59	61	41	59	60	43	59	62	36	60	61	37	59,4	61,2	39,6	0,4899	0,7483	2,6533	0,21908902	0,33466401	1,18659176
37	60	63	41	60	61	42	60	62	41	60	64	38	59	62	37	59,8	62,4	39,8	0,4	1,0198	1,9391	0,17888544	0,45607017	0,86717934
45	62	64	35	61	65	38	61	64	35	62	65	38	61	66	38	61,4	64,8	36,8	0,4899	0,7483	1,4697	0,21908902	0,33466401	0,65726707

P19-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	45	46	36	45	48	36	46	48	36	47	49	37	47	49	36	46	48	36,2	0,8944	1,0954	0,4	0,4	0,48989795	0,17888544
25	52	54	38	52	54	38	53	54	40	51	54	38	53	55	37	52,2	54,2	38,2	0,7483	0,4	0,9798	0,33466401	0,17888544	0,43817805
30	55	55	40	56	57	39	57	58	40	56	57	41	57	58	39	56,2	57	39,8	0,7483	1,0954	0,7483	0,33466401	0,48989795	0,33466401
37	58	59	42	58	59	41	58	59	40	57	58	43	58	59	41	57,8	58,8	41,4	0,4	0,4	1,0198	0,17888544	0,17888544	0,45607017
45	59	60	41	60	61	39	60	61	42	59	61	38	60	61	39	59,6	60,8	39,8	0,4899	0,4	1,4697	0,21908902	0,17888544	0,65726707

P19/RGD(1:8)-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	42	43	29	43	44	31	43	44	31	43	44	30	42	43	29	42,6	43,6	30	0,4899	0,4899	0,8944	0,21908902	0,21908902	0,4
25	43	45	30	44	46	32	44	46	33	45	46	35	44	46	35	44	45,8	33	0,6325	0,4	1,8974	0,28284271	0,17888544	0,48452814
30	47	48	35	47	48	36	47	48	35	48	49	35	48	49	37	47,4	48,4	35,6	0,4899	0,4899	0,8	0,21908902	0,21908902	0,35777088
37	50	51	35	51	52	38	50	51	37	51	52	36	50	51	38	50,4	51,4	36,8	0,4899	0,4899	1,1662	0,21908902	0,21908902	0,52153619
45	54	55	37	51	52	38	52	54	38	53	54	37	51	53	38	52,2	53,6	37,6	1,1662	1,0198	0,4899	0,52153619	0,45607017	0,21908902

RGD-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	25	26	10	24	25	13	25	26	12	21	24	11	25	26	12	24	25,4	11,6	1,5492	0,8	1,0198	0,69282032	0,35777088	0,45607017
25	23	24	10	23	25	11	25	26	13	25	26	10	26	26	11	24,4	25,4	11	1,2	0,8	1,0954	0,53665631	0,35777088	0,48989795
30	25	26	11	22	24	11	23	26	14	26	28	12	24	25	13	24	25,8	12,2	1,4142	1,3266	1,1662	0,63245553	0,59329588	0,52153619
37	24	24	14	25	27	12	23	24	12	27	31	14	27	29	14	25,2	27	13,2	1,6	2,7568	0,9798	0,71554175	1,2328828	0,43817805
45	25	25	15	24	26	13	28	29	13	25	26	11	21	23	12	24,6	25,8	12,8	2,245	1,9391	1,3266	1,00399203	0,86717934	0,59329588

P19/PG(1:6)-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	34	37	26	35	37	27	34	39	27	32	35	25	36	39	26	34,2	37,4	26,2	1,3266	1,4967	0,7483	0,59329588	0,66932802	0,33466401
25	38	40	26	42	43	28	43	44	26	40	42	27	42	43	28	41	42,4	27	1,7889	1,3565	0,8944	0,8	0,60663004	0,4
30	44	45	30	43	44	32	40	44	29	43	45	33	41	44	31	42,2	44,4	31	1,4697	0,4899	1,4142	0,65726707	0,21908902	0,63245553
37	43	47	31	42	45	29	42	45	32	44	45	31	41	45	29	42,4	45,4	30,4	1,0198	0,8	1,2	0,45607017	0,35777088	0,53665631
45	43	46	30	45	48	31	46	47	32	45	48	33	45	47	32	44,8	47,2	31,6	0,9798	0,7483	1,0198	0,43817805	0,33466401	0,45607017

PG-Au [°C]	1			2			3			4			5			MW			Stabw			SEM		
	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev	stat	fw	rev												
20	36	38	26	35	37	25	34	36	25	33	35	24	36	37	25	34,8	36,6	25	1,1662	1,0198	0,6325	0,52153619	0,45607017	0,28284271
25	35	38	24	34	37	27	36	38	22	34	35	23	35	37	25	34,8	37	24,2	0,7483	1,0954	1,7205	0,33466401	0,48989795	0,76941536
30	35	39	21	35	37	29	36	39	28	33	35	22	37	38	26	35,2	37,6	25,2	1,3266	1,4967	3,1875	0,59329588	0,66932802	1,42548237
37	36	38	25	36	38	28	37	39	26	35	36	27	34	39	23	35,6	38	25,8	1,0198	1,0954	1,7205	0,45607017	0,48989795	0,76941536
45	36	38	27	34	38	25	37	39	27	35	36	26	37	39	25	35,8	38	26	1,1662	1,0954	0,8944	0,52153619	0,48989795	0,4

A2: Zellablösungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au in einem mikrofluidischen Kanal bei unterschiedlichen Flussraten. MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung; SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

angelegte Flussrate [µl/h]	37 °C										25 °C												
	Zellablösungsanteil [%]					MW	Stabw	SEM	angenommene Zellhöhe: 4,5µm Umströmungsgeschw adh Zelle [µm/sec] Vz					Zellablösungsanteil [%]					MW	Stabw	SEM	angenommene Zellhöhe: 15 µm Umströmungsgeschw abger Zelle [µm/sec] Vz	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2				Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3					
0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,8	0,8	0,8	0	0,8	0,8	9,5	12,8	7,4	2,8
50	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,8	0,8	0,8	0	0,8	0,8	17,5	24,2	14,0	14,0
100	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	4,8	4,8	4,8	51,9	4,8	36,1	36,1	22,2	27,9	
150	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	4,8	4,8	4,8	51,9	4,8	36,1	36,1	22,2	41,9	
200	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	13,6	13,6	13,6	51,9	13,6	40,2	40,2	18,9	55,9	
250	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	13,6	13,6	13,6	51,9	13,6	41,4	41,4	19,8	69,9	
300	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	50,4	50,4	50,4	51,9	50,4	53,6	53,6	3,6	83,8	
350	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	51,9	50,4	50,4	50,4	51,9	50,4	53,6	53,6	3,6	97,8	
400	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	53,2	55,2	55,2	55,2	53,2	55,2	55,7	55,7	2,2	111,8	
500	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	53,2	63,2	63,2	63,2	53,2	63,2	64,1	64,1	9,3	139,7	
600	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	53,2	68	68	68	53,2	68	65,7	65,7	9,4	167,6	
700	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	53,2	69,6	69,6	69,6	53,2	69,6	66,2	66,2	9,6	195,6	
800	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	70,4	70,4	70,4	64,6	70,4	70,3	70,3	4,6	223,5	
900	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	76,8	76,8	76,8	64,6	76,8	72,4	72,4	5,5	251,5	
1000	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	76,8	76,8	76,8	64,6	76,8	72,4	72,4	5,5	279,4	
1250	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	109,6	109,6	109,6	64,6	109,6	72,4	72,4	5,5	349,3	
1500	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	131,5	131,5	131,5	64,6	131,5	72,4	72,4	5,5	419,1	
2000	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	175,3	175,3	175,3	64,6	175,3	76,7	76,7	10,2	558,8	
2500	0,9	0	0	0	0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	64,6	219,2	219,2	219,2	64,6	219,2	76,7	76,7	10,2	698,5	
3000	0,9	0	0	0	2	1,0	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	64,6	263,0	263,0	263,0	64,6	263,0	76,7	76,7	10,2	836,2	
5000	0,9	0	0	0	4	1,6	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	64,6	438,3	438,3	438,3	64,6	438,3	76,7	76,7	10,2	1397,0	
8000	0,9	0	0	0	4	1,6	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	64,6	701,4	701,4	701,4	64,6	701,4	76,7	76,7	10,2	2235,3	
9999	0,9	0	0	0	8	3,0	3,6	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	64,6	876,6	876,6	876,6	64,6	876,6	76,7	76,7	10,2	2793,8	

ANHANG

A3: Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au und P19-Au nach Temperaturänderung (37 °C - 25 °C) über die Zeit. Nummerierung 1-3: jeweiliger Versuch; MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung; SEM: Standardabweichung des Mittelwerts.

t [min]	1			2			3			MW			Stabw			SEM		
	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28
P15-Au	4	16	81	5	19,6	72,7	4	39	84	4,3	24,9	79,2	0,5773503	12,371473	5,853489	0,2581989	5,5326907	2,6177599
P19-Au	7	85	94	8	68	84	5	69	92	6,7	74,0	90,0	1,5275252	9,539392	5,2915026	0,6831301	4,2661458	2,3664319

A4: Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und mehreren Schaltzyklen. Nummerierung 1-3: jeweiliger Schaltzyklus; Lagerzeiten: Tag 0, Woche 1.

Anzahl der Schaltzyklen	Tag 0			Woche 1		
	ausgebreitete Zellen 37°C	abgerundete Zellen 25°C	Zellabrundungsanteil [%]	ausgebreitete Zellen 37°C	abgerundete Zellen 25°C	Zellabrundungsanteil [%]
1.	248	206	83	164	143	87
2.	198	154	78	105	92	88
3.	254	129	51	148	74	50

A5: Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P15-Au bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und- bedingungen. RT: 25 °C, Ex: Exsikator; kA: Daten konnten aufgrund einer Kontamination nicht erhoben werden.

Lagerdauer	Versuch 1			Versuch 2		
	ausgebreitete Zellen 37°C	abgerundete Zellen 25°C	Zellabrundungsanteil [%]	ausgebreitete Zellen 37°C	abgerundete Zellen 25°C	Zellabrundungsanteil [%]
Tag 0	113	96	85	165	134	81,3
Woche 1, RT/ Ex	85	78	92	248	206	83
Woche 2, RT/ Ex	201	145	72	287	178	62
Woche 2, 40Grad/ Ex	kA	kA	kA	192	40	21
Woche 4, RT/ Ex	192	104	54	203	126	62
Woche 6, RT/ Ex	140	102	73	kA	kA	kA
Woche 6, 40°C/Ex	221	24	11	kA	kA	kA
Woche 6, Luft	104	69	66	kA	kA	kA

A6: Zellabrundungsanteil von MG63 Osteoblasten auf P19/PG(1:6)-Au. MW: Mittelwert.

P19/PG(1:6)-Au	37 °C	25°C	Zellabrundungsanteil [%]	MW [%]
	ausgebreitete Zellen	abgerundete Zellen		
Versuch 1	61	45	73,8	74
Versuch 2	80	64	80,0	
Versuch 3	95	65	68,4	

ANHANG

A7: Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P19/RGD-Au mit unterschiedlichen molaren Mischungsverhältnissen.

P19/RGD-Au	ausgebreitete Zellen	ausgebreitete Zellen	abgerundete Zellen	Zellabrundungsanteil
molares Mischungsverhältnis	37°C	25°C	25°C	[%]
1:8	162	14	148	91
1:18	211	54	157	74
1:72	205	95	110	54

A8: Zellabrundungsanteil von L929 Fibroblasten auf P19/RGD(1:8)-Au. MW: Mittelwert

P19/RGD(1:8)-Au	37 °C	25°C		
	ausgebreitete Zellen	abgerundete Zellen	Zellabrundungsanteil [%]	MW [%]
Versuch 1	162	148	91	91
Versuch 2	107	97	91	

Lebenslauf

Name Dipl.-Ing. Oliver Ernst
Geburtstag 25.10.1978
Geburtsort Augsburg

Akademische Ausbildung

06/2005 - 05/2008 **Promotion**
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT),
Potsdam-Golm, AG Zell-Assay-Entwicklung, Dr. Claus Duschl

*“Entwicklung und Anwendung temperaturschaltbarer
Oberflächen zur Kontrolle der Zell-Substrat-Adhäsion”*

05/2005 **Diplom in medizinischer Biotechnologie (Dipl.-Ing.)**
Technische Universität Berlin

*“Mikroskopische Analyse der Zell-Substrat-Adhäsion
und Lokalisation daran beteiligter Proteine”*

06/2002 **Vordiplom in medizinischer Biotechnologie**
Technische Universität Berlin

10/1999 **Studium der Biotechnologie**
Technische Universität Berlin

Schulische Ausbildung

06/1998 Abitur
**Pater-Rupert-Mayer-Gymnasium,
München**