

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Aaron Lindner
aus Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Dezember 2009

**Kraftsensoren im
Nanonewton-Bereich:
Biofunktionalisierte Mikrosäulen aus
Poly-Ethylenglykol zur Untersuchung
fusionierender Mitosespindeln**

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim Spatz

Prof. Dr. Ulrich Schwarz

Abstract

The biophysical research of cytoskeleton components requires specialized technologies for the measurement of forces in the piconewton to millinewton range. Until now there has been no satisfactory method for the simultaneous measurement of a large number of such forces in the sub-nanonewton range. The use of fields from flexible micro pillars would seem possible in many experiments, but generally proves impracticable due to the limited sensitivity to forces of the polymer pillars produced. In this work an innovative method for the production of pillar fields from polyethylene glycol hydrogel (*PEG*) is introduced. By varying the mesh size, the elasticity module of this hydrogel can be adjusted by up to an order of magnitude of four. In this way very flexible pillars for the measurement of forces in the sub-nanonewton range can be produced. The method also allows for effective biofunctionalization of the pillar heads in the production process itself. A special calibration structure allows for cross calibration of the pillars with an atomic force microscope cantilever with a known spring constant. In this way pillars with spring constants down to $0.3 \text{ nN}/\mu\text{m}$ can be calibrated, which corresponds to a force resolution of 30 piconewton with standard microscopes. The potential of PEG pillar technology is demonstrated by means of in-vitro assembly of mitotic spindle structures on the pillar heads. Under suitable experimental conditions these spindles fuse and exert forces on one another. The effective forces lead to a pillar deflection and can in this way be quantified.

Zusammenfassung

Die biophysikalische Erforschung von Zellskelettkomponenten verlangt nach speziellen Techniken zur Messung von Kräften im Bereich von Piconewton bis Millinewton. Bislang fehlte eine zufriedenstellende Methode zur parallelen Messung einer großen Anzahl solcher Kräfte im Sub-Nanonewton-Bereich. Die Verwendung von Feldern aus flexiblen Mikrosäulen (*Pillars*) würde sich in vielen Experimenten anbieten, scheidet aber meist wegen der limitierten Kraftsensitivität der herstellbaren Polymerpillars aus. In dieser Arbeit wird eine innovative Methode zur Herstellung von Pillarfeldern aus dem Hydrogel Poly-Ethylenglykol (*PEG*) vorgestellt. Das Elastizitätsmodul des Hydrogels kann durch Variation der Maschenweite in einem vier Größenordnungen umfassenden Bereich eingestellt werden. Dadurch können bei Bedarf sehr flexible Pillars zur Messung von Kräften im Sub-Nanonewtonbereich hergestellt werden. Die Methode erlaubt außerdem eine effektive Biofunktionalisierung der Pillarköpfe bereits im Herstellungsprozess. Ein spezieller Kalibrationsaufbau ermöglicht die Kreuzkalibration der Pillars gegen einen

Atomkraftmikroskop-Cantilever mit bekannter Federkonstanten. Dadurch können Pillars mit Federkonstanten von minimal $0,3 \text{ nN}/\mu\text{m}$ kalibriert werden, was bei Standardmikroskopen einer Kraftauflösung von 30 pN entspricht. Die Möglichkeiten der PEG-Pillar-Technologie werden durch in-vitro-Assemblierung von Mitosespindeln an den Pillarköpfen demonstriert. Bei geeigneten Versuchsbedingungen fusionieren diese Mitosespindeln und üben Kräfte aufeinander aus. Die wirkenden Kräfte führen zu einer Pillarverbiegung und lassen sich dadurch quantifizieren.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	v
I Einleitung und Theorie	1
1 Einleitung und Motivation	3
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Methoden zur Messung von Kräften in biologischen Systemen	7
2.1.1 Elastische Substrate	7
2.1.2 Pillarsysteme	8
2.1.3 Optische Pinzetten	10
2.1.4 Magnetische Pinzetten	11
2.1.5 Glasfasern oder Glas-Mikroplatten	12
2.2 Zellskelett und Mitosespindel	13
2.2.1 Das Zellskelett	13
2.2.2 Mikrotubuli	13
2.2.3 Die Mitose	16
2.2.4 Die Mitosespindel	17
II Materialien und Methoden	21
3 Verwendete Techniken	23
3.1 Oberflächenchemie	23
3.1.1 Sputter Coater	23
3.1.2 Plasmatechnik	24
3.1.3 Silanisierungstechniken	25
3.2 Mikroskopietechniken	26
3.2.1 Konfokale Mikroskopie	26
3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie	28
3.3 Hydrogele aus Poly-Ethylenglykol	29
3.4 Fotolithografie	31
3.4.1 Herstellung von Belichtungsmasken	31
3.4.2 Herstellung von Abgussmastern aus SU-8 Fotolack	34

3.4.3	Herstellung von PDMS-Abgüssen (<i>Replika Moulding</i>)	35
3.4.4	Mikroskop-Projektionslithografie	36
3.5	Methoden der Zell- und Molekularbiologie	38
3.5.1	Fluoreszenzfarbstoffe	38
3.5.2	Biofunktionalisierung	39
3.5.3	Xenopus Laevis Extrakt	39
3.5.4	Herstellung von DNA-bedeckten Mikrobeads	41
3.5.5	In-vitro-Assemblierung von Mitosespindeln	42
III Ergebnisse und Diskussion		47
4	Experimenteller Teil	49
4.1	Die Entwicklung eines Kraftsensors auf der Basis von PEG-Pillars . .	49
4.1.1	PEG-Pillar-Herstellung per Replika Moulding	50
4.1.2	PEG-Pillar-Herstellung per Mikroskop-Projektionslithografie .	52
4.1.3	Funktionalisierung der Pillars	54
4.1.4	Kalibration der Pillars	57
4.2	Kraftmessungen zwischen fusionierenden Mitosespindeln	66
4.2.1	Versuchsaufbau	66
4.2.2	Auswerteprozedur	69
5	Ergebnisse	71
5.1	Herstellung und Charakterisierung von Hydrogelstrukturen	71
5.1.1	Herstellung per Replika Moulding	71
5.1.2	Herstellung per Mikroskop-Projektionslithografie	73
	Objektivwahl	73
	Belichtungsdauer	74
	Wahl der UV-Quelle	74
	Belichtungsmaskendesign	74
	sonstige Beobachtungen	76
	Funktionalisierung	78
	Writing-Verfahren	78
	Line-Writing-Verfahren	82
5.1.3	Kalibrationsergebnisse	82
5.2	Nachweis der Eignung als Kraftsensor	87
5.2.1	Beobachtete Pillarverbiegungen	87
5.2.2	Spindel-Assemblierung auf den Pillars	92
	Fall 1: Keine oder kaum DNA-assoziierte Mikrotubuliassemb- lierung	92
	Fall 2: Bildung von netzwerkartigen Mikrotubulistrukturen an und zwischen den Pillarköpfen	92

Fall 3: Keine freie Nukleation, Bildung von bipolaren Spindeln auf Pillarköpfen	92
Fall 4: Zwei bipolare Spindeln fusionieren	94
6 Diskussion und Ausblick	97
Abbildungsnachweis	101
Literaturverzeichnis	105
A Appendix	117
A.1 Abkürzungen	117
A.2 Verwendete Materialien und Geräte	119
A.3 Protokolle	123

Teil I

Einleitung und Theorie

Einleitung und Motivation

Lebende Zellen können eine Vielzahl von Formen annehmen, mit ihrer Umgebung mechanisch in Wechselwirkung treten, die vielen Komponenten in ihrem Inneren aktiv organisieren, sich teilen und koordinierte Bewegungen ausführen. All diese mechanoaktiven Zellprozesse werden in eukaryotischen Zellen unter aktiver Beteiligung des Zellskeletts bewerkstelligt, einem komplizierten Netzwerk aus Proteinfilamenten, das sich durch das gesamte Zytoplasma erstreckt [1]. Das Zellskelett ist in der biomedizinischen Forschung von besonderer Bedeutung. Eine gezielte medikamentöse Störung der mechanoaktiven Zellprozesse hat sich beispielsweise in der Chemotherapie als effektives Mittel zur Bekämpfung von Krebstumoren erwiesen [2], [3].

Zur Erforschung des Zellskeletts reichen biologische Methoden alleine nicht aus. Für ein genaues Verständnis der mechanoaktiven Komponenten müssen auch deren physikalische Eigenschaften bestimmt werden. Dazu werden biophysikalische Methoden benötigt, beispielsweise spezielle Sensoren zur Messung der aktiv von diesen Komponenten ausgeübten Kräfte. Meist handelt es sich um Kräfte im Bereich Pikonewton bis Millinewton, die von nanometer- bis mikrometergroßen Objekten verursacht werden. In den letzten Jahrzehnten haben sich mehrere Methoden zur Kraftmessung in biologischen Systemen etabliert, die dieser Aufgabe gewachsen sind [4]. Grob lassen sie sich in zwei Klassen einteilen:

Einerseits gibt es hochsensitive Methoden zur Messung von Kräften zwischen zwei Angriffspunkten: Glasmikroplatten [5], Atomkraftmikroskope [6] und optische [7] oder magnetische Pinzetten [8] beispielsweise erlauben die Messung von Kräften bis hinunter in den Pikonewton- und teilweise sogar den Femtonewton-Bereich - allerdings unter großem experimentellen Aufwand und beschränkt auf Einzelmessungen.

Andererseits gibt es Sensorfelder, mit denen parallel und orts aufgelöst eine große Anzahl von Kraftmessungen gleichzeitig durchgeführt werden können. Beispiele sind elastische Substrate [9] und Felder aus flexiblen Mikrosäulen (*Pillars*) [10].

Insbesondere die Pillartechnologie ist prinzipiell gut für biophysikalische Untersuchungen an Zellskelettkomponenten geeignet. An die Pillarköpfe lassen sich mittels geeigneter Biofunktionalisierung gezielt und spezifisch die zu untersuchenden Objekte anbinden, störende Oberflächeneffekte werden weitgehend vermieden.

Die beobachtete Verbiegung der Pillars liefert dann die wirkenden Kräfte.

Pillars werden meist aus Poly-Dimethylsiloxan (PDMS) gefertigt, einem Material, das sich aufgrund seiner proteinabweisenden Eigenschaften gut für derartige Experimente eignet, und aus dem sich mittels lithografischen Standardtechniken Pillarfelder herstellen lassen. Die Federkonstanten der Pillars sind abhängig von dem Elastizitätsmodul des verwendeten Materials, sowie von Höhe und Durchmesser der Pillars. Das Elastizitätsmodul von PDMS liegt in der Größenordnung 1 MPa, und kann um maximal eine Größenordnung variiert werden. Die Federkonstanten werden deshalb vor allem durch die Variation der Pillargeometrien eingestellt. Bisher liegt die untere praktikable Grenze für Kraftmessungen mit Pillars aus PDMS bei 0,5 nN [11], wofür Pillars mit einem Durchmesser von 2 μm verwendet werden. Diese Spezifikationen reichen zur Messung der Zugkräfte von adherierenden Zellen aus (siehe Abbildung 1.1 (a)).

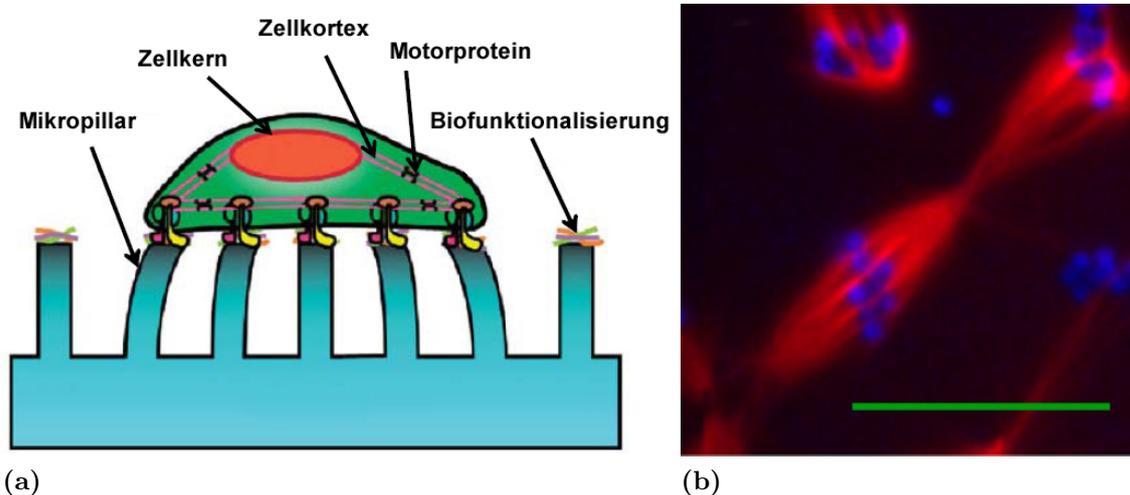


Abbildung 1.1: Ausgangslage. (a) Mit Pillarfeldern aus PDMS lassen sich Zugkräfte von lebenden Zellen messen (übernommen aus [12]). Die Kraftsensitivität der Pillars ist allerdings zu gering für Messungen an einzelnen Zellskelettkomponenten. (b) Interessant wäre beispielsweise die Messung der Kräfte zwischen in-vitro-assemblierten, fusionierenden Mitosespindeln (übernommen aus [13]). Mikrotubulstrukturen sind rot, DNA blau angefärbt. Maßstab 50 μm .

Allerdings sind zahlreiche spannende Experimente denkbar, für die Pillars mit größerem Durchmesser, aber kleinerer Federkonstante benötigt werden. Abbildung 1.1 (b) zeigt so ein Beispiel. Zu sehen sind Mitosespindeln, die zellulären Apparate, die bei der Zellteilung für die Chromosomensegregation zuständig sind. In dem gezeigten Experiment werden sie in einem Modellsystem aus Froschei-Extrakt in-vitro an DNA-Strukturen assembliert. Kommen die einzelnen Spindelstrukturen miteinander in Kontakt, so fusionieren sie und üben Kräfte aufeinander aus. Eine Messung dieser Kräfte könnte wichtige Informationen über den Aufbau der Mitosespindeln

liefern. Mitosespindeln sind als Untersuchungsobjekt von besonderem Interesse, da Fehler bei der Chromosomensegregation zu schweren Krankheiten führen können - und sich die medikamentöse Inhibierung der Mitose andererseits auch als besonders effektiver Weg zur Bekämpfung von sich schnell teilenden Tumorzellen erwiesen hat.

Die hierbei ausgeübten Kräfte werden nach [14] im niedrigen Nanonewtonbereich erwartet. Gleichzeitig benötigt man runde DNA-Strukturen mit einem Mindestdurchmesser von $12\ \mu\text{m}$ zur erfolgreichen in-vitro Assemblierung der Spindeln [13]. Mit Pillars aus PDMS können diese Spezifikationen nicht erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb eine neue Methode zur Herstellung von Pillars aus Poly-Ethylenglykol (PEG) entwickelt. Das ist ein proteinabweisendes Hydrogel, das sich wie PDMS ebenfalls gut für Experimente mit biologischen System eignet [15]. Die neue Herstellungsmethode basiert auf der Mikroskop-Projektionslithografie, einer Technik zur fotolithografischen Mikrostrukturierung fotosensitiver Materialien in Standardmikroskopen [16]. Nachdem in den letzten Jahren die Mikrostrukturierung von PEG etabliert wurde ([17], [18], [19]), werden in dieser Arbeit erstmals kraftsensitive Pillars aus diesem Material vorgestellt.

Im Gegensatz zu PDMS kann das Elastizitätsmodul von PEG durch Variation der Herstellungsparameter in einem sehr großen Bereich eingestellt werden (von 0,6 kPa bis über 6 MPa) [20]. Mit Pillars aus PEG ist es somit möglich, ausreichend dicke und dennoch ausreichend kraftsensitive Pillars für Kraftmessungen an fusionierenden Mitosespindeln herzustellen.

Die hier entwickelte Methode schließt demnach die Lücke zwischen den existierenden Methoden zur Kraftmessung. Sie erlaubt es, mit Standardtechniken ausgedehnte Felder aus hochsensitiven, spezifisch an den Pillarköpfen biofunktionalisierten Kraftsensoren für zahlreiche interessante Anwendungsmöglichkeiten herzustellen.

Kapitel 2 stellt einige wichtige Methoden zur Kraftmessung in biologischen Systemen vor, und vermittelt die biologischen Grundlagen der Mitosespindelbildung. In Kapitel 3 wird ein Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken gegeben, während sich Kapitel 4 detailliert dem experimentellen Vorgehen widmet. Einen Überblick über die erzielten Resultate liefert Kapitel 5. Kapitel 6 gibt abschließend eine Zusammenfassung der Ergebnisse und einen Ausblick auf zukünftige Einsatzmöglichkeiten der in dieser Arbeit entwickelten Pillartechnologie.

Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden für das Verständnis der Arbeit nötige theoretische Grundlagen behandelt. Kapitel 2.1 befasst sich mit der Bedeutung von biophysikalischen Kraftmessungen und stellt die wichtigsten existierenden Messmethoden kurz mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen vor. In Kapitel 2.2 wird ein Überblick über Aufbau und Funktion des Zellskeletts, insbesondere während der Mitose, gegeben.

2.1 Methoden zur Messung von Kräften in biologischen Systemen

Für ein besseres Verständnis der Vorgänge im Zellskelett (siehe Kapitel 2.2) werden die mechanischen Eigenschaften von ganzen Zellen, Zellskelettbestandteilen und Zellskelettmodellen in zahlreichen Experimenten untersucht [21], [22], [23], [24]. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse helfen unter anderem dabei, immer realistischere Modelle der komplexen Zellskelettvorgänge zu entwickeln [25], [26], [27], [28]. Besonders interessant ist dafür häufig die Messung aktiv ausgeübter Kräfte, wie sie beispielsweise von einzelnen molekularen Motoren, Mitosespindeln, Muskelfasern oder kriechenden Zellen verursacht werden [29]. Für solche Experimente steht eine Reihe von Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die in bestimmten Fällen eine Messung von Kräften in der relevanten Größenordnung (Pikonewton bis Millinewton) ermöglichen. Die speziell für diese Arbeit relevantesten Methoden werden in den folgenden Abschnitten mit ihren Vorteilen und Grenzen kurz vorgestellt. Mehr Informationen zu diesen und weitere Methoden finden sich beispielsweise in [4], [30] und [31]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Messmethode mit neuen Anwendungsmöglichkeiten entwickelt (siehe Kapitel 4).

2.1.1 Elastische Substrate

Seit den 1980ern verwenden Wissenschaftler elastische Substrate wie Poly-Dimethylsiloxan (*PDMS*) oder Poly-Acrylamid (*PAA*), um biologische Kräfte zu detektieren.

Harris et al. lies Hühnerherz-Fibroblasten auf weichen silikonbasierten Substraten adherieren und beobachtete eine Deformierung des Substrats aufgrund von Zellbewegungen und Zellkontraktionen [9]. Um eine quantitative Auswertung von Substratdeformationen zu ermöglichen werden heutzutage meist fluoreszierende Mikrobeads in die Gele eingebettet, deren Trajektorien mittels Videomikroskopie verfolgt werden [32], [33], [31]. Diese *Zugkraftmikroskopie* ist heute ein Standardverfahren um zelluläre Zugkräfte zu messen. Abbildung 2.1 zeigt ein Beispiel zur Verdeutlichung des Arbeitsprinzips.

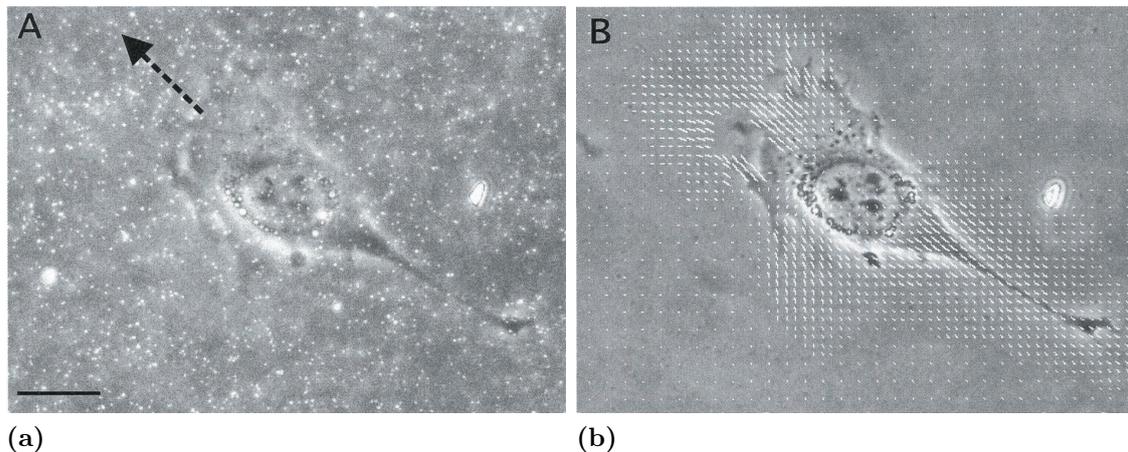


Abbildung 2.1: Die Zugkraftmikroskopie (lichtmikroskopische Aufnahmen). (a) In das elastische Substrat sind fluoreszierende Mikrobeads eingebettet. Die in Pfeilrichtung kriechende Fibroblastenzelle übt Kräfte auf das Substrat aus, und deformiert es dadurch. (b) Mittels vorher-/nachher-Vergleich der Beadpositionen lassen sich Deformationsvektoren rekonstruieren und dadurch die angreifenden Kräfte bestimmen. Beide Bilder stammen aus [34]. Maßstab $20 \mu\text{m}$.

Bei der Zugkraftmikroskopie handelt es sich jedoch um eine Oberflächentechnik. Für Messungen an Strukturen wie Mitosespindeln, bei denen Oberflächeneffekte vermieden werden sollten, ist sie demnach nicht geeignet.

2.1.2 Pillarsysteme

In gewisser Weise eine Weiterentwicklung der in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Technik ist die Verwendung von Feldern aus flexiblen Polymerpillars als Kraftsensoren. Dadurch können die Kräfte an den Pillarpositionen unabhängig voneinander bestimmt werden, außerdem werden Oberflächeneffekte weitgehend vermieden. Mikropillars können aus verschiedenen Materialien hergestellt werden, meist wird PDMS verwendet (siehe Kapitel 3.4 und [35], [10]). Pillars verbiegen sich bei horizontal angreifenden Kräften (siehe Abbildung 2.2). Für kleine Winkel lässt sich die Verbiegung eines exakt zylinderförmigen Pillars durch eine am Pillarkopf horizontal

angreifende Kraft mit Hilfe der linearen Strahlentheorie berechnen zu [36]:

$$F = \frac{3\pi Er^4}{4l^3} \cdot \Delta x \quad (2.1)$$

mit E = Elastizitätsmodul des Pillarmaterials, l = Pillarhöhe und r = Pillarradius. Gleichung 2.1 lässt sich auch schreiben als

$$F = k \cdot \Delta x \quad (2.2)$$

mit der Federkonstanten

$$k := \frac{3\pi Er^4}{4l^3} \quad (2.3)$$

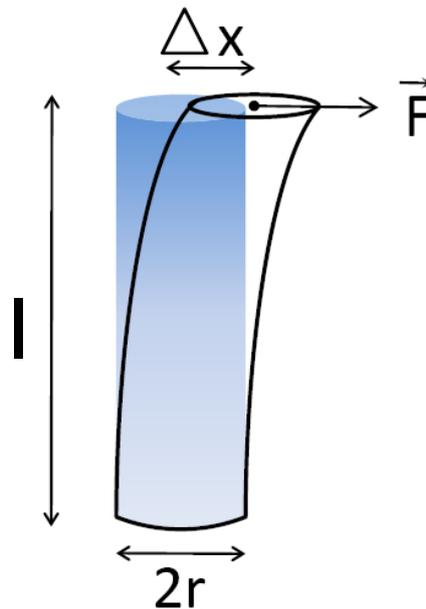


Abbildung 2.2: Pillarverbiegung aufgrund einer tangential angreifenden Kraft (schematische Darstellung). Für kleine Auslenkungen Δx verhält sich die Auslenkung proportional zur angreifenden Kraft F .

Die Verbiegung ist für kleine Winkel demnach proportional zur angreifenden Kraft und abhängig von Radius, Höhe und Elastizitätsmodul des Pillars. Bei bekannter Federkonstante kann man aus der Pillarverbiegung die angreifende Kraft berechnen. Mittels Kreuzkalibration gegen einen Kraftsensor mit bekannter Federkonstante, beispielsweise einen AFM-Cantilever (vergleiche Kapitel 4.1.4), lassen sich die nach Gleichung 2.1 theoretisch berechneten Federkonstanten experimentell überprüfen [35].

Nach spezifischer Biofunktionalisierung (siehe Kapitel 3.5.2) lassen sich biologische Untersuchungsobjekte an die Pillarköpfe anbinden. Bisher wurden Pillarsysteme aus PDMS meist für Untersuchungen an ganzen Zellen verwendet (siehe Abbildung 2.3 und [10], [31]). Ihre Kraftauflösung ist bisher materialbedingt nach unten auf ca. 0,5 Nanonewton beschränkt [11], wofür Pillars mit $2\ \mu\text{m}$ Durchmesser verwendet werden. Für die Messung der von Mitosespindeln ausgeübten Kräfte werden hingegen deutlich Pillars mit deutlich größerem Durchmesser und gleichzeitig besserer Kraftsensitivität benötigt (vergleiche Kapitel

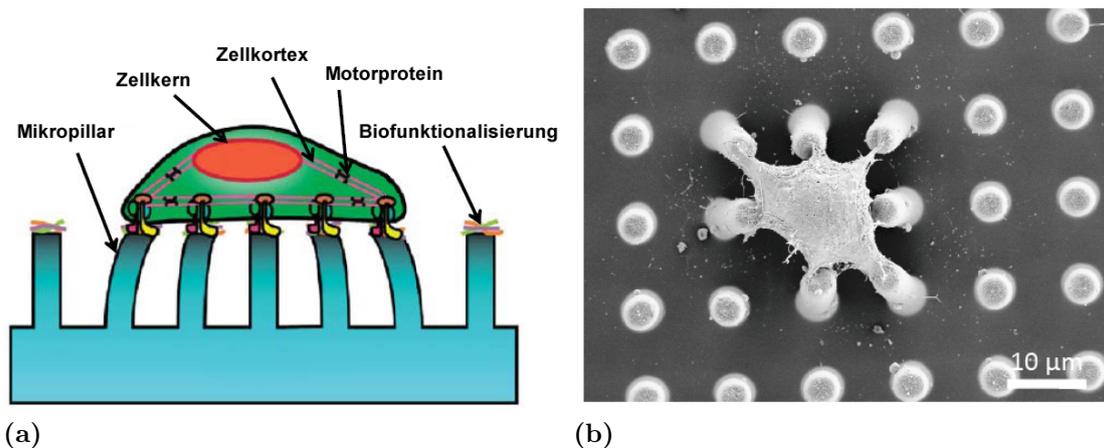


Abbildung 2.3: Kraftmessung mit Mikropillars. Zellen adhieren auf geeignet biofunktionalisierten Pillarköpfen. Von den Zellen ausgeübte Kräfte verbiegen die Pillars. (a) Schematische Darstellung, übernommen aus [12]. (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme, übernommen aus [37].

2.1.3 Optische Pinzetten

Mit optische Pinzetten lassen sich mikroskopisch kleine Objekte einerseits festhalten und bewegen - andererseits lassen sich auch auf diese Objekte wirkende Kräfte im Bereich 1 bis 100 Piconewton messen [7]. Meist wird ein durch ein Lichtmikroskop fokussierter Laserstrahl verwendet, um im verwendeten Wellenbereich durchsichtige Teilchen im Fokus einzufangen. Ein gefangenes Teilchen erfährt bei Auslenkung aus dem Fokus eine vom Laserstrahl erzeugte Rückstellkraft in Richtung des Laserfokus (Gradientenkraft, siehe Abbildung 2.4).

Optische Pinzetten können verwendet werden um kleine Objekte zu manipulieren (beispielsweise Eizellen bei der künstlichen Befruchtung [38]) - oder aber um klar definierte Kräfte im Piconewton-Bereich auszuüben oder zu messen¹. Dazu werden meist im Fokus eingefangene Polystyrol-Mikrokugeln verwendet, deren Auslenkung

¹beispielsweise wurden auf diese Weise die von einzelnen molekularen Motoren ausgeübten Kräfte gemessen [39].

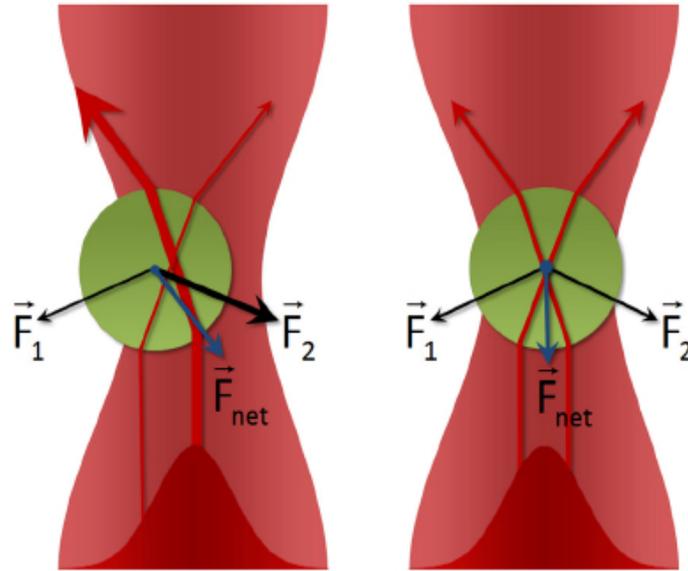


Abbildung 2.4: Funktionsprinzip optischer Pinzetten (schematische Darstellung). Transparente Mikrobeads werden durch Impulsübertragung in die Gleichgewichtslage knapp oberhalb des Laserfokus gezogen. Übernommen aus [37].

aus der Gleichgewichtslage nach Kalibration der optischen Pinzette die angreifende Kraft liefert. Holografische optische Pinzetten erlauben durch dynamische Aufspaltung des Laserstrahls die gleichzeitige Arbeit mit mehreren unabhängig voneinander agierenden Fallen [40]. Solche Systeme werden beispielsweise dazu verwendet, die mechanischen Eigenschaften des Aktinkortex von Zellen zu untersuchen [23], [41]. Weiterführende Informationen zu optischen Pinzetten finden sich beispielsweise in [42] und [43].

Für die Messung der Kräfte zwischen den Polen von Mitosespindeln eignen sich optische Pinzetten aus zwei Gründen nicht: Erstens sind die wirkenden Kräfte in der Mitosespindel zu stark, und zweitens funktionieren optische Pinzetten nur in Proben, die im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers durchsichtig sind. Dies ist im verwendeten Froschei-Extrakt nicht der Fall. Allerdings lassen sich optische Pinzetten trotz ihrer niedrigen Federkonstanten (bis maximal $0,1 \text{ nN}/\mu\text{m}$) sehr genau kalibrieren [41], und sind somit ein interessantes Werkzeug für die Kreuzkalibration anderer Systeme (vergleiche Kapitel 4.1.4).

2.1.4 Magnetische Pinzetten

Magnetische Pinzetten beruhen auf einem ähnlichen Wirkungsprinzip wie die optischen Pinzetten: Äußere magnetische Gradientenfelder $\vec{\nabla}\vec{B}$ üben nach Gleichung 2.4 Kräfte auf para- oder ferromagnetische Beads mit magnetischen Dipolmoment \vec{m} aus.

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B} \quad (2.4)$$

Durch Modulation der Gradientenfelder können die Beads gezielt bewegt werden und definierte Kräfte im Femtonewton- bis Pikonewton-Bereich ausüben beziehungsweise messen [8]. Es gibt verschiedene Realisierungen dieses Wirkprinzips, von der einfachen bipolaren Spulenanordnung bis hin zu multipolaren Anordnungen von Magneten im Mikrometermaßstab [44].

Magnetische Pinzetten werden beispielsweise dazu verwendet, Zelladhäsionskräfte an Oberflächen oder viskoelastische Eigenschaften von Zellen zu messen [45], [46], [44]. Sie können aber auch dazu verwendet werden, in-vitro den Einfluss der Chromosomengeometrie auf die Mitosespindelbildung zu untersuchen (vergleiche Kapitel 3.5.5) [47]. Aktuell wird zudem versucht, mit Hilfe von magnetischen Pinzetten in-vivo die Rückstellkräfte der Mitosespindel bei Auslenkungen aus der Ruheposition in der Zelle zu vermessen [48]. Für die in-vitro Messung der Zugkräfte von Mitosespindeln nach Kapitel 4.2 eignen sich magnetische Pinzetten hingegen nicht, da es mit ihnen nicht möglich ist, größere Mengen magnetischer Partikeln unabhängig voneinander zu steuern.

2.1.5 Glasfasern oder Glas-Mikroplatten

Die Messung kleiner Kräfte mit Glasfasern (oder Glas-Mikroplatten) basiert im wesentlichen auf dem selben Prinzip wie die Kraftmessung mit Pillars: Tangential angreifende Kräfte verbiegen die flexiblen Glasfasern. Da sich die Glasfasern gut kalibrieren lassen (beispielsweise mittels Kreuzkalibration gegen einen kalibrierten AFM-Cantilever, vergleiche Kapitel 4.1.4) lässt sich aus der beobachteten Verbiegung die angreifende Kraft bestimmen. Glasfasern bieten dabei gegenüber Pillars den Vorteil, dass sie eingekoppelte Lichtstrahlen leiten und ihre Position somit häufig sehr genau im Mikroskop verfolgt werden kann. Auch können durch Ätzung mit Flusssäure nur wenige Mikrometer dicke und gleichzeitig sehr lange Fasern hergestellt werden, die somit trotz des verhältnismäßig hohen Elastizitätsmodul von Glas eine sehr kleine Federkonstante besitzen. Somit eignen sich Glasfasern prinzipiell gut für eine genaue Bestimmung von Kräften im Pikonewton- bis Nanonewton-Bereich [5], [49], und können bei entsprechender Biofunktionalisierung auch eingesetzt werden um die von Mitosespindeln in-vivo oder in-vitro ausgeübten Kräfte zu messen. 1983 zeigte Nicklas, dass sich mit Glasfasern die auf ein Chromosom ausgeübten Kräfte der Mitosespindel in-vivo messen lassen, und bestimmte die Kraft auf 0,7 Nanonewton [14]. Der große Nachteil der Glasfasermethode ist die komplizierte Handhabung bei gleichzeitiger Beschränkung auf nur ein vermessenes Untersuchungsobjekt pro Versuch. Es ist nicht praktikabel, eine große Anzahl von Experimenten parallel im selben Versuchsaufbau durchzuführen und somit ohne sehr großen Aufwand eine statistisch relevante Menge an Messdaten zu generieren. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein weitere Messmethode entwickelt.

2.2 Zellskelett und Mitosespindel

Ein zentrales Forschungsgebiet der Biophysik befasst sich mit der Mechanik von Zellen und Zellbestandteilen. Meist beziehen sich die Untersuchungen auf ganze Zellen oder auf bestimmte Komponenten des Zellskeletts (siehe Kapitel 2.2.1). Für die vorliegende Arbeit ist besonders die Mitosespindel von Interesse - ein auf Mikrotubuli basierender Apparat zur Segregation der Chromosomen während der Mitose. Grundlagen zu Mikrotubuli, Mitose und der Mitosespindel finden sich in den Kapiteln 2.2.2 bis 2.2.4. Alle Angaben beziehen sich dabei auf eukaryotische Zellen. Weiterführende Informationen zu den in diesem Kapitel behandelten Themen finden sich beispielsweise in [1].

2.2.1 Das Zellskelett

Zellen sind von einem dichten Netzwerk aus Proteinfäden durchzogen, dem sogenannten Zellskelett. Das Zellskelett bestimmt die äußere Form der Zelle und ermöglicht es ihr, sich zu teilen, sich fortzubewegen, mit der Umgebung mechanisch in Wechselwirkung zu treten und die Zellkomponenten im inneren zu organisieren und zu transportieren [50]. Das Zellskelett ist dabei keine starre Struktur, sondern höchst dynamisch und wird je nach Bedarf ständig umgebaut und neu organisiert.

Es basiert auf einem Gerüst aus drei verschiedenen Filamenttypen, die aus jeweils spezifischen Proteinuntereinheiten aufgebaut sind: Aktinfilamenten, Mikrotubuli (vergleiche Abbildung 2.5) und Intermediärfilamenten. Jeder dieser Filamenttypen besitzt charakteristische mechanische Eigenschaften und erfüllt spezielle Aufgaben in der Zelle. Ergänzt werden die Proteinfäden durch eine Vielzahl von assoziierten Proteinen mit verschiedenen Aufgaben. Ein Beispiel sind mit dem Zellskelett assoziierte Motorproteine. Sie sorgen in vielen Fällen für die nötigen Kräfte um gerichtete Bewegungen auszuführen, Organellen zu positionieren und Frachten zwischen den Organellen hin- und her zu transportieren (vergleiche Abbildung 2.6).

Das Zellskelett ist aufgrund seiner vielfältigen Funktionen ein wichtiges Untersuchungsobjekt und Angriffspunkt für zahlreiche Diagnostik- und Therapieverfahren bei schweren Krankheiten wie beispielsweise Krebs [24], [51], [52].

2.2.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ca. 25 nm. Sie sind mit ihren assoziierten Motorproteinen Dynein und Kinesin in der Zelle beispielsweise für Transportvorgänge und die Bewegung beziehungsweise Lokalisierung der Organellen im Zytosol zuständig. Während der Mitose bilden sie zusammen mit zahlreichen assoziierten Proteinen die Mitosespindel zur Chromosomensegregation (siehe Kapitel 2.2.4). Mikrotubuli sind aus 13 linearen Protofilamenten aufgebaut, die durch die Polymerisation von Tubulinmolekülen entstehen. Tubulinmoleküle sind wiederum Dimere aus den zwei strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten α -Tubulin und

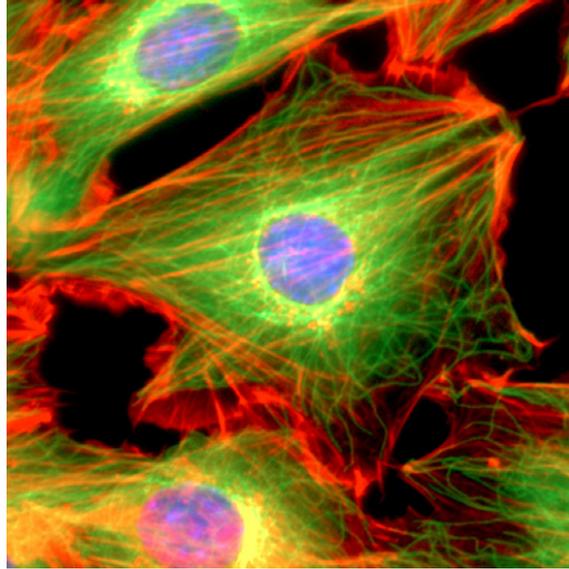


Abbildung 2.5: Aktin- und Mikrotubulinetzwerke (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme). Mikrotubuli sind rot, Aktinfilamente grün und die DNA im Zellkern blau angefärbt. Übernommen aus [24]

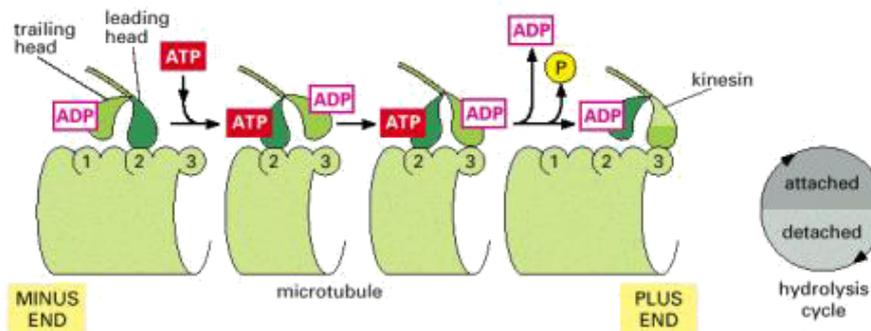


Abbildung 2.6: Funktionsprinzip eines molekularen Kinesin-Motors (schematische Darstellung). Die Hydrolyse von Adenosin-Triphosphat (ATP) verursacht eine Konformationsänderung, die eine Kraft im niedrigen Piconewton-Bereich ausübt. Übernommen aus [1]

β -Tubulin (siehe Abbildung 2.7). Beide Untereinheiten haben Bindungstaschen für Guanosin-Triphosphat (GTP), aber nur β -Tubulin hydrolysiert GTP während des Polymerisationsprozesses. Diese Asymmetrie führt zu einer Polarität der Mikrotubuli und zu einem anisotropen Wachstumsverhalten. Sowohl die Anlagerung weiterer Dimere als auch die Depolymerisation geschehen am β -Tubulin-terminierten *Plus-Ende* wesentlich schneller als am α -Tubulin-terminierten *Minus-Ende*. Auf dieser Polarität beruht außerdem auch die gerichtete Bewegung der Mikrotubuli-assoziierten molekularen Motoren. Kinesine wandern meist zum Plus-Ende der Mikrotubuli, Dyneine hingegen zum Minus-Ende.

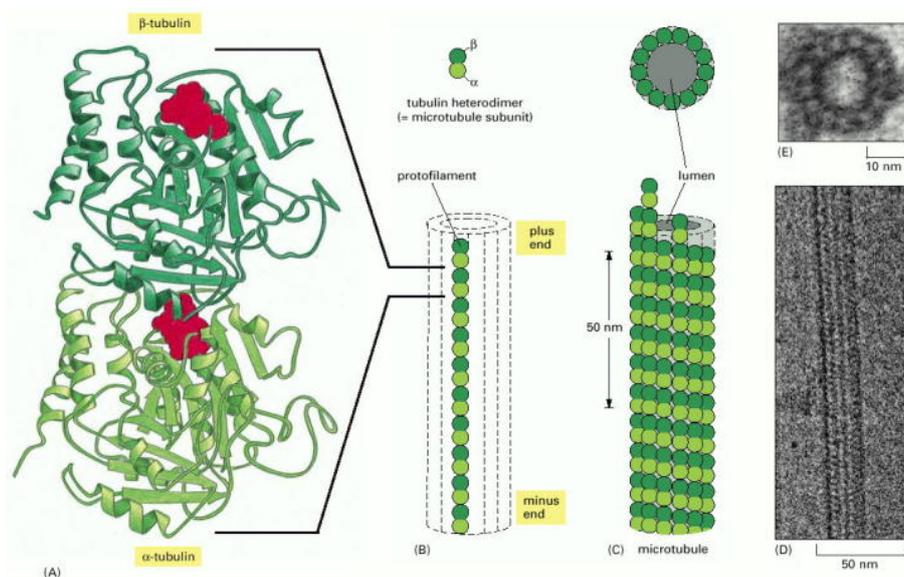


Abbildung 2.7: Aufbau der Mikrotubuli (schematische Darstellung). Dargestellt sind (von links nach rechts): Proteinstruktur eines Tubulin-Dimers, Aufbau eines Protofilaments, Aufbau eines Mikrotubulus, elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mikrotubulus. Übernommen aus [1]

Mikrotubuli bilden sich in der Zelle meist ausgehend von sogenannten Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOCs). Häufig wird diese Aufgabe vom Zentrosom übernommen, das in der Nähe des Nukleus lokalisiert ist. Das Zentrosom ist ein Proteinkomplex, der auch γ -Tubulin enthält - eine Tubulinvariante, die stabil an α -Tubulin bindet und somit den Aufbau eines neuen Mikrotubulus initiieren kann. Im Zytoplasma der Zellen liegt in der Regel ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Tubulin vor. Ständig werden neue Tubulin-Dimere an die existierenden Mikrotubuli angebaut, gleichzeitig kommt es immer wieder zu spontaner Rückbildung einzelner Mikrotubuli (sogenannte *Katastrophen*). Durch dieses, als *dynamische Instabilität* bezeichnete Gleichgewicht aus Auf- und Abbau (vergleiche Abbildung 2.8) ist das Mikrotubulnetzwerk sehr variabel und kann sich jederzeit schnell an die jeweiligen Anforderungen in der Zelle anpassen [53].

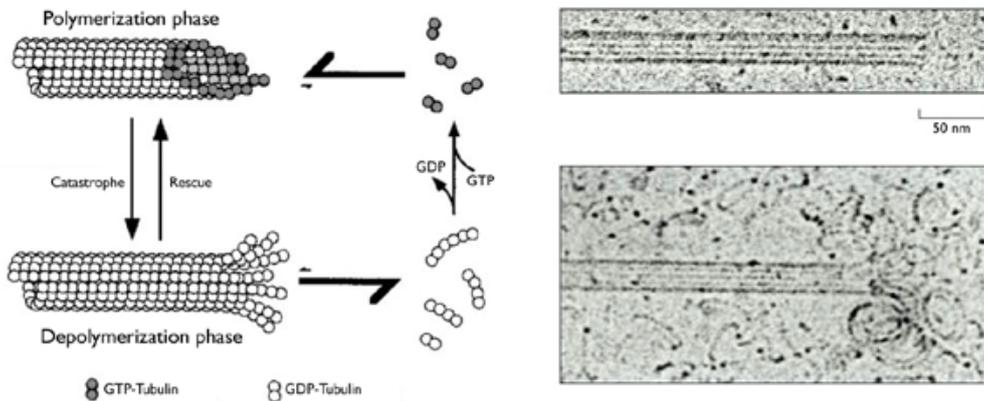


Abbildung 2.8: Dynamische Instabilität (schematische Darstellung sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen). Eine GTP-Kappe am Plus-Ende des Mikrotubulus fördert ein schnelles Wachstum. Geht die Kappe verloren, so folgt die rasche Depolymerisation [54]. Übernommen aus [55] und [1].

2.2.3 Die Mitose

Der Zyklus aus Verdopplung der DNA und Teilung der Zelle steht im Mittelpunkt der Reproduktion allen Lebens. Nach der Verdopplung der im Kern vorhandenen DNA folgt erst die Zellkernteilung (*Mitose*) und anschließend die Teilung des Zellkörpers (*Zytokinese*). An beiden Prozessen nehmen Komponenten des Zellskeletts aktiv teil. Im folgenden wird der Prozess der Mitose kurz erläutert.

Nach der Replikation der DNA im Zellkern während der sogenannten S-Phase besteht jedes Chromosom zu Beginn der Mitose aus zwei identischen Schwesterchromatiden, die durch *Cohesinklammern* genannte Proteinkomplexe fest miteinander verbunden sind [56]. Auch das Zentrosom wurde in der S-Phase verdoppelt. Die DNA kondensiert nun zu mikroskopisch sichtbaren, dicht gepackten Chromosomen während sich die umhüllende Kernmembran auflöst. Gleichzeitig bildet sich ausgehend von den beiden Zentrosomen die auf Mikrotubuli basierende Mitosespindel (siehe Kapitel 2.2.4). Die Spindelfasern adherieren an die Chromosomen und bringen sie in die Äquatorialebene zwischen den beiden Spindelpolen. Nachdem dort alle Chromosomen angekommen sind lösen sich die Cohesinklammern auf, und die jetzt als Tochterchromosomen bezeichneten Hälften werden von der Spindel zu den Spindelpolen gezogen. Dort angekommen bildet sich um sie herum eine neue Kernhülle, und die Mitose ist abgeschlossen. In der nun folgenden Zytokinese teilt ein aktin- und myosinbasierter kontraktiler Ring den Zellkörper durch abschnüren in zwei Hälften. Abbildung 2.9 zeigt den Vorgang der Mitose noch einmal schematisch.

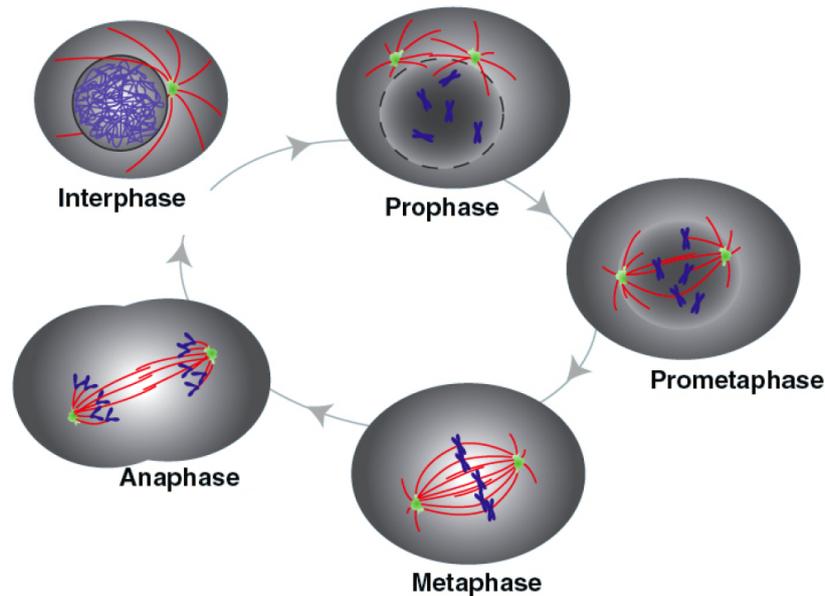


Abbildung 2.9: Der Mitosezyklus (schematische Darstellung). *Interphase*: Die Zelle wächst, die Chromosomen (blau) werden repliziert und das Zentrosom (grün) verdoppelt. *Prophase*: Die Mikrotubuli des Zellskeletts depolymerisieren, die Zelle nimmt dadurch eine runde Gestalt an. Die replizierten Chromosomen kondensieren, und die Mitosespindel bildet sich ausgehend von den beiden auseinander gewanderten Zentrosomen. *Prometaphase*: Die Kernhülle (grau) löst sich auf, die Spindelmikrotubuli (rot) beider Pole heften sich an die Kinetochore der Chromosomen. *Metaphase*: Die Chromosomen haben sich entlang des Spindeläquators angeordnet. *Anaphase*: Die Schwesterchromatiden trennen sich in zwei Tochterchromosomen auf, und werden durch Verkürzung der Kinetochormikrotubuli sowie durch Wanderung der Spindelpole auseinander gezogen. Nach der Bildung neuer Kernhüllen um die wieder decondensierenden Chromosomen folgt die Zellteilung, ein neuer Zellzyklus beginnt. Übernommen aus [57].

Die Bedeutung der Mikrotubuli für die Mitose wird deutlich, wenn man ihre Dynamik hemmt. Vinblastin fällt beispielsweise Tubulin aus, Colchicin fördert die Depolymerisation der Mikrotubuli und Taxol hingegen stabilisiert sie. Trotz der unterschiedlichen Effekte haben diese drei pflanzlichen Alkaloide letztendlich die selbe Wirkung: Sie stören die Mikrotubulidynamik und verhindern somit eine funktionierende Mitose. Taxol und Vinblastin werden dementsprechend auch bei Chemotherapien gegen Krebs eingesetzt.

2.2.4 Die Mitosespindel

Zu Beginn der Mitose wandern die beiden Zentrosomen an gegenüberliegende Orte des Nukleus. Dann bilden sich von ihnen ausgehend Mikrotubuli-Astern, wobei die dynamische Instabilität gegenüber der Interphase drastisch erhöht ist. Die rasch

wachsenden und schrumpfenden Mikrotubuli breiten sich somit von den beiden Zentrosomen schnell in alle Richtungen aus und erkunden die Umgebung. Treffen sie dabei auf Mikrotubuli der jeweils anderen Aster, so treten sie mit diesen in Wechselwirkung. Das führt zu einer Stabilisierung der beteiligten Mikrotubuli und somit zur Ausbildung des bipolaren Gerüsts der Mitosespindel. Aus den Zentrosomen werden die Spindelpole, die interagierenden Mikrotubuli nennt man *interpolare Mikrotubuli*².

An den Zentromeren der Chromosomen, also den zentralen Verbindungsstellen zwischen den beiden Schwesterchromatiden, bilden sich währenddessen Kinetochor genannte Proteinkomplexe, die eine hohe Affinität zu Mikrotubuli aufweisen. Nach Auflösung der Kernmembran zu Beginn der Prometaphase erkunden dann Mikrotubuli auch den Bereich des ehemaligen Zellkerns nach dem Zufallsprinzip. Treffen sie dabei auf ein Kinetochor, so binden sie stabil daran und verbinden somit das Chromosom mit dem entsprechenden Spindelpol. Diese Mikrotubuli werden dann *Kinetochormikrotubuli* genannt. Da die Kinetochore der Schwesterchromatiden in entgegengesetzte Richtungen zeigen binden sie an Mikrotubuli von entgegengesetzten Spindelpolen. So wird jedes Chromosom mit beiden Spindelpolen verbunden. Je nach Spezies heftet sich dabei teilweise eine Vielzahl von Mikrotubuli an jedes Kinetochor. Für den Mechanismus der Anbindung und Verkürzung der Kinetochormikrotubuli existieren zwei konkurrierende Modelle: Entweder werden die Mikrotubuli aktiv unter ATP-Hydrolyse von Motorproteinen verkürzt, oder aber die Neigung zur Depolymerisation der Mikrotubuli selbst sorgt für eine Verkürzung. Die beiden Modelle werden in Abbildung 2.10 erläutert.

Mikrotubuli die weder an andere Mikrotubuli noch an Kinetochore binden, reichen astral in das Zytoplasma hinaus und stabilisieren und positionieren somit die Spindel im Zellkörper. Man nennt sie *astrale Mikrotubuli*. Abbildung 2.11 zeigt die drei Mikrotubuliklassen aus denen sich die Mitosespindel aufbaut.

Durch gleichmäßigen Zug von beiden Kinetochormikrotubulisträngen werden die Chromosomen nun in der zentralen Äquatorialebene zwischen den Spindelpolen angeordnet [57]. Noch ist nicht viel über die dabei wirkenden Kräfte bekannt - aber man vermutet, dass sowohl weiteres wachsen und schrumpfen der Mikrotubuli, als auch aktive Motorproteine an der Chromosomenpositionierung beteiligt sind [59]. Auch nach Eintreffen in der Äquatorialebene zittern die Chromosomen weiter ständig hin und her. Dies deutet auf einen andauernden Zug aus beiden Richtungen durch die Mikrotubuli hin. Durchtrennt man zu diesem Zeitpunkt einen der beiden Mikrotubulistränge mit einem Laser, so wandert das jeweilige Chromosom sofort in Richtung des jeweils anderen Spindelpols [1]. Die Kräfte, die nach Durchtrennung der verbindenden Cohesinklammern in der Anaphase die Tochterchromosomen mit einer Geschwindigkeit von ca. $2 \mu\text{m}/\text{sec}$ auseinander ziehen, sind also schon in der

²Pflanzenzellen besitzen allerdings keine Zentrosomen und bilden dennoch Mitosespindeln aus. Und auch Versuche mit Froschei-Extrakt zeigen, dass weder Zentrosomen noch Kinetochore zwingend für die Bildung bipolarer Mitosespindeln benötigt werden (siehe Kapitel 3.5.5).

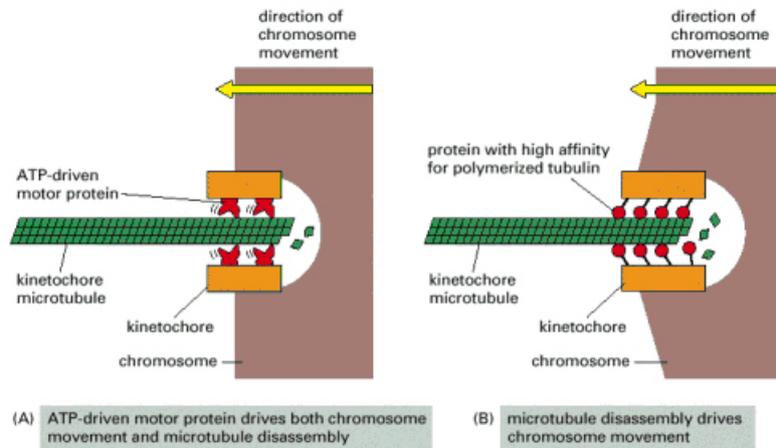


Abbildung 2.10: Zwei Hypothesen zum Mechanismus der Verkürzung der Kinetochormikrotubuli (schematische Darstellung). In beiden Modellen sind die Kinetochormikrotubuli über Proteinbrücken beweglich an die Kinetochore angebunden. In Modell (A) wird diese Aufgabe von Motorproteinen übernommen, die in Richtung des Minuspols der Mikrotubuli wandern, in Modell (B) von Linkerproteinen, die mit hoher Affinität an polymerisiertes, nicht aber an depolymerisiertes Tubulin binden. Jenseits der Proteinbrücken depolymerisieren die Mikrotubuli in beiden Modellen. Dies führt tendenziell zu einer Verkürzung der Kinetochormikrotubuli und dadurch zu einer Kraftausübung auf die Chromosomen. Übernommen aus [1].

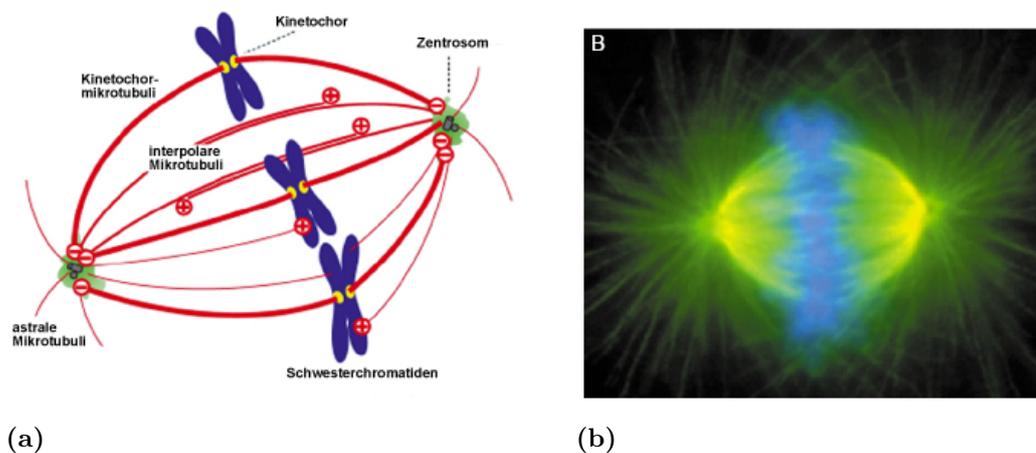


Abbildung 2.11: Die Mitosespindel. (a) Die drei Mikrotubuliklassen (rot) in der Mitosespindel (schematische Darstellung): Kinetochormikrotubuli reichen von den Polen (grün) zu den Kinetochoren (gelb) der Chromosomen (blau), interpolare Mikrotubuli beider Spindelpole überlappen mit gegensätzlicher Polarität in der Äquatorebene. Astrale Mikrotubuli reichen von den Zentrosomen in alle Richtungen in den Zellkörper hinaus. Übernommen aus [57]. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Mitosespindel. Übernommen aus [58].

Metaphase aktiv.

Die Auseinanderbewegung in der Anaphase basiert auf zwei Effekten. Einerseits werden die Kinetochormikrotubuli durch Abbau immer weiter verkürzt, und die angehefteten Tochterchromosomen bewegen sich dadurch polwärts. Andererseits rücken die Spindelpole selbst auseinander - durch motorgetriebenes Aneinander vorbeigleiten der überlappenden interpolaren Mikrotubuli. Abbildung 2.12 zeigt die beiden Mechanismen schematisch. Eine quantitative Messung der hierbei auftretenden Kräfte könnte Rückschlüsse auf den Aufbau der Mitosespindel, und insbesondere auf die Anzahl der an diesem Prozess beteiligten molekularen Motoren liefern.

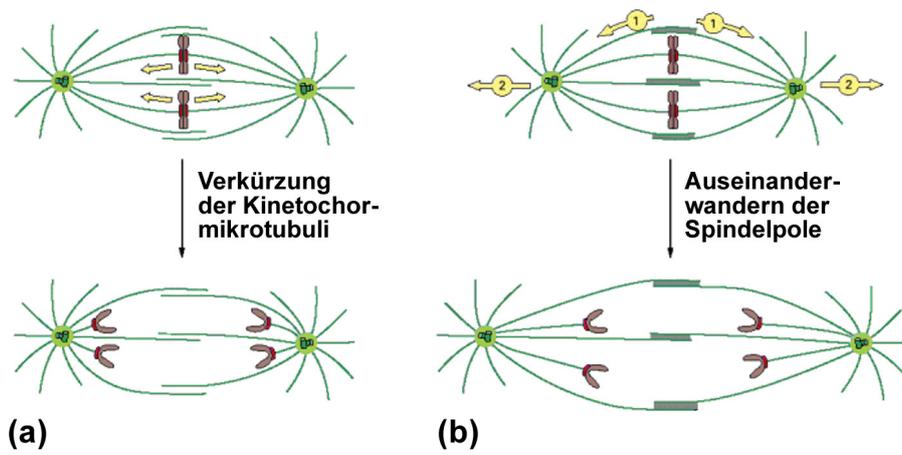


Abbildung 2.12: Chromosomensegregation in der Anaphase (schematische Darstellung). Die Chromosomensegregation erfolgt durch zwei überlagerte Effekte: (a) Die Kinetochormikrotubuli verkürzen sich, und ziehen die Tochterchromosomen auseinander. (b) Die Spindelpole wandern auseinander durch (1) gegenseitige Verschiebung der interpolaren Mikrotubuli, und (2) Krafteinwirkung auf die Spindelpole über die astralen Mikrotubuli. Übernommen aus [1].

Teil II

Materialien und Methoden

Verwendete Techniken

3.1 Oberflächenchemie

3.1.1 Sputter Coater

Sputter Coater werden verwendet um dünne gleichmäßige Metall- oder Halbmetallfilme auf Proben aufzubringen. Dazu wird in der Reaktionskammer des Geräts ein Argon-Plasma erzeugt. Die Argon-Kationen werden dann elektrisch beschleunigt und treffen auf das gewählte Metall-Target. Beim Aufprall der Argon-Kationen werden Metallatome in Richtung der Probe herausgeschlagen. Je nach Argon-Gasdruck fliegen die Metallatome entweder direkt auf die Probe (niedriger Gasdruck) oder sie kollidieren unterwegs mit Argonatomen und erreichen die Probe auf indirektem Weg (hoher Gasdruck). Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des Sputter-Prozesses.

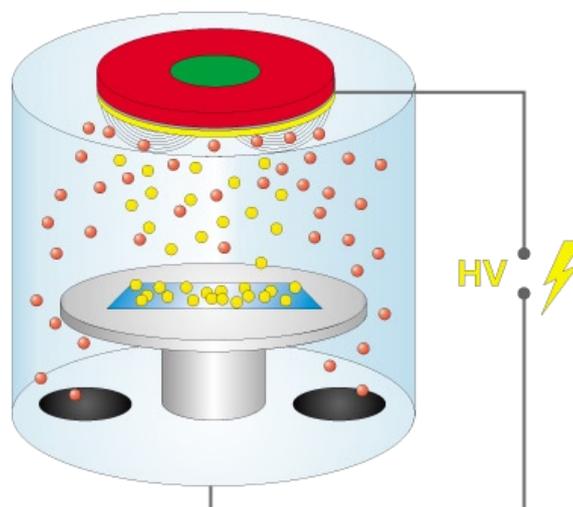


Abbildung 3.1: Der Sputter-Prozess (schematische Darstellung). Metallatome (gelb) lagern sich in einer Argon-Athmosphäre (rot) auf der Probe (blau) ab. Übernommen aus [60].

Die Stärke des Metallfilms auf der Probe kann über die Parameter Gasdruck, Beschleunigungsspannung und Prozessdauer reguliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Sputter-System MED020 von BAL-TEC verwendet (BAL-TEC, Witten, Deutschland), um Chromschichten auf Glas für Belichtungsmasken (siehe Kapitel 3.4.1) und Goldschichten auf Hydrogel (siehe Kapitel 3.3) beziehungsweise Glas für Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (siehe Kapitel 3.1.2) aufzubringen. Üblicherweise wurden folgende Parameter verwendet:

- Chrom auf Glas: 300 sec, $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 120 mA
- Gold auf Hydrogel/Glas: 30 sec, $5,0 \cdot 10^{-2}$ mbar, 120 mA

3.1.2 Plasmatechnik

Plasmageräte werden verwendet um Oberflächen zu ätzen, zu reinigen oder chemisch zu aktivieren. In der Probenkammer wird in einer verdünnten Gasatmosphäre durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen ein Gasplasma erzeugt, das aus hochenergetischen Ionen, Elektronen und gegebenenfalls freien Radikalen besteht. Je nach verwendeten Parametern und Probenmaterialien kann das Plasma organische Reste von der Probe abbrennen (reinigen), die Oberflächenmoleküle der Probe chemisch modifizieren (aktivieren) oder Atome aus der Probe herauszuschlagen (plasmaätzen). Abbildung 3.2 zeigt den Plasmaprozess schematisch.

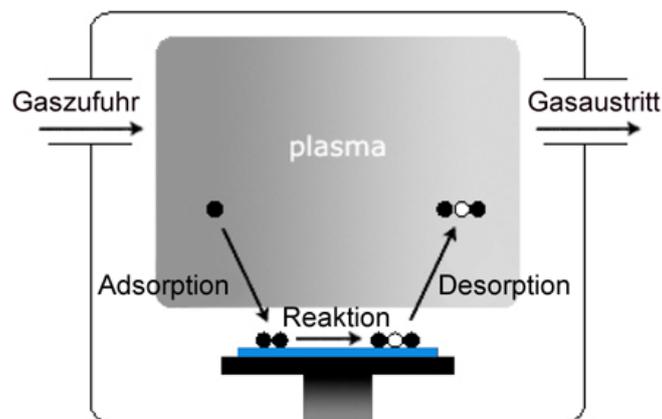


Abbildung 3.2: Der Prozess der Plasmareinigung (schematische Darstellung). Hochenergetische Ionen (schwarz) reagieren mit organischen Resten (weiß) auf der Probe (blau).

In der vorliegenden Arbeit wurden ein TePla Dry Plasma Etcher, 100E Mikrowellen-Plasmasystem mit einer 2,45 GHz Plasmaquelle und einstellbarer Plasmaleistung bis 300 W verwendet (TePla) um Glasoberflächen chemisch zu aktivieren. Aktivierete Glasplättchen wurden für die Herstellung von Versuchskammern (siehe Kapitel 4.2.1) und für die Silanisierung von Glasoberflächen (siehe Kapitel 3.1.3) benötigt.

3.1.3 Silanisierungstechniken

Eine Methode zur Modifizierung der Oberflächeneigenschaften und -reaktivität von Glas- oder Quarzproben ist die Selbstassemblierung einer funktionalen Molekül-Monolage auf der Probenoberfläche [61], [62], [63]. Die adsorbierten Moleküle organisieren sich dabei spontan in kristallinen oder semikristallinen Strukturen [64], [65]. Alkylalkoxysilane sowie Alkylchlorosilane beispielsweise können durch nukleophile Substitutionsreaktionen kovalent an freien Hydroxylgruppen auf Glasoberflächen angebonden werden (siehe Abbildung 3.3).

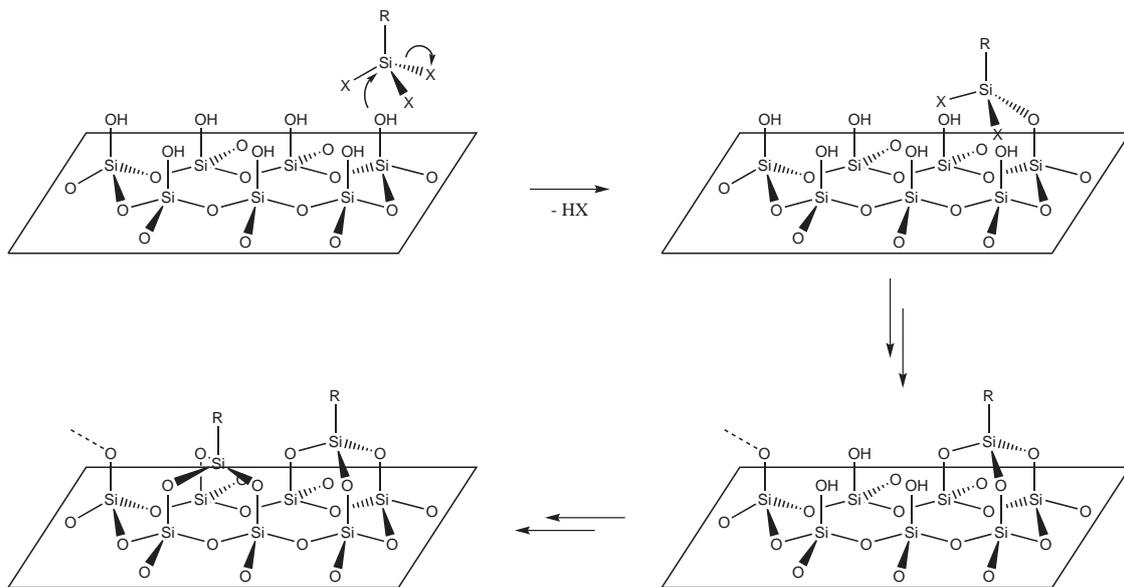


Abbildung 3.3: Bildung einer selbstassemblierten Monolayer von Silanmolekülen auf einer Glasoberfläche (schematische Darstellung). Die Anbindung von Alkylalkoxysilanen ($X = \text{OR}$) oder Alkylchlorosilanen ($X = \text{Cl}$) an das Siliziumdioxid der Glasoberfläche erfolgt über nukleophile Substitution.

Für die Anbindung der Silane (*Silanisierung*) wird die Probe bei Raumtemperatur zusammen mit $100 \mu\text{l}$ des flüssigen Silans in einem Exsikkator positioniert¹. Nach etwa einminütiger Evakuierung ist der Dampfdruck des Silans unterschritten und es bildet sich eine silangesättigte Atmosphäre aus. Der Vakuümhahn wird geschlossen, und die Probe für zwei Stunden im Exsikkator belassen. Das Silan adhiert dann auf der Probe.

Silanisierungen werden in diesem Projekt für zwei Ziele benötigt:

1. Eine Behandlung mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorsilan (ABCRC) lässt Oberflächen von Siliziumwafern oder Glasproben hydrophober werden. Auf

¹Vor der Behandlung mit Allyl-Triethoxysilan müssen Glasproben chemisch aktiviert werden, beispielsweise durch Sauerstoff-Plasma (10 min, 150 W, 0,4 mbar, siehe Kapitel 3.2.2)

Glas oder Siliziumwafern ausgehärtetes PDMS ist dann deutlich einfacher wieder von der Probe ablösbar, was den Herstellungsprozess von PDMS-Abgüssen (siehe Kapitel 3.4.2) wesentlich erleichtert und die Lebensdauer des Abgussmasters verlängert.

2. Eine Funktionalisierung mit Allyl-Triethoxysilan (Sigma-Aldrich) wird verwendet um PEG-Hydrogel (siehe 3.3) kovalent an Glasoberflächen anzubinden. Bei dieser Silanisierungstechnik werden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen erzeugt, die reaktiv sind gegenüber radikalischer Polymerisation. Das führt während der radikalischen Quervernetzungsreaktion von PEG zu einer kovalente Anbindung des PEG-Hydrogels.

3.2 Mikroskopietechniken

3.2.1 Konfokale Mikroskopie

Die *konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie* (LSM) ist eine Weiterentwicklung der gewöhnlichen Lichtmikroskopie [66]. Um den Kontrast zwischen beobachtetem Objekt und unerwünschtem Hintergrund zu erhöhen, wird bei konfokalen Mikroskopen ausschließlich das Licht aus der jeweiligen Fokusebene ausgewertet und Hintergrundlicht aus anderen Ebenen unterdrückt. Bei der klassischen Lichtmikroskopie wird die Probe gleichmäßig ausgeleuchtet, bei der konfokalen Mikroskopie wird das Anregungslicht hingegen auf einen Punkt in der Probe fokussiert. In der Praxis werden meist fokussierte Laser als Lichtquellen verwendet. Das von der Probe zurück gestreute Licht wird durch das selbe Objektiv auf eine Lochblende abgebildet und dahinter detektiert. Die Größe der Lochblende (*Pinhole*) bestimmt dabei die Beleuchtungssensitivität und die Tiefenschärfe des Bildes. Anregungs- und Detektionsfokus liegen konfokal, also aufeinander. Optische Informationen die nicht aus der Fokusebene kommen, werden dadurch zweifach unterdrückt: Erstens werden sie kaum abgefragt, da die Beleuchtungsintensität außerhalb des Fokus sehr schwach ist, und zweitens wird Licht von außerhalb der Fokusebene nicht auf die Lochblende fokussiert und somit fast komplett abgeblockt (vergleiche Abbildung 3.4).

Rastert man die Probe nun Punkt für Punkt ab, so erhält man sehr kontrastreiche Bilder der Fokusebene. Durch die Aufnahme mehrerer Fokusebenen hintereinander können auch dreidimensionale Abbildungen der Probe rekonstruiert werden. Die Auflösung wird wie beim gewöhnlichen Lichtmikroskop vor allem durch die Lichtbeugung begrenzt. Mit blauem Licht kann man eine Auflösung von bis zu 200 nm lateral und 500 nm axial erreichen.

Konfokale LSM eignet sich insbesondere für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie. Dazu werden bestimmte Bestandteile der Probe, beispielsweise geeignete Proteine, spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff (siehe Kapitel 3.5.1) markiert. Diese Farbstoffe werden im LSM durch Absorption von Laserphotonen angeregt, und

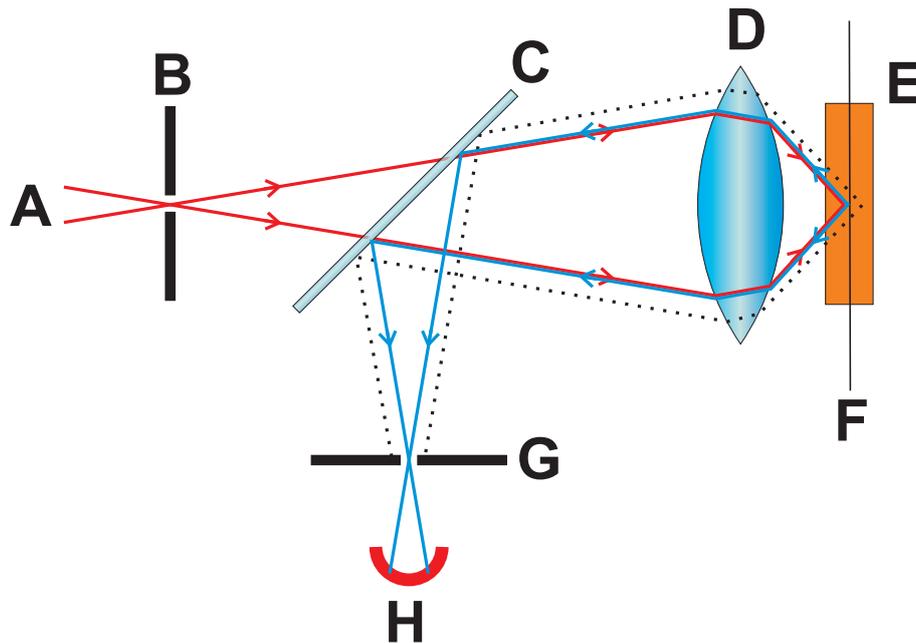


Abbildung 3.4: Das Funktionsprinzip der konfokalen Mikroskopie (schematische Darstellung). Eingezeichnet ist der Strahlengang des Lichts. Das von der Lichtquelle (A) durch eine erste Lochblende (B) kommende Anregungslicht (rot) wird durch das Objektiv (D) auf einen Punkt in der Probe (E) fokussiert. Das rückgestreute Licht (blau, bei Fluoreszenzaufnahmen das emittierte Fluoreszenzlicht) wird durch das selbe Objektiv wieder fokussiert, und über einen Strahlteiler (C) auf eine zweite Lochblende (G) fokussiert, hinter der sich der Detektor (H) befindet. Reflektiertes Licht von außerhalb der Fokusebene (grau gestrichelt) wird durch das Objektiv ebenfalls fokussiert, allerdings auf eine Ebene vor oder hinter der Lochblende (G). Dadurch wird dieses Licht zum größten Teil durch die Lochblende abgeblockt, und somit kaum detektiert.

emittieren daraufhin Photonen mit einer größeren Wellenlänge. Durch Einbringung entsprechender Filter in den Strahlengang werden nur die langwelligen emittierten, nicht aber die kurzwelligen rückgestreuten Photonen detektiert. Dadurch erhält man sehr kontrastreiche und hochauflösende Fluoreszenzaufnahmen. Alle Fluoreszenzaufnahmen in dieser Arbeit wurden mit konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen erzeugt (Pascal 5 beziehungsweise Meta 510, beide Zeiss). Zu den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen siehe Kapitel 3.5.1.

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist ein Standardverfahren zur hochauflösenden Abbildung von Mikro- und Nanostrukturen [67]. Dabei wird die Oberfläche einer Probe im Hochvakuum mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert (siehe Abbildung 3.5). Die Interaktion der Elektronen mit dem Probenmaterial kann auf mehreren Wegen genutzt werden, um sowohl topografische als auch chemische Information über die Probe zu erhalten. Am wichtigsten für die Auswertung sind die sogenannten *sekundären Elektronen*, rückgestreuten Elektronen und niederenergetische Röntgenstrahlen. Während sekundäre Elektronen und rückgestreute Elektronen Informationen über die Oberflächenmorphologie und den Materialkontrast enthalten, kann die chemische Zusammensetzung der Probe anhand der charakteristischen Röntgenemissionen analysiert werden. Damit sich die Probe nicht mit Elektronen auflädt und somit die Interaktion des Elektronenstrahls mit der Probe durch elektrostatische Wechselwirkung verfälscht, müssen nichtleitende Proben mit einer Schicht eines leitenden Materials versehen werden. Meist wird dazu eine dünne Schicht aus Graphit oder Gold aufgesputtert (siehe Kapitel 3.2.1).

Die theoretisch erreichbare Auflösung ist wegen der kleinen De-Broglie-Wellenlängen der Elektronen bei hohen Beschleunigungsspannungen um einen Faktor 10^5 größer als bei Lichtmikroskopen. In der Praxis wird das Auflösungsvermögen jedoch durch Linsenfehler beschränkt, besonders durch die sphärische Abberation. Moderne Rasterelektronenmikroskope können Proben bei exakter Justierung des Elektronenstrahls mit einem Auflösungsvermögen von bis zu 0,1 nm abbilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Leo 1530 Feldemissionssystem mit Schottky Kathode (Zeiss) zur Charakterisierung der hergestellten PEG-Hydrogelstrukturen verwendet. Mit dem REM können die Strukturen im Blickwinkel von 45° hochauflösend abgebildet werden. Dadurch wird auch ihre dreidimensionale Struktur erkennbar (siehe Kapitel 5.1). Als leitende Schicht wurde eine dünne Goldschicht aufgesputtert. Die Beschleunigungsspannung betrug zwischen 3 und 4 kV bei einem Kammerdruck von ca. $1,5 \cdot 10^{-5}$ mbar.

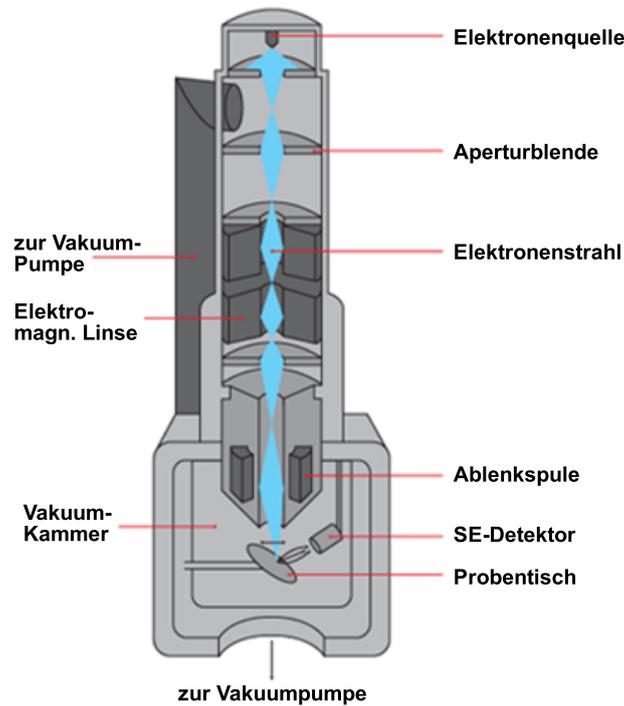


Abbildung 3.5: Aufbau eines Elektronenmikroskops (schematische Darstellung).

3.3 Hydrogele aus Poly-Ethylenglykol

Als Hydrogele bezeichnet man wasserunlösliche Polymere, die durch Quervernetzung ein dreidimensionales Netzwerk bilden, in das sich Wasser einlagern lässt. Durch hydrophile Polymerkomponenten quellen sie bei Wasseraufnahme je nach Zusammensetzung unter teils erheblicher Volumenzunahme [15]. Das hier verwendete Hydrogel basiert auf Poly-Ethylenglykol-Kettenmolekülen (PEG). PEG wird aufgrund seiner Biokompatibilität [68] und seiner gewebeähnlichen mechanischen Eigenschaften vielfach verwendet - beispielsweise in der biologischen Forschung [69], [70], [71], [72], [73], sowie in pharmazeutischen und medizinischen Produkten [74].

Als *PEG Prepolymerlösung* bezeichnet man das flüssige Gemisch von PEG-Polymeren klar definierter Kettenlänge (*PEG-Prepolymere*), Initiator und gegebenenfalls Wasser. Als *PEG-Hydrogel* bezeichnet man den flexiblen Feststoff, den man erhält, wenn man die PEG-Ketten durch eine Quervernetzungsreaktion ihrerseits zu einem Netzwerk verbindet. PEG-Prepolymer wird dargestellt durch eine radikalische Polymerisationsreaktion von Ethylenglykol. Nach Erreichen der gewünschten Kettenlänge wird die Reaktion durch Zugabe einer Säure (beispielsweise Milchsäure) gestoppt. Als Abkürzung für die verwendete Kettenlänge des Prepolymers wird in dieser Arbeit die Anzahl der Ethylenoxid-Monomere pro Prepolymer-Kette angegeben (Bsp.: PEG-400 entspricht (*EthO*)₄₀₀). Abbildung 3.6 zeigt schematisch die

Struktur der PEG-Prepolymere.

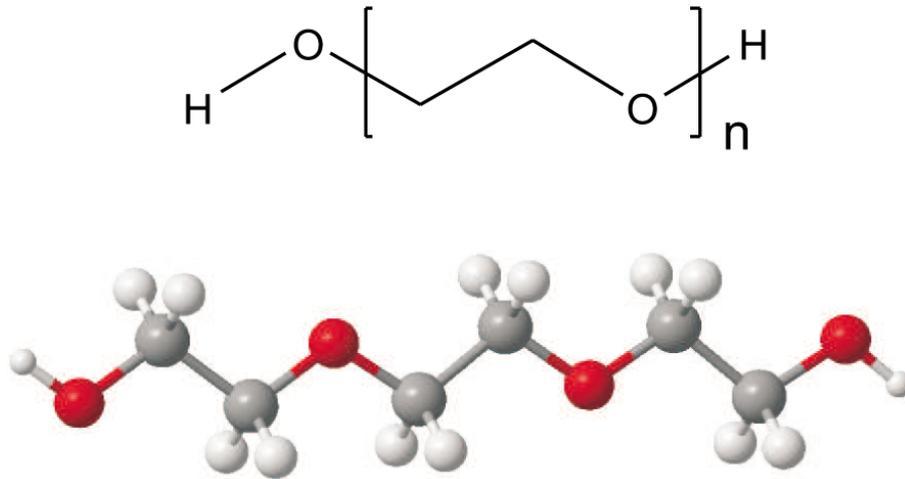


Abbildung 3.6: Struktur von PEG-Prepolymere (schematische Darstellung). Kohlenstoffatome sind grau, Sauerstoffatome rot und Wasserstoffatome weiß dargestellt.

Die Maschenweite des Netzwerks im quervernetzten Hydrogel, und damit seine mechanischen Eigenschaften, sind vor allem abhängig von der Kettenlänge der Prepolymere und der Wasserbeimischung in der Prepolymerlösung. Je länger die Ketten und je größer der Wassergehalt, desto weniger Quervernetzungen gibt es im Hydrogel. Weniger Quervernetzungen bedeuten wiederum ein niedrigeres Elastizitätsmodul.

Das PEG-Hydrogel kann nach dem Quervernetzen schwammartig weiteres Wasser aufsaugen und dadurch anschwellen. Die relative Volumenzunahme (*Schwellrate*) ist insbesondere abhängig von der Maschenweite des Netzwerks. Bei kurzen Prepolymerketten ($n \leq 1000$) kann durch eine bestimmte Wasserkonzentration in der Prepolymerlösung ein weiteres Schwellen nach dem Quervernetzen weitgehend verhindert werden. Dadurch kann man erreichen, dass zumindest kleine Hydrogelstrukturen (wie beispielsweise einzelne Pillars) sich auch in wässriger Umgebung nicht von silanisierten Glasoberflächen (siehe Kapitel 3.1.3) ablösen. Für das in dieser Arbeit meist verwendete PEG-400 beträgt das dafür optimale Verhältnis zu Wasser in der Prepolymerlösung ungefähr 2 zu 1.

In dieser Arbeit wurden PEG-Prepolymere mit je einer Acrylatgruppe an beiden Kettenenden verwendet (PEG-Diacrylat). PEG-Diacrylat hat gegenüber gewöhnlichem PEG den Vorteil, mittels radikalischer Fotopolymerisation vernetzbar zu sein. Die Verwendung eines fotosensitiven radikalischen Initiators (beispielsweise 4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)keton, Irgacure, Sigma-Aldrich) erlaubt somit die Herstellung von PEG-Hydrogelstrukturen mit Hilfe von fotolithografischen Techniken (siehe Kapitel 3.3). Um eine Kettenabbruch-Reaktion der Radikale mit Sauerstoff zu vermeiden, sollte unter Schutzgas (Stickstoff oder Argon) oder zumindest un-

ter Luftausschluss (geschlossene Reaktionskammern mit Glasboden und Glasdecke, siehe Kapitel 4.1.2) gearbeitet werden. Der Mechanismus der radikalischen Quervernetzungsreaktion von PEG-Diacrylat (im folgenden der Einfachheit halber ebenfalls als PEG bezeichnet) ist in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt.

Die Herstellung von Pillars aus PEG bietet sich neben der einfachen Herstellungsweise noch aus zwei weiteren Gründen besonders an: Erstens verhält sich PEG-Hydrogel stark proteinabweisend [68], und zweitens lässt sich sein Elastizitätsmodul innerhalb einer großen Spannweite je nach Bedarf durch Wahl der Prepolymer-Kettenlänge und Wasserbeimischung² einstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde meist eine Prepolymerlösung aus 2 ml PEG-400 (Polysciences), 1 ml PBS-Puffer (siehe Anhang) und 24 mg Irgacure-Fotoinitiator verwendet. Alle in Kapitel 5 vorgestellten Hydrogelstrukturen wurden aus dieser Mischung hergestellt³

3.4 Fotolithografie

Fotolithografie ist eine weit verbreitete Technik zur Herstellung von Mikrostrukturen für verschiedenste Anwendungen [75], [76], [77]. Dabei werden lichtempfindliche Materialien, meist sogenannte Fotolacke, durch Belichtungsmasken partiell belichtet. Je nach verwendetem Fotolack wird entweder die belichtete (*Negativlack*) oder die unbelichtete Region (*Positivlack*) ausgehärtet. Der restliche, nicht ausgehärtete Fotolack wird anschließend im Entwicklungsprozess entfernt. Fotolithografische Techniken werden meist unter Reinraumbedingungen durchgeführt, um jegliche Verunreinigung der Mikrostrukturen zu vermeiden. Im diesem Kapitel werden die notwendigen Arbeitsschritte für die Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen mittels Fotolithografie erläutert, wie sie in der vorliegenden Arbeit mehrfach verwendet werden.

3.4.1 Herstellung von Belichtungsmasken

Als erster Schritt wird dazu eine Belichtungsmaske mit der gewünschten Struktur hergestellt. Das kann entweder extern bei spezialisierten kommerziellen Anbietern in Auftrag gegeben werden (Masken Lithographie & Consulting), oder aber selbst im Reinraum durchgeführt werden. Belichtungsmasken bestehen in der Regel aus einem Glasträger der teilweise mit einer opaken Chromschicht bedeckt ist. Die Herstellung dieser Belichtungsmasken wird in diesem Kapitel beschrieben.

Im Vorfeld wird das gewünschte Maskenmuster am Computer mittels CAD-Programm (AutoCAD 2004, Autodesk) entworfen. Dann wird ein etwa 2 mm dickes, gereinigtes Glasplättchen (5 x 5 cm) mit einer opaken Schicht Chrom besputtert

²bei Proteinfunktionalisierten Pillars wird PBS-Puffer (siehe Anhang) anstelle von Wasser beige-mischt, um die Proteine während der Herstellung zu schonen

³Allerdings funktionieren die in Kapitel 4.1 vorgestellten Techniken auch mit anderen Prepolymer-Lösungen. Experimentell überprüft wurden Kettenlängen von $n = 400$, $n = 700$, $n = 10.000$ und $n = 20.000$, sowie verschiedene PBS-Beimischungen zwischen 0 % und 50 %.

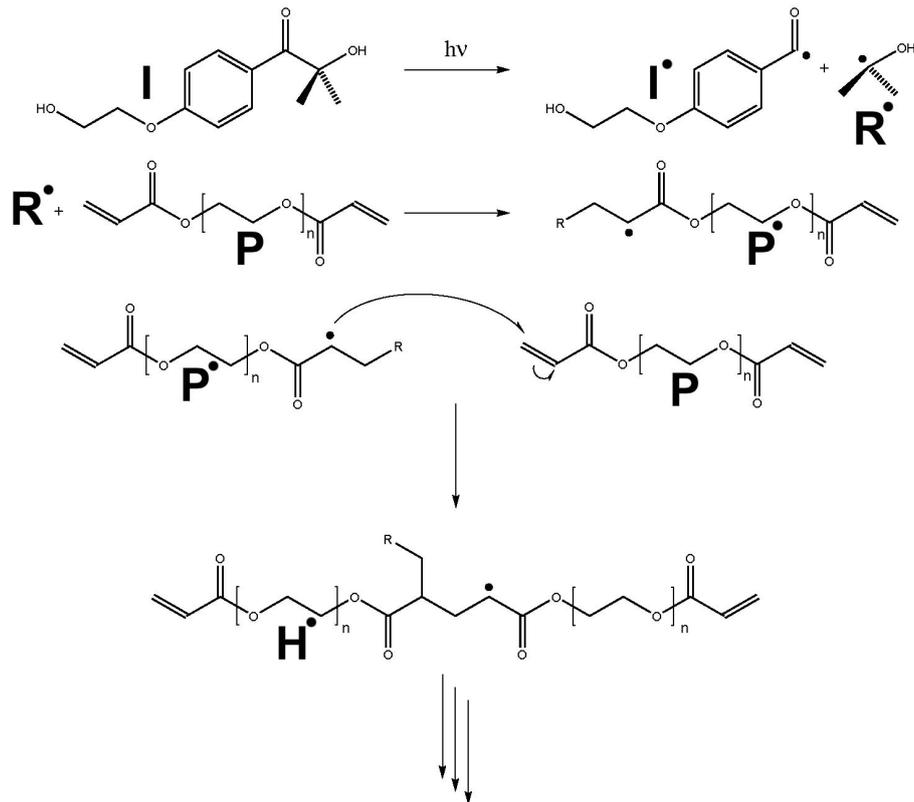


Abbildung 3.7: Fotoinduzierte radikalische Kettenwachstumsreaktion von PEG-Diacrylat (schematische Darstellung). Das durch Photonenabsorption vom Fotoinitiator (I) abgespaltete freie Radikal R^\bullet startet eine radikalische Kettenreaktion unter den PEG-Prepolymeren (P). Durch fortgesetzte radikalische Quervernetzung (H) entsteht das PEG-Hydrogel.

(120 nm, siehe Kapitel 3.2.1). Anschließend wird im Reinraum eine dünne homogene Schicht Positiv-Fotolack AZ-1505 (MicroChemicals) nach dem Spincoating-Verfahren aufgeschleudert (25 s, 3500 U/min). Nach Verdampfen des im Lack enthaltenen Lösungsmittels im Konvektionsofen (30 min) wird die CAD-Struktur mit dem HeCd-Laser eines Mask-writers (DWL66, Heidelberg Instruments) Punkt für Punkt auf den Fotolack übertragen. Dabei wird dieser an den vom Laser belichteten Stellen löslich in AZ-351 Entwicklerlösung (MicroChemicals), und im anschließenden Entwicklungsprozess (1 min, AZ-351 1:6 in Wasser verdünnt) ausgewaschen. Nun kann das dort jetzt frei liegende Chrom mit einer Chrom-Ätz-Lösung (Merck) entfernt werden (1 min, 1:3 in Wasser verdünnt). Abschließend wird der verbleibende Lack mit Aceton abgewaschen, und die Chrommaske ist einsatzbereit. Abbildung 3.8 zeigt den Vorgang schematisch, Abbildung 3.9 eine fertige Chrommaske zur Herstellung von Pillarstrukturen.

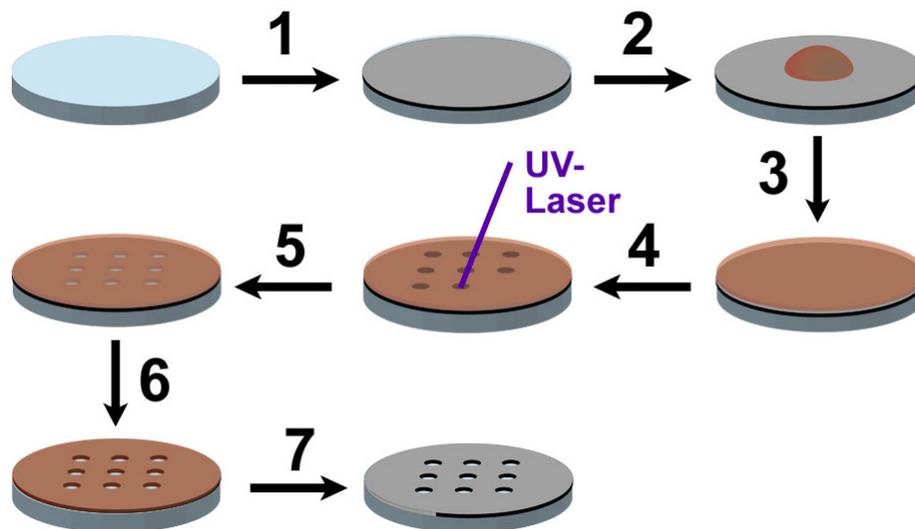


Abbildung 3.8: Chrommasken-Herstellung (schematische Darstellung). (1) Glasplättchen wird mit Chromschicht besputtert, (2) und (3): Fotolack wird aufgeschleudert, (4) Die Maskenstruktur wird auf den Fotolack übertragen, (5) der belichtete Fotolack wird im Entwicklungsprozess entfernt, (6) das freiliegende Chrom wird geätzt, und (7) der restliche Lack entfernt.

Die so hergestellten Chrommasken werden entweder direkt in der Mikroskop-Projektionslithografie zur PEG-Pillar-Herstellung verwendet (siehe Kapitel 4.1.2) - oder aber zur Herstellung von Abgussmastern für PDMS-Mikrostrukturen, beispielsweise für PDMS-Versuchskammern (siehe Kapitel 4.2.1) oder zur Herstellung von PEG-Pillars nach dem Abgussverfahren (siehe Kapitel 4.1.1).

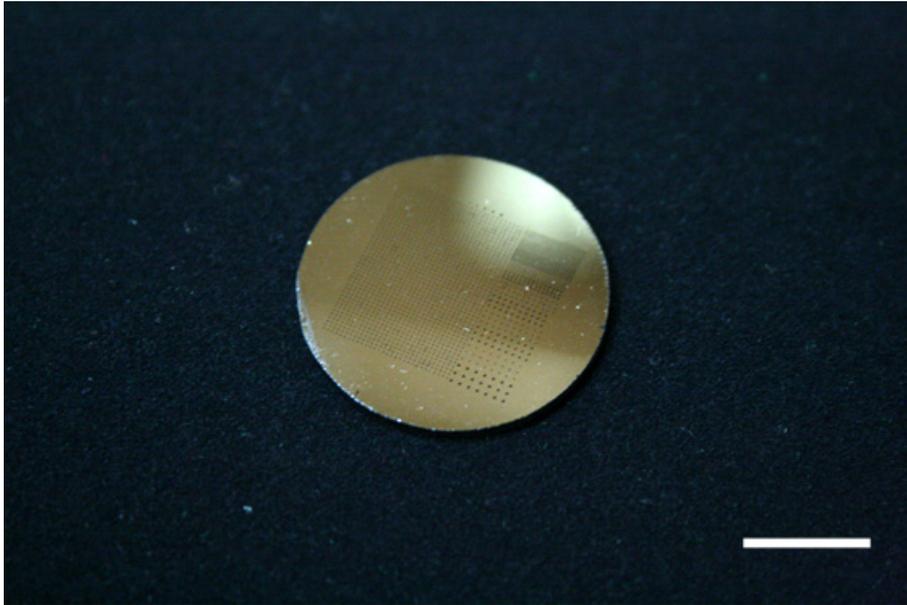


Abbildung 3.9: Eine fertige Chrommaske (fotografische Abbildung). Die gezeigte Chrommaske wurde passend für einen Mikroskopfilterhalter zurecht gesägt. Zu erkennen ist zudem das Muster aus unterschiedlich großen kreisrunden Löchern in der Chromschicht. Maßstab 1 cm.

3.4.2 Herstellung von Abgussmastern aus SU-8 Fotolack

Sollen die Belichtungsmasken zur Herstellung von Mikrostrukturen aus PDMS verwendet werden, so wird im nächsten Schritt aus SU-8 Fotolack (MicroChemicals) ein Abgussmaster für das PDMS hergestellt. Dieser Arbeitsschritt wird ebenfalls im Reinraum durchgeführt.

SU-8 Fotolack besteht aus einem aromatischen Rückgrat und acht Epoxygruppen pro Molekül (siehe Abbildung 3.10). Aufgrund seiner außergewöhnlichen mechanischen Stabilität wird er standardmäßig in zahlreichen Anwendungen wie Mikroelektronik und Softlithografie verwendet [79]. Er wird mittels Spincoating auf einem trockenen und staubfreien Siliziumwafer (Silicon Materials) aufgetragen. Der Lösungsanteil im Lack und die Spindgeschwindigkeit bestimmen die Dicke der aufgetragenen Schicht. Anschließend wird das im Lack enthaltene Lösungsmittel durch Erhitzen des Wafers auf einer Heizplatte verdampft (*soft bake*). Dann wird der Wafer in einem Mask-Aligner (MJB-3, Suss) montiert und für wenige Sekunden mit einer 350W Quecksilberdampfampe durch eine auf den Fotolack aufgepresste Chrommaske belichtet. Das UV-Licht spaltet dabei an den belichteten Stellen Protonen von dem als Fotoinitiator verwendeten Triaryl-Sulfoniumsalz ab [80]. Nach dem Belichten wird der Wafer nochmals auf einer Heizplatte erhitzt (*post exposure bake*), wobei die abgespalteten Protonen die kationische Polymerisationsreaktion der Epoxygruppen katalysieren. Somit werden die belichteten Stellen ausgehärtet, SU-8

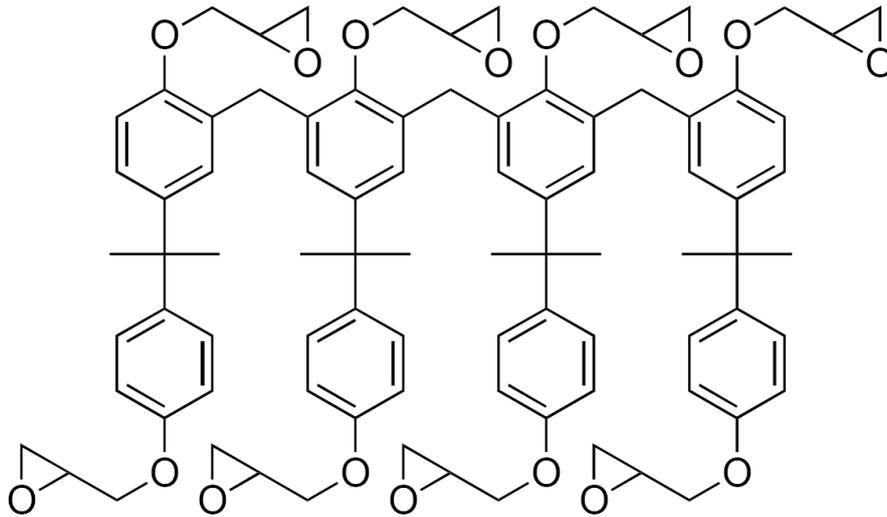


Abbildung 3.10: Struktur von SU-8 Fotolack. Das aromatische Rückrat trägt acht Expolygruppen. Diese sorgen bei UV-Bestrahlung für eine dichte Quervernetzung des Fotolacks. Übernommen aus [78].

ist demnach ein Negativ-Fotolack. Nun wird der Wafer in SU-8-Entwicklerlösung (mr-Dev600, Microresist) entwickelt, wobei der an den unbelichteten Stellen nicht polymerisierte Fotolack ausgewaschen wird. Die so erzeugten quasidreidimensionalen Polymerstrukturen sind chemisch und mechanisch sehr stabil und werden in der Mikrostrukturierungstechnik häufig als Abgussmaster verwendet. Um das wiederholte gießen und ablösen von PDMS zu erleichtern und die Lebensdauer des Abgussmasters zu erhöhen wird auf den Wafer zur Passivierung abschließend noch 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilane (ABCR) aufgedampft (siehe Kapitel 3.1.3).

3.4.3 Herstellung von PDMS-Abgüssen (*Replika Moulding*)

Poly-Dimethylsiloxan (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) ist ein elastisches, transparentes, ungiftiges und hydrophobes Polymer das häufig in der chemischen und biologischen Forschung eingesetzt wird. Bekannte Beispiele sind Zellsubstrate (siehe Kapitel 2.1.1), Pillarfelder (siehe Kapitel 2.1.2) und Flusszellen (siehe Kapitel 4.2.1 und [81], [82]). Das unpolymersierte PDMS enthält als Basis ein Vinyl-terminiertes, 250 Einheiten langes Dimethylsiloxan-Prepolymer mit einigen Gewichtsprozenten eines Platin-Katalysators - und ein kurzes Hydrosilan als Quervernetzer (*Crosslinker*). Basis und Crosslinker werden im Verhältnis 10:1 gemischt und dann im Exsikkator entgast. Anschließend gibt man das Gemisch auf ein Abgussmaster (siehe Kapitel 3.4.2) und drückt je nach Anwendung gegebenenfalls noch ein Deckglas darauf (beispielsweise für Flusszellen oder Versuchskammern, siehe Kapitel 4.2.1). Bei 65°C

wird das Prepolymer dann im Ofen über Nacht in in einem katalytischen Zyklus mit dem Hydrosilan quervernetzt. Das so erzeugte Polymer kann vorsichtig vom Abgussmaster abgelöst werden und besitzt ein Elastizitätsmodul in der Größenordnung 1 MPa. Durch Variation der Crosslinkerkonzentration und der Zeit und Temperatur im Ofen kann das Elastizitätsmodul im Bereich 50 kPa bis 4 MPa variiert werden [83]. Abbildung 3.11 zeigt den Produktionsprozess noch einmal schematisch.

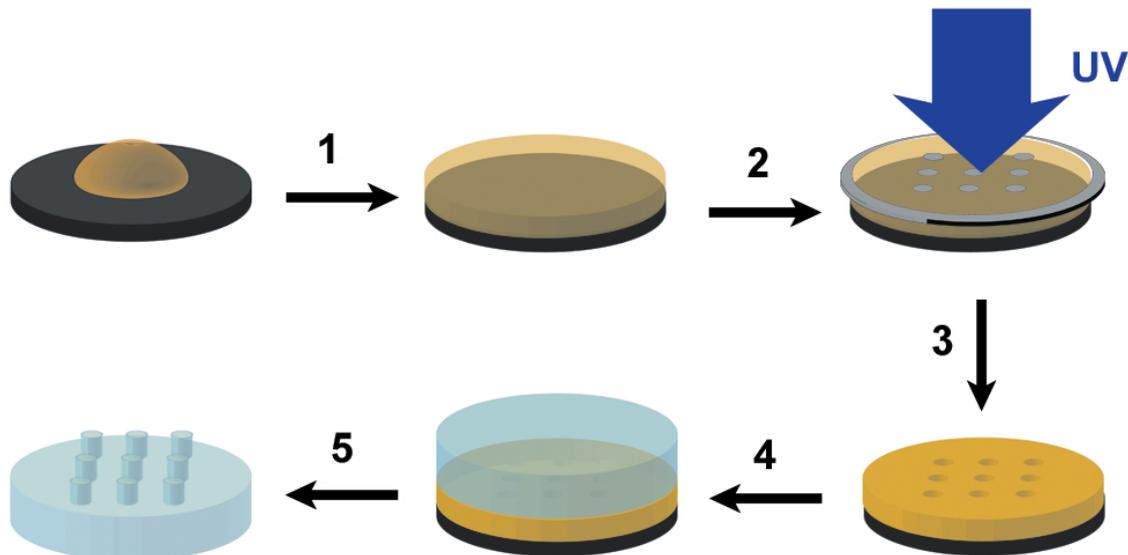


Abbildung 3.11: Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen mittels Replika Moulding (schematische Darstellung). (1) Der Fotolack wird aufgeschleudert, (2) mit UV-Licht durch eine Maske belichtet, (3) der unbelichtete Fotolack wird im Entwicklungsprozess entfernt, (4) Das Abgussmaster wird silanisiert und mit PDMS-Prepolymer abgegossen, (5) das thermisch quervernetzte PDMS wird vom Abgussmaster gelöst.

3.4.4 Mikroskop-Projektionslithografie

Eine einfache aber elegante Variante der Fotolithografie stellt die sogenannte *Mikroskop-Projektionslithografie* (MPL) dar. Sie erlaubt es, nur mit Hilfe einer Belichtungs-*maske* und eines Standardfluoreszenzmikroskops, schnell und direkt Polymerstrukturen aus fotosensitiven Materialien herzustellen [16]. Teure Reinraumtechnik und der zeitaufwändige Umweg über ein SU-8 Abgussmaster werden nicht benötigt. Mit MPL können beispielsweise Mikrostrukturen aus PEG hergestellt werden [17]. Für biologische Anwendungen ist dabei besonders die Möglichkeit interessant, funktionalisierte Mikrobeads während des Polymerisationsprozesses in das PEG-Polymer einzubetten [19], eine Technik, die mit herkömmlichen Abgussverfahren so nicht möglich ist [60]. In dieser Arbeit wurde MPL dazu verwendet, beadfunktionalisierte Pillars aus PEG herzustellen. Im folgenden Abschnitt wird das Funktionsprinzip der MPL erklärt.

MPL basiert wie andere fotolithografische Verfahren auf der Aushärtung eines fotosensitiven Materials durch belichten. Die Probe wird dazu entweder abgerastert und punktwise, oder aber durch eine Belichtungsmaske mit der gewünschten Struktur homogen belichtet. Im Gegensatz zur herkömmlichen Mask-Aligner-Technik wird die Maske jedoch nicht auf die Probe aufgepresst, sondern in der Sehfeldblendenposition in den Strahlengang eines Mikroskops eingeschoben. Dadurch wird die Struktur der Maske verkleinert auf die Fokusebene des Objektivs, also auf die Probe, abgebildet. In Abbildung 3.12 ist das Funktionsprinzip der MPL schematisch dargestellt.

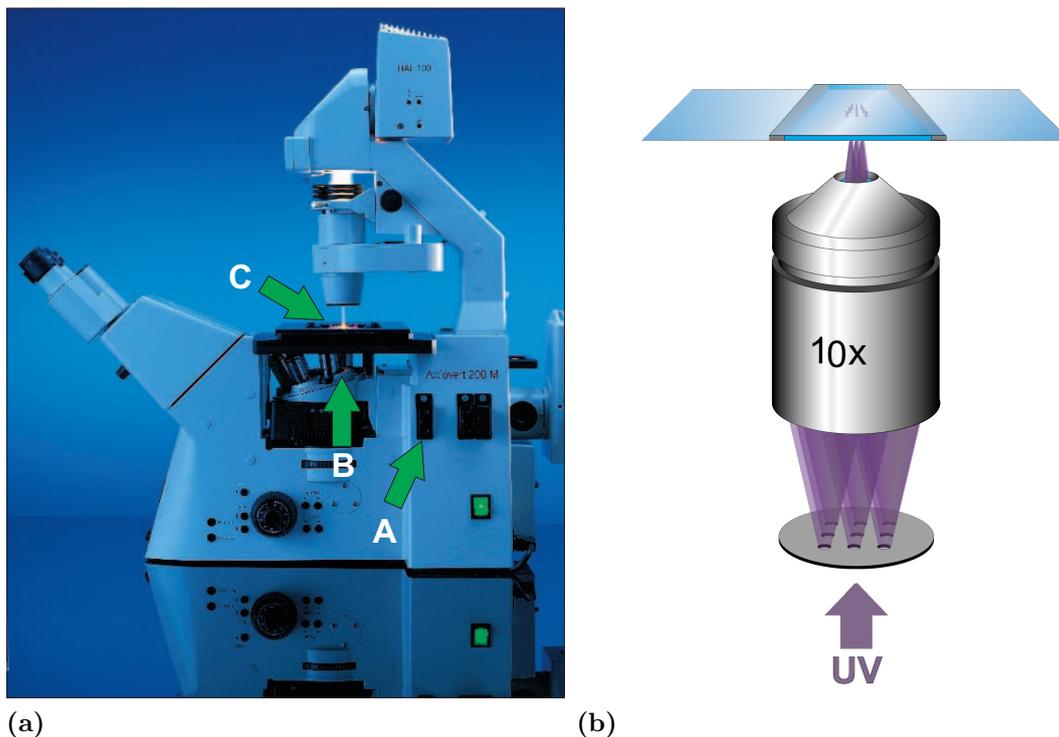


Abbildung 3.12: Funktionsprinzip der Mikroskop-Projektionslithografie (schematische Darstellung). Abbildung (a) zeigt die Positionen der Belichtungsmaske (A), des Objektivs (B) und der Probe (C) in einem wie in dieser Arbeit verwendeten Axiovert 200M (Zeiss). Bild (b) zeigt schematisch die Abbildung der Belichtungsmaskestruktur auf die Probe.

Für die Polymerisation von PEG wird der Fotoinitiator Irgacure (Sigma-Aldrich) verwendet, der mit Licht der Wellenlänge $\lambda \approx 360 \text{ nm}$ aktiviert wird (siehe Kapitel 3.3). Zur Belichtung wurden eine sorgfältig justierte 100 W-Fluoreszenzlampe (HBO 100, Zeiss) oder eine Metallhalidlampe (X-Cite 120 PC, EXFO) verwendet. Letztere erzielte eine homogenere Ausleuchtung der Probe und dadurch geringere Abweichungen der PEG-Struktur von der vorgegebenen Maskenstruktur (vergleiche Kapitel 5.1.2). Wichtig ist weiterhin die Verwendung eines Fluoreszenzobjektivs (bei-

spielsweise Zeiss Neofluar) sowie eines UV-reflektierenden Spiegels im Filterwürfel⁴. Die nach Kapitel 3.4.1 hergestellten Belichtungsmasken werden kreisrund mit einem Durchmesser von 25 mm zugeschnitten. Dann können sie in einen Filterhalter eingesetzt und somit in die Sehfeldblendenposition des Mikroskops eingeschoben werden.

Die Belichtungszeit wird durch einen Shutter vor der UV-Lampe (*Lampenshutter*) elektronisch kontrolliert. Nach dem Belichten wird das nicht quervernetzte PEG an den unbelichteten Stellen mit Wasser oder PBS-Puffer abgespült. Übrig bleiben quasidreidimensionale Strukturen nach dem Muster der Belichtungsmaske. Bei perfekter Köhlerbeleuchtung mit geschlossener Aperturblende, das heißt bei exakt parallelen Lichtstrahlen zwischen Objektivlinse und Probe, können auf diese Weise im Prinzip beliebig hohe Strukturen mit lotrechten Wänden erzeugt werden. In der Praxis werden die möglichen Strukturen allerdings durch das verwendete Objektiv begrenzt (siehe Kapitel 5.1.2).

3.5 Methoden der Zell- und Molekularbiologie

Für die Beispielanwendung der Kraftmessung zwischen fusionierenden Mitosespindeln werden eine Reihe von molekular- und zellbiologischen Methoden benötigt. Die wichtigsten werden im folgenden Kapitel kurz erläutert. Für eine umfassende Darstellung wird auf weiterführende Literatur verwiesen, insbesondere auf [1], wo sich eine anschauliche und ausführliche Erläuterung der meisten Techniken findet. Die Herstellung von Froschei-Extrakt (siehe Kapitel 3.5.3) und von DNA-bedeckten Mikrobeads (siehe Kapitel 3.5.4) sind sehr zeitaufwändige Vorgänge mit zahlreichen experimentellen Zwischenschritten, und haben im vorliegenden Projekt viel Zeit in Anspruch genommen. Da aber nach erprobten und publizierten Protokollen verfahren wurde, werden hier in den Kapiteln 3.5.3 und 3.5.4 nur die wichtigsten Arbeitsschritte schematisch dargestellt. Eine ausführliche Erläuterung der Vorgehensweisen inklusive Versuchsprotokollen findet sich in [84].

3.5.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzmikroskopie ist ein Standardverfahren für die Beobachtung biologischer Vorgänge auf molekularer Ebene. Dazu werden fluoreszierende Moleküle an bestimmte Moleküle der Probe angebunden, beispielsweise über spezifisch bindende Antikörper. Durch Fluoreszenzanregung können im Mikroskop die Position und gegebenenfalls Bewegung der markierten Moleküle beobachtet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet:

1. **Rhodamin** bezeichnet eine Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen mit ähnlichem chemischen Aufbau. In dieser Arbeit wird ein kovalent an Tubulin gebundenes

⁴Ein DAPI-Filterwürfel (Zeiss) erzielte dabei deutlich bessere Ergebnisse als ein eigens angeschaffter UV-Spiegel (ebenfalls Zeiss).

Rhodamin mit Absorptionsmaximum bei $\lambda = 535$ nm und Emissionsmaximum bei $\lambda = 585$ nm verwendet (Cytoskeleton). Die so markierten Tubulinmoleküle werden dem *Xenopus*-Extrakt (siehe Kapitel 3.5.3) beigemischt und somit dort mit in die Mikrotubuli eingebaut. Mikrotubuli erscheinen demnach rot auf den Fluoreszenzaufnahmen. Werden nur wenige markierte Tubulinmoleküle dem Extrakt beigemischt, so lässt sich sogar die Bewegung einzelner Tubulinmoleküle innerhalb der Mitosespindel verfolgen [85].

2. **DAPI** (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein weit verbreiteter Fluoreszenzfarbstoff für die spezifische Anfärbung von DNA. Der Farbstoff interkaliert zwischen den DNA-Strängen, und emittiert dann (und erst dann) unter UV-Beleuchtung (Absorptionsmaximum bei $\lambda = 358$ nm) Fluoreszenzlicht mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 461$ nm. DAPI wird auf den Fluoreszenzaufnahmen demnach blau dargestellt.

3.5.2 Biofunktionalisierung

Die gezielte Anbindung von Makromolekülen wie beispielsweise Proteine oder DNA-Stränge an Oberflächen lässt sich mit speziellen Linkermolekülen bewerkstelligen. In dieser Arbeit wird das gebräuchliche Biotin-Streptavidin Linkersystem verwendet: Das von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produzierte Streptavidin-Protein bindet mit sehr hoher Affinität (Assoziationskonstante $K_A \approx 10^{15} M^{-1}$) [86] an bis zu vier Moleküle des Vitamins Biotin (siehe Abbildung 3.13). Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen und hoch spezifisch. Sowohl Biotin als auch Streptavidin lassen sich gut an funktionale Gruppen (beispielsweise Carboxylgruppen oder Aminogruppen) anderer Moleküle kovalent anbinden (*Biotinylierung* beziehungsweise *Streptavidin-Funktionalisierung*). In dieser Arbeit werden biotinylierte Nukleotide in DNA-Stränge eingebaut und anschließend an Streptavidin-funktionalisierte Mikrobeads angebinden (siehe Kapitel 3.5.4).

3.5.3 *Xenopus Laevis* Extrakt

Der Klauenfrosch *Xenopus Laevis* dient als Modellorganismus für zahlreiche Experimente der Entwicklungs- und Molekularbiologie. Insbesondere für in-vitro Untersuchungen an Mitosespindeln wird häufig auf Extrakt aus den Oozyten des Frosches zurückgegriffen [87], [88]. Dieses Extrakt, das weitgehend dem Zytosol der Zellen entspricht, kann wie in Abbildung 3.14 gezeigt durch Zentrifugation aus Froscheiern gewonnen werden. Die Herstellung erfolgt nach dem Protokoll in [89]. Dem Extrakt wird bei der Herstellung Cytochalasin zugegeben - ein Protein, dass die zellulären Aktinfilamente depolymerisiert und dadurch ein homogenes Extrakt ermöglicht [90]. Die Bildung von Mitosespindeln wird durch die Depolymerisation des Aktins hingegen nicht wesentlich beeinflusst [88].

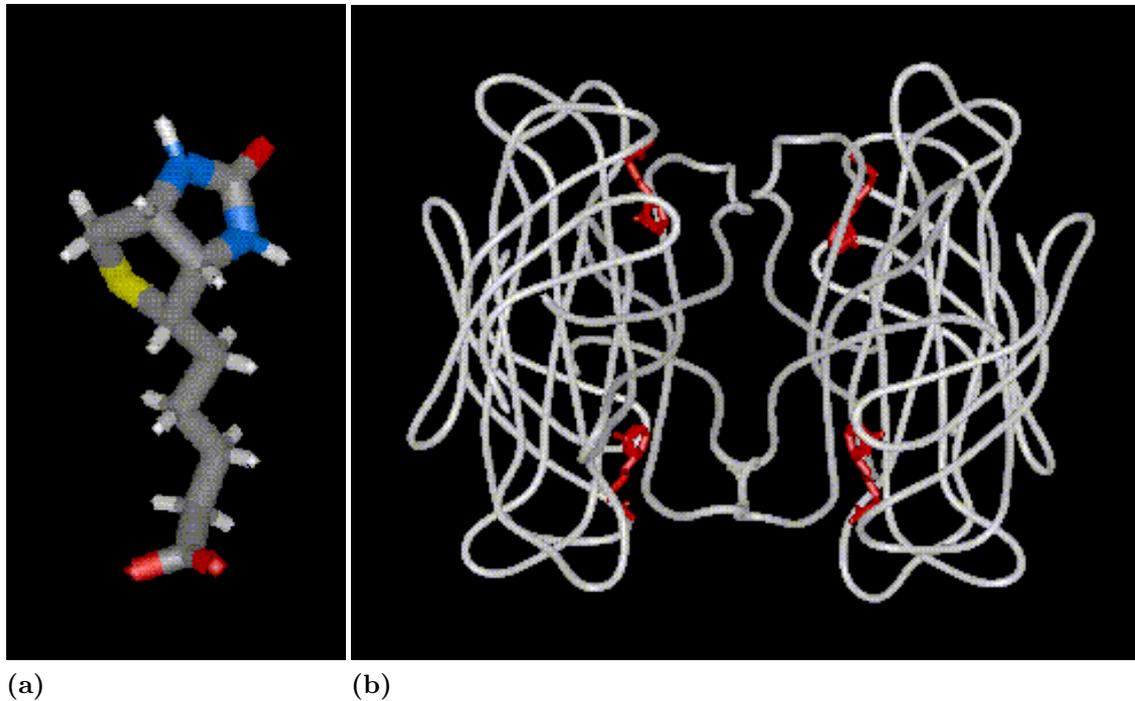


Abbildung 3.13: Biotin und Streptavidin (a) Struktur von Biotin. (b) Streptavidin-Biotin-Tetramer-Komplex. Ein Streptavidin-Tetramer (grau) bindet hoch spezifisch an vier der wesentlich kleineren Biotinmoleküle (rot).



Abbildung 3.14: Herstellung von Froschei-Extrakt (schematische Darstellung). Die Eier von *Xenopus*-Fröschen werden aufgereinigt und anschließend zentrifugiert. Die mittlere der drei Phasen entspricht dem Extrakt.

3.5.4 Herstellung von DNA-bedeckten Mikrobeads

Für die Assemblierung von Mitosespindeln in Froschei-Extrakt wird chromatinisierte DNA benötigt. Allerdings muss es sich dabei nicht um Original-DNA des Frosches handeln. In dieser Arbeit wird wegen der einfachen Amplifizierbarkeit deshalb nach [88] die DNA eines Plasmids verwendet (YEp24, New England Biolabs). Das Plasmid wird mit zellbiologischen Standardtechniken in *E.coli* Bakterien amplifiziert und zur gezielten Manipulierbarkeit auf der Oberfläche von paramagnetischen, mit Streptavidin bedeckten Mikrobeads (Dynabeads M-280, Invitrogen) aufgebracht. Die Herstellung dieser sogenannten *DNA-Beads* basiert im wesentlichen auf acht Arbeitsschritten:

1. Amplifizierung des Plasmids in *E.coli*
2. Extrahierung und Reinigung des Plasmids
3. Zweifache Verdauung des Plasmids durch die Restriktionsendonukleasen SmaI und BamHI (beide New England Biolabs). Die durch SmaI entstehende Schnittstelle ist ohne Überhang, BamHI erzeugt einen vier Nukleotide langen einsträngigen Überhang (siehe Abbildung 3.15).
4. Anbindung von komplementären biotinylierten Desoxynukleosid-Triphosphaten (bio-dNTPs) an die freien Basen des einsträngigen Überhangs. Dazu wird als Ligaseenzym das sogenannte *Klenow exo⁻ Fragment* verwendet (Fermentas). Als Klenow Fragment bezeichnet man die große Untereinheit der DNA-Polymerase von *E.coli*. Der Zusatz *exo⁻* bedeutet, dass die 3'→5' Exonukleaseaktivität durch eine Genmutation ausgeschaltet wurde. Dadurch baut das Klenow Fragment nur die passenden dNTPs ein, verdaut aber keine überstehenden einsträngigen Enden [91].
5. Kopplung der DNA-Stränge über die eingebauten Biotine an die Streptavidin-bedeckten Mikrobeads.
6. Nach der Anbindung der einen Seite des DNA-Stranges an die Beads wird das andere Ende mit der Restriktionsendonuklease NcoI (New England Biolabs) verdaut. Es entsteht wieder ein einsträngiger Überstand.
7. Der einsträngige Überstand wird analog zu 4.) biotinyliert. Durch diese Biotine können die DNA-Beads später wiederum an weitere Streptavidinmoleküle angebunden werden.
8. Chromatinisierung der an die Beads angebundenen DNA durch Inkubation in interphasischem Extrakt (siehe [84]).

Die chromatinisierten Beads werden dann in Froscheiextrakt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Abbildung 3.15 zeigt den Herstellungsprozess noch einmal schematisch. Ein Protokoll des recht aufwändigen Vorgangs findet sich in [13] beziehungsweise [84].

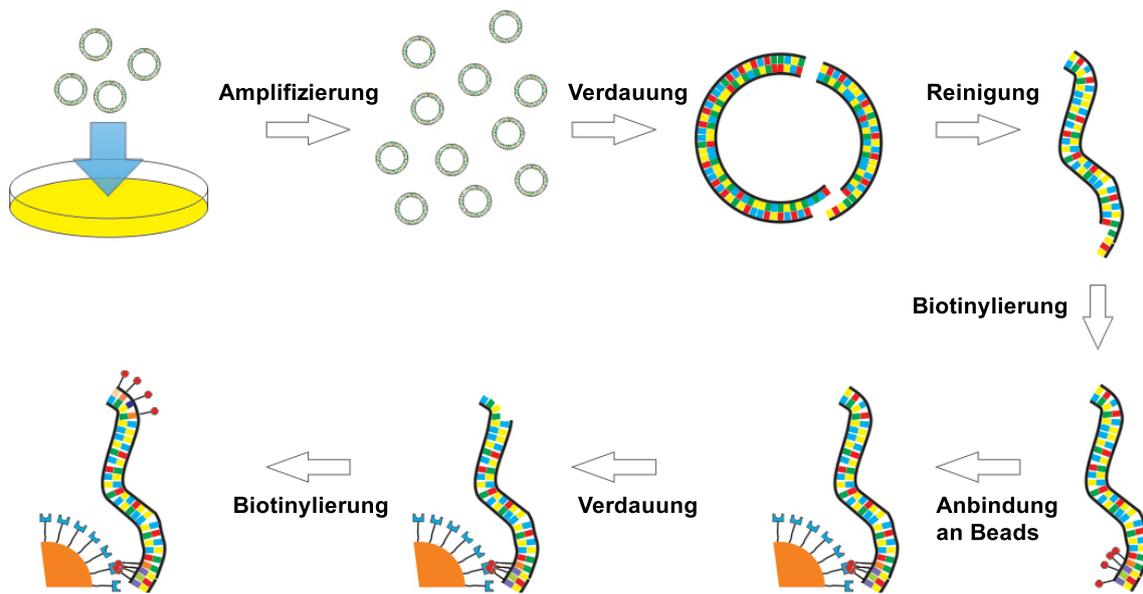


Abbildung 3.15: Herstellung von DNA-Beads (schematische Darstellung). Eine Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte findet sich im Text.

3.5.5 In-vitro-Assemblierung von Mitosespindeln

Mitotisches Extrakt kann durch Zugabe von chromatinisierter DNA zur spontanen Bildung von Mitosespindeln um die DNA herum angeregt werden. Dazu werden entweder Spermienköpfe oder aber künstliche Chromosomen in Form von DNA-Bead-Klumpen dem Extrakt zugegeben (siehe Abbildung 3.16). Spermienköpfe enthalten neben der chromatinisierten DNA auch Zentrosomen und bilden deshalb tendenziell mehr und stabilere bipolare Mitosespindeln aus.

Spermienköpfe werden deshalb dazu verwendet, das nach Kapitel 3.5.3 hergestellte Froschei-Extrakt auf seine Fähigkeit zur Spindelbildung zu testen. Dazu wird fluoreszenzmarkiertes Extrakt (vergleiche Kapitel 3.5.1) zusammen mit den Spermienköpfen 30 Minuten bei 20° C inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop beobachtet (vergleiche Abbildung 3.17). Das Extrakt ist nur dann von guter Qualität und kann für weitere Versuche verwendet werden, wenn sich

1. bipolare Spindeln um fast alle Spermienköpfe bilden und
2. es nur sehr wenig *freie Nukleation* gibt, das heißt praktisch alle Mikrotubuliansammlungen an Spermien-DNA lokalisiert sind.

Zeigt das Extrakt gute Spindelbildung, dann können Experimente mit künstlichen Chromosomen aus DNA-Beads durchgeführt werden. Mikrokontaktgestempelte Muster aus DNA-Beads auf einer Glasoberfläche ([92]) sind beispielsweise eine elegante Methode um den Einfluss der Chromosomengeometrie auf die Spindelbildung zu untersuchen [13]. Der Zwischenraum zwischen den DNA-Strukturen wird dabei mit

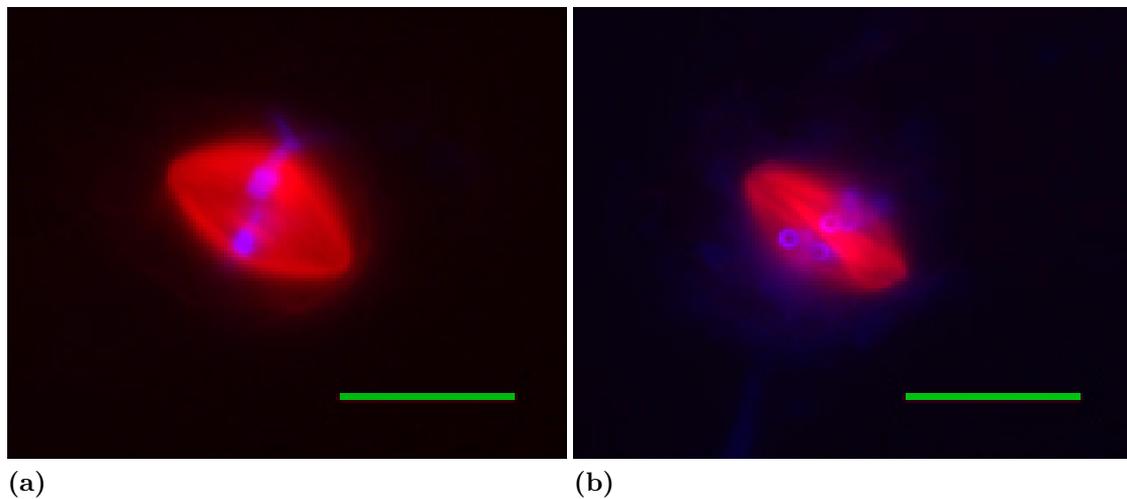


Abbildung 3.16: Bipolare Mitosespindeln in Forscheiextrakt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). (a) Spindelbildung an Spermienköpfen. (b) Spindelbildung an DNA-Bead-Clustern. Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab 25 μm . (Mit freundlicher Genehmigung von Francois Nédélec.)

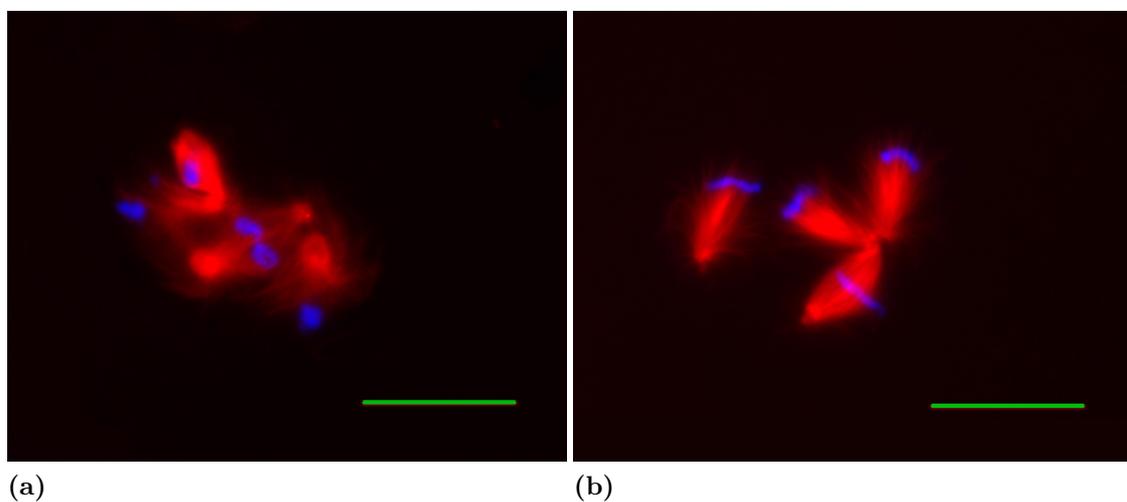


Abbildung 3.17: Extrakttest mit Spermienköpfen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). (a) Ein nicht verwendbares Extrakt. Statt bipolaren Spindeln bilden sich unförmige Mikrotubulistrukturen. (b) Ein verwendbares Extrakt: Es bilden sich teils monopolare, teils bipolare Spindeln an den Spermienköpfen. Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab 50 μm . (Mit freundlicher Genehmigung von Céline Pugieux.)

BSA passiviert um unspezifische Adhäsion von Proteinen an der Glasoberfläche zu vermeiden.

Inkubiert man diese Oberflächen dann mit mitotischem Extrakt, so bilden sich je nach DNA-Geometrie unförmige Mikrotubuliansammlung beziehungsweise mono-, bi- oder multipolaren Spindeln. Abbildung 3.18. zeigt einige typische Ergebnisse solcher Experimente.

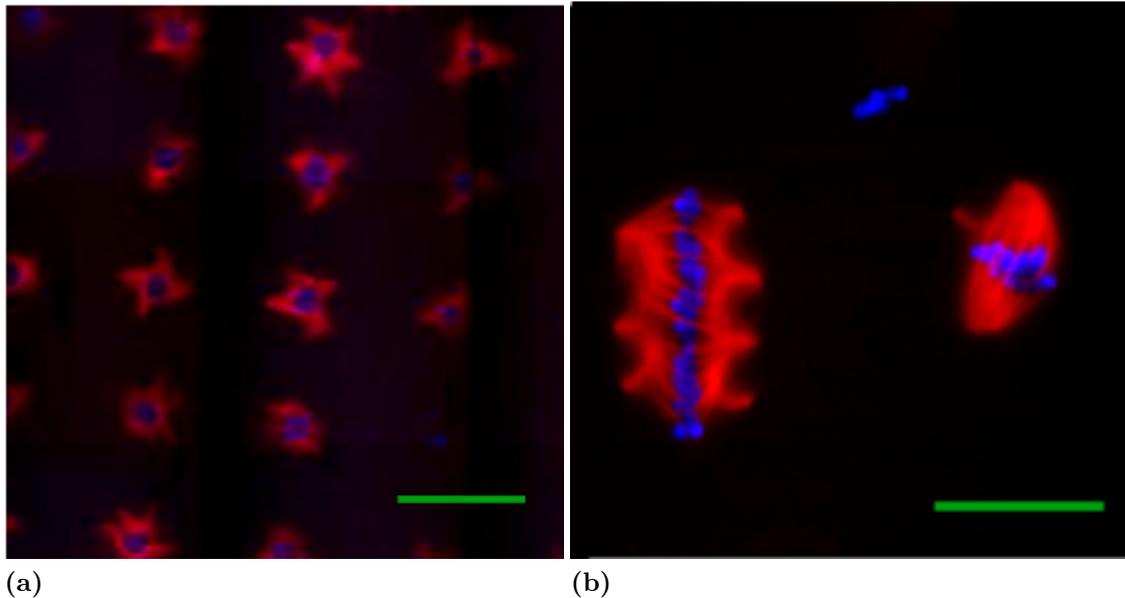


Abbildung 3.18: Assemblierung von Mikrotubuli an mikrokontaktgestempelten DNA-Strukturen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Je nach Anordnung der angebotenen DNA bilden sich charakteristische Mikrotubulimuster aus. (a) Keine bipolaren Spindeln (mit freundlicher Genehmigung von Francois Nédélec). (b) Rechts zu sehen ist eine bipolare Spindel, wie sie sich nur bei ganz bestimmten DNA-Geometrien bildet (übernommen aus [13]). Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab $50 \mu\text{m}$.

Durch diese Versuche wurde beispielsweise herausgefunden, dass die Bildung bipolarer Mitosespindeln eine bestimmte räumliche Ausdehnung der DNA benötigt - und nicht etwa nur eine bestimmte Menge an DNA. Und es zeigte sich, dass sich bipolare Spindeln bei kreisrunden DNA-Strukturen nur bei einem Strukturdurchmesser zwischen $12 \mu\text{m}$ und $17 \mu\text{m}$ bilden [13]. Bei Abständen der DNA-Strukturmitteln von ca. $35 \mu\text{m}$ richten sich die assemblierten Spindeln außerdem gegeneinander aus und fusionieren (siehe Abbildung 3.19.).

Solche fusionierenden Spindeln üben Kräfte aufeinander aus, da ihre molekularen Motoren an den Mikrotubuli der jeweils anderen Spindel ziehen. Eine Messung der Kräfte würde wertvolle Informationen über den Aufbau der Spindeln liefern. Diese Kräfte sollten vergleichbar sein mit jenen, die die Spindeln in der Anaphase auf die

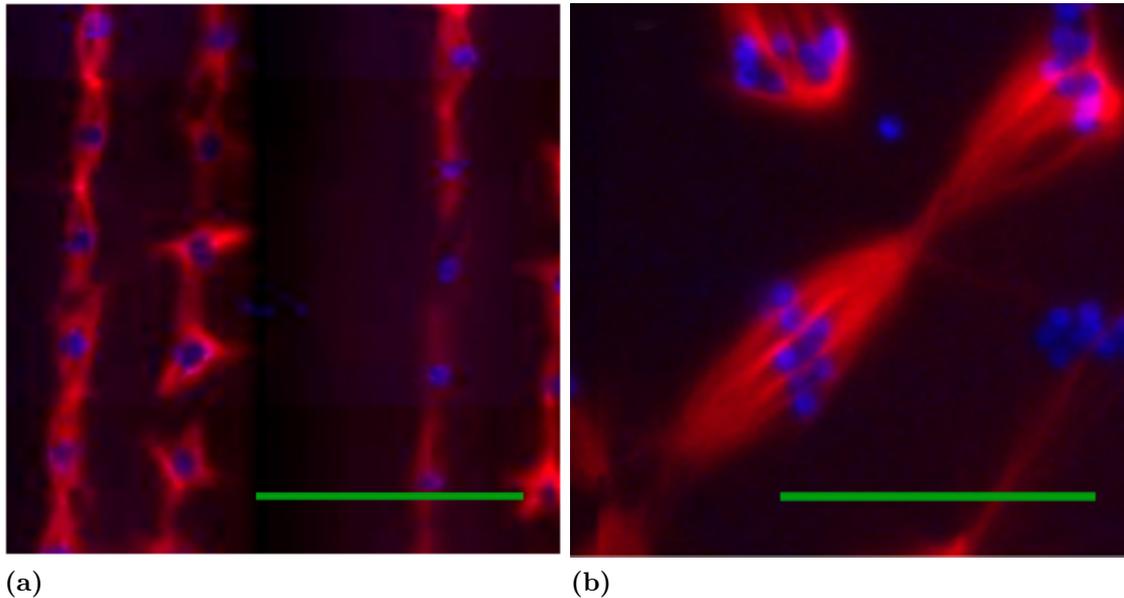


Abbildung 3.19: Bildung fusionierender bipolarer Spindeln an mikrokontaktgestempelten DNA-Strukturen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). (a) Mit freundlicher Genehmigung von Francois Nédélec. Maßstab $100\ \mu\text{m}$. (b) Übernommen aus [13]. Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab $50\ \mu\text{m}$.

Chromosomen ausüben. Diese wurden durch Nicklas zu etwa $0,7\ \text{nN}$ pro Chromosom ermittelt ([14]), was bei 18 Chromosomenpaaren eine Kraft in der Größenordnung $10\ \text{nN}$ erwarten lässt. Werden die DNA-Beads auf den Köpfen von ausreichend flexiblen Polymerpillars anstatt auf einer Glasoberfläche aufgebracht, sollten sich die Kräfte durch die Pillarverbiegungen bestimmen lassen. Auf diese Methode wird in Kapitel 4 ausführlich eingegangen.

Teil III

Ergebnisse und Diskussion

Experimenteller Teil

Nachdem in den Kapiteln 2 und 3 die theoretischen Grundlagen und die verwendeten Standardtechniken erläutert wurden, befasst sich dieses Kapitel mit den im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Techniken und Versuchsaufbauten. In Kapitel 4.1 wird die Herstellung, Funktionalisierung und Kalibrierung von PEG-Pillars ausführlich erläutert, in Kapitel 4.2 werden Versuchsaufbau und -Durchführung für die Beispielanwendung der Kraftmessung an Mitosespindeln vorgestellt. Die mit diesen Techniken erzielten Ergebnisse werden in Kapitel 5 diskutiert.

4.1 Die Entwicklung eines Kraftsensors auf der Basis von PEG-Pillars

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Pillars, die aus dem Hydrogel PEG bestehen. Das Elastizitätsmodul von PEG-Hydrogel ist durch die Wahl der Prepolymerkettenlänge und des Wassergehalts in der Prepolymerlösung in einem weiten Bereich einstellbar (siehe Kapitel 3.3). Dadurch haben diese Pillars gegenüber herkömmlichen Pillars aus PDMS oder Silizium den großen Vorteil, dass ihre Federkonstante ohne Änderung der Pillargeometrie um bis zu vier Größenordnungen variiert werden kann. Bei Bedarf lassen sich dadurch extrem flexible Pillars für die Detektion von Kräften im Sub-Nanonewtonbereich herstellen.

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Herstellung von PEG-Pillars entwickelt: Eine Variation des klassischen Replika Moulding (*RM*, vergleiche Kapitel 3.4.2), sowie ein auf der MPL basierendes Verfahren (vergleiche Kapitel 3.4.3). Die Herstellung mittels *RM* ist eine erprobte Technologie zur Herstellung sehr gleichmäßiger PDMS-Pillarfelder. Mit der hier verwendeten Variation konnten ebenfalls sehr gleichmäßige PEG-Pillarfelder hergestellt werden. Allerdings bringt diese Technik einige schwerwiegende Beschränkungen mit sich, die in Kapitel 4.1.1 dargelegt werden. Aus diesem Grund wurde das auf der MPL basierende Verfahren entwickelt, das in Kapitel 4.1.2 vorgestellt wird.

4.1.1 PEG-Pillar-Herstellung per Replika Moulding

Es ist ein naheliegendes Vorgehen, Pillars aus PEG auf die gleiche Art herzustellen wie Pillars aus PDMS. Das ist prinzipiell auch möglich - allerdings gibt es neben der Sauerstoffempfindlichkeit der PEG-Prepolymerlösung noch weitere wesentliche Unterschiede in der Materialeigenschaften von PDMS und PEG, die eine Anpassung des Verfahrens erfordern. PDMS wird thermisch quervernetzt, das heißt die gegossenen Strukturen können im Ofen ausgehärtet werden. PEG wird hingegen meist durch UV-Bestrahlung quervernetzt. Um eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten ist deshalb ein UV-durchlässiges Abgussmaster sinnvoll. Desweiteren dehnt sich quervernetztes PEG-Hydrogel bei Kontakt mit Wasser teils stark aus. Das kann einerseits das Ablösen gegossener PEG-Strukturen vom Abgussmaster erleichtern - andererseits verursacht es aber auch eine starke mechanische Belastung desselben. Deshalb sollten die Abgussmaster aus einem einigermaßen flexiblen Material bestehen. Aber auch dann bleiben die Abgussmaster für PEG-Pillars Verschleißmaterial und sollten mit möglichst wenig Aufwand herstellbar sein.

Ein weiterer Zwischenschritt im Replika-Moulding-Verfahren löst diese Probleme: Anstelle eines negativen, das heißt zur gewünschten Endstruktur komplementären SU-8-Abgussmasters wird ein positives hergestellt. Von diesem werden nun Abgüsse aus PDMS hergestellt, die ihrerseits wiederum als Abgussmaster für die PEG-Abgüsse dienen. Das PDMS-Master erfüllt die oben genannten Anforderungen: Es ist transparent für UV-Licht, mechanisch flexibel und leicht herstellbar - anders als bei der Herstellung von SU-8-Mastern wird keine Reinraumtechniken benötigt, sondern nur die PDMS-Prepolymerlösung, ein Exsikkator und ein Konvektionsofen. Das PDMS-Master wird (analog zu den SU-8-Mastern, siehe Kapitel 3.4.2) mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorsilan funktionalisiert, um das Herauslösen des PEG-Pillarfeldes aus dem Master zu erleichtern. Abbildung 4.1 zeigt den Herstellungsprozess schematisch.

Für die meisten denkbaren Anwendungen müssen die PEG-Pillars in eine Versuchskammer eingebaut werden (vergleiche Kapitel 4.2). Deshalb wäre es vorteilhaft, wenn die Pillars auf einem Glasuntergrund stehen würden. Wird ein silanisierendes Glasplättchen (siehe Kapitel 3.1.3) auf die ausgegossene PEG-Prepolymerlösung aufgedrückt, so bindet das PEG in der Quervernetzungsreaktion kovalent daran. Allerdings bleibt auch bei festem aufdrücken stets ein dünner, durchgehender PEG-Film zwischen dem Glas und dem PDMS-Master. Nach dem Quervernetzen bildet diese Schicht einen durchgehenden Hydrogeluntergrund unter den Pillars. Dieser Untergrund löst sich bei Wasserkontakt selbst bei sehr kleinen Schwellraten vom Glasplättchen ab, da durch das Schwellen über eine große Fläche starke Spannungen in der Schicht entstehen. Bei der RM Technik können die Pillars somit nicht auf einem Glasuntergrund verankert werden. Stattdessen erhält man PEG-Pillarfelder auf einem homogenen PEG-Untergrund.

Mit der beschriebenen Vorgehensweise lassen sich großflächige und gleichmäßige Pillarfelder herstellen. Aber die Technik stößt in mehrfacher Hinsicht an Grenzen:

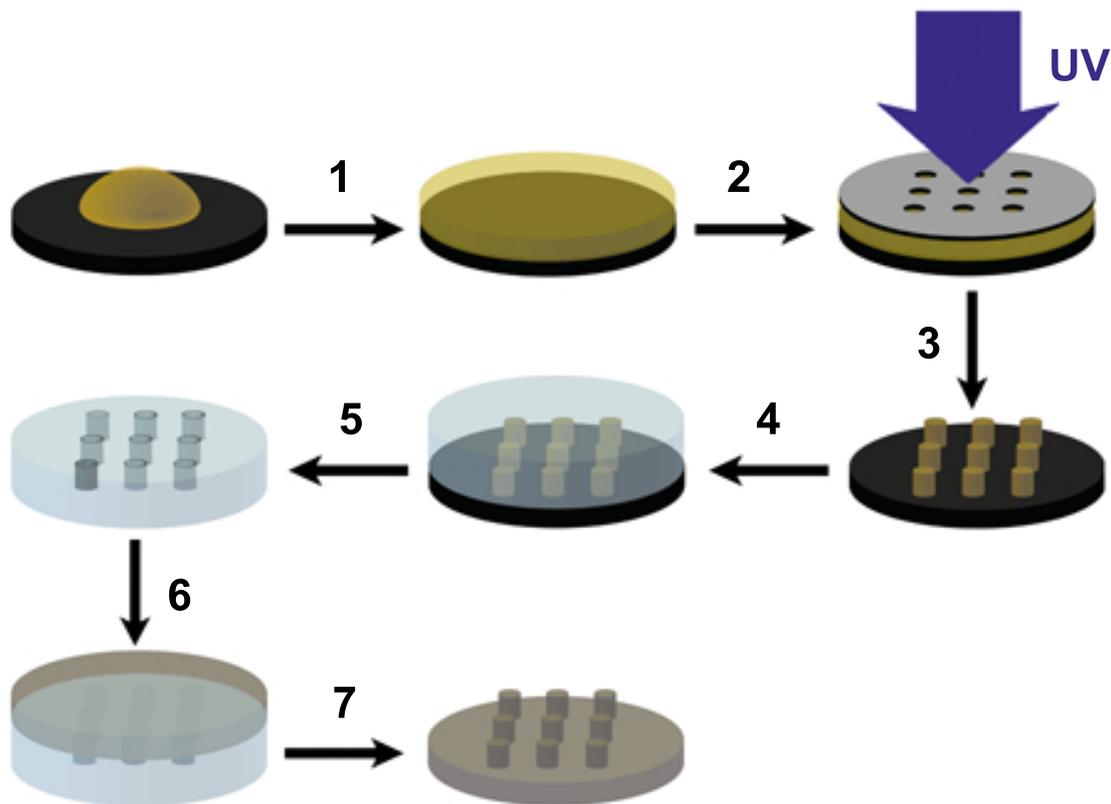


Abbildung 4.1: Herstellung von PEG-Pillars nach dem Replika Moulding Verfahren (schematische Darstellung). (1) der Fotolack wird in der gewünschten Dicke aufgeschleudert, (2) der Lack wird durch eine Fotomaske belichtet, (3) der unbelichtete Lack wird im Entwicklungsprozess entfernt, (4) das so hergestellte Abgussmaster wird mit flüssigem PDMS-Prepolymer ausgegossen, (5) das thermisch quervernetzte PDMS wird vom Master abgelöst, (6) das so hergestellte PDMS-Abgussmaster wird mit flüssigem PEG-Prepolymer ausgegossen, und (7) das durch UV-Bestrahlung quervernetzte PEG-Hydrogel wird vom Master abgelöst.

1. Die maximal erreichbaren Aspektverhältnisse sind durch die mechanische Stabilität der Hydrogelstrukturen auf Werte deutlich unter 10 beschränkt (siehe Kapitel 5.1.1).
2. Es konnte keine verlässliche Methode zur spezifischen Biofunktionalisierung der Pillarköpfe entwickelt werden, siehe [60].
3. Der fehlende Glasuntergrund erschwert die Einbindung der Pillarfelder in mikroskopietaugliche Versuchskammern.

Aus diesen Gründen wurde das im nächsten Kapitel beschriebene alternative Verfahren zur Pillarherstellung auf Basis der MPL entwickelt.

4.1.2 PEG-Pillar-Herstellung per Mikroskop-Projektionslithografie

Es war ein erklärtes Ziel der vorliegenden Arbeit, auf Glas verankerte, biofunktionalisierte PEG-Pillars mit großen Aspektverhältnissen herzustellen. Dazu wurde ein neuartiges, auf der MPL (siehe Kapitel 3.4.4) basierendes Verfahren zur Pillarherstellung entwickelt. Die Methode ist vergleichsweise schnell und unkompliziert durchzuführen, und ermöglicht deutlich größere Aspektverhältnisse als die Herstellung durch RM (bislang bis maximal ca. 20). Als einziger bedeutender Nachteil steht dem die geringere Reproduzierbarkeit der Pillarform gegenüber, was bei Kraftmessungen eine Einzelkalibration der verwendeten Pillars nötig macht.

Normalerweise wird MPL für die Erzeugung sehr flacher Strukturen verwendet [16], [19]. Es lassen sich mit dieser Methode aber auch Objekte mit sehr großen Aspektverhältnissen herstellen, solange gewährleistet ist, dass die aus dem Objektiv austretenden Lichtstrahlen ausreichend parallel angeordnet sind. In der Praxis erzielt man mit Objektiven mit kleiner numerischer Apertur die besten Resultate (vergleiche Kapitel 5.1.2). Es wurde deshalb meist mit einem Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.3 - Objektiv gearbeitet. Im folgenden werden die nötigen Arbeitsschritte zur Herstellung von PEG-Pillars mittels MPL erläutert.

Probenvorbereitung: Die Probe zur Herstellung von PEG-Pillarfelder besteht im wesentlichen aus einer dünnen Schicht PEG-Prepolymerlösung zwischen zwei Glasplättchen. Das untere Glasplättchen wurde mit Allyl-Triethoxysilan behandelt (siehe Kapitel 3.1.3), so dass das PEG-Hydrogel während der Quervernetzungsreaktion kovalent daran anbindet. Das obere Glasplättchen kann mit funktionalen Substanzen beschichtet werden, die dann auf die Oberseite des Hydrogels übertragen werden (siehe Kapitel 4.1.3). Die Höhe der Prepolymer-Schicht wird durch Abstandshalter zwischen den beiden Glasplättchen eingestellt und bestimmt die Höhe der erzeugten Hydrogelstrukturen. Als Abstandshalter wurden meist dünne Streifen aus handelsüblicher Klarsichtfolie verwendet, die je nach Fabrikat eine Dicke zwischen 80 μm und 120 μm besitzen. Der Aufbau der Probe ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

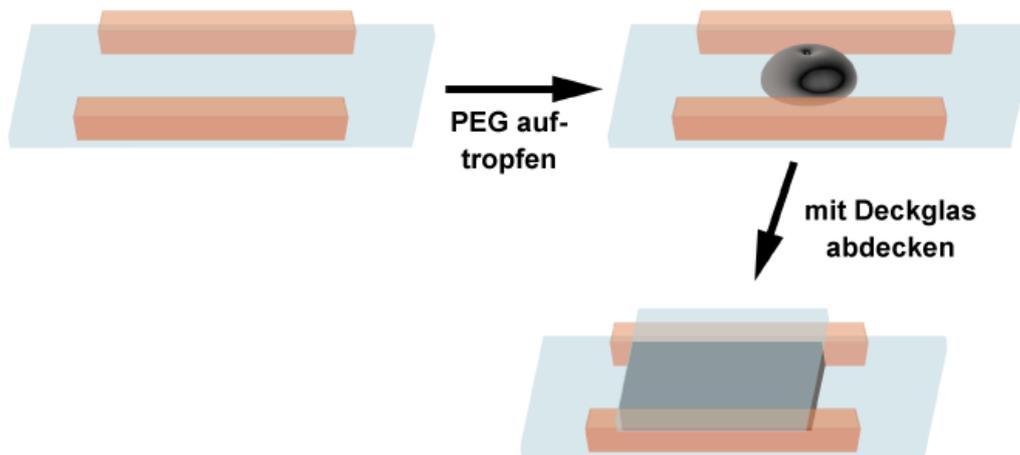


Abbildung 4.2: Probe für die Herstellung von PEG-Strukturen mittels Mikroskop-Projektionslithographie (schematische Darstellung). Zwei leicht angefeuchtete Abstandshalter (rot) auf einem silanisierten Glasplättchen (hellgrau) bilden die Grundlage der Probenkammer. Nach Zugabe eines Tropfens PEG-Lösung (dunkelgrau) wird die Kammer mit einem Deckglas abgedeckt.

Belichtung der Probe: Die Probe wird unmittelbar nach der Herstellung im Mikroskop (Axiovert 200 oder Axiovert 200M, beide Zeiss) für eine definierte Zeitspanne mit UV-Licht bestrahlt¹. In der Sehfeldblendenposition des Mikroskops befindet sich dabei die gewünschte Belichtungsmaske (siehe Kapitel 3.4.1).

Es wurden zahlreiche Pillarfelder mit verschiedenen Parametern auf diese Weise hergestellt. In Kapitel 5.1.2 werden die Auswirkungen der einzelnen Parameter ausführlich diskutiert. Als optimal für die Herstellung von Pillarfeldern für die Kraftmessung zwischen fusionierenden Mitosespindeln (siehe Kapitel 4.2) haben sich folgende Versuchsbedingungen herauskristallisiert:

- Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.3 (Zeiss)
- UV-Quelle: X-Cite 120 PC (EXFO)
- Filterwürfel: DAPI (Zeiss)
- Belichtungsmaske: SLA009 oder MLC001
- Belichtungszeiten: (4 - 20) sec

Es zeigt sich, dass die optimalen Belichtungszeiten deutlich variieren - abhängig von Zusammensetzung und Alter der PEG-Prepolymerlösung, sowie von Brenndauer und Justierung der verwendeten UV-Lampe. Vor der Herstellung der gewünschten

¹Da die PEG Prepolymerlösung sauerstoffempfindlich ist, wird die Qualität der PEG-Lösung schon ca. 10 bis 20 Minuten nach der Probenpräparation spürbar schlechter. Eine längere Belichtungszeit wird dann für die Quervernetzung nötig, und die Maskenstruktur zunehmend unscharf abgebildet.

Pillarfelder sollte deshalb stets die optimale Belichtungszeit für die aktuelle Prepolymerlösung in einem Vorversuch neu ermittelt werden.

4.1.3 Funktionalisierung der Pillars

Eine spezifische Funktionalisierung der Pillarköpfe ist mit der MPL-Methode denkbar einfach. Dazu wird das obere Glasplättchen der Probe mit einer geeigneten funktionalen Substanz beschichtet. Bei der Quervernetzung wird die Substanz dann auf die Oberseite der Hydrogelstrukturen übertragen.

Es hat sich allerdings als vorteilhaft erwiesen, die funktionalen Moleküle gekoppelt an Polystyrol-Mikrobeads mit einem Durchmesser von einigen Mikrometern zu übertragen². Die Verwendung von Beads hat drei wesentliche Vorteile gegenüber der Übertragung von ungekoppelten Molekülen:

1. Die Beads sorgen für eine gute Exponierung der funktionalen Moleküle auf der Beadoberseite. Ohne die Beads könnte es passieren, dass die übertragenen Moleküle bei der Quervernetzung vom PEG-Hydrogel komplett inkorporiert werden und somit nicht mehr exponiert zugänglich sind.
2. Die opaken Beads schirmen die funktionalen Moleküle auf der Beadoberseite von der UV-Strahlung ab. Das ist beispielsweise wichtig bei UV-empfindlichen funktionalen Proteine.
3. Die Beads ermöglichen eine schnelle lichtmikroskopische Vorkontrolle der Übertragung. Zwar ist die Übertragung der Beads noch kein eindeutiger Beweis für eine geglückte Funktionalisierung, da die funktionalen Moleküle Schaden genommen haben könnten. Für die in dieser Arbeit verwendete Funktionalisierung mit Streptavidin-bedeckten Beads (Dynabeads 2,8 μm Durchmesser, Dynal) hat sich allerdings in der Praxis gezeigt, dass die Übertragung der Beads in den allermeisten Fällen auch mit einer erfolgreichen Funktionalisierung einhergeht (siehe Kapitel 5.1.2 und Kapitel 5.2.2).

Vorbereitung der Probenkammer: Das für die Beschichtung mit Beads vorgesehene Glasplättchen wird in Extran-Lösung (Merck, 1:2 mit Wasser verdünnt) im Ultraschallbad gereinigt, mit Wasser gespült und im N_2 -Strom getrocknet. Dann wird ein ca. 10 μl großer Tropfen der gewünschten Beadlösung (beispielsweise Streptavidin Dynabeads, 2,8 μm , Dynal) auf das Deckglas gegeben und mit der Pipettenspitze leicht ausgestrichen. Anschließend lässt man die Beadlösung ca. 20 Minuten eintrocknen. Zurück bleibt eine dünne Schicht - im Idealfall eine Monolayer - von Beads auf dem Glasplättchen. Sobald die Beads komplett trocken gefallen sind, wird das

²Beads mit einem Durchmesser von unter einem Mikrometer tendieren dazu, gänzlich in das PEG-Hydrogel inkorporiert zu werden, und sind somit ungeeignet. Wesentlich größere Beads hingegen verursachen eine unnötige Vergrößerung der Pillaroberfläche.

Glasplättchen mit den Beads nach unten auf die Abstandshalter der Probenkammer gelegt (siehe Abbildung 4.3).

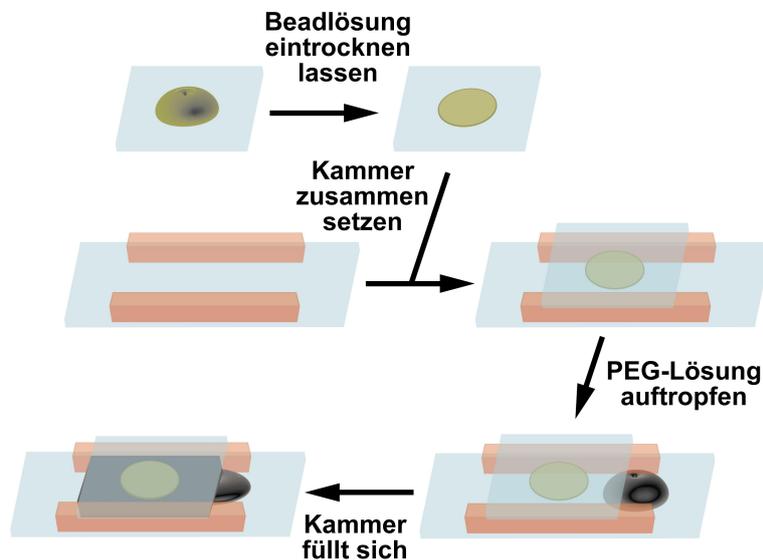


Abbildung 4.3: Zusammenbau der Probenkammer (schematische Darstellung). Das Deckglas wird mit der Beadschicht nach unten auf die leicht angefeuchteten Abstandshalter (rot) aufgelegt. Ein Tropfen PEG-Lösung wird neben die Kammer gegeben (dunkelgrau). Die Probenkammer füllt sich aufgrund von Kapillarkräften.

Es ist wichtig und erfordert einige Erfahrung, hier den richtigen Zeitpunkt zu erkennen: Ist die Beadlösung bei der PEG-Zugabe noch nicht vollständig eingetrocknet, so lösen sich die Beads vom Deckglas und werden vom PEG-Strom mitgerissen. Wartet man hingegen zu lange mit dem Zusammenbau, so läuft man gegebenenfalls Gefahr, dass die auf den Beads sitzenden funktionalen Proteine denaturieren.

Nach dem Zusammenbau der Probenkammer werden ca. $70 \mu\text{l}$ PEG-Lösung direkt neben der Kammer auf das untere Glasplättchen gegeben. Durch die Kapillarkräfte füllt sich die Kammer dann innerhalb weniger Sekunden mit der Lösung. Sobald die Kammer komplett gefüllt ist kann die Probe im Mikroskop belichtet werden. Das Füllen der Kammer durch die Kapillarkräfte ist wichtig. Gibt man einfach einen Tropfen der PEG-Lösung auf das untere Glasplättchen und deckt ihn dann erst wie in Abbildung 4.2 mit dem Bead-bedeckten Deckglas zu, dann sorgt der ausgeübte Druck dafür, dass das PEG alle Zwischenräume zwischen den Beads und dem Deckglas ausfüllt. Die Beads werden dann beim Quervernetzen komplett in das Hydrogel inkorporiert und die Funktionalisierung schlägt fehl (siehe Kapitel 5.1.2).

Behandlung der Probe nach dem Belichten: Nach dem Belichten wird die Probe in eine Petrischale mit sterilem physiologischen PBS-Puffer (siehe Anhang) gelegt. Dann

wird das Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und das nicht quervernetzte PEG ausgewaschen. Nach dem Waschvorgang kann die Probe bis zur weiteren Verwendung mehrere Tage in frischem PBS im Kühlschrank gelagert werden. Abbildung 4.4 zeigt den Herstellungsprozess noch einmal schematisch.

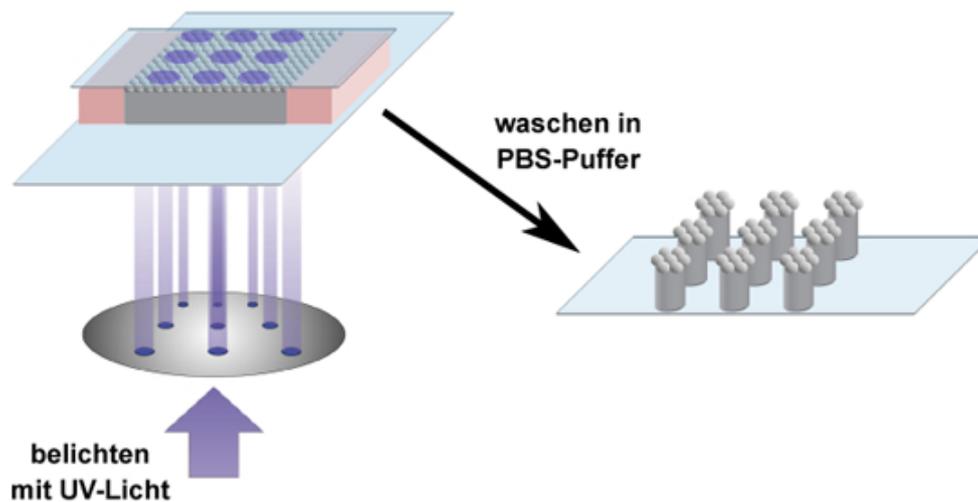


Abbildung 4.4: Herstellung beadfunktionalisierter PEG-Pillars (schematische Darstellung). Nach dem Belichten wird das Deckglas entfernt, und das nicht quervernetzte Hydrogel wird ausgewaschen.

Überprüfung der Biofunktionalisierung: Der Erfolg der Funktionalisierung mit Streptavidin kann durch die Anbindung von DNA-Beads (siehe Kapitel 3.5.4) überprüft werden. Dazu holt man die Probe aus dem PBS-Puffer, belässt allerdings einen kleinen Tropfen des Puffers auf dem Pillarfeld. Dann gibt man einige Mikroliter der DNA-Bead-Lösung hinzu. Während der ca. 20-minütigen Inkubation werden die sedimentierten Beads mehrfach wieder mit der Pipette aufgewirbelt. Anschließend wird die Probe vorsichtig, aber gründlich mit PBS gespült und mit einem Tropfen DAPI-Lösung versetzt. Danach sieht man im Fluoreszenzmikroskop deutlich, ob die DNA-Beads spezifisch an die Pillarköpfe angebonden haben³.

Wie in Kapitel 5.1.2 gezeigt, gelingt die Funktionalisierung mit Streptavidin-Beads in den allermeisten Fällen ohne Probleme. Das bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass auch andere Proteine die teils harschen Herstellungsbedingungen überstehen. Immerhin wird das Protein erst eingetrocknet und muss dann während der Quervernetzungsreaktion eine radikalische Umgebungschemie überleben. Der

³Ein Nachweisversuch mit fluoreszenzmarkiertem Biotin (Atto-Biotin, Sigma Aldrich) ohne Anbindung an Mikrobeads brachte hingegen keine eindeutigen Ergebnisse. Das Biotin diffundiert in das weitmaschige PEG-Hydrogel ein und erzeugt dadurch eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz.

Nachweis einer erfolgreichen Funktionalisierung muss demnach für jedes weitere in Zukunft verwendete funktionale Molekül einzeln erbracht werden.

4.1.4 Kalibration der Pillars

Nur bei bekannter Federkonstante können Pillars als Kraftsensoren eingesetzt werden. Die Kalibration der Pillars ist demnach ein zentraler, und nach wie vor nicht ganz zufriedenstellend gelöster Aspekt in dieser Arbeit (vergleiche Kapitel 5.1.3). Es wurden zahlreiche Methoden sondiert, um die Federkonstanten der Pillars verlässlich zu bestimmen. Die wichtigsten Ideen werden im folgenden kurz vorgestellt.

1. Theoretische Berechnung: Die Federkonstanten exakt zylinderförmiger Pillars können nach Gleichung 2.1 elementar berechnet werden, wenn Pillardimensionen und das Elastizitätsmodul des Pillarmaterials bekannt sind. Innerhalb einer gewissen Fehlertoleranz lassen sich so die Federkonstanten für mittels RM hergestellte PDMS-Pillars bestimmen [35]. Für mittels MPL hergestellte PEG-Pillars gibt es jedoch zwei gravierende Probleme: Erstens weicht ihre Form häufig leicht von der perfekten Zylindergeometrie ab, und zweitens sind die Elastizitätsmodule der verwendeten Prepolymerlösungen bisher nicht bekannt. Aus diesen Gründen wird in dieser Arbeit auf eine theoretische Berechnung der Federkonstanten verzichtet.
2. Kreuzkalibration gegen AFM-Cantilever: Die Methode der Wahl ist in dieser Arbeit die Kreuzkalibration der Pillars gegen einen kalibrierten AFM-Cantilever. Für AFM-Cantilever existieren aufgrund ihrer einfachen Geometrien und der kommerziellen Verwendung verlässliche Eichkurven, anhand derer sich die Federkonstante aus der thermischen Bewegung der Cantileverspitze ermitteln lässt [93]. Die so kalibrierten Cantilever können gegen die Pillarspitze bewegt werden, so dass sowohl der Pillar als auch der Cantilever ausgelenkt werden. Aus dem Verhältnis der beiden Auslenkwinkel lässt sich dann die Federkonstante des Pillars bestimmen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und ist weiter unten in diesem Kapitel ausführlich beschrieben⁴.
3. Kalibration anhand von statistischen Daten: Auch ohne Kenntnis der exakten Pillargeometrie und des Elastizitätsmoduls des verwendeten PEG-Hydrogels könnten die Federkonstanten der Pillars eventuell über die Messung ihrer Durchmesser bestimmt werden. Dazu müsste eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Pillars mit unterschiedlichen Durchmessern einzeln nach Methode 2.) kalibriert werden. Normalerweise besitzen die Pillars eines Pillarfeldes eine vergleichbare Geometrie (vergleiche Kapitel 5.1). Das bedeutet, dass sich für

⁴Anstelle eines Cantilevers könnten im Prinzip auch andere Kraftsensoren mit bekannter Federkonstante verwendet werden - beispielsweise eine optische Pinzette für die Kalibration sehr weicher Pillars.

ihre Federkonstanten ein Zusammenhang $k \propto r^3$ ergeben sollte. Wenn dieser Zusammenhang statistisch bestätigt werden kann, dann reicht in Zukunft bei jedem Pillarfeld die Kalibration einiger weniger Pillars nach 2.), um daraus auf die Federkonstanten aller Pillars der Probe schließen zu können.

4. Kalibration durch inhomogene Magnetfelder: Inhomogene Magnetfelder üben eine Kraft auf paramagnetische Beads aus. Dieser Effekt sollte sich bei bead-funktionalisierten Pillars für eine elegante Kalibrationsmethode ausnutzen lassen: Ein in horizontaler Richtung stark inhomogenes Magnetfeld führt zu einer Verbiegung der Pillars. Die Verbiegung ist proportional zur Anzahl der auf dem Pillar sitzenden Beads und antiproportional zur Federkonstante des Pillars. Die gegenseitige Beeinflussung der Pillars untereinander durch Störungen des äußeren Magnetfelds sollte nach den Erfahrungen mit magnetischen Pinzetten vernachlässigbar klein sein. Mit dieser Methode ließen sich auch ohne exakte Kenntnis der verwendeten Magnetfelder alle Pillars einer Probe ohne viel Aufwand relativ zueinander kalibrieren. Eine Kalibration einiger Pillars nach 2.) würde dann die Federkonstanten aller Pillars dieser Probe liefern.

Kreuzkalibration, experimenteller Aufbau: In dieser Arbeit wurden alle Federkonstanten mittels Kreuzkalibration gegen AFM-Cantilever (MLCT oder MSNL-10, Veeco) bestimmt. Dazu wurde nach [78] ein spezieller Aufbau entwickelt, der es ermöglicht einen Cantilever fest mit dem Sockel eines Mikroskops zu verbinden. Gleichzeitig kann die Probe mit dem Pillarfeld mittels Piezoprobentisch computergesteuert schrittweise gegen den Cantilever verschoben werden. Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen den Kalibrationsaufbau.

Der Kalibrationsaufbau basiert auf einer Metallplatte, die den Probentisch überbrückt und an beiden Seiten am Mikroskopsockel festgeschraubt ist. Auf der Metallplatte ist ein Aufbau aus Mikrometertischen montiert, der sich über die Mikrometerschrauben manuell in alle drei Raumrichtungen verstellen lässt. An diesem Aufbau wiederum ist ein speziell konstruierter Aluminiumhalter befestigt, in den sich eine Glasmikroplatte einspannen lässt [94]. Durch die Mikrometertische lässt sich der Aluminiumhalter in alle drei Raumrichtungen justieren, durch eine weitere Mikrometerdrehschraube lässt sich zusätzlich sein Winkel bezüglich des Probentisches einstellen (siehe Abbildung 4.6). An die Glasmikroplatte wird wiederum ein AFM-Cantilever (MLCT oder MSNL-10, Veeco) in einem Winkel von ca. 45° gegenüber der Mikroplattenachse mit Sekundenkleber (UHU) aufgeklebt (siehe Abbildung 4.7).

Das Pillarfeld hingegen liegt in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf dem Probentisch des Mikroskops. Der Cantilever wird nun mit den Justiervorrichtungen vorsichtig in das PBS eingetaucht. Anschließend folgt die im nächsten Abschnitt beschriebene Feinjustierung mit Hilfe des Mikroskops.

Feinjustage des Kalibrationsaufbaus: Der erste Schritt der Feinjustage ist die genaue Höhenjustierung des Cantilevers bezüglich des zu kalibrierenden Pillars. Dazu wird

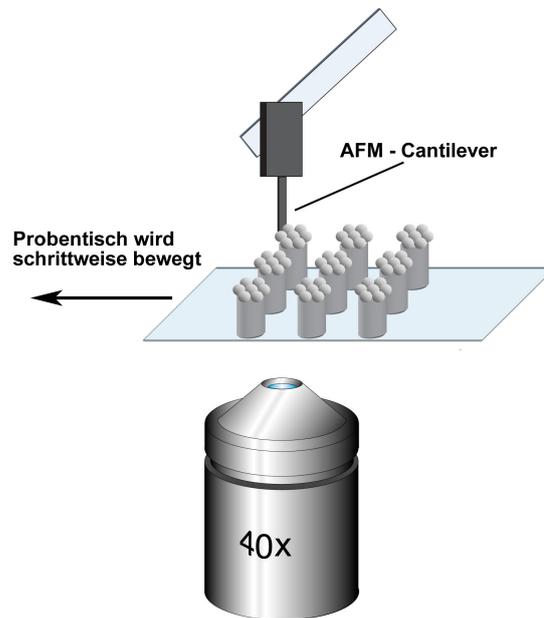


Abbildung 4.5: Der Kalibrationsprozess (schematische Darstellung). Der zu kalibrierende Pillar wird schrittweise gegen den starr mit dem Mikroskopgehäuse verbundenen AFM-Cantilever bewegt. Kommen Pillar und Cantilever miteinander in Kontakt, so werden sie bei weiterer Bewegung beide aus der Ruhelage ausgelenkt.

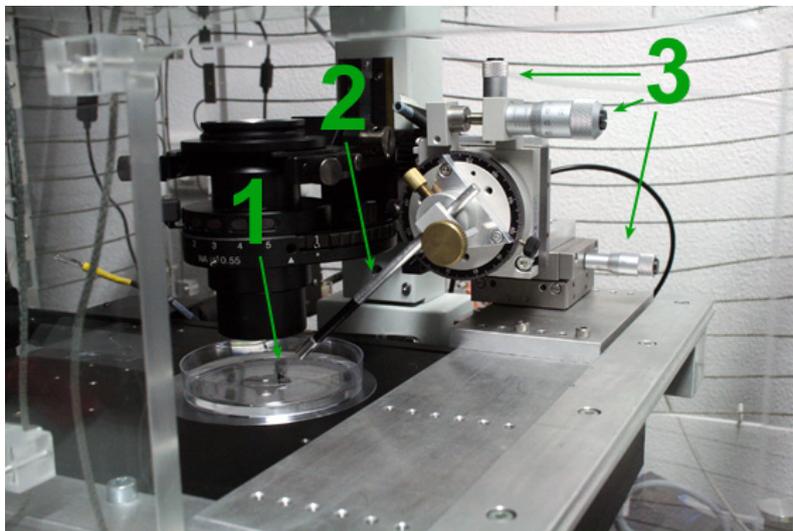


Abbildung 4.6: Der Kalibrationsaufbau (fotografische Abbildung). (1) Der auf einer Glasmikroplatte aufgeklebte Cantilever über der Probe mit dem zu kalibrierenden Pillar. (2) Der Aluminiumhalter, in dem die Glasmikroplatte eingespannt ist. (3) Mikrometerschrauben zur Feinjustage.

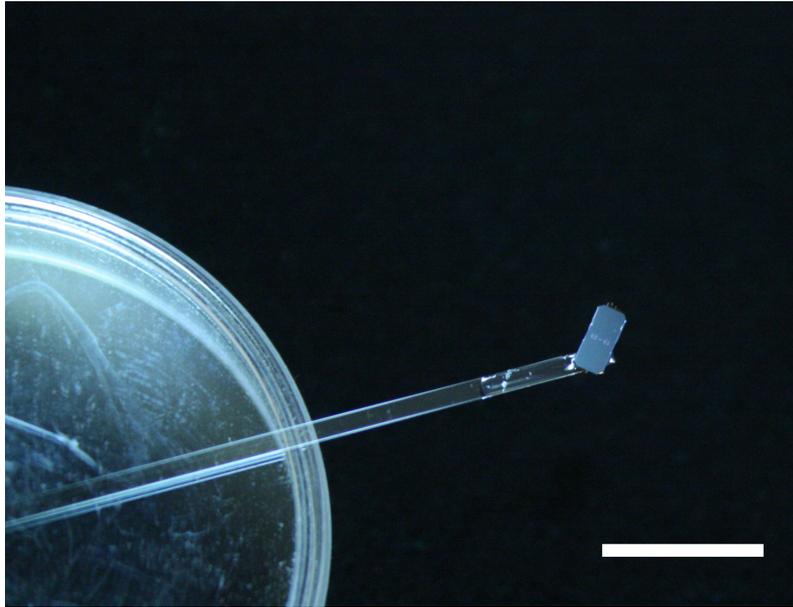


Abbildung 4.7: Befestigung des AFM-Cantilever am Kalibrationsaufbau (fotografische Abbildung). Der Cantilever wird im 45° -Winkel auf die Glasmikroplatte aufgeklebt. Dadurch steht er nach dem Einspannen der Glasmikroplatte in den Kalibrationsaufbau senkrecht zum Mikroskop-Probentisch. Maßstab 1 cm.

das Mikroskop auf den Pillarkopf fokussiert, was bei beadfunktionalisierten Pillars besonders einfach ist. Nun wird der Cantilever per Mikrometerschraube so lange abgesenkt, bis auch die Cantileverspitze scharf im Fokus erscheint. Anschließend erfolgt eine horizontale Verschiebung des Cantilevers in die Bildmitte. Dann wird der Pillar mit Hilfe des computergesteuerten Probentischs horizontal gegen den Cantilever bewegt. Stoßen Cantilever und Pillar dabei zusammen, das heißt wird der Pillar ausgelenkt, so wird die Probe mittels Probentisch um $1 \mu\text{m}$ abgesenkt und die Prozedur wiederholt - immer wieder, solange bis der Pillar gerade nicht mehr mit dem Cantilever zusammen stößt. Wurde dieser Punkt gefunden, dann wird die Probe wieder $3 \mu\text{m}$ nach oben bewegt, der Cantilever greift dann also ($3 \pm 3 \mu\text{m}$) unterhalb der Pillaroberfläche an den Pillar an. Die Kenntnis des Angriffspunkts ist wichtig für die Berechnung der Federkonstanten des Pillars (siehe Gleichung 4.6). Abschließend wird der Pillar im Mikroskopbild horizontal so ausgerichtet, dass er knapp oberhalb des Cantilevers zu sehen ist. Dabei muss der Cantilever für das Mustertracking allerdings seitlich teilweise über den Pillar herausragen (siehe Abbildung 4.8).

Der Kalibrationsprozess: Für die eigentliche Kalibration wird der Pillar jetzt in Schritten von je $1 \mu\text{m}$ im Mikroskopbild nach unten gegen den Cantilever bewegt, und dann jeweils ein Bild aufgenommen. Bei dem für die Kalibration verwendeten Mikroskop (DeltaVision, Applied Precision) öffnet sich der Lampenshutter norma-

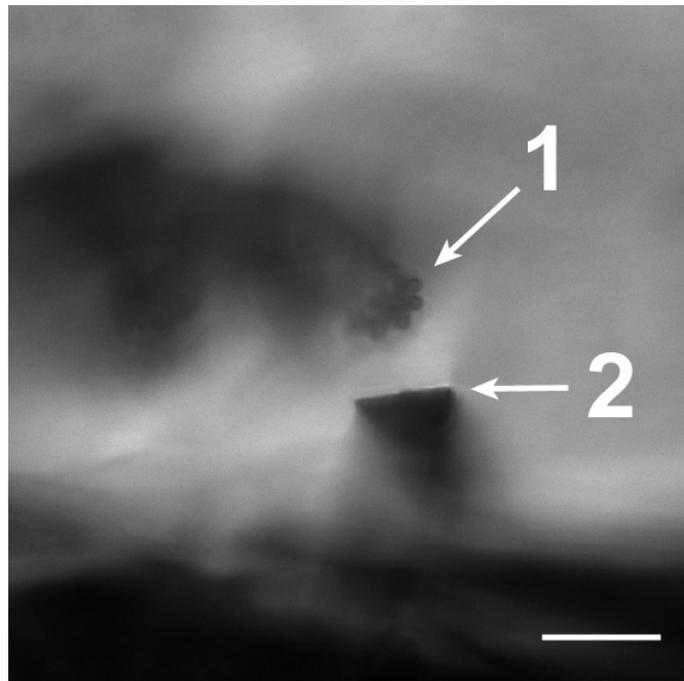


Abbildung 4.8: Feinjustage von Pillar und Cantilever (lichtmikroskopische Aufnahme). Nach erfolgter Feinjustage ergibt sich die hier dargestellte Situation. Deutlich zu erkennen sind der Bead-bedeckte Pillarkopf (1) und die Cantileverspitze (2). Maßstab 25 μm .

erweise erst unmittelbar vor der Aufnahme des Bilds automatisch. Die vom Shutter verursachten Schwingungen übertragen sich dann über den Kalibrationsaufbau auf den Cantilever. Die Cantileverschwingung ist zwar stark gedämpft - trotzdem erscheint er auf den Mikroskopbildern unscharf, was eine exakte Kalibration unmöglich macht. Der Effekt kann aber unterdrückt werden indem der Lampenshutter mindestens eine Sekunde vor Aufnahme jedes Bildes manuell geöffnet wird. Der Cantilever erscheint dann scharf auf den Mikroskopieaufnahmen.

Die gesamte Prozedur (Lampenshutter manuell öffnen, Probenstisch um $1\ \mu\text{m}$ bewegen, Bild aufnehmen) wird so lange wiederholt, bis der Pillar aufgrund seiner Verbiegung den Kontakt mit dem Cantilever verliert und in seine Ausgangsposition zurück schnappt. Ab diesem Punkt wird die Schrittrichtung des Probenstischs umgedreht und die Kalibrationsprozedur von der anderen Cantileverseite kommend erneut durchgeführt. Wiederum so lange, bis der Pillar in seine Ausgangslage zurück schnappt. Der gesamte Kalibrationsvorgang wird dann aus statistischen Gründen noch zweimal wiederholt.

Bei einem Angriffspunkt des Cantilevers von ca. $3\ \mu\text{m}$ unterhalb der Pillaroberfläche schnappt der Pillar in der Regel bei einem Auslenkwinkel von $\leq 15^\circ$ zurück. Das ist auch wichtig, da ansonsten die in Gleichung 2.1 gemachte Näherung $\sin(x) \approx x$ nicht mehr im Rahmen enger Fehlergrenzen gültig ist⁵. Im Ausnahmefall kann ein Pillar bei der Kalibration jedoch deutlich stärker ausgelenkt werden. Wenn sich beispielsweise der Cantilever am Kopf eines sehr dünnen Pillars verhakt, so kann dieser Pillar beim Kalibrationsprozess unter Umständen regelrecht in die Länge gezogen werden. In diesem Fall ist der Prozess abzubrechen und neu zu beginnen.

Bestimmung der Kalibrationstrajektorien: Die im Kalibrationsprozess aufgenommene Bilderserie erlaubt nun eine Bestimmung der Auslenkungen des zu kalibrierenden Pillars und des kalibrierten Cantilevers. Der Pillar bewegt sich in der Bilderserie anfangs genau um die Schrittweite des Probenstischs $x_T = 1\ \mu\text{m}/\text{Bild}$, bis er auf den Cantilever trifft. Nach dem Aufeinandertreffen muss die Tischartschrittweite durch die addierten Auslenkungen von Pillar (x_P) und Cantilever (x_C) kompensiert werden. Es gilt demnach:

$$x_P + x_C = x_T \quad (4.1)$$

Da der Cantilever in der Bilderserie aufgrund seiner scharf umrandeten Form deutlich genauer erkannt und verfolgt (*getrackt*) werden kann als der Pillar, wird für die Kalibration nur die Trajektorie des Cantilevers herangezogen.

Für das automatische Tracken der Cantileverposition x_C hat sich das Calibration-Werkzeug der frei erhältlichen Kameratracking-Software ICARUS bewährt⁶ (v.2.08,

⁵bei $\alpha = 15^\circ$ macht die Näherung einen Fehler von 1,14%, bei größeren Auslenkwinkeln steigt der Fehler hingegen schnell an

⁶es wurden mehrere frei erhältliche Mustertrackingwerkzeuge ausprobiert, ICARUS lieferte die verlässlichsten Ergebnisse.

Advanced Interfaces Group, University of Manchester). Das Programm ermöglicht es dem Nutzer, in einem Videofilm selbst gewählte Muster mit Subpixelgenauigkeit zu verfolgen. Normalerweise wird das Programm vor allem dazu verwendet, Kamerawackler bei Videofilmen herauszurechnen - es eignet sich aber auch hervorragend für das tracken von Mustern aller Art in Mikroskopievideos. Eine Beschreibung des Programms findet sich in [95]. Die so ermittelten 2D-Trajektorien des Cantilevers werden im ASCII-Format ausgegeben und anschließend mit den Programmen EXCEL (Microsoft) und ORIGIN (OriginLab) ausgewertet.

Auswertung der Kalibrationstrajektorien: In der mittels ICARUS ermittelten Trajektorie der Cantileverposition lassen sich mehrere charakteristische Ereignisse erkennen (siehe Abbildung 4.9).

1. Basislinie: Pillar und Cantilever sind nicht in Kontakt, der Cantilever wird deshalb bei einer Bewegung des Probenstückes nicht ausgelenkt. Manchmal ist allerdings ein leichter linearer Drift in der Trajektorie zu erkennen, beispielsweise aufgrund von Temperaturschwankungen.
2. Erster Kontaktpunkt: Pillar und Cantilever treffen erstmals aufeinander.
3. Linearer Auslenkbereich: Der Cantilever wird nach Gleichung 2.2 linear durch die Bewegung der Probe ausgelenkt⁷.
4. Verlustpunkt: Der Pillar verliert aufgrund seiner Verbiegung den Kontakt zum Cantilever.
5. Zurückschnappen: Nach dem Kontaktverlust schnappen Pillar und Cantilever wieder in ihre Ruhepositionen zurück.
6. Zweiter Kontaktpunkt: Der Pillar trifft von der anderen Seite kommend wieder auf den Cantilever.

In ORIGIN werden die Trajektorien nun aufgespalten in eine Trajektorie für die Basislinie und je eine Trajektorie für die beiden Bereiche linearer Auslenkung. Anschließend werden die einzelnen Trajektorien linear angefitet (siehe Abbildung 4.10).

Durch die linearen Fits wird jeweils das Verhältnis $m' := \frac{x_C}{x_T}$ aus Cantileverauslenkung zu Tischbewegung und gegebenenfalls der Grunddrift m_D ermittelt. Aus diesen Werten lässt sich bei bekannter Federkonstante des Cantilevers k_C nun die Federkonstante des Pillars berechnen.

⁷Streng genommen ist die Auslenkung nicht exakt linear. Neben der Näherung $\sin(x) \approx x$ wandert auch der Angriffspunkt des Cantilevers am Pillar bei zunehmender Pillarauslenkung immer weiter Richtung Pillarkopf. Dadurch wird die effektive Federkonstante des Pillars stetig kleiner, und die Auslenkung pro Bild sollte demnach langsam ansteigen. In der Praxis ist jedoch auch dieser Effekt im Rahmen der angenommenen Fehlergrenzen zu vernachlässigen.

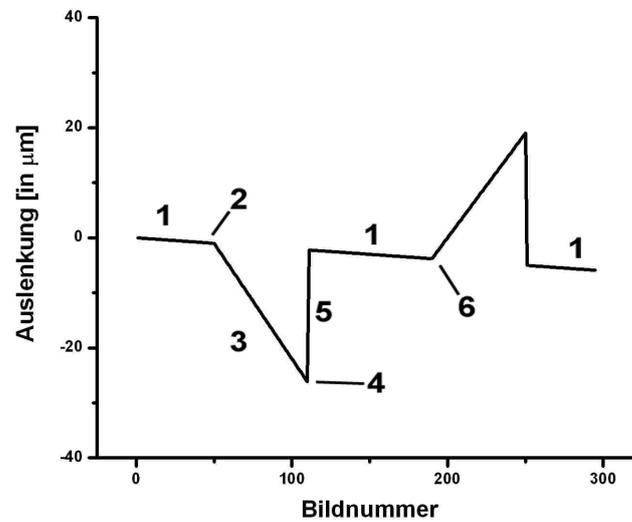


Abbildung 4.9: Theoretisch erwartete Trajektorie der Cantileverposition. Jeder Wert auf der X-Achse entspricht einem Mikroskopbild. Zwischen zwei Bildern wird die Probe um jeweils $1 \mu\text{m}$ relativ zum Cantilever bewegt. Beschreibung der charakteristischen Abschnitte der Trajektorie: siehe Text.

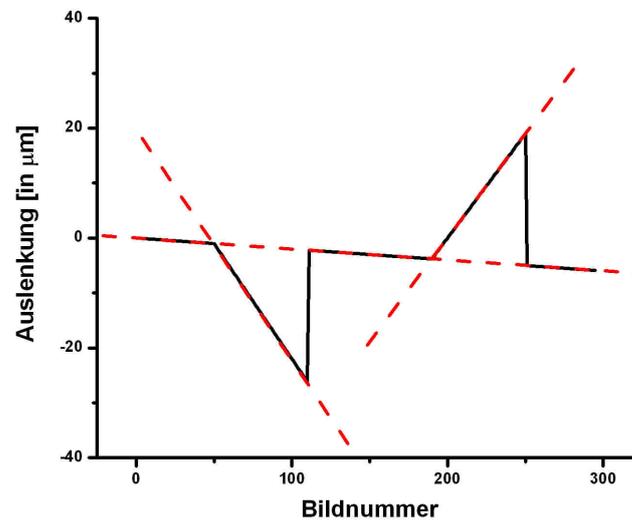


Abbildung 4.10: Bestimmung der Pillar-Federkonstante aus der Cantilevertrajektorie. Die Basislinie und die beiden linearen Auslenkbereiche werden linear angefitet (rot gestrichelt).

Dazu werden die Werte für m' als erstes auf den linearen Grunddrift korrigiert:

$$m = m' - m_D \quad (4.2)$$

Zwischen ausgelenktem Pillar und ausgelenktem Cantilever herrscht Kräftegleichgewicht. Nach dem Hook'schen Gesetz [36] gilt dann:

$$k_C \cdot x_C = k_P \cdot x_P \quad (4.3)$$

was mit Gleichung 4.1 umgeformt werden kann zu

$$k_P = k_C \cdot \frac{x_C}{x_T - x_C} \quad (4.4)$$

mit $m = x_C/x_T$ folgt für die Federkonstante des Pillars

$$k_P = k_C \cdot \frac{m}{1 - m} \quad (4.5)$$

Die auf diese Weise bestimmte Federkonstante k'_P für den Pillar der Höhe h ist streng genommen eine lineare Mittelung der Federkonstanten von Pillars mit Höhen h' zwischen $h' = (h - 3 \mu\text{m}) \pm 3 \mu\text{m}$ und $h' = h \pm 3 \mu\text{m}$, da der Cantilever anfangs ca. $3 \mu\text{m}$ unterhalb der Pillaroberkante angreift, und unmittelbar vor dem Zurückschnappen direkt an der Kante. Der dadurch entstehende Fehler wird durch einen Korrekturfaktor nach Gleichung 2.1 minimiert:

$$k_P = k'_P \cdot \left(\frac{h}{h - 1,5 \mu\text{m}} \right)^3 \quad (4.6)$$

Bei insgesamt N Wiederholungen des Kalibrationsvorgang gilt für die endgültige Federkonstante k_P des Pillars [96]:

$$k_P = \overline{k_P} \pm \Delta k_P \quad (4.7)$$

mit

$$\overline{k_P} = \frac{1}{2N} \cdot \sum k_{P_i} \quad (4.8)$$

$$\Delta k_P = \frac{1}{\sqrt{(2N \cdot (2N - 1))}} \cdot \sqrt{\sum (k_{P_i} - \overline{k_P})^2} \quad (4.9)$$

4.2 Kraftmessungen zwischen fusionierenden Mitosespindeln

Mit der in diesem Kapitel beschriebenen Beispielanwendung soll demonstriert werden, dass sich die in Kapitel 4.1 entwickelten PEG-Pillarfelder tatsächlich in der Praxis zur Messung von Kräften in biologischen Systemen eignen. Kapitel 4.2.1 erläutert Versuchsaufbau und -Durchführung zur Messung von Kräften zwischen fusionierenden Mitosespindeln, Kapitel 4.2.2 die Auswerteprozedur der gewonnenen Daten. Die Ergebnisse der Experimente werden in Kapitel 5.2 vorgestellt.

4.2.1 Versuchsaufbau

Im Vorfeld des Versuchs werden ein Streptavidin-funktionalisiertes Pillarfeld nach Kapitel 4.1.2, mitotisches Froschei-Extrakt nach Kapitel 3.5.3 und ein Kammerdeckel für die Versuchskammer (siehe unten) hergestellt. Der Kammerdeckel kann vor der Verwendung mehrere Monate gelagert werden, das funktionalisierte Pillarfeld einige Tage. Das Froschei-Extrakt muss am Tag der Versuchsdurchführung frisch hergestellt werden. Der Versuch selber besteht dann im wesentlichen aus drei Arbeitsschritten: Anbindung von DNA-Beads an die Pillarköpfe, Inkubation der Pillars in mitotischem Extrakt und Beobachtung der Spindelassembly im LSM.

Herstellung des Kammerdeckels: Die Versuchskammer besteht letztendlich aus einem Glasplättchen mit dem Pillarfeld und einem Kammerdeckel aus PDMS und Glas (siehe Abbildung 4.11).

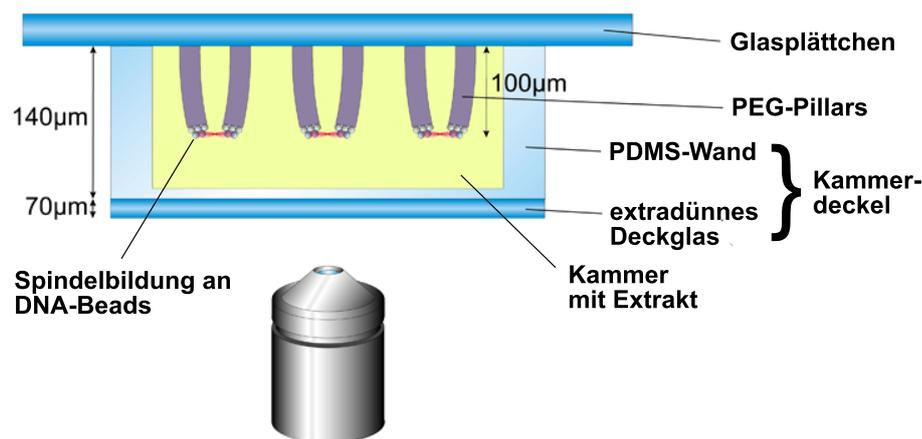


Abbildung 4.11: Aufbau der Versuchskammer (schematische Darstellung). Die Versuchskammer besteht aus dem Glasplättchen mit dem PEG-Pillarfeld, und dem aus PDMS und einem extradünnem Deckglas bestehenden Kammerdeckel. Mit den Pillarköpfen nach unten zeigend wird in der Extraktgefüllten Versuchskammer mit einem LSM die Spindelbildung beobachtet.

Der Kammerdeckel wird mit dem RM Verfahren produziert (siehe Kapitel 3.4.2). Das Abgussmaster muss jedoch nicht fotolithografisch hergestellt werden - stattdessen wird ein ca. $(0,3 \times 1,0)$ cm² großes Stück Klarsichtfolie mit zwei übereinander liegenden Streifen doppelseitigen Klebebands (Tesa) auf einen Objektträger aufgeklebt. Es wird dabei die selbe Klarsichtfolie verwendet, die auch bei der Pillarherstellung als Abstandhalter eingesetzt wurde (siehe Kapitel 4.1.2). Durch die beiden Klebebandstreifen mit einer Höhe von jeweils ca. $30 \mu\text{m}$ wird sichergestellt, dass die entstehende Versuchskammer ca. $60 \mu\text{m}$ höher ist als die entsprechenden Pillars, und somit genug Raum für die Assemblierung der Spindeln bleibt.

Das Abgussmaster wird nach Kapitel 3.1.3 mit 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorsilan behandelt und anschließend mit PDMS Prepolymer ausgegossen. Dann wird ein extra dünnes Deckglas (Deckglas #0, $(0,08 - 0,12)$ mm, Assistent) fest auf das PDMS aufgepresst, so dass nur eine sehr dünne Schicht PDMS zwischen der Klarsichtfolie und dem Deckglas verbleibt. Das PDMS wird dann im Ofen quervernetzt und anschließend vorsichtig vom Abgussmaster abgelöst.

Anbindung von DNA-Beads an die Pillarköpfe: Der eigentliche Versuch startet mit der Anbindung von DNA-Beads (siehe Kapitel 3.5.4) an die Pillarköpfe. Dazu wird ein Aliquot von 10 bis $20 \mu\text{l}$ der DNA-Bead-Suspension⁸ langsam auf Eis aufgetaut, und die Beads anschließend in $10 \mu\text{l}$ 3-molarer KCl-Lösung überführt⁹. Das Pillarfeld wird währenddessen gründlich mit CSF-XB-Puffer (siehe Anhang) gespült, um den PBS-Puffer und gegebenenfalls lose Streptavidin-Beads abzuwaschen. Dann wird die Probe um das Pillarfeld herum mit Filterpapier abgetrocknet, die Pillars selber sollten aber stets mit Flüssigkeit benetzt bleiben. Jetzt wird die Bead-KCl-Suspension mit einer Pipette auf das Pillarfeld getropft. Dann lässt man die Pillars 40 Minuten bei 4°C inkubieren, wobei die sedimentierten DNA-Beads etwa alle zehn Minuten wieder mit der Pipette aufgewirbelt werden. Dabei ist die Bildung von Luftbläschen unbedingt zu vermeiden, da die DNA-Beads sehr empfindlich auf Luftsauerstoff reagieren. Durch das wiederholte aufwirbeln und sedimentieren kommen die DNA-Beads ausreichend mit den Streptavidin-funktionalisierten Pillarköpfen in Kontakt um anzubinden. Nach der Inkubation wird das Pillarfeld gründlich in CSF-XB-Puffer gereinigt. Dabei wird durch Pipettieren eine ausreichend starke Strömung im Puffer erzeugt, um die Probe von allen unspezifisch adherierten oder nur schwach angebondenen DNA-Beads zu reinigen. Gleichzeitig darf die erzeugte Strömung nicht so stark sein, dass die angebondenen DNA-Beads von den Pillarköpfen abgerissen werden.

Inkubation der Pillars mit Extrakt: Nach der Reinigung in CSF-XB-Puffer wird das Glasplättchen um das Pillarfeld herum wieder mit Filterpapier abgetrocknet. Dann

⁸Die Konzentration der DNA-Beads entspricht der der Streptavidin-Beads ($6 \cdot 10^5 \text{Beads}/\mu\text{l}$)

⁹dazu werden die Beads mit einem starken Magneten an der Seite des Eppendorfgefäßes gesammelt, und dann das Extrakt gegen die KCl-Lösung ausgetauscht.

werden die Pillars mit ca. 50 μl mitotischem Extrakt gespült, um den Puffer restlos zu entfernen. Nun färbt man 40 μl mitotisches Extrakt mit DAPI und Rhodamin-Tubulin an, und tropft es auf das Pillarfeld. Durch Aufsetzen des Kammerdeckels wird die Probe vorsichtig und luftblasenfrei verschlossen.

Beobachtung der Spindelassemblierung im LSM: Die verschlossene Versuchskammer wird mit den Pillarköpfen nach unten zeigend in den Probentisch des auf 20° C temperierten LSM (Meta 510, Zeiss) eingespannt. Im Hellfeld-Modus wird zunächst mit einem 10x Objektiv auf die auf den Pillarköpfen sitzenden Beads fokussiert. Anschließend wird die Probe im LSM-Modus mit folgenden Standardeinstellungen beobachtet¹⁰:

- Objektive
 - A-Plan 10x/0,2
 - Plan-Neofluar 20x/0,5
 - Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil
- Temperatur: 20° C
- Scan Mode: Plane, multi track, 8bit, 1024 x 1024
- Strahlteiler
 - MBS: HFT 405/488/543
 - DBS1: Mirror
 - DBS2: NFT 545

Kanal 1 (DAPI)

- Anregungslaser: Ar, 405 nm, 31 % Laserleistung
- Filterset: BP 420-480 nm
- Pinhole (10x / 20x / 40x): 420 μm / 470 μm / 1000 μm

Kanal 2 (Rhodamin)

- Anregungslaser: HeNe, 543 nm, 9 % Laserleistung
- Filterset: BP 560-615 nm
- Pinhole (10x / 20x / 40x): 260 μm / 475 μm / 1000 μm

¹⁰Die Einstellungen werden nach Bedarf angepasst und können je nach Versuchstag leicht von den hier angegebenen Werten abweichen.

Im DAPI-Kanal lässt sich fortlaufend die Position der DNA-Beads - und damit auch der Pillarköpfe - beobachten. Im Rhodamin-Kanal lässt sich die Assemblierung von Mikrotubuli zu Asten und Spindeln verfolgen.

Nach ca. 10-15 Minuten können im Rhodamin-Kanal die ersten Mikrotubuliansammlungen um DNA-Bead-Cluster ausgemacht werden. Man wählt nun einen besonders interessant erscheinenden Bereich des Pillarfelds aus und beobachtet diesen im folgenden mit dem 40x Öl-Objektiv bei gleichzeitiger Videoaufzeichnung beider Fluoreszenzkanäle. Nach ca. 30-45 Minuten erscheinen im Erfolgsfall die ersten voll ausgebildeten Spindeln, im DAPI-Kanal lassen sich gegebenenfalls die Auslenkungen der Pillars durch die auftretenden Kräfte beobachten. Nach ca. 90 Minuten zerfallen die Mitosespindeln langsam wieder, und das Experiment wird beendet. Die in diesen Experimenten gemachten Beobachtungen werden in Kapitel 5.2 vorgestellt.

4.2.2 Auswerteprozedur

Nach erfolgreicher Durchführung des in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Versuchs bleiben zwei Aufgaben zu erledigen: Die Pillarauslenkungen müssen quantitativ bestimmt und die beteiligten Pillars nach Kapitel 4.1.4 kalibriert werden.

Die Pillarauslenkungen werden analog zu Kapitel 4.1.4 durch Mustertracking quantifiziert. Allerdings müssen dieses mal die Pillars selbst getrackt werden, was anhand des DAPI-Kanals des Videos aber sehr gut gelingt. Die fluoreszierenden DNA-Beads erzeugen auf jedem Pillarkopf ein sehr charakteristisches und somit leicht verfolgbares Muster.

Für die Kalibration der beteiligten Pillars ist es wichtig, sich auf einer Übersichtsaufnahme des Pillarfeldes die genaue Position der fraglichen Pillars zu markieren. Nach dem Spindelexperiment wird dann der Kammerdeckel wieder vorsichtig entfernt. Das Pillarfeld wird mit PBS gespült, in PBS bei 4° C gelagert und möglichst zeitnah nach der in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Methode kalibriert.

Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der in Kapitel 4 beschriebenen Experimenten vorgestellt. Kapitel 5.1 präsentiert die Eigenschaften der hergestellten PEG-Hydrogelstrukturen, in Kapitel 5.2 werden erste Ergebnisse bei der Messung der Kräfte zwischen fusionierenden Mitosespindeln gezeigt.

5.1 Herstellung und Charakterisierung von Hydrogelstrukturen

In diesem Kapitel werden einige nach Kapitel 4.1 hergestellte PEG-Hydrogelmikrostrukturen mit ihren charakteristischen Eigenschaften vorgestellt. Das wichtigste Werkzeug zur Charakterisierung der Strukturen ist dabei das REM (siehe Kapitel 3.1.2), da sich anhand von REM-Aufnahmen auch die dreidimensionale Struktur der Hydrogele ansatzweise erkennen lässt. Bei allen REM-Aufnahmen von PEG-Hydrogelstrukturen ist aber zu beachten, dass die Proben vor der Betrachtung im REM getrocknet und evakuiert werden müssen. Die Strukturen weichen in ihrer Form dadurch teilweise von ihrer Form in Wasser oder Pufferlösung ab. Das macht sich meist nur durch Faltenwurf auf der Hydrogeloberfläche bemerkbar - dünne Pillars können jedoch beim austrocknen teilweise umfallen¹. Trotz dieser Abweichungen vermitteln REM-Aufnahmen in aller Regel einen recht guten Eindruck von der dreidimensionalen Struktur der erzeugten Hydrogele, und liefern dadurch deutlich mehr Informationen als lichtmikroskopische Aufnahmen.

5.1.1 Herstellung per Replika Moulding

PEG-Pillars können mittels RM (siehe Kapitel 4.1.1) weitgehend analog zu PDMS-Pillars hergestellt werden. Allerdings sind die hierbei erreichbaren Aspektverhältnisse

¹Werden Proben mit umgefallenen Pillars wieder mit Wasser benetzt, so richtet sich allerdings die meisten Pillars wieder von selbst auf.

durch die mechanische Belastung der Pillars beim Ablöseprozess vom Abgussmaster nach oben hin beschränkt. Zwar können mit SU-8-Lack mittlerweile Aspektverhältnisse von über 20 erreicht werden [97], aber solche Strukturen sind nicht als Abgussmaster für Pillarfelder geeignet. Mittels RM hergestellte PEG-Pillarfelder lassen sich bei kleinen Aspektverhältnissen manuell gut von vorher silanisierten PDMS-Abgussmastern ablösen. Bei größeren Aspektverhältnissen wird das Abgussmaster inklusive des PEG-Abgusses für einige Zeit in Wasser gelegt. Das Hydrogel quillt dann auf und wird dadurch aus dem Master herausgedrückt. Abbildung 5.1 zeigt mittels RM hergestellte PEG-Pillarfelder.

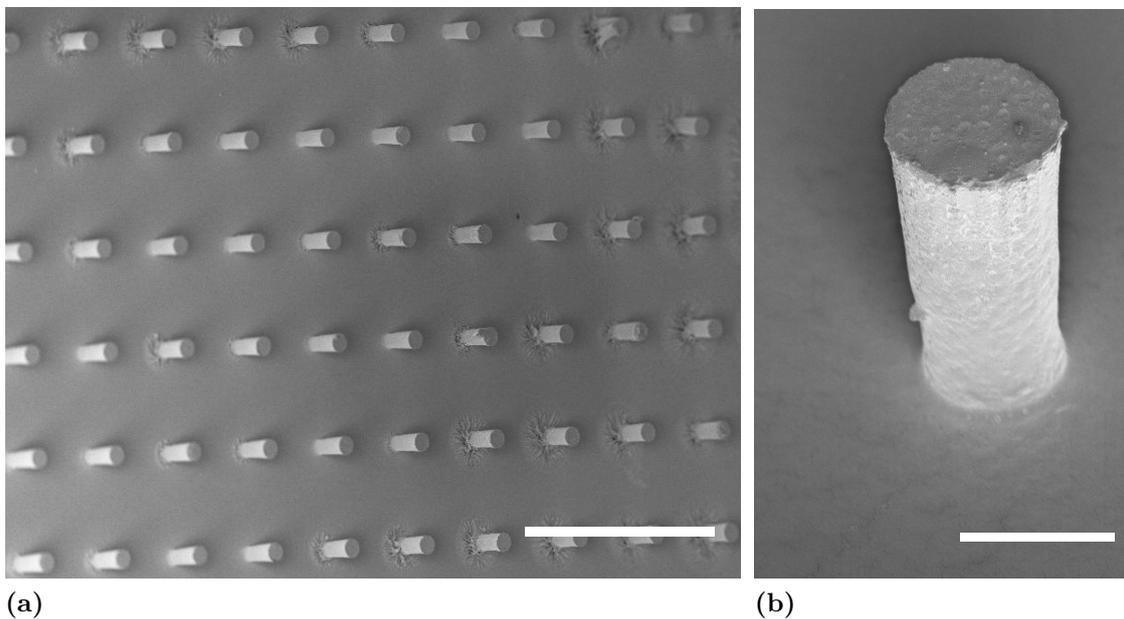


Abbildung 5.1: PEG-Pillarfelder, hergestellt nach dem Replika Moulding Verfahren (elektronenmikroskopische Aufnahmen). (a) Übersichtsaufnahme, Maßstab 200 μm . (b) Detailaufnahme, Maßstab 20 μm .

Es zeigt sich, dass mit dieser Technik großflächige und sehr gleichmäßige Pillarfelder hergestellt werden können. Allerdings wird die Herstellung bei Aspektverhältnissen jenseits von ca. fünf zunehmend schwierig, es brechen immer mehr Pillars beim Ablöseprozess von der Probe ab. Das Hauptproblem ist jedoch, dass keine verlässliche Methode zur spezifischen Biofunktionalisierung der Pillarköpfe entwickelt werden konnte (siehe [60]). Aus diesen und weiteren Gründen (siehe Kapitel 4.1.1) konzentriert sich diese Arbeit auf die Herstellung von Pillarfelder mittels MPL. Dennoch könnte die RM-Methode für bestimmte Anwendungen die Methode der Wahl sein - beispielsweise für Experimente, die keine spezifische Biofunktionalisierung benötigen.

5.1.2 Herstellung per Mikroskop-Projektionslithografie

Mit der MPL-Methode wurde eine große Zahl verschiedener Pillarfelder hergestellt um das Verfahren zu optimieren und die Möglichkeiten und Grenzen dieser Technik auszuloten. Dabei wurden die Pillarfelder vor allem in Hinblick auf die Spindelanzwendung (siehe Kapitel 4.2) optimiert, und dann schließlich auch dafür eingesetzt. Die vorläufigen Ergebnisse der Versuche mit Mitosespindeln finden sich in Kapitel 5.2. In diesem Kapitel werden einige Pillarfelder und andere Hydrogelstrukturen vorgestellt, die mit verschiedenen Parametern fabriziert wurden.

Objektivwahl

Sehr unterschiedliche Ergebnisse erhält man bei der Wahl verschiedener Mikroskopobjektive. Allgemein lässt sich sagen, dass nur Fluoreszenzobjektive ohne Phasenring eingesetzt werden sollten. In Abbildung 5.2 werden die resultierenden Pillarstrukturen bei Verwendung der selben Belichtungsmaske, aber zweier unterschiedlicher Objektive gezeigt. In beiden Fällen war die Aperturblende vollständig geöffnet².

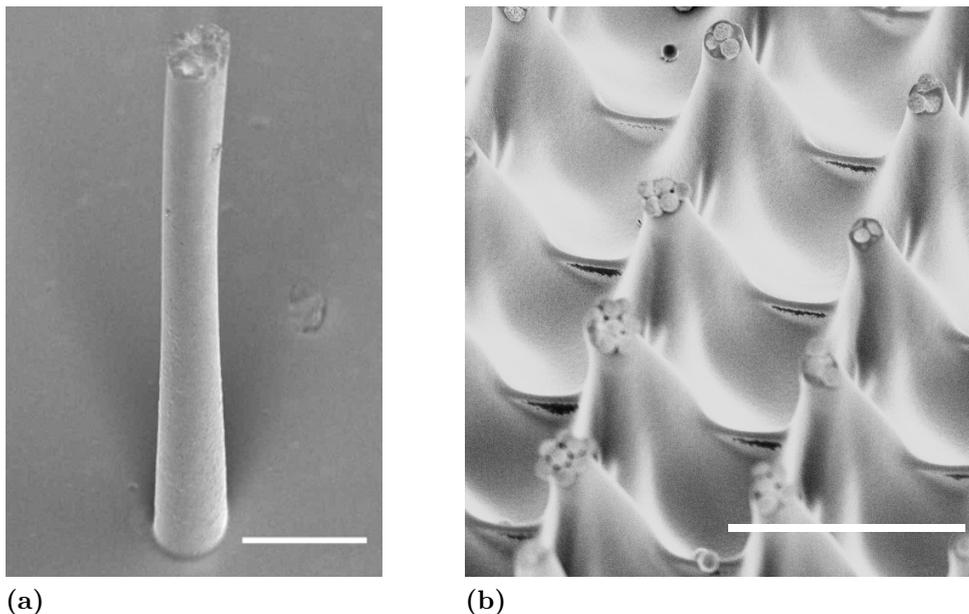


Abbildung 5.2: Auswirkungen des verwendeten Mikroskopobjektivs auf die Form der erzeugten Pillars (elektronenmikroskopische Aufnahmen). (a) Plan-Neofluar 10x/0,3 und (b) Plan-Neofluar 40x/0,75. In (b) ist eine starke Abweichung von der gewünschten zylindrischen Pillarstruktur deutlich zu erkennen. Maßstab 15 μm .

Aus den REM-Aufnahmen lässt sich deutlich erkennen, dass das verwendete 10x

²Bei teilweise geschlossener Aperturblende steigt die notwendige Belichtungszeit rasch an und die Abbildungsgüte wird deutlich schlechter.

Objektiv wegen des geringen Öffnungswinkel seines Beleuchtungskegels am geeignetsten ist für die Herstellung von hohen Pillarstrukturen. Bei der Verwendung von Objektiven mit stärkerer Vergrößerung weichen die erzeugten Pillars immer mehr von der gewünschten Zylinderform ab. Bei geringen Pillarabständen kommt es dann teilweise sogar zum Verschmelzen der einzelnen Strukturen an der Basis.

Belichtungsdauer

Bei längerer Belichtungsdauer fangen die erzeugten Hydrogel-Strukturen an, über die belichtete Region hinauszuwachsen (siehe auch [98]). Zwei Prozesse sind dabei als Ursache denkbar: Entweder diffundieren die erzeugten Initiatorradikale zunehmend in die Umgebung und sorgen dort ab einer bestimmten kritischen Radikalkonzentration ebenfalls für Quervernetzung - oder aber die Quervernetzung wird von Mikroskopstreulicht verursacht. Fakt ist jedenfalls, dass sowohl Belichtungszeit als auch Beleuchtungshomogenität eine große Rolle bei der Erzeugung gleichmäßiger Strukturen spielen, die das Muster der verwendeten Belichtungsmaske qualitativ gut nachbilden. Abbildung 5.3 zeigt Pillarfelder, die mit verschiedenen Belichtungszeiten bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen hergestellt wurden. Der Einfluss von Beleuchtungsinhomogenitäten wird im nächsten Abschnitt nochmals genauer erörtert.

Wahl der UV-Quelle

Neben der Belichtungszeit spielt auch die Beleuchtungsstärke eine erhebliche Rolle bei der Herstellung qualitativ hochwertiger Hydrogelstrukturen. Es zeigte sich bei den Experimenten immer wieder, dass schon eine leichte Dejustage der anfangs verwendeten Quecksilberdampf Lampe (HBO-100, Zeiss) zu erheblichen Inhomogenitäten in den hergestellten Pillarfeldern führt. Es ist jedoch äußerst schwierig, die HBO-Lampe exakt zu justieren - und selbst bei sorgfältigster Justage bleiben unvermeidbare Inhomogenitäten im Lichtkegel übrig. Zudem besitzen die Birnen für die HBO-Lampe eine maximale Brenndauer von 300 Stunden - zu wenig, um reproduzierbare Versuchsbedingungen über einen langen Zeitraum zu garantieren. Aus diesen Gründen wurde auch mit einer 120 W-Metallhalidlampe mit 1500 Stunden Brenndauer (X-Cite 120 PC, EXFO) als UV-Quelle experimentiert. Es zeigte sich, dass sich mit der X-Cite 120 PC wesentlich leichter homogene Pillarfelder herstellen lassen als mit der HBO-100-Lampe. Im folgenden wurde deshalb meist die X-Cite 120 PC verwendet.

Belichtungsmaskendesign

Pillardurchmesser und -Anordnung werden im wesentlichen durch die verwendete Belichtungsmaske bestimmt. Es wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit anfangs zahlreiche unterschiedliche Belichtungsmasken hergestellt, um Möglichkeiten und Grenzen des Belichtungsmaskendesigns auszuloten. Später wurden die Masken dann

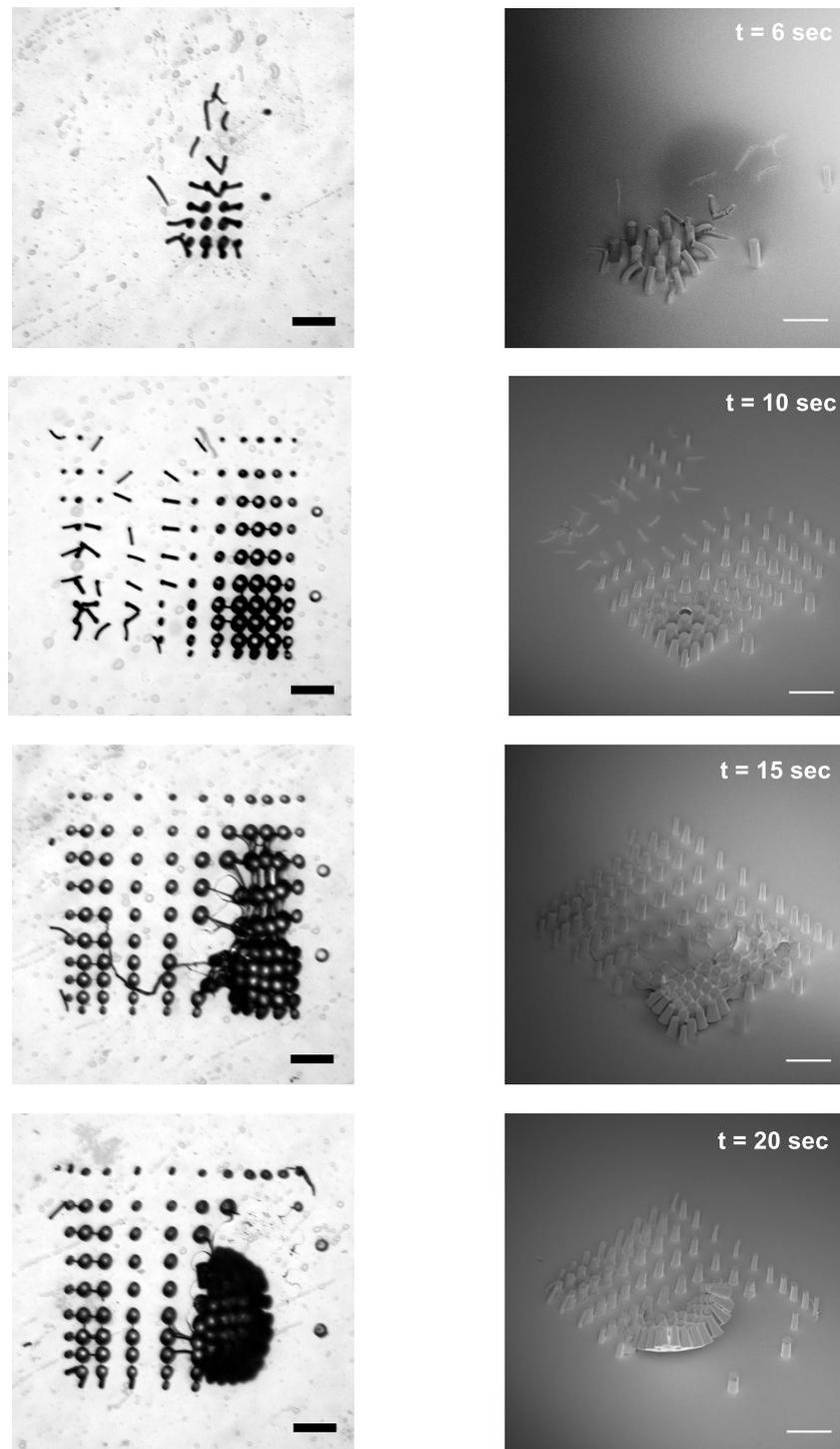


Abbildung 5.3: Auswirkungen der Belichtungsdauer auf die entstehenden Pillars (links lichtmikroskopische, rechts elektronenmikroskopische Aufnahmen). Es wurde eine Maske mit verschiedenen Pillar-Abständen verwendet, um die Auswirkungen der Belichtungsdauer auf unterschiedliche Pillarstrukturen gleichzeitig in einem Experiment untersuchen zu können. Die Pillarlöcher in der Maske haben alle den selben Durchmesser - Unterschiede in der resultierenden Hydrogelstruktur beruhen auf der hier verwendeten, schlecht justierten HBO 100 - Lampe als UV-Quelle (siehe Text). Es zeigt sich, dass eng beieinander stehende Pillars schon nach wenigen Sekunden miteinander verschmelzen (rechts unten im Bild), wohingegen weit auseinander stehende Pillars erst sehr viel später von diesem Phänomen betroffen sind. Maßstab 200 μm .

hinsichtlich der Mitosespindelanwendung optimiert. Die letztendlich optimale Maskenstruktur ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Abbildung 5.5 zeigt Pillars, die mit dieser Maske hergestellt wurden.

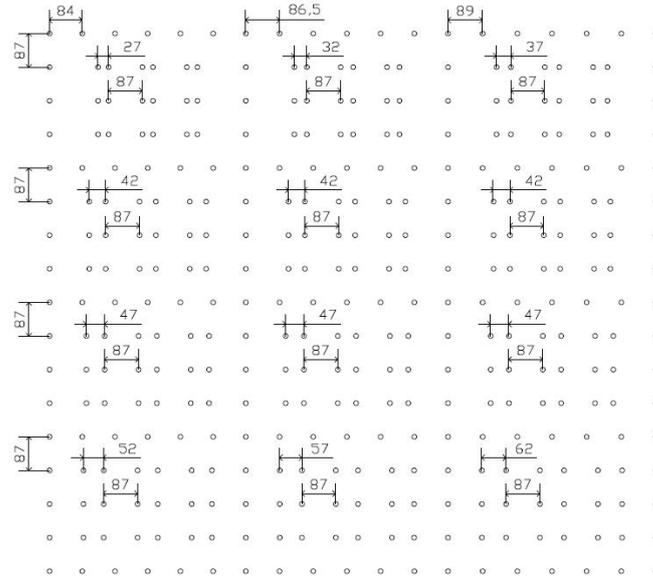


Abbildung 5.4: Die für die Spindelversuche letztlich meistens verwendeten Maskenstruktur SLA009 (schematische Darstellung). Die Zahlen geben die markierten Abstände im hergestellten Pillarfeld in μm an. Der Durchmesser der Pillarlöcher beträgt $12\mu\text{m}^3$.

sonstige Beobachtungen

Abbildung 5.6 zeigt einige weitere interessante Beobachtungen bei der Pillarherstellung. Die MPL-Methode ist nicht auf Pillarstrukturen beschränkt. Bei Verwendung entsprechender Belichtungsmasken können beliebige quasi-dreidimensionale Hydrogelstrukturen erzeugt werden (vergleiche Abbildung 5.6 (a)). Die dünnsten experimentell beobachteten Pillars hatten einen Durchmesser von etwa $(5 \pm 2) \mu\text{m}$. Pillars mit Durchmessern von unter etwa $10 \mu\text{m}$ fallen beim Austrocknen der Probe meist um (vergleiche Abbildung 5.6 (b)). Abbildung 5.6 (c) demonstriert die Notwendigkeit, unter Luftabschluss zu arbeiten. In diesem frühen Experiment wurde statt dem Aufbau aus Abstandshaltern und Deckglas eine PDMS-Flusszelle als Probenkammer verwendet. PDMS ist allerdings durchlässig für Luftsauerstoff. Dieser hemmt die Quervernetzungsreaktion des PEG und verhindert somit die Ausbildung von annähernd zylinderförmigen Pillars (vergleiche auch [19]).

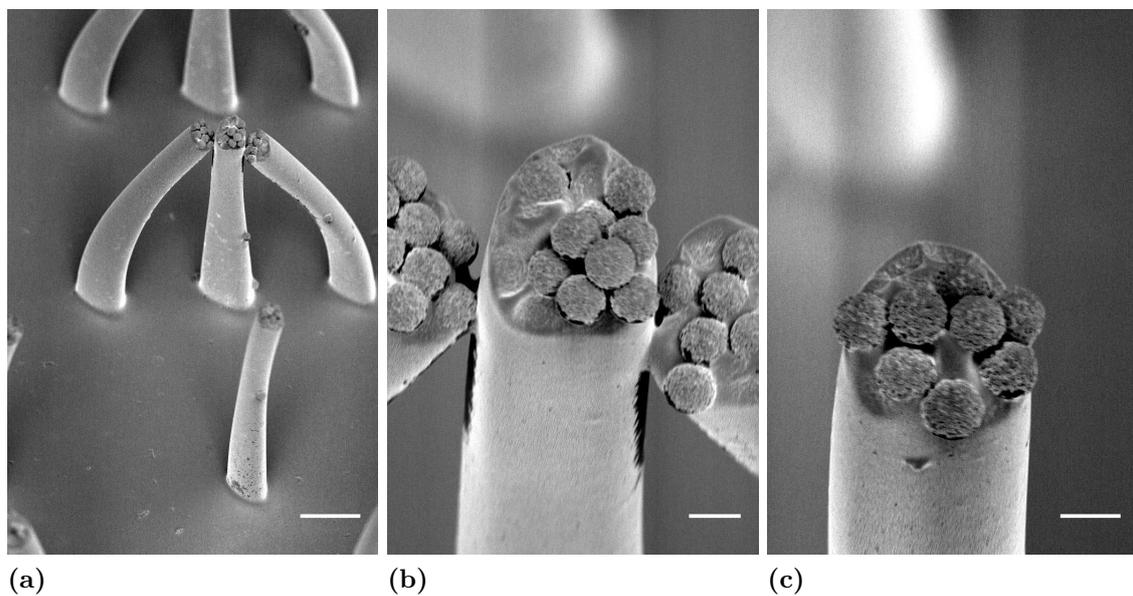


Abbildung 5.5: Pillars, die mit der Belichtungsmaske SLA009 hergestellt wurden (elektronenmikroskopische Aufnahmen). Die Pillars haben den für die Spindelassembly benötigten Durchmesser zwischen $12\ \mu\text{m}$ und $17\ \mu\text{m}$. Deutlich zu erkennen sind auch die gut exponierten Streptavidin-bedeckten Beads auf den Pillarköpfen. Die Verbiegung der äußeren Pillars hingegen ist ein durch das Trocknen verursachtes Artefakt. Maßstab $20\ \mu\text{m}$ (a) und $3\ \mu\text{m}$ (b) und (c).

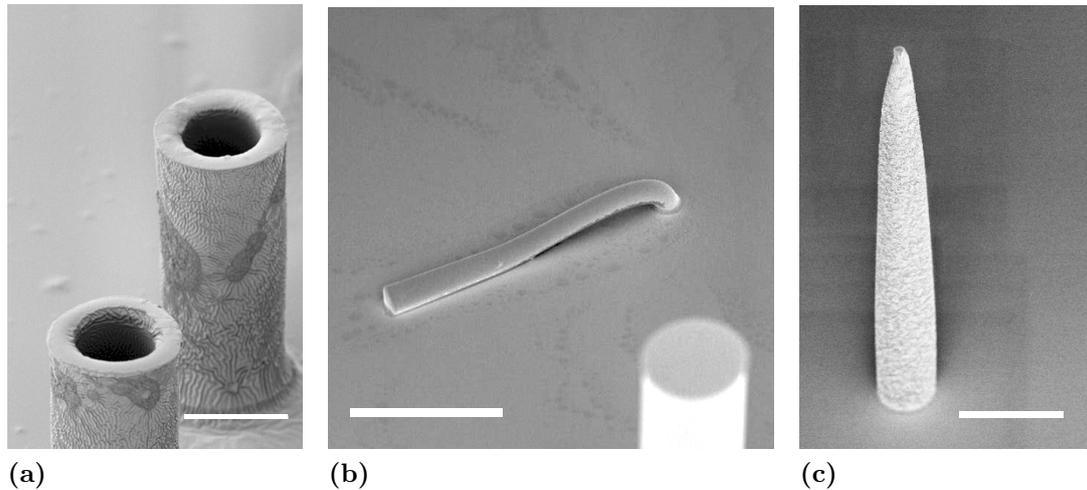


Abbildung 5.6: Verschiedene Pillarvarianten (elektronenmikroskopische Aufnahmen). (a) Durch die Verwendung von Donut-förmigen Belichtungsmaskenstrukturen können Tori erzeugt werden. (b) Ein Pillar mit Durchmesser von ca. $8 \mu\text{m}$, der beim trocknen umgeknickt ist. (c) Solche nach oben hin spitz zulaufenden Pillars erhält man, wenn man die Probenkammer nicht mit einem Deckglas, sondern mit einer Flusszelle aus PDMS verschließt. Maßstab $50 \mu\text{m}$.

Funktionalisierung

Die erfolgreiche Übertragung von Streptavidin-Beads auf die Hydrogelstruktur nach Kapitel 4.1.3 lässt sich ohne großen Aufwand im Lichtmikroskop überprüfen. Ob die Beadoberflächen aber auch frei zugänglich sind - und nicht etwa vollständig in das Hydrogel inkorporiert, lässt sich erst anhand von REM-Aufnahmen klar erkennen. Abbildung 5.7 zeigt beadfunktionalisierte Pillars, die mit leicht unterschiedlichen Herstellungsmethoden erzeugt wurden.

Wird die Probenkammer also wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben zusammengebaut, dann bleiben die Beadoberflächen exponiert. Dennoch bleibt auch in diesem Fall zu überprüfen, ob das Streptavidin die harschen Produktionsbedingungen auch unbeschadet übersteht. Abbildung 5.8 zeigt das Ergebnis des Funktionalisierungstests mit DAPI-gefärbten DNA-Beads nach Kapitel 4.1.3.

Die DNA-Beads binden also spezifisch an die Pillarköpfe an. Somit ist nachgewiesen, dass die Pillarköpfe spezifisch mit Streptavidin funktionalisiert werden können.

Writing-Verfahren

Eine interessante Variante der Pillarherstellung mittels MPL ist das sogenannte *Writing-Verfahren*. Anstatt für jede neue Pillaranordnung eine neue Belichtungsmaske herzustellen - was mit erheblichem Aufwand oder erheblichen Kosten verbunden ist - wird das gewünschte Pillarfeld mit einer Punktmaske Pillar für Pillar

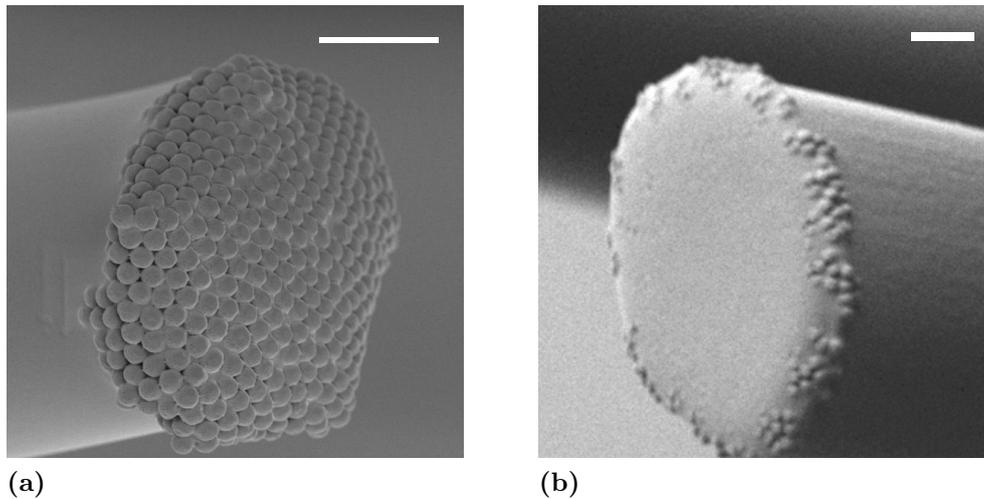


Abbildung 5.7: Funktionalisierung der Pillarköpfe mit Streptavidinbeads bei leicht unterschiedenen Herstellungsverfahren (elektronenmikroskopische Aufnahmen). (a) Die Probenkammer wurde nach der in Kapitel 4.1.3 vorgestellten Methode befüllt. Die Beads ragen weit aus dem PEG-Hydrogel heraus und exponieren ihre Streptavidinfunktionalisierung. (b) Das Deckglas mit den Beads wurde analog zu Abbildung 4.2 auf einen Tropfen PEG-Prepolymer gelegt. Die Beads wurden dadurch in das Hydrogel inkorporiert. Maßstab 10 μm .

in die PEG-Probe geschrieben. Dazu wird eine Belichtungsmaske mit nur einem einzigen durchsichtigen Punkt verwendet. Alternativ kann auch auf eine kommerziell erhältliche LSM-Lochblende als Belichtungsmaske zurückgegriffen werden. So wird bei jedem Belichtungsschritt nur ein einzelner Pillar auf der Probe quervernetzt. Nun fährt man nun mit Hilfe des mikrometergenau steuerbaren Piezo-Probentisches sukzessive alle gewünschten Pillarpositionen einzeln an und belichtet dann jeweils für einige Sekunden. Die gewünschte Pillaranordnung kann am Computer mittels CAD-Programm entworfen werden (AutoCAD, Autodesk). Ein eigens geschriebenes Steuerungsprogramm (LSM Stage Control) für den LSM-Probentisch stellt dann vollautomatisch das gewünschte Pillarfeld her. Technische Details zum Steuerungsprogramm finden sich in [60]. Die Abbildungen 5.9 und 5.10 zeigen mittels Writing-Verfahren hergestellte Pillarfelder.

Das Verfahren eignet sich insbesondere dazu, in kurzer Zeit mehrere verschiedene Pillaranordnungen für ein Experiment herzustellen (*rapid prototyping*). Dadurch kann beispielsweise der optimale Pillarabstand für das Experiment bestimmt werden. Allerdings weichen die so hergestellten Pillars bisher deutlich stärker von der gewünschten Zylinderform ab, als bei der Herstellung mittels klassischer MPL. Bei eng stehenden Pillars kommt es außerdem schneller zum Verschmelzen der Strukturen. Zudem ist zwar die Pillaranordnung frei wählbar - der Pillardurchmesser wird aber durch die verwendete Belichtungsmaske vorgegeben. Aus diesen Gründen wird

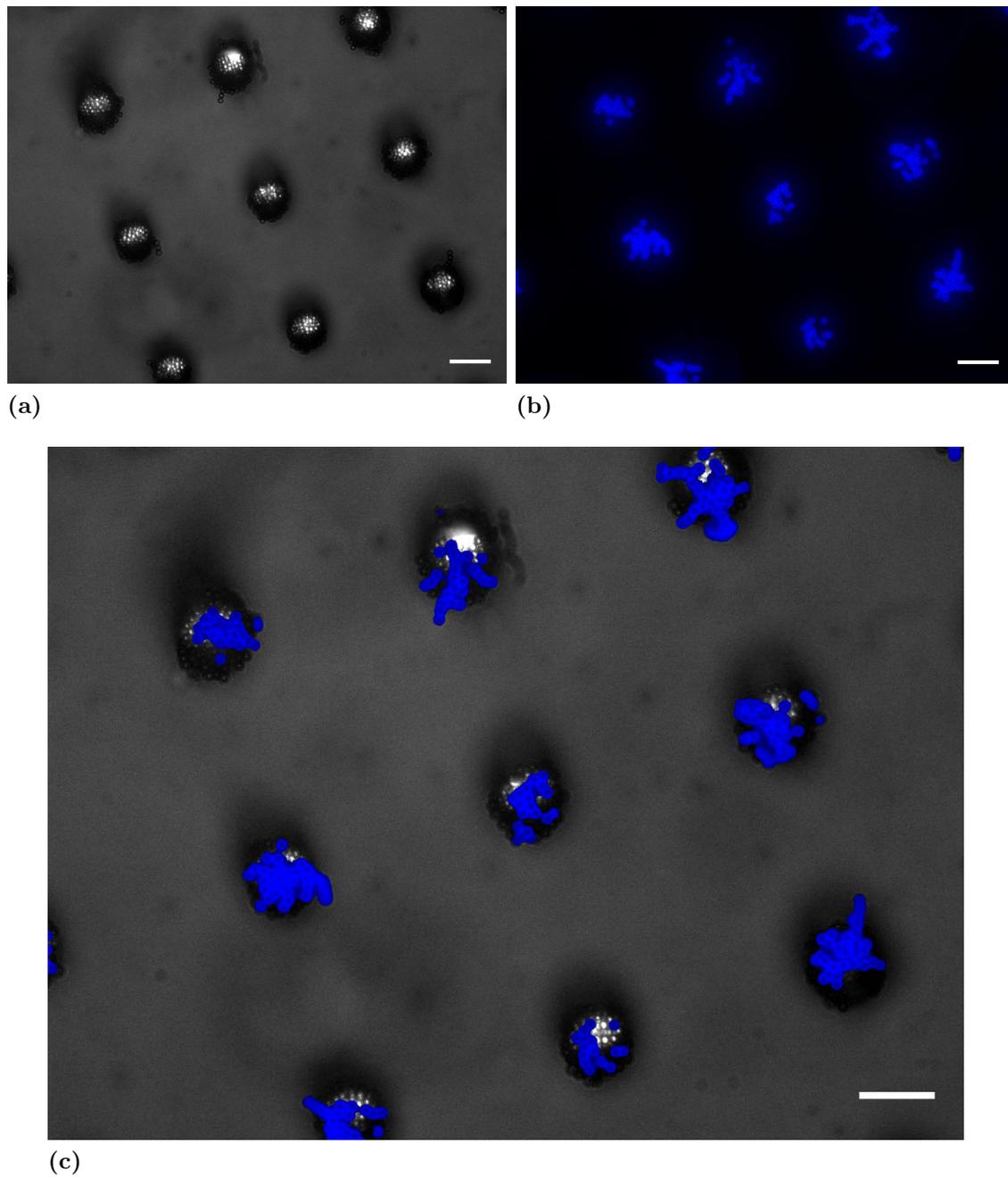


Abbildung 5.8: Fluoreszierende DNA-Beads haben spezifisch auf den Pilarköpfen gebunden (lichtmikroskopische Aufnahmen). (a) Hellfeldaufnahme. (b) Fluoreszenzaufnahme. (c) Im übereinandergelegten Vergleichsbild lassen sich DNA- (blau) und normale Beads (grau) deutlich unterscheiden. Maßstab 20 μm .

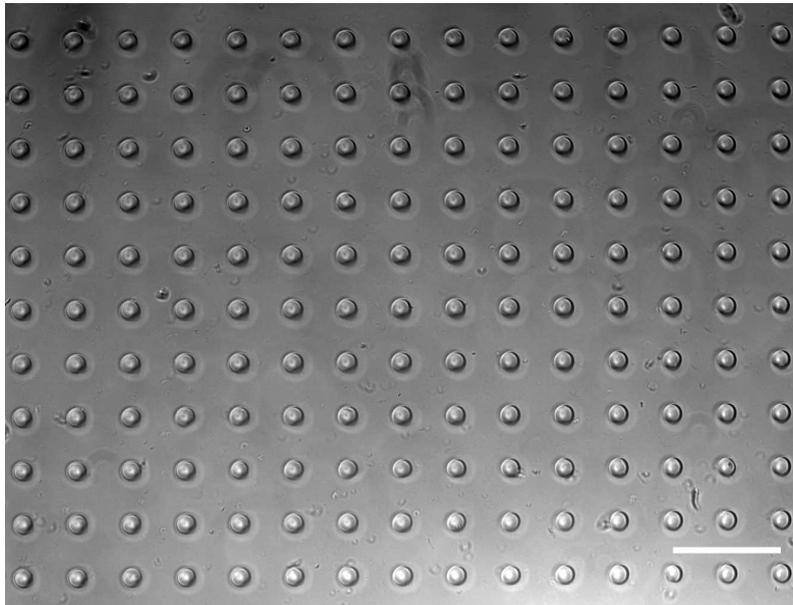


Abbildung 5.9: Ein mittels Writing-Verfahren hergestelltes Pillarfeld (lichtmikroskopische Aufnahme). Maßstab $200\ \mu\text{m}$.

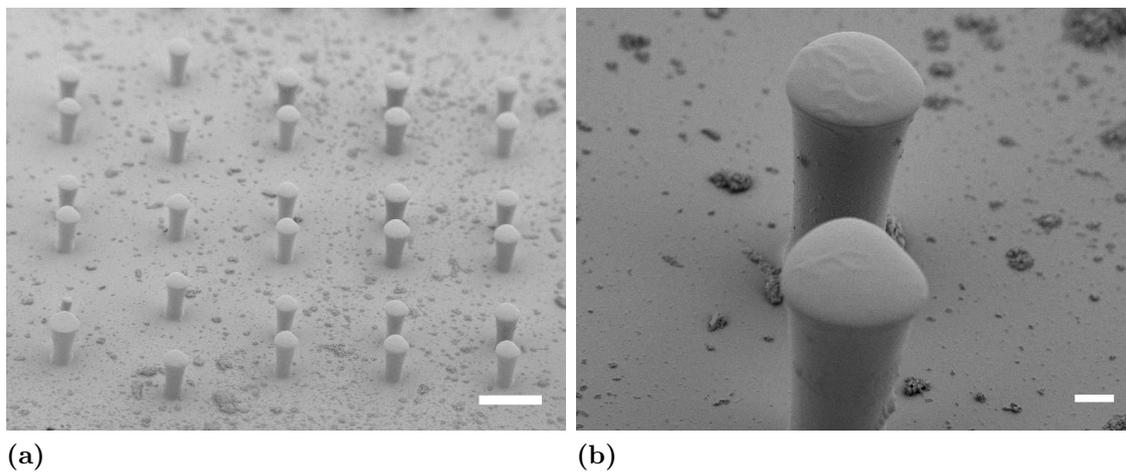


Abbildung 5.10: Ein mittels Writing-Verfahren hergestelltes Pillarfeld (elektronenmikroskopische Aufnahmen). (a) Übersichtsaufnahme, Maßstab $200\ \mu\text{m}$. (b) Detailaufnahme zweier Pillars. Zu erkennen ist die deutliche Abweichung von der Zylinderform. Maßstab $20\ \mu\text{m}$.

die Technik in der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingesetzt. Für Anwendungen, die keine großen Anforderungen an die Pillargeometrie stellen, kann sie jedoch unter Umständen eine erhebliche Zeitersparnis ermöglichen.

Line-Writing-Verfahren

Eine weitere Variation stellt das sogenannte *Line-Writing-Verfahren* dar. Wie beim Writing-Verfahren fährt der Probestisch computergesteuert ein vorgegebenes CAD-Muster ab. Der Unterschied liegt in der durchgehenden Belichtung: Anders als beim Writing-Verfahren wird der Lampenshutter nicht nur an den Zielpunkten kurz geöffnet, sondern bleibt die ganze Zeit offen. Dadurch werden keine Punkte, also Pillars - sondern Linien, also Wände aus Hydrogel erzeugt. Mit diesem Verfahren können somit ohne großen Aufwand Kammern mit Hydrogelwänden hergestellt werden. Abbildung 5.11 zeigt ein Beispiel.

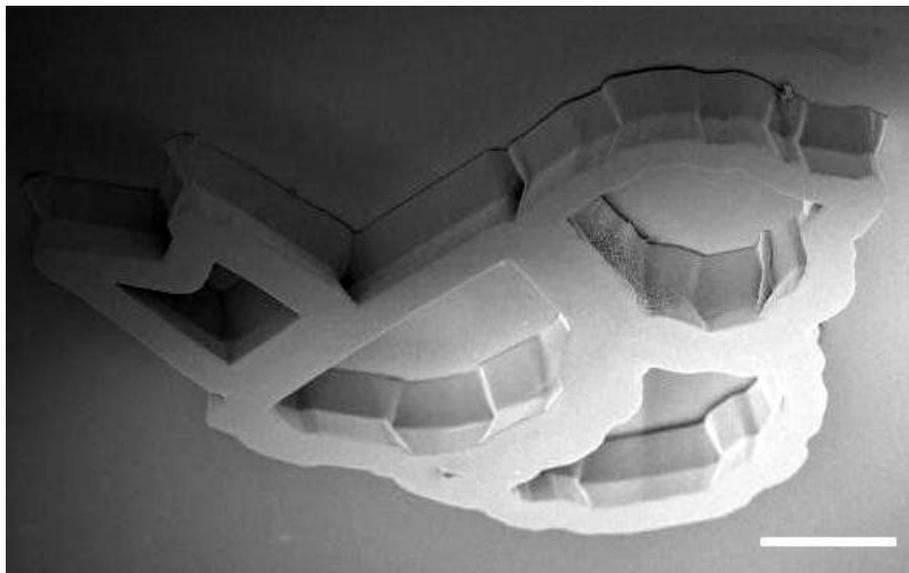
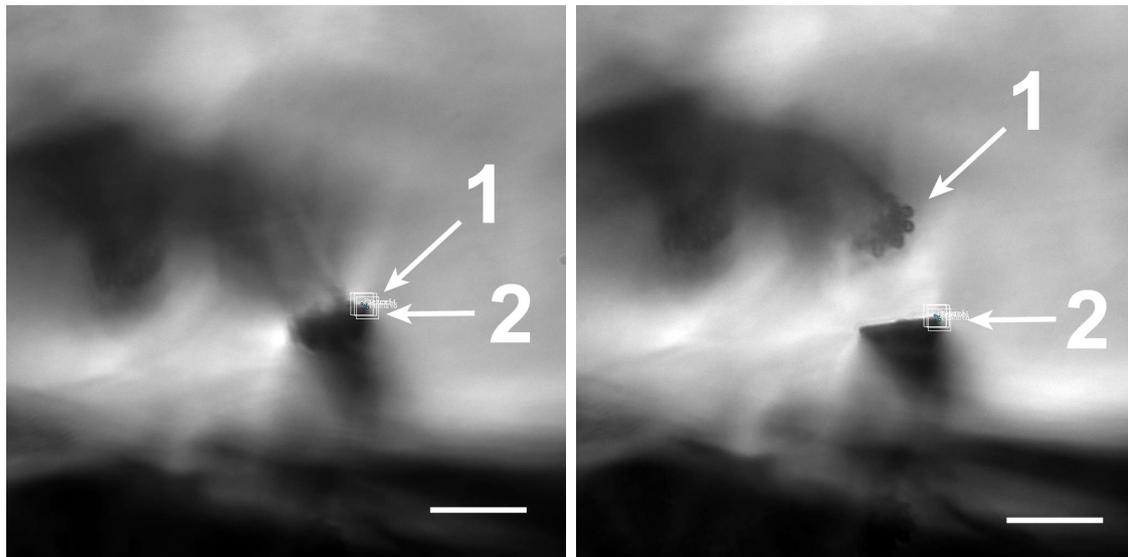


Abbildung 5.11: Beispiel für eine mit dem Line-Writing-Verfahren hergestellte **Kammerstruktur** (elektronenmikroskopische Aufnahme). Maßstab 200 μm .

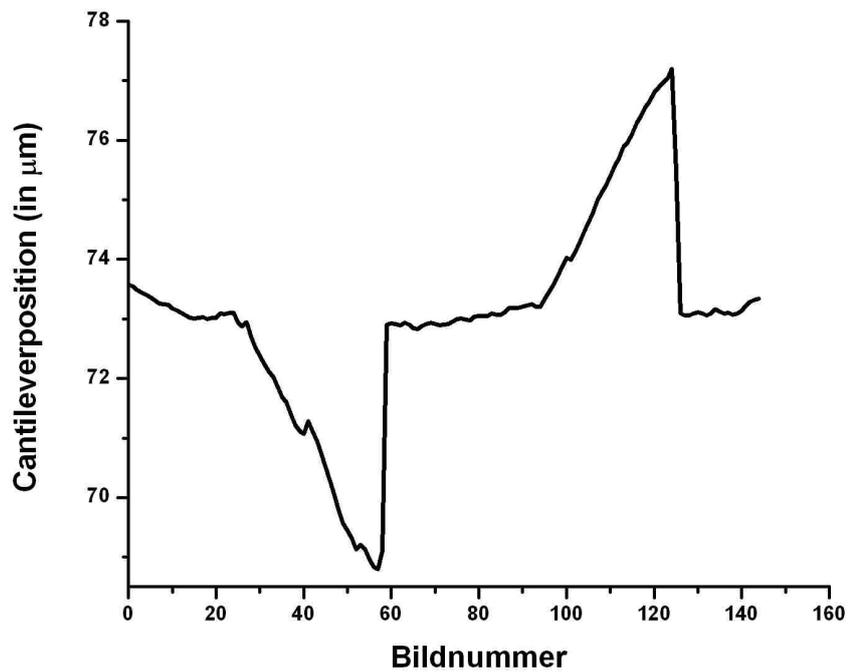
5.1.3 Kalibrationsergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere verschiedene Pillars mit der in Kapitel 4.1.4 vorgestellten Kreuzkalibrationsmethode gegen einen AFM-Cantilever kalibriert. Wie erwartet ergaben sich je nach verwendeter PEG-Mischung und je nach Pillardurchmesser sehr unterschiedliche Federkonstanten. Abbildung 5.12 zeigt eine charakteristische Kalibrationskurve eines vergleichsweise festen Pillars mit einer Federkonstanten, die nur etwa um den Faktor 10 kleiner ist als die des verwendeten Cantilevers.



(a)

(b)



(c)

Abbildung 5.12: Kalibrationskurve für einen vergleichsweise harten Pillar. (a) Mikroskopieaufnahme des vom Cantilever (2) maximal ausgelenkten Pillars (1). Die kleinen Quadrate markieren die mit ICARUS getrackten Features. (b) Die Situation unmittelbar nach dem Zurückschnappen. Maßstab $25 \mu\text{m}$. Der Durchmesser des Pillars wird zu $(14,6 \pm 2) \mu\text{m}$ bestimmt. (c) Die ermittelte Pillar-Trajektorie. Aus ihr ergibt sich eine Federkonstante von $(2,3 \pm 0,3) \text{ nN}/\mu\text{m}$.

Es zeigen sich deutlich die in Kapitel 4.1.4 beschriebenen charakteristischen Bereiche in der Kalibrationskurve. Zu Abweichungen kommt es in der Praxis allerdings manchmal unmittelbar vor dem Zurückschnapp-Punkt: Der Cantilever rutscht vor dem endgültigen Zurückschnappen häufig in mehreren Schritten über die Beads auf dem Pillarkopf. Dadurch kommt es zu teils starken Ausschlägen in der Kalibrationskurve. Dieser Bereich darf bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Je stärker sich die Federkonstanten von Pillar und Cantilever unterscheiden, desto ungleicher sind die jeweiligen Auslenkungen. Das macht die Kalibration weicher Pillars zunehmend schwierig, da dann sehr kleine Cantileverauslenkungen mit hoher Genauigkeit getrackt werden müssen. Abbildung 5.13 zeigt charakteristische Kalibrationskurven für im Vergleich zum verwendeten Cantilever sehr weiche Pillars.

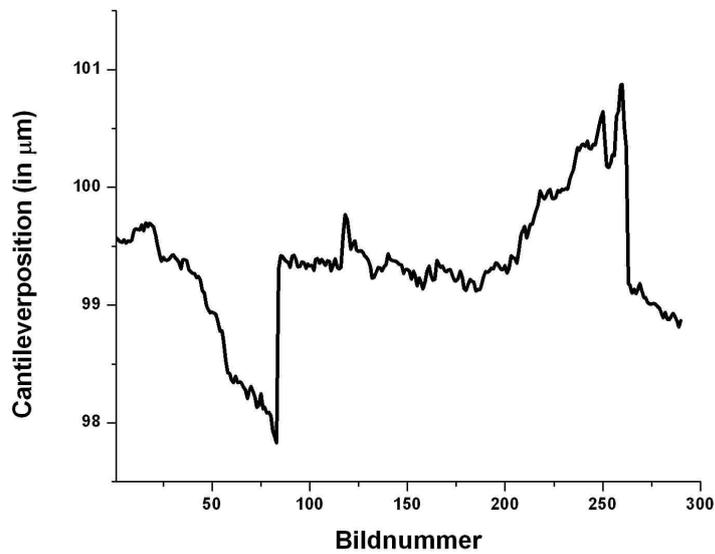
Die Abbildung zeigt, dass diese Kalibrationsmethode bei Pillars mit Federkonstanten von etwa $(0,3 \pm 0,2)$ nN/ μm an ihre Grenzen stößt. Für die durchgeführten Kalibrationen wurden bereits die empfindlichsten kommerziell erhältlichen Cantilever verwendet, die eine für die Pillarkalibration geeignete Geometrie besitzen⁴ (MLCT oder MSNL-10, beide mit $k_C = 20$ nN/ μm , beide Veeco). Trotzdem ist die Kalibrationsgrenze bei Verwendung einer 2:1 Mischung von PEG-400 und PBS-Puffer bereits bei Pillars mit (12 ± 2) μm Durchmesser erreicht. Federkonstanten in dieser Größenordnung sind zwar bereits für die Mitosespindelanwendung geeignet (siehe Kapitel 5.2.1) - es lassen sich jedoch auch noch um mehrere Größenordnungen weichere Pillars herstellen. Dünne Pillars aus langkettigen Prepolymeren eignen sich aber vorläufig nur dazu, angreifende Kräfte im Piconewton-Bereich qualitativ nachzuweisen - für eine quantitative Messung muss erst noch eine empfindlichere Kalibrationstechnik entwickelt werden.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit nur einige wenige Pillars kalibriert, um die Machbarkeit des Vorgehens zu zeigen. Abbildung 5.14 zeigt die dabei für Pillars aus der Standard-Prepolymerlösung⁵ ermittelten Federkonstanten in Abhängigkeit vom Pillardurchmesser. Außerdem ist die für perfekt zylinderförmige Pillars nach Gleichung 2.1 erwartete Abhängigkeit eingezeichnet, geeicht auf den Messwert für einen Pillar mit Durchmesser $(14,6 \pm 2,0)$ μm ⁶. Die Messwerte lassen einen ähnlichen Zusammenhang wie bei zylinderförmigen Pillars vermuten. Für eine definitive Aussage müssen allerdings erst noch wesentlich mehr Kalibrationsmessungen durchgeführt werden.

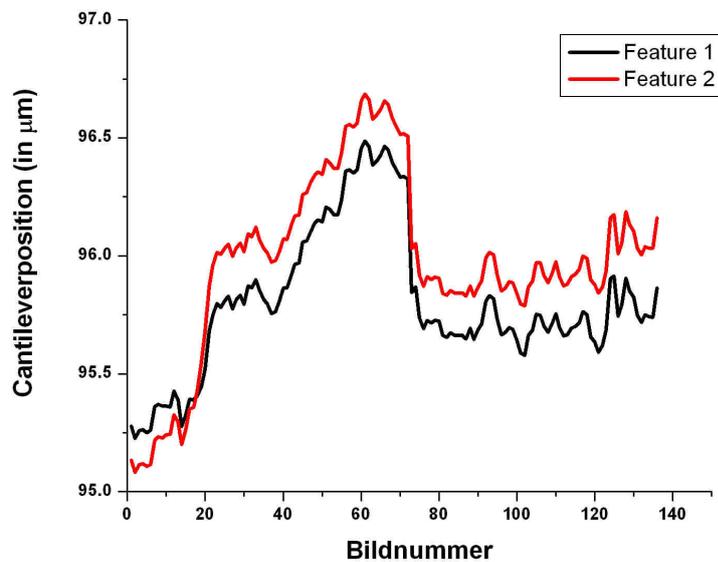
⁴Geeignet sind nur Cantilever mit Rechteckgeometrie. Dreiecksgeometrien verdecken in den Mikroskopieaufnahmen den getrackten Pillar.

⁵PEG-400, 2:1 mit PBS gemischt, 8 mg Irgacure-Initiator pro ml Lösung

⁶Aufgrund der Beadfunktionalisierung sind die Pillardurchmesser nur auf etwa 2μ genau abschätzbar.



(a)



(b)

Abbildung 5.13: Kalibrationskurven für vergleichsweise weiche Pillars. Ergebnisse: (a) Durchmesser: $(14,6 \pm 2) \mu\text{m}$, Federkonstante: $(0,48 \pm 0,2) \text{ nN}/\mu\text{m}$. (b) Zu sehen ist in diesem Fall nur die Auslenkung in eine Richtung. Der Vergleich der Tracking-Ergebnisse zweier verschiedener Features zeigt deutlich, dass die Kalibrationsmethode hier an ihre Grenzen stößt. Die Federkonstante des Pillars mit Durchmesser $(12,2 \pm 2) \mu\text{m}$ wurde auf $(0,3 \pm 0,2) \text{ nN}/\mu\text{m}$ bestimmt.

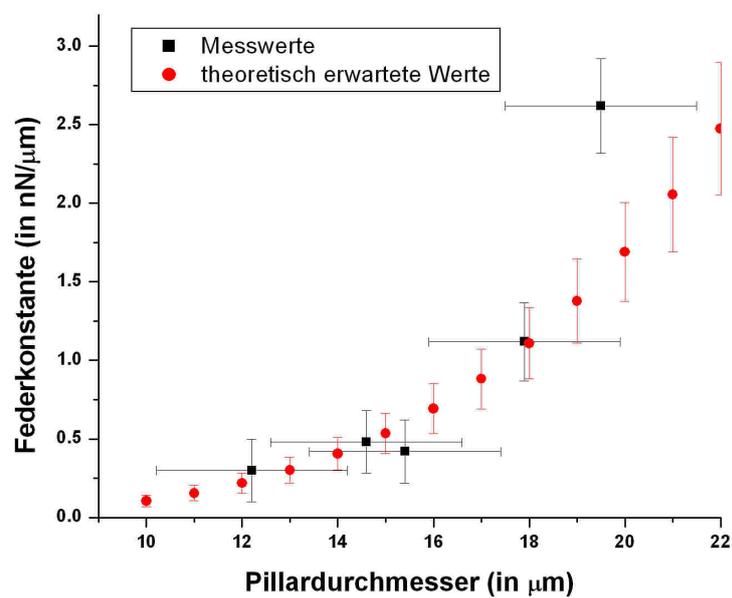


Abbildung 5.14: Zusammenhang zwischen Pillardurchmesser und Federkonstante. Eingezeichnet sind gemessene Werte für kalibrierte Pillars (schwarz), und die für zylinderförmige Pillars theoretisch erwartete Kurve, geeicht auf den Messwert bei $14,6 \mu\text{m}$ Durchmesser (rot). Die Verteilung der Messwerte lässt einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Durchmesser und Federkonstante vermuten.

5.2 Nachweis der Eignung als Kraftsensor

In diesem Kapitel wird das Anwendungspotenzial der PEG-Pillar-Technologie anhand der Beispielanwendung der fusionierenden Mitosespindeln demonstriert. Kapitel 5.2.1 zeigt experimentell beobachtete Pillarverbiegungen durch Mikrotubuli-Ansammlungen in *Xenopus*-Extrakt, Kapitel 5.2.2 liefert einen Überblick über Probleme und erste Erfolge beim Versuch, fusionierende Mitosespindeln auf den Pillarköpfen zu assemblieren.

5.2.1 Beobachtete Pillarverbiegungen

In einem frühen Experiment mit DNA-funktionalisierten PEG-Pillars in *Xenopus* Extrakt konnten unförmige Mikrotubulistrukturen (vergleiche Kapitel 5.2.1, Fall 2) auf den Pillarköpfen assembliert werden. Die Strukturen interagieren miteinander und führen dadurch zu einer Verbiegung der entsprechenden Pillars (siehe Abbildung 5.15).

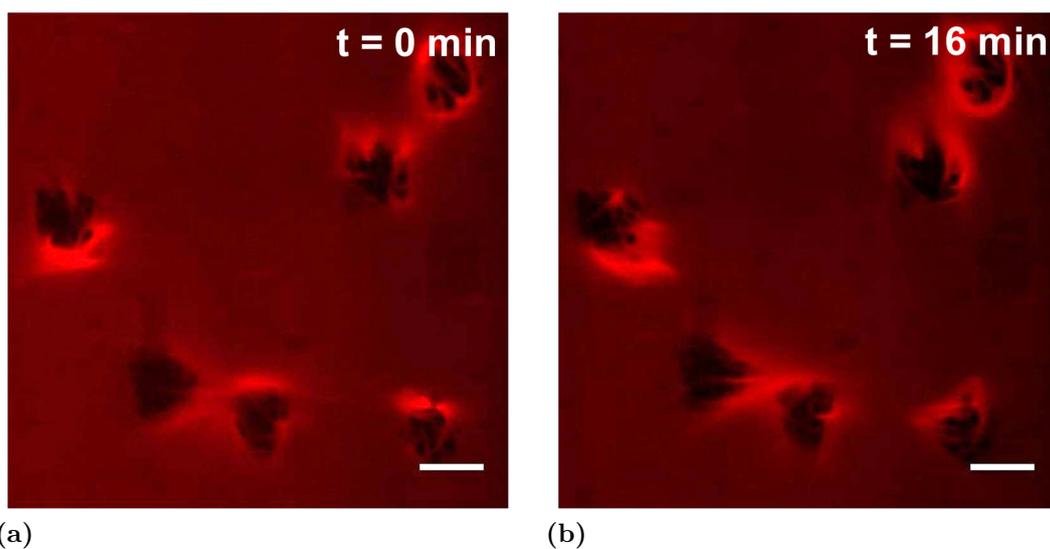


Abbildung 5.15: Beobachtete Pillarverbiegung aufgrund von pillarassoziierten Mikrotubuliansammlungen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Unförmige Mikrotubuli-Ansammlungen (rot) auf den Pillarköpfen (schwarz), die teilweise miteinander wechselwirken und dadurch die Pillars verbiegen. Zu sehen sind zwei Momentaufnahmen aus einem Video. Maßstab 20 μm .

Zum Zeitpunkt des Experiments konnte aus technischen Gründen der DAPI-Kanal nicht beobachtet werden. Daher ist ein exaktes tracken der Pillarpositionen nicht möglich. Ein Falschfarbenbild (Abbildung 5.16) zeigt jedoch deutlich die Verbiegungen der Pillars.

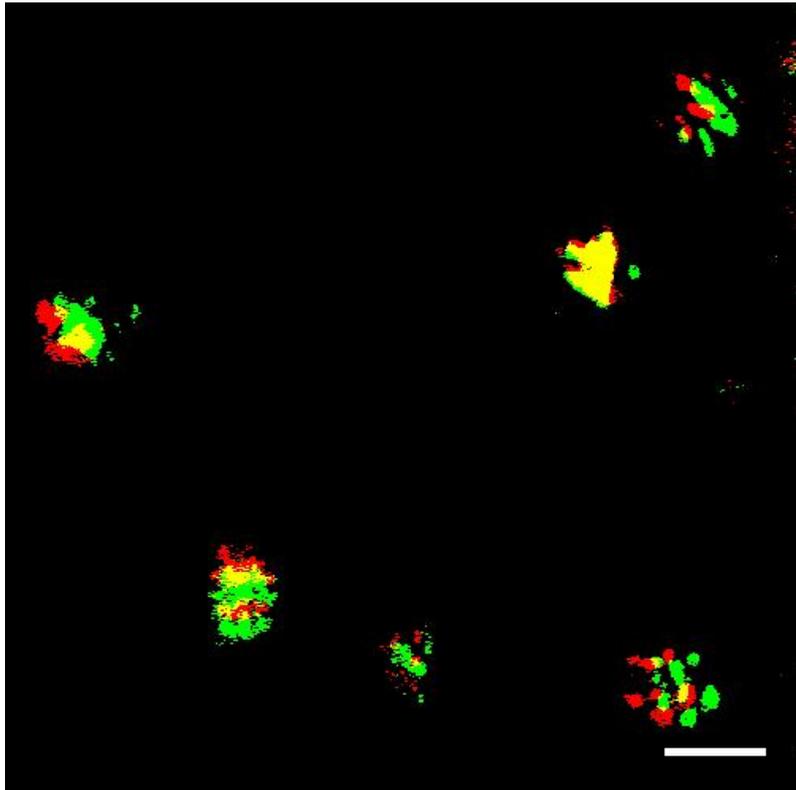


Abbildung 5.16: Rekonstruierte Pillarverbiegung aufgrund der pillarassoziierten Mikrotubuliansammlungen (Falschfarbendarstellung). Die Pillarpositionen aus Abbildung 5.15 (a) sind grün, die aus Abbildung 5.15 (b) sind rot eingefärbt. Überlagerungen der beiden Positionen sind gelb dargestellt. Der vollständig gelb gefärbte Pillar hat demnach seine Position zwischen den beiden Bildern nicht verändert. Maßstab 20 μm .

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Pillars in verschiedene Richtungen verbiegen. Damit ist ausgeschlossen, dass ein Drift für die beobachtete Positionsänderung der Pillarköpfe verantwortlich ist. Leider konnten die in diesem Experiment wirkenden Kräfte nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt des Experiments noch keine Methode zur Pillarkalibration zur Verfügung stand. Die maximal wirkenden Kräfte können aber grob abgeschätzt werden:

Legt man nach Kapitel 5.1.3 eine Federkonstante von etwa $0,48 \text{ nN}/\mu\text{m}$ bei $14,6 \mu\text{m}$ Pillardurchmesser zugrunde, und geht man von zylinderförmigen Pillars aus, so ergeben sich für die hier beobachteten Pillars mit ca. $12 - 18 \mu\text{m}$ Durchmesser nach Gleichung 2.1 bei einer Auslenkung um maximal $5 \mu\text{m}$ Kräfte im Bereich $1,1 - 5,5 \text{ nN}$.

In einem anderen Experiment wurde eine Verbiegung eines Pillars aufgrund von sich bewegenden, netzartigen Mikrobutulistrukturen beobachtet, die nicht mit den Pillarköpfen assoziiert waren (siehe Abbildung 5.17).

Die Verbiegung des Pillars kann mit der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methode auf etwa 100 nm genau getrackt werden. Abb. 5.18 zeigt die entsprechende Pillartrajektorie. In der abgeschlossenen Versuchskammer herrscht keinerlei Strömung, daher ist die Bewegung vermutlich auf Prozesse in dem Netzwerk aus Mikrotubuli und molekularen Motoren zurückzuführen.

Die Federkonstante des Pillars mit einem Durchmesser von ca. $10 \mu\text{m}$ liegt unter der gegenwärtigen Kalibrationsgrenze von $0,3 \text{ nN}/\mu\text{m}$. Allerdings lässt sich auch hier die Größenordnung der wirkenden Kraft analog zu oben grob abschätzen. Für den Pillar ergibt sich dadurch eine Federkonstante in der Größenordnung $100 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Bei einer Auslenkung um $5 \mu\text{m}$ entspricht das $0,5 \text{ nN}$.

Die hier abgeschätzten Kräfte sind mit großen Unsicherheiten behaftet, aber in etwa konsistent mit den Erwartungen. Klar demonstrieren sie zudem die Eignung der Pillars zur Detektion der von Mitosespindeln ausgeübten Kräfte, die etwa eine Größenordnung höher ausfallen dürften (vergleiche Kapitel 3.5.5). Allerdings ist die Assemblierung von fusionierenden Mitosespindeln auf den Pillarköpfen kein einfaches Experiment. Im nächsten Kapitel werden in dieser Hinsicht die Probleme und bisherigen Erfolge vorgestellt.

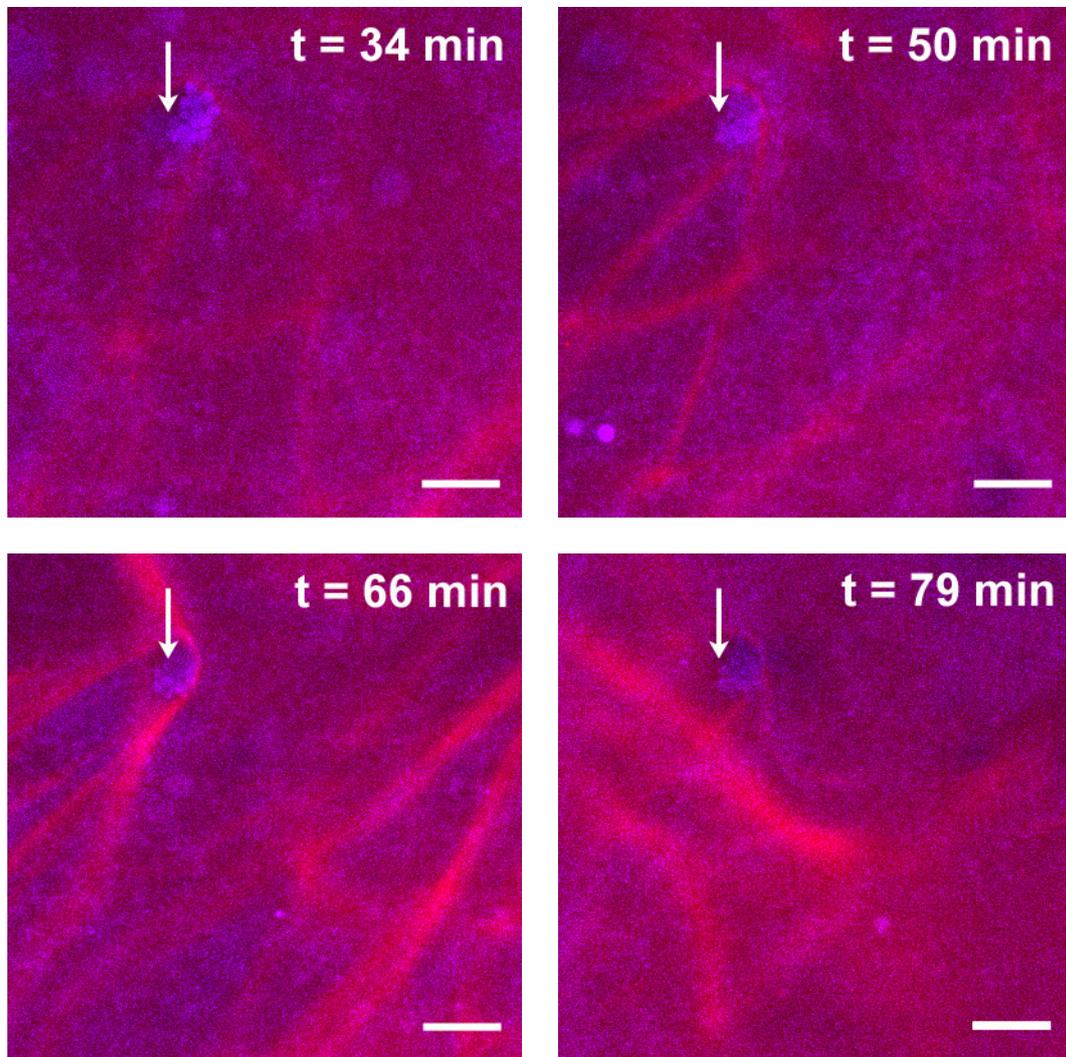


Abbildung 5.17: Beobachtete Pillarverbiegung aufgrund von freien Mikrotubuliansammlungen im Extrakt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Bei diesem Experiment bilden sich extrem weitreichende, fadenförmige Mikrotubulistrukturen, die im Verlauf der Beobachtung zum linken Bildrand wandern. Einige der Mikrotubuli (rot) bleiben dabei an dem Pillar in der oberen linken Ecke des Bilds hängen. Der Pfeil markiert die linke Begrenzung der DNA-Beads auf dem Pillarkopf (blau) bei $t = 34$ min. Bei $t = 66$ min zeigt sich die stärkste Ansammlung von Mikrotubuli am Pillar, verbunden mit einer maximalen Auslenkung aus der Ruhelage. Bei $t = 79$ min ist der größte Teil der Mikrotubuli über den Pillar hinweg weitergewandert, der Pillar kehrt wieder in seine Ausgangslage zurück. Maßstab $20 \mu\text{m}$.

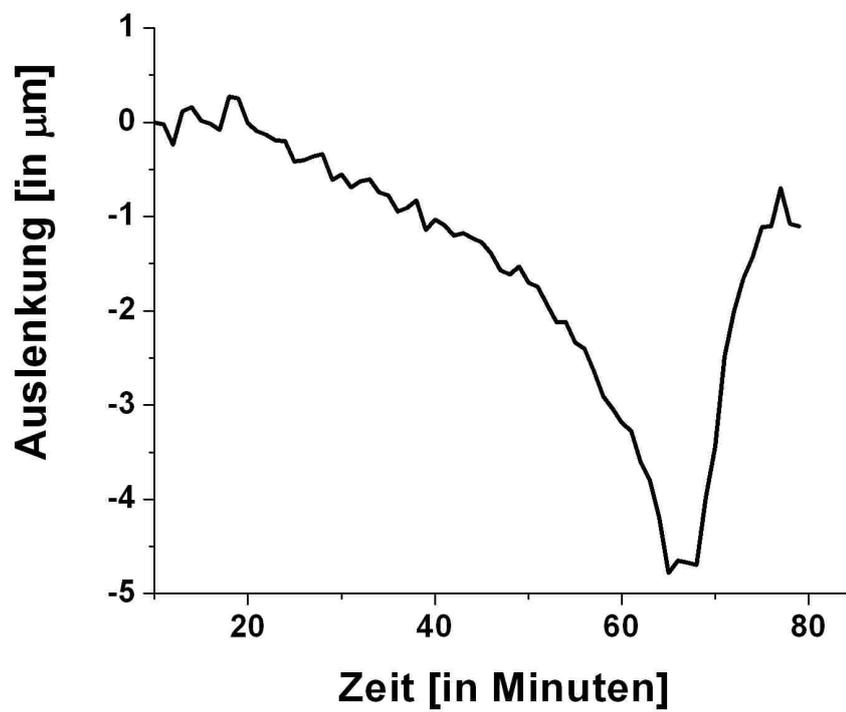


Abbildung 5.18: Rekonstruierte Pillarverbiegung aufgrund der Bewegung der Mikrotubulstruktur. Der Pillar verbiegt sich maximal um ca. $5 \mu\text{m}$, und kehrt dann wieder bis fast in seine Ausgangslage zurück.

5.2.2 Spindel-Assemblierung auf den Pillars

Die in-vitro-Assemblierung von Mitosespindeln an DNA-Bead-Strukturen ist ein kompliziertes Experiment mit zahlreichen kritischen Parametern. So schwankt beispielsweise die Qualität der gewonnenen Froscheier von Tag zu Tag erheblich, und dadurch auch die Fähigkeit des Extrakts zur Spindelbildung. An manchen Tagen ergibt der Test mit Spermienköpfen (vergleiche Kapitel 3.5.5) fast ausschließlich bipolare Spindeln um DNA-Beads - an anderen Tagen bilden sich hingegen Mikrotubuli-Astern statt Spindeln, teilweise sogar weit von den Spermienköpfen entfernt.

Auch die Anbindung der sehr empfindlichen DNA-Beads an die Pillarköpfe ist eine Schwachstelle des Experiments. Kommen die Beads beispielsweise in Kontakt mit Luftsauerstoff, so verlieren sie ihre Fähigkeit, Spindelbildung auszulösen. Und nicht zuletzt gelingt die Spindelbildung nur bei ganz bestimmten DNA-Geometrien (siehe Kapitel 3.5.5). Die hergestellten Pillarfelder müssen also exakt die richtige Geometrie aufweisen, damit sich bipolare Spindeln ausbilden können. Aus diesen Gründen mussten sehr viele Versuche durchgeführt werden, bis tatsächlich bipolare Spindeln auf den Pillars beobachtet werden konnten. Im folgenden werden anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einige charakteristische Ergebnisse der Spindelasssemblierungs-Versuche vorgestellt.

Fall 1: Keine oder kaum DNA-assoziierte Mikrotubuliassemblierung

Abbildung 5.19 zeigt eine häufig gemachte Beobachtung: Trotz eindeutig geglückter Biofunktionalisierung mit DNA-Beads zeigt sich keine oder fast keine Assemblierung von Mikrotubuli an den Pillarköpfen (siehe Abbildung 5.19 (a)). Häufig kann jedoch die Ausbildung von weitreichenden Mikrotubulinetzwerken fernab der DNA beobachtet werden (siehe Abbildung 5.19 (b)).

Fall 2: Bildung von netzwerkartigen Mikrotubulistrukturen an und zwischen den Pillarköpfen

Die mit Abstand am häufigsten gemachte Beobachtung ist in Abbildung 5.20 dargestellt: Es zeigt sich zwar eine deutliche Assemblierung von Mikrotubuli an den Pillarköpfen - allerdings bilden sich keine bipolaren Spindeln aus, sondern weitreichende Netzwerke, die über einen großen Bereich hinweg miteinander interagieren.

Fall 3: Keine freie Nukleation, Bildung von bipolaren Spindeln auf Pillarköpfen

In einigen wenigen Experimenten konnte die Bildung von bipolaren Mitosespindeln an den Pillarköpfen beobachtet werden. In diesen Fällen zeigen sich dann auch keinerlei netzwerkartigen Mikrotubulistrukturen zwischen den Pillars. Meist werden jedoch nur einige wenige Spindeln beobachtet, die zu weit voneinander entfernt sind um zu fusionieren (siehe Abbildung 5.21).

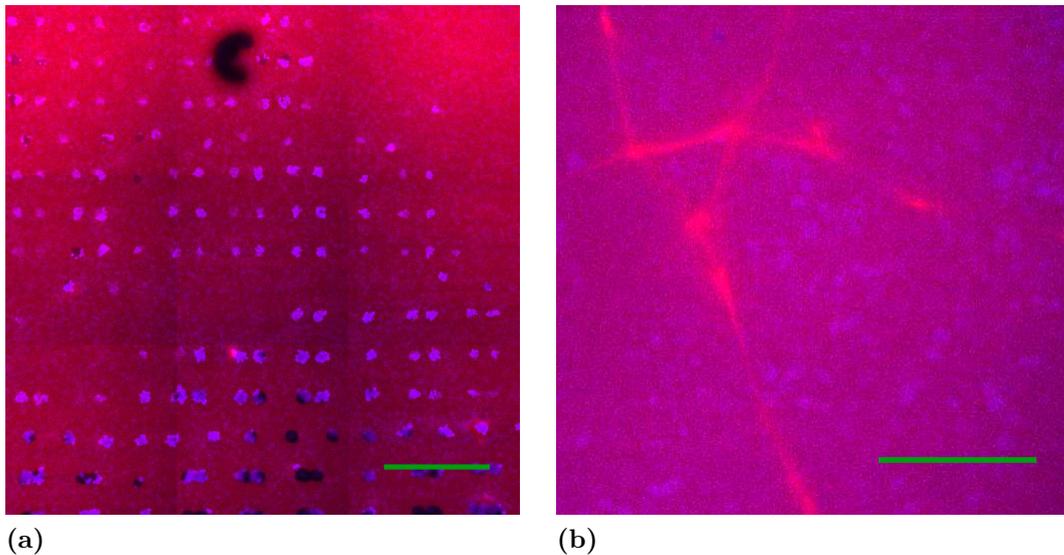


Abbildung 5.19: Fall 1: Keine oder kaum DNA-assozierte Mikrotubuliassemblierung (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). (a) Ein funktionalisiertes Pillarfeld praktisch ohne Assemblierung von Mikrotubuli (Maßstab $100\ \mu\text{m}$). (b) Freie Nukleation fernab jeglicher DNA (Maßstab $50\ \mu\text{m}$). Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau).

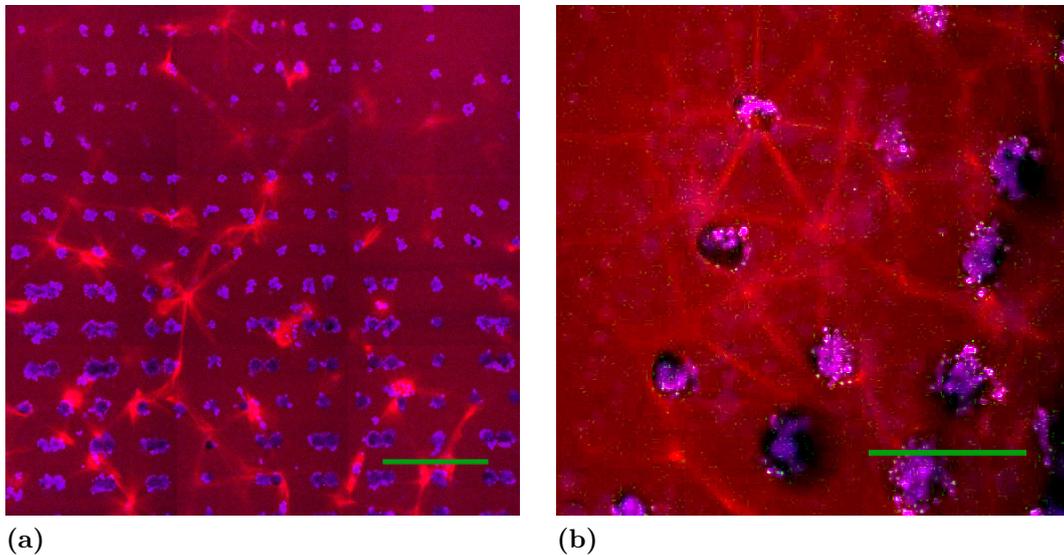


Abbildung 5.20: Fall 2: Bildung von netzwerkartige Mikrotubulstrukturen an und zwischen den Pillarköpfen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Keine bipolaren Spindeln. (a) Übersichtsaufnahme (Maßstab $100\ \mu\text{m}$) (b) Nachbearbeitete Detailaufnahme. Durch die starke Kontrasterhöhung wird die netzwerkartige Mikrotubulstruktur zwischen den Pillarköpfen deutlich (Maßstab $50\ \mu\text{m}$). Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau).

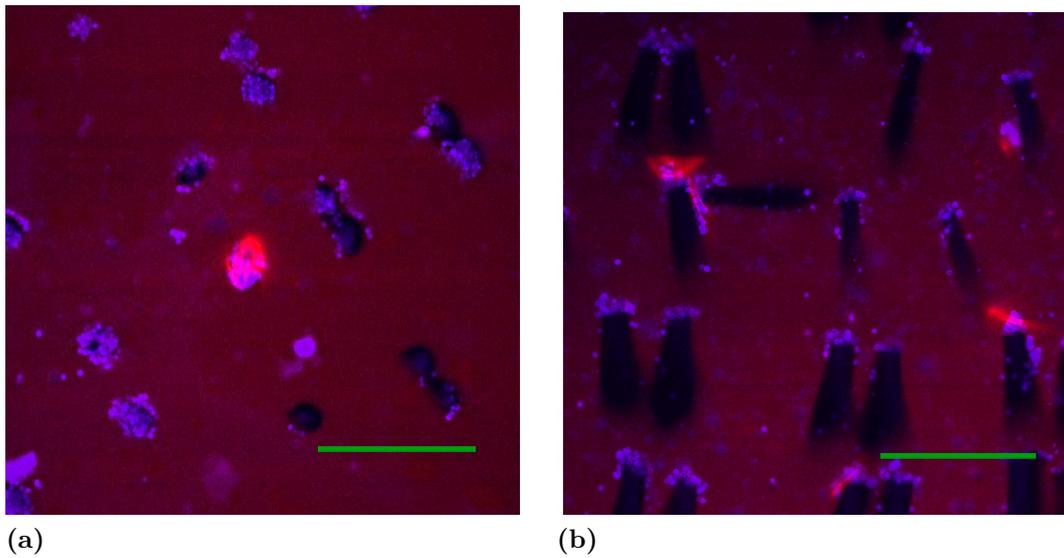


Abbildung 5.21: Fall 4: Keine freie Nukleation, Bildung von bipolaren Spindeln auf Pillarköpfen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Es entstehen vereinzelt bipolare Spindeln, allerdings können keine Fusionen beobachtet werden. Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab 100 μm .

Fall 4: Zwei bipolare Spindeln fusionieren

Bisher ist es erst in einem einzigen Experiment gelungen, zwei fusionierende Mitospindeln zu beobachten (siehe Abbildung 5.22). Allerdings begannen die Spindeln bereits bei Beginn der Fusion wieder zu disassemblieren. Es konnte deshalb keine Verbiegung der Pillars beobachtet werden.

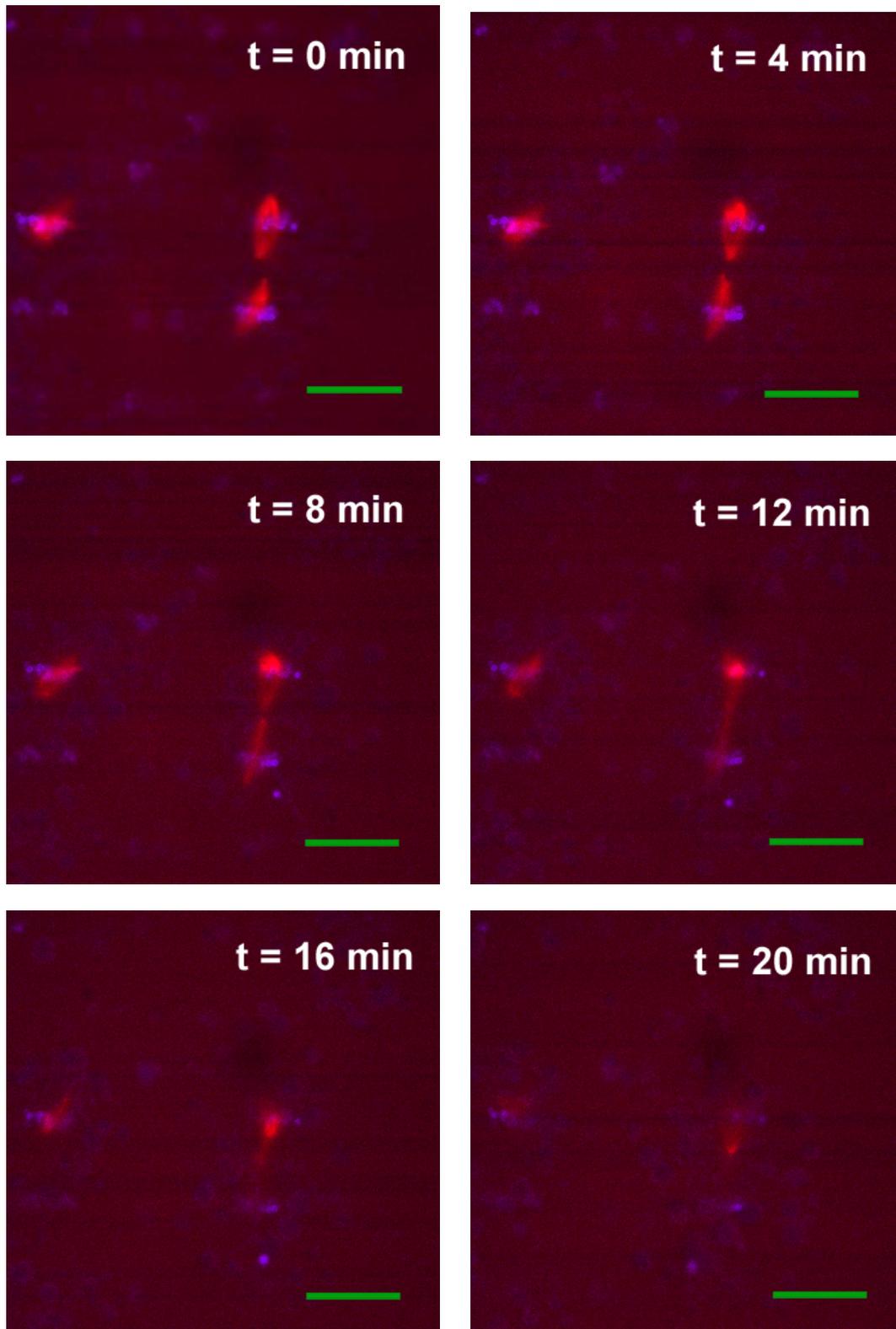


Abbildung 5.22: Fall 5: Zwei bipolare Spindeln fusionieren (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Allerdings disassemblieren beide Spindelstrukturen kurz nach der Fusionierung. Es kann daher keine Pillarverbiegung beobachtet werden. Angefärbt sind Mikrotubuli (rot) und DNA (blau). Maßstab $25 \mu\text{m}$.

Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, mit dem erstmals spezifisch biofunktionalisierte Pillarfelder auf der Basis des Hydrogels PEG hergestellt werden können. Diese Pillars eignen sich zur Messung von Kräften in biologischen Systemen, was in-vitro am Beispiel von fusionierenden Mitosespindeln demonstriert wurde.

Das neuartige Herstellungsverfahren basiert auf der Technik der Mikroskop-Projektionslithografie. Es ist mit Standardtechniken durchführbar und ermöglicht eine spezifische Biofunktionalisierung der Pillarköpfe über die Integrierung biofunktionalisierter Mikrobeads bereits während des Herstellungsprozesses. Für das Linkerprotein Streptavidin wurde die erfolgreiche Funktionalisierung experimentell nachgewiesen.

Die Federkonstanten der Pillars können durch die drei voneinander unabhängigen Parameter Höhe, Durchmesser und Elastizitätsmodul variiert werden. Alleine durch die Variation der verwendeten PEG-Prepolymerlösung kann die Federkonstante unter Beibehaltung der Pillargeometrie in einem vier Größenordnungen umfassenden Bereich eingestellt werden. Dies stellt einen ganz erheblichen Vorteil gegenüber dem etablierten Pillarmaterial PDMS dar, dessen Elastizitätsmodul nur um etwa eine Größenordnung variiert werden kann.

Zur Kalibration der Pillars wurde ein Aufbau entwickelt, der eine Kreuzkalibration gegen einen AFM-Cantilever mit bekannter Federkonstante ermöglicht. Mit diesem Aufbau können Pillars mit Federkonstanten bis zu einer Untergrenze von etwa $(0,3 \pm 0,2) \text{ nN}/\mu\text{m}$ kalibriert werden. Das entspricht bei der in dieser Arbeit beobachteten Tracking-Genauigkeit für beadfunktionalisierte Pillars von ca. 100 nm einer minimalen Kraftauflösung von (30 ± 20) Pikonewton. Diese Kalibrationsgrenze wird bereits von Pillars mit $(12,2 \pm 2) \mu\text{m}$ Durchmesser und $(100 \pm 10) \mu\text{m}$ Höhe erreicht, wenn diese aus einer 2:1 Mischung aus PEG-400 und PBS-Puffer hergestellt wurden. Die flexibelsten im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Pillars hatten bei gleicher Höhe und Prepolymer-Lösung einen Durchmesser von ca. $(5 \pm 2) \mu\text{m}$. Ihre Federkonstante kann demnach auf $\leq 30 \text{ pN}/\mu\text{m}$ abgeschätzt werden. Durch die Verwendung von längerkettigem PEG-Prepolymer sollten sich zudem noch deutlich kleinere Federkonstanten erreichen lassen.

Pillars mit Federkonstanten von unter $0,3 \text{ nN}/\mu\text{m}$ können jedoch mit dem existierenden Kalibrationsaufbau nicht verlässlich kalibriert werden. Sie eignen sich vorerst nur zum qualitativen Nachweis von Kräften. Für die verlässliche Messung von Kräften unterhalb von etwa 100 Piconewton ist erst eine bessere Kalibrationsmethode zu entwickeln.

Das neuentwickelte Herstellungsverfahren für Pillars aus PEG wurde hinsichtlich zahlreicher Versuchsparameter optimiert. Anschließend wurde gezeigt, dass eine *in-vitro*-Assemblierung von Mitosespindeln auf den PEG-Pillars möglich ist. Allerdings wurden bislang nur in einem Experiment fusionierende Mitosespindeln beobachtet, wobei sich die Spindeln schnell auflösten und zu keiner Pillarverbiegung führten. Eine Kraft zwischen fusionierenden Spindeln konnte daher vorerst noch nicht bestimmt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Pillars flexibel genug für die Detektion von Kräften sind, die von verschiedenen Mikrotubulistrukturen verursacht werden. In zwei Experimenten konnten durch Mikrotubulistrukturen verursachte Pillarverbiegungen beobachtet werden. Die zugehörigen Kräfte konnten auf die Größenordnung 1 Nanonewton abgeschätzt werden.

Es bleibt noch viel zu tun, bis die PEG-Pillartechnik standardmäßig zur Messung von Kräften in biologischen Systemen eingesetzt werden kann. Insbesondere bedarf es der Kalibration einer statistisch aussagekräftigen Anzahl von mit verschiedenen Parametern hergestellten Pillars, um den Zusammenhang zwischen Durchmesser, Pillarhöhe und verwendeter Prepolymer-Lösung auf der einen, und den Pillarfederkonstanten auf der anderen Seite quantifizieren zu können. In diesem Zusammenhang wäre eine schnellere und kraftsensitivere Kalibrationsmethode ein wichtiges Zwischenziel. Besonders aussichtsreich erscheint in diesem Zusammenhang die Idee, die zur Funktionalisierung verwendeten paramagnetischen Beads auf den Pillarköpfen zur Kalibration der Pillars in einem äußeren inhomogenen Magnetfeld zu verwenden.

Neben der Kraftmessung an Mitosespindeln eignen sich prinzipiell auch weitere Komponenten des Zellskeletts für eine Untersuchung mit PEG-Pillars. An einem Experiment zur Vermessung der mechanischen Eigenschaften von Aktinnetzwerken wird bereits gearbeitet [99]. Die Zugabe von verschiedenen quervernetzenden Faktoren verändert die Mechanik des Netzwerkes und übt dadurch aktiv Kräfte auf die Pillars aus. Diese Kräfte sollen in dem Experiment quantifiziert werden. Weitere mögliche Anwendungen sind beispielsweise die Messung der Kräfte zwischen Aktin- und Myosinfasern oder zwischen Zellen, die mit sogenannten *Tunneling Nanotubes* miteinander verbunden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier vorgestellte System eine Lücke schließt zwischen den etablierten Methoden zur Messung von Kräften in biologischen Systemen. Einzelmolekülmessungen werden auch in Zukunft in vielen Fällen exakter mit Atomkraftmikroskopen oder optischen beziehungsweise magnetischen Pinzetten durchführbar sein. Aber dank der neuen Methode können nun erstmals auch mit Pillarfeldern Kräfte von deutlich unter einem Nanonewton gemessen - und Kräfte im niedrigen Piconewtonbereich zumindest qualitativ nachgewiesen werden. Dank der kostengünstigen und einfachen Herstellung und Biofunktionalisierung, der

bioinerten Oberflächeneigenschaften des PEG-Hydrogels und der in einem weiten Bereich nach Bedarf einstellbaren Federkonstanten sind in Zukunft zahlreiche praktische Anwendungen für das PEG-Pillarsystem zu erwarten.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ausgangslage	4
2.1	Die Zugkraftmikroskopie	8
2.2	Pillarverbiegung aufgrund einer tangential angreifenden Kraft	9
2.3	Kraftmessung mit Mikropillars	10
2.4	Funktionsprinzip optischer Pinzetten	11
2.5	Aktin- und Mikrotubulinetzwerke	14
2.6	Funktionsprinzip eines molekularen Kinesin-Motors	14
2.7	Aufbau der Mikrotubuli	15
2.8	Dynamische Instabilität	16
2.9	Der Mitosezyklus	17
2.10	Zwei Hypothesen zum Mechanismus der Verkürzung der Kinetochor- mikrotubuli	19
2.11	Die Mitosespindel	19
2.12	Chromosomensegregation in der Anaphase	20
3.1	Der Sputter-Prozess	23
3.2	Der Prozess der Plasmareinigung	24
3.3	Bildung einer selbstassemblierten Monolayer von Silanmolekülen auf einer Glasoberfläche	25
3.4	Das Funktionsprinzip der konfokalen Mikroskopie	27
3.5	Aufbau eines Elektronenmikroskops	29
3.6	Struktur von PEG-Prepolymermolekülen	30
3.7	Fotoinduzierte radikalische Kettenwachstumsreaktion von PEG-Diacrylat	32
3.8	Chrommasken-Herstellung	33
3.9	Eine fertige Chrommaske	34
3.10	Struktur von SU-8 Fotolack	35
3.11	Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen mittels Replika Moulding	36
3.12	Funktionsprinzip der Mikroskop-Projektionslithografie	37
3.13	Biotin und Streptavidin	40
3.14	Herstellung von Froschei-Extrakt	40
3.15	Herstellung von DNA-Beads	42
3.16	Bipolare Mitosespindeln in Froscheiextrakt	43
3.17	Extrakttest mit Spermienköpfen	43

3.18	Assemblierung von Mikrotubuli an mikrokontaktgestempelten DNA-Strukturen	44
3.19	Bildung fusionierender bipolarer Spindeln an mikrokontaktgestempelten DNA-Strukturen	45
4.1	Herstellung von PEG-Pillars nach dem Replika Moulding Verfahren .	51
4.2	Probe für die Herstellung von PEG-Strukturen mittels Mikroskop-Projektionslithographie	53
4.3	Zusammenbau der Probenkammer	55
4.4	Herstellung beadfunktionalisierter PEG-Pillars	56
4.5	Der Kalibrationsprozess	59
4.6	Der Kalibrationsaufbau	59
4.7	Befestigung des AFM-Cantilever am Kalibrationsaufbau	60
4.8	Feinjustage von Pillar und Cantilever	61
4.9	Theoretisch erwartete Trajektorie der Cantileverposition	64
4.10	Bestimmung der Pillar-Federkonstante aus der Cantilevertrajektorie .	64
4.11	Aufbau der Versuchskammer	66
5.1	PEG-Pillarfelder, hergestellt nach dem Replika Moulding Verfahren .	72
5.2	Auswirkungen des verwendeten Mikroskopobjektivs auf die Form der erzeugten Pillars	73
5.3	Auswirkungen der Belichtungsdauer auf die entstehenden Pillars . . .	75
5.4	Die für die Spindelversuche letztlich meistens verwendeten Maskenstruktur SLA009	76
5.5	Pillars, die mit der Belichtungsmaske SLA009 hergestellt wurden . . .	77
5.6	Verschiedene Pillarvarianten	78
5.7	Funktionalisierung der Pillarköpfe mit Streptavidinbeads bei leicht unterschiedenen Herstellungsverfahren	79
5.8	Fluoreszierende DNA-Beads haben spezifisch auf den Pillarköpfen gebunden	80
5.9	Ein mittels Writing-Verfahren hergestelltes Pillarfeld	81
5.10	Ein mittels Writing-Verfahren hergestelltes Pillarfeld	81
5.11	Beispiel für eine mit dem Line-Writing-Verfahren hergestellten Kammerstruktur	82
5.12	Kalibrationskurve für einen vergleichsweise harten Pillar	83
5.13	Kalibrationskurven für vergleichsweise weiche Pillars	85
5.14	Zusammenhang zwischen Pillardurchmesser und Federkonstante . . .	86
5.15	Beobachtete Pillarverbiegung aufgrund von pillarassozierten Mikrotubuliansammlungen	87
5.16	Rekonstruierte Pillarverbiegung aufgrund der pillarassozierten Mikrotubuliansammlungen	88
5.17	Beobachtete Pillarverbiegung aufgrund von freien Mikrotubuliansammlungen im Extrakt	90

5.18	Rekonstruierte Pillarverbiegung aufgrund der Bewegung der Mikrotubulstruktur	91
5.19	Fall 1: Keine oder kaum DNA-assoziierte Mikrotubuliassemblierung .	93
5.20	Fall 2: Bildung von netzwerkartigen Mikrotubulstrukturen an und zwischen den Pillarköpfen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen) . .	93
5.21	Fall 3: Keine freie Nukleation, Bildung von bipolaren Spindeln auf Pillarköpfen	94
5.22	Fall 4: Zwei bipolare Spindeln fusionieren	95

Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Raff, and K. Roberts. *Molecular Biology of the Cell 5th edn* (London: Garland Science). 2007. 3, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 38
- [2] M.A. Jordan and L. Wilson. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current opinion in cell biology*, 10(1):123–130, 1998. 3
- [3] C. Alberti. Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 13(1):13–21, 2009. 3
- [4] D. Leckband and J. Israelachvili. Intermolecular forces in biology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34(02):105–267, 2001. 3, 7
- [5] O. Thoumine, A. Ott, O. Cardoso, and J.J. Meister. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 39(1-2):47–62, 1999. 3, 12
- [6] G. Binnig, CF Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9):930–933, 1986. 3
- [7] A. Ashkin, JM Dziedzic, JE Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5):288, 1986. 3, 10
- [8] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal*, 82(6):3314–3329, 2002. 3, 12
- [9] AK Harris, P. Wild, and D. Stopak. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440):177–179, 1980. 3, 8

- [10] J.L. Tan, J. Tien, D.M. Pirone, D.S. Gray, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4):1484–1489, 2003. 3, 8, 10
- [11] B. Li, L. Xie, Z.C. Starr, Z. Yang, J.S. Lin, and J.H.C. Wang. Development of micropost force sensor array with culture experiments for determination of cell traction forces. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 64(7), 2007. 4, 10
- [12] N.J. Sniadecki and C.S. Chen. Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells. *Methods in cell biology*, 83:314, 2007. 4, 10
- [13] A. Dinarina, C. Pugieux, M. Corral, M. Loose, J. Spatz, E. Karsenti, and F. Nédélec. Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell*, 138:502–513, 2009. 4, 5, 41, 42, 44, 45
- [14] RB Nicklas. Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *Journal of Cell Biology*, 97(2):542–548, 1983. 5, 12, 45
- [15] A.S. Hoffman et al. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1):3–12, 2002. 5, 29
- [16] J.C. Love, D.B. Wolfe, H.O. Jacobs, and G.M. Whitesides. Microscope projection photolithography for rapid prototyping of masters with micron-scale features for use in soft lithography. *Langmuir*, 17(19):6005–6012, 2001. 5, 36, 52
- [17] A. Revzin, R.J. Russell, V.K. Yadavalli, W.G. Koh, C. Deister, D.D. Hile, M.B. Mellott, and M.V. Pishko. Fabrication of poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir*, 17(18):5440–5447, 2001. 5, 36
- [18] M.S. Hahn, L.J. Taite, J.J. Moon, M.C. Rowland, K.A. Ruffino, and J.L. West. Photolithographic patterning of polyethylene glycol hydrogels. *Biomaterials*, 27(12):2519–2524, 2006. 5
- [19] D.C. Pregibon, M. Toner, and P.S. Doyle. Magnetically and biologically active bead-patterned hydrogels. *Langmuir*, 22(11):5122–5128, 2006. 5, 36, 52, 76
- [20] Louban I. Perschmann N. Blümmel J. Lohmüller T. Cavalcanti-Adam E. A. Fiammengo R. Kessler H. Spatz J. Aydin, D. Polymeric substrates with tunable and nanoscopically controlled biomolecule density. in preparation. 5
- [21] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T.J. Moon, C.C. Cunningham, and J. Käs. The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, 81(2):767–784, 2001. 7

- [22] T. Itabashi, J. Takagi, Y. Shimamoto, H. Onoe, K. Kuwana, I. Shimoyama, J. Gaetz, T.M. Kapoor, and S. Ishiwata. Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle. *Nature Methods*, 2009. 7
- [23] T. Haraszti, S. Schulz, K. Uhrig, R. Kurre, W. Roos, C.H.J. Schmitz, J.E. Curtis, T. Maier, A.E.M. Clemen, and J.P. Spatz. Biomimetic Models of the Actin Cortex. 7, 11
- [24] S. Suresh. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 55(12):3989–4014, 2007. 7, 13, 14
- [25] D. Stamenovic and N. Wang. Invited review: engineering approaches to cytoskeletal mechanics. *Journal of Applied Physiology*, 89(5):2085–2090, 2000. 7
- [26] CT Lim, EH Zhou, and ST Quek. Mechanical models for living cells—a review. *Journal of biomechanics*, 39(2):195–216, 2006. 7
- [27] A. Besser and U.S. Schwarz. Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction. *New J. Phys*, 9:425, 2007. 7
- [28] W.E. Channels, F.J. Nédélec, Y. Zheng, and P.A. Iglesias. Spatial regulation improves antiparallel microtubule overlap during mitotic spindle assembly. *Biophysical Journal*, 94(7):2598–2609, 2008. 7
- [29] D.A. Fletcher and J.A. Theriot. An introduction to cell motility for the physical scientist. *Phys. Biol*, 1:T1–T10, 2004. 7
- [30] KJ Van Vliet, G. Bao, and S. Suresh. The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules. *Acta Materialia*, 51(19):5881–5905, 2003. 7
- [31] J.J. Norman, V. MUKUNDAN, D. Bernstein, and B.L. Pruitt. Microsystems for Biomechanical Measurements. *Pediatric research*, 63(5):576, 2008. 7, 8, 10
- [32] J. Lee, M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson. Traction forces generated by locomoting keratocytes. *Journal of Cell Biology*, 127(6):1957–1964, 1994. 8
- [33] T. Oliver, M. Dembo, and K. Jacobson. Traction forces in locomoting cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 31(3):225–240, 1995. 8
- [34] S. Munevar, Y. Wang, and M. Dembo. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophysical Journal*, 80(4):1744–1757, 2001. 8

- [35] J. Ulmer. *Quantitative Measurements of Force Distribution in Single and Multi Cellular Systems Quantitative Messung der Kräfteverteilung in Einzel und Vielzelligen Systemen*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2005. 8, 9, 57
- [36] C. Gerthsen. *Gerthsen Physik*. Springer, 2003. 9, 65
- [37] S.D. Schulz. *Application of Micropillar Interfaces: A Study on Human Periodontal Cells and Actin Biomimetic Systems Anwendung von Mikrosäulen: Eine Studie über Mundschleimhautzellen und biomimetische Aktinsysteme*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2009. 10, 11
- [38] G. Wright, M.J. Tucker, P.C. Morton, C.L. Sweitzer-Yoder, and S.E. Smith. Micromanipulation in assisted reproduction: a review of current technology. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 10(3):221, 1998. 10
- [39] Simmons R.M. Finer, J.T. and J.A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanonewton steps. *Nature*, 368:113–119, 1994. 10
- [40] E.R. Dufresne and D.G. Grier. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optical elements. *Rev. Sci. Instr.*, 69:1974–1977, 1998. 11
- [41] K. Uhrig. *Investigation of molecular interactions in cytoskeletal systems with holographic optical tweezers*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2009. 11
- [42] D.G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(6950):810–816, 2003. 11
- [43] C.H.J. Schmitz. *Entwicklung eines opto-mechanischen Mikrolabors zur Generierung und Untersuchung biomimetischer Proteinnetzwerke*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2005. 11
- [44] A.H.B. de Vries, B.E. Krenn, R. van Driel, and J.S. Kanger. Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical journal*, 88(3):2137–2144, 2005. 12
- [45] N. Walter, C. Selhuber, H. Kessler, and J.P. Spatz. Cellular unbinding forces of initial adhesion processes on nanopatterned surfaces probed with magnetic tweezers. *Nano lett*, 6(3):398–402, 2006. 12
- [46] A.R. Bausch, W. M öller, and E. Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 76(1):573–579, 1999. 12
- [47] J. Gaetz, Z. Gueroui, A. Libchaber, and T.M. Kapoor. Examining how the spatial organization of chromatin signals influences metaphase spindle assembly. *Nature cell biology*, 8(9):924–932, 2006. 12

- [48] H. Fantana. Towards measuring the centering forces acting on the mitotic spindle in the *c. elegans* embryos. Posterpräsentation, 2009. 12
- [49] Y. Marcy, J. Prost, M.F. Carlier, and C. Sykes. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16):5992–5997, 2004. 12
- [50] P.A. Janmey. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews*, 78(3):763–781, 1998. 13
- [51] S. Suresh, J. Spatz, JP Mills, A. Micoulet, M. Dao, CT Lim, M. Beil, and T. Seufferlein. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomaterialia*, 1(1):15–30, 2005. 13
- [52] J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H.M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, et al. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical journal*, 88(5):3689–3698, 2005. 13
- [53] R. Heald and E. Nogales. Microtubule dynamics. *Journal of Cell Science*, 115(1):3–4, 2002. 15
- [54] Mandelkow E. Mandelkow, E. M. and R. Milligan. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time resolved cry-electron microscopy study. *J. Cell. Biol.*, 114:977–991., 1991. 16
- [55] A. Desai and T.J. Mitchison. Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1):83–117, 1997. 16
- [56] K. Nasmyth, J.M. Peters, and F. Uhlmann. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, 288(5470):1379, 2000. 16
- [57] S. Gadde and R. Heald. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Current Biology*, 14(18):797–805, 2004. 17, 18, 19
- [58] T. Wittmann, A. Hyman, and A. Desai. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature cell biology*, 3(1):E28–E34, 2001. 19
- [59] M. Dogterom, J.W.J. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne, and M.E. Janson. Force generation by dynamic microtubules. *Current opinion in cell biology*, 17(1):67–74, 2005. 18
- [60] Bastian Rühle. Functionalized peg pillar arrays acting as force sensors for the investigation of mitotic spindle mechanics. Master’s thesis, Univ. of Heidelberg, 2008. 23, 36, 52, 72, 79

- [61] R. Maoz and J. Sagiv. On the formation and structure of self-assembling monolayers. I: Comparative ATR-wettability study of Langmuir-Blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads. *Journal of colloid and interface science*, 100(2):465–496, 1984. 25
- [62] J. Gun and J. Sagiv. On the formation and structure of self-assembling monolayers. III: Time of formation, solvent retention, and release. *Journal of colloid and interface science*, 112(2):457–472, 1986. 25
- [63] S. Brandriss and S. Margel. Synthesis and characterization of self-assembled hydrophobic monolayer coatings on silica colloids. *Langmuir*, 9(5):1232–1240, 1993. 25
- [64] A. Ulman et al. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 96(4):1533, 1996. 25
- [65] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, and G.M. Whitesides. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev*, 105(4):1103–1170, 2005. 25
- [66] G.S. Dawe, J.T. Schantz, M. Abramowitz, M.W. Davidson, and D.W. Hutmacher. *Light microscopy*. World Scientific Pub Co Inc, 2006. 26
- [67] D. Shindo and K. Hiraga. *High-resolution electron microscopy for materials science*. Springer, 1998. 28
- [68] D. Schwendel, R. Dahint, S. Herrwerth, M. Schloerholz, W. Eck, and M. Grunze. Temperature dependence of the protein resistance of poly-and oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiolate monolayers. *Langmuir*, 17(19):5717–5720, 2001. 29, 31
- [69] J.M. Harris and S. Zalipsky. Poly (ethylene glycol): chemistry and biological applications. 1997. 29
- [70] B.K. Mann, A.S. Gobin, A.T. Tsai, R.H. Schmedlen, and J.L. West. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials*, 22(22):3045–3051, 2001. 29
- [71] W.G. Koh, A. Revzin, and M.V. Pishko. Poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures encapsulating living cells. *Langmuir*, 18(7):2459–2462, 2002. 29
- [72] V.A. Liu and S.N. Bhatia. Three-dimensional photopatterning of hydrogels containing living cells. *Biomedical Microdevices*, 4(4):257–266, 2002. 29

- [73] Cavalcanti-Adam A. Deeg J. Aydin D. Selhuber-Unkel-C. Cadmus C. Fiammengo R. Spatz J. Louban, I. Mimicking cellular environments: effect of elastic nanopatterned substrates on integrin-mediated cell spreading. in preparation. 29
- [74] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, BD Ratner, A. Hoffman, FJ Schoen, and JE Lemons. *Biomaterials science*. Springer, 1997. 29
- [75] P. Van Zant. *Microchip fabrication*. McGraw-Hill Professional, 2004. 31
- [76] P. Rai-Choudhury. *Handbook of microlithography, micromachining, and microfabrication*. Iet, 1997. 31
- [77] Y. Xia and G.M. Whitesides. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, 28(1):153–184, 1998. 31
- [78] D. Aydin. *Fabrication and application of microstructured protein-nanoarrays*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2009. 35, 58
- [79] J.M. Shaw, J.D. Gelorme, N.C. LaBianca, W.E. Conley, and S.J. Holmes. Negative photoresists for optical lithography. *IBM Journal of Research and Development*, 41(1):81–94, 1997. 34
- [80] DW Johnson, DJ Nawrocki, and R. Ruhmann. Improving the process capability of SU-8, Part III. *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 15(5):749–756, 2002. 34
- [81] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *ANALYTICAL CHEMISTRY-WASHINGTON DC-*, 70:4974–4984, 1998. 35
- [82] PN Kim, K.W. Kwon, M.C. Park, S.H. Lee, S.M. Kim, and K.Y. Suh. Soft lithography for microfluidics: a review. *Biochip J*, 2:1–11, 2008. 35
- [83] D. Fuard, T. Tzvetkova-Chevolleau, S. Decossas, P. Tracqui, and P. Schiavone. Optimization of Poly-Di-Methyl-Siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility. *Microelectronic Engineering*, 2008. 36
- [84] E. Hannak and R. Heald. Investigating mitotic spindle assembly and function in vitro using *Xenopus laevis* egg extracts. *Nature protocols*, 1(5):2305–2314, 2006. 38, 41
- [85] C.M. Waterman-Storer, A. Desai, J.C. Bulinski, and ED Salmon. dynamics of protein assemblies in living cells. *Current Biology*, 8(22):1227–1230, 1998. 39
- [86] M. Wilchek and EA Bayer. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical biochemistry*, 171(1):1, 1988. 39

- [87] H. Masuda, M. Sevik, and WZ Cande. In vitro microtubule-nucleating activity of spindle pole bodies in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: cell cycle-dependent activation in *Xenopus* cell-free extracts. *Journal of Cell Biology*, 117(5):1055–1066, 1992. 39
- [88] R. Heald, R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. 1996. 39, 41
- [89] A. Desai, A. Murray, TJ Mitchison, and CE Walczak. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro. *Methods in cell biology*, 61:385–412, 1999. 39
- [90] J.R. Peterson and T.J. Mitchison. Small Molecules, Big Impact A History of Chemical Inhibitors and the Cytoskeleton. *Chemistry & Biology*, 9(12):1275–1285, 2002. 39
- [91] H. Klenow and I. Henningsen. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65(1):168–175, 1970. 41
- [92] Ostuni-E. Takayama S. Jiang X. Whitesides, G.M. and D.E. Ingber. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 3:335–373, 2001. 42
- [93] J.E. Sader, J.W.M. Chon, and P. Mulvaney. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70:3967, 1999. 57
- [94] A. Micoulet. *Uniaxial mechanical assays on adherent living single cells: animal embryonic fibroblasts and human pancreas cancer cells*. PhD thesis, University of Heidelberg, 2005. 58
- [95] S. Gibson, J. Cook, T. Howard, and R. Hubbard. ICARUS: Interactive reconstruction from uncalibrated image sequences. In *International Conference on Computer Graphics and Interactive Techniques*, pages 197–197. ACM New York, NY, USA, 2002. 63
- [96] IN Bronstein. *Taschenbuch der Mathematik. 6., vollst. uberarb.* 2005. 65
- [97] J. Liu, B. Cai, J. Zhu, G. Ding, X. Zhao, C. Yang, and D. Chen. Process research of high aspect ratio microstructure using SU-8 resist. *Microsystem Technologies*, 10(4):265–268, 2004. 72
- [98] D. Dendukuri, T.A. Hatton, and P.S. Doyle. Synthesis and self-assembly of amphiphilic polymeric microparticles. *Langmuir*, 23(8):4669–4674, 2007. 74

- [99] S. Rahmouni. *persönliche Mitteilung*. PhD thesis, 2009. 98

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Joachim Spatz, der mir die Forschung an diesem spannenden Thema ermöglichte, und mir alle Freiheiten bei der Bearbeitung zugestanden hat. Auch für die vielfältigen Möglichkeiten, meine Arbeit national und international vor Fachpublikum zu präsentieren möchte ich mich an dieser Stelle nochmals ganz herzlich bedanken. Prof. Schwarz bin ich außerordentlich dankbar, dass er sich so kurzfristig bereit erklärt hat, als Zweitkorrektor meine Dissertation zu begutachten. Prof. Horner und Prof. Meier möchte ich ebenfalls ganz herzlich für Ihre spontane Bereitschaft danken, als Prüfer an meiner Promotionsprüfung teilzunehmen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Dr. Anabel Clemen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und das Projekt von Anfang bis Ende wissenschaftlich begleitet hat. Dr. Francois Nédélec danke für die fruchtbare Kooperation in Hinsicht auf die Mitosespindelanwendung der PEG-Pillars. Herzlichen Dank für den Laborarbeitsplatz am EMBL und die umfangreiche Unterstützung. Zu tiefster Dankbarkeit verpflichtet bin ich in diesem Zusammenhang auch Maria Mora Corral und ganz besonders Céline Pugieux, die mir von der DNA-Aufreinigung bis hin zur Extrakt-Präparation mit viel Geduld sämtliche molekular- und zellbiologische Arbeitsschritte beibrachten, und mir zusätzlich viel Arbeit bei der Extrakterstellung abnahmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Bastian Rühle, der als Diplomand wesentlich zum Gelingen des Projekts beigetragen hat. Bastian, ohne deine Mitarbeit wäre ich niemals so weit gekommen! Auch die Mithilfe von Thomas Pfeil war von unschätzbarem Wert. Als Mini-Forscher half er in den Anfängen sehr bei der Etablierung des Protokolls zur Mikroskop-Projektionslithografie. Herzlichen Dank dafür!

Für die fachliche Unterstützung möchte ich allen Mitgliedern des AK Spatz danken. Leider ist es unmöglich, an dieser Stelle alle Kollegen namentlich zu nennen, die mir mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung geholfen haben, dieses Projekt so weit zu bringen. Besonders hervorheben möchte ich jedoch Daniel Aydin für seine zahlreichen Tipps und Ratschläge bei chemischen Problemstellungen aller Art, Nadine Perschmann für ihr Know-How bei der PEG-Herstellung und der Oberflächenanisierung, Kai Uhrig für seine zahlreichen großen und kleinen Tipps und

Hilfestellungen, Patrick Heil für das Anti-Stress Fachwissen, und Ilia Louban für den ganzen Rest.

Nicht zuletzt möchte ich Sabri Rahmouni dafür danken, dass er mit Elan und Ideenreichtum die PEG-Pillar-Technologie weiterentwickelt, und somit meiner Arbeit (hoffentlich) eine bleibende Bedeutung beschert. Anabel Clemen, Kai Uhrig, Ilia Louban und Sabri Rahmouni haben sich zudem für das kurzfristige Korrekturlesen meiner Arbeit einen zusätzlichen Dank verdient.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke für alles! Und abschließend möchte ich mich auch ganz besonders herzlich bei meiner Freundin Julika bedanken, die mir in den letzten Monaten immer zur Seite gestanden hat. Ich weiß nicht, wie ich diese doch sehr anstrengende Zeit ohne sie hätte überstehen sollen. Danke, dass es dich gibt, Julika!

Appendix

A.1 Abkürzungen

- REM** Raster Elektronen Mikroskopie
- MPL** Mikroskop-Projektionslithografie
- LSM** Laser Scanning Mikroskopie
- UV** Ultraviolett
- PEG** Poly-Ethylenglykol
- PEG-DA** Poly-Ethylenglykol-Diacrylat
- RM** Replika Moulding
- PDMS** Poly-Dimethylsiloxan
- DNA** Desoxy-Ribonukleinsäure

A.2 Verwendete Materialien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
SU-8-10 Fotolack	MicroChemicals, Ulm, D
SU-8-25 Fotolack	MicroChemicals, Ulm, D
PEG-DA(400)	Polysciences, Warrington, USA
PEG-DA(700)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PEG-DA(10000)	Roberto Fiammengo, MPI für Metallforschung, Stuttgart, D
PEG-DA(20000)	Roberto Fiammengo, MPI für Metallforschung, Stuttgart, D
Irgacure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid, 30% p.a.	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure, 96% p.a.	Merck, Darmstadt, D
SU-8-10 Fotolack	MicroChemicals, Ulm, D
SU-8-25 Fotolack	MicroChemicals, Ulm, D
SU-8-100 Fotolack	MicroChemicals, Ulm, D
mr-Dev600 SU-8 Entwickler	Microresist, Berlin, D
AZ-1505 Fotolack	Hoechst, Frankfurt a.M., D
Chrom-Ätzlösung	Merck, Darmstadt, Darmstadt, D
Extran MA01	Merck, Darmstadt, Darmstadt, D
PDMS-Kit Sylgard 184	Dow Corning, Midland, USA
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl- trichlorosilane	ABCR, Karlsruhe, D
Allyl-Triethoxysilan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenol-Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Materialien	Hersteller
Dynabeads M-280	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptavidin Mikrobeads 2,0 μm	Polysciences, Warrington, USA
DNA Purification Kit (Maxi Prep)	Qiagen, Venlo, NL
Silizium Wafer	Silicon Materials, Landsberg, D
Glas-Objekträger 24x60 mm	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glas-Deckgläser 24x60x0,17 mm (#1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glas-Deckgläser 24x24x0,17 mm (#1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glas-Deckgläser 24x60x(0,08-0,12) mm (#0)	Assistent, Sondheim, D
MLCT Cantilever	Veeco, Plainview, USA
MSNL-10 Cantilever	Veeco, Plainview, USA
A-thio-dGTP	Trilink Biotechnologies, San Diego, USA
A-thio-DCTP	Trilink Biotechnologies, San Diego, USA
Biotin-11-dUTP	Fermentas, Burlington, CDN
Biotin-14-dATP	Invitrogen, Carlsbad, USA
Atto-Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Restriktionsenzym BamH1, rekombinant	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzym NotI, rekombinant	New England Biolabs, Ipswich, USA
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Klenow exo^- Fragment	Fermentas, Burlington, CDN
Rhodamin-Tubulin	Cytoskeleton, Denver, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Plasmid YEp24	New England Biolabs, Ipswich, USA
Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Basel, CH
Alleskleber	Uhu, Bühl, D
Chrommaske	Masken Lithographie & Consulting GmbH, Jena, D
Doppelseitiges Klebeband 15 mm x 10 m	Tesa, Hamburg, D

Geräte	Hersteller
X-Cite 120 PC Metallhalidlampe	EXFO, Quebec City, CDN
Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena, D
Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena, D
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, D
LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Jena, D
LSM Pascal 5	Carl Zeiss, Jena, D
DeltaVision	Applied Precision, Issaquah, USA
LEO-1530 REM	Carl Zeiss, Jena, D
HAL 100 Halogenlampe	Carl Zeiss, Jena, D
HBO 100 UV-Lampengehäuse	Carl Zeiss, Jena, D
HBO 103 W/2 Quecksilberdampf Lampe	Osram, München, D
Plan Neofluar 10x/0,30 Objektiv	Carl Zeiss, Jena, D
Plan Neofluar 40x/0,75 Objektiv	Carl Zeiss, Jena, D
PVA TePla 100 Plasmamaschine	TePla, Feldkirchen, D
MED 020 Sputter Coater	BAL-TEC, Schalksmühle, D
DWL-66 Mask-Writer	Heidelberg Instruments, Heidelberg, D
MJB-3 Mask Aligner	Suss MicroTec, München, D

Software	Hersteller
AutoCAD Mechanical 2007	Autodesk, San Rafael, USA
ImageJ v.1.40g	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Simple PCI v.6.5	Hamamatsu Corp., Hamamatsu, JP
ChemDraw Ultra v.11.0.1	CambridgeSoft, Cambridge, USA
Icarus v.2.09.	Advanced Interfaces Group University of Manchester, UK
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA
Origin v.6.1	OriginLab, Northampton, USA
LSM Stage Control	Bastian Rühle, Universität Heidelberg, D

A.3 Protokolle

PBS-Puffer (1 l, bei Raumtemperatur haltbar)

- 8,0 g Natriumchlorid
- 0,2 g Kaliumchlorid
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat
- in 1 l Mili-Q-Wasser
- autoklavieren

XB 20x Stocklösung (500 ml, bei 4°C haltbar)

- 74,55 g KCl
- 10 ml MgCl₂-Lösung, 1 M
- 1 ml CaCl₂-Lösung, 1 M

XB-Puffer (1 l)

- 50 ml XB 20x Stocklösung
- 17,12 g Sucrose
- 10 ml HEPES 1 M pH 7,7
- 440 ml Mili-Q-Wasser
- mit KOH 2 M auf pH 7,7 titrieren

CSF-XB-Puffer (500 ml, bei 16° C ein Tag haltbar.)

- 5 ml EGTA 0,5 M
- 1 ml MgCl₂
- 494 ml XB-Puffer
- mit KOH 2 M auf pH 7,7 titrieren

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 21. September 2009

.....
Aaron Lindner