

# Fakultät für Physik und Astronomie

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Bachelorarbeit  
im Studiengang Physik  
vorgelegt von

**Kristian Rink**

geboren in Göttingen.

**Juli 2010**



# Elektrodenstimulierte Zellaktivität in Interaktion mit biokompatiblen Chipoberflächen

Diese Bachelorarbeit wurde von Kristian Rink ausgeführt  
am Kirchhoff-Institut für Physik in Heidelberg  
unter der Betreuung von  
Herrn Prof.Dr.Michael Hausmann.



# Kurzfassung

Die Mikrostrukturierung auf biokompatiblen Oberflächen ist eine wichtige und hilfreiche Methode, um die Funktion bei Anordnungen kleiner Präparate zu erforschen und verstehen zu lernen. In der vorliegenden Bachelorarbeit war es mit Hilfe dieses Werkzeugs möglich das Wachstum von Zellen zu beeinflussen und damit kontrollierbar zu machen. Dabei wird der Aufbau eines Biochips beschrieben, mit dem es nach erfolgreicher Zellanordnung in einem Linienmuster möglich ist, das Verhalten der sich darauf befindlichen Muskelzellen zu untersuchen. Beim Anlegen einer definierten elektrischen Spannung über Elektroden wird das Ruhemembranpotential der zu Tuben differenzierten Zellen verändert und es erfolgt eine Umwandlung dieses Signals in eine mechanische Reaktion. Die Zelle kontrahiert. Auf diese Weise ist es mit dem Biochip bzw. Elektrodenarray möglich, Myotuben zu analysieren, wenn sie mit einem Spannungssprung beaufschlagt werden oder mit chemischen Reizen in Berührung kommen. Es ist also realisierbar, die Funktion und eventuelle Funktionsstörungen von Zellen anhand ihrer Signalweiterleitung zu untersuchen. Bei der Konstruktion des Elektrodenarrays wurden die bestmöglichen Konturen ermittelt und es kamen unterschiedliche Verfahren der Photolithographie zum Einsatz. Unter Anwendung verschiedener chemischer Stoffe wurde die optimale Strukturierung ermittelt, womit der Zellenträger reproduzierbar hergestellt werden konnte.

# Abstract

Micropatterning of biocompatible surfaces is an important and helpful tool to investigate the organization process of small biological specimens like human and animal cells. In this bachelor thesis the micropatterning was used to control the spread and migration of eucaryotic cells, murine C2C12 myoblasts. The thesis describes the setup of a biochip, consisting of micropatterned lines and macropatterned cell repellent polymer deposits in combination with gold electrodes. Using the setup it is possible to organize an ensemble of several C2C12 myocytes along the line micropattern. The subsequent application of an external electrical potential excites a cellular action potential in the myotubes, the differentiated forms of myoblasts. The individual myotube converts the membrane depolarisation into cell contraction and cell twitch occurs. This makes it possible to analyse the reaction of cultivated myotubes onto electrical or chemical stimulation. In brief, the setup makes it possible to examine the cell activity as a function of electrical cell response.

The setup procedure involved the optimization of small electrode structures, the micro-moulding of line patterns, and projection micro-lithography to deposit cell repellent areas. After some optimization procedures the biochip could be produced under reproducible conditions.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Materialtechnik . . . . .	3
2.1.1	Photolackierung . . . . .	3
2.1.2	Besputterung . . . . .	4
2.1.3	Polymerisation . . . . .	5
2.2	Physiologie von Muskelzellen . . . . .	6
2.2.1	Aufbau und Ionenverteilung in Muskelzellen . . . . .	6
2.2.2	Elektrophysiologie . . . . .	9
2.3	Mikroskopie . . . . .	11
2.3.1	Lichtmikroskopie . . . . .	11
2.3.2	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	12
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1	Zelllinie . . . . .	15
3.1.1	Stoffbeschreibungen . . . . .	15
3.1.2	Passagieren . . . . .	16
3.1.3	Fixieren und Färben . . . . .	17
3.2	Strukturierungsmaterialien für das Elektrodenarray . . . . .	18
3.2.1	Photolackbeschichtung und Besputterung . . . . .	18
3.2.2	Verwendung von PDMS und HEMA . . . . .	20
3.3	Präparation für das SEM . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>24</b>
4.1	Überblick . . . . .	24
4.2	Entwicklung der Elektroden . . . . .	26
4.2.1	Photolackbeschichtung . . . . .	27
4.2.2	Elektrodenbeschichtung . . . . .	28
4.3	Strukturierung . . . . .	28

---

4.4	Untersuchungsmethoden . . . . .	32
4.4.1	Lichtmikroskopie . . . . .	33
4.4.2	Elektronenmikroskopie . . . . .	34
4.5	Verhalten der Muskelzellen . . . . .	39
4.5.1	Time-Lapse-Untersuchung . . . . .	39
4.5.2	Spannungsbeaufschlagung . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>45</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>i</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>iii</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>vi</b>
	<b>Anhang</b>	<b>vii</b>

# 1 Einleitung und Motivation

Die Physik ist in ihrem klassischen Ursprung die Wissenschaft der unbelebten Materie. Doch führen physikalische Entdeckungen immer wieder zu bahnbrechenden Entwicklungsschüben in der Biologie und Medizin, den Wissenschaften vom Leben. Interdisziplinäres Arbeiten wird daher zunehmend wichtiger, um besser und schneller zum Wohle des immer älter werdenden Menschen arbeiten zu können. Deshalb war bei der Wahl dieser Bachelorarbeit entscheidend und motivierend, dass sich die Forschung in praktische Anwendung umsetzen lässt und für den Menschen nützlich ist. Dabei war das Verschmelzen von Leben und Technik eine besonders große Herausforderung.

Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Entwicklung und der Aufbau eines biokompatiblen Elektrodenarrays, auf dem eine zweidimensionale Anordnung von Zellsystemen gezüchtet und anschließend untersucht werden soll. Mit diesem Biochip ist es möglich, ein Biosystem reproduzierbar aufzubauen, um auf einer Oberfläche mehrere Versuchsreihen durchführen zu können. Beim Züchten von Gewebestrukturen soll es mit diesem Elektrodenarray realisierbar sein, die Zellen auf mikroskopischer Ebene schalten zu können. Dazu wird eine intelligente Elektroden- und Strukturierungsanordnung benötigt, die es ermöglicht, die Zellen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.

In den folgenden Kapiteln werden die hier genannten Fragestellungen diskutiert und erläutert:

- **Wie kommen lebende Zellen auf einen Biochip?**

Zellen höherer Lebewesen müssen mehreren Anforderungen genügen. Zum einen müssen die Zellen aneinander haften können, damit der Körper zusammengehalten wird. Zum anderen müssen die Zellen sich voneinander lösen und umorganisieren können, damit der Körper wachsen, auf Verletzungen reagieren und Krankheitserreger abwehren kann. Diese Phänomene lassen sich bei der Untersuchung und der Züchtung von Zellen nutzbar machen. Dabei sollen

die Zellen so gehandhabt werden, dass sie geordnet auf einer Linienstruktur wachsen.

- **Wie muss die biokompatible Chipoberfläche konstruiert werden?**

Die Strukturierung, auf der die Zellen wachsen sollen, muss auf einer biokompatiblen Oberfläche aufgetragen werden, die gut mikroskopierbar, aber auch einfach zu bearbeiten sein sollte. Mit zellausrichtenden Flächen soll versucht werden, die zu Tuben differenzierten Myozyten parallel auf einer Struktur wachsen zu lassen. Diese Struktur soll auf Elektroden enden, um die Zellen durch eine Spannungsbeaufschlagung mit Signalen versehen zu können.

- **Welche Sprache sprechen Muskelzellen und wie reagiert ein solches Netzwerk?**

Wenn sich das Membranpotential von Zellen durch elektrische oder chemische Einflüsse ändert, ist es möglich, dass die Zellen mit einer mechanische Reaktion agieren oder das elektrische Signal weitergeben. Da sie auf körpereigene Signale reagieren, muss es auch möglich sein, extern auf das Verhalten Einfluss zu nehmen und eine Steuereinheit für Zellen bauen zu können. Aus diesem Grund sollen die Muskelzellen auf dem Elektrodenarray mit einer Spannung beaufschlagt werden, damit ihre mechanischen Reaktionen untersucht und ausgewertet werden können.

## 2 Grundlagen

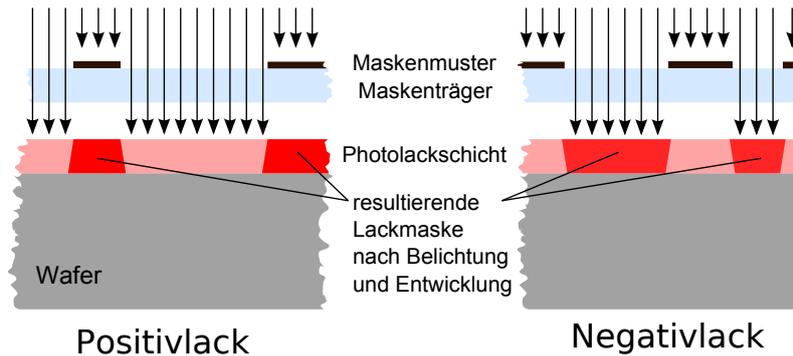
Zu Beginn werden einige Grundlagen für das tiefere Verständnis dieser Bachelorarbeit vorausgeschickt. Zunächst wird die Materialtechnik erläutert, daraufhin biologisch und medizinisch mit der Physiologie von Muskelzellen fortgefahren und weiterhin die physikalische Seite der Mikroskopie angeschnitten.

### 2.1 Materialtechnik

Um Strukturierungen auf einer Chipoberfläche herstellen zu können, werden die Kenntnis verschiedener Werkstoffe benötigt. Die Grundlagen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Stoffe und Verfahren sind im Folgenden kurz erklärt. Dabei spielt auch die Biochemie beim Verständnis verschiedener Stoffreaktionen eine wichtige Rolle.

#### 2.1.1 Photolackierung

Bei einer lithographischen Strukturierung verwendet man in der Mikroelektronik Photolacke zur Herstellung von Leiterplatten und Wafern. Bei der Fertigung werden die zu strukturierenden Oberflächen mit Photolack benetzt und anschließend mit einer Maske versehen. Nach einer festgelegten Belichtungsdauer können die Strukturen entwickelt werden. Dabei werden Positiv- und Negativlacke unterschieden, die sich bei der Entwicklung des Lackes entgegengesetzt verhalten. Während bei Positivlacken die belichteten Flächen entfernt werden, bleiben diese bei Negativlacken erhalten, wie in [Abbildung 2.1](#) gezeigt. Der Lack ist nach Belichtung gegen Säuren stabil und mit Natronlauge abwaschbar. Mit Hilfe von Aceton lässt sich sowohl belichteter als auch unbelichteter Lack auflösen ([19](#)).



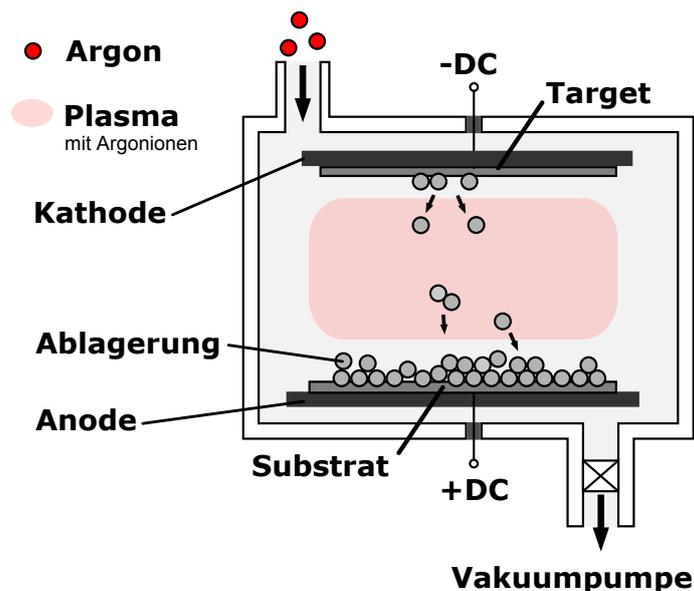
**Abbildung 2.1:** Funktionsweise eines Photolacks. Positivlack: Die von oben einfallende Belichtung, gekennzeichnet durch die schwarzen Pfeile, weicht die nicht durch die Photomaske geschützten Flächen auf und macht sie damit ablösbar. Negativlack: Das Licht, das durch die Photomaske fällt, härtet die mit Photolack beschichteten Stellen aus, sodass die unbelichteten Stellen ablösbar sind.

## 2.1.2 Besputterung

Die Besputterung bzw. die Kathodenzerstäubung ist ein Standardbeschichtungsverfahren in der Materialtechnik. Beim Besputterungsprozess wird zunächst das aufzutragende Beschichtungsmaterial entweder zugeführt oder aus einem Festkörper, dem so genannten Target, durch Beschuss mit energiereichen Ionen herausgelöst. Bei der Abtragung des bombardierten Targets geht das Material in den gasförmigen Zustand über. Dabei bestimmt die Zeit, in der das Target abgetragen wird bzw. das Beschichtungsmaterial zugeführt wird, wie dick die Besputterungsablagerung aufgetragen werden soll.

Als Ionenquelle dient eine Gleichstrom-Gasentladung, wobei die Ionen eine gewisse Mindestenergie zum Ausschlagen vom Materialabtrag besitzen müssen. Zum Besputtern wird in die Nähe des Targets ein Substrat gebracht, sodass die herausgeschlagenen Atome auf diesem kondensieren und eine Schicht bilden können. In der Anlage muss dabei ein Vakuum herrschen, sodass die Targetatome das Substrat auch erreichen können. Durch den Elektrodenstrom wird weiterhin festgelegt, wie schnell sich die Ionen ablagern sollen. Da möglichst reine Metallschichten gewünscht sind, wird, um eine Oxidation der Ablagerungsschicht zu verhindern, ein hochreines Edelgas eingesetzt - in diesem Fall Argon.

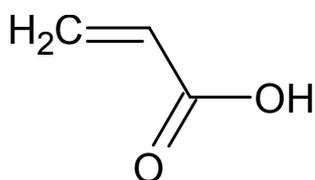
Wie in [Abbildung 2.2](#) zu sehen, setzt sich das in Gas übergegangene Target wieder in fester Form auf dem Substrat ab. Diese Fläche muss vor dem Besputtern allerdings gut gereinigt werden, um eine feste Bindung des Sputtermaterials zu gewährleisten.



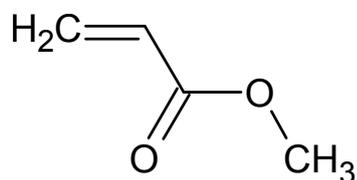
**Abbildung 2.2:** Technischer Vorgang der Besputterung: Die durch Beschuss aus dem Target herausgelösten Metallionen setzen sich auf dem nahegelegenen Substrat ab. Das Edelgas Argon verhindert bei der Ablagerung der Ionen auf dem Substrat eine Oxidation.

### 2.1.3 Polymerisation

Die Polymerisation ist eine chemische Reaktion, bei der Monomere unter Auflösung der Mehrfachbindung zu Polymeren reagieren. Im folgenden Abschnitt wird nur auf die Polymerisation von HEMA<sup>1</sup> eingegangen, was die Kenntnis einiger chemischer Grundlagen erfordert. Da HEMA ein Derivat des Plexiglasses ist, sind besonders die Strukturen von Acryl und Plexiglas interessant, die in [Abbildung 2.3](#) und [2.4](#) dargestellt sind. Dabei ist Methacrylat das Monomer des Plexiglasses und unterscheidet sich von der Strukturformel des Acryls durch Veresterung der Acrylsäuregruppe mit einer Methylgruppe am einfach gebundenen Sauerstoffatom.



**Abbildung 2.3:** Acryl-Strukturformel

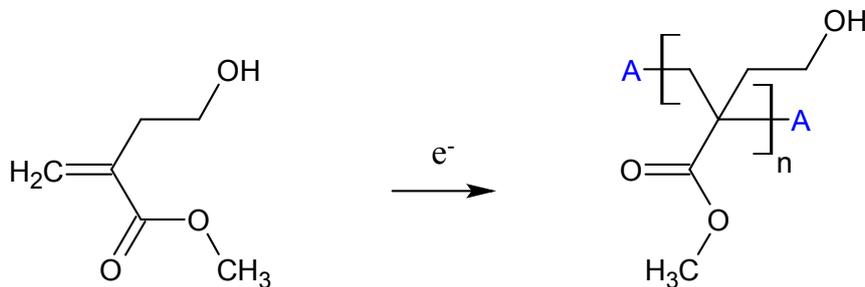


**Abbildung 2.4:** Plexiglas-Strukturformel

<sup>1</sup>2-Hydroxyethyl-Methacrylat

HEMA ist ein Monomer und als solches bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand vorfindbar. Das Poly-HEMA oder pHEMA ist dagegen als Polymer ein fester Kunststoff und entsteht durch UV-Beleuchtung des Monomers (20). Die Polymerisationsreaktion des flüssigen HEMA-Monomers zum festen HEMA-Polymer ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Dabei löst der im HEMA-Monomer enthaltene Radikalstarter die frei abzugebenden Elektronen heraus.

Die Verwendung von HEMA ist sehr vielseitig. So wird es u. a. als Kontaktlinsenmaterial eingesetzt, da es hydrophil ist und keine Zellen bindet. Es ist transparent und sein Brechungsindex liegt in der Nähe des Brechungsindex von Glas.



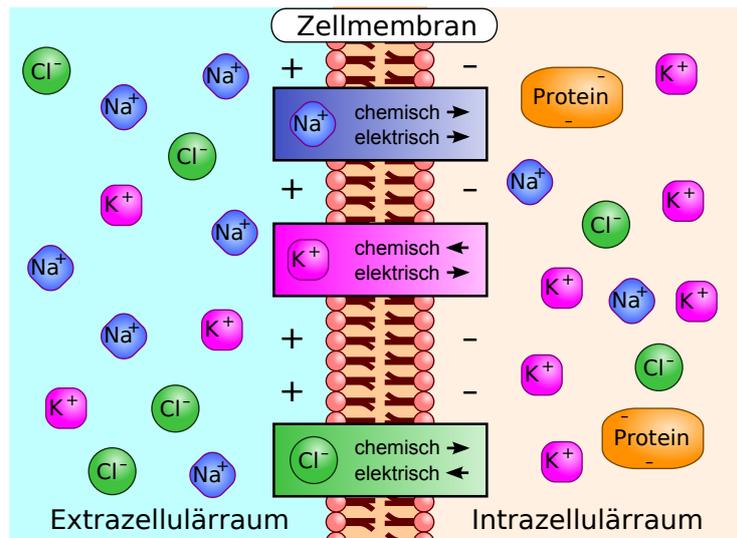
**Abbildung 2.5:** Polymerisationsreaktion von HEMA: Der im HEMA-Monomer enthaltene Radikalstarter löst die frei abzugebenden Elektronen heraus und bildet somit das Polymer.

## 2.2 Physiologie von Muskelzellen

Gegenstand der Physiologie sind die Funktionsweisen und Regelmechanismen von Lebewesen, die diese am Leben halten (5). Um das Verhalten von Zellen zu verstehen ist es also unumgänglich, sich mit dessen Aufbau und ihrer inneren Struktur zu beschäftigen. Jeder vielzellige, arbeitsteilig organisierte Organismus besteht aus unterschiedlichen Organen und Geweben, die jeweils spezifische Funktionen haben. Zellen sind die kleinsten funktionellen Bestandteile von Organen und Geweben und meist imstande, die jeweils spezifische Funktion isoliert auszuüben (12).

### 2.2.1 Aufbau und Ionenverteilung in Muskelzellen

Muskelzellen sind eukaryotische Zellen, welche die Muskulatur von Lebewesen bilden und somit in ihrer Gesamtheit die kontrollierte und unkontrollierte Bewegung ermöglichen. Um dies zu gewährleisten gibt es verschiedene Differenzierungsstadien. Nachdem sich aus den Vorläuferzellen, den Myoblasten, Myozyten gebildet haben,



**Abbildung 2.6:** Ionenverteilung im Intra- und Extrazellulärraum der Zelle: Aufgrund der unterschiedlichen Stoffmengen der einzelnen Atome entstehen chemische Kräfte, die in Richtung der niedrigeren Konzentration wirken. Da sich zwischen Intra- und Extrazellulärraum ein Potentialgefälle befindet, wirkt zusätzlich eine elektrische Kraft richtungsabhängig von der Ladung der einzelnen Stoffe.

differenzieren bzw. verschmelzen diese bei entsprechenden Bedingungen nach gewisser Zeit zu Myotuben. Myotuben sind eine besondere Art des Gewebes in Form von Muskelschläuchen. Erst nach dem durch „tissue engineering“ hervorgerufenen Differenzieren sind die Zellen in der Lage zu kontrahieren, also sich zusammenzuziehen. Diese Kontraktion setzt ein, nachdem ein äußerer Reiz, z. B. ein Potentialsprung, ein zelluläres Aktionspotential ausgelöst hat.

Um die Wirkung von Aktionspotentialen verstehen zu können, ist es wichtig, die Ionenverteilung im Intra- und Extrazellulärraum einer Zelle zu kennen, die in Abbildung 2.6 dargestellt ist. Aufgrund der Membranschicht einer Zelle und verschiedenen Ionen wirkt zum einen eine chemische bzw. osmotische Kraft und zum anderen eine elektrische Kraft auf die verschiedenen Anionen und Kationen. Dabei entstehen Konzentrationsunterschiede, die sich bei freier Diffusion schnell ausgleichen würden (5). An der Aufrechterhaltung dieser Unterschiede sind zwei wichtige Prozesse beteiligt. Zum einen die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , die als aktiver und energieverbrauchender Prozess im Verhältnis zwei zu drei Kaliumionen in die Zelle hinein und Natriumionen aus der Zelle hinauspumpt, zum anderen die Ionenleitfähigkeit der Membran. Denn die Phospholipiddoppelschicht ist praktisch undurchlässig für Ionen, so dass diese nur über spezialisierte Transportproteine die Membran passieren können. Dadurch lässt sich der transmembrane Ionenstrom steuern.

Im Ruhezustand einer Zelle ist die Natriumkonzentration im Zellinneren geringer als im Extrazellulärraum, sodass die  $\text{Na}^+$ -Ionen aufgrund der chemischen Kraft, also entlang dem Konzentrationsgefälle, in das Zellinnere hineingezogen werden. Aber auch das elektrische Potential ist für den Einstrom der  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle verantwortlich, da die positiv geladenen Natriumionen vom negativ geladenen Zellinneren angezogen werden. Um die Natriumionen zurück in den Extrazellulärraum zu befördern, ist die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase notwendig.

Auf die Kaliumionen wirkt die chemische Kraft nach außen, da die Konzentration im Inneren der Zelle höher ist. Durch die Diffusion der  $\text{K}^+$ -Ionen wird gleichzeitig Ladung verschoben, sodass die auftretenden elektrischen Kräfte der Diffusion entgegenwirken.

Die extrazellulären Anionen werden vor allem von den  $\text{Cl}^-$ -Ionen gestellt, die durch die chemische Kraft in die Zelle hinein und durch die elektrische Kraft aus der Zelle herausgedrängt werden. Da das  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotential allerdings ca.  $-80 \text{ mV}$  beträgt, kommt es bei einem normalen Ruhemembranpotential kaum zu einem Nettofluss, wie in Abschnitt 2.2.2 ersichtlich wird.

Weiterhin gibt es im Intrazellulärraum große Anionen in Form von Proteinen, für die die Zellmembran aber praktisch undurchlässig ist.

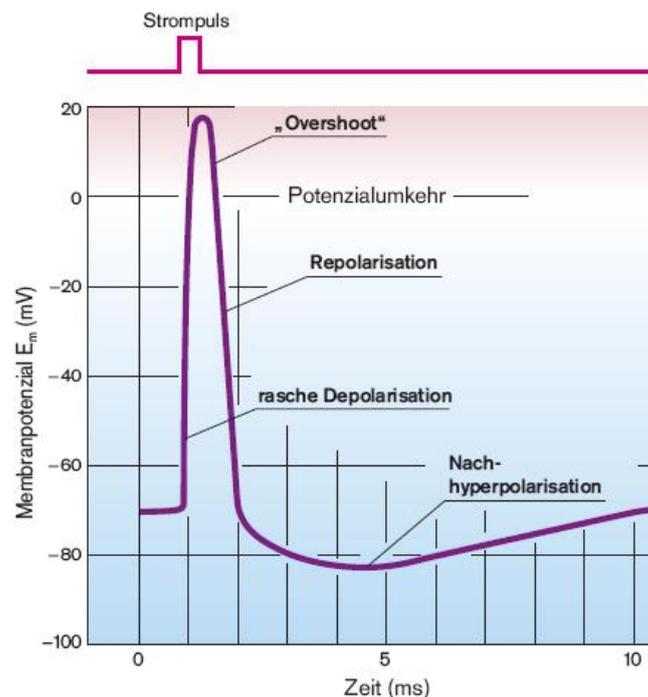
Das Gleichgewichtspotential eines Ions ist dann erreicht, wenn die elektrische und die chemische Kraft, die für die Bewegung des Ions durch die Membran sorgen, gleich groß und entgegengesetzt sind. Das elektrochemische Gleichgewicht eines Ions wird durch die Nernst-Gleichung angegeben:

$$E_x = \frac{RT}{F z_x} \ln\left(\frac{c[\text{X}]_e}{c[\text{X}]_i}\right) \quad (2.1)$$

mit	$E_x$	= Gleichgewichtspotential des Ions X
	R	= allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \frac{\text{J}}{\text{Kmol}}$ )
	T	= absolute Temperatur (310 K)
	F	= Faraday-Konstante ( $9,65 * 10^4 \frac{\text{As}}{\text{mol}}$ )
	$z_x$	= Ladungszahl der Ions
	$c[\text{X}]_e$	= effektive Konzentration des Ions X extrazellulär
	$c[\text{X}]_i$	= effektive Konzentration des Ions X intrazellulär

## 2.2.2 Elektrophysiologie

Wenn sich das extrazelluläre chemische oder elektrische Potential verändert, wird das Membranpotential einer Zelle verändert und es kommt zu Aktionspotentialen. Eine Zelle verhält sich daher ähnlich wie ein RC-Glied (4). In Abbildung 2.7 ist der Aktionspotentialverlauf in einer Nervenzelle dargestellt.



**Abbildung 2.7:** Aktionspotentialverlauf in einer Nervenzelle, entnommen aus (11): Das Membranpotential der Zelle beträgt im Grundzustand ca.  $-70$  mV. Aufgrund einer Anregung durch einen Strompuls öffnen sich schnelle  $\text{Na}^+$ -Kanäle und es entsteht eine aufsteigende Flanke, die zu einer Depolarisation führt. Nach einem Overshoot, der bis auf ca.  $20$  mV ansteigen kann, folgt die Repolarisation, die durch Öffnen der  $\text{K}^+$ -Kanäle eingeleitet wird.

Das Ruhemembranpotential ergibt sich aus den Gleichgewichtspotentialen (Gleichung 2.1) aller beteiligten Ionensorten, die jedoch entsprechend ihrer Leitfähigkeit unterschiedlich gewichtet werden (5). Unter Ruhebedingungen liegt das Membranpotential der meisten Zellen etwa bei  $-60$  bis  $-80$  mV und damit nahe am  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential, also dem Ion, dessen Leitfähigkeit am höchsten ist. Die Form und der dreiphasige Verlauf des Aktionspotentials bleiben immer gleichförmig (12). Zunächst startet ein Aktionspotential mit der Depolarisationsphase. Dabei öffnen sich beim Erreichen des Schwellenpotentials schnelle  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die zu einer raschen Depolarisation, bei Muskelzellen die Kontraktionsphase, der Zelle führen. Es werden positive Spannungspotentiale erreicht, die man „Overshoot“ nennt. In

der darauffolgenden Repolarisationsphase verschließen sich durch die fortschreitende Depolarisation immer mehr der schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, bis letztendlich alle vormals aktivierten inaktiviert sind. Diese Abnahme der Natrium-Leitfähigkeit setzt bereits vor Erreichen des Overshoots ein. Gleichzeitig werden durch die Depolarisation die  $\text{K}^+$ -Kanäle geöffnet, die die Repolarisationsphase des Aktionspotentials einleiten. Die Repolarisation endet nicht punktgenau am ursprünglichen Ruhepotential der Zelle, sondern dauert meist noch etwas länger an, sodass eine Nachhyperpolarisation der Zelle entsteht.

Das Aktionspotential von Muskelzellen unterscheidet sich nur marginal von dem der Nervenzellen. So dauert ein Aktionspotential einer Nervenzelle ca. 1 bis 2 ms, das einer Skelettmuskelzelle ca. 10 ms und einer Herzmuskelzelle ca. 200 ms. Aktionspotentiale können nach einer überschwelligem Reizung zunächst für einige Zeit nicht direkt wieder ausgelöst werden. Die Phase, in der erregende Reize unbeantwortet bleiben, heißt Refraktärzeit und liegt absolut bei der maximalen Länge eines Aktionspotentials.

In Skelettmuskelzellen aktiviert das Aktionspotential (AP) ein Membranprotein, den Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR). Der aus der Membran ins Zellinnere ragende Teil des DHPR sitzt wie ein Verschluss auf einem anderen Protein, dem Ryanodin-Rezeptor (RyR). Der RyR ist ein für gewöhnlich verschlossener Kanal, in der Membran eines intrazellulären Calcium-Speicherorganells, des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR).

Die Verknüpfung von Depolarisation der Zelle mit der Kontraktion verläuft wie folgt: Das AP entfernt den DHPR-Verschluss auf dem RyR in der SR-Membran. Ausströmende Calciumionen binden an das Tropomyosin C (Trp C), das den Ablauf der Kontraktion blockiert, solange seine Calcium-freie Form auf dem Zellskelettprotein Aktin aufsitzt. Bindet das Trp C Calcium, springt es von den Aktinfasern ab und ermöglicht es den Myosinfasern an den Aktinfasern entlang zu gleiten. Die Zelle kontrahiert.

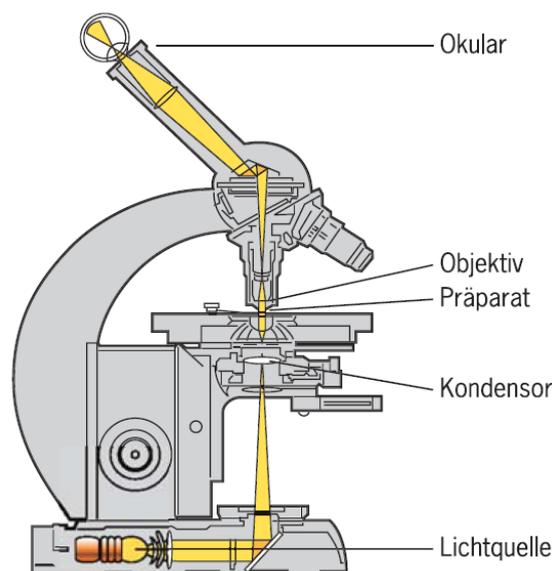
Mit fallender Depolarisation verschließt der DHPR den RyR wieder und Calcium-ATPasen im SR entfernen die Calciumionen aus dem Zelllumen. Damit wird das Tropomyosin C wieder aktiv und blockiert den Kraftzug von Myosin gegen Aktinfilamente. Die Zelle entspannt sich wieder (9).

## 2.3 Mikroskopie

Die Mikroskopie ist eine wichtige Untersuchungsmethode bei der Zellforschung, da sie es ermöglicht Objekte vergrößert anzusehen und visuell darzustellen.

### 2.3.1 Lichtmikroskopie

Für eine Untersuchung von Zellen, den kleinsten lebensfähigen Einheiten, eignet sich ein klassisches Lichtmikroskop, dessen Schnittaufbau in Abbildung 2.8 zu sehen ist. Auch für die Beobachtung von in-vivo Reaktionen ist die Lichtmikroskopie eine geeignete Technologie.



**Abbildung 2.8:** Schnitt durch ein Lichtmikroskop mit den Hauptbestandteilen und gelb eingezeichnetem Lichtweg, entnommen aus (7)

Das zu mikroskopierende Präparat wird durch eine am Fuß des Lichtmikroskops platzierte Lichtquelle beleuchtet (7). Die Kondensorenlinse unterhalb des Objektstischs bündelt die diffusen Lichtstrahlen der Lichtquelle und beleuchtet das Objekt mit einem kleinen, hellen Lichtkegel. Die durch den Kondensator auf das Objekt gebündelten Lichtstrahlen werden anschließend von den Linsen im Objektiv zu einem realen vergrößerten Bild im Mikroskoptubus erneut gebündelt. Daraufhin bildet das von der Objektivlinse geschaffene Abbild des Gegenstands das Abbildungsobjekt für das Okular ab, ein zweites Linsensystem, das ein nochmals vergrößertes virtuelles Bild des Gegenstands entstehen lässt.

Nun kann dieses virtuelle Bild vom vorderen Teil des menschlichen Auges, ein drittes Linsensystem, als Abbild auf die Netzhaut projiziert werden. Dreht man am Fokussierad des Mikroskops, verändert sich der relative Abstand zwischen Präparat und Objektiv. Auf diese Weise lässt sich das Abbild auf der Retina genau auf die Netzhautebene oder einen CCD-Kamerachip<sup>1</sup> justieren. Die Vergrößerung eines Lichtmikroskops berechnet sich aus dem Produkt der beiden Vergrößerungen von Objektiv und Okular.

### 2.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

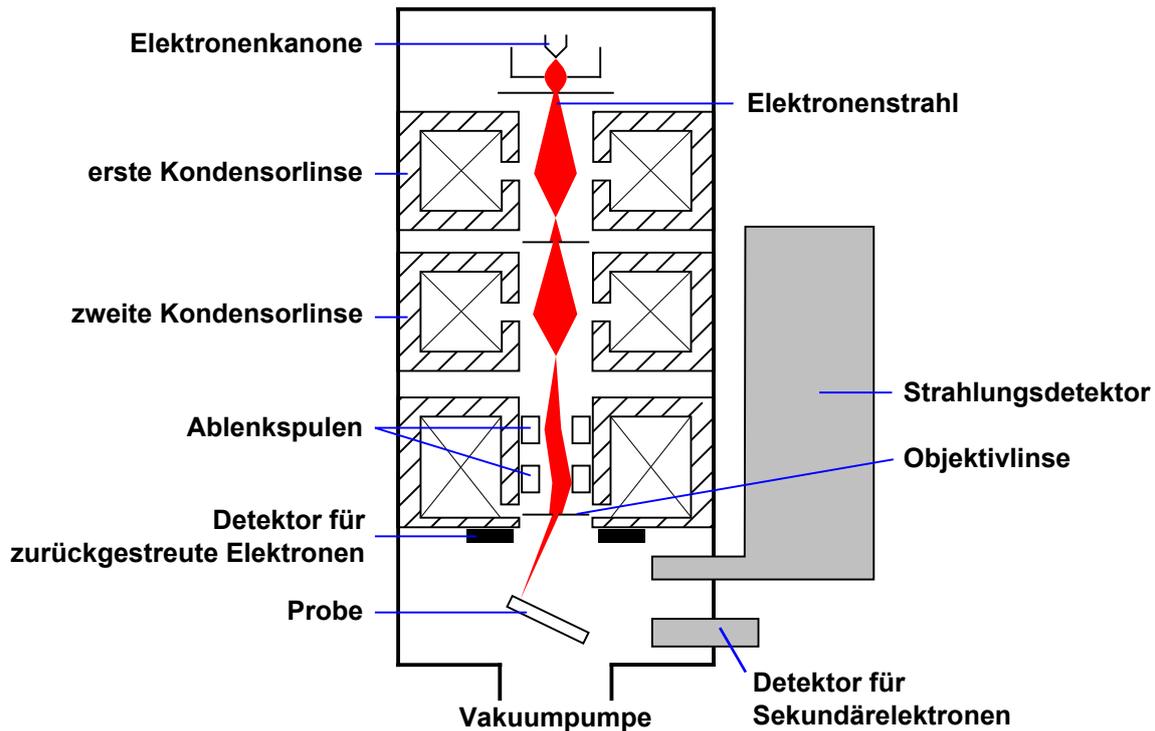
Beim SEM<sup>2</sup> wird die Oberfläche einer Probe mit schnellen Elektronen abgetastet und daraufhin abgebildet (7). Elektronen haben eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht. Aus diesem Grund ist die Auflösung bei einem Lichtmikroskop wesentlich geringer. Konventionelle Lichtmikroskope können Abbildungen, die kleiner sind als 200 nm, nur noch verschwommen darstellen. Dies ist beim Rasterelektronenmikroskop anders, wobei Auflösungen von bis zu 0,1 nm erreicht werden. Da das SEM ein Vakuum im Messraum benötigt, ist üblicherweise nur in-vitro Mikroskopie möglich.

Der Vorgang in einem SEM ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Dabei wird zunächst ein Elektronenstrahl aus einer Elektronenkanone emittiert. Dieser Elektronenstrahl wird von mehreren Kondensorenlinen fokussiert und anschließend durch eine Anordnung von Ablenkspulen auf die gewünschte Position gelenkt. Die Anordnung der Spulen muss in zwei Richtungen erfolgen, damit das Mikroskop rasterförmig eine rechteckige Ebene des zu scannenden Objekts abtasten kann. Wenn die Elektronen auf die Probe treffen, entstehen unterschiedliche Interaktionen. Zum einen werden bei einer elastischen Streuung Elektronen mit einer hohen Energie reflektiert. Weiterhin entstehen bei einer inelastischen Streuung Sekundärelektronen und auch elektromagnetische Strahlung. Die auswertbaren Informationen werden von unterschiedlichen Detektoren erfasst, sodass aus allen Detektionen im Computer ein Bild berechnet werden kann. Man erhält mittels eines SEMs also eine indirekte Bildgebung (10).

---

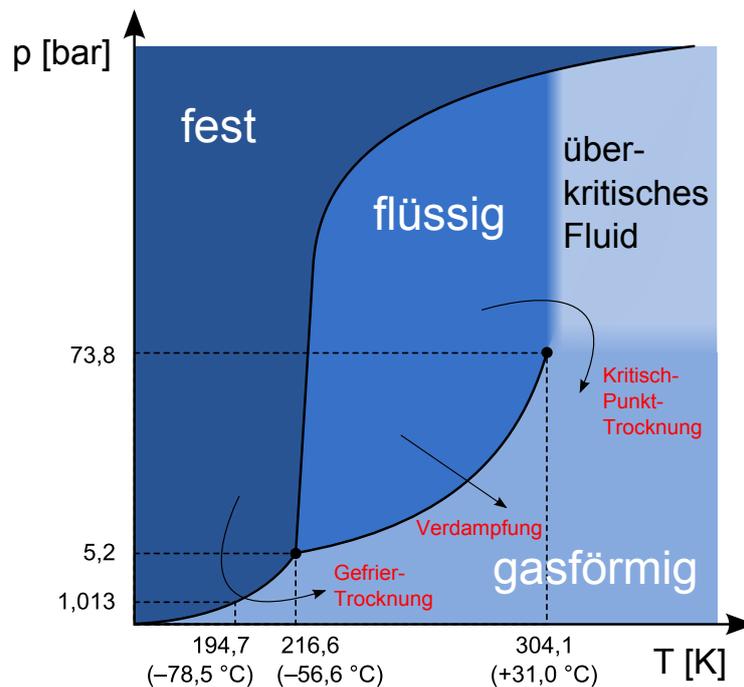
<sup>1</sup>Charge-coupled Device

<sup>2</sup>Scanning Electron Microscope = Rasterelektronenmikroskop



**Abbildung 2.9:** Schemazeichnung eines SEM mit Elektronenstrahlengang: Der rot eingezeichnete Elektronenstrahl durchläuft nach der Erzeugung in der Elektronenkanone mehrere Kondensorlinsen, um fokussiert zu werden. Mit Hilfe der Ablenkspulen kann der Auftreffpunkt des Strahls auf der Probe verändert werden. Nach dem Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe werden die auswertbaren Informationen von mehreren Detektoren weiterverarbeitet.

Um ein Präparat für die Rasterelektronenmikroskopie vorzubereiten, muss ein recht langwieriges Präparationsverfahren absolviert werden, welches in Abschnitt 3.3 beschrieben ist. Das Ziel der Objektpräparation für das SEM besteht darin, Form und Oberflächeneigenschaften des Objekts wie im lebendigen Zustand zu erhalten, ihm allerdings Flüssigkeit zu entziehen, damit es sich im Vakuum betrachten lässt. Da Wasser einen hohen Gewichtsanteil lebender Zellen ausmacht und in nahezu jedem Makromolekül enthalten ist, kann sein Entzug auf zelluläre Strukturen zerstörend wirken. Wenn man Zellen einfach gefriertrocknet, sorgt vor allem die Oberflächenspannung, die sich zwischen Luft und Wasser ergibt, für Schäden. Präparate, die im SEM betrachtet werden sollen, müssen deshalb mit der Kritisch-Punkt-Trocknung bearbeitet werden. Dieses Trocknungsverfahren macht sich den Umstand zu nutze, dass es für jede Flüssigkeit eine kritische Temperatur und einen kritischen Druck gibt, an dem die Gasdichte gleich der Flüssigkeitsdichte ist. An diesem Punkt gibt es keine Oberflächenspannung zwischen Gas und Flüssigkeit. Die Flüssigkeit in den Zellen wird durch eine geeignete transiente Flüssigkeit, in der Regel Koh-



**Abbildung 2.10:** Phasendiagramm von CO<sub>2</sub>: Beim Übergang in den gasförmigen Zustand wird zwischen drei Trocknungen unterschieden. Dabei spielt die Kritisch-Punkt-Trocknung eine besondere Rolle, da sie den Umweg über den Zustand des überkritischen Fluids geht.

lenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), ersetzt. Verdampft diese Flüssigkeit unter Druck, werden die Zellen keinerlei Oberflächenspannung ausgesetzt, durch welche ihre dreidimensionale Struktur zerstört werden könnte. Die Phasenübergänge von Kohlenstoffdioxid sind in [Abbildung 2.10](#) dargestellt.

# 3 Material und Methoden

Dieses Kapitel erläutert zunächst die Hauptkultivierungsverfahren von Muskelzellen, die auf dem Biochip verwendet werden. Dabei wird auf die in dieser Arbeit eingesetzte Zelllinie C2C12 eingegangen. Anschließend folgt die Erklärung zu verschiedenen Materialien und Vorgehensweisen bei der Mikrostrukturierung. Ein weiterer Abschnitt beschreibt die Präparation der Zellen für das Licht- und Elektronenmikroskop.

## 3.1 Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen aus der Zelllinie C2C12 und wurden aus der Oberschenkelmuskulatur von Mäusen gewonnen. Verwendet wird diese Zelllinie, weil die Myozyten nach ca. einer Woche unter serumgeringen Bedingungen (fünfprozentiger Serumgehalt) Myotuben bilden (14).

Ein weiterer Grund für die Verwendung von Muskelzellen ist, dass sie wesentlich leichter zu züchten sind als Nervenzellen und bei Aktionspotentialen auch mechanische Reaktionen durch die Kontraktion ausführen. Beim Wachsen auf strukturierten Substanzen bildet die Zelllinie C2C12 einen Monolayer. Sie bildet also zweidimensionales Gewebe auf biokompatiblen Oberflächen, was man als SAM<sup>1</sup> bezeichnet. Weitere Details über die Strukturierung von Zellen, dem „patterning“, können den folgenden Arbeiten entnommen werden (1, 3, 13, 16). Weiterhin wird die Zelllinie C2C12 genauer in den Arbeiten (2, 6, 8, 18, 21) beschrieben.

### 3.1.1 Stoffbeschreibungen

Um die Zellen zu ernähren, kommt das Nährmittel DMEM<sup>2</sup> zum Einsatz. Das DMEM Grundmedium wird mit vier weiteren Komponenten ergänzt. Hierbei handelt es sich zum einen um die Puffersubstanz HEPES<sup>3</sup>, die den PH-Wert bei ca.

---

<sup>1</sup>Self Assembled Monolayer

<sup>2</sup>Dulbecco's Minimum Essential Medium, nachfolgend nur noch Medium genannt

<sup>3</sup>2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure

7,5 hält und zum anderen um die Antibiotika Penicilin und Streptomycin, welche das Bakterienwachstum verhindern. Weiterer Bestandteil ist die Aminosäure L-Glutamin, die einen Nährstoff für die Zelle darstellt. Das essentielle FCS<sup>1</sup> liefert zusätzlich Proteine und nicht näher bekannte Wachstumsfaktoren. Das Medium besitzt eine rote Färbung, die durch den beigefügten Indikator Phenolrot entsteht und bei Gelbfärbung angibt, dass das Nährmittel den pH-Wert von 7,0 unterschreitet und verbraucht ist.

Zum Ablösen der Zellen muss die Kulturflasche vom FCS freigewaschen werden. Hierfür wird DPBS<sup>2</sup> verwendet, welches die Zellen vom Medium säubert und damit bewirkt, dass das Verdauungsenzym Trypsin wirken kann. Ohne die Säuberung würde die Wirkung des Trypsins durch die Inhaltsstoffe des DMEM blockiert werden. Trypsin hat die Aufgabe, die Zellen chemisch von der Zellkulturflasche abzutrennen. Dabei löst das Trypsin die Proteinverbindungen, durch die die Zellen an den Wänden der Flaschen festgehalten werden, auf und lässt sie an der Oberfläche schwimmen. Die Zellen ziehen sich dabei zu einer Kugelgestalt zusammen.

### 3.1.2 Passagieren

Da sich die Zelllinie C2C12 um den Faktor 50 in vier Tagen vermehrt, müssen die Zellen alle drei bis vier Tage passagiert werden, d. h. in andere Gefäße mit einer geringeren Konzentration umgesetzt werden. Die Zellen sind durch ihr Zytoskelett und Haftproteine auf dem Boden einer Zellkulturflasche festgewachsen und dabei von Medium umgeben. Das DMEM muss zum Passagieren zunächst entfernt werden. Anschließend werden die Zellen auf dem Boden von dem restlichen Medium mittels PBS gereinigt. Nun kann man die Myozyten mit Trypsin ablösen. Damit das Trypsin arbeitet, muss die Zellkulturflasche mit dem einwirkenden Trypsin zunächst für ein paar Minuten in den Wärmeschrank gelegt werden. Die Zellen schwimmen jetzt abgelöst in der Trypsinflüssigkeit und sind morphologisch rund und nicht mehr flach und polygonal wie im adhärenen Zustand. Anschließend kann die Zellkulturflasche mit Medium zu einem bestimmten Faktor, je nachdem wie dicht die Zellkulturflasche schon bewachsen ist, verdünnt werden und die gelösten Zellen können auf neue Passagenflaschen verteilt werden. Die frisch gefüllten Zellkulturflaschen kommen zum Abschluss wieder in den Brutschrank, damit sich die Zellen absetzen und vermehren

---

<sup>1</sup>fetales Kälberserum

<sup>2</sup>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, wobei Dulbecco nur der Herstellername ist und im folgenden Text weggelassen wird

können. Um eine bessere Wirksamkeit der verwendeten Substanzen zu gewährleisten, sollten diese vor Beginn der Passagierung ca. 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt werden.

Das Passagieren der Zellen ist abhängig von deren Zustand. So müssen Zellen früher passagiert werden, wenn man kleinere Zellkulturflaschen zur Verfügung hat oder die Zellen nur einem Hungermedium ausgesetzt sind und dieses schnell kahl fressen. Führt man das Passagieren zu spät aus, altern die Zellen, was man durch viele schwarze Flecken im Inneren der Zellen erkennen kann oder sie sterben, lösen sich ab und beginnen im Medium zu schwimmen. Es ist sehr wichtig bei den Passagen jeweils ein Backup anzulegen, damit man eine Rücklage hat, falls bei dem Umfüllvorgang Bakterien in die Zellkultur gelangen oder man einen Fehler begeht.

### 3.1.3 Fixieren und Färben

Um die Zellen für Untersuchungen vorzubereiten, kann man die Zellproteine chemisch quervernetzen und die Zellen so fixieren. Zur besseren Sichtbarmachung werden sie gefärbt. Für das Fixieren entfernt man aus der zu bearbeitenden Zellkulturflasche zunächst das Medium und reinigt die Zellen mit PBS. Daraufhin erfolgt die eigentliche Fixierung mit Formaldehyd<sup>1</sup>. Das Formaldehyd wirkt zytotoxisch und bildet mit Aminogruppen kovalente Bindungen. Dadurch entsteht eine Formerhaltung und Bewegungshemmung der Zellen. Zum Abschluss kommen die fixierten Zellen zur Quervernetzung 30 Minuten lang bei 37 °C in den Luftraum eines Wasserbades. Bei der Fixierung mit Formaldehyd ist noch eine geringe Proteinbeweglichkeit gegeben, sodass man dieses Verfahren auch bei der Behandlung mit Antikörpern verwenden kann. Diese Methode wird jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt.

Die in Zeitrafferaufnahmen mikroskopierten Zellen, wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, wurden mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff DiOC6(3)<sup>2</sup> angefärbt, der für lebende und tote Zellen verwendet werden kann. DiOC färbt nur die Zellmembran, diffundiert aber als nicht fluoreszierende Form frei in Flüssigkeiten. Nach der Färbung mit DiOC bleiben die Zellen am Leben und es lassen sich Filmaufnahmen machen.

Eine weitere Möglichkeit, Zellen zu färben, ist die Verwendung von Gurr's Giemsa, einer Färbelösung, bestehend aus Methylenblau und Gentianaviolett in einer Lösung aus Methanal, Citrat und Wasser. Es wird verwendet, um Stoffe mit OH-Gruppen

---

<sup>1</sup>Trivialname für Methanal bzw. CH<sub>2</sub>O

<sup>2</sup>3,3'-Dihexyloxycarbocyanin Iodid

einzufärben. Diese Färbelösung wirkt allerdings zytotoxisch und zellablösend, sodass diese Zellfärbung erst nach einer Zellfixierung zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führt.

## 3.2 Strukturierungsmaterialien für das Elektrodenarray

Grundbaustein des hier verwendeten Biochips ist ein handelsübliches Deckglas. Diese Grundplatte zur Aufnahme von mehreren verschiedenen Beschichtungslagen und zum Aufpflanzen der gezüchteten Muskelzellen besteht aus Sodaglas bzw. Floatglas. Sie hat die von mir gewählten Abmessungen von  $(24 \times 60)$  mm bei einer Dicke von  $(0,10 \pm 0,02)$  mm. Zur Weiterverarbeitung des Deckglases mussten Schablonen für verschiedene Oberflächenbehandlungen strukturiert und gefertigt werden. Die erfolgreiche Beschichtung mit verschiedenen Stoffen (Lack-, Metall und Polymerschichten) war für diese Arbeit von wichtiger Bedeutung.

### 3.2.1 Photolackbeschichtung und Besputterung

Um Elektroden auf Oberflächen zu erstellen, wird auf die Deckgläser zunächst eine Schicht positiver Photolack durch Sprühen aufgetragen. Nach zweiminütiger Anharthezeit wird erneut eine Schicht positiven Photolack aufgetragen und anschließend getrocknet. Für die komplette Aushärtung kommen die Elektrodenträger für mindestens 30 Minuten bei  $70^\circ\text{C}$  in einen Wärmeschrank. Nun werden die beschichteten Träger unter eine Photomaske gelegt, die in [Abbildung 4.2](#) dargestellt ist und mittels einer UV-Lampe die Muster der Maske in die Beschichtung einbelichtet. Die Belichtung wird über 15 Minuten in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, damit die Maske zwar durchleuchtet wird, jedoch die helleren Stellen des schwarzen Drucks fast kein Licht durchlassen. Näheres dazu in [Abschnitt 4.2.1](#). Daraufhin folgt die Photoentwicklung mit Natronlauge (0,7% in destilliertem Wasser), die die belichteten Flächen ablöst. Um eine weitere Ablösung der nicht belichteten Flächen sofort zu stoppen, werden die Träger in 2% wässrige Essigsäure gelegt. Nach anschließendem Abspülen mit destilliertem Wasser gelangen die vorstrukturierten Träger zum Trocknen in den Wärmeschrank.

Als nächster Schritt erfolgte die Besputterung der Träger, um die Elektrodenstruktur herstellen zu können. Bei dem Besputterungsvorgang wurden die Träger in die Besputterungsmaschine BAL-TEC MED 020 (Coating System) mit der Steuereinheit BAL-TEC MCS 010 gelegt, die sich am PCI<sup>1</sup> befindet. In der Maschine wurde zunächst ein Vakuum erzeugt, sodass anschließend eine 70 nm dicke Chromschicht (120 s Auftragzeit) auf die gesamte Oberfläche aufgebracht werden konnte. Diese Chromschicht ist wichtig, da sonst die folgende Goldschicht auf dem Träger nicht genügend haften würde. Da die Kristallstruktur des Goldes nicht mit dem Glas übereinstimmt, muss die Chromschicht die passenden Strukturabstände vermitteln, wodurch die beiden Schichten mit dem Glas fest verbunden werden. Die Dicke der folgenden Goldbesputterung betrug 60 nm (80 s Auftragzeit). Anschließend kann das Vakuum wieder abgebaut und die Träger vorsichtig aus der Maschine entfernt werden.

Da bei der Besputterung der gesamte Träger oben mit Chrom und Gold bedeckt wurde, muss nun eine zweite Entwicklung erfolgen, welche dank des Photolackmusters mit Aceton möglich ist. Die Träger werden nun in kleinen Kunststoffröhrchen in Aceton<sup>2</sup> eingelegt, was je nach Dichte der Beschichtung bis zur vollständigen Wirkung einen Tag dauern kann. Daraufhin müssen ungewollt beschichtete Stellen über dem Photolack zunächst durch Schütteln des Röhrchens und dann mit dem Pinsel abgelöst werden. Dabei ist zu beachten, dass die Träger bei dieser zweiten Entwicklung stets komplett mit Aceton bedeckt sind, weil sich sonst Goldbrocken ohne den aufgelösten Photolack wieder absetzen können. Nach dem Ablösen erfolgt erneut eine Trocknung im Wärmeschrank. Damit ist die Elektrodenstruktur fertiggestellt. Da jedoch bei der Entwicklung im PCI Ungereimtheiten auftraten, die sich in Form von unregelmäßigen Ablösungen des Goldes einstellten wie in Abbildung 4.5 erkennbar, wurde die Besputterung in der Folgeproduktion im KIP<sup>3</sup> durchgeführt. Bei dieser Besputterung wurde als Übergangsmedium anstelle von Chrom eine 15 nm dicke Titanschicht aufgetragen, die unter einer 200 nm dicken Goldschicht liegt. Die Besputterung erfolgte hier wesentlich länger, denn das Auftragen der Titanbeschichtung dauerte 15 Minuten und das Auftragen der Goldbeschichtung 26 Minuten. Dadurch erhielt man wesentlich festere Schichten.

---

<sup>1</sup>Physikalisch-Chemisches Institut

<sup>2</sup>Trivialname für Propanon C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O

<sup>3</sup>Kirchhoff-Institut für Physik

### 3.2.2 Verwendung von PDMS und HEMA

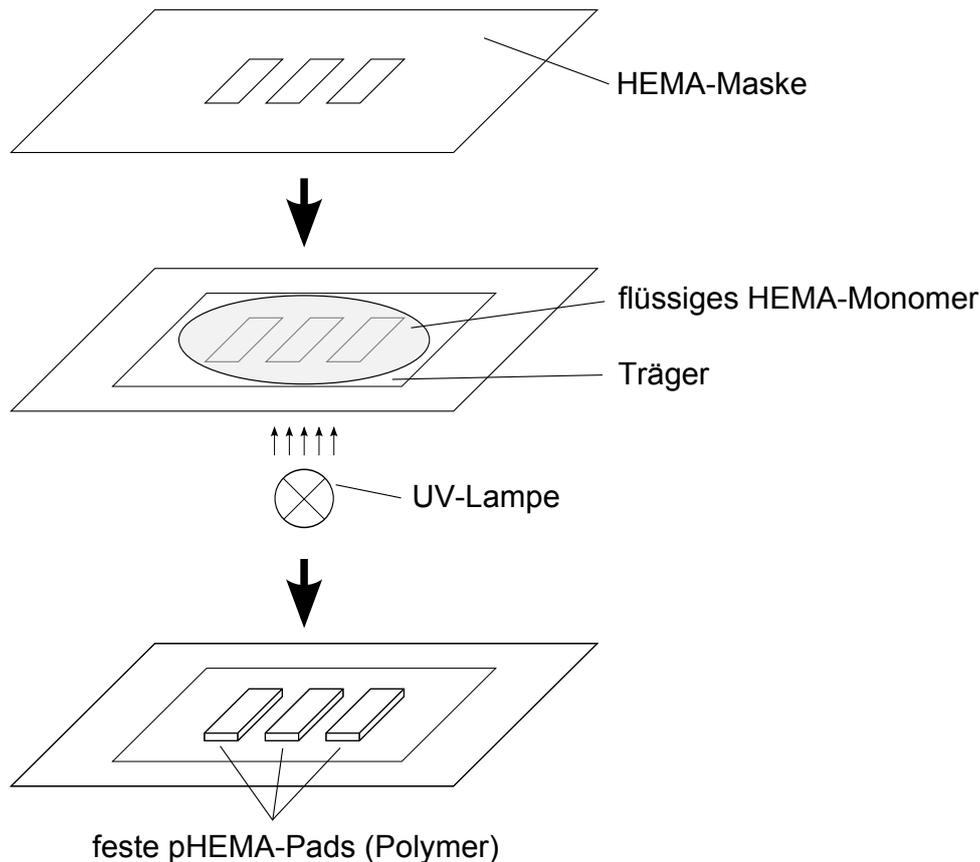
Das Gemisch PDMS<sup>1</sup> hat mehrere Anwendungsmöglichkeiten und dient zum einen als Klebstoff zwischen Glassubstrat und pHEMA-Struktur und zum anderen als Mikrostrukturumgebung für die hier verwendeten Zellen. Damit das Monomer bei der Lagerung nicht aushärtet, trennt man eine dickflüssige Komponente, „Sylgard 184, Component 1 (big point)“, von einer dünnflüssigen, „Sylgard 184, Component 2 (small bottle)“. Bei der Anwendung vermischt man diese beiden Komponenten im Verhältnis 10:1, wobei von der Komponente 1 die zehnfache Menge verwendet wird. Nach dem Auftragen auf die gewünschten Stellen lässt man das erstellte Monomer bei 90 °C eineinhalb Stunden durchhärten bis das gehärtete Polymer entsteht. Bei der Auftragung werden zum Schutz mit Organo-Silan überzogene Objektträger benutzt, da Silan PDMS-abweisend ist und man übergetropfte Reste einfach abwischen kann.

Für die Strukturierung wird ein Stempel verwendet, in den dünne, parallele Linien geprägt sind. Die Linien haben eine lichte Weite (Abstand zwischen den Stegen) von 30  $\mu\text{m}$  und eine Stegbreite von 5  $\mu\text{m}$ . Die Periodizität der Linien beträgt damit 35  $\mu\text{m}$ . Die Maße wurden in früheren Versuchen, die nicht während dieser Arbeit durchgeführt wurden, als optimal für das Zellwachstum bestimmt.

Für die Auftragung der zellabweisenden Flächen auf der Trägerplatte kommt pHEMA zum Einsatz. Dazu wird das flüssige HEMA-Monomer auf die vorgesehenen Stellen des Deckglases flächig aufgegossen. Das Deckglas liegt auf einer Fotomaske, auf der Pads mechanisch ausgeschnitten sind, wie in Abbildung 4.6 gezeigt. Unter der Maske befindet sich ein 100 Watt Hg-Höchstdruckbrenner Typ HB0100, dessen Licht mit dichroitischen Filtern auf einen Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 380 nm gefiltert wird und das HEMA-Monomer aushärtet. Als Beleuchtungsdauer für die pHEMA-Pads wurden fünf Minuten veranschlagt, da zu diesem Zeitpunkt das HEMA noch nicht vollständig polymerisiert ist und die Zwischenräume, die HEMA-frei bleiben sollen, noch ausgewaschen werden können. Dabei ist es sehr wichtig, dass möglichst viel des HEMA-Monomers abgewaschen wird, da das Monomer im Gegensatz zum Polymer zytotoxisch ist und die Mikrostruktur zudeckt. Nach der Reinigung wird das Elektrodenarray dieses Mal ohne Maske erneut zum endgültigen Aushärten über die UV-Lampe gelegt. Die UV-Belichtung des HEMAs und die darauf folgende Polymerisation sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

---

<sup>1</sup>Polydimethylsiloxan ( $(\text{H}_6\text{C}_2\text{OSi})_n$  -Vinyliden-Copolymer



**Abbildung 3.1:** UV-Belichtung des HEMA-Monomers: Oberhalb der UV-Lampe wird der Träger über die HEMA-Maske gelegt. Das flüssige HEMA-Monomer wird ausgehärtet, sodass nach der Entfernung des unbelichteten Monomers die pHEMA-Pads an den gewünschten Stellen aufgetragen sind.

### 3.3 Präparation für das SEM

Für die Untersuchung eines Präparates mit dem Elektronenmikroskop muss eine aufwendige Präparation erfolgen, die mindestens sieben Stunden in Anspruch nimmt. Nach der Anzucht des zu mikroskopierenden Zellpräparats muss dieses zunächst fixiert werden. Dazu wird das Präparat in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  im Verhältnis eins zu zwei gewaschen und anschließend eine Minute bei  $37^\circ\text{C}$  in ein Wärmebad gelegt. Anders als in Unterkapitel 3.1.3 beschrieben, wird bei der Präparation für das SEM die Fixanz Glutaraldehyd<sup>1</sup> verwendet, damit die 3D-Struktur des Präparats erhalten bleibt und die Proteinbeweglichkeit vollständig gestoppt wird. Das Glutaraldehyd wird vierprozentig in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gegeben und nach Zugabe auf das Präparat eine Stunde in den Wärmeschrank gestellt. Nach diesem Einwirken kommt das Präparat 12 bis 18 Stunden in den Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 bis

<sup>1</sup>Trivialname für n-Hexandial

8 °C.

Im nächsten Schritt wird das Präparat mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Nach dem zweimaligen Waschen mit destilliertem bzw. demineralisiertem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ) erfolgt nun eine weitere Fixierung mit einprozentigem  $\text{OsO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ , wodurch sich die organischen Substanzen schwarz färben. Das Osmiumtetroxid schafft ein metallisches Abbild der Zelle, welches das Elektronenmikroskop detektieren kann. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wird das Präparat nun mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend benutzt man eine einprozentige Tanninlösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ , um das Präparat zu gerben. Tannin ist ein Holzstoff und führt neue organische Substanz ein, die in einem zweiten Schritt vom Osmium wieder in Metall umgesetzt werden kann. Nach der Gerbung wird das Präparat wieder mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und es erfolgt eine zweite Osmiumbeschichtung. Nach dem obligatorischen Waschen in destilliertem Wasser wird zum Präparat nun eine 25-prozentige Ethanollösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gegeben und bei Raumtemperatur 15 Minuten abgewartet. Im Anschluss erhöht man die Ethanolkonzentration schrittweise um je 25 %, bis man eine absolute Ethanolösung erreicht hat. Das Präparat kann nun in dieser Lösung gelagert werden. Das langsame Erhöhen der Ethanolkonzentration ist nötig, um dem Präparat das Wasser zu entziehen und bei der folgenden „Kritisch-Punkt-Trocknung“ einen leichteren Übergang zur Präparatlagerung in flüssigem  $\text{CO}_2$  zu gewährleisten.

In einem nächsten Schritt folgt nun die Kritisch-Punkt-Trocknung mit Hilfe des Gerätes BAL-TEC CPD 030 (Critical Point Dryer), die ebenfalls im physikalisch chemischen Institut bei Herrn Dr. Marcus Abel durchgeführt wurde. Zunächst wird das Präparat auf 9 °C abgekühlt („Cooling“) und einem Druck von 30 bar in einem geschlossenen Gehäuse ausgesetzt (Grundzustand). Diese Umgebungsveränderung ist notwendig, da nun das Ethanol durch flüssiges  $\text{CO}_2$  ausgetauscht werden soll.  $\text{CO}_2$  befindet sich unter den oben genannten Bedingungen in flüssigem Zustand, wie aus dem Phasendiagramm in [Abbildung 2.10](#) ersichtlich ist. Man benötigt das flüssige  $\text{CO}_2$ , da bei der überkritischen Trocknung der kritische Punkt von  $\text{CO}_2$  schon bei 73,8 bar erreicht wird. Dieser kritische Punkt liegt für Wasser bei labortechnisch schwer zu erreichenden 220,5 bar ([15](#)). Der Medien austausch zwischen Ethanol und  $\text{CO}_2$  erfolgt wesentlich sauberer als der Austausch von destilliertem Wasser und  $\text{CO}_2$ , da sich aufgrund der Stoffeigenschaften kein brauchbares Mischverhältnis einstellt. Kohlenstoffdioxid ist in Wasser schlecht löslich und deshalb nur schlecht mischbar. Es ist deshalb über den Umweg, Ethanol als Mischpartner zu verwenden, überhaupt erst möglich das Präparat in  $\text{CO}_2$  zu immersieren.

Nachdem sich das Präparat nun im Grundzustand befindet, kann der Austausch mit  $\text{CO}_2$  beginnen. Dazu wird  $\text{CO}_2$  in das Gehäuse des Kritisch-Punkt-Trockners eingepumpt („Medium in“), bis es bis zum oberen Rand gefüllt ist und ca. 60 bar aufweist. Nun wird einige Minuten gewartet, damit der Magnetrührer die Substanzen gründlich vermischen kann und der Druck sich bei ca. 40 bar befindet. Folgend wird der Schalter „Medium in“ betätigt und solange abgepumpt, bis das Präparat gerade noch von der Lösung bedeckt ist und sich ein Druck von ca. 30 bar im Gefäß aufgebaut hat. Diese Vorgänge werden nun mindestens zwölf Mal wiederholt, bis eine verhältnismäßig saubere  $\text{CO}_2$ -Konzentration vorliegt. Der Druckverlauf erfolgt auf diese Weise, da sich die Proben temperatur beim Zulauf von neuem  $\text{CO}_2$  ändert. Abschließend wird das Gefäß auf  $40^\circ\text{C}$  und 80 bar Druck erwärmt („Heating“), um das überkritische Fluid zu erzeugen und damit die überkritische Trocknung durchführen zu können. Das gasförmige  $\text{CO}_2$  wird nun langsam abgepumpt bis wieder Normaldruck herrscht und die Probenkammer geöffnet werden kann.

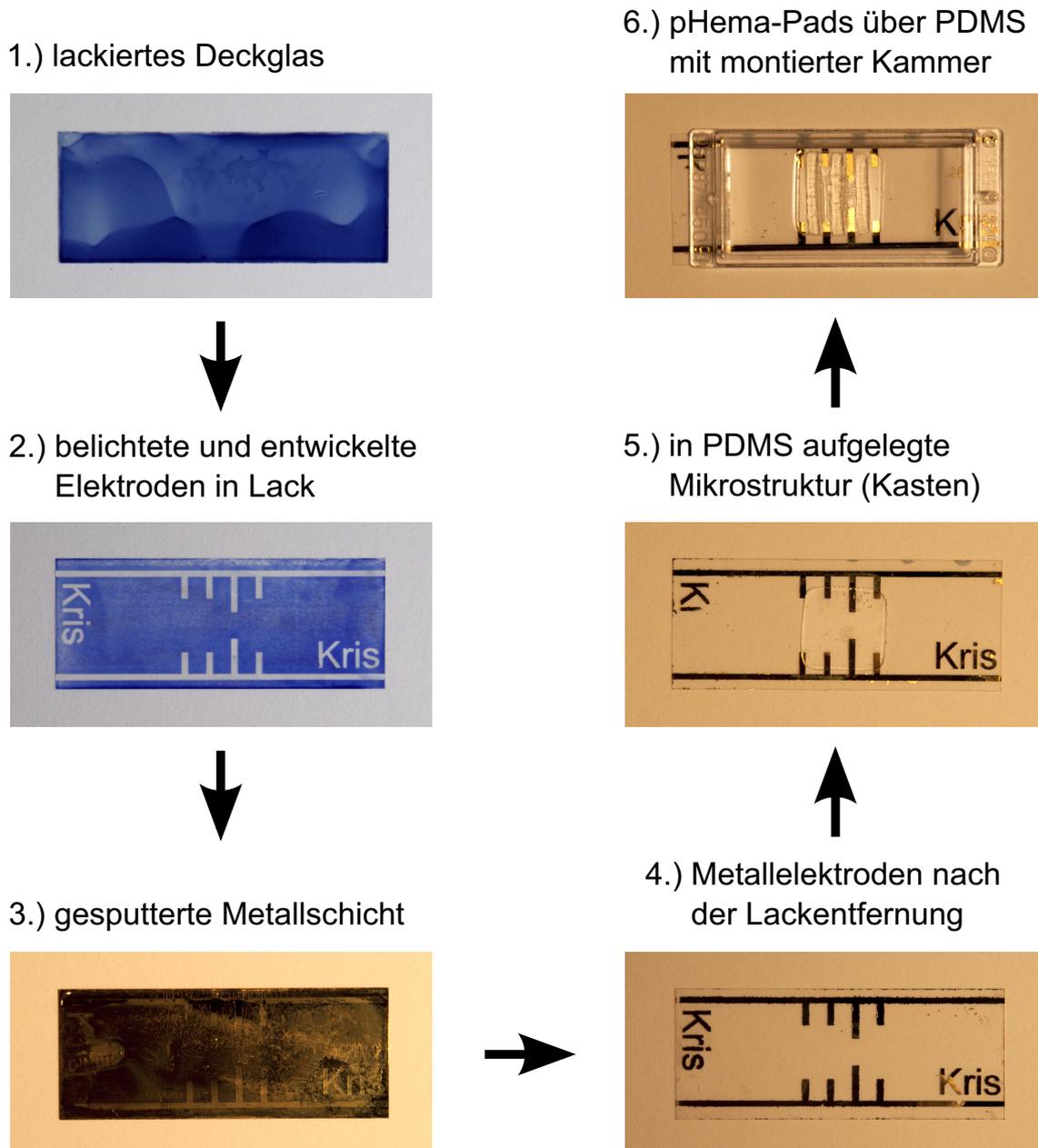
Damit das Präparat kein Wasser aus der Luftfeuchte aufnimmt, sollte die Weiterverarbeitung recht schnell geschehen. Das Präparat wird mit einer ca. 10 nm dicken Goldschicht besputtert und ist nun für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Um bei der Mikroskopie eine gute Beweglichkeit des Präparates auf dem Mikroskopiertisch zu gewährleisten, wird noch ein Metallfuß unter dem Präparat angeklebt. Dieser hat die Passform für das Elektromikroskop LEO 1530 von der Firma Carl Zeiss NTS GmbH. Es steht im Keller des Medizintraktes, um bei der Messung unnötige Erschütterungen zu vermeiden.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die bei der Durchführung dieser Bachelorarbeit gewonnenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Zuerst erfolgt ein kurzer Überblick der angewandten Verfahren. Daraufhin werden die Ergebnisse zum Erstellen von Elektroden und der pHEMA-Pads erläutert. Weiterhin wird auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden und das Verhalten der Muskelzellen eingegangen.

## 4.1 Überblick

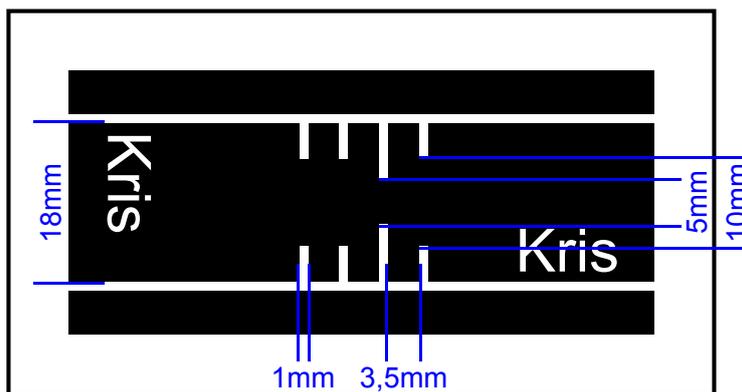
Um einen Überblick über die gesamte Herstellung des entwickelten Elektrodenarrays zu bekommen, liefert Abbildung 4.1 eine zusammenfassende Darstellung. Ein Vorteil der Entwicklungsvorgänge ist, dass sowohl der verwendete Photolack, als auch das pHEMA nach der Entwicklung bei Tageslicht weiterverwendet werden können. Beide Verfahren sind außerdem funktional voneinander unabhängig und deswegen trennbar. Weitere Vorteile sind der geringe Kostenaufwand und der überschaubare Hilfsmittelbedarf.



**Abbildung 4.1:** Überblick der Herstellung des Elektrodenarrays: 1.) Ein Deckglas ist mit positivem Photolack besprüht worden. 2.) Mit Hilfe einer Belichtungsmaske wurde die Elektrodenstruktur in den Lack entwickelt. 3.) Auf das Deckglas wurde eine Metallschicht gesputtert. 4.) Die unbelichtete restliche Photolackschicht wurde entfernt und damit die Metallelektroden entwickelt. 5.) In der Mitte des Deckglases wurde eine in PDMS aufgelegte Mikrostruktur aufgebracht. 6.) Über die PDMS-Struktur wurden pHEMA-Pads polymerisiert und eine Kammer montiert.

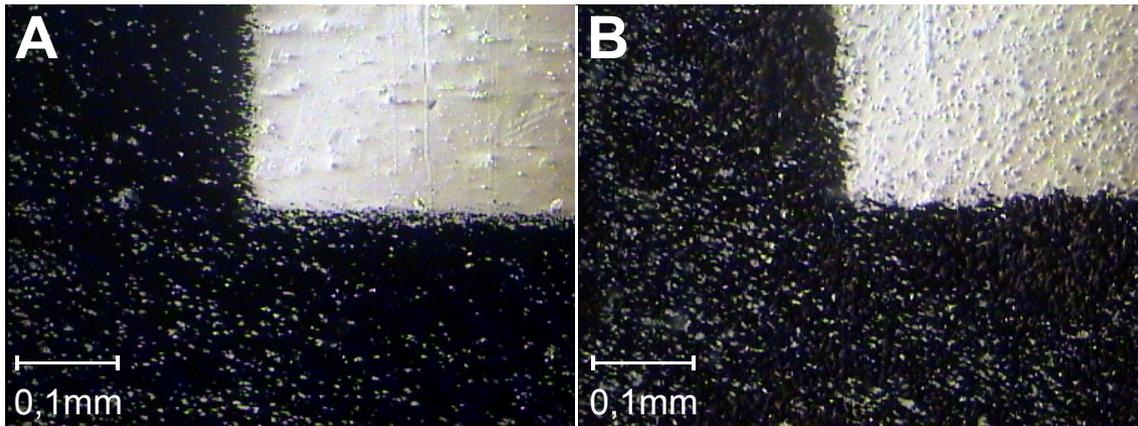
## 4.2 Entwicklung der Elektroden

Um das Verhalten der C2C12-Zellen untersuchen zu können, wird eine Struktur von Elektroden benötigt, die an den Enden und in Richtung der gezüchteten Zelltuben ein elektrisches Potential darstellen. Dadurch ist es möglich, das Membranpotential der Muskelzellen zu verändern und auf diese Weise eine Kontraktion auszulösen. Für die Beschichtung der Elektroden mit Gold benötigt man zunächst eine Maske, die auf Druckerfolie aufgedruckt wurde und in [Abbildung 4.2](#) dargestellt ist. Zum Erstellen der Maske kam das Programm „Inkscape“ zum Einsatz. Dabei wurden die mechanischen Maße so gewählt, dass die Flächen, an denen später die Zellen platziert sein werden, in eine gut mikroskopierbare Box passen, wie auf dem fertigen Elektrodenarray in [Abbildung 5.1](#) dargestellt ist. Der Innenabstand zwischen den Zellelektroden beträgt bei den kurzen Elektroden 10mm und bei den langen Elektroden 5mm.



**Abbildung 4.2:** Photolackmaske zur Erstellung der Elektroden: An den weißen Flächen wird der Photolack belichtet und anschließend abgelöst, damit an diesen Stellen die Metallschicht haften bleibt. Es ragen acht Elektroden in die Mitte des Deckglases hinein, um vier Reihen mit Muskelzellen platzieren zu können. Ein Elektrodenpaar wurde länger gewählt, um bei unterschiedlichem Abstand das Zellwachstum zwischen den Elektroden untersuchen zu können.

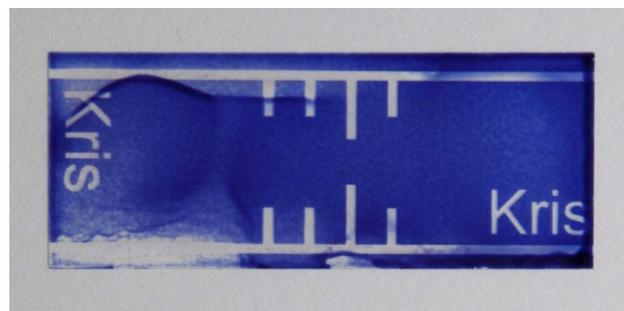
Ein gleichmäßiges Bedrucken der Folie stellte sich als schwierig heraus, denn aufgrund der verschiedenen Partikeldichten bei unterschiedlichen Tonern der Drucker waren die Ausdrücke alle ungleich, wie in [Abbildungen 4.3](#) zu sehen ist. Auch die Druckerfolien waren teilweise beschichtet und störten somit die Optik der Bestrahlung, da das UV-Licht gestreut wurde. Für diese Zwecke erwies sich im Endeffekt als gebrauchstfähigste Methode der Laserdrucker „hp LaserJet 4200n“ mit einer nicht beschichteten für Farbdrucke vorgesehene Folie.



**Abbildung 4.3:** Unterschiede bei der Maskenbedruckung, untersucht mit dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung:  
A: verwendete, weitgehend dichte Maske, B: fehlerhafte, lichtdurchlässige Maske

#### 4.2.1 Photolackbeschichtung

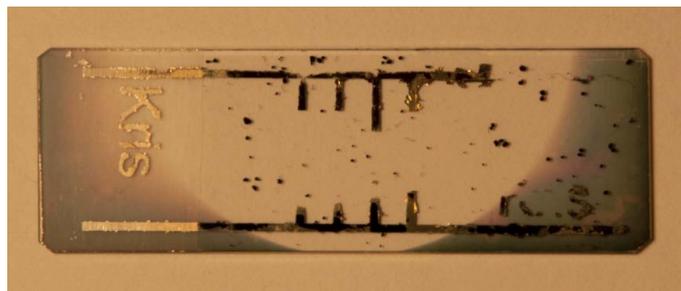
Den Photolack einigermaßen gleichmäßig auf die zu mikroskopierenden Deckgläser aufzutragen, ist anspruchsvoll. Um ein Verrutschen der Deckgläser zu vermeiden, wurde der Lack aus einem großen Abstand aufgesprüht, damit der Sprühdruck nicht zu stark war. Das Verfahren des „Spin-Coating“, wobei sich ein Wafer schnell dreht und die Photolackschicht somit ausgedünnt wird, war nicht notwendig, da trotz der Unregelmäßigkeiten beim Aufsprühen die Qualität ausreichend war. Einer der Fehlversuche ist in [Abbildung 4.4](#) zu sehen. Die besprühten Deckgläser sind unbrauchbar, da sich entweder kräftige Schlieren bildeten, die nach dem Belichten nicht wirksam abgelöst werden konnten oder der Photolack auf verschiedenen Bereichen nicht dick genug aufgetragen wurde und deshalb Löcher entstanden sind, in denen sich Gold auf dem Glas ablagern würde.



**Abbildung 4.4:** Fehlversuch bei der Photolackbeschichtung: Die zu dünne Lack-schicht an der Unterseite wurde überbelichtet. Die zu dicken Lackränder, die an der Oberseite durch Schlieren gekennzeichnet sind, blieben unterbelichtet

### 4.2.2 Elektrodenbeschichtung

Nach der Besputterung der mit der Photolackstruktur versehenen Deckgläser trat zunächst das Problem auf, dass sich bei der Entwicklung mit Aceton nicht nur die beabsichtigten Flächen ablösten, sondern auch Teile der Elektroden. Wahrscheinlich erfolgte die Besputterung der Deckgläser zu schnell, sodass die Ablagerungen keine gleichmäßigen Dichten darstellten und deswegen keine festen Schichten ergaben. Dies könnte am zu groß eingestellten Sputterstrom liegen. Nachdem jedoch statt des Verbindungsstoffes Chrom das Metall Titan gewählt wurde, trat das Problem nur noch selten auf. Am PCI war das Besputtern mit Titan technisch nicht möglich. Deshalb wurde die Besputterung am KIP durchgeführt. Hier werden geringe Sputterströme bei hohen Sputterzeiten verwendet, während am PCI umgekehrte Einstellungen gewählt wurden. Die fehlerhafte Elektrodenentwicklung ist in Abbildung 4.5 zu sehen.



**Abbildung 4.5:** Fehlerhafte Elektrodenentwicklung auf einem Objektträger: Bei der Entwicklung wurde zu viel Metall abgelöst, sodass die Elektroden zum Teil nicht mehr vorhanden waren. Die halbrunde Metallablagerung entstand durch die Auflagefläche auf der Rückseite beim Besputtern.

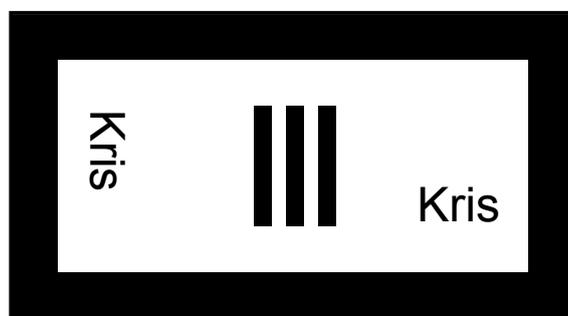
## 4.3 Strukturierung

Für die Strukturierung der Zellen benötigt man zum einen eine zwischen Glas und pHEMA haftvermittelnde Schicht mit Mikrolinien, die mit PDMS hergestellt wurde und zum anderen Flächen, auf denen keine Zellen wachsen. Diese Flächen wurden mit pHEMA, das als rechteckige Kissen deponiert wurde („Pads“), erstellt.

Bei der PDMS-Beschichtung wurden Stempel zur Oberflächenstrukturierung verwendet. Dabei entstanden Probleme bei der Auftragung, denn wenn zu viel PDMS auf den Stempel aufgetragen und anschließend auf ein Deckglas gebracht wird, deckt es die Elektroden ab. Wenn allerdings zu wenig PDMS verwendet wird, entsteht lediglich eine runde Beschichtung, die nicht den gewünschten Bereich abdeckt. Aus

diesem Grund musste die Menge des PDMS auf dem Stempel sehr genau dosiert werden. Eine weitere Schwierigkeit trat beim Entfernen des Stempels auf, denn teilweise löste sich die PDMS-Schicht vom Deckglas wieder mit ab, obwohl der Stempel mit PDMS-abweisendem Silan beschichtet ist. Die Kraft des großflächigen mechanischen Oberflächenkontaktes war in diesem Fall größer als die Kontaktkraft zum Deckglas. Nach der PDMS-Beschichtung traten beim Zellwachstum „Bulbs“ auf. Bulbs sind Zellklumpen, die ohne Haftung am Glasuntergrund im Medium schwimmen. Sie kommen dadurch zustande, dass die Zellen auf einem Präparat nicht so gut haften wie aneinander und daher nach dem Ablösen nur noch andere Zellen zum Festhalten haben. Deshalb wachsen die Zellen als kohärente Zellmasse weiter.

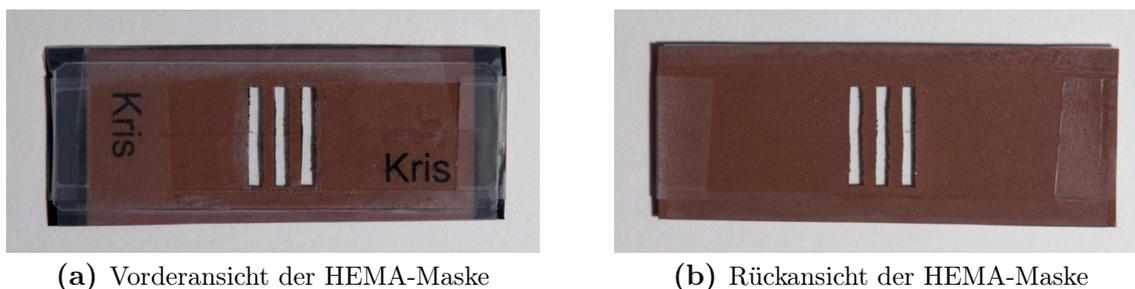
Bevor die HEMA-Beschichtung aufgetragen werden konnte, musste wieder eine Maske mit dem Programm „Inkscape“ erstellt werden, die in [Abbildung 4.6](#) dargestellt ist. Auf beiden Masken ist die Abkürzung meines Namens („Kris“) aufgebracht, um durch ein chirales Zeichen die Vorderseiten und die Richtung der Masken per Referenzpunkte zu kennzeichnen. Somit lassen sie sich deckungsgleich übereinander anbringen, da „Kris“ an den gleichen Stellen der größenmäßig identischen Masken steht.



**Abbildung 4.6:** Maske zur Erstellung der pHEMA-Pads: Die schwarzen Areale kennzeichnen die Stellen an denen auf den Deckgläsern die pHEMA-Pads entstehen sollen.

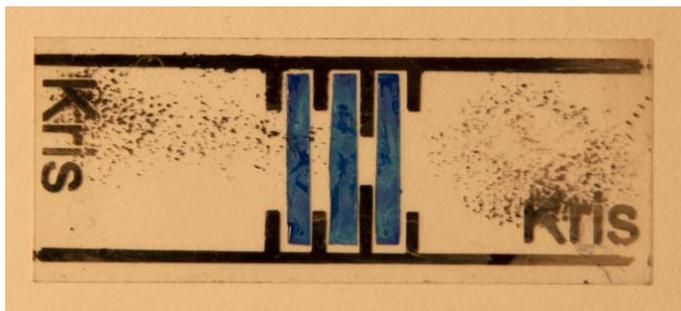
Bei der UV-Licht-Bestrahlung trat das Problem auf, dass die Benetzung des flüssigen HEMAs auf der PDMS-Beschichtung auf dem Deckglas nicht sehr gut funktionierte. Deshalb wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, den Rand abzudecken. Dabei wurde jedoch die Abdeckung primär benetzt und nicht die eigentlich gewollte Fläche. Weiterhin wurde das UV-Licht an einer Abdeckung mit Parafilm derart gespiegelt, dass nicht nur die Maskenabbildung ausgehärtet wurde, sondern die gesamte Fläche.

Vor der Polymerisation ist die Farbe der HEMA-Ränder blau-weißlich, doch nachdem das UV-Licht länger auf die Struktur gefallen ist, werden die Ränder blaugelblich. Dieses Phänomen liegt an der Veränderung der Stoffeigenschaft bei der Polymerisation. Aufgrund der neuerlichen Anordnung der Moleküle verändert sich hierbei der Lichtbrechungsindex, was die unterschiedliche Färbung veranlasst. Zusätzlich treten gelbliche Abbauprodukte des zugesetzten Radikalstarters auf. Nach den ersten Auftragsversuchen mit der inversen HEMA-Maske (Schwarz und Weiß vertauscht) wurde festgestellt, dass auch die Druckdichte des dunklen Laserdrucks nicht ausreicht. Deshalb wurden aus der Folienmaske die pHEMA-Pads herausgeschnitten und anschließend die verbleibende Maske mit dichtem, braunen Kupferleitlack besprüht. Um durch die Feuchtigkeit des Lacks ein Wellen der Folie zu verhindern, wurde sie auf einen Objektträger mit doppelseitigem Klebeband aufgeklebt. Siehe hierzu Abbildung 4.7.



**Abbildung 4.7:** Vorder- und Rückansicht der HEMA-Maske: Aus der auf Folie ausgedruckten Maske wurden die Schlitze herausgeschnitten und Kupferlack aufgetragen. Die Folie ist auf einem Objektträger mit Klebefilm fest aufgebracht.

Zunächst wurden die pHEMA-Pads ohne PDMS-Klebstoff auf die Deckgläser aufgetragen, wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist. Diese Variante war jedoch im Medium unbefriedigend, denn die pHEMA-Pads fanden keinen guten Halt auf der Glasoberfläche, sogen sich mit Flüssigkeit voll und lösten sich anschließend teilweise vom Untergrund ab. Deshalb wurde eine PDMS-Klebeverbinding unter die pHEMA-Pads gelegt, die zusätzlich strukturiert ist. Um die Größenordnung überblicken zu können ist in Abbildung 4.9 die PDMS-Strukturierung angrenzend an eine Elektrode dargestellt. Die Größenverhältnisse des pHEMA-Pads zu den Linien sind in den SEM-Aufnahmen 4.15 und 4.16 ersichtlich.



**Abbildung 4.8:** Elektrodenarray ohne PDMS-Beschichtung: Die pHEMA-Pads erscheinen blau, da sie mit Giemsa-Lösung gefärbt wurden. Die Verschmutzung zwischen den Elektroden entstand aufgrund der nicht gut abgelösten Sputterschicht.

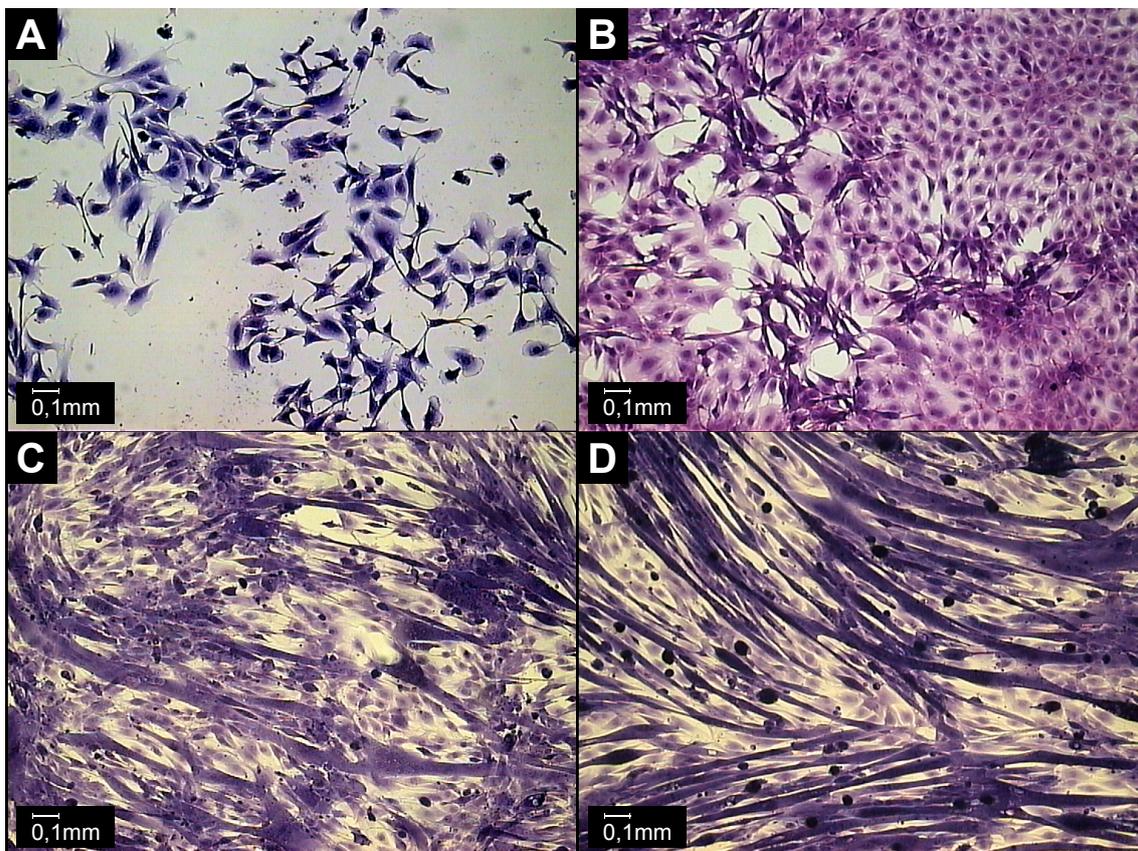


**Abbildung 4.9:** Größenübersicht der PDMS-Linien neben einer Elektrode bei 10-facher Vergrößerung: Der schwarze Bereich am oberen Bildrand zeigt die Elektrode. Die Linienstruktur parallel zu den Seiten der Elektrode ist die PDMS-Strukturierung.

Die vorhandene Schale als Deckel auf der fertigen Chipoberfläche hat viele nützliche Eigenschaften: So passen die Größe und die rechteckige Form optimal zu den Deckgläsern, da die Maße der Box ( $24 \times 50$ ) mm und die der Deckgläser ( $24 \times 60$ ) mm betragen. Damit ragen meine Elektroden etwas aus der Box heraus und können somit optimal an die Signaleinspeisung angekoppelt werden. Weiterhin passt die Box gerade noch in eine Zellkulturschale und bietet Zellen somit gute Wachstumsbedingungen und dem gesamten Elektrodenarray einen mechanischen Schutz. Die Abdeckung hat bewusst keinen Griff. Deshalb lässt sich die Box auch noch sehr gut mikroskopisch untersuchen, weil bei der Belichtung das Licht nicht abgelenkt wird. Nachteile sind jedoch, dass der Kunststoff der Box in Aceton löslich ist und dass sie nicht erhitzen bzw. autoklavierbar ist.

## 4.4 Untersuchungsmethoden

Um die Zellen untersuchen und für das menschliche Auge gut sichtbar darstellen zu können, sind verschiedene Methoden der Mikroskopie angewendet worden. Dabei war die Kontrastoptimierung bei jedem Bild extrem wichtig.

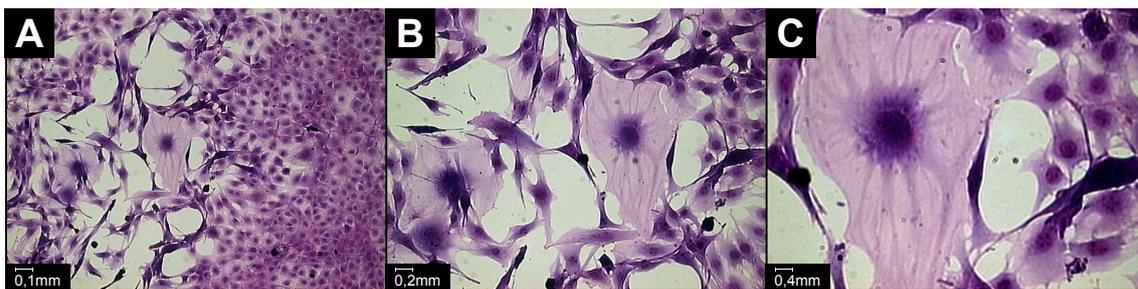


**Abbildung 4.10:** C2C12 Differenzierung von Zellstadien bei 10-facher Vergrößerung: Die Farbunterschiede in den vier Aufnahmen entstanden durch eine unterschiedliche Auspegelung der Farben mit dem Hintergrund, der in Bild A weißlich und in Bild D gelblich erscheint. Das Präparat in Bild B wurde nach der Färbung kürzer gewaschen als bei den anderen Präparaten, sodass die Zellfärbung mehr ins rötliche geht.  
 A: niedrige Zelldichte; B: hohe Zelldichte; C: frühe, schwache Tuben. Zwischen den Myotuben, die aus mehreren Zellen zu einem Schlauch zusammengewachsen und als längliche violette Streifen sichtbar sind, befinden sich noch eine Vielzahl weiterer polygonaler Myozyten; D: späte, starke Tuben. Hier nimmt das Zytoskelett der Myotuben eine kräftige Farbe an.

### 4.4.1 Lichtmikroskopie

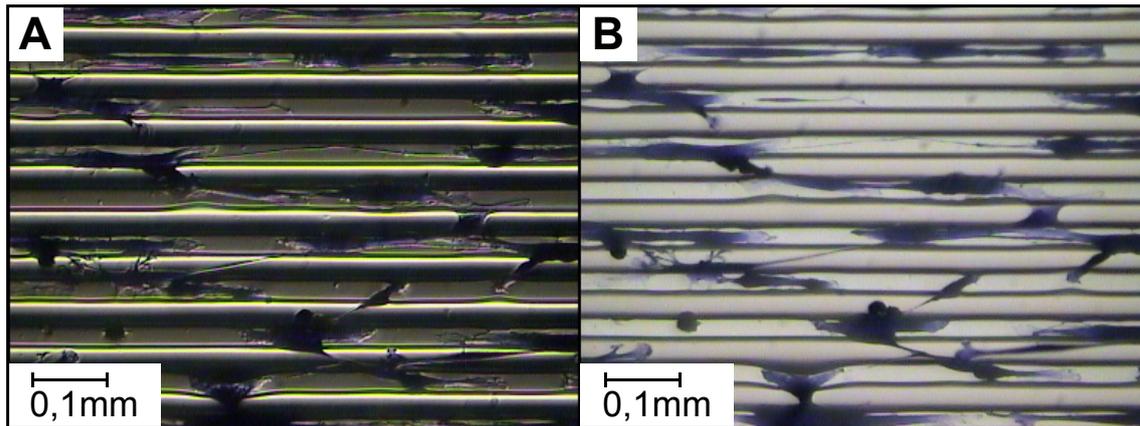
Das Verhalten der Zellen lässt sich am einfachsten und auf recht schnelle Weise mit einem Lichtmikroskop darstellen. Abbildung 4.10 zeigt verschiedene Zellstadien, wobei die Zellen mit „Giemsa“ gefärbt wurden und dadurch blau-violett erscheinen. Das Zellstadium A (niedrige Dichte) ist eine Aufnahme einen Tag nach dem Passagieren der Zellen, das Zellstadium B (hohe Dichte) entstand nach drei Tagen, das Zellstadium C (schwache Tuben) nach fünf Tagen und das Zellstadium D (starke Tuben) nach neun Tagen. Auf den Bildern zu den verschiedenen Zellstadien ist zu erkennen, dass die Zellen bei höherer Dichte kleiner sind. Dies resultiert aus dem geringer werdenden Platzangebot.

Mit der Lichtmikroskopie wurden Aufnahmen bei verschiedenen Vergrößerungen der Zellen an der gleichen Präparatstelle der Zellkulturflasche gemacht, wie in Abbildung 4.11 dargestellt ist. Das Bild entstand von einem Zellstadium, in dem eine hohe Dichte erreicht wurde.

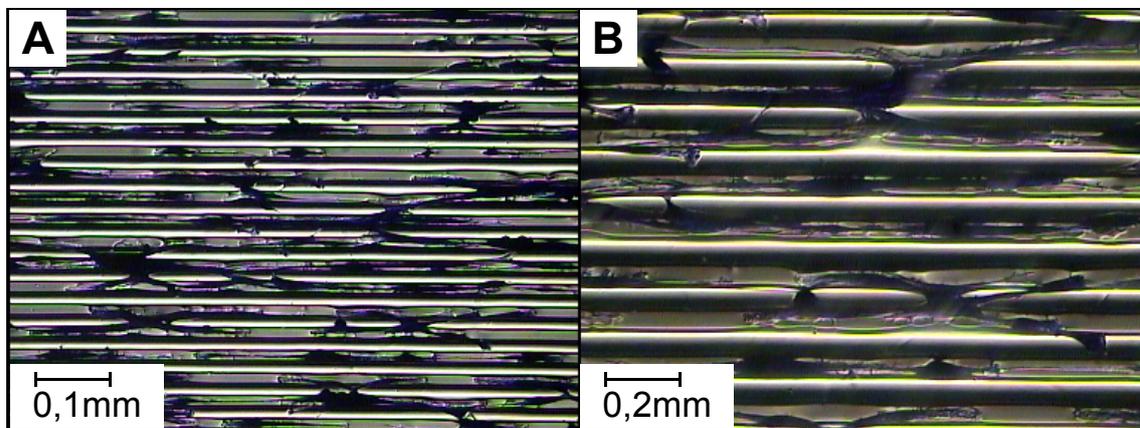


**Abbildung 4.11:** C2C12 bei hoher Dichte und unterschiedlichen Vergrößerungen: Es sind verschieden große Myozyten abgebildet, wobei auf die große Zelle fokussiert wurde. Die dunkleren violetten Punkte in den Myozyten kennzeichnen den Zellkern. Die Streifen in den Zellen, die vom Zellkern weglaufer, bilden das Zytoskelett ab. A: 10-fache Vergrößerung, B: 20-fache Vergrößerung, C: 40-fache Vergrößerung

Um die Zellen auf der PDMS-Linienstruktur gut erkennen zu können, wurden sie in Abbildung 4.12 und 4.13 mit Giemsa eingefärbt. Bei diesen Aufnahmen wurde zusätzlich einen Kondensator verwendet, der den Kontrast der Aufnahmen merklich verbessert hat, wie in Abbildung 4.12 bei einer 20-fachen Vergrößerung vergleichbar dargestellt ist. Die Myozyten, die ca. 12 Stunden vor der Fixierung ausgesät wurden, orientieren sich in die Richtung des einfachsten Wachstums, welches bei einer Linienstruktur entlang der Linien ist. Vergleichbar ist dieses Phänomen mit elektrischem Stromfluss, der immer in die Richtung des geringsten Widerstandes fließt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Strom passiv in einem Potentialfeld



**Abbildung 4.12:** Vergleich des Kontrastes mit und ohne Kondensator: A: mit Kondensator  $\Rightarrow$  dreidimensionaler Reliefkontrast, B: ohne Kondensator  $\Rightarrow$  Hellfeld



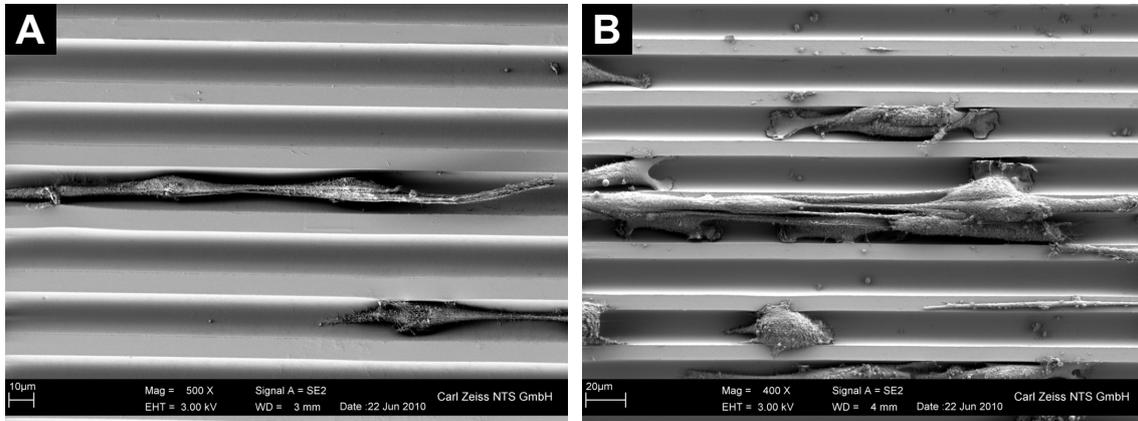
**Abbildung 4.13:** Strukturierung von Giemsa-gefärbten Myotuben: Die dunkel violetten Stellen kennzeichnen die Zellen. Die horizontal verlaufenden Linien zeigen die PDMS-Strukturierung. A: 20-fache Auflösung, B: 40-fache Auflösung

fließt und die Zellen aktiv an jedem Punkt wandern. Teilweise ist ein Übergreifen der Myozyten zwischen den Linien erkennbar.

#### 4.4.2 Elektronenmikroskopie

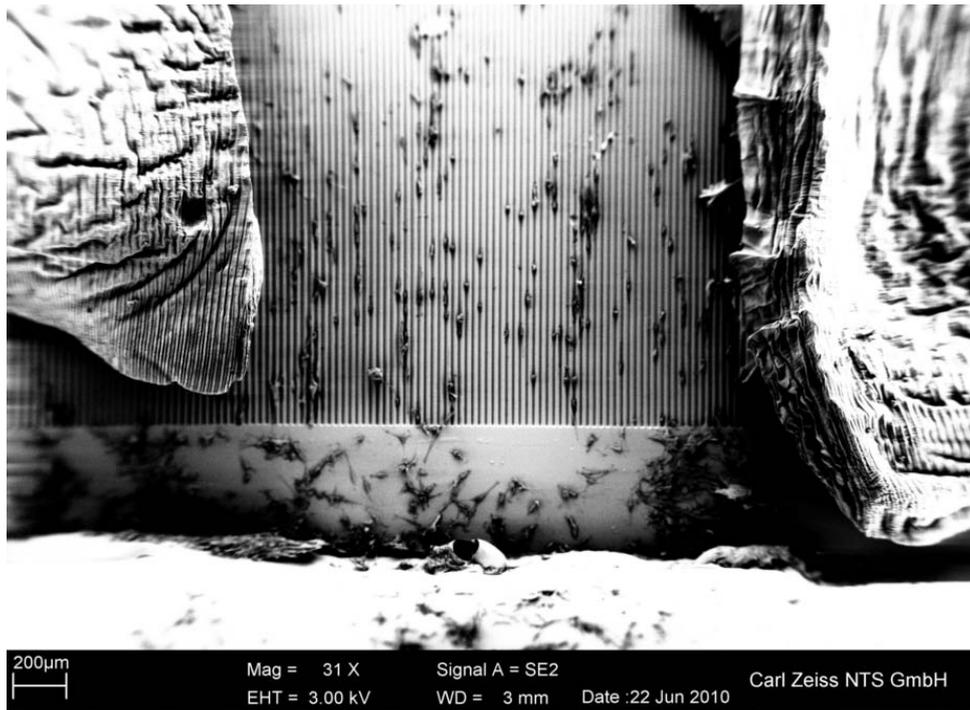
Um Abbildungen der gezüchteten strukturierten Zellen bei einer höheren Auflösung zu bekommen, wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Dazu mussten die Präparate aufwendig vorbereitet werden, was bereits in Kapitel 3.3 beschrieben ist. Der Unterschied zwischen Lufttrocknung und Kritisch-Punkt-Trocknung ist durch einen Vergleich zweier Präparate bei unterschiedlicher Trocknung zu erkennen. In Abbildung 4.14 ist deutlich zu sehen, dass sich das Präparat, welches Kritisch-Punkt getrocknet wurde, in einem wesentlich besseren Zustand befindet. Dies ist zum einen an der Oberfläche der Zellen zu erkennen, die

nicht durchlöchert wurde und wesentlich detailreicher dargestellt werden kann. Zum anderen sind bei dem Kritisch-Punkt getrockneten Präparat weniger Zellen abgebrochen und es lassen sich dünne Zellverbindungen besser erkennen.



**Abbildung 4.14:** Vergleich bei unterschiedlichen Trocknungen: A: Lufttrocknung. B: Kritisch-Punkt-Trocknung. In Bild A ist zu erkennen, dass die Oberfläche der Zellen angeraut ist und dass die obere Myozyte am rechten Rand abgebrochen ist. Die Zellen in Bild B sind dagegen natürlicher und unzerstört dargestellt.

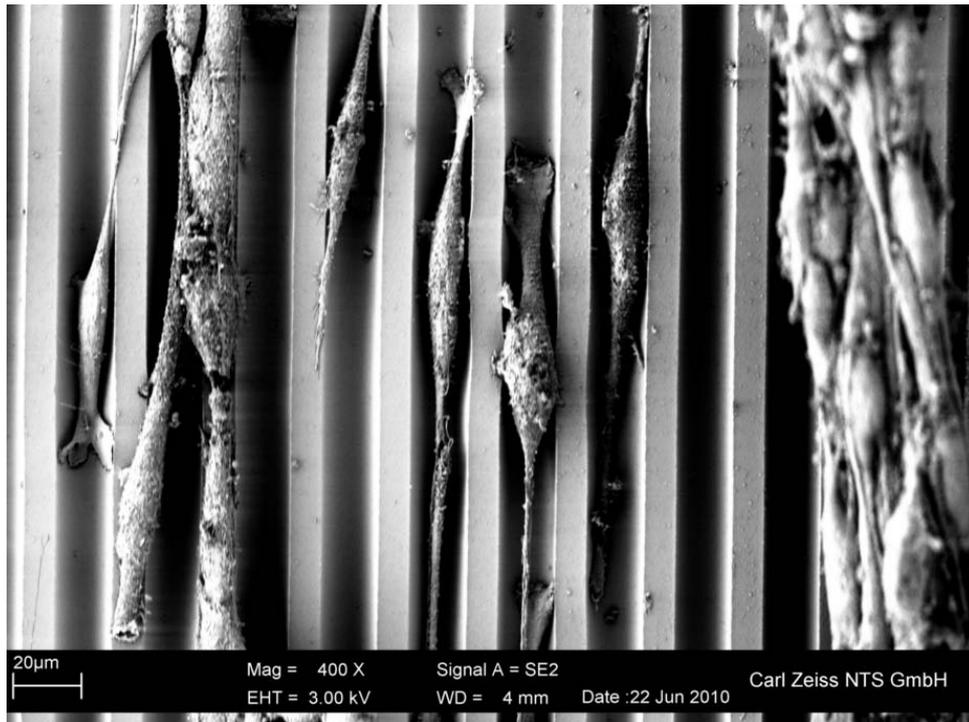
Als Präparate wurden Zellen auf Chips verwendet, auf denen nur die PDMS-Beschichtung und die pHEMA-Pads aufgetragen waren, da im SEM die Goldelektroden nicht detektiert werden. Für einen Überblick über das Präparat ist in [Abbildung 4.15](#) die Vergrößerung so gewählt, dass man an den Bildrändern rechts und links noch die pHEMA-Pads und am unteren Bildrand die unstrukturierte Fläche des PDMS erkennen kann. Die Elektrode für die Zellen würde von unten in die Strukturierung hineinragen. Bei dieser Aufnahme wurde die Schärfenebene auf die pHEMA-Pads gelegt, anders als in [Abbildung 4.16](#), wo auf die Zellen fokussiert wurde. Letztere Aufnahme zeigt die Linienstruktur zwischen den pHEMA-Begrenzungen. Die Begrenzungen sind nicht absolut parallel zu der Strukturierung, da die pHEMA-Pads durch die ausgeschnittene Maske nur annähernd exakt waren und beim Zellwachstum durch das Medium trotz des PDMS-Klebstoffes in der Höhe ein wenig aufgequollen sind. Für die Untersuchung der Zellen oder einer Spannungsbeaufschlagung stellt dies jedoch kein Problem dar, da dieser Faktor nur makroskopisch auftritt.



**Abbildung 4.15:** Überblick der luftgetrockneten Chipprobe, wobei auf die pHEMA-Pads fokussiert wurde: Auf der linken und rechten Seite sind pHEMA-Pads zu erkennen. Dazwischen liegen die Zellen. Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Zellen auf der PDMS-Linienstruktur, die am unteren Bildrand zu Ende geht. Da die Linienstruktur mit einem rechteckigen Stempel aufgetragen wurde, ist eine horizontale Kante unter dem linken pHEMA-Pad bis zum rechten Pad zu erkennen.



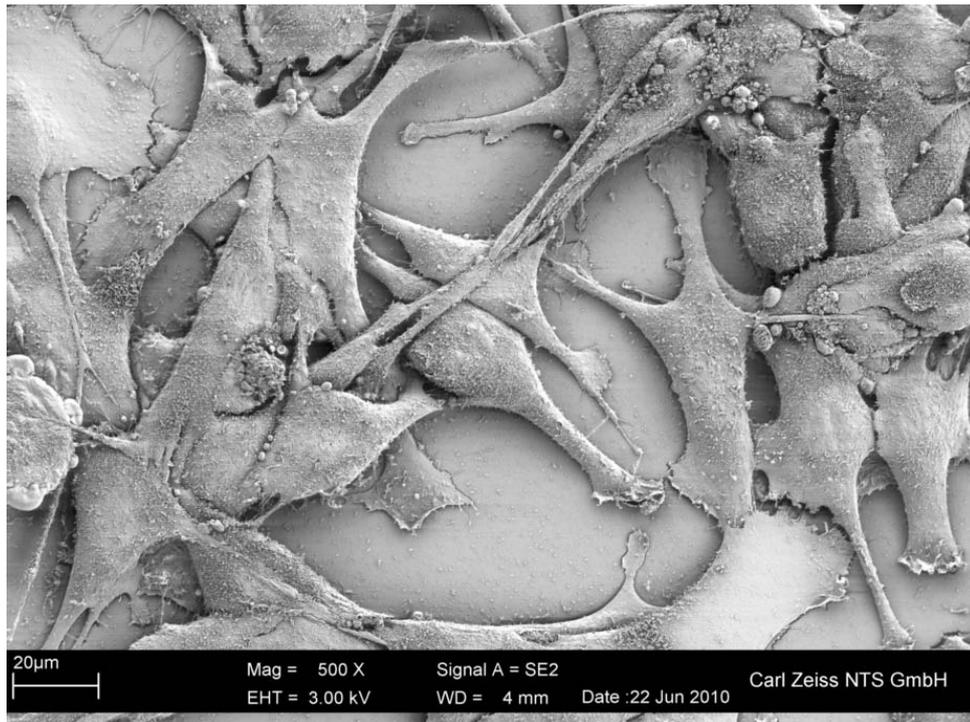
**Abbildung 4.16:** Linienstruktur bei pHEMA-Begrenzung des luftgetrockneten Präparates, wobei auf die Zellen fokussiert wurde.



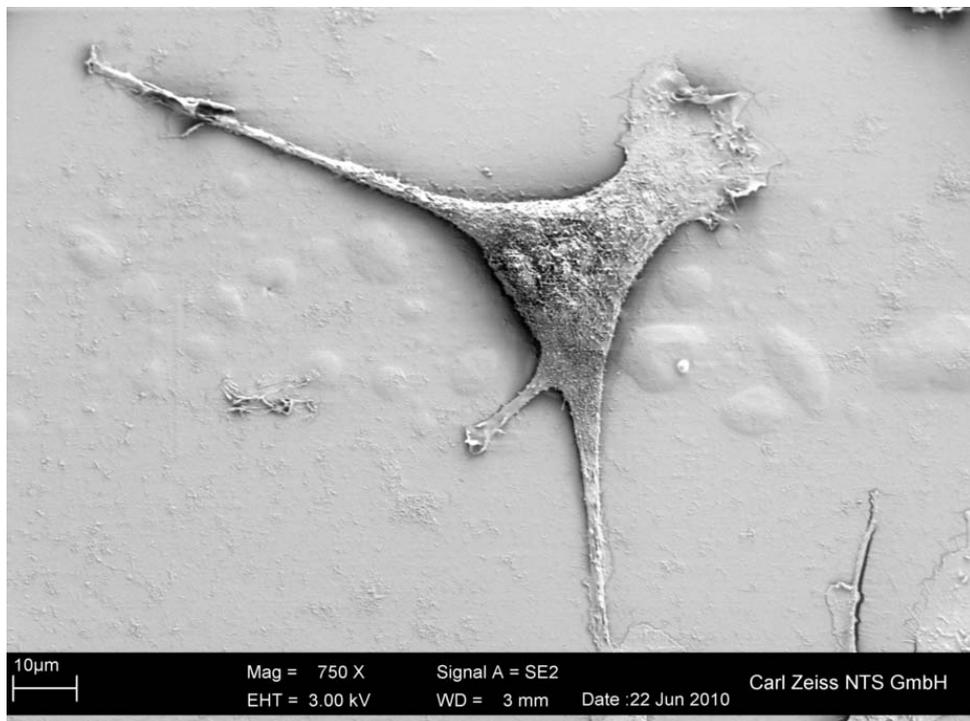
**Abbildung 4.17:** Zellwachstum auf der PDMS-Linienstruktur bei Kritisch-Punkt-Trocknung: Die Zellen sind strukturiert parallel gewachsen.

In der Aufnahme 4.17 ist das Zellwachstum auf der PDMS-Linienstruktur dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sich anders als in Abbildung 4.18 die Myozyten an die Linienstruktur angepasst haben und längs der PDMS-Linien wachsen. Auf der linken Seite des Bildes kann man erkennen, dass eine Tubenbildung eingesetzt hat. Die Verlinkung der Zellen in Abbildung 4.18 hat dagegen nach keinem bestimmten Muster stattgefunden. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen ohne Linienstruktur wie erwartet biologisch unkontrollierbar wachsen. Auf einer Linienstruktur lässt sich die Lage der Zellen dagegen voraussagen. Dieser Punkt ist entscheidend bei meinem Elektrodenarray, da das Wachstum und damit die Ausrichtung des lebenden Gewebes durch die Strukturierung steuerbar wird.

In Abbildung 4.19 ist eine polygonale Zelle dargestellt. In der Linienstruktur tritt eine derart geformte Myozyte nicht auf, da sie in der Fläche mehrere Richtungen auf einmal abdeckt, was bei Abgrenzungen durch das Linienmuster behindert wird. Das Überwinden der Linie wäre energieaufwendiger als das Folgen der Linie.



**Abbildung 4.18:** Zellwachstum am Rand des Präparates ohne Linienstruktur bei Kritisch-Punkt-Trocknung: Die Zellen sind unkontrolliert nebeneinander gewachsen und sind quer miteinander verknüpft.

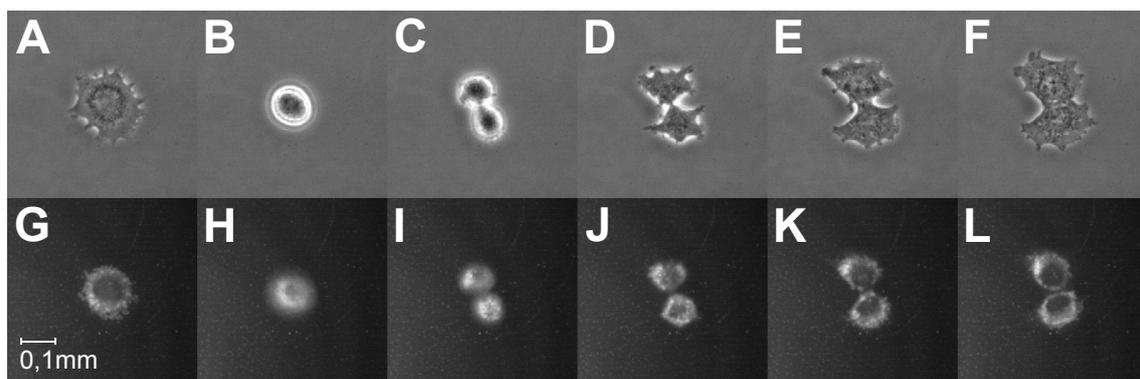


**Abbildung 4.19:** Polygonale Zelle auf dem PDMS Untergrund ohne Linienstruktur bei einem luftgetrockneten Präparat.

## 4.5 Verhalten der Muskelzellen

### 4.5.1 Time-Lapse-Untersuchung

Mit dem Time-Lapse-Mikroskop, welches seinen Standort im Nikon Imaging Center des Bioquants hat, wurden zeitraffende Aufnahmen zur Verdeutlichung der Zellbewegung und der Mitose aufgezeichnet. Bei der Mitose handelt es sich um den Vorgang der klassischen Zellteilung bei Zellen eines eukaryotischen Lebewesens. Dabei liegt zwischen den einzelnen Bildern A bis F, bzw. G bis L der Abbildung 4.20 eine Zeitspanne von jeweils 20 Minuten. Bild A und Bild G sind zeitgleich. Das Einsetzen der Mitose ist in der Zellphysiologie festgelegt.



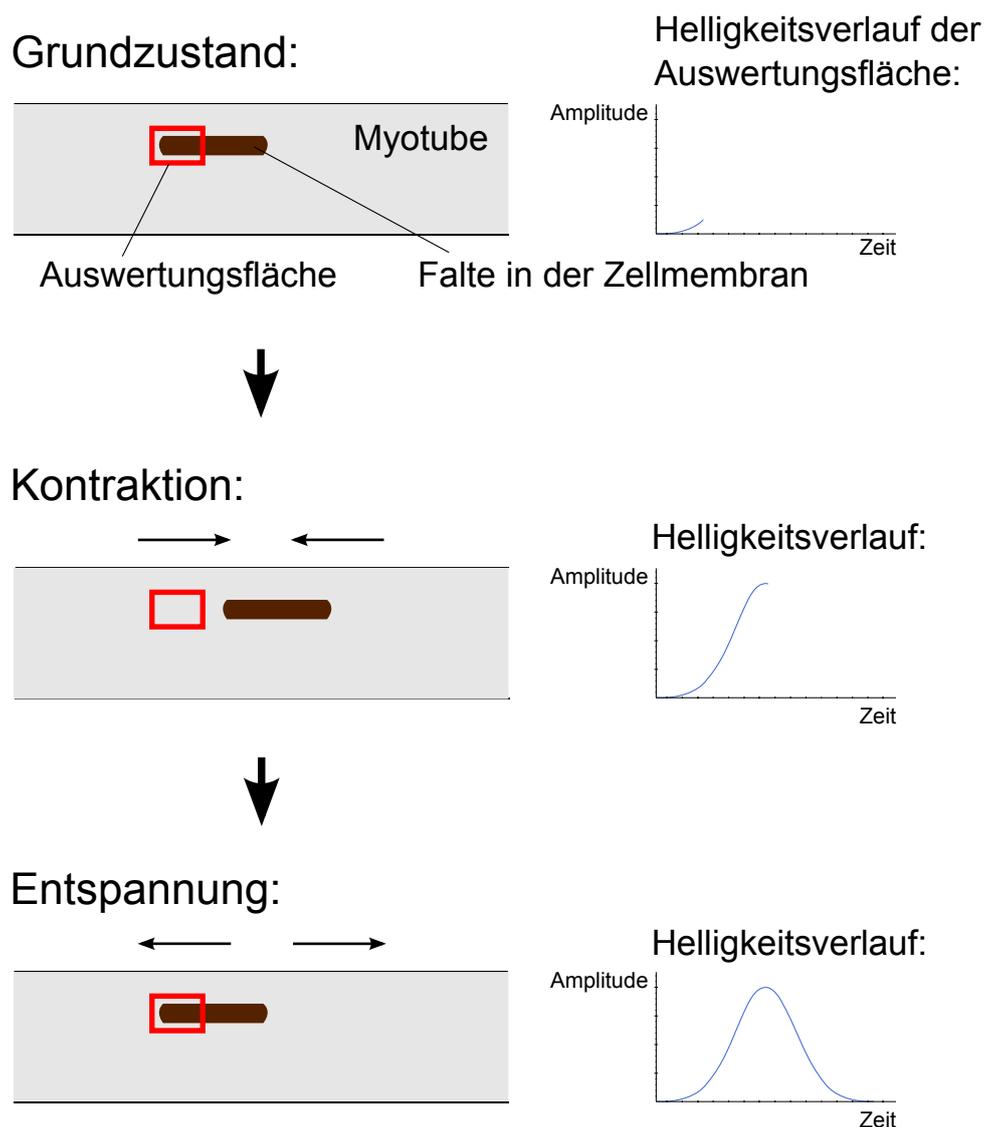
**Abbildung 4.20:** Mitose aufgenommen in der Time-Lapse: Die Aufnahmen übereinander sind jeweils zeitgleich. Zwischen den einzelnen Bildern liegt eine Zeitspanne von je 20 Minuten.

A-F: Helligkeitsaufnahmen, G-L: Fluoreszenzaufnahmen

Aus dieser und auch anderen Time-Lapse-Aufnahme lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen: Aufgrund der beliebig statistischen Bewegungsschwankungen der Zellen um den Grundzustand lässt sich festhalten, dass es bei einer Zelle kein stabiles „Vorne“ oder „Hinten“ gibt. Verstärkt wird dieses Erkenntnis durch die von der Morphologie der Zellen unabhängigen Bewegungen. Auch die Fangarme bewegen sich in beliebige Richtungen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Zelle isotrop um den Zellkern verteilt ist, wenn sie sich alleine in einer homogenen Umgebung befindet. Bei Zellen, die anisotropen Umgebungen ausgesetzt sind, verteilt sich die Zellmasse jedoch meistens asymmetrisch um den Zellkern herum.

### 4.5.2 Spannungsbeaufschlagung

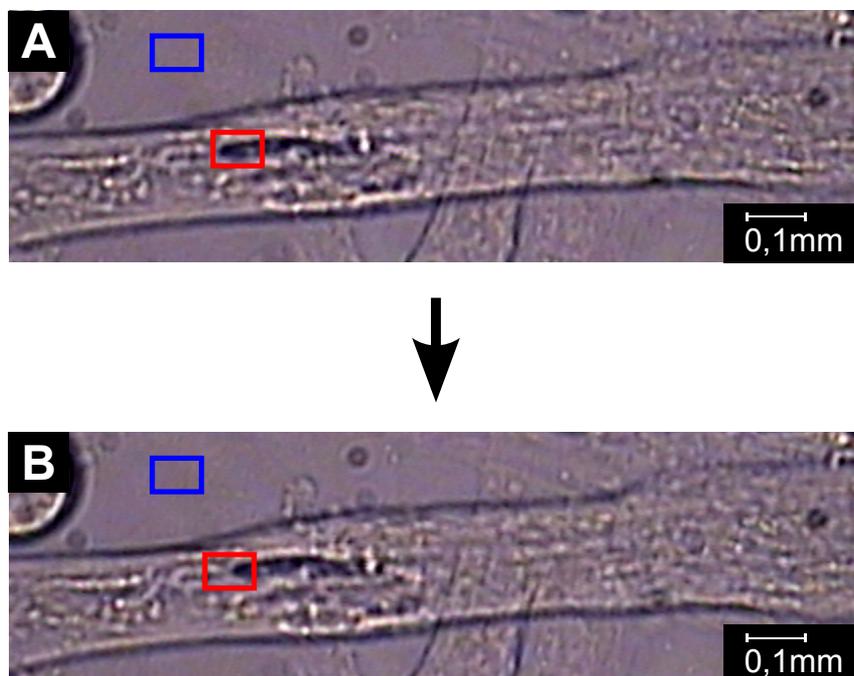
Sobald ein externer Spannungspuls an die C2C12-Myotuben angelegt wird, beginnen sie auf diesen Reiz hin zu kontrahieren. Zum besseren Verständnis ist ein Beispiel in Abbildung 4.21 skizziert.



**Abbildung 4.21:** Schemazeichnung eines Twitches: Im Grundzustand befindet sich die rote Auswertungsfläche über den Rand einer Falte der Zellmembran. Bei einer Kontraktion schiebt sich die Falte aus der Auswertungsfläche hinaus und es kommt zu einem Anstieg des Helligkeitsverlaufs. Nach der Entspannung kehrt die Zelle wieder in den Grundzustand zurück.

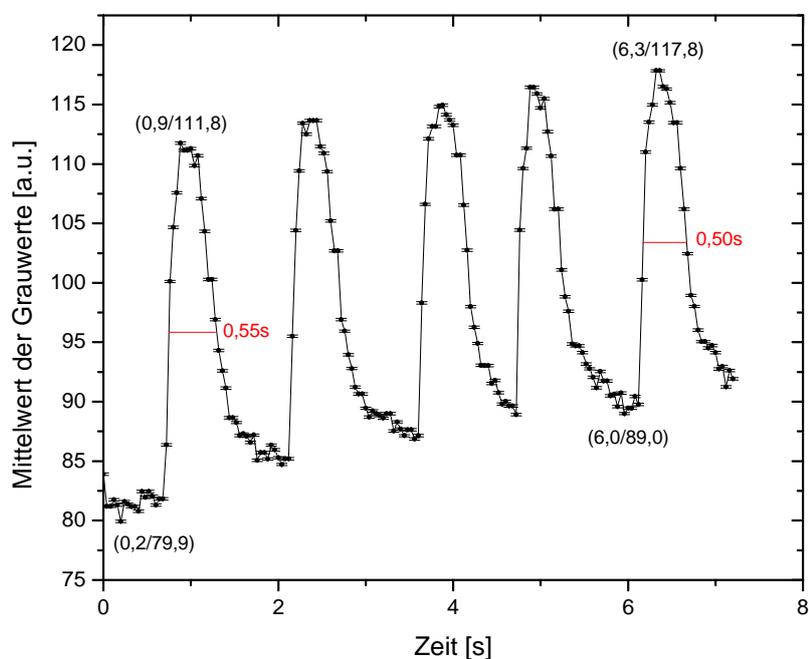
Bei den hier durchgeführten Messungen lag die Mindestspannung, ab der die Zellen angefangen haben zu reagieren bei  $(4 \pm 1)$  V bei einem Strom von  $(0,10 \pm 0,05)$  A, abhängig von Größe, Morphologie und Lageausrichtung der Myotuben zwischen den Elektroden des Arrays. Je besser die Tuben längs zwischen den Elektroden ausgerichtet sind, desto weniger Spannung wird benötigt. Gleiches gilt für längere und dünnere Tuben. Diese Beobachtungen sind logisch, da bei längeren Zellen die Elektroden näher an den Enden liegen und bei dünneren Zellen aufgrund der geringeren Dicke ein geringeres Signal und somit eine geringere Spannung benötigt wird. Wenn eine Zelle auf das externe Potential nicht kontrahiert, ist es auch möglich, dass der kontraktile Apparat noch nicht fertig ausdifferenziert ist.

Ein Nebeneffekt bei der Spannungsbeaufschlagung ist die Elektrolyse. Bei der Durchführung des Experiments sammelte sich an einem Pol eine grüne Ablagerung an, welche u. a. aus den positiv geladenen Kupferionen entstand. Am anderen Pol bildete sich ein weißer Schaum, der bei der Hydrolyse des Wassers entsteht. Je höher der Strom gewählt wird, desto mehr Ionen laufen zu den Elektroden. Beide Ablagerungen sind gleich groß, da das Medium ähnlich einer Kochsalzlösung isoosmotisch ist, also aus zwei Lösungen mit der selben Anzahl an gelösten Teilchen besteht.



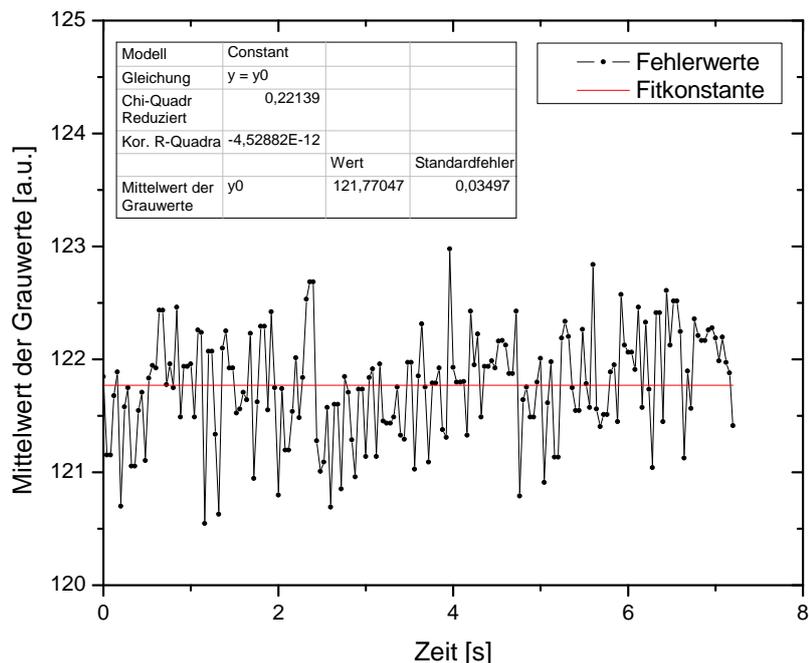
**Abbildung 4.22:** Zellaufnahme bei einem Twitch: Bild A zeigt den Grundzustand, Bild B das Maximum der Auslenkung einer Kontraktion. Der Zeitunterschied zwischen den Aufnahmen beträgt 0,48 s. Die Markierungen sind an räumlich identischen Stellen angelegt.

Um die Reaktionen der Myotuben auswerten zu können, wurde der mittlere Grauwert der rot markierten Flächen in Abbildung 4.22 berechnet und als Diagramm in Abbildung 4.23 dargestellt. Die Fehlerbalken wurden dabei aus der Schwankung einer neutralen weißen Stelle berechnet, die in Abbildung 4.22 als blau gekennzeichnete Stelle sichtbar ist. Die Schwankung der neutralen Stelle ist in Abbildung 4.24 zu sehen. Mit dem Programm „Origin“ wurde eine Gerade durch die Messwerte gelegt, sodass man dessen Standardabweichung für die Fehlerbalken in der Abbildung 4.23 verwenden konnte. Die Kamera am Lichtmikroskop liefert 25 Bilder pro Sekunde, die mit dem Programm „free screen to video“ aus der Monitoranzeige entnommen und in eine Filmdatei hineingeschrieben wurden.



**Abbildung 4.23:** Grauwerte des in Abbildung 4.22 dargestellten roten Messareal bei Spannungsbeaufschlagung: Bei den Peaks wurde jeweils ein Spannungsimpuls angelegt, sodass die Zelle kontrahierte.

Abbildung 4.23 zeigt typische Kontraktionsverläufe der Muskelzellen: Alle Peaks sind recht identisch, wobei jeder Flankenanstieg sehr steil ist und nach einer kurzen Verweildauer wieder eine Relaxation bis fast an den Grundzustand stattfindet. Dabei entspannt sich die Zelle langsamer als sie kontrahiert. Der Grundzustand wird nicht vollständig wieder erreicht, da die Zelle bei der Entspannung keinen Gegenpart hat, wie es bei Lebewesen der Fall ist. Jeder Muskel hat einen Gegenspieler



**Abbildung 4.24:** Fehlergraph der Grauwerte des in Abbildung 4.22 dargestellten blauen Messareals.

und kann so wieder auf die Ursprungslänge gezogen werden. Deshalb werden auch die Amplituden der Peaks kleiner. Die Amplitude der ersten Schwingung hat den Wert  $(31,9 \pm 0,5)$ , die der fünften Schwingung  $(28,8 \pm 0,5)$ . Der langsame Anstieg der Maxima und Minima der einzelnen Amplituden ist dadurch zu erklären, dass durch die nicht in den Grundzustand zurückkehrende Zelle die Grundwerte jeweils etwas nach oben verschoben werden.

Es können nicht mehrere Kontraktionen direkt hintereinander erfolgen. Die Frequenz ist nach oben begrenzt. Der Grund ist elektrophysiologischer Natur und nicht mechanischer, siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.2. Der beim Twitch auftretende Membranpotentialverlauf wird durch die Aktivierung von Ionenkanälen erzeugt. Diese treten dann für feste Zeiträume in einen refraktären, also nicht aktivierbaren, Zustand ein. Die Amplituden der Grauwertverläufe sind allerdings nur relativ zu sehen, da sie eine mechanische und keine elektrische Signalaufnahme darstellen. Die Form der Schwingungen hängt stark von den Punkten der zu betrachtenden Auswertungsfläche ab, die in Abbildung 4.22 für das obige Beispiel dargestellt ist. Die Signalgebung erfolgte beliebig und manuell über das Schließen des Stromkreises mit

einem Taster.

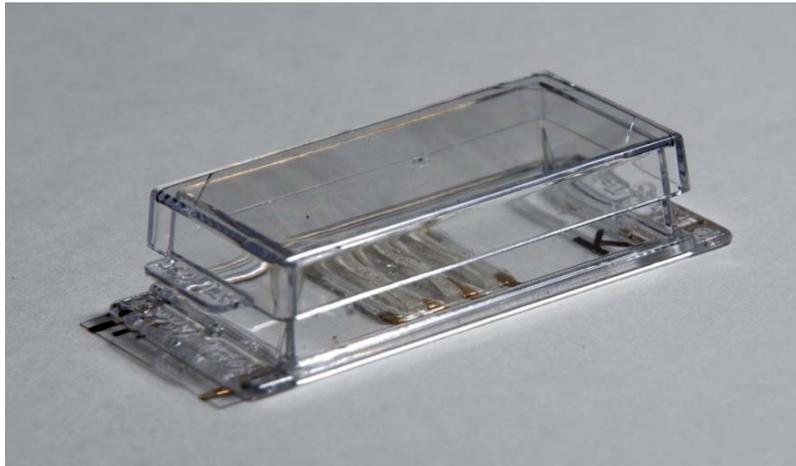
Der zeitliche Abstand zwischen Minimum und Maximum gibt die Kontraktionsdauer an, ebenso wie bei den Aktionspotentialen, bei denen auch der Anstieg die Kontraktion widerspiegelt (Depolarisation). Die Halbwertsbreite der Peaks, also die Zeit der halben Kontraktion, nimmt bei späteren Anregungen ebenfalls ab, da sie ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktionen ist und sich die gleiche, jetzt kürzere Myotube schneller zusammenzieht. Dieser Ermüdungseffekt wird durch die Zahlenwerte der Halbwertsbreiten ersichtlich. Bei der ersten Kontraktion liegt die Halbwertsbreite noch bei  $(0,55 \pm 0,02)$  s und bei der fünften Schwingung bei  $(0,50 \pm 0,02)$  s.

Der Verlauf der Grauwerte wird näherungsweise von nicht linearen Differentialgleichungen beschrieben, dem sogenannten Van-der-Pol-System. Van-der-Pol-Oszillatoren sind schwingungsfähige Systeme mit nichtlinearer Dämpfung und Selbsterregung, deren Diskussion jedoch nicht Teil dieser Arbeit ist. Für genauere Erklärungen siehe externe Literatur wie z. B. (17).

Die Zellmembranpotentiale verändern sich nicht nur bei einer Anregung der Zellen durch elektrische Spannungspulse, sondern leiten auch bei chemischen Veränderungen eine Kontraktion der Muskelzellen ein, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Deshalb wurde dem Medium, in dem die Zellen lagen, nach der Spannungsmessung Kalium zugeführt. Dies bewirkte eine einmalige Reaktion der Myotuben wie bei einem Spannungspeak. Nachfolgend angelegte Potentiale wurden in diesem Fall wegen der hohen Konzentration an Kaliumionen außerhalb der Zelle nicht mit Kontraktionen beantwortet.

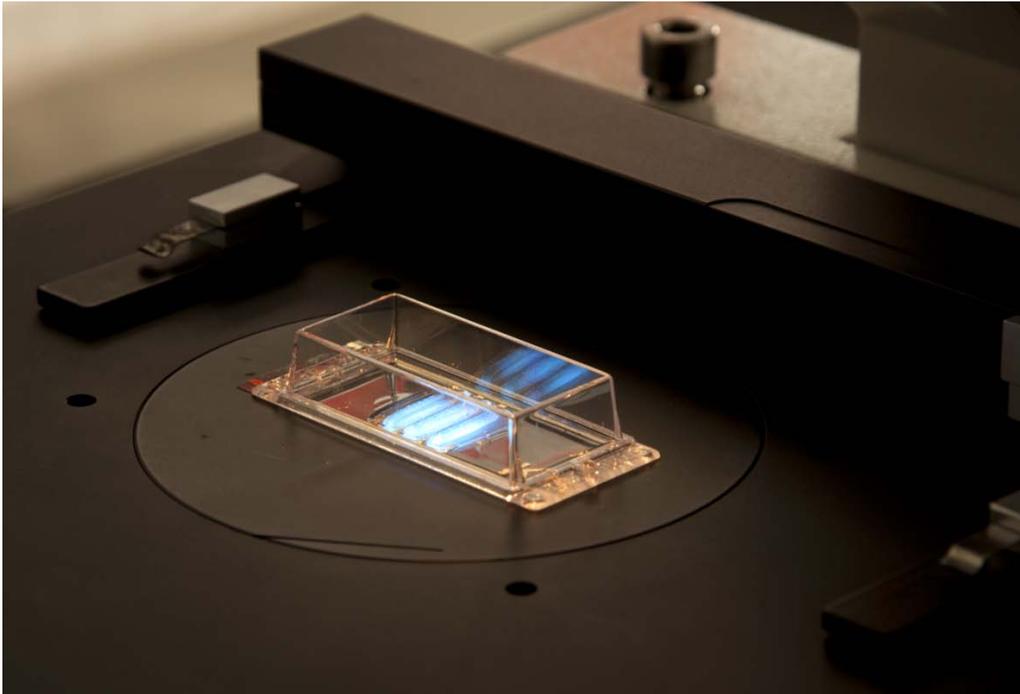
## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Bachelorarbeit wurde das von mir entwickelte und gefertigte biokompatible Elektrodenarray erläutert, welches aus mehreren Strukturierungsvorgängen aufgebaut ist. Zunächst erfolgte mit einem photolithographischen Verfahren die Erstellung einer Elektrodenstruktur, die in Folgeschritten mit einer PDMS-Strukturierung und zellrepellenten Polymer-Pads ergänzt wurde. Die Abbildungen 5.1 und 5.2 zeigen das fertiggestellte Elektrodenarray aus verschiedenen Perspektiven.



**Abbildung 5.1:** Foto des fertiggestellten Elektrodenarrays

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde das Wachstum und die Gewebebil- dung einer Muskelzelllinie sowie deren elektrodenstimulierte zelluläre Interaktion untersucht. Dazu wurde die Zelllinie mit bekannten Methoden präpariert, um sie mit geeigneten Technologien, wie dem Lichtmikroskop und später mit dem Elek- tronemikroskop, zu beobachten und abzubilden. Unter variierenden Randbedin- gungen erfolgte zusätzlich die Untersuchung der Morphologie und Zellausrichtung. Weiterhin wurden die zu Tuben differenzierten Muskelzellen mit Spannungssignalen beaufschlagt, durch die sie ihr Membranpotential veränderten und mechanische Re- aktionen ausgelöst wurden.



**Abbildung 5.2:** Elektrodenarray im Mikroskoplicht

Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Bachelorarbeit waren die fertiggestellten Elektrodenarrays mit Zellen besiedelt. Diese können nach ausreichendem Wachstum unter den Randbedingungen der Strukturierung und einer Spannungsbeaufschlagung mechanische Reaktionen auslösen, was in dieser Arbeit gezeigt wurde. Das Gelingen erscheint als sehr vielversprechend, weil die einzelnen Testschritte schon unabhängig voneinander mit Erfolg durchgeführt worden sind. Somit eröffnet diese Arbeit verschiedene Wege der Fortsetzung:

- Eine Möglichkeit wäre, die Kraft der Zellkontraktion zu messen, die bei einer bestimmten Tubenlänge und -dicke auftritt.
- Auf die gleiche Verfahrensweise könnten Netzwerke anderer Zelllinien getestet werden.
- Eine Erhöhung der Anzahl von Zellelektroden auf dem Chip hätte den Vorteil, dass viele Versuchsreihen parallel und aus diesem Grund in kürzerer Zeit und größerer Anzahl vorgenommen werden könnten.
- Unter der Zugabe von Medikamenten oder Umweltgiften wäre es möglich, die Reaktionen der Zellen auf diese Nebenbedingung zu analysieren.

# Literaturverzeichnis

- [1] M. Abercrombie and Joan E. M. Heaysman. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. *Science*, 1953.
- [2] Helen M. Blau, Grace K. Pavlath, Edna C. Hardeman Choy-Pik Chiu, Laura Silberstein, Steven G. Webster, Steven C. Miller, and Cecelia Webster. Plasticity of the differentiated state. *Science*, 1985.
- [3] Christopher S. Chen, Sui Huang Milan Mrksich, George M. Whitesides, and Donald E. Ingber. Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997.
- [4] Wolfgang Demtröder. *Experimentalphysik 2*. Springer, 4. edition, 2006.
- [5] Jens Huppelsberg and Kerstin Walter. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Thieme, 3. edition, 2009.
- [6] Nevenka Juretic, Ulises Urzu, David J. Munroe, Enrique Jaimovich, and Nora Riveros. Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization. *Journal of Cellular Physiology*, 2007.
- [7] Gerald C. Karp. *Molekulare Zellbiologie*. Springer, 1. edition, 2005.
- [8] Takenobu Katagiri, Akira Yamaguchi, Motohiro Komaki, Etsuko Abe, Naoyuki Takahashi, Tohru Ikeda, Vicki Rosen, John M. Wozney, and Tatsuo Suda Atsuko Fujisawa-Sehara. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of c2c12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of Cell Biology*, 1994.
- [9] Arnold M. Katz. *Physiology of the Heart*. Raven Press, 2. edition, 1992.
- [10] Hans Kleinig and Uwe Maier. *Zellbiologie*. Gustav Fischer, 4. edition, 1998.
- [11] Rainer Klinke, Hans-Christian Pape, and Stefan Silbernagl. *Lehrbuch Physiologie*. Thieme, 5. edition, 2005.
- [12] Georg Löffler. *Basiswissen Biochemie*. Springer, 7. edition, 2008.

- 
- [13] Mònica Mir, Srujan Kumar Dondapati, Maria Viviana Duarte, Margarita Chatzichristidi, Konstantinos Misiakos, Panagiota Petrou, Sotirios E. Kakabakos, Panagiotis Argitis, and Ioanis Katakistinos. Electrochemical biosensor microarray functionalized by means of biomolecule. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010.
- [14] Peter Molnar, Weishi Wang, Anupama Natarajan, John W. Rumsey, and James J. Hickman. Photolithographic patterning of c2c12 myotubes using vitronectin as growth substrate in serum-free medium. *Biotechnol Prog.* 2007, 2007.
- [15] Charles E. Mortimer and Ulrich Müller. *Chemie*. Thieme, 9. edition, 2007.
- [16] Ramalingam Murugan, Peter Molnar, Koritala P. Rao, and James J. Hickman. Biomaterial surface patterning of self assembled monolayers for controlling neuronal cell behavior. *Int J Biomed Eng Technol.*, 2009.
- [17] A. V. Panfilov and A. V. Holden. *Computational Biology of the Heart*. Wiley-VCH, 1997.
- [18] Jaehyun Park, Tushar Bansal, Mikhail Pinelisa, and Michel M. Maharbiz. a microsystem for sensing and patterning oxidative microgradients during cell culture. *The Royal Society of Chemistry*, 2006.
- [19] Stephan Rohr, Daniel M. Scholly, and Andre G. Kleber. Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture. *Circulation Research*, 1991.
- [20] Galen B. Schneider, Anthony English, Matthew Abraham, Rebecca Zaharias, Clark Stanford, and John Keller. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials*, 2004.
- [21] Kazunori Shimizu, Hideaki Fujita, and Eiji Nagamori. Micropatterning of single myotubes on a thermoresponsive culture surface using elastic stencil membranes for single-cell analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Funktionsweise eines Photolacks . . . . .	4
2.2	Technischer Vorgang der Besputterung . . . . .	5
2.3	Acryl-Strukturformel . . . . .	5
2.4	Plexiglas-Strukturformel . . . . .	5
2.5	Polymerisationsreaktion von HEMA . . . . .	6
2.6	Ionenverteilung im Intra- und Extrazellulärraum der Zelle . . . . .	7
2.7	Aktionspotentialverlauf in einer Nervenzelle . . . . .	9
2.8	Schnitt durch ein Lichtmikroskop . . . . .	11
2.9	Schemazeichnung eines SEM . . . . .	13
2.10	Phasendiagramm von CO <sub>2</sub> . . . . .	14
3.1	UV-Belichtung des HEMA-Monomers . . . . .	21
4.1	Überblick der Herstellung des Elektrodenarrays . . . . .	25
4.2	Photolackmaske zur Erstellung der Elektroden . . . . .	26
4.3	Unterschiede bei der Maskenbedruckung . . . . .	27
4.4	Fehlversuch bei der Photolackbeschichtung . . . . .	27
4.5	Fehlerhafte Elektrodenentwicklung . . . . .	28
4.6	Maske zur Erstellung der HEMA-Pads . . . . .	29
4.7	Vorder- und Rückansicht der HEMA-Maske . . . . .	30
4.8	Elektrodenarray ohne PDMS-Beschichtung . . . . .	31
4.9	Größenübersicht der PDMS-Linien neben einer Elektrode . . . . .	31
4.10	C2C12 Differenzierung von Zellstadien . . . . .	32
4.11	C2C12 bei hoher Dichte und unterschiedlichen Vergrößerungen . . . . .	33
4.12	Vergleich des Kontrastes mit und ohne Kondensator . . . . .	34
4.13	Strukturierung von Giemsa-gefärbten Myotuben . . . . .	34
4.14	Vergleich bei unterschiedlichen Trocknungen . . . . .	35
4.15	Überblick der luftgetrockneten Chipprobe . . . . .	36
4.16	Linienstruktur bei pHEMA-Begrenzung des luftgetrockneten Präparates . . . . .	36

4.17 Zellwachstum auf der PDMS-Linienstruktur . . . . .	37
4.18 Zellwachstum am Rand des Präparates ohne Linienstruktur . . . . .	38
4.19 Polygonale Zelle auf dem PDMS Untergrund ohne Linienstruktur . . .	38
4.20 Mitose aufgenommen in der Time-Lapse . . . . .	39
4.21 Schemazeichnung eines Twitches . . . . .	40
4.22 Zellaufnahme bei einem Twitch . . . . .	41
4.23 Grauwerte bei Spannungsbeaufschlagung . . . . .	42
4.24 Fehlergraph des Grauwertverlaufs . . . . .	43
5.1 Foto des fertiggestellten Elektrodenarrays . . . . .	45
5.2 Elektrodenarray im Mikroskoplicht . . . . .	46
5.3 Plakat des „2nd European Workshop on Tissue Imaging and Analysis“	viii

# Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
CCD	Charge-coupled Device
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DiOC6(3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyanin Iodid
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FCS	fetales Kälberserum
HEMA	2-Hydroxyethyl-Methacrylat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
KIP	Kirchhoff-Institut für Physik
PCI	Physikalisch-Chemisches Institut
PDMS	Polydimethylsiloxan ( $H_6C_2OSi)_n$ -Vinyliden-Copolymer
pHEMA	Polymer des HEMA (fester Zustand)
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SAM	Self Assembled Monolayer
SEM	Scanning Electron Microscope = Rasterelektronenmikroskop
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Trp C	Tropomyosin

# Publikationen

Teile aus dieser Bachelorarbeit wurden beim „2nd European Workshop on Tissue Imaging and Analysis“, der am 25. und 26. Juni 2010 im „BIOQUANT Center for Systems Biology“ in Heidelberg durchgeführt wurde, auf einem Plakat veröffentlicht. Die Publikation erfolgte unter dem Titel „Tissue Reorganisation in vitro by Geometric Surface Patterns“ von Götz Pilarczyk, Kristian Rink und Michael Hausmann, siehe Abbildung [5.3](#).

# Anhang



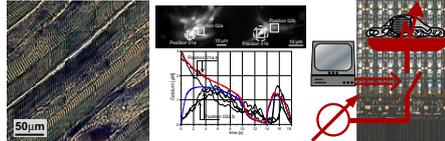
Kirchhoff Institute for Physics  
INF 227  
D-69120 Heidelberg  
Germany

# Tissue Reorganisation *in vitro* by Geometric Surface Patterns

Götz Pilarczyk, Kristian Rink and Michael Hausmann

Correspondence: goetz.pilarczyk@kip.uni-heidelberg.de

## Organized Signal Geometry

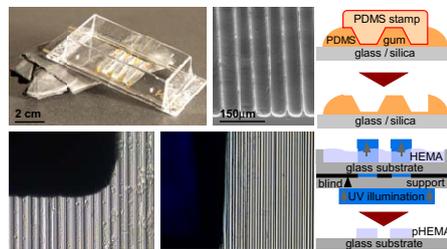


**Left: Muscle tissue slice, Puchtler stain.** Both, structure and signal spread are highly organized and anisotropic in muscle as well as in heart muscle tissue.

**Middle: Optical evoked Calcium oscillations.** In contrast, local signal excitation in muscle cell culture results in stochastic signal spread because the individual cells are disordered.

**Right: Multi-Electrode HV-CMOS Chip:** Every deterministic tissue stimulation on-chip requires a precise alignment of the stimulated cells.

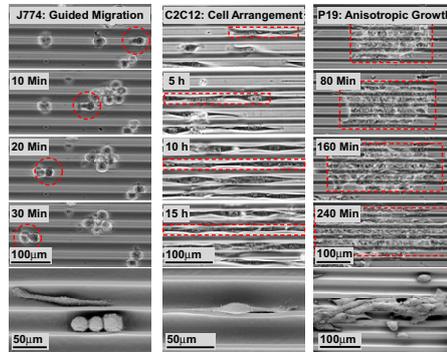
## Geometric Surface Patterning



**Top row: Anisotropic patterns and electrodes.** To organize culture cells into muscle type aggregates a microscopy cover slide is micro-patterned with stimulation electrodes, cell repellent HEMA polymere pads and cell orientating PDMS line patterns (left). The line pattern is moulded with subcellular precision in a simple one-step procedure (middle and right). The mounted chamber can be used in routine culture environments and high resolution light microscopes.

**Bottom row: All elements are of cell dimension.** The line pattern periodicity reflects the size of muscle progenitor cells (i. e. myoblasts). The stimulation electrodes feed potential into a small number of linewise orientated cells restricted by HEMA boundaries (left and middle). The HEMA pads are deposited in situ via UV radical polymerisation in a few minutes. Form and size of the pads can be varied using UV blocking masks.

## Cell Ensemble Formation



**Anisotropic cell behavior on line patterns.** Basic processes during tissue constitution are cell migration (left column), cell association (middle column) and tissue growth (right column).

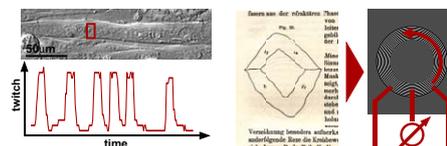
Each of the elementary processes is anisotropic under the influence of the patterned substrate. This way the needs for user designed tissue anisotropy are fulfilled.

**Left column: Migrating J774 macrophages.** Under the control of the pattern topography the usually stochastic migration directions reduce to two directions along the line axis. The cells transition from a suspension state into an adherent one increases the ratio of mobile/sessile cells and induces rapid motion activity.

**Middle column: Cueing of C2C12 myoblasts:** Myotube progenitor cells actively align in long cell series via continuous cell migration. Such an alignment is the prerequisite for their differentiation into myotubes. The resulting myotubes twitch upon electrical stimuli (see below).

**Right column: P19 cardiogenic primary cells.** Cell groups grow in an anisotropic fashion with the main growth axis in parallel to the line pattern. This facilitates the constitution of organized tissue strips of differentiated beating heart cells. The differentiation can be done independently from cell growth and orientation.

## Up-Scaling to Tissue Size



**Embedding excitable cells into tissue shapes.**

The presented system makes it possible to design electrode patterns inside typical organ shapes and to fill the shapes with excitable cells (left) orientated like in native tissue. Cell organisation and electrical signal spread simulate true tissue situations (middle). This facilitates the cultivation of artificial tissue for transplantation. Further, the basic experiments for cardiac arrhythmias can be performed without the use animal or human organs (right).

Abbildung 5.3: Plakat des „2nd European Workshop on Tissue Imaging and Analysis“

# Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen meiner Bachelorarbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken, insbesondere bei:

Herrn Prof.Dr.Michael Hausmann für seine Vorlesung, die mein Interesse an interdisziplinärer Arbeit weckte, für die Ermöglichung dieser Bachelorarbeit, die freundliche, fördernde Betreuung und für die Gewissheit, bei Fragen jederzeit willkommen zu sein.

Herrn Prof.Dr.Christoph Cremer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Götz Pilarczyk für die umfassende, freundliche Betreuung, stets kompetente Hilfe bei allen auftretenden Fragen und Problemen mit konstruktiver Kritik, sowie das Korrekturlesen des Manuskripts.

Dr. Jutta Schwarz-Finsterle, Jenny Wagner, Kai König, Patrick Müller und allen weiteren Mitarbeitern der „Peptide Chips“ Gruppe für die Hilfsbereitschaft und stets angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Florian Painke für die nette Hilfe bei der professionellen Photographie meiner fertigen Präparate.

Dr. Marcus Abel für die freundliche Unterstützung bei der Kritisch-Punkt-Trocknung und das Besputtern meiner Präparate am PCI.

Thomas Wolf für das Besputtern einiger meiner Präparate am KIP.

Ingrid Hauser und Heinz Horstmann für die freundliche Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Meinen Freunden Christopher Rank und Lars Harmsen für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Der größte Dank geht an meine Eltern für die Ermöglichung meines Physikstudiums in Heidelberg und die überaus herzliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Persönlich hat mir die Arbeit sehr viel Spaß gemacht und ich war von der erfolgreichen Durchführung meines Projektes begeistert. Besonders habe ich mich gefreut, dass Teile dieser Bachelorarbeit beim „2nd European Workshop on Tissue Imaging and Analysis“ publiziert wurden.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 07. Juli 2010

.....