

Methoden und Strukturen zur Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Physiker
Peter Sebastian Nill
aus Nürtingen

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

01. Juli 2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dieter P. Kern

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Peschel

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Methoden und Strukturen zur Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den 01.07.2013

Peter Nill

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden Methoden zur Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung erarbeitet. Der Fokus wurde dabei auf die Aspekte der Wechselwirkung von Mikroben mit gezielt mikrostrukturierten Oberflächen gelegt. Innerhalb dieses Themengebiets wurden explizit drei Fragestellungen behandelt.

Zum Einen wurden geeignete Elastomerstrukturen zur Quantifizierung mikrobieller Adhäsionskräfte konzipiert und hergestellt, sowie mithilfe einer eigens ausgearbeiteten Messmethode unter Verwendung der Rasterelektronenmikroskopie entsprechende Messungen an einem mikrobiellen Modellorganismus, dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde zudem eine Methodik erarbeitet, die es erlaubt, die elastischen Eigenschaften der mikrometergroßen Elastomerstrukturen zu untersuchen. Hierdurch wurde ein experimenteller Vergleich mit den bisher hauptsächlich theoretisch motivierten Berechnungen bestehender Arbeiten ermöglicht.

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit sich mikrostrukturierte Substrate zur Beeinflussung der Zellausrichtung eignen. Nach der Konzeption geeigneter Zellsubstrate, sowie einer geeigneten Auswertemethodik wurden entsprechende Experimente an dem Bakterienstamm *BoFeN1* durchgeführt.

Schließlich wurden Experimente zur Bedeutung des Benetzungsverhaltens von Zellsubstraten für die Zell-Material-Wechselwirkung unternommen. Basierend auf der Möglichkeit, das Benetzungsverhalten einer Oberfläche durch geeignete Mikrostrukturierung zu beeinflussen, wurden Zellsubstrate mit einer gezielten, lokalen Variation des Benetzungsverhaltens hergestellt und in Wachstumsexperimenten mit dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* eingesetzt. Unter Verwendung einer neu entwickelten Messmethodik auf Basis einer fluoreszenzgestützten Ermittlung der Zelldiffusion war es hier möglich, die Auswirkungen des lokal variierten Benetzungsverhaltens an den lebenden Bakterien zu untersuchen.

Abstract

In this thesis, methods were established that aim at studying the interplay between cells and cell substrate materials and their respective topography. The investigations that were carried out have focused mainly on the mechanisms of interaction between microbes and microstructured surfaces. In this respect, three main topics were investigated:

In order to quantify microbial adhesion forces, cell substrates have been designed and fabricated that consist of elastomeric microstructures as the force sensing apparatus. An experimental calibration procedure has been developed to determine the elastic properties of these sub-micrometer-sized elastomeric structures and a novel method has been demonstrated that enables quantitative force measurements on such cell substrates by means of Scanning Electron Microscopy. Using this approach, the adhesion forces of a microbial model organism, namely *Staphylococcus aureus*, were determined experimentally.

Furthermore, investigations were carried out to address the influence of micro-structured substrates on the orientation of bacteria. Following the design and fabrication of cell substrates with suitable microstructures as well as the development of an appropriate measurement method, cell studies were carried out, using the microbial strain *BoFeN1*.

Finally, an experimental approach has been conceived to investigate the influence of wettability on cell-material interactions. Based on the possibility to tailor the wettability of surfaces by introducing defined microstructures, cell substrates were developed that include areas with locally varying wettability. These substrates were used in cell growth experiments with *Staphylococcus aureus*. Applying a fluorescence-based method for the observation of cell diffusion, it was possible to study the impact of these local variations in wettability on the microbes *in vitro*.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Eidesstattliche Erklärung | iv |
| Kurzzusammenfassung | v |
| Abstract..... | vii |
| Inhaltsverzeichnis | ix |
| 1 Einleitung..... | 11 |
| 2 Allgemeine Grundlagen | 13 |
| 2.1 Die Zelle | 13 |
| 2.2 Zellen und ihre Umgebung | 16 |
| 2.3 Fokus auf Prokaryoten | 24 |
| 3 Bestehende Fragestellungen | 29 |
| 3.1 Quantifizierung mikrobieller Adhäsionskräfte | 29 |
| 3.2 Beeinflussung der Biokolonisation | 30 |
| 4 Vorüberlegungen zur Konzeption von Zellsubstraten | 33 |
| 4.1 Anforderungsprofil..... | 33 |
| 4.2 Motivation des Herstellungsverfahrens | 34 |
| 4.3 Allgemeines Konzept der Zellsubstrate | 36 |
| 5 Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte | 39 |
| 5.1 Vorüberlegungen..... | 39 |
| 5.2 Mikrobieller Modellorganismus..... | 40 |
| 5.3 Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate | 42 |
| 5.4 Elastische Eigenschaften der Zellsubstrate | 48 |
| 5.5 Zellkulturbedingungen | 59 |
| 5.6 Probenpräparation | 59 |
| 5.7 Auswertemethodik..... | 64 |
| 5.8 Ergebnisse | 66 |
| 5.9 Diskussion und Zusammenfassung | 69 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6 | Biokolonisation I: Strukturmoderierte Zellausrichtung | 71 |
| 6.1 | Mikrobieller Modellorganismus..... | 71 |
| 6.2 | Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate | 72 |
| 6.3 | Zellkulturbedingungen..... | 78 |
| 6.4 | Probenpräparation | 79 |
| 6.5 | Auswertemethodik..... | 81 |
| 6.6 | Ergebnisse | 82 |
| 6.7 | Diskussion und Ausblick | 86 |
| 7 | Biokolonisation II: Die Rolle des Benetzungsverhaltens | 89 |
| 7.1 | Grundlagen der Oberflächenbenetzung | 89 |
| 7.2 | Die Diffusion kolloidaler Partikel..... | 94 |
| 7.3 | Mikrobieller Modellorganismus..... | 99 |
| 7.4 | Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate | 100 |
| 7.5 | Geometrische Parameter der Substratstrukturen..... | 102 |
| 7.6 | Charakterisierung des Benetzungsverhaltens..... | 103 |
| 7.7 | Zellkulturbedingungen..... | 107 |
| 7.8 | Experimentelle Vorgehensweise | 108 |
| 7.9 | Messprotokoll..... | 109 |
| 7.10 | Auswertemethodik..... | 110 |
| 7.11 | Ergebnisse und Diskussion..... | 111 |
| 8 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 121 |
| | Danksagung..... | 125 |
| | Literaturverzeichnis | 127 |
| | Abbildungsverzeichnis | 133 |
| | Tabellenverzeichnis | 137 |
| | Anhang..... | 139 |
| A | Reaktives Ionenätzen von Siliziumoxid | 139 |
| B | Kalibrierung des AFM für Kraftmessungen | 151 |
| C | Strukturparameter der Zellsubstrate..... | 161 |
| D | Verwendete Anlagen und Materialien | 165 |
| E | Lebenslauf des Autors | 167 |

1 Einleitung

„*Microfabrication meets microbiology*“. Dieses Leitwort findet sich in einem Übersichtsartikel, der im Jahre 2007 in der Zeitschrift *Nature Reviews* veröffentlicht wurde. Die Autoren beschreiben darin, wie sich die Möglichkeiten und Methoden der Mikrostrukturtechnik dazu nutzen lassen, mikrobiologische Fragestellungen zu untersuchen, deren Klärung anders nur schwer oder gar nicht möglich wäre (siehe [Wei07]).

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Mikro- und Nanostrukturtechnik in den letzten Jahrzehnten versetzen uns in die Lage, Materie auf immer kleiner werdenden Größenskalen, bis hin zu der einzelner Atome, gezielt zu manipulieren, während gleichzeitig die Komplexität dessen, was technologisch auf der Mikro- und Nanometerskala realisiert werden kann, stetig steigt. Je umfangreicher dabei das Portfolio des „technisch Machbaren“ wird, desto mehr Beachtung erfahren die entsprechenden Technologien und Prozesse in Disziplinen abseits der traditionellen Anwendungsgebiete. Waren früher Informations- und Halbleiterindustrie die einzigen treibenden Kräfte hinter den Bemühungen hin zu immer kleineren und komplexeren Strukturen, so werden mikro- und nanoskalige Systeme längst auch in zahlreichen anderen Anwendungsgebieten genutzt. So erlaubt beispielsweise die Kombination herkömmlicher, chemischer Analysetechnik mit Methoden der Mikrostrukturierung die Integration ganzer Chemielabors auf einem Mikrochip („Lab-on-a-Chip“, siehe [Dit06]). Diese Miniaturisierung der Analytik führt zu einer drastischen Verbesserung bestehender Verfahren und ermöglicht darüber hinaus die wissenschaftliche Behandlung vollkommen neuartiger Fragestellungen mit einem Bruchteil des Aufwands früherer Methoden (aus „*Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review*“, siehe [Tri11]).

Dass die Einbeziehung mikrostrukturtechnischer Methoden in den letzten Jahren auch in den Disziplinen der Lebenswissenschaften immer populärer wurde, zeigt ein Blick auf die Anzahl der Veröffentlichungen, in denen mithilfe von Ansätzen aus der Mikro- und Nanostrukturtechnik mikrobiologische Fragestellungen untersucht werden (siehe Abbildung 1-1).

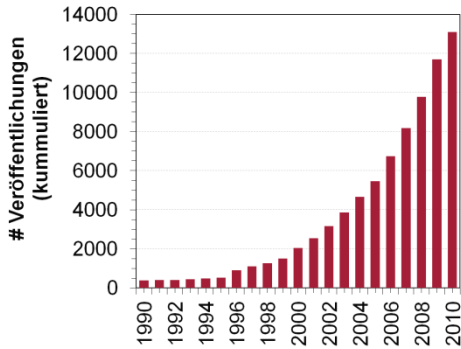


Abbildung 1-1 Veröffentlichungen zu Mikrobiologie und Strukturtechnik

Gezeigt ist die Anzahl an Veröffentlichungen die eine Kombination aus „Microbiology“ und „Nanotechnology“ oder „Microfabrication“ zum Thema hatten. Quelle: Google Scholar

Gerade auf den Gebieten der Zell- und Mikrobiologie eröffnet die Mikrostrukturtechnik neuartige Ansätze. Die Standardmethoden der Mikro- und Nanostrukturtechnik erlauben es beispielsweise, Materialien so zu bearbeiten, dass sie das Verhalten von Zellen direkt beeinflussen (siehe [Dal07], [Nil11a]) oder mithilfe von Strukturen und Sensoren auf der Größenskala von wenigen Mikro- und Nanometern die physikalischen-chemischen Wechsel-

wirkungen einzelner Zellen mit den sie umgebenden Materialien zu erfassen (siehe [Cav07], [Nil11]). Diese interdisziplinären Forschungsansätze erweitern das Wissen um die Wechselwirkung belebter Materie mit herkömmlichen und neuartigen Materialoberflächen (siehe [Mur08]). In der Anwendung ermöglichen sie so beispielsweise die Entwicklung, von neuartigen Materialoberflächen, die allein durch ihre physikalische Strukturierung antibakterielle Eigenschaften aufweisen (siehe [Car06], [Fad11]) oder von funktionalisierten Oberflächen, die das Einwachsen von Implantaten in den Körper begünstigen (siehe [McN10]).

Die Zahl der durch die Kombination von Mikrostrukturtechnik und Mikrobiologie zugänglichen Einflussfaktoren auf die Zell-Material-Wechselwirkung ist immens und so besteht ein wachsender Bedarf an innovativen Methoden und maßgeschneiderten Probenstrukturen, die geeignet sind, diesen Parameterraum experimentell zu erfassen und zu charakterisieren.

Solche Methoden und Strukturen zu entwickeln und deren Anwendbarkeit auf die Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung zu demonstrieren, ist das Ziel der hier vorgelegten Arbeit.

2 Allgemeine Grundlagen

Die Untersuchung der Wechselwirkungsmechanismen zwischen lebenden Zellen und deren Umgebung setzt Kenntnisse über die Charakteristika biologischer Systeme voraus. Auf die für das Verständnis der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wesentlichen Punkte wird nachfolgend eingegangen.

2.1 Die Zelle

Zellen bilden, im engsten Sinne der Definition, die kleinste Einheit belebter Materie. Eine einzelne Zelle zeichnet sich demnach dadurch aus, dass sie die Fähigkeit zur Reproduktion sowie zur Vererbung besitzt und sich aktiv an Veränderungen in ihrer Umwelt anpassen kann (siehe [Joy94], [Lui98], [Mir02]).

Der weitaus größte Teil aller Lebewesen der Erde ist einzellig und jedes komplexere Lebewesen besteht letztlich aus einem komplexen Netzwerk hochgradig spezialisierter Zellen. Es ist daher durchaus gerechtfertigt, sie als Grundbausteine des Lebens zu bezeichnen und den Abläufen, die den zellulären Lebenszyklus bestimmen, besondere Aufmerksamkeit zu widmen.

2.1.1 Grundlegender Aufbau

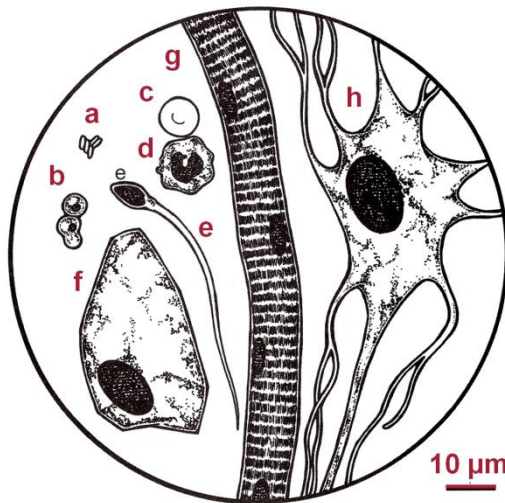


Abbildung 2-1 Maßstabsgetreue Zeichnung einiger Zelltypen

a) Fünf Bakterien des Typs *Escherichia coli*, b) zwei Hefezellen, c) ein rotes Blutkörperchen, d) ein Lymphozyt des menschl. Immunsystems, e) eine menschl. Samenzelle, f) eine menschl. Hautzelle, g) eine menschl. Muskelzelle, h) ein menschl. Neuron. Abbildung entnommen aus [Nel08], Seite 36, Beschriftungen vergrößert.

So divers wie die Lebewesen, zu denen sich einzelne oder mehrere Zellen entwickelt haben, so vielfältig ist auch der Aufbau verschiedener Zelltypen.

Abbildung 2-1 zeigt am Beispiel einer Auswahl verschiedener Zelltypen, wie stark Größenskala und Form unterschiedlicher Zelltypen variieren. Dennoch weisen alle Zellen im Allgemeinen einige grundlegende Gemeinsamkeiten auf.

So verfügt jede Zelle über eine Wandung (die Zellmembran), die das Zellinnere (das Zytoplasma) von der äußeren Umgebung, auch extrazelluläre Matrix genannt, trennt. Abhängig vom jeweiligen Zelltyp besteht diese Wandung aus einer einzigen Lipiddoppelschicht oder ist aus mehreren Schichten unterschiedlicher Zusammensetzung aufgebaut. Je nach Zelltyp verfügt diese Barriere über eine ganze Reihe von funktionellen Einheiten wie z. B. Kanälen zum aktiven und passiven Transport von Ionen oder ungeladenen Molekülen, Rezeptoreinheiten zur Weiterleitung von externen Stimuli in das Zellinnere oder Haftkomplexen, mit deren Hilfe die Zelle den physikalischen Kontakt zu ihrer Umgebung aufrecht erhält.

Innerhalb des Zytoplasmas befinden sich die zelleigenen, lebenserhaltenden Systeme, unter anderem zur Proteinsynthese und zur Metabolisierung von Nährstoffen sowie der Zellkern, der in Form des Erbguts sämtliche Informationen zu Aufbau und Erhaltung der Zelle und ihrer Bestandteile enthält.

2.1.2 Klassifizierung von Zelltypen

Nach heutiger Definition wird bei Zellen je nach Erscheinungsform zwischen zwei Kategorien unterschieden: *Eukaryoten*, zu denen beispielsweise tierische sowie Pflanzenzellen zählen, und *Prokaryoten*. Eine schematische Darstellung dieser Kategorisierung ist in Abbildung 2-2 anhand des zeitlichen Verlaufs der Entwicklung ein- und später auch mehrzelliger Organismen gegeben.

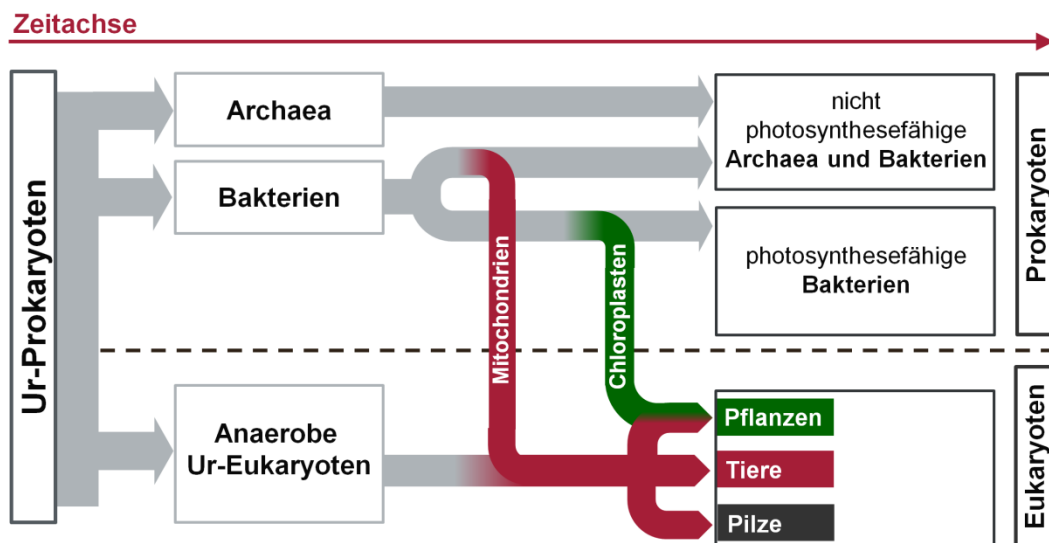


Abbildung 2-2 Zeitliche Entwicklung von Prokaryoten und Eukaryoten

Beide Kategorien haben den in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen, grundlegenden Aufbau gemein, weisen jedoch in einigen Bereichen wesentliche Unterschiede auf. Nachfolgend sind hierzu zwei Beispiele genannt (aus [Sin04]):

- Bei *Eukaryoten* ist das Erbgut durch eine zusätzliche Membran vom Zytoplasma getrennt und so an einem Ort im Zellinneren, dem Zellkern, lokalisiert. Bei *Prokaryoten* liegt das Erbgut dagegen frei im Zytoplasma vor.
- In eukaryotischen Zellen sind hochspezialisierte Organellen mit eigenem Erbgut - Mitochondrien bzw. Chloroplasten – vorhanden. Der gängigen Lehre zufolge, handelt es sich dabei ursprünglich um Bakterien, die im Laufe der Evolution eine symbiotische Verbindung mit den sogenannten Ur-Eukaryoten eingegangen sind (vgl. auch Abbildung 2-2). Bei Prokaryoten hingegen fehlen derartige Zellorganellen.

Ihr in vielerlei Hinsicht rudimentärerer Zellaufbau deutet darauf hin, dass prokaryotische Zellen die ursprünglichere Form des Lebens darstellen. Es wird vermutet, dass sich die Gruppe der *Eukaryoten* vor circa zwei bis dreieinhalb Milliarden Jahren (siehe [Doo96]), vermutlich aus der Symbiose zweier *Prokaryoten* entwickelt hat (siehe [Mar98]).

Die Einteilung von Zellen in *Eu-* bzw. *Prokaryoten* stellt die oberste Ebene eines Klassifizierungssystems mit einer Vielzahl von Unterkategorien dar. Die in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismen sind beispielsweise der Gruppe der Bakterien zuzuordnen, die eine Unterkategorie der *Prokaryoten* darstellt.

2.2 Zellen und ihre Umgebung

Um ihre Lebensfunktionen aufrechtzuerhalten, bedürfen Zellen (*Prokaryoten* und *Eukaryoten* gleichermaßen) eines ständigen Austauschs mit Ihrer Umgebung. Zum Einen müssen kontinuierlich Nährstoffe aufgenommen und Abfallprodukte abgegeben werden, zum Anderen aber auch sensorische Reize chemischer oder physikalischer Natur in das Zellinnere weitergeleitet werden.

Die Membran einer Zelle ist aus diesem Grund mit einer Vielzahl von funktionellen Einheiten (Membranproteinen) bestückt, die den aktiven sowie passiven Transport von Molekülen ermöglichen und die über biochemische Signalkaskaden extrazelluläre Reize in das Zellinnere weiterleiten (vgl. Abbildung 2-3a). Diese zelleigene Sensorik ermöglicht es beispielsweise Bakterien, einem Nährstoffgradienten zu folgen (siehe [Adl75]). Zellen im menschlichen Körper können sich mithilfe dieser Sensorik anhand der physikalischen und chemischen Umgebungsparameter orientieren und so an der richtigen Stelle des Körpers die richtige Funktion übernehmen.

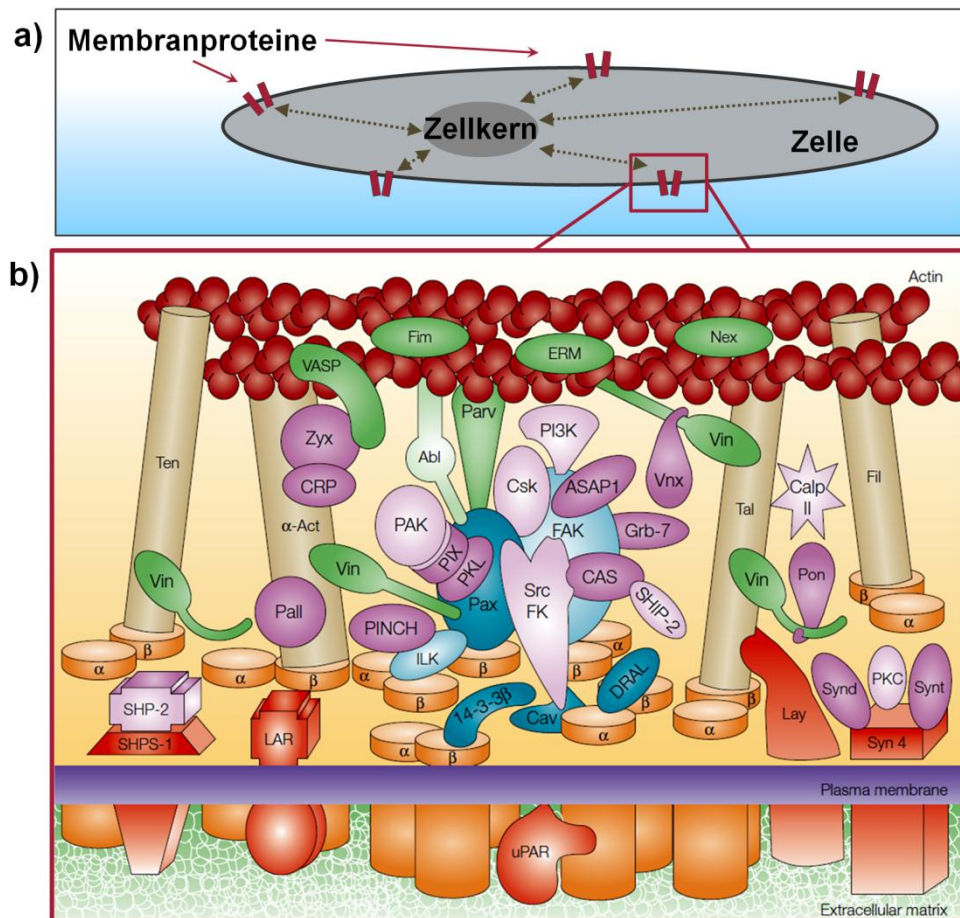


Abbildung 2-3 Kopplung von Membranproteinen

a) Schematische Darstellung der Kopplung zwischen den Membranproteinen einer Zelle und ihrem Zellkern, b) Verdeutlichung der Komplexität dieser Kopplungsmechanismen am Beispiel der für die Zellhaftung verantwortlichen Integrinkomplexe (Zylinder, orange). Die übrige Farbgebung kodiert einzelne Proteine oder Enzyme, die wiederum eine spezifische Funktion für zelluläre Vorgänge erfüllen. Für weitere Details hierzu sei auf den Quellartikel verwiesen (Grafik entnommen aus [Gei01]).

Wie in Abbildung 2-3b schematisch dargestellt ist, koppelt ein Membranprotein (hier der Adhäsionskomplex *Integrin*, in der Abbildung in Form von orangefarbenen Zylindern eingezeichnet) einer Zelle an eine Vielzahl von intrazellulären Proteinen.

Wird diese Signalkette unterbrochen, beispielsweise indem einige der Proteine in der Kette ausgeschaltet werden, kann damit das Zellverhalten signifikant beeinträchtigt werden.

So haben im vorliegenden Beispiel Wang und Kollegen gezeigt, dass durch gezieltes Ausschalten des Proteins FAK (engl. *Focal Adhesion Kinase*, in Abbildung 2-3b hellblau eingefärbt) das Migrationsverhalten von Zellen (in

diesem Fall Fibroblasten, d. h. menschliche Bindegewebszellen) gestört werden kann (siehe [Wan01]).

2.2.1 Physikalische Parameter beeinflussen Zellen

Wang und Kollegen nutzten biochemische Eingriffe in die Kopplungsmechanismen des Membranproteins *Integrin* um das Zellverhalten zu beeinflussen. Alternativ zur biochemischen oder genetischen Beeinflussung können zelluläre Funktionen auch durch eine Anpassung der physikalischen Umgebungsparameter reguliert werden.

Forschern um N.D. Evans sowie um A.J. Engler gelang es beispielsweise nachzuweisen, dass die Entwicklung von embryonalen wie auch von adulten Stammzellen in weiter ausdifferenzierte Zellen nicht nur biochemischen Faktoren unterworfen ist, sondern darüber hinaus auch eine Funktion der Substratelastizität ist (siehe [Eva09], [Eng06]).

In einem anderen Experiment konnten Forscher um Evelyn Yim mithilfe eines gitterförmig vorstrukturierten Polymersubstrats die Ausrichtung von Muskelzellen allein durch die vorgegebene Topographie des Substrats steuern (siehe [Yim05]). Diese topographie-induzierte Beeinflussung des Zellverhaltens ist dabei keinesfalls eine Konsequenz ausschließlich künstlich hergestellter Topographien, sondern ist vielmehr ein natürlicher Bestandteil biologischer Systeme.

Innerhalb ihres natürlichen Lebensraumes, beispielsweise im menschlichen Körper, sind Zellen in eine Umgebung - die extrazelluläre Matrix - eingebettet, die neben bestimmten biochemischen Merkmalen auch charakteristische physikalische Parameter, wie die Elastizität des Gewebes, eine (nanoskalige) Oberflächenrauigkeit oder definierte Ladungsverteilungen aufweist.

So besteht die extrazelluläre Matrix in menschlichem Gewebe unter anderem aus den strukturgebenden Proteinfasern *Kollagen* und *Fibronectin*, die von den gewebebildenden Zellen, den Fibroblasten, synthetisiert werden. Diese Zellen bewegen sich entlang bereits bestehender Fasern durch die extrazelluläre Matrix, indem sie über die adhäsionsvermittelnden *Integrine* an die Faseroberfläche binden (siehe [Alb10], Kapitel 20). Dabei werten sie

kontinuierlich die nanoskalige Oberflächenstruktur dieser Proteinfasern aus, die sich zum Beispiel bei *Kollagen* über typische Längenskalen von 67 nm erstreckt (aus [Jia04]).

Die Gruppe um Joachim P. Spatz konnte nachweisen, dass sie dabei extrem empfindlich auf Änderungen dieser Oberflächenstrukturen reagieren. Sie inkubierten Fibroblasten auf nanostrukturierten Substraten, die derart präpariert waren, dass Zellen nur in den durch die Nanostrukturen definierten Abständen am Substrat adherieren konnten. So konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Fibroblasten an das Substrat nur bis zu einem kritischen Abstand der Adhäsionszentren (in diesem Fall zwischen 55 nm und 70 nm) erfolgreich war. Für größere Abstände der Adhäsionspunkte konnten die Zellen keinen dauerhaften Kontakt mehr mit dem Substrat ausbilden; der Zelltod war die Folge (siehe [Cav07], [Arn08]).

Ein anderes Beispiel ist die von Michael J. Dalby und Kollegen vorgestellte Studie (siehe [Dal07]). In dieser konnte nachgewiesen werden, dass der untersuchte Zelltyp (hier: Stammzellen aus dem menschlichen Knochenmark, sog. mesenchymale Stammzellen, Details siehe [Min01]) bereits durch die nanoskalige Topographie des ansonsten chemisch inerten Zellsubstrats aus Siliziumoxid in seinem Differenzierungsverhalten beeinflusst wird.

Die obigen Beispiele zeigen, dass für ein umfassendes Verständnis zellulärer Prozesse nicht nur ausschließlich biochemische Vorgänge und Wechselwirkungen inner- und außerhalb der Zelle betrachtet werden müssen. Vielmehr ist auch die Rolle rein physikalischer Wechselwirkungen von Zellen mit ihrer Umgebung von Interesse.

Es herrscht in der Literatur Konsens darüber, dass ein tieferes Verständnis dieser Thematik wichtige Konsequenzen, vor allem für das sogenannte *Tissue Engineering*, d. h. der gezielten Herstellung von künstlichem Gewebe für das Wachstum von Zellen, z. B. für künstliche Organtransplantate, haben wird (weiterführende Informationen siehe [Lut05] oder [Daw08]).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass der Fokus bei der Erforschung der gezielten Einflussnahme auf die Zell-Substrat-Wechselwirkung im Moment auf eukaryotischen, insbesondere menschlichen Zelltypen, liegt.

2.2.2 Zellen beeinflussen ihre Umgebung

Neben der Beeinflussung von Zellen durch physikalische Umgebungsparameter ist auch der umgekehrte Fall, d. h. die Frage, über welche physikalischen Mechanismen Zellen auf ihre Umgebung einwirken, von Interesse.

Zu den typischen Experimenten zählt in diesem Zusammenhang beispielsweise die Erfassung der Kräfte, die Zellen bei der Adhäsion an oder während der Migration über eine Oberfläche entwickeln.

Derartige Experimente wurden beispielsweise von Christine Selhuber-Unkel und Kollegen an *Eukaryoten* durchgeführt. In ihrer Studie fixierten die Forscher einzelne Zellen (embryonale Fibroblasten der Ratte) an einem speziellen Cantilever eines Rasterkraftmikroskops (kurz: AFM) und ermittelten die wirksamen Adhäsionskräfte durch kontrolliertes Abziehen der Zelle von der Substratoberfläche (siehe [Sel10] und Abbildung 2-4).

In Kombination mit einer räumlich strukturierten Oberflächenfunktionalisierung der Substrate auf der Nanometerskala konnte gezeigt werden, inwiefern die Beträge der gemessenen Adhäsionskräfte vom räumlichen Abstand der zellulären Haftkomplexe abhängen (siehe Abbildung 2-4c).

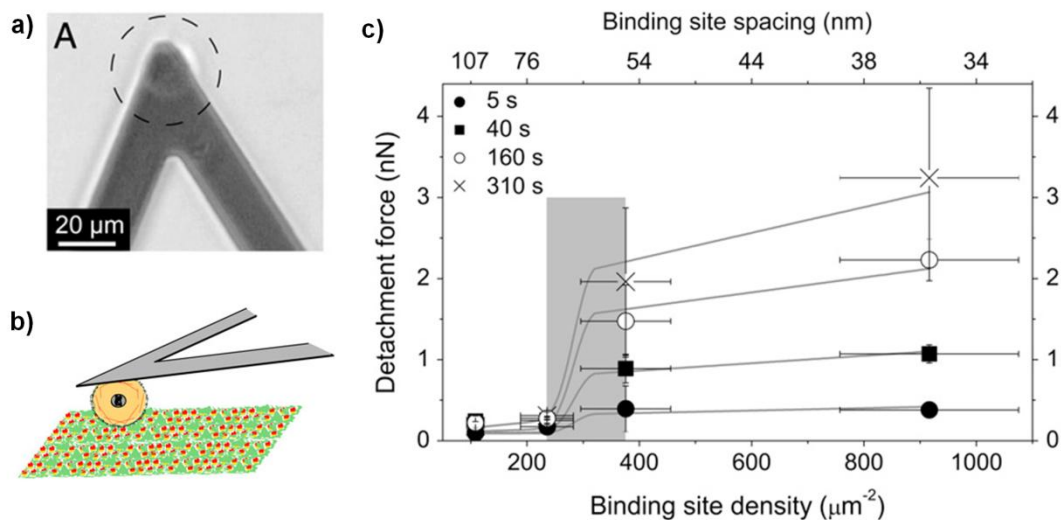


Abbildung 2-4 Erfassung von Adhäsionskräften mit dem Rasterkraftmikroskop

a) Mikroskopbild einer am AFM-Cantilever fixierten Zelle (Kreis), b) Schematische Darstellung des Experiments, c) Sprunghafte Zunahme der gemessenen Adhäsionskräfte bei Unterschreiten eines gewissen Abstands der Haftkomplexe. Die Bilder wurden entnommen aus [Sel10].

Während einerseits die Verwendung des AFMs eine Erfassung der Zellkräfte mit hoher Genauigkeit ermöglicht, stellt andererseits die notwendige Fixierung einzelner Zellen an AFM-Cantilever eine experimentelle Herausforderung dar. Zudem kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass die hierzu notwendigen präparativen Schritte die Zellfunktion und damit das Messergebnis beeinflussen.

Derlei potenziell störende Einflüsse können ausgeschlossen werden, indem alternativ das Zellsubstrat selbst als Kraftsensor zur Erfassung zellulärer Kräfte eingesetzt wird. Für eine ausführliche Zusammenfassung entsprechender Methoden sei an dieser Stelle auf einen Übersichtsartikel von K.A. Beningo und Y.-L. Wang verwiesen (siehe [Ben02]).

Ein innovativer Ansatz, der die Vorteile der AFM-basierten Messmethodik auf das Zellsubstrat überträgt, ist die von C.B. Galbraith und M.P. Sheetz realisierte Herstellung eines Silizium-Zellsubstrats mit integrierten Cantilevern zur Kraftmessung (siehe [Gal97]). Der Nachteil dieser Methode besteht im hohen Herstellungsaufwand und der dadurch begrenzten Dichte an Kraftmesssensoren. Für die Messungen wurde abgewartet, bis eine Zelle über die integrierten Cantilever wanderte.

Der Herstellungsaufwand lässt sich minimieren, indem das Zellsubstrat als passiver Kraftsensor genutzt wird, d. h. beispielsweise elastische Deformationen eines geeigneten Substratmaterials als Maß für Zellkräfte genutzt werden. Durch diesen Ansatz ist es außerdem nicht mehr notwendig, die Zelle an einer bestimmten Stelle auf dem Substrat zu positionieren.

Frühe Experimente dieser Art nutzten die Faltenbildung bei der Migration von Zellen über ein dünnes Elastomersubstrat, um auf zelluläre Kräfte zu schließen (vgl. Abbildung 2-5a, [Har80]).

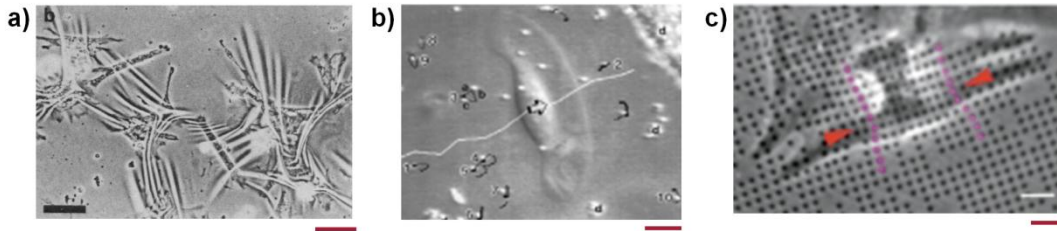


Abbildung 2-5 Elastische Substrate zur Messung von zellulären Kräften

a) Die Migration der Zellen verursacht Faltenwürfe in einer Elastomermembran (Skala: 100 μm , aus [Har80]), b) Die Deformation einer gespannten Elastomermembran wird durch ein Verschieben von optischen Markern (helle Punkte und zugehörige Trajektorien in schwarz) verfolgt (Skala: 10 μm , aus [Oli95]), c) Die Elastomermembran enthält ein regelmäßiges Gitter, das als Maß für Deformationen verwendet wird (Skala: 6 μm , aus [Bal01]).

Da eine Quantifizierung der wirksamen Kräfte anhand des Faltenwurfs nur schwer möglich war, wurde die Methode verfeinert, indem die dünne Elastomermembran an ihren Enden fest eingespannt und so die Faltenbildung unterdrückt wurde. Die Bestimmung der von der Zelle auf das Substrat ausgeübten Kräfte erfolgte nun anhand von optischen Markern, die in das Elastomersubstrat eingegossen wurden (vgl. Abbildung 2-5b, [Oli95]).

Um die durch die Zellen auf das Substrat übertragenen Spannungen noch besser sicht- und quantifizierbar zu machen, wurden darüber hinaus auch mikrostrukturierte Substrate mit regulären Oberflächenstrukturen genutzt (vgl. Abbildung 2-5c, [Bal01]).

Durch die Nutzung der elastischen Eigenschaften des Zellsubstrats als Kraftsensor konnten zelluläre Kräfte also in einem Umfeld ermittelt werden, das keine besondere Präparation der Zellen erfordert. Allerdings bestand die Herausforderung nun darin, die Beträge der beobachteten Kräfte aus den Deformationen von Markern in einer kontinuierlichen Elastomermembran zu extrahieren. Die elastizitätstheoretische Behandlung war nicht trivial und erforderte in der Regel eine computergestützte Modellierung (entsprechende Berechnungen siehe [Pel99]).

Eine Lösung für dieses Problem wurde von J. Tan und Kollegen vorgeschlagen, die den Ansatz der Mikrostrukturierung des Elastomersubstrats weiterverfolgten (siehe [Tan03]). Die Forscher erstellten mithilfe eines Vergussprozesses Zylinder mit definiertem Radius R und definierter Höhe H aus einem Elastomer material mit bekannten elastischen Eigenschaften (zusammengefasst im Elastizitätsmodul E). Bewegen sich Zellen auf diesen

sogenannten *mPADs* (aus dem Englischen: *microfabricated Post-Array-Detectors*), so führen die zellulären Kräfte zu einer Auslenkung Δx der Zylinder aus ihrer Gleichgewichtslage (siehe Abbildung 2-6).

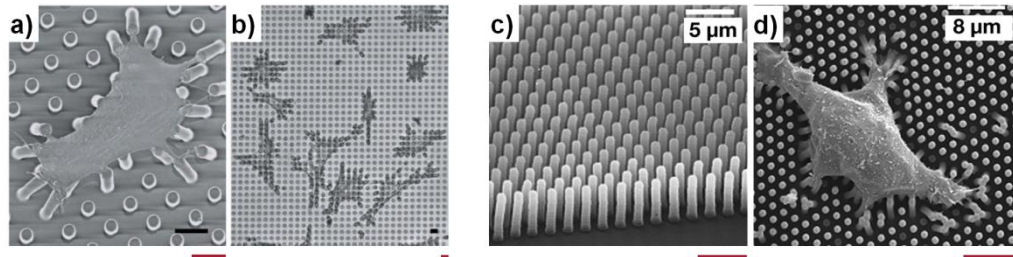


Abbildung 2-6 Zylindersubstrate zur Messung von Zellkräften

a) Deformation elastischer Zylinder durch die Adhäsion einer Zelle (Skala: 10 μm , aus [Tan03]), b) Phasen-Kontrast-Bild von Zellen auf dem Zylindersubstrat (Skala: 10 μm , aus [Tan03]), c) REM-Aufnahmen eines Zylindersubstrats mit eng angeordneten Zylindern (Skala: 5 μm , aus [Rou05]), d) Eine Zelle auf der dichten Zylinderanordnung (Skala: 8 μm , aus [Rou05])

Aufgrund der Geometrie der Zylinderstrukturen kann diese Auslenkung mittels elastizitätstheoretischer Überlegungen analytisch in die auf die Zylinder wirkende Kraft F umgerechnet werden, da in der Näherung für kleine Auslenkungen Δx und lange, dünne Zylinder ($R \ll H$) nach [Lan87] gilt:

$$F = \frac{3\pi E}{4} \cdot \frac{R^4}{H^3} \cdot \Delta x. \quad (2.1)$$

Die Quantifizierung der zellulären Kräfte wurde somit bedeutend vereinfacht.

Seit der Demonstration der *mPADs* sind eine ganze Reihe weiterer Zellstudien mit diesem experimentellen Ansatz veröffentlicht worden (siehe [Rou05], [Lem05], [Gan06], [Gha08], [Gha09], [Lem09]). Auch diverse theoretische Untersuchungen wurden durchgeführt, die sich mit der Präzision der Messmethode und eventuell notwendigen Modifikationen derselben beschäftigen (siehe [Moh05], [Sch10]). *mPADs* sind mittlerweile weit verbreitet, wenn es um die Messung von zellulären Kräften bei eukaryotischen Zellen geht.

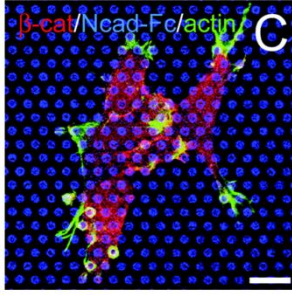


Abbildung 2-7 Verbindung von mPADs mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Eine Zelle adhiert an Mikrostrukturen, die mit n-Cadherin (blau) funktionalisiert wurden. Innerhalb der Zelle wurden f-Actin (grün) und β -Catenin (rot) eingefärbt. (Skala: 10 μm , aus [Gan06]).

In Kombination mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden lässt sich hier mittlerweile gezielt die Rolle einzelner, subzellulärer Strukturen für die Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen aufklären (siehe Abbildung 2-7, [Gan06]).

Die Methodik der *mPADs* wurde bislang noch nicht zur Messung von Kräften in prokaryotischen Systemen genutzt.

2.3 Fokus auf Prokaryoten

Aus den letzten beiden Abschnitten geht hervor, wie die physikalischen Anteile der Zell-Material-Wechselwirkung gerade für den Bereich der eukaryotischen Zellen sukzessive erforscht werden. Dabei spielt die Kombination zellbiologischer Vorgehensweisen mit Methoden der Mikro- und Nanostrukturierungstechnik eine wesentliche Rolle, da sich so die physikalischen Oberflächenparameter gezielt beeinflussen lassen.

Ähnliches ist auch für die Forschung an Prokaryoten zu erwarten, allerdings gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen, in denen die Wechselwirkung zwischen prokaryotischen Zellen, z. B. Bakterien, mit ihrer Umgebung gezielt mithilfe von Methoden der Mikro- und Nanostrukturtechnik untersucht wurde (siehe z. B. [Car06], [Chu07]).

Das Verständnis der Zell-Material-Wechselwirkung bei prokaryotischen Zellen und hier insbesondere bei Bakterien beruht vielmehr auf herkömmlichen, mikrobiologischen Studien. Die wesentlichen Erkenntnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

2.3.1 Wechselwirkungen zwischen Bakterien und ihrer Umgebung

Die bakterielle Zell-Material-Wechselwirkung wird in der Literatur gemeinhin als zweistufiger Prozess beschrieben:

In einem ersten Schritt wechselwirken die Bakterien über langreichweitige, reversible Kräfte mit der Oberfläche, während im zweiten Schritt die Zelle

über physikalisch-chemische Prozesse an die Substratoberfläche bindet (siehe [Zob43], [Mar71]).

Nach Y.H. An werden im Englischen beide Phasen sprachlich unterschieden, d. h. der erste Schritt wird als *Attachment* bezeichnet, während mit *Adhesion* die zweite, irreversible Bindung der Zelle an eine Oberfläche gemeint ist. Der gesamte Prozess wird dann unter dem Überbegriff *Adherence* zusammengefasst (vgl. [An98]). Einige Forscher teilen diesen Prozess auch in drei Phasen ein, mit einer intermediären Phase zwischen *Attachment* und *Adhesion* (siehe [Bus87]). Die zweistufige Beschreibung ist jedoch in der Literatur wesentlich weiter verbreitet (siehe [Gri87]).

Die einzelnen Phasen sind schematisch in Abbildung 2-8 dargestellt.

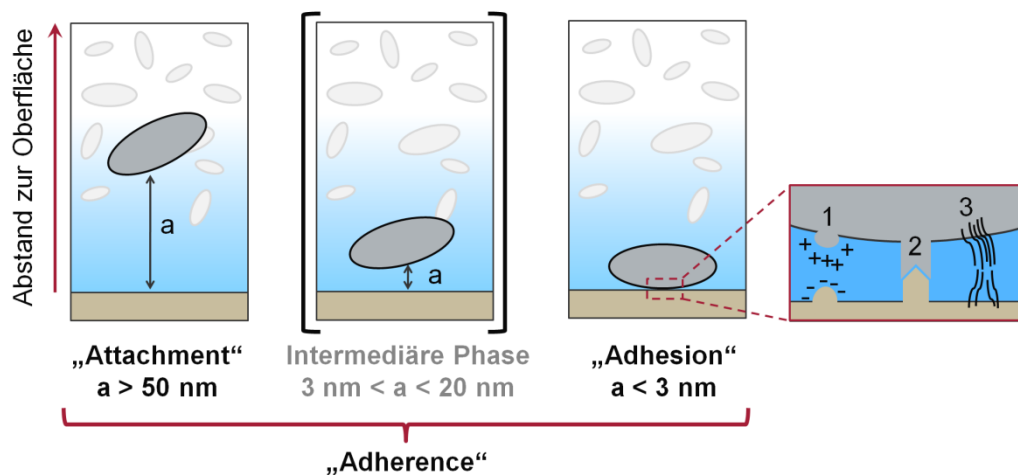


Abbildung 2-8 Phasen der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen

Aufteilung der mikrobiellen Adhäsion je nach Abstand der Zelle von der Substratoberfläche. Hauptverantwortlich für die mikrobielle Adhäsion in direktem Kontakt zur Oberfläche sind elektrostatische Wechselwirkungen (1), spezifische Wechselwirkungen mit Rezeptoren an der Oberfläche (2), aber auch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Molekülen der Zellmembran und der Oberfläche (skizziert im rechten Bild). Die Abbildung wurde auf Basis der Ausführungen in [Gri87] angefertigt.

Werden Bakterien als Suspension in einer Nährlösung auf ein Substrat aufgebracht, so sorgen zunächst Faktoren wie die Brown'sche Bewegung oder Gravitationskräfte dafür, dass sich die Zellen diffusiv der Substratoberfläche annähern (*Attachment*).

Unterschreitet der Zell-Substrat-Abstand einen gewissen Wert ($< 3 \text{ nm}$, nach [An98]), so werden kurzreichweitige Wechselwirkungskräfte, wie zum Beispiel van-der-Waals-Kräfte oder die Ausbildung chemischer Bindungen

zwischen den Bestandteilen der Zellhülle und der Substratoberfläche maßgeblich für die weitere Adhäsion (*Adhesion*).

Während im vorherrschenden Modell der Zell-Material-Wechselwirkung das *Attachment* weitestgehend unabhängig von den spezifischen Eigenschaften der Zell- bzw. Substratoberfläche abläuft, ist die Ausbildung eines irreversiblen Oberflächenkontakts während der Adhäsion hochgradig abhängig von den (bio)chemischen und physikalischen Gegebenheiten an der sich ausbildenden Zell-Material-Grenzfläche (vgl. Abbildung 2-8, rechte Seite).

2.3.2 Parameter der Bakterien-Material-Wechselwirkung

Da es sich, wie eingangs erwähnt wurde, bei Zellen um komplexe Einheiten handelt und es gerade im Bereich der prokaryotischen Zellen eine Vielzahl von Zellen mit unterschiedlichsten Eigenschaften gibt, ist sicherlich nicht jeder Parameter für jeden Zelltyp gleich relevant. Es ist daher eine Herausforderung, allgemeingültige Parameter der Adhäsion zu identifizieren. Einige Ergebnisse entsprechender Studien sind nachfolgend zusammengefasst.

Zur Ausbildung einer stabilen biochemischen Bindung zwischen Substrat und Zelle bedarf es geeigneter Bindungsstellen auf beiden Seiten sowie den passenden Umgebungsbedingungen, damit die entsprechenden chemischen Reaktionen in die bevorzugten Richtungen ablaufen können.

So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die bakterielle Adhäsion mit steigender Umgebungstemperatur (bis zu 50 °C) zunimmt (siehe [Ors77]), während auch die Zusammensetzung des wässrigen Mediums, z. B. die Ionenkonzentration, der pH-Wert oder die Zugabe von Antibiotika in nicht-tödlicher Konzentration das Adhäsionsverhalten von Bakterien beeinflusst.

Weiterhin ist die Zahl und Funktionsfähigkeit von Haftproteinen (*Adhesinen*) innerhalb der Zellmembran eine maßgebliche Einflussgröße für die Zelladhäsion. Bei Bakterien befinden sich derartige Adhesinkomplexe meist in den sogenannten Fimbrien, 0,2 nm bis 20 nm langen Proteinfilamenten mit typischen Durchmessern von 4 nm bis 7 nm, die dicht gepackt die Zellhülle umgeben (siehe [Kro91]).

Neben der durch die Adhesine gegebenen Möglichkeit, spezifische chemische Bindungen mit einem Substrat einzugehen, moderieren die Fimbrien auch unspezifische, physikalische Wechselwirkungen, da sie eher hydrophobe Eigenschaften besitzen, Bakterien mit Fimbrien also eher hydrophob sind (siehe [Lin81]).

Auch fimbrienlose Bakterien verfügen über Adhesine innerhalb ihrer Zellhülle: Als Beispiel sei hier auf den Übersichtsartikel von Timothy J. Foster und Magnus Höök verwiesen, in welchem die Autoren auf drei Haftkomplexe in der Zellhülle des Bakteriums *Staphylococcus aureus* eingehen, die bevorzugt mit den gerade auch in der extrazellulären Matrix menschlichen Gewebes vorkommenden Proteinen Fibronectin, Kollagen und Fibrinogen wechselwirken (siehe [Fos98]).

Auf der Substratseite dienen meist Biomoleküle, wie die eben erwähnten Proteine, als Bindungsstellen für die Zelladhäsion. Auch wenn zunächst keine Biomoleküle auf einer Oberfläche vorhanden sind, werden diese oftmals von den Bakterien selbst produziert oder über die Umgebung bereitgestellt. Auf diese Weise ändern sich mit zunehmender Exposition einer Oberfläche deren chemische Eigenschaften durch Anlagerung von Biomolekülen. In der Folge können Bakterien dann über diese biogene Zwischenschicht chemische Bindungen zum Substrat ausbilden, auch wenn das ursprüngliche Substratmaterial selbst für die Adhäsion von Bakterien ungeeignet gewesen wäre (siehe [Gri87]).

Zu den rein physikalischen Einflussgrößen der Zell-Material-Wechselwirkung zählen beispielsweise kurzreichweitige van-der-Waals-Kräfte, aber auch elektrische Kräfte, die durch Oberflächenladungen oder (induzierte) Dipolmomente innerhalb der Zellmembran verursacht werden.

Außerdem spielt das Benetzungsverhalten¹ der Zellhülle bzw. des Substrats eine Rolle. So wurde gezeigt, dass hydrophobe Oberflächen im Allgemeinen stärker von Bakterien besiedelt werden als hydrophile Oberflächen (siehe [Hog83]). Ein von Forschern um Fletcher untersuchter Bakterientyp zeigte sehr gute Haftung an hydrophoben, kaum geladenen Materialoberflächen, wie z. B. denen von Teflon oder Polyethylen, während die Zellad-

¹ Für Informationen zum Benetzungsverhalten siehe Kapitel 7.1.

häsion an den stark hydrophilen Oberflächen von Glas oder Glimmer deutlich geringer war (siehe [Fle79]).

Die gute Haftung an hydrophoben Substraten wurde damit begründet, dass die bakterielle Zellhülle im Allgemeinen ebenfalls eher hydrophobe Eigenschaften besitzt. Allerdings variiert das Benetzungsverhalten zwischen verschiedenen Bakterienspezies deutlich, ohne dass signifikante Unterschiede in der beobachteten Adhäsion auftraten und es wurde zudem beobachtet, dass sich das Benetzungsverhalten ein und desselben mikrobiellen Stamms bereits durch Mutationen während der Zellkultur verändern kann (siehe [Wes83]).

Zwar bestätigen einige mikrobiologische Untersuchungen bislang die Tendenz, dass gerade hydrophobe Flächen die Haftung von Bakterien begünstigen (siehe [Fin02]), eindeutig geklärt scheinen die Hintergründe jedoch nicht.

Schließlich scheint auch die mikro- bzw. nanoskalige Rauigkeit der Substratoberfläche einen Einfluss auf die Zell-Material-Wechselwirkung zu haben. Die Bedeutung dieser Einflussgröße wurde in der Vergangenheit allerdings kontrovers diskutiert. Während beispielsweise Forscher um Quirynen eine bis zu fünfundzwanzigfach stärkere Adhäsion von Bakterien auf rauen im Vergleich zu glatten Oberflächen von typischen Implantatmaterialien nachwiesen (siehe [Qui93]), konnte in anderen Studien hingegen kaum ein Einfluss der Substratrauigkeit festgestellt werden (siehe [An95]).

3 Bestehende Fragestellungen

Die im vorigen Kapitel genannten Beispiele zeigen, dass physikalische Parameter wichtige Einflussgrößen der Zell-Material-Wechselwirkung darstellen.

Während die Untersuchung dieser Parameter im Fall von Eukaryoten ein Stadium erreicht hat, in dem mittels Methoden der Mikro- und Nanostrukturtechnik die physikalische Wechselwirkung einzelner Zellen bzw. subzellulärer Funktionskomplexe mit dem Substratmaterial untersucht und beeinflusst werden kann, besteht für das Feld der Prokaryoten noch die Notwendigkeit, weitere Methoden zu entwickeln.

Es stellt sich daher gerade für das Feld der Prokaryoten die Frage, inwieweit sich die Methoden der Mikrostrukturierung nutzen lassen, um das Studium der Zell-Substrat-Wechselwirkung auf diesem Gebiet weiter zu ergänzen. Zur weiteren Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit werden insbesondere zwei Fragestellungen herausgegriffen, die nachfolgend näher erläutert werden.

3.1 Quantifizierung mikrobieller Adhäsionskräfte

Wie in Abschnitt 2.2.2 des vorigen Kapitels erläutert wurde, ist es von großem Interesse, die Kräfte zu bestimmen, die eine Zelle auf ihre Umgebung ausübt. Wie ausgeführt wurde, bestehen für Eukaryoten bereits zahlreiche, experimentelle Möglichkeiten zur Kraftmessung. Diese sollten sich auch auf Prokaryoten übertragen lassen.

Ein Ansatz zur Messung zellulärer Kräfte bei *Prokaryoten* wurde beispielsweise von S.K. Lower und Kollegen entwickelt, die - ähnlich zu dem experimentellen Vorgehen von C. Selhuber-Unkel bei Eukaryoten - ein Rasterkraftmikroskop dazu nutzten, die Adhäsionskräfte von Bakterien (*Escherichia coli*) an verschiedene Mineraloberflächen zu untersuchen (siehe [Low00]). Auch hier gilt, dass der experimentelle Ansatz eine Fixierung der Zellen am Cantilever des Rasterkraftmikroskops bedingt, was methodisch herausfordernd ist.

Interessant wäre daher, die in Abschnitt 2.2.2 ebenfalls angeführten *mPADs* für die Nutzung zur Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte nutzbar zu machen. Geeignete Elastomersubstrate sowie eine entsprechende Methodik zur Erfassung der Adhäsionskräfte werden in Kapitel 5 ausgearbeitet und an einem mikrobiellen Modellorganismus getestet.

3.2 Beeinflussung der Biokolisation

Im Hinblick auf die Frage, inwieweit sich die Zell-Material-Wechselwirkung bei Prokaryoten mithilfe von Methoden der Mikrostrukturtechnik beeinflussen lässt, werden in dieser Arbeit zwei Themengebiete bearbeitet.

3.2.1 Strukturmoderierte Ausrichtung von Zellen

Nachdem in Abschnitt 2.2.1 erläutert wurde, dass die Ausrichtung eukaryotischer Zellen durch die Vorgabe einer definierten Substratopographie beeinflusst werden kann (siehe [Yim05]), soll ein derartiger Ansatz auch für prokaryotische Zellen untersucht werden.

Eine diesbezüglich erarbeitete experimentelle Methodik wird in Kapitel 6 diskutiert, sowie auch Experimente an einem geeigneten Modellbakterium erläutert.

3.2.2 Die Rolle des Benetzungsverhaltens

Wie in Abschnitt 2.3.2 ausgeführt wurde, scheint die Rolle des Benetzungsverhaltens für die bakterielle Adhäsion nicht vollständig geklärt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass zudem die Auswirkung von mikro- und nanoskaliger Substratraugigkeit nicht eindeutig geklärt scheint.

Da das Benetzungsverhalten, wie in Abschnitt 7.1 erläutert werden wird, signifikant von der Rauigkeit einer Materialoberfläche abhängt, könnte dies auf einen weitergehenden Zusammenhang hindeuten.

In der Literatur gibt es bereits erste Ansätze für eine systematische Untersuchung dieses Sachverhalts. So haben M.L. Carman und Kollegen das Benetzungsverhalten von Zellsubstraten mittels Mikrostrukturierung variiert und die Konsequenzen für die Zell-Material-Wechselwirkung untersucht (siehe [Car06]). Die Arbeitsgruppe bestimmte Auswirkungen auf die Zelladhäsion, indem Zellsubstrate mit jeweils einer definierten Oberflächenstrukt-

rierung nach der Inkubation mit Zellen einer Waschprozedur unterzogen wurden und anschließend durch Sichten der Substrate in einem Rasterelektronenmikroskop die verbleibende Zellbedeckung ermittelt wurde.

Eine Beobachtung der Zellen im lebenden Zustand war nicht vorgesehen und somit war es nicht möglich, die Auswirkungen unterschiedlicher Oberflächenstrukturen bzw. unterschiedlichen Benetzungsverhaltens direkt während der Zellinkubation zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird daher ein Konzept entwickelt, das es ermöglicht, Bereiche mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften auf einem einzigen Zellsubstrat zusammenzufassen. Darüber hinaus wird eine Messmethode vorgeschlagen, mit der die Auswirkungen der Bereiche mit unterschiedlichem Benetzungsverhalten auf Prokaryoten *in vitro* beobachtet werden können und die eine quantitative Analyse der Beobachtungen erlaubt. Die entsprechenden Überlegungen und Experimente sind in Kapitel 7 zusammengefasst.

4 Vorüberlegungen zur Konzeption von Zellsubstraten

Die Untersuchung der in Kapitel 3 geschilderten Fragestellungen zur Zell-Material-Wechselwirkung prokaryotischer Zellen erfordert speziell für diese Anwendungsbereiche ausgelegte Zellsubstrate mit definierten Oberflächenstrukturen.

In diesem Kapitel werden die allgemeinen Anforderungen an solche Substrate formuliert und eventuelle Konsequenzen für die möglichen Verfahren zur Substratherstellung erläutert. Das Kapitel schließt mit der Motivation eines geeigneten, universell einsetzbaren Herstellungsverfahrens und eines generellen Entwurfs geeigneter Zellsubstrate.

4.1 Anforderungsprofil

Eine grundlegende Anforderung an die Zellsubstrate ist deren Biokompatibilität. Die verwendeten Materialien dürfen keine für Zellen toxischen Substanzen enthalten. Dies schließt die Verwendung von Schwermetallen (insbesondere chromhaltige Verbindungen, siehe [Gra98] oder [Day01]) und im Fall von Bakterien zudem silber- (siehe [Mor05]) oder kupferhaltige Materialien (siehe [Elz95]) aus.

Des Weiteren müssen die verwendeten Materialien eine ausreichende chemische Stabilität aufweisen, um zum Einen die Vorreinigung der Proben (beispielsweise in Ethanol, leicht basischen oder sauren Lösungen) und zum Anderen die Inkubation der Bakterien in ihren jeweiligen Nährlösungen unbeschadet zu überstehen. Da es sich bei den zu erwartenden Nährmedien im weitesten Sinne um wässrige, salzhaltige Lösungen mit teilweise leicht saurem pH-Wert handelt, scheiden daher redox-aktive Substanzen, wie beispielsweise unedle Metalle, als Substratmaterialien aus.

Die zu konzipierenden Zellsubstrate sollen über definierte Oberflächentopographien verfügen. Das Probenkonzept muss daher eine Möglichkeit zur gezielten und möglichst frei definierbaren Strukturierung der Substrate enthalten.

Schließlich gilt es bei der Probenkonzeption noch zu beachten, dass Experimente mit biologischen Komponenten *per se* eine gewisse Streuung aufweisen. Aus diesem Grund muss die zugrundeliegende Datenbasis eines Experiments groß genug sein, um statistisch fundierte Aussagen über die gemachten Beobachtungen tätigen zu können (vgl. [Ste55]).

Die Zellsubstrate müssen daher so gestaltet sein, dass die Experimente entweder durch Wiederverwenden oder eine hohe Stückzahl der Zellsubstrate mit geringen Fertigungstoleranzen häufig und unter stets gleichen Bedingungen durchgeführt werden können.

Werden die Zellsubstrate mehrmals wiederverwendet, muss sichergestellt sein, dass durch Reinigungsprozeduren zwischen zwei Experimenten bestehende Kontaminationen vollständig entfernt werden und sich die Oberflächeneigenschaften der Zellsubstrate zwischenzeitlich nicht verändern.

4.2 Motivation des Herstellungsverfahrens

Um die erarbeiteten Anforderungen an das Probenkonzept umzusetzen, wurde entschieden, den Herstellungsprozess in zwei separate Teilschritte zu gliedern.

Während in einem ersten Teil zunächst die definierten Oberflächentopographien auf einer Vorlagenstruktur erzeugt werden, erfolgt in einem zweiten Prozessschritt die Herstellung der eigentlichen Zellsubstrate mittels Replikation der bestehenden Vorlagenstruktur.

Durch die Aufteilung in zwei unabhängige Prozesse wird erreicht, dass einerseits Materialien und Prozesse verwendet werden können, die sich optimal für eine möglichst flexible Herstellung von Oberflächentopographien eignen, während andererseits durch den nachgeschalteten Abformprozess Materialien für die eigentlichen Zellsubstrate genutzt werden können, die sich durch eine hohe Biokompatibilität und chemische Stabilität auszeichnen.

Darüber hinaus ist auf diese Weise gewährleistet, dass eine einmal hergestellte Vorlagenstruktur mit definierter Oberflächentopographie zuverlässig und detailgetreu in hoher Stückzahl repliziert werden kann. Eine Wiederverwendung von Zellsubstraten ist somit nicht notwendig und die damit ver-

bundene Unsicherheit im Hinblick auf konstante Oberflächeneigenschaften entfällt.

4.2.1 Materialauswahl I – Herstellung der Vorlagenstrukturen

Das Hauptkriterium für die Auswahl des Materials für die Vorlagenstrukturen ist eine gute Bearbeitbarkeit mit lithographischen Methoden, um möglichst flexibel Oberflächentopographien erzeugen zu können.

Da trotz der Aufteilung des Herstellungsprozesses die Vorlagenstruktur noch in Kontakt mit den späteren Zellsubstraten gelangt, muss des Weiteren dafür gesorgt werden, dass keine toxischen Substanzen verwendet werden, die nach Abschluss der Herstellung auf der Vorlagenstruktur erhalten bleiben.

Da das Institut für Angewandte Physik über zahlreiche Prozesse und umfangreiches Vorwissen im Bereich der Bearbeitung von Halbleitermaterialien verfügt, liegt eine Nutzung dieser Materialklasse zur Herstellung der Vorlagenstrukturen nahe. Gerade Silizium eignet sich für das geplante Vorhaben besonders gut, da es sowohl in Reinform, als auch in oxidiert Form vollständig biokompatibel (siehe [Kot02]) ist. Mögliche Rückstände dieses Materials auf den Zellsubstraten sind daher unproblematisch. Zudem sind aufgrund der großen Bedeutung Siliziums für die moderne Halbleitertechnik zahlreiche Verfahren dokumentiert und erprobt, die eine Strukturierung bis in den Nanometerbereich erlauben (siehe [Wol00]).

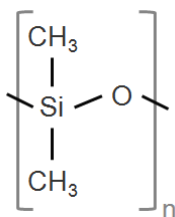
4.2.2 Materialauswahl II – Herstellung der Zellsubstrate

Für den zweiten Prozessschritt, die Herstellung der Zellsubstrate durch Abformen der Vorlagenstrukturen, muss ein vollständig biokompatibles Material verwendet werden, das sich für einen Abformprozess eignet. Zudem muss das Material chemisch ausreichend stabil sein, um eventuell eine Vorreinigung sowie die Inkubation in Nährmedien ohne Veränderungen zu überstehen.

Mögliche Materialien sind Polymerverbindungen, wie sie im Allgemeinen auch für die Imprint-Lithographie eingesetzt werden, da diese sich prinzipiell auch für die Verwendung in einem Vergussprozess eignen. Beispiele für derartige Polymere sind Poly(methylmethacrylat), Polystyrol oder

Poly(dimethylsiloxan) (siehe [Mal02], [Guo07]) sowie Hybridpolymere aus anorganischen (Gläser, Keramiken, Silikonverbindungen) und organischen Komponenten, sogenannte OrmoCere (siehe [Haa03]).

In dieser Arbeit wird zur Herstellung der Zellsubstrate Poly(dimethylsiloxan) (kurz: PDMS) verwendet. Dieses biokompatible Material ist mithilfe eines Vergussprozesses strukturierbar, chemisch stabil und zeichnet sich durch eine hohe Elastizität aus; eine Eigenschaft, die insbesondere für die in Kapitel 5 diskutierte Methodik zur Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte interessant ist.



Bei PDMS handelt es sich um ein anorganisches Polymer, dessen Grundeinheit, aus einer beidseitig methylierten Siloxanverbindung besteht (siehe Abbildung 4-1).

Abbildung 4-1
Basiseinheit von PDMS

Das hier verwendete PDMS wurde unter dem Markennamen *Sylgard 184*² von der Firma Dow Corning GmbH, Wiesbaden bezogen. Bei *Sylgard 184* handelt es sich

um ein Set mit zwei Komponenten, bestehend aus einem niedermolekularen PDMS, dem „Precursor“ und einem platinhaltigen Katalysator, dem „Curing agent“, beide in flüssiger Form. Werden die beiden Komponenten vermischt, setzt eine radikalische Vernetzungsreaktion ein und das Material härtet aus. Die Dauer der Vernetzungsreaktion ist dabei stark temperaturabhängig und lässt sich von ca. 10 Minuten bei 150 °C auf bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur ausdehnen (siehe [Syl08]).

4.3 Allgemeines Konzept der Zellsubstrate

Abbildung 4-2 zeigt schematisch den grundlegenden Entwurf der in dieser Arbeit herzustellenden Zellsubstrate.

² Sylgard 184 ist ein eingetragenes Warenzeichen der Dow Corning Corporation

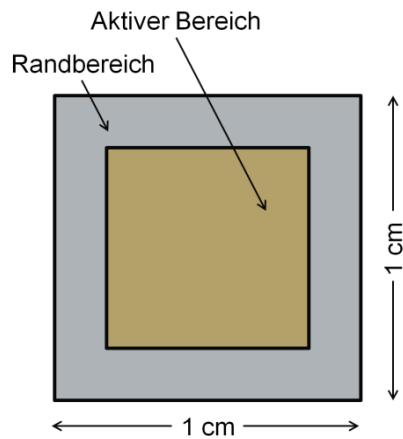


Abbildung 4-2 Grundlegender Entwurf der Zellsubstrate

Da die Zellsubstrate möglichst vielseitig verwendbar für die Inkubation von Zellen sein sollen, wurde ihre Größe so gewählt, dass sich die Zellsubstrate problemlos für einen Einsatz in sogenannten „24-Well“-Platten, wie sie standardmäßig in Zellexperimenten verwendet werden, eignen.

Es wurden daher quadratische Zellsubstrate mit einer Kantenlänge von 1 cm konzipiert. Die Substrate gliedern sich in den zentralen, „aktiven Bereich“, der die Oberflächentopographien enthält, und den umgebenden Randbereich, der eine Handhabung der Zellsubstrate mithilfe von Pinzetten erlaubt, ohne den „aktiven Bereich“ zu beschädigen.

Anhand dieser Vorüberlegungen sind nun die Voraussetzungen für eine experimentelle Behandlung der in Kapitel 3 formulierten Fragestellungen geschaffen. In den nachfolgenden Kapiteln werden die entsprechenden Experimente erläutert.

5 Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte

Die in Abschnitt 2.2.2 erwähnte Methodik, Adhäsionskräfte einzelner, eukaryotischer Zellen mithilfe von strukturierten Elastomersubstraten zu ermitteln, sollte sich auch auf mikrobielle Systeme anwenden lassen. Folgende Punkte müssen allerdings berücksichtigt werden, um eine entsprechende Methode entwickeln zu können.

5.1 Vorüberlegungen

Eine Herausforderung besteht darin, dass Bakterien mit typischen Ausdehnungen von wenigen Mikrometern im Allgemeinen deutlich kleiner sind, als die eukaryotischen Zellen (typ. einige zehn bis hundert Mikrometer), an denen bislang derartige Experimente durchgeführt wurden.

Die bestehende Methodik der Kraftmessung basiert darauf, dass eukaryotische Zellen ausschließlich entlang der Oberkanten der Elastomerstrukturen anhaften. Dies wird in bestehenden Experimenten dadurch gewährleistet, dass der Abstand der Strukturen deutlich kleiner als die mittlere Ausdehnung der untersuchten Zellen gewählt wird. Um Gleiches im Fall der kleineren Bakterien zu gewährleisten, müssten die Strukturen entsprechend deutlich dichter, d.h. mit Strukturabständen bis deutlich unter 1 μm angeordnet sein.

Werden die Elastomerstrukturen allerdings derart dicht angeordnet, so sind für eine Erfassung der jeweiligen elastischen Deformationen herkömmliche, optische Methoden nicht mehr ausreichend. Es wird folglich eine alternative Auswertemethodik benötigt, um die Lage der zu untersuchenden Bakterien und die Deformation der Elastomerstrukturen zu vermessen. Die Erfassung der Adhäsionskräfte soll daher mithilfe des am Institut für Angewandte Physik vorhandenen Rasterelektronenmikroskops durchgeführt werden.

Dies erfordert die Trocknung der Zellsubstrate nach Anwachsen der Bakterien. Es ist somit nicht mehr möglich, die Zelladhäsion *in vitro* zu bestimmen. Zudem muss gewährleistet sein, dass die notwendigen Präparationsschritte vor der Erfassung der Zellkräfte die Messergebnisse

nicht beeinträchtigen. Dies muss durch eine umfassende Analyse der Präparationsschritte im Vorfeld der eigentlichen Zellexperimente sichergestellt werden.

5.1.1 Angewandte Methodik

Aufgrund der oben genannten, notwendigen Anpassungen wurde das folgende Vorgehen zur Erfassung mikrobieller Adhäsionskräfte ausgearbeitet.

- 1) Inkubation von Zellen auf einem Substrat mit geeigneten Elastomerstrukturen
- 2) Trocknung der Zellsubstrate bei gleichzeitiger Konservierung der bestehenden Zellstrukturen
- 3) Bestimmung elastischer Deformationen der Strukturen zur Kraftmessung mithilfe des Rasterelektronenmikroskops

Gemäß diesem Ablaufplan wurden entsprechende Experimente konzipiert und an dem in Abschnitt 5.2 vorgestellten Bakterienstamm durchgeführt.

Die Konzeption der zur Kraftmessung geeigneten Strukturen ist in Unterkapitel 5.3 erläutert. Abschnitt 5.4 beinhaltet Kalibriermessungen an den elastischen Strukturen, während in den nachfolgenden Kapiteln Untersuchungen zum Einfluss der Probenpräparation diskutiert werden. Die Ergebnisse der Kraftmessungen am vorgeschlagenen, mikrobiellen Modellsystem werden schließlich in Unterkapitel 5.8 behandelt.

5.2 Mikrobieller Modellorganismus

Als Modellorganismus für die Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte wird im Rahmen dieser Arbeit *Staphylococcus aureus* verwendet.

Bei *Staph. aureus* handelt es sich um ein Bakterium aus der Familie der *Staphylococcaceae*. Der Name leitet sich aus der sphärischen Form (griech. kokkos: Korn, Kern) der Bakterien und der Anordnung der Zellen ab. Durch Zellteilung bilden Staphylokokken allmählich traubenförmige Zellhaufen (griech. staphylé: Weintraube), wie in Abbildung 5-1 exemplarisch in einer REM-Aufnahme gezeigt ist. Der Namenszusatz *aureus* (lat. *Der Goldene*) beruht auf der goldgelben Färbung, die die Bakterienkolonien bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop zeigen.

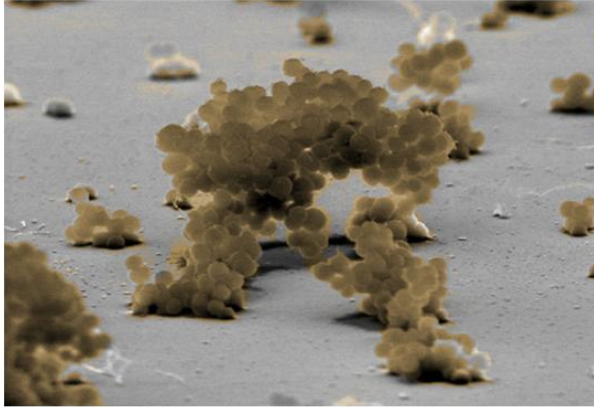


Abbildung 5-1 Staphylococcus aureus im Rasterelektronenmikroskop.

Die Abbildung wurde zur Hervorhebung der Bakterien nachträglich koloriert. (Skala: 5 μm , Bild gekippt)

Die Bakterien haben typische Durchmesser zwischen 0,8 μm und 1,5 μm . Der hier verwendete Stamm *Staphylococcus aureus* (Laborstamm SA113) gehört in seiner ursprünglichen Form zur Mikroflora des Menschen.

Nach [Nob97] kommt das Bakterium bei ca. 35% aller gesunden Erwachsenen in der Nasenschleimhaut vor. Auch

auf der Haut kann es nachgewiesen werden.

Aufgrund seiner hohen Anpassungsfähigkeit und ausgeprägter Adhäsionsmechanismen kann *Staph. aureus* auch körperfremde Oberflächen, wie Implantat- oder Kathetermaterialien, kolonisieren und so bei mangelnder Hygiene beispielsweise im Krankenhausbetrieb über Infusionsnadeln oder Ähnliches ins Körperinnere gelangen.

Dort können dann Infektionen, wie beispielsweise Entzündungen der Herzinnenhaut (*bakterielle Endokarditis*) oder auch schweres Kreislauf- und Organversagen (*Toxisches-Schock-Syndrom*) die Folge sein (siehe [Low98]). Der übermäßige Gebrauch von Antibiotika zur Bekämpfung der auftretenden Infektionen hat das vermehrte Auftreten von resistenten Bakterienstämmen zur Folge. Bekannt sind in diesem Zusammenhang insbesondere die sogenannten *methicilin-resistenten Staph. aureus* (kurz MRSA, siehe [Nob97]), aber auch *vancomycin-resistente Staph. aureus* (kurz VRSA, siehe [Hir01]), die eine Behandlung der entsprechenden Infektionen zunehmend erschweren.

Aufgrund dieser Resistenzen wird *Staph. aureus* als eine der bedeutendsten Ursachen für sogenannte Krankenhausinfektionen angesehen (siehe [Tay02]).

5.3 Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate

Um Elastomerstrukturen konzipieren zu können, deren elastische Eigenschaften sich für die Kraftmessung an *Staph. aureus* eignen, müssen zunächst die zu erwartenden Adhäsionskräfte abgeschätzt werden.

5.3.1 Abschätzung der notwendigen Struktursteifigkeiten

Aufgrund von früheren Experimenten anderer Forschergruppen, wie beispielsweise denen von Abu-Lail und Kollegen, die mikrobielle Adhäsionskräfte mithilfe von rasterkraftmikroskopischen Methoden abschätzten, lässt sich für die zu erwartenden Kräfte ein Bereich von

$$0,1 \text{ nN} \leq F_{\text{mikrobe}} \leq 100 \text{ nN} \quad (5.1)$$

angeben (siehe [Abu03]). Die Messung dieser Kräfte soll im Rahmen der hier verwendeten Methodik über die Auslenkung Δx der Elastomerstrukturen erfolgen.

Wird angenommen, dass sich im Rahmen des Experiments elastische Deformation derartiger Strukturen aus ihrer Ruhelage von $\Delta x \geq 20 \text{ nm}$ im Rasterelektronenmikroskop gerade noch zuverlässig bestimmen lassen, so ergibt sich für die Steifigkeiten geeigneter Strukturen ein Bereich von

$$5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m}} \leq k_{\text{mess}} \leq 5 \frac{\text{N}}{\text{m}} \text{ bzw.} \quad (5.2)$$

$$5 \frac{\text{nN}}{\mu\text{m}} \leq k_{\text{mess}} \leq 5000 \frac{\text{nN}}{\mu\text{m}} \quad (5.2a)$$

wobei Gl. (5.2)a das Intervall in einer Einheitenkombination angibt, die in der Literatur üblicherweise verwendet wird.

5.3.2 Layout der Zellsubstrate

Um den gesamten in Gl. (5.1) bestimmten Bereich abdecken zu können, werden auf den Zellsubstraten für die Kraftmessung Strukturen mit unterschiedlichen Steifigkeiten erzeugt.

Die Variation der Struktursteifigkeiten wird erreicht, indem auf dem Zellsubstrat mehrere Felder mit jeweils unterschiedlichen Zylinderradien R bei einheitlicher Zylinderhöhe H angelegt werden (siehe Abbildung 5-2a).

Zusätzlich wird der Abstand A der Zylinder von Feld zu Feld variiert, sodass sich auf dem Zellsubstrat eine Variationsmatrix ergibt (vgl. Abbildung 5-2b und c).

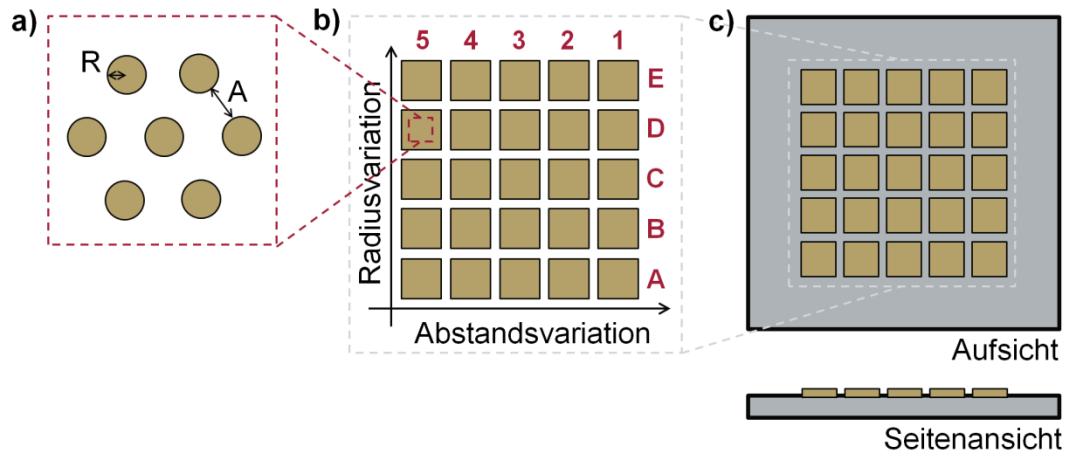


Abbildung 5-2 Layout der Zellsubstrate zur Kraftmessung

a) Hexagonal angeordnete Zylinderstrukturen mit Radius R und Abstand A, b) 25 Kombinationen der Parameter R und A, zusammengefasst in einer Variationsmatrix, c) schematische Darstellung des kompletten Zellsubstrats.

Innerhalb der Variationsmatrix verfügt jede Reihe, gekennzeichnet durch die Zeilenkennungen A bis E, über einen einheitlichen Radius R, während die Abstände A der Zylinderstrukturen jeweils entlang einer Spalte, gekennzeichnet durch die Kennungen 1 bis 5, konstant sind.

Die hier verwendeten Zellsubstrate mit einer Gesamtgröße von $(1 \times 1) \text{ cm}^2$ beinhalten insgesamt 25 verschiedene Zylinderfelder, von denen jedes eine Fläche von $(500 \times 500) \mu\text{m}^2$ einnimmt.

5.3.3 Herstellung der Vergussformen

Zunächst wurden entsprechend des Entwurfs der Zellsubstrate Vergussformen aus Siliziumoxid hergestellt. Als Ausgangspunkt dienten dabei Siliziumwafer mit einer $\langle 111 \rangle$ -orientierten Oberfläche, die zuvor mithilfe einer Wafersäge auf eine Größe von $(1 \times 1) \text{ cm}^2$ gebracht wurden.

Die Waferstücke wurden in Aceton, Isopropanol und demineralisiertem Wasser gereinigt. Die durch die Lagerung an Raumluft entstandene, natürlich gewachsene Schicht Siliziumdioxid (SiO_2) wurde in einem einminütigen Ätzschritt in Ammoniumfluorid entfernt. Dies ist die Ausgangssituation für das Prozessschema in Abbildung 5-3 (Schritt 1).

Es folgte die plasmagestützte Niedertemperaturabscheidung einer 2 µm dicken Schicht SiO₂ aus der Gasphase bei einer Substrattemperatur von 400 °C und unter Verwendung der Prozessgase Silan (SiH₄) und Distickstoffmonoxid (N₂O) in einem Niederdruckplasma (1,0 Torr bei 10 Watt Plasmaleistung) (Schritt 2).

Danach wurden die Waferstücke in einer Hochvakuumanlage bei einem Druck von typischerweise 6·10⁻⁶ mBar mit einer 40 nm dicken Schicht Aluminium versehen (Schritt 3).

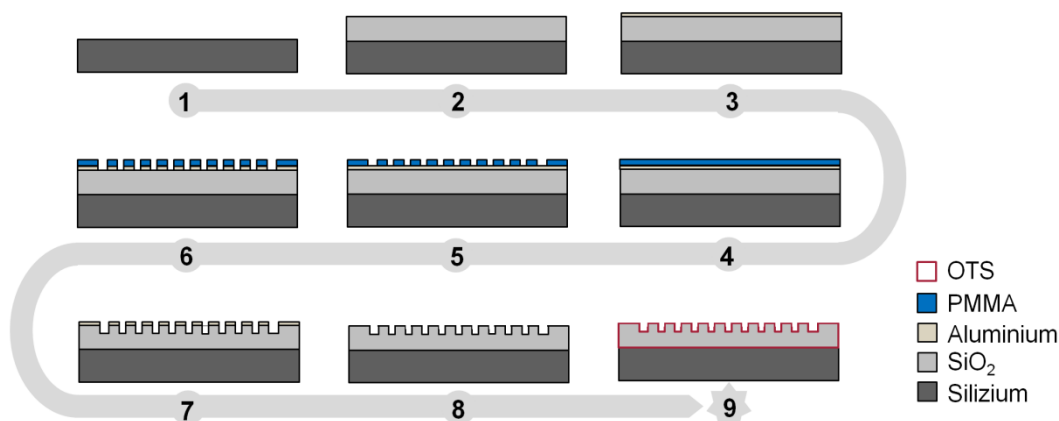


Abbildung 5-3 Erzeugung der Oberflächentopographien auf Vergussrohlingen.

Die Definition der Oberflächentopographien erfolgte mittels Elektronenstrahlithographie unter Verwendung von Poly(methylmethacrylat) (PMMA) als Elektronenstrahllack (Abbildung 5-3, Schritte 4 und 5).

Nach der Entwicklung der Lackstruktur wurde diese mithilfe eines nass-chemischen Ätzschritts in einer Mischung aus 70 % H₃PO₄, 3 % HNO₃ und 27 % H₂O in die Aluminiumschicht übertragen (Schritt 6).

Durch Reaktives Ionenätzen in einem Radiofrequenzplasma mit den Prozessgasen Trifluormethan (CHF₃) und Stickstoff (N₂), einer Plasmaleistung von 120 W und einem Druck von 79 mTorr wurde die Oberflächentopographie in SiO₂ übertragen, wobei die Kombination aus PMMA und Aluminium als Ätzmaske fungierte (Schritt 7). Der verwendete Ätzprozess wurde eigens für diesen Zweck entwickelt. Eine detaillierte Beschreibung und Prozesscharakterisierung findet sich in Kapitel A des Anhangs.

Abschließend folgte noch die Reinigung des Waferstücks von überschüssigem PMMA und Aluminium in Aceton bzw. einem nasschemischen Ätzschritt (Schritt 8).

Um bei der späteren Verwendung der Vergussformen gewährleisten zu können, dass sich das Abformmaterial zuverlässig aus den Formen löst, wurde deren Oberfläche zusätzlich passiviert.

Die Auswirkungen dieses Prozessschritts lassen sich anhand der sich ändernden Benetzung der Vergussformen mit Wasser visualisieren. Dies ist in Abbildung 5-4 anhand von Kontaktwinkelmessungen dargestellt³.

Die zunächst mäßig hydrophilen Vergussformen (Kontaktwinkel $\vartheta_a = 66 \pm 5^\circ$) wurden in eine 1:2-Lösung aus Schwefelsäure (H_2SO_4) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gegeben. Die stark reduzierende Wirkung dieser sogenannten „Piranha-Lösung“ führt zu einer Hydroxylierung der Oberfläche; der Kontaktwinkel nimmt drastisch ab ($\vartheta_b = 25 \pm 5^\circ$).



Abbildung 5-4 Oberflächenfunktionalisierung der Vergussformen

Gezeigt sind jeweils Seitenansichten eines Wassertropfens auf Siliziumdioxid: a) ohne Vorbehandlung, b) nach Hydroxylierung der Probe in Piranha-Lösung, c) nach Funktionalisieren der Probe mit OTS.

Nachdem die Formen gründlich mit demineralisiertem Wasser gespült wurden, erfolgte die Silanisierung durch Einlegen der Formen in eine 5 % Lösung von Octadecyltrichlorosilan (OTS) in n-Heptan (3 Minuten). Da OTS in Kontakt mit Wasser zur Polymerisation neigt, wurden die Formen danach in Isopropanol gespült, um eine Kontamination der Formen durch überschüssiges OTS zu vermeiden. Der Erfolg der Silanisierung kann wieder durch eine Kontaktwinkelmessung evaluiert werden: Der Kontaktwinkel steigt auf $\vartheta_b = 88 \pm 5^\circ$; Wasser perlt nun von der Oberfläche der Vergussformen ab (siehe Abbildung 5-4c).

³ Für eine Erläuterung der Grundlagen des Benetzungsverhaltens von Oberflächen, sei an dieser Stelle auf Kapitel 7.1 verwiesen.

5.3.4 Herstellung der PDMS-Zellsubstrate

Die Vergussform wurde zunächst in Aceton und Isopropanol gereinigt und durch Abblasen mit Stickstoff getrocknet.

Unvernetztes Polydimethylsiloxan wurde durch Mischen des zweikomponentigen Sylgard 184 vorbereitet, wobei jeweils nach Gewicht zehn Teile der unvernetzten PDMS-Vorläufersubstanz auf einen Teil des Vernetzungskatalysators gegeben wurden. In einer Teflonwanne wurde die Form dann in PDMS eingegossen (siehe Abbildung 5-5, Schritt 1).

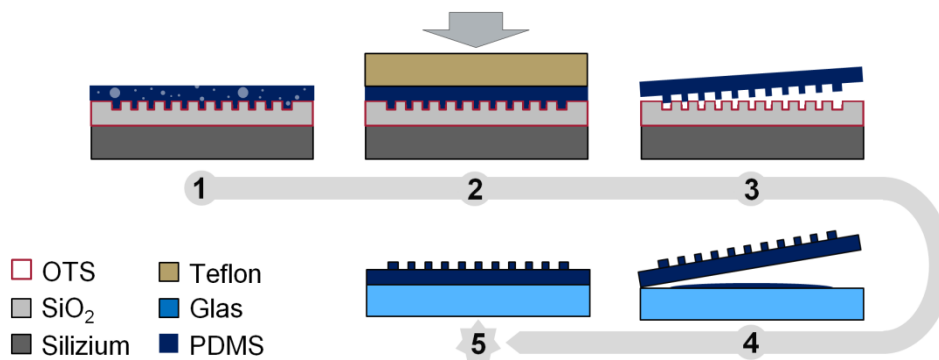


Abbildung 5-5 Herstellung von Oberflächentopographien in PDMS.

Der Behälter wurde anschließend in einem Exsikkator für 10 Minuten durch Evakuieren einem leichten Unterdruck ausgesetzt, um eventuell im PDMS gelöste Gasblasen auszutreiben. Die Wanne wurde dann mit einem Stempel verschlossen und der Aufbau mithilfe einer hydraulischen Presse durch einen Druck von ca. 10 bar komprimiert, während mithilfe einer in der Presse integrierten Heizplatte gleichzeitig eine Temperatur von 110 °C eingestellt wurde (Schritt 2). Nach 45 Minuten wurde der Aufbau schließlich geöffnet und das ausgehärtete PDMS mitsamt Vergussform als Pellet aus der Teflon-Wanne gelöst.

Durch vorsichtiges Abschälen mit einem Skalpell wurden PDMS-Abguss und Form voneinander getrennt (Schritt 3). Ein solches Zellsubstrat direkt nach dem Ablösen aus der Vergussform ist in Abbildung 5-6 gezeigt.

Die in Abbildung 5-6a noch vorhandenen hohen Ränder, die durch die beim Vergussprozess verwendete Teflonform bedingt waren, wurden im Allgemeinen direkt nach dem Lösen aus der Vergussform mithilfe eines Skalpells entfernt, sodass das Zellsubstrat seine endgültige Größe von 1 cm² erhielt.

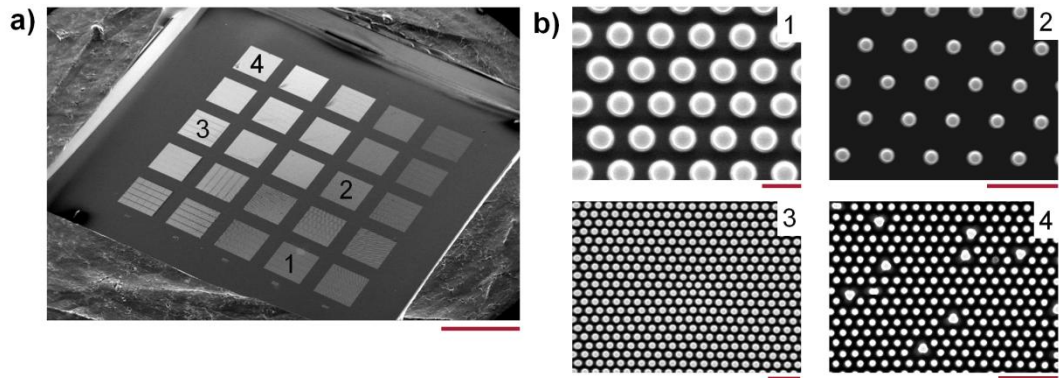


Abbildung 5-6 REM-Aufnahmen eines PDMS-Zellsubstrats zur Kraftmessung

a) Übersichtsaufnahme (Skala: 1 mm, Bild gekippt), b) vergrößerte Aufsichten auf die nummerierten Felder (Skalen: 5 µm)

Um den elastischen PDMS-Abguss zu stabilisieren, wurde dieser abschließend durch Verkleben mit frisch angerührtem PDMS auf einem passend zugeschnittenen Glaträger fixiert (Schritt 4) und bis zur weiteren Verwendung steril verpackt.

5.3.5 Charakterisierung der Strukturparameter

Aus REM-Aufnahmen wurden die mittleren Geometrieparameter der Felder auf den Zellsubstraten bestimmt.

Alle Zylinderstrukturen haben dieselbe mittlere Höhe $H = 1243 \pm 66 \text{ nm}$. Gemäß der Konzeption weisen die Zylinder innerhalb der Felder entlang einer Zeile der Variationsmatrix im Mittel die gleichen Radien R auf, während entlang einer Spalte der Variationsmatrix die mittleren Abstände A konstant gehalten werden. Die entsprechenden Mittelwerte sind in Abbildung 5-7a und Abbildung 5-7b dargestellt.

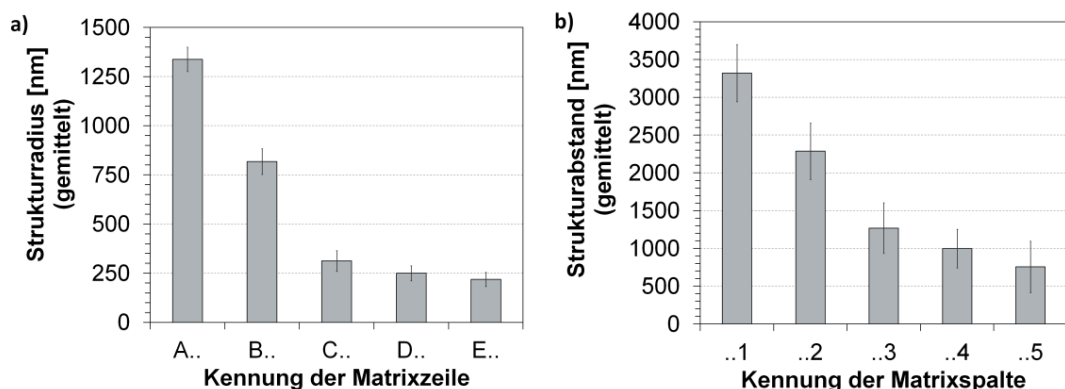


Abbildung 5-7 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrix

a) Mittlere Strukturradien entlang der Matrixzeilen A bis E, b) mittlere Strukturabstände entlang der Matrixspalten 1 bis 5.

Die Geometrieparameter der einzelnen Felder sind in Tabelle C. im Anhang zusammengefasst.

Durch den Ätzprozess, der zur Herstellung der Vergussformen verwendet wird, weisen bereits die Vorlagenstrukturen auf der Vergussform eine gewisse, konische Form auf. Die Abformung dieser Vorlagen in PDMS verstärkt diesen Effekt noch, sodass die Zylinderstrukturen auf den Zellsubstraten eine deutlich konische Form aufweisen. Es stellt sich, abhängig vom jeweiligen Radius und Abstand der einzelnen Strukturen, ein deutlich von null abweichender Flankenwinkel ein. Dies hat zur Folge, dass die Zylinderstrukturen an der Basis größer als an ihrer Oberseite sind. Eine genauere Betrachtung des Flankenwinkels ist in Kapitel A im Anhang gegeben. An dieser Stelle sei nur darauf verwiesen, dass sich die hier angegebenen Strukturradien jeweils auf die Radien an der Oberkante der Zylinderstrukturen beziehen.

5.4 Elastische Eigenschaften der Zellsubstrate

Um die Bestimmung mikrobieller Adhäsionskräfte zu ermöglichen müssen die elastischen Eigenschaften der hergestellten Elastomerstrukturen möglichst genau bekannt sein.

5.4.1 Die elastischen Eigenschaften des Substratmaterials

Die elastischen Eigenschaften des PDMS hängen letztlich vom Vernetzungsgrad des Elastomers nach dem thermischen Härteprozess ab und je nach anfänglichem Mischungsverhältnis zwischen Precursor- und Katalysatorlösung lässt sich dieser in einem weiten Bereich einstellen. Die Folge ist eine relativ hohe Variabilität der elastischen Eigenschaften.

In Abbildung 5-8 ist dies am Beispiel des Elastizitätsmoduls (im Englischen Young's Modulus) E_{PDMS} gezeigt. Die unterschiedlichen Werte von E_{PDMS} für dasselbe Mischungsverhältnis ergeben sich durch die Anwendung unterschiedlicher Berechnungsmethoden für das E-Modul, die von Khanafer und Kollegen in dieser Studie verglichen wurden (siehe [Kha09]).

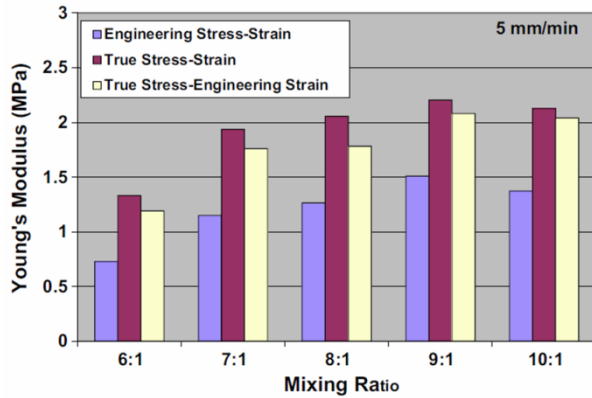


Abbildung 5-8 Zusammenhang zwischen Elastizitätsmodul und Mischungsverhältnis der PDMS-Komponenten

Abhängigkeit des Elastizitätsmoduls vom Mischungsverhältnis, wobei jeweils drei verschiedene Definitionen zur Berechnung des E-Moduls angenommen wurden. Entnommen aus [Kha09]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde PDMS mit einem konstanten Mischungsverhältnis von 10:1 (Gewichtsprozent) verwendet. Wie bereits Abbildung 5-8 zu entnehmen ist, variieren die Angaben für den Elastizitätsmodul je nach verwendeter Mess- bzw. Berechnungsmethode. Die Literaturwerte E_{PDMS} bewegen sich dementsprechend in einem Intervall zwischen 750 kPa und 2,4 MPa (siehe [McD02], [Kha09]).

5.4.2 Grundlage zur Berechnung der Struktursteifigkeiten

In bisherigen Experimenten zur Bestimmung zellulärer Adhäsionskräfte wurden die elastischen Eigenschaften der verwendeten Elastomerstrukturen mithilfe elastizitätstheoretischer Überlegungen rechnerisch abgeschätzt. Den Betrachtungen liegt eine idealisierte Modellvorstellung aus der Balkentheorie zugrunde, nach der sich die Auslenkung Δx eines langen, dünnen

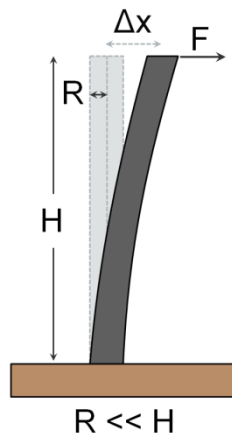


Abbildung 5-9 Steifigkeit eines Zylinders gemäß der Balkentheorie

Zylinders aus seiner Ruhelage unter Einwirkung einer Kraft F wie folgt berechnet (siehe Abbildung 5-9, [Lan87]).

Aus der Balkentheorie ergibt sich für einen schwach gebogenen Zylinder mit $R \ll H$:

$$F = \frac{3\pi E}{4} \cdot \frac{R^4}{H^3} \cdot \Delta x = k_{theo} \cdot \Delta x, \quad (5.3)$$

d. h. der Zylinder verhält sich wie eine ideale, Hooke'sche Feder mit einer effektiven Steifigkeit k_{theo} , die durch die elastischen Eigenschaften

ten des Materials, hier ausgedrückt durch den Elastizitätsmodul E , sowie die Geometrie des Zylinders bestimmt ist.

Wendet man obige Gleichung direkt auf die hier angefertigten Strukturen an, so ergeben sich für die fünf unterschiedlichen Strukturradien die nachfolgend aufgelisteten, effektiven Steifigkeiten. Damit decken sie den in Gleichung (5.2)a formulierten Bereich geeigneter Steifigkeiten im Wesentlichen ab.

Tabelle 5.1 Effektive Steifigkeiten der PDMS-Strukturen nach Gl. (5.3)

| Matrixzeile | Mittlerer Strukturradius [nm] | Aspektverhältnis H/R | Effektive Steifigkeit nach Gl. (5.3) [nN/μm] |
|-------------|-------------------------------|----------------------|--|
| A.. | 1337±124 | 0,93±0,04 | 7870±729 |
| B.. | 818±130 | 1,52±0,12 | 1106±180 |
| C.. | 312±104 | 3,98±0,66 | 24±6 |
| D.. | 250±76 | 4,97±0,78 | 10±2 |
| E.. | 219±70 | 5,68±0,93 | 6±1 |

5.4.3 Grenzen der Näherung

Nun beschreibt die Gleichung (5.3) zugrundeliegende Modell strenggenommen nur die Näherung ($R \ll H$, fixierte Zylinderbasis), in der die angreifende Kraft F ausschließlich eine Biegung des idealen Zylinders bewirkt. Wie in Abbildung 5-10 schematisch dargestellt ist, muss diese Idealisierung im Fall der hier angefertigten Kraftmessstrukturen überprüft werden, da zum Einen geringe Aspektverhältnisse erreicht werden, d. h. die Annahme $R \ll H$ zumindest für einen Teil der Strukturen nicht mehr gültig ist (siehe Abbildung 5-10a). Als weitere Konsequenz der geringen Aspektverhältnisse kann eine angreifende Kraft F neben der Biegung auch eine Scherung der Elastomerstrukturen verursachen.

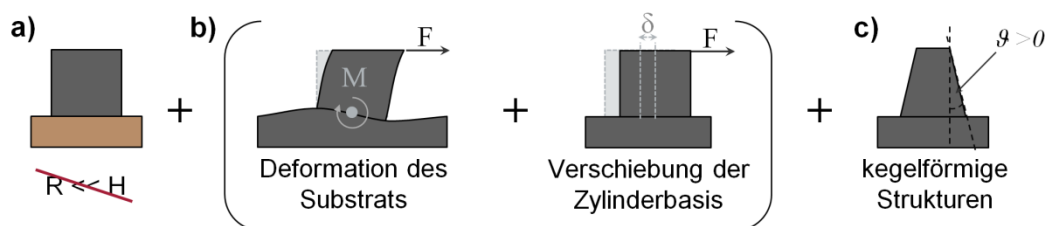


Abbildung 5-10 Nichtideale Einflüsse auf die elastischen Eigenschaften der Elastomerstrukturen

a) Geringes Aspektverhältnis, b) Elastizität der Zylinderunterlage, c) Abweichung von der idealen Zylindergeometrie

Des Weiteren befinden sich die Elastomerstrukturen nicht, wie in der Näherung vorausgesetzt, auf einer festen Unterlage. Die Zylinderbasis besteht vielmehr ebenfalls aus demselben Elastomermaterial wie die Zylinderstrukturen und ist somit deformierbar. Es kann also neben der reinen Biegung der Zylinder auch zu einer Deformation der Unterlage aufgrund der Biegemomente M oder zu einer Translation der Zylinderbasis kommen (siehe Abbildung 5-10b).

Schließlich weisen die hier hergestellten Strukturen bedingt durch den Herstellungsprozess keine ideale Zylindergeometrie auf (siehe Abbildung 5-10c). Insbesondere die Seitenwände sind nicht senkrecht zur Substratoberfläche, sondern sind um einen Winkel $\vartheta > 0$ geneigt. Die zur Herleitung von Gleichung (5.3) verwendete Annahme eines über die gesamte Zylinderhöhe H konstanten Flächenträgheitsmoments $I = \frac{\pi R^4}{4}$ ist damit nicht mehr gültig.

Ein Ansatz zur Integration der Substratbeiträge in ein erweitertes Modell der Biegung von Elastomerstrukturen wurde von I. Schön und Kollegen vorgestellt (siehe [Sch10]). Demnach müssen die nach Gleichung (5.3) berechneten Steifigkeiten mit einem Korrekturfaktor

$$c = \frac{\frac{128}{3} \left(\frac{H}{R}\right)^3}{\left[\frac{128}{3} \left(\frac{H}{R}\right)^3 + 32 \cdot T_{tilt} \left(\frac{H}{R}\right)^2 + \frac{14 + 12\nu}{3} \left(\frac{H}{R}\right) \right]} \quad (5.4)$$

$$\text{mit } T_{tilt}(\nu) = 1,3 \cdot \frac{(1 + \nu)}{2\pi} \left[2(1 - \nu) + \left(1 - \frac{1}{4(1 - \nu)} \right) \right]$$

modifiziert werden. In den Korrekturparameter geht somit neben dem Aspektverhältnis der Zylinderstrukturen $\frac{H}{R}$ nur noch die Poissonzahl ν als materialabhängiger Parameter ein.

Die korrigierten Steifigkeiten ergeben sich dann aus

$$k_{eff,korr} = c \cdot k_{eff} \quad (5.5)$$

Wird diese Korrektur auf die hier hergestellten Strukturen angewandt, so ergeben sich die folgenden Werte (Es gilt $\nu = \nu_{PDMS} = 0,5$).

Tabelle 5.2 Korrektur der Struktursteifigkeiten nach Gl. (5.5)

| Matrixzeile | Aspektverhältnis H/R | Korrekturfaktor aus (5.4) | korrigierte Steifigkeit [nN/μm] |
|-------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| A.. | 0,93±0,04 | 0,19±0,01 | 1456±89 |
| B.. | 1,52±0,12 | 0,33±0,01 | 367±45 |
| C.. | 3,98±0,66 | 0,66±0,02 | 16±4 |
| D.. | 4,97±0,78 | 0,72±0,02 | 7±2 |
| E.. | 5,68±0,93 | 0,76±0,01 | 4±1 |

Die Anwendung des Korrekturparameters führt also durchweg zu einer Verringerung der zu erwartenden Struktursteifigkeiten um bis zu 80 %, wobei der Beitrag der Substratdeformation mit wachsendem Aspektverhältnis deutlich abnimmt.

Schön und Kollegen haben ihre zunächst theoretisch motivierte Korrektur an PDMS-Strukturen mit Durchmessern von 1 mm und Aspektverhältnissen von 2 bis 9 experimentell verifiziert. Da Gleichung (5.4) keine explizite Skalenabhängigkeit aufweist, sollten die Ergebnisse ohne Weiteres auch auf die in dieser Arbeit verwendeten mikrometer-skaligen Strukturen übertragbar sein, vorausgesetzt, die elastischen Eigenschaften des verwendeten Elastomermaterials sind ebenfalls skalen-unabhängig. Zudem fehlt dem erweiterten Modell die Berücksichtigung der kegelstumpfförmigen Geometrie.

Um folglich die Übertragbarkeit des Korrekturparameters auf die hier verwendeten Elastomerstrukturen zu überprüfen, sind eigene experimentelle Untersuchungen der elastischen Eigenschaften notwendig.

5.4.4 Experimenteller Ansatz für Eichmessungen

Die Charakterisierung der elastischen Eigenschaften wird mithilfe eines Rasterkraftmikroskops durchgeführt. Die hierzu im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methodik basiert in Teilen auf den Arbeiten von J. Song und O. Sul (siehe [Son05], [Sul09]).

Dem Experiment liegt die Vermessung der strukturierten Oberfläche mit einem für Kraftmessungen kalibrierten AFM-Cantilever im Kontakt-Modus zugrunde. Das Messprinzip ist dabei wie folgt (siehe Abbildung 5-11a-f).

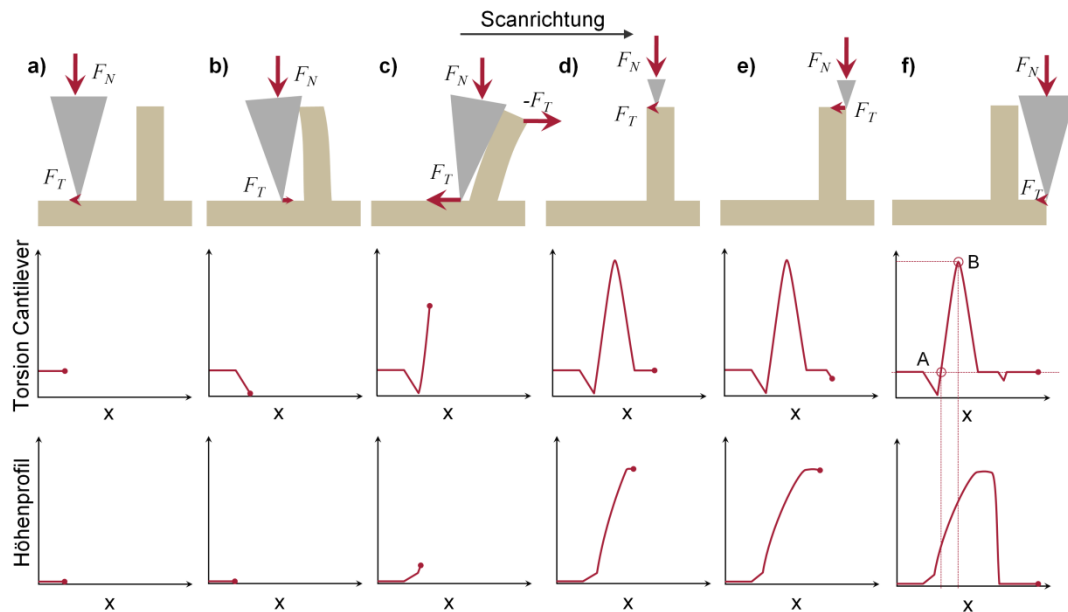


Abbildung 5-11 Bestimmung der elastischen Eigenschaften der Elastomerstrukturen
Details zu den Teilbildern sind im Text erläutert.

Die AFM-Spitze wird auf der zu untersuchenden Oberfläche verfahren, während der Cantilever mit einer definierten Normalkraft F_N auf die zu vermessende Oberfläche gedrückt wird. Überfährt die AFM-Spitze einen ebenen Bereich der Oberfläche, so bewirkt die Gleitreibung zwischen AFM-Spitze und Oberfläche eine gewisse, zeitlich konstante Auslenkung des Cantilevers um einen Torsionswinkel α aus seiner Gleichgewichtslage (siehe Abbildung 5-11a). Kommt die AFM-Spitze nun in Kontakt mit einem Hindernis, wird die Spitze zunächst durch adhäsive Kräfte angezogen; die anfängliche Torsion nimmt leicht ab (siehe Abbildung 5-11b). Bewegt sich der Cantilever weiter, wird neben der senkrecht zur Probenoberfläche wirkenden Kraft F_N nun auch eine zur Oberfläche parallele Kraft F_T auf das Hindernis ausgeübt. Das Hindernis wird elastisch deformiert. Der Cantilever wird dabei weiter tordiert; das entsprechende Signal steigt an (siehe Abbildung 5-11c). Kurz bevor die vertikale Ausweichbewegung des Cantilevers einsetzt, erreicht die Torsion ihr Maximum. Ist die AFM-Spitze an der Oberkante des Hindernisses angekommen, entspannen sich Cantilever und Hindernis. Die Torsion des Cantilevers kehrt wieder in die Ausgangslage

zurück(siehe Abbildung 5-11d). Ist das Hindernis überwunden, nähert sich die AFM-Spitze der Topographie folgend wieder an die Oberfläche an. Dabei kann es aufgrund von Adhäsion zwischen AFM-Spitze und Hindernis noch zu einer geringfügigen Änderung der Torsion des Cantilevers kommen (siehe Abbildung 5-11e).

Aus dem Verlauf der Cantilevertorsion können dann die zur Berechnung der Pfostensteifigkeit notwendigen Parameter extrahiert werden. Relevant sind hier insbesondere die beiden Punkte A und B entlang der Messkurve der Cantilevertorsion (siehe Abbildung 5-11f). In A entspricht der Wert der Torsion zunächst dem der Bewegung entlang der (glatten) Oberfläche ohne zusätzlichen Beitrag des deformierten Hindernisses. In B hingegen wird der Cantilever aufgrund der elastischen Deformation des Hindernisses maximal tordiert.

Die Auslenkung des Hindernisses Δs durch die AFM-Spitze ergibt sich aus der Differenz der Cantileverpositionen an den Punkten A und B

$$\Delta s = x(B) - x(A) \quad (5.6)$$

während sich die für die Torsion notwendige Kraft F_T aus den entsprechenden Torsionswinkel α gemäß

$$F_T = k_T \cdot [\alpha(B) - \alpha(A)] \quad (5.7)$$

ableiten lässt.

Die Steifigkeit des Hindernisses ergibt sich dann schließlich aus

$$k_{\text{Probe}} = \frac{F_T}{\Delta s}. \quad (5.8)$$

Die Durchführbarkeit dieses Experiments wird im Wesentlichen durch zwei Parameter beeinflusst, die nachfolgend angeführt sind.

Einstellung der Höhenregulierung

Die Höhenregulierung des AFMs bestimmt, wie empfindlich der Cantilever auf eine Änderung der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probenoberfläche reagiert. Die Regulierung muss sensitiv genug auf Änderungen der Cantilever-Verbiegung reagieren, da sonst die AFM-Spitze während der Messung unkontrolliert gegen Hindernisse prallen und dadurch beschädigt

werden kann. Zugleich muss sie jedoch ausreichend träge sein, damit ein unkontrolliertes Übersteuern bei vertikalen Ausweichbewegungen verhindert und die Oberflächentopographie korrekt abgebildet wird.

Durch Einstellen eines geringfügigen Untersteuerns der Höhenregulierung, wird gewährleistet, dass der Cantilever durch ein Hindernis zunächst um einen Winkel α tordiert wird, bevor die Regelungselektronik die vertikale Ausweichbewegung einleitet. Die hierbei über die torsionale Cantileversteifigkeit k_T auf die Oberflächenstrukturen ausgeübte Kraft

$$F_T = k_T \cdot \alpha \quad (5.9)$$

ermöglicht dann das in Abschnitt 5.4.4 beschriebene Experiment zur Vermessung der elastischen Eigenschaften der Oberflächenstrukturen.

Wahl des passenden AFM-Cantilevers

Nach Gleichung (5.9) bestimmt die torsionale Steifigkeit des Cantilevers k_T die auf die Probenstruktur ausgeübte Kraft. Ist diese deutlich geringer als die Steifigkeit k_{Probe} der zu untersuchenden Struktur, so wird der Cantilever während der Messung stark tordiert. Der in Gleichung (5.9) formulierte lineare Zusammenhang ist dann nicht mehr erfüllt.

Da in den Datenblättern der AFM-Cantilever meist nur die Federkonstante gegen vertikale Auslenkungen angegeben wird, kann diese Größe zunächst als Richtwert für die Vorauswahl eines geeigneten Cantilevers genutzt werden, denn es gilt $k_N \propto k_T$ (vgl. Abschnitt B.3).

Für die Experimente standen sowohl Kontakt-Cantilever mit typischen Federkonstanten um $k_N \approx 0,11 \text{ N/m} = 110 \text{ nN}/\mu\text{m}$ (Typ *CSG10*, NT-MDT Co., Moskau, Russland) sowie Nicht-Kontakt-Cantilever mit typischen Federkonstanten um $k_N \approx 11,8 \text{ N/m} = 11800 \text{ nN}/\mu\text{m}$ (Typ *NSG10*, NT-MDT Co., Moskau, Russland) zur Verfügung (beide Angaben laut Datenblatt des Herstellers).

Probemessungen ergaben, dass die Kontakt-Cantilever zu weich waren, um alle Strukturen auf den Zellsubstraten zu vermessen. Die Messungen wurden daher mit den Nicht-Kontakt-Cantilevern durchgeführt.

Notwendigkeit von Kalibriermessungen

Die Torsion des AFM-Cantilevers und die damit verbundene Kraftwirkung waren bei dem in dieser Arbeit verwendeten Rasterkraftmikroskop (Modell *NanoWizard II*, JPK Instruments AG, Berlin) nicht direkt messbar. Zunächst standen lediglich die entsprechenden Detektorsignale der im AFM verwendeten Fotodiode zur Verfügung, die im Vorfeld eines jeden Experiments mithilfe einiger Eichmessungen kalibriert werden mussten. Ebenso mussten die elastischen Eigenschaften der verwendeten AFM-Cantilever, d. h. im Wesentlichen die Steifigkeiten des Cantilevers gegen vertikale Auslenkungen k_N sowie gegen torsionale Auslenkungen k_T , aus den geometrischen Daten der AFM-Cantilever berechnet werden.

Die hierfür genutzte Kalibrier- und Berechnungsprozedur wird in Kapitel B des Anhangs näher erläutert.

5.4.5 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5-12 zeigt je zwei Messkurven, aufgenommen auf dem Hin- und Rückweg des AFM-Cantilevers über zwei PDMS-Pfostenfelder, anhand derer die Steifigkeiten der jeweiligen Elastomerstrukturen bestimmt wurden.

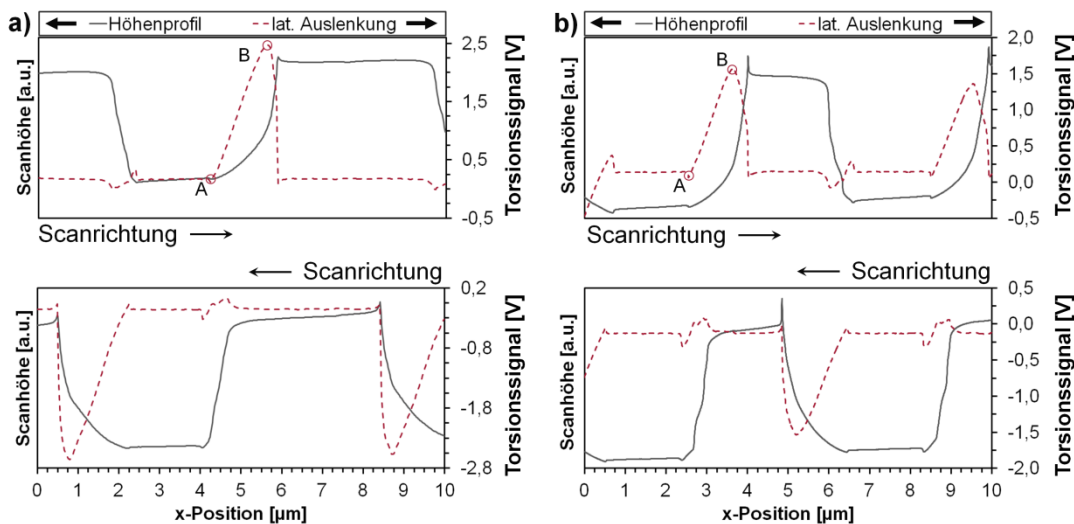


Abbildung 5-12 Line scans der Kontakt-Messung über PDMS-Strukturen

a) Hin- und Rückweg über eine Struktur des Felds A1, b) Hin- und Rückweg über eine Struktur des Felds C1. Gezeigt sind jeweils das Höhenprofil sowie das Spannungssignal der Cantilevertorsion.

Insgesamt wurden für jede Elastomerstruktur fünf Messungen durchgeführt, wobei jeweils sowohl aus den Kurven des Hin- und Rückwegs des AFM-Cantilevers die Steifigkeiten der Pfosten berechnet wurden.

Anhand von REM-Aufnahmen der Elastomerstrukturen vor und nach den AFM-Messungen wurden zudem nochmals die Geometrieparameter bestimmt, da die für die AFM-Messungen verwendeten PDMS-Substrate nicht aus derselben Vergussform wie die oben genannten Zellsubstrate hergestellt wurden. Die Strukturradien wichen daher leicht von denen der Zellsubstrate ab. Die Strukturhöhe war wieder einheitlich bei $H = 1242 \pm 54 \text{ nm}$.

Die sich aus diesen Messungen ergebenden Strukturradien sowie die gemessenen, mittleren Steifigkeiten sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3 Experimentell bestimmte Steifigkeiten der PDMS-Strukturen.

| Mittlerer Strukturradius [nm] | Aspektverhältnis H/R | Mittlere Auslenkung Δs [μm] | Mittlere Kraft F_T [nN] | resultierende Steifigkeiten [nN/ μm] |
|----------------------------------|-------------------------|---|------------------------------|---|
| 2153 | 0,58 | 1,60 | 1512 | 948\pm100 |
| 1636 | 0,76 | 1,58 | 1389 | 887\pm70 |
| 1150 | 1,08 | 1,64 | 1114 | 678\pm60 |
| 899 | 1,38 | 1,49 | 766 | 514\pm114 |
| 579 | 2,14 | 1,48 | 568 | 385\pm111 |
| 408 | 3,04 | 1,98 | 393 | 200\pm37 |
| 256 | 4,84 | 1,96 | 222 | 113\pm16 |

Ein Vergleich der hier ermittelten, effektiven Steifigkeiten mit denen aus den oben genannten Modellen zeigt deutliche Abweichungen (siehe Abbildung 5-13a).

Für Strukturradien $R > 1,5 \mu\text{m}$ ergeben sich deutlich geringere, effektive Steifigkeiten, als nach den Modellrechnungen anzunehmen wäre. In dieser Richtung sind allerdings Abweichungen auch zu erwarten, da die Überlegungen, die hinter den Herleitungen zu Gl. (5.3) sowie Gl. (5.4) stehen, Strukturen mit einem Aspektverhältnis < 1 nicht mehr ohne Weiteres beinhalten. Interessanterweise werden die gemessenen Steifigkeiten für Strukturradien $R \leq 1 \mu\text{m}$ hingegen deutlich größer als anhand der theoretischen Vorüberlegungen zu erwarten wäre.

Um die Messungen auf die Strukturparameter der Elastomersubstrate übertragen zu können, werden die Messwerte für kleine Radien linear extrapoliert (vgl. Abbildung 5-13b).

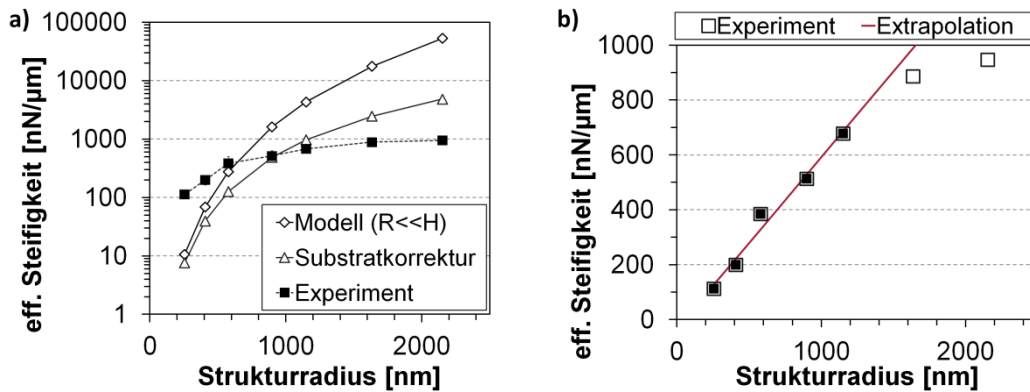


Abbildung 5-13 Lineare Extrapolation der Messdaten

a) Vergleich zwischen Modellierung und Messdaten, b) Lineare Extrapolation der Messwerte zur Ermittlung der Werte in Tabelle 5.4.

Es ergibt sich ein empirischer Zusammenhang zwischen der zu erwartenden, effektiven Steifigkeit k_{eff} und dem Strukturradius R von

$$k_{eff}(R) \approx 6,24 \cdot 10^5 \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \cdot R - 0,03 \frac{\text{N}}{\text{m}} \quad (5.10)$$

Unter Verwendung von Gleichung (5.10) werden die gemäß des Experiments zu erwartenden, effektiven Steifigkeiten der im Rahmen dieser Arbeit für Zellexperimente verwendeten Elastomerstrukturen berechnet. Die extrapolierten Werte sind in Tabelle 5.4 gegeben.

Tabelle 5.4 Effektive Steifigkeiten, ermittelt aus den AFM-Messungen.

Die Werte wurden mithilfe von Gl. (5.10) extrapoliert.

| Kennung der Matrixzeile | Mittlerer Strukturradius [nm] | Eff. Steifigkeit [nN/μm] |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| A.. | 1337±124 | 802±77 |
| B.. | 818±130 | 478±81 |
| C.. | 312±104 | 161±65 |
| D.. | 250±76 | 123±47 |
| E.. | 219±70 | 104±44 |

Die oben angegebenen Werte dienen nunmehr als Basis für die in Abschnitt 5.8 geschilderten Kraftmessungen an *Staph. aureus*. Die entsprechenden Experimente werden nachfolgend erläutert.

5.5 Zellkulturbedingungen

Für die Experimente wurde *Staph. aureus* in den Labors des Interfakultären Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene zunächst über Nacht in geeignetem Nährmedium inkubiert. Bei dem Medium handelte es sich um eine wässrige Lösung von 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % Natriumchlorid, 0,1 % Kaliumhydrogenphosphat und 0,1 % Glucose (im Englischen „BM broth“ genannt).

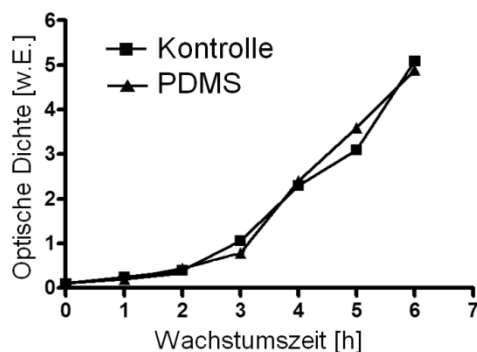


Abbildung 5-14 Zeitliche Entwicklung der Zellzahl während der Inkubation.

Gezeigt sind jeweils Messkurven bei der Inkubation von PDMS-Zellsubstraten und Kontrollmessungen bei Inkubation ohne Zugabe eines Substrats.

Diese Stammsuspension wurde am Folgetag in frischem Medium verdünnt um eine konstante Zellkonzentration zu erhalten. Die Konzentration wurde dabei anhand der optischen Dichte der Zellsuspension bei Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 578 nm bestimmt.

Nach Einstellen einer optischen Dichte von 0,1 wurden die strukturierten Zellsubstrate in 24-Wellplatten mit jeweils 1 ml der kalibrierten Nährlösung bedeckt und dann auf einer Rüttelplatte bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C für definierte Zeit inkubiert. In dieser Zeit vermehrten sich die Zellen exponentiell. Wie in Abbildung 5-14 gezeigt ist, hatten die Zellsubstrate dabei keinen signifikanten Einfluss auf die zeitliche Entwicklung der Zellzahl.

5.6 Probenpräparation

Nach Erreichen der vorgesehenen Inkubationsdauer wurden die Zellsubstrate aus dem Nährmedium entnommen und entsprechend der nachfolgend beschriebenen Schritte präpariert.

Da die Zellsubstrate mithilfe des Rasterelektronenmikroskops am Institut für Angewandte Physik vermessen werden sollten, mussten diese aus Sicherheitsgründen vor dem Transport sterilisiert und anschließend weiter präpariert werden. Hierzu wurden mehrere Methoden getestet, um mögliche Artefakte durch die jeweils gewählte Präparationsmethodik erkennen zu

können. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen werden nachfolgend erläutert.

5.6.1 Sterilisierung der Zellsubstrate

Zur Sterilisation wurden die Substrate nach der Entnahme aus dem Nährmedium mit Ethanol behandelt. Ein Teil der Proben wurde unter einem Strahl von Ethanol gespült, ein anderer Teil in ein mit Ethanol gefülltes Becherglas getaucht. Für beide Schritte wurde in Testreihen sowohl 70 % Ethanol in Wasser, als auch reines Ethanol verwendet. In beiden Fällen wurden die Proben nach dem Sterilisierungsschritt für den Transport und bis zur weiteren Verarbeitung in 70 % bzw. 100 % Ethanol gelagert, um ein vorzeitiges, unkontrolliertes Trocknen der Proben zu vermeiden. Die Lagerzeiten betragen typischerweise zwischen ein und vier Stunden.

5.6.2 Vorbereitungen für die Rasterelektronenmikroskopie

Für die weitere Vorbereitung mussten die sterilisierten und in Ethanol zwischengelagerten Zellsubstrate getrocknet werden.

Zu Vergleichszwecken wurden drei verschiedene Trocknungsmethoden durchgeführt:

Thermische Trocknung

Die Zellsubstrate wurden hierbei in einem herkömmlichen Heizofen bei 80 °C für ca. 25 Minuten getrocknet.

Vakuumtrocknung

Als zweite Trocknungsmethode wurde die Trocknung bei Raumtemperatur durch Lagern der Zellsubstrate in einer Vakuumkammer bei einem Druck von circa 0,04 mbar durchgeführt. Die Substrate benötigten dabei zur Trocknung circa fünf Minuten.

Kritisch-Punkt-Trocknung

Als dritte Methode wurde die sogenannte Kritisch-Punkt-Trocknung herangezogen. Die Proben wurden hierzu zunächst aus Ethanol in Isopropanol überführt und dann in einer speziellen, heizbaren und druckfesten Kammer durch mehrmaliges Spülen in flüssigem Kohlendioxid und anschließendem

Überführen des CO_2 in den gasförmigen Zustand kontrolliert getrocknet. Abbildung 5-15 veranschaulicht das diesem Prozess zugrundeliegende Prinzip der Trocknung oberhalb des Kritischen Punkts von CO_2 ($T = 31,0\text{ }^\circ\text{C}$; $p = 73,8\text{ bar}$) anhand des Phasendiagramms (nach [Lid04]).

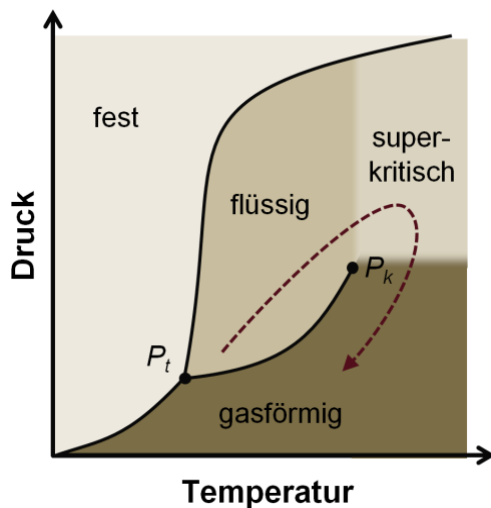


Abbildung 5-15 Phasendiagramm von CO_2
Zur Veranschaulichung der Kritisch-Punkt-Trocknung (nach [Lid04]). Zur Trocknung wird das Lösungsmittel in den super-kritischen Zustand überführt (gestrichelte Linie)

Nach der Trocknung wurden die Zellsubstrate in einem abschließenden Schritt mit einer leitenden Schicht versehen. Hierzu wurden die Proben mittels Plasmabeschichtung (*Agar Manual Sputtercoater*, Agar Scientific Ltd., Stansted, Großbritannien) mit einer ca. 10-15 nm dicken Schicht Gold-Palladium (AuPd) versehen.

Sofern die Sichtung im REM nicht sofort erfolgen konnte, wurden die Proben in einem Exsikkator gelagert, um diese vor Luftfeuchtigkeit zu schützen.

5.6.3 Charakterisierung des Präparationsverfahrens

Es zeigte sich, dass die Wahl der Präparationsmethodik große Auswirkungen auf die im Elektronenmikroskop sichtbaren Strukturen hatte.

In Abbildung 5-16 sind exemplarische Übersichtsaufnahmen von Zellsubstraten gezeigt, die thermisch beziehungsweise vakuumgetrocknet wurden.

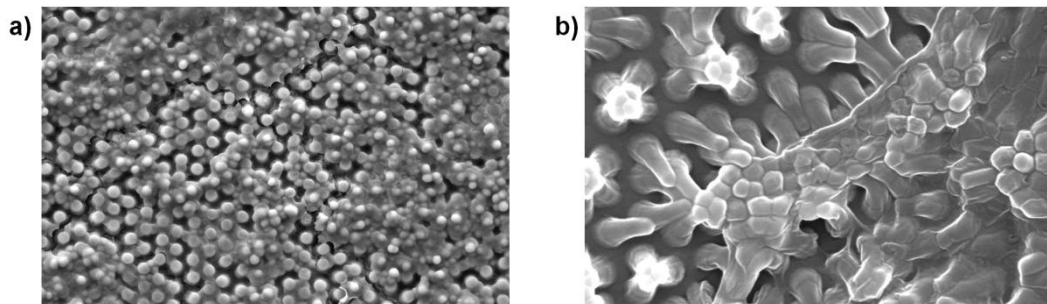
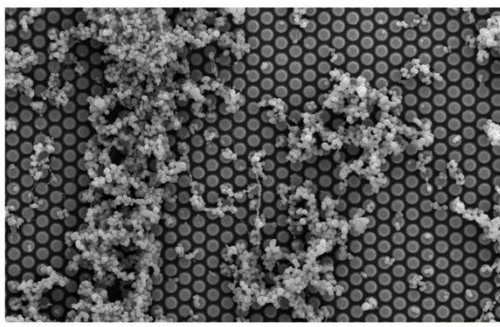


Abbildung 5-16 Auswirkungen der Trocknungsmethodik
a) Großflächig verklebte Elastomerstrukturen nach thermischer Trocknung des Zellsubstrats (Skala: 10 μm), b) Kollaps der Elastomerstrukturen und Verkleben der Zellen (Feld D5) nach Vakuumtrocknung (Skala: 2 μm)

Sowohl durch die Trocknung bei erhöhter Temperatur, als auch durch die Vakuumtrocknung kam es zu großflächigen Veränderungen der Zellen auf den Zellsubstraten und der Elastomerstrukturen. Auf allen derart vorbehandelten Zellsubstraten konnte ein Verkleben der Zellen in großflächigen Bereichen beobachtet werden (siehe Abbildung 5-16a). Zudem kam es durch die bei beiden Trocknungsmethoden unvermeidliche Oberflächenspannung des verdampfenden Lösungsmittels zu einem Kollaps der feinen Strukturen des Substrats (hauptsächlich beobachtet in den Feldern D4, D5, sowie E4 und E5).



**Abbildung 5-17 Struktur-
erhaltung nach
Kritisch-Punkt-Trocknung**
(Skala: 20 μm)

Durch den Einsatz von Kritisch-Punkt-Trocknung konnten derartige Veränderungen vermieden werden. Wie in Abbildung 5-17 gezeigt ist, blieb bei den Zellkolonien auf den so getrockneten Zellsubstraten großflächig eine dreidimensionale Struktur erhalten. Auch ein Kollaps der feinen Elastomerstrukturen

konnte weitestgehend vermieden werden.

Der Grund für diese deutlich bessere Struktur-erhaltung durch Kritisch-Punkt-Trocknung liegt in der prozessbedingten Vermeidung des allmählichen Phasenübergangs des Lösungsmittels (Ethanol oder CO_2) vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand. Hierdurch kommt es während der Trocknung zu keinem Zeitpunkt zur Ausbildung einer Grenzfläche zwischen der flüssigen und der gasförmigen Phase des Lösungsmittels. Eventuell strukturverändernde Grenzflächenspannungen werden damit vermieden (siehe [Bra93]).

Neben der Trocknungsmethode hatte auch die Konzentration des zur Sterilisierung verwendeten Ethanol einen deutlichen Einfluss auf die im Rasterelektronenmikroskop zu beobachtenden Strukturen. Während Zellen auf den mit 70 % Ethanol sterilisierten Substraten im REM die typische, haufenförmige Anordnung beibehielten (vgl. Abbildung 5-17), kam es durch die Verwendung von 100 % Ethanol zur Ausbildung hochgeordneter Zellstruktu-

ren, deren geometrische Parameter stark mit den vorgegebenen Substrat-topographien korrelierten (siehe Abbildung 5-18).

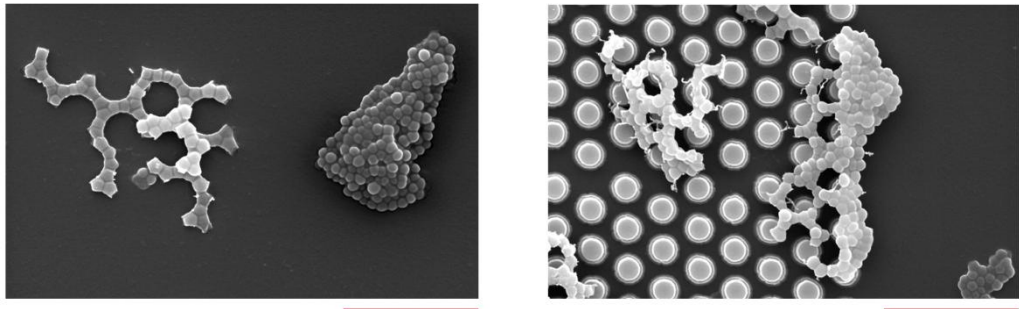


Abbildung 5-18 Artefaktstrukturen durch den Einsatz von 100 % Ethanol.
(Skalen: 10 μm)

Der Vergleich zwischen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen hydrierter Zellsubstrate zeigte, dass diese hochgeordneten Strukturen nicht bereits während der Inkubation vorhanden waren, sondern erst durch die Sterilisierung in Ethanol verursacht wurden. Als Grund für deren Bildung wird daher vermutet, dass der plötzliche Wechsel in einen Überschuss an Ethanol zu einer Ausfällung von Substanzen des Nährmediums führt, die sich auf den Substrattopographien niederschlagen.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Zellsubstrate in steriles Nährmedium ohne Bakterien gelegt und anschließend sowohl in 70 %, als auch in 100 % Ethanol überführt. In 100 % Ethanol zeigte sich sofort eine deutliche Trübung sowie ein Niederschlag auf den Proben, während dies in 70 % Ethanol nicht beobachtet werden konnte.

Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung konnten bei den mit 100 % Ethanol versetzten Substraten im REM wieder Strukturen identifiziert werden (siehe Abbildung 5-19); diesmal allerdings gänzlich ohne die Beteiligung von Bakterien.

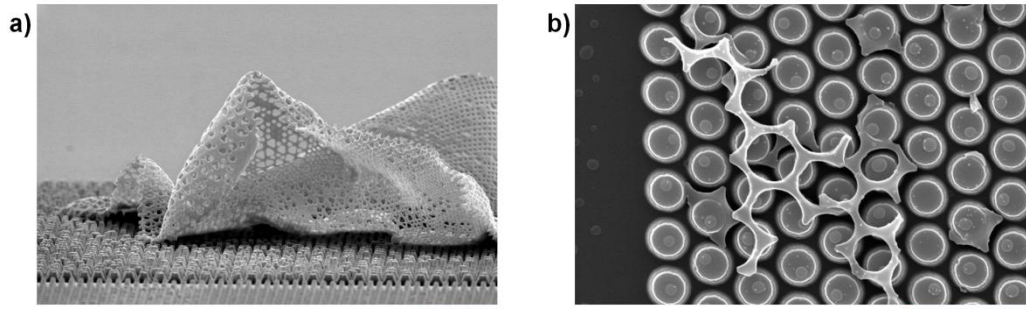


Abbildung 5-19 Artefaktstrukturen, verursacht durch das Nährmedium

a) Membranartige Struktur auf Feld D5 (Skala: 10 µm, Bild gekippt), b) Gitterstruktur durch Abformen der Strukturzwischenräume von Feld C4 (Skala: 10 µm).

Die beobachteten Strukturen waren also bedingt durch eine Ausfällung von Bestandteilen des Nährmediums aufgrund einer hohen Ethanolkonzentration während der Sterilisierung der Zellsubstrate.

Es ist zwar nicht auszuschließen, dass der plötzliche Übergang hin zu 100 % Ethanol darüber hinaus auch zu einer Denaturierung von Proteinen innerhalb des extrazellulären Mediums führen kann und die in Abbildung 5-18 gezeigten Strukturen zumindest teilweise auch dadurch verursacht werden; allerdings ließ sich diese Hypothese mit den in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht eindeutig überprüfen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Art und Weise der Vorbereitung auf rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bereits einen starken Einfluss auf die beobachteten Strukturen hatte.

Die geschilderte Untersuchung der möglichen Einflussgrößen ergab, dass durch eine Sterilisierung in 70 % Ethanol, gefolgt von Kritisch-Punkt-Trocknung, der ursprüngliche Zustand während der Inkubation der Bakterien am detailgetreuesten konserviert werden konnte. Für die nachfolgend geschilderten Experimente wurde daher stets dieses Präparationsprotokoll verwendet.

5.7 Auswertemethodik

Zur Abschätzung der mikrobiellen Adhäsionskräfte wurden die getrockneten Zellsubstrate im Rasterelektronenmikroskop gesichtet.

Durch Verwenden eines geeigneten Probenhalters und vorbereitenden Kalibriermessungen wurde zunächst sichergestellt, dass die Strahlachse

des REM lotrecht zur Oberfläche des Zellsubstrats ausgerichtet war, um Messfehler durch eine Verkipfung des Zellsubstrats zu vermeiden (siehe Abbildung 5-20a).

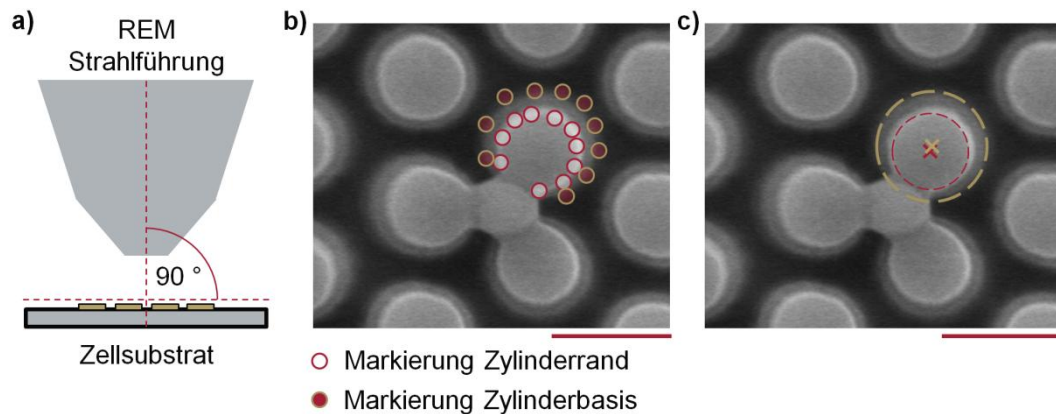


Abbildung 5-20 Erfassung der Zylinderauslenkungen

a) Ausrichtung der Zellsubstrate im Rasterelektronenmikroskop, b) Manuelle Erfassung des Zylinderrands und der Zylinderbasis, c) Computergestützte Ermittlung der Mittelpunkte von Oberkante und Basis; der Versatz entspricht der Auslenkung der Zylinderstruktur. (Skalen: 2 μm)

Die so angefertigten Aufnahmen wurden dann mithilfe eines in Eigenarbeit erstellten Auswerteprogramms vermessen, um die Auslenkung einzelner Zylinderstrukturen aus ihrer Ruhelage zu erfassen.

Wie in Abbildung 5-20b gezeigt ist, wurden pro Struktur jeweils zehn bis zwanzig Messpunkte entlang sowohl des oberen Zylinderrandes, als auch entlang der Zylinderbasis gesetzt. Durch die Messpunkte wurden dann in einem iterativen Näherungsverfahren zwei Kreise (einer um die Basis, einer um den oberen Rand) gelegt. Zur Durchführung dieses Schrittes kam ein frei verfügbarer Algorithmus von R. Brown zum Einsatz, dessen Verfahren auf einem Ansatz von W. Gander und Kollegen zur näherungsweise Berechnung von Kreisgleichungen aus einer Menge von Messpunkten beruht (siehe [Gan94]).

Die Auslenkung der Zylinderstruktur wurde schließlich durch Ermitteln der Distanz zwischen den beiden Mittelpunkten der Kreise erfasst (vgl. Abbildung 5-20c).

Diese Datenerfassung wurde stichprobenartig auch an nicht durch Mikroben belegten Zylinderstrukturen durchgeführt, um ein Maß für etwaige, noch bestehende Messfehler zu erhalten. Diese Eichmessungen ergaben, dass

bei der Bestimmung der Strukturverschiebungen in der Regel ein Fehler von bis zu $\Delta M = \pm 2 \text{ px}$ auftritt. Je nach gewählter Vergrößerung des REM-Bildes sowie Steifigkeit der Elastomerstrukturen hat dies für die gemessenen Haftkräfte eine Messunsicherheit im Bereich von $3 \text{ nN} \leq \Delta F_{\text{Adhäsion}} \leq 15 \text{ nN}$ zur Folge.

5.8 Ergebnisse

In Abbildung 5-21 sind an einigen Beispielen typische REM-Aufnahmen der Mikroben nach der Inkubation auf den Elastomerstrukturen gezeigt.

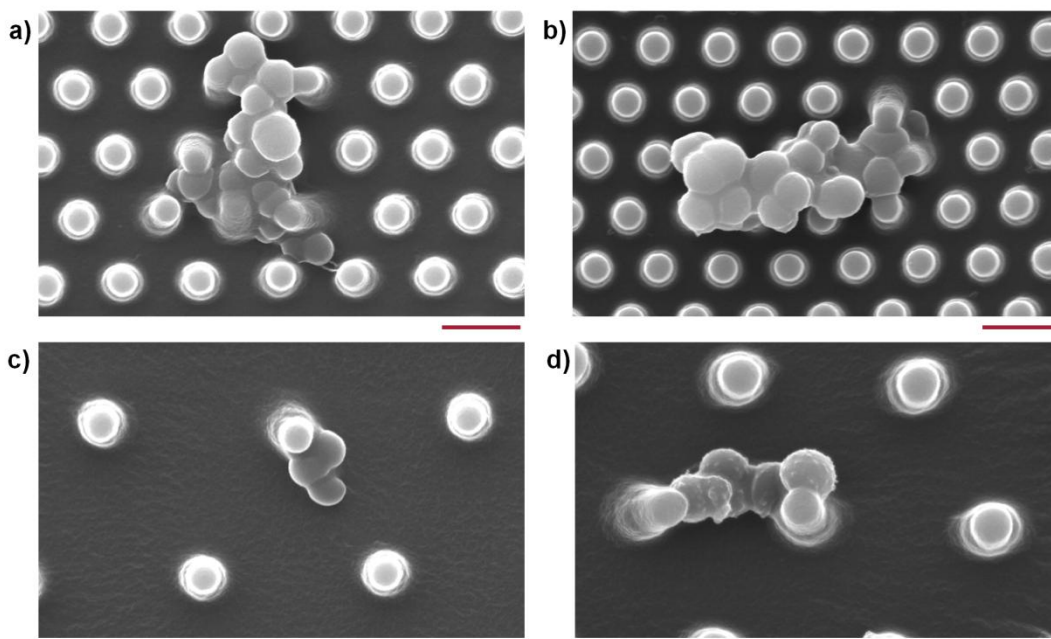


Abbildung 5-21 Staph. aureus auf PDMS: Typische REM-Aufnahmen

Die gezeigten Bilder zeigen Aufnahmen der Zylinderfelder a) Feld C1, b) Feld C2, c) Feld C3 und d) Feld C4. (Skalen: 2 μm)

Über die Felder der Zellsubstrate verteilt, finden sich Zellen, die in den unterschiedlichsten Konfigurationen auf und an den Zylinderstrukturen adhaerieren. Die Situation, die exemplarisch in Abbildung 5-21a und b dargestellt ist, tritt am häufigsten auf. Hier findet sich ein Zellverbund von *Staph. aureus*, der über mehrere Zylinderstrukturen hinweg am Elastomersubstrat anhaftet.

Ist der Abstand zwischen den einzelnen Elastomerstrukturen ausreichend, so finden sich auch Zellen, die an der Basis der Strukturen adhaerieren (siehe Abbildung 5-21c, d). Eine weitergehende Korrelation zwischen der geo-

metrischen Anordnung der Substratstrukturen und der Anordnung der Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Für Anordnungen wie sie in Abbildung 5-21b und d dargestellt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich aufgrund der starken Deformation der Elastomerstrukturen deren elastisches Verhalten ändert und die realen Steifigkeiten somit von der in Abschnitt 5.4.5 gemachten Kalibrierung abweichen.

Zur Erfassung der zellulären Adhäsionskräfte wurden daher ausschließlich die Konfigurationen verwendet, bei denen einzelne Mikroben oder kleine Zellgruppen nahe der Oberkante der Zylinderstrukturen adherieren. Durch den steilen Blickwinkel der REM-Aufnahmen kann der Angriffspunkt der Adhäsionskräfte an den Zylinderstrukturen nicht exakt bestimmt werden. Daher wurde für die Auswertungen angenommen, dass die Bakterien immer an der Oberkante der Strukturen adherieren. Das Newton'sche Axiom *actio = reactio* ist daher scheinbar in einigen der Abbildungen verletzt, was allerdings darin begründet liegt, dass die Mikroben in unterschiedlichen Höhen der Zylinderstrukturen adherieren und damit die in den Abbildungen angegebenen Kräfte unterschiedlich ausfallen.

In Abbildung 5-22 sind entsprechende Aufnahmen gezeigt. Die anhand der Zylinderauslenkungen bestimmten Kräfte sind in Pfeildarstellung eingezeichnet.

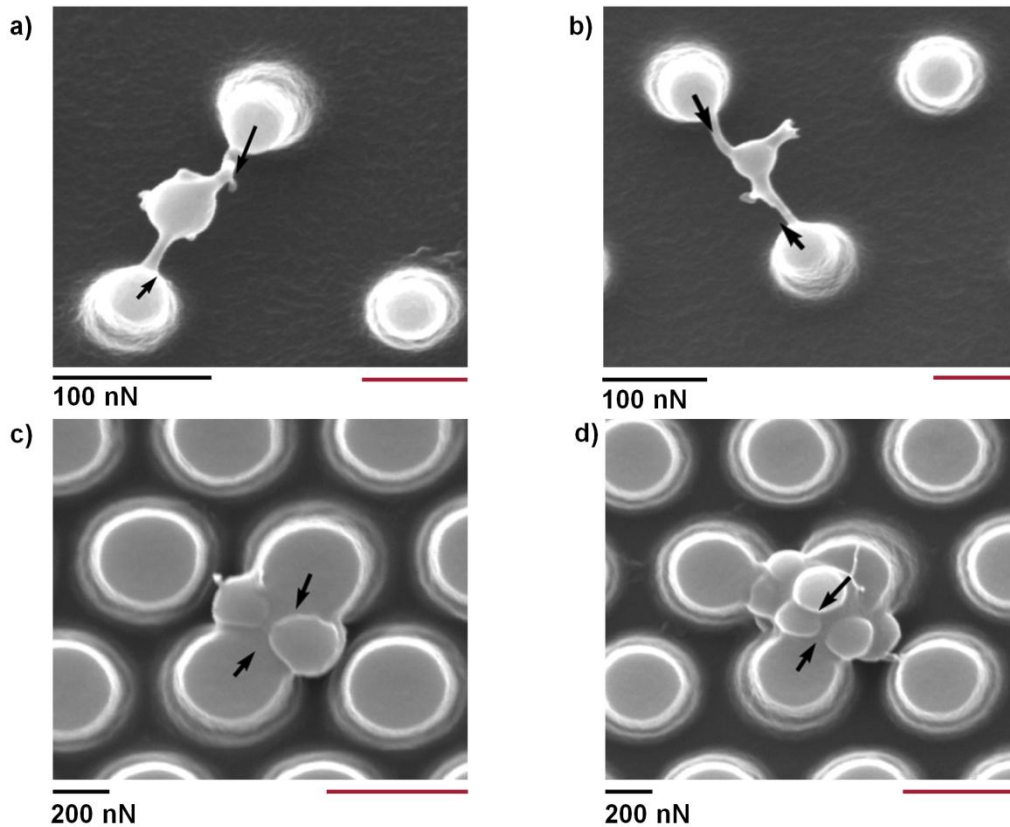


Abbildung 5-22 Darstellung der Adhäsionskräfte auf den Zellsubstraten

a) Eine Zelle zwischen zwei Strukturen, Feld C2 (Skala: 1 μm), b) Eine Zelle an Strukturen, Feld C2 (Skala: 1 μm), c) 2 Zellen an Strukturen, Feld B5 (Skala: 2 μm), d) 7 Zellen an Strukturen, Feld B5 (Skala: 2 μm)

Es ergeben sich Adhäsionskräfte von $f_a \in \{44 \pm 10 \text{ nN}; 25 \pm 10 \text{ nN}\}$ sowie $f_b \in \{35 \pm 10 \text{ nN}; 29 \pm 10 \text{ nN}\}$ für die in Abbildung 5-22a bzw. b gezeigten, einzelnen Zellen zwischen zwei Elastomerstrukturen (hier in beiden Fällen Felder C2 in der Variationsmatrix). Adhieren mehrere Mikroben im Verbund an Elastomerstrukturen, ergeben sich entsprechend höhere Kräfte; hier $F_c \in \{115 \pm 15 \text{ nN}; 98 \pm 15 \text{ nN}\}$ und $F_d \in \{124 \pm 15 \text{ nN}; 168 \pm 15 \text{ nN}\}$, wie Abbildung 5-22c und d jeweils zeigt.

Unter Berücksichtigung der Anzahl der Zellen in den untersuchten Zellgruppen ergeben sich hier mittlere Adhäsionskräfte pro Zelle von $\langle f_c \rangle \approx 54 \pm 15 \text{ nN}$ beziehungsweise von $\langle f_d \rangle \approx 24 \pm 15 \text{ nN}$.

Sämtliche der über 80 ausgemessenen rastermikroskopischen Aufnahmen zeigen Mikroben, deren Haftkräfte sich, umgerechnet auf einzelne Zellen, in diesem Intervall von $25 \text{ nN} \leq \langle F_i \rangle \leq 60 \text{ nN}$ bewegen.

5.9 Diskussion und Zusammenfassung

Aus den Kraftmessungen lässt sich ableiten, dass Mikroben des Typs *Staph. aureus* im Mittel Adhäsionskräfte von $\langle f_{Zelle} \rangle \approx 40 \pm 19 \text{ nN}$ auf die Elastomerstrukturen ausüben.

Die Unsicherheit dieses Wertes ergibt sich aus den oben genannten Unsicherheiten bei der Bestimmung der Elastomersteifigkeiten sowie der angenommenen Messungengenauigkeit in der Datenerfassung ($\Delta F_{\text{Adhäsion}} \leq 15 \text{ nN}$). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Zellen selbst gewissen Schwankungen unterliegen, da es sich hierbei um lebendige Organismen handelt, die grundsätzlichen Schwankungen unterworfen sein können. Zuletzt müssen bei der Diskussion der Messunsicherheit auch die aufwändigen Präparationsbedingungen berücksichtigt werden.

Wird der hier ermittelte Wert der mikrobiellen Adhäsionskräfte von circa 40 nN mit den in der Literatur vorhandenen Werten anderer Zellen verglichen, so zeigt sich eine Übereinstimmung mit den Adhäsionskräften, die an eukaryotischen Zellen beobachtet wurden.

So ermittelten Tan und Kollegen für Fibroblasten (3T3-Zellen, ATCC Katalog Nr. CRL-1658) ebenso mittlere Adhäsionskräfte von 40 nN (siehe [Tan03]). Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten auch Olivia du Roure und Kollegen für Epithelzellen, bei denen mittlere Werte zwischen 10 nN und 40 nN gemessen wurden (siehe [Rou05]).

Diese Übereinstimmung hinsichtlich der mittleren Adhäsionskräfte könnte darauf hindeuten, dass *Staph. aureus* über Adhäsionsproteine mit ähnlicher Funktionalität wie die oben genannten Zelltypen verfügt. Für diese Hypothese spricht, dass *Staph. aureus* nach [Fos98] über Membranproteine verfügt, die, ebenso wie Fibroblasten, an Bestandteile der extrazellulären Matrix im menschlichen Gewebe binden können. Dies stellt einen Ausgangspunkt für weiterführende, mikrobiologische Untersuchungen dar.

6 Biokolisation I: Strukturmoderierte Zellausrichtung

Wie in Abschnitt 3.2.1 ausgeführt wurde, soll hier anhand einiger Experimente untersucht werden, inwieweit sich die Ausrichtung eines mikrobiellen Modellorganismus bei der Anlagerung an ein Substrat durch Mikrostrukturen beeinflussen lässt.

Für derartige Untersuchungen muss ein mikrobieller Modellorganismus verwendet werden, der im Gegensatz zum bisherigen Modellbakterium *Staphylococcus aureus* eine anisotrope Form aufweist, da sich nur so eine eventuell vorhandene Zellausrichtung experimentell erfassen lässt.

Nach der Vorstellung eines geeigneten Bakteriums in Abschnitt 6.1 wird in Abschnitt 6.2 der Entwurf geeigneter Zellsubstrate erläutert. In den darauffolgenden Unterkapiteln werden dann die experimentellen Vorgehensweisen im Einzelnen erläutert und die Ergebnisse vorgestellt.

6.1 Mikrobieller Modellorganismus

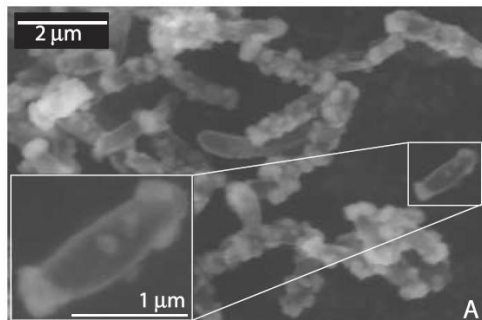


Abbildung 6-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums BoFeN1

(entnommen aus [Kap05])

Das Bakterium BoFeN1 wurde von Professor Andreas Kappler und Kollegen aus Ufersedimenten des Bodensees isoliert [Kap05]. Es gehört einer Klasse von Mikroben an, die Metalle umsetzen kann und daraus die für seinen Metabolismus erforderliche Energie gewinnt.

Zwar wird nach [Kap05] bevorzugt die Oxidation von Acetatverbindungen im leicht sauren (pH=6,8), nitrathaltigen Nährmedium als Energiequelle genutzt, jedoch können parallel dazu zweiwertige Eisenverbindungen (Fe(II)) oxidiert werden. Das dabei anfallende, dreiwertige Eisen (Fe(III)) lagert sich in Form von Goethit-Kristallen als Kruste um die Zellen herum an (siehe Abbildung 6-1).

Die Mikroben sind typischerweise stäbchenförmig mit mittleren Ausdehnungen von ca. 300-500 nm entlang der kurzen, beziehungsweise 1,2 -2,0 μm entlang der langen Stabachse.

BoFeN1 ist nicht in der Lage, sich aus eigener Kraft fortzubewegen. Die Verteilung des Bakteriums über ein Substrat erfolgt damit ausschließlich durch diffusive Prozesse innerhalb des Kulturmediums.

6.2 Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate

6.2.1 Verwendete Substratmaterialien

Für die Experimente zur Untersuchung strukturinduzierter Zellausrichtung wurde wieder das bereits bekannte Poly(dimethylsiloxan) verwendet (vgl. Abschnitt 4.2.1).

6.2.2 Layout der Zellsubstrate

Im Vorfeld der Untersuchung waren keine bestehenden, ähnlich gearteten Untersuchungen bekannt, die Anhaltspunkte für geeignete Strukturparameter zur Beeinflussung der Zellausrichtung gaben. Als Ausgangspunkt für die Wahl der herzustellenden Strukturgrößen wird daher die mittlere Ausdehnung des mikrobiellen Modellorganismus, d. h. ein Intervall zwischen 300 nm und 1,8 μm , verwendet. Der Entwurf der Zellsubstrate soll daher eine große Spanne an unterschiedlichen Strukturgrößen beinhalten, um den Parameterraum geeignet abdecken zu können.

Die Variation der geometrischen Strukturparameter wird erreicht, indem auf dem Zellsubstrat mehrere Felder mit jeweils unterschiedlichen Zylinderradien R sowie variierenden Abständen A bei einheitlicher Zylinderhöhe H angelegt werden (siehe Abbildung 6-2a). Die einzelnen Zylinder sind dabei in einem hexagonalen 2D-Gitter angeordnet.

Jedes Zylinderfeld hat eine definierte Fläche von $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$. Die Kombination der Felder, geordnet nach Zeilen mit jeweils konstantem Radius R und Spalten mit konstantem Strukturabstand A , ergibt die sogenannte Variationsmatrix (vgl. Abbildung 6-2b).

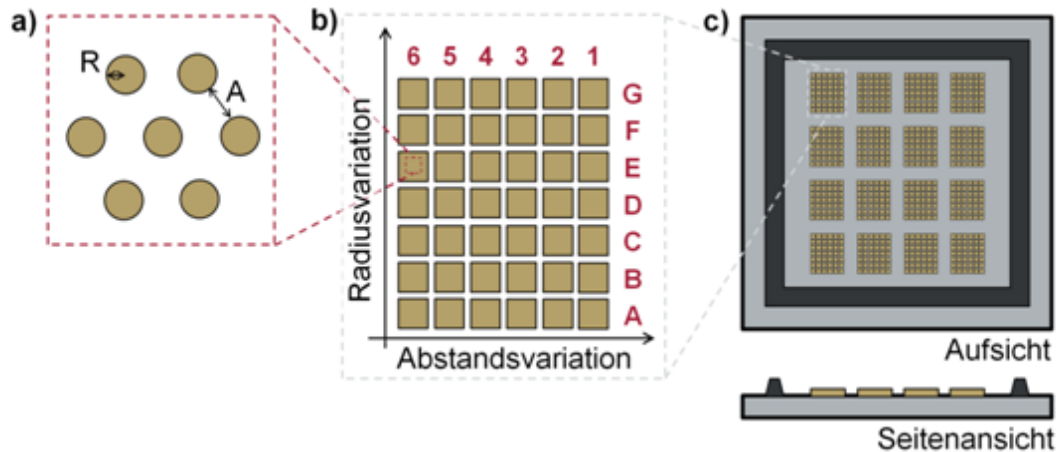


Abbildung 6-2 Zellsubstrate zur Untersuchung strukturinduzierter Zellausrichtung

a) Hexagonale Anordnung mit Radius R und Abstand A , b) 42 verschiedene Kombinationen der Strukturparameter R und A zusammengefasst in einer Variationsmatrix, c) 16 Variationsmatrizen auf dem Zellsubstrat, umgeben von einer Umrandung.

Um Vergleichsmessungen zwischen mehreren Strukturen mit nominell gleichen Strukturparametern auf demselben Zellsubstrat zu ermöglichen, werden auf einem Substrat insgesamt sechzehn Variationsmatrizen angelegt (siehe Abbildung 6-2c).

Neben den oben genannten Zylinderstrukturen werden ebenfalls noch Zellsubstrate mit Vertiefungen konzipiert. Die Lochstrukturen weisen analog zu den beschriebenen Zylinderstrukturen definierte Radien R und Abstände A auf und sind ebenfalls in 42 verschiedenen Kombinationen von R und A in insgesamt sechzehn Variationsmatrizen auf einem Zellsubstrat integriert. Die Anordnung der Lochstrukturen entspricht ebenso den in Abbildung 6-2 gezeigten Gegebenheiten.

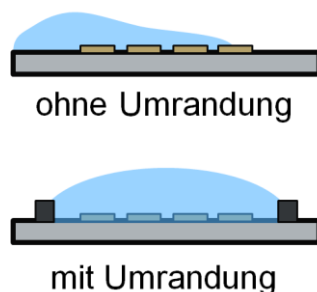


Abbildung 6-3 Umrandung der Substratstrukturen

Schutz der Strukturen durch die Vermeidung von Flüssigkeitsschwankungen während der Präparation.

Um die eventuell während der Inkubation von Zellen gewachsenen Zellstrukturen so gut wie möglich bewahren zu können, wird der Randbereich der Zellsubstrate zusätzlich noch mit einer Umrandung versehen, die ein vorzeitiges Abtrocknen oder Beschädigungen durch Flüssigkeitsströmungen während der Probenpräparation vermeiden sollte (siehe Abbildung 6-3).

6.2.3 Herstellung

Zunächst wurden Vergussformen für die Zylinder- beziehungsweise die Vertiefungsstrukturen aus Siliziumoxid hergestellt. Als Ausgangspunkt für die Vergussformen wurden in diesem Fall Siliziumwafer mit einer Kristallorientierung von $\langle 100 \rangle$ verwendet.

Strukturierung der Umrandung

Um die in der Konzeption erwähnte Umrandung herzustellen, wurde der Siliziumwafer zunächst in Aceton, Isopropanol sowie demineralisiertem Wasser gereinigt und die natürlich gewachsene Oxidschicht auf der Oberfläche eines Wafers mithilfe einer Ammoniumfluorid-Ätzlösung entfernt. Typischerweise reichte hier eine Ätzzeit von einer Minute aus (siehe Abbildung 6-4, Schritt 1).

Anschließend wurde mittels thermischer Oxidation bei einer Temperatur von $1050\text{ }^{\circ}\text{C}$ in trockener Sauerstoffatmosphäre eine circa 300 nm dicke Schicht Siliziumdioxid auf dem Wafer erzeugt (2).

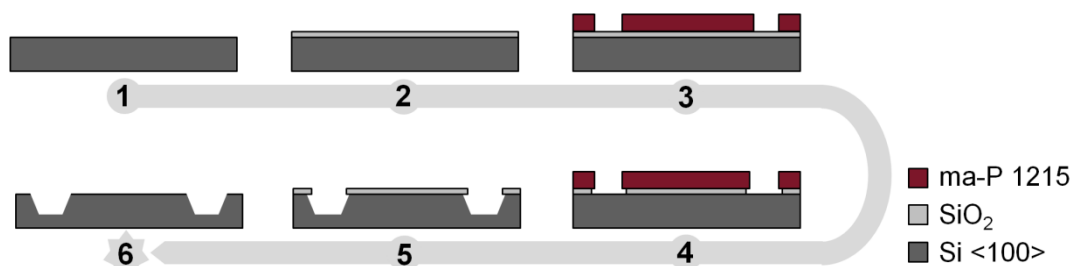


Abbildung 6-4 Herstellung eines Vergussrohlings mit Umrandung

Die Umrandung wurde daraufhin durch optische Belichtung in Fotolack (map1215, micro resist technologies GmbH, Berlin) definiert (3). Das Lackmuster wurde anschließend mithilfe von Ammoniumfluorid in die Oxidschicht übertragen (4).

Nach Entfernen des Fotolacks erfolgte ein weiterer Ätzschritt in 10 M Kaliumhydroxid (KOH) (5). Da die Ätzraten von Silizium in KOH stark von der jeweiligen Kristallrichtung der Siliziumoberfläche abhängen (siehe [Wil96]), konnte hierbei eine definierte Seitenwandgeometrie der Umrandung erreicht werden. Durch die Ätztiefe wurde die spätere Höhe der Umrandung festgelegt. Typische Ätztiefen waren $20\text{--}25\text{ }\mu\text{m}$, für die mittlere Ätzzeiten von ca.

20 bis 30 Minuten in KOH mit einer Temperatur von 30 °C notwendig waren.

Kritische Parameter bei diesem Prozessschritt waren zum Einen Qualität und Schichtdicke des als Ätzmaske dienenden Siliziumdioxids, sowie die Durchmischung der KOH-Lösung während des Ätzschrittes.

Dünnere Oxidschichten oder ein Wechsel von thermisch gewachsenem zu plasma-gestützt abgeschiedenem Oxid führten in der Regel zu einem frühzeitigen Versagen der Ätzmaske. Eine schlechte Durchmischung der KOH-Ätzlösung beeinträchtigte hingegen lokal die Ätzrate, sodass keine über die gesamte Umrandung homogene Äztiefe erreicht wurde.

Nachdem die Umrandung im Silizium definiert war, wurde verbliebenes Siliziumdioxid in einem abschließenden Ätzschritt in Ammoniumfluorid entfernt (6).

Herstellung der Vergussformen

Die auf diese Weise mit der Umrandung vorstrukturierten Waferstücke wurden analog zu dem bereits in Abschnitt 5.3.3 geschilderten Prozess bearbeitet, um Vergussformen für die Zylinder- beziehungsweise die Vertiefungsstrukturen bereitzustellen. Die wesentlichen Prozessschritte sind hier kurz zusammengefasst.

Zunächst wurde auf den Wafern mithilfe von plasma-gestützter Gasphasenabscheidung eine 2 µm dicke Oxidschicht aufgebracht. Es folgte das Aufbringen einer ca. 40 nm dicken Schicht Aluminium als Ätzmaske für den nachfolgenden Trockenätzprozess.

Mithilfe von Elektronenstrahlolithographie (mit Lack PMMA) und Trockenätzverfahren wurden dann die Formen für Zylinder- beziehungsweise die Vertiefungsstrukturen in Siliziumoxid definiert. Für die Zylinderstrukturen wurde dabei der Elektronenstrahlack als Ätzmaske für eine Aluminiumätz verwendet, während für die Negativstrukturen die Aluminiumschicht auf das PMMA aufgebracht und nach der Elektronenstrahlbelichten ein Lift-Off-Verfahren in Aceton durchgeführt wurde.

Nach einer abschließenden Oberflächenfunktionalisierung zur Anti-Haft-Beschichtung wurden die Vergussformen als Ausgangspunkt für die Herstellung der Zellsubstrate genutzt.

Abformen der Zellsubstrate

Die Herstellung der Zellsubstrate erfolgte, analog zu dem in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Prozess, durch Vergießen der Formen mit dem, in einem Verhältnis von 1:10 (Basislösung zu Vernetzungskatalysator) angemischtem Poly(dimethylsiloxan)-Elastomer.

Nach der thermischen Vernetzung des Poly(dimethylsiloxan)-Elastomers wurden die Zellsubstrate von der Vergussform gelöst und mithilfe eines sterilen Skalpells auf eine Größe von 1x1 cm² zurechtgeschnitten.

Um den elastischen PDMS-Abguss zu stabilisieren wurde dieser abschließend durch Verkleben mit noch nicht vernetztem PDMS auf einem passend zugeschnittenen Glasträger fixiert und bis zur weiteren Verwendung in einem sterilen Gefäß gelagert.

Die auf diese Weise hergestellten Variationsmatrizen auf den PDMS-Zellsubstraten sind in Abbildung 6-5 gezeigt.

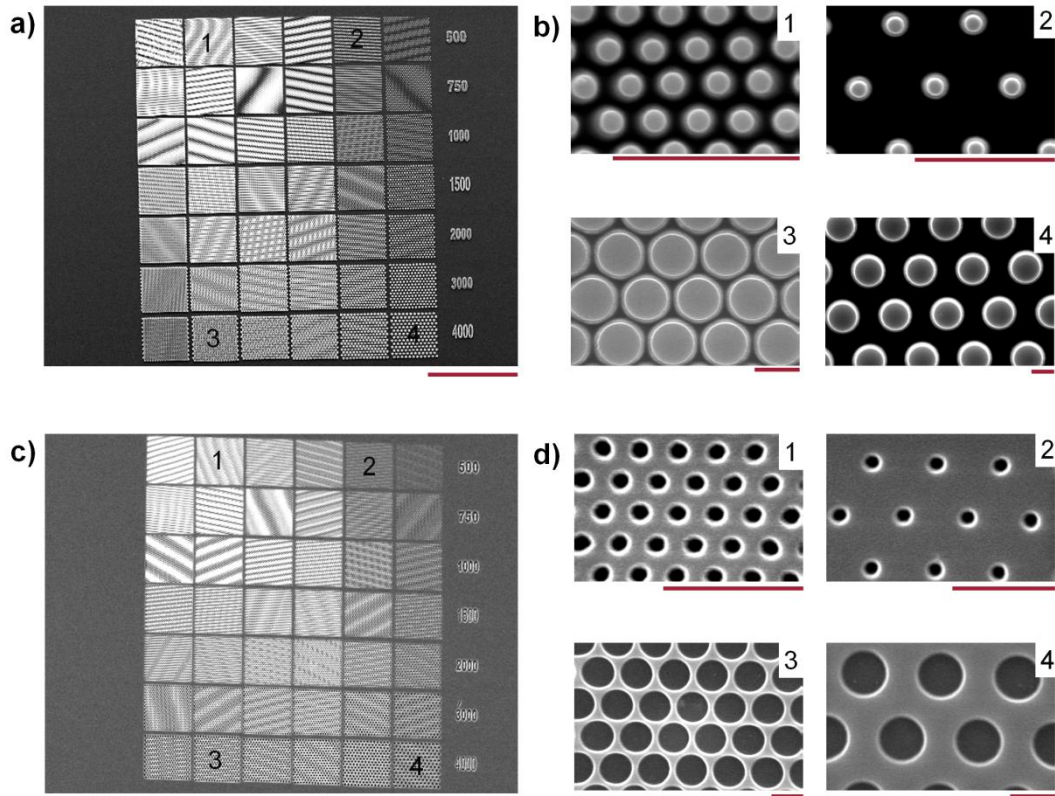


Abbildung 6-5 REM-Aufnahmen der PDMS-Zellsubstrate zur Untersuchung struktur-induzierter Zellausrichtung

a) Variationsmatrix der Zylinderstrukturen (Skala: 200 µm), b) vergrößerte Aufsichten auf die Zylinderstrukturen (Skalen: 5 µm), c) Variationsmatrix der Vertiefungsstrukturen (Skala: 200 µm), d) vergrößerte Ansichten der Vertiefungsstrukturen (Skalen: 5 µm)

6.2.4 Charakterisierung der Strukturparameter

Die Vermessung der Zellsubstrate erfolgte anhand von REM-Aufnahmen. Aus diesen wurden die mittleren Geometrieparameter der Felder innerhalb der Variationsmatrizen bestimmt.

Auf den Zylindersubstraten haben alle Zylinder dieselbe mittlere Höhe $H = 1122 \pm 63 \text{ nm}$, während die Lochstrukturen eine einheitliche, mittlere Tiefe von $T = 1224 \pm 72 \text{ nm}$ aufweisen.

Sowohl bei den Zylinder- als auch bei den Lochstrukturen sind die mittleren Strukturradien entlang einer Zeile der jeweiligen Variationsmatrix konstant. Die mittleren Radien R der einzelnen Matrixzeilen sind in Abbildung 6-6a dargestellt. Analog dazu sind die Abstände der Strukturen innerhalb einer Spalte der Variationsmatrix annähernd konstant. Die Mittelwerte der Abstände in den einzelnen Matrixspalten sind in Abbildung 6-6b gegeben. Eine detaillierte, tabellarische Auflistung der Strukturparameter jedes einzelnen

Feldes der jeweiligen Zylinder- bzw. Lochmatrix ist in Abschnitt C.2 des Anhangs gegeben.

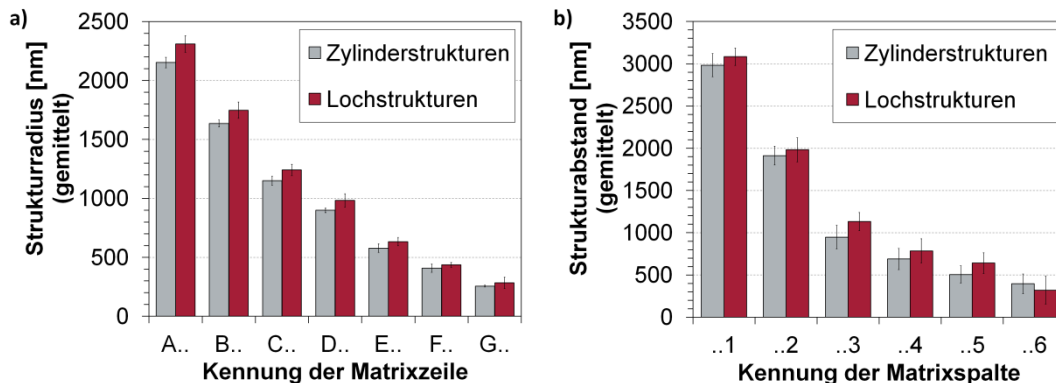


Abbildung 6-6 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrizen

a) Mittlere Strukturradien entlang der Matrixzeilen A bis G, b) mittlere Strukturabstände entlang der Matrixspalten 1 bis 6.

Sowohl die Strukturradien als auch die Strukturabstände bewegen sich damit in derselben Größenordnung wie die mittleren Ausdehnungen des Bakteriums BoFeN1, das auf diesen Zellsubstraten inkubiert werden soll.

Wie bereits in Abschnitt 5.3.5 diskutiert, weisen, bedingt durch den Herstellungsprozess, sowohl die Zylinder-, als auch die Lochstrukturen eine leicht konische Form auf. Der Winkel der Seitenflanken ist in allen Fällen ungleich null. Die Zylinderstrukturen sind daher an der Basis größer, als an ihrer Oberseite. Bei den Lochstrukturen ist dieser Trend genau umgekehrt, d. h. der Radius im Inneren der Vertiefungen ist kleiner als der Radius an der Oberseite.

Für eine ausführlichere Betrachtung sei auf Kapitel A im Anhang verwiesen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich die in Abbildung 6-6 gegebenen Werte jeweils auf die Zylinderoberkante, beziehungsweise auf den Boden der Lochstrukturen beziehen.

6.3 Zellkulturbedingungen

Die Inkubation der unter sterilen Bedingungen hergestellten Proben wurde in den Labors der Angewandten Geowissenschaften in Tübingen durchgeführt.

Wesentliche Bestandteile des Kulturmediums, das für die Inkubation der Zellen verwendet wurde, waren 10 mM Natriumnitrat (NaNO_3) und 5 mM

Natriumacetat (CH_3COONa). Weitere Details zur genauen Zusammensetzung sind [Kap05] zu entnehmen.

Da BoFeN1 sowohl mit als auch ohne Fe(II) kultivierbar ist und nicht bekannt war, ob die Zugabe von Fe(II) die Wechselwirkung des Bakteriums mit den strukturierten Substraten beeinflusst, wurden Zellkulturen mit und ohne Fe(II) angelegt. Im Fall des eisenhaltigen Mediums wurden sowohl Kulturen mit ca. 3,0 mM Eisenchlorid (FeCl_2), als auch mit 0,5 mM FeCl_2 angelegt.

Nach Einlegen der Zellsubstrate in das Zellkulturmedium wurden die Zellen in gasdicht verschlossenen Zellkulturflaschen unter anaeroben Bedingungen (N_2/CO_2 -Atmosphäre) über eine Dauer von drei Tagen inkubiert.

6.4 Probenpräparation



Abbildung 6-7 BoFeN1-Zellkulturflaschen nach dem Transport ans Institut für Angewandte Physik.

Links: Zellkultur ohne FeCl_2 , rechts: Zellkultur mit FeCl_2 . Die bräunlich-rote Trübung kommt durch die entstandenen, dreiwertigen Eisenverbindungen zustande. (Skala ca. 4 cm)

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellkulturflaschen an das Institut für Angewandte Physik transportiert und dort die strukturierten Substrate entnommen (siehe Abbildung 6-7).

Ausgehend von den Erfahrungen der ersten Zellexperimente (vgl. Abschnitt 5.6.2), wurde ein Präparationsprotokoll verwendet, das durch möglichst graduelle Übergänge von einem Lösungsmittel zum anderen Präparationsartefakte auf ein Minimum

beschränken sollte. Zudem wurde getestet, ob der Einsatz eines zusätzlichen Fixiermittels (Glutaraldehyd) zur zusätzlichen Strukturstabilisierung der gewachsenen Zellstrukturen, einen Einfluss auf die beobachtete Zellausrichtung hatte (vgl. [Ric84]). Die einzelnen Präparationsprotokolle sind nachfolgend erläutert.

6.4.1 Fixiermethoden

Im einen Fall wurden die Substrate nach der Entnahme aus dem Kulturmedium direkt zur Dehydrierung für jeweils fünf Minuten in wässrige Lösungen von Ethanol mit steigender Ethanolkonzentration (10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) überführt. Direkt vor dem Trockenschritt erfolgte dann der Austausch des Ethanols durch Isopropanol in einer zweiten Konzentrationsreihe (33 %, 66 %, 100 % Isopropanol in Ethanol).

Alternativ dazu wurden Substrate aus dem entsprechenden Kulturmedium zunächst in phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline, kurz PBS) überführt, dort fünf Minuten belassen und dann für drei Stunden in einer Lösung von 2 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Erst danach erfolgte die Dehydrierung der Substrate in wässrigen Lösungen von Ethanol steigender Konzentration (10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) und schließlich in einer weiteren Konzentrationsreihe (33 %, 66 %, 100 % Isopropanol in Ethanol) die Überführung und anschließende Lagerung in Isopropanol.

6.4.2 Trocknung und REM-Präparation

Die in Isopropanol überführten Proben wurden direkt in die Anlage zur Kritisch-Punkt-Trocknung eingebracht und dort mehrfach mit flüssigem Kohlendioxid gespült, um das bisherige Medium Isopropanol auszutauschen. Anschließend wurde das flüssige CO₂ durch Überschreiten des kritischen Punkts von CO₂ (bei $T = 31,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $p = 73,8\text{ bar}$, vgl. Abschnitt 5.6.2) in den gasförmigen Zustand überführt und so die Proben getrocknet.

Direkt im Anschluss an die Trocknung wurden die Zellsubstrate durch Aufspütern einer ca. 10-15 nm dicken Schicht Gold-Palladium (AuPd) mit einer leitfähigen Deckschicht versehen.

Sofern die Vermessung im Rasterelektronenmikroskop nicht sofort erfolgen konnte, wurden die präparierten Substrate zusammen mit Kieselgel-Granulat in einem Exsikkator zwischengelagert, um die erneute Aufnahme von Luftfeuchtigkeit zu verhindern.

6.5 Auswertemethodik

Zur Bestimmung einer möglichen strukturmodifizierten Zellausrichtung auf den einzelnen PDMS-Strukturen wurden REM-Aufnahmen verwendet.

Es wurden pro Strukturfeld jeweils drei Aufnahmen mit konstanter Vergrößerung an zufällig ausgewählten Stellen gemacht, sodass auf jedem Strukturfeld eine Fläche von circa $(70 \times 70) \mu\text{m}^2$ abgedeckt wurde (siehe Abbildung 6-8a).

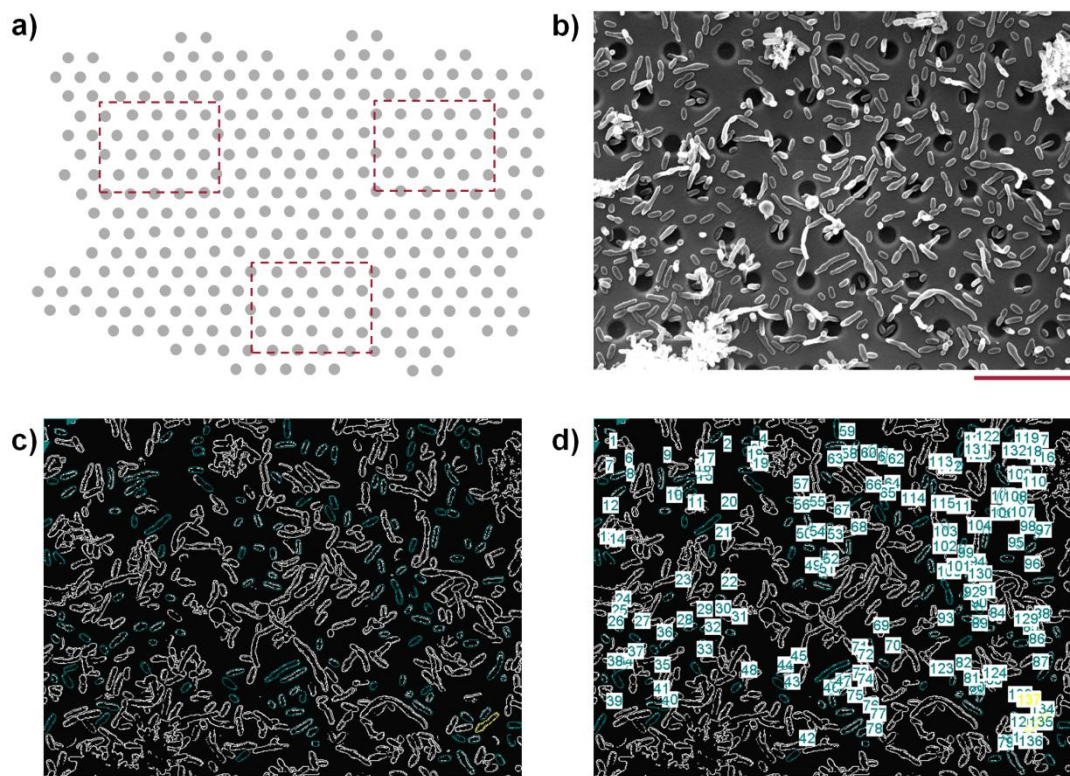


Abbildung 6-8 Experimentelles Vorgehen zur Bestimmung der Zellausrichtung

a) Zufallsbasierte Auswahl dreier Bildausschnitte auf einem der Strukturfelder, b) Beispiel einer solchen REM-Aufnahme (Feld D1 auf Substrat mit Vertiefungen), c) Anwendung des Kantenfilters, d) Manuelle Erfassung der Zellen, die Vermessung erfolgte mithilfe der Software Scandium (Skalen: 10 μm).

Die einzelnen REM-Aufnahmen wurden mithilfe der Auswertesoftware *Scandium* (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) vermessen.

Es wurde zunächst ein Kantenfilter angewandt, um die Umrisse der Zellen hervorzuheben (siehe Abbildung 6-8b). Danach wurden die Umrisse einzelner Zellen von Hand erfasst (siehe Abbildung 6-8c).

Die Funktionen von Scandium erlaubten die Berechnung der mittleren Ausdehnung der markierten Zelle. Hierüber konnte die Ausrichtung der Zelle

relativ zu den vorhandenen Substratstrukturen bestimmt werden. Als Maß für die Ausrichtung wurde der Winkel α zwischen der langen Achse der Zelle und einer durch die Strukturen auf den Zellsubstraten festgelegte Achse, gewählt (vgl. Abbildung 6-9). Damit ergibt sich für den Ausrichtungswinkel ein Wertintervall von $0^\circ \leq \alpha < 180^\circ$.

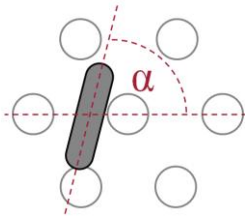


Abbildung 6-9 Schema zur Erfassung der Zellausrichtung

Das Maß für die Zellausrichtung ist der Winkel α zwischen langer Zellachse und der horizontalen Achse im Bild, ausgezeichnet durch die Substratstrukturen.

Auf diese Weise wurden pro Feld durchschnittlich einhundert Zellen erfasst. Die Daten der einzelnen Zellen wurden dann pro Feld zusammengefasst und in Histogrammform gebracht.

Nach dieser experimentellen Vorgehensweise müsste sich die Beeinflussung der Zellausrichtung durch die Substratstrukturierung durch Häufung eines bestimmten Ausrichtungswinkels zeigen.

Im Fall der gegebenen Strukturgeometrie, d. h. des hexagonalen Gitters, wären solche, mit dem Substrat korrelierenden Winkel beispielsweise 0° , 60° und 120° .

6.6 Ergebnisse

Abbildung 6-10 zeigt exemplarisch die typischen Ansichten der Zellsubstrate im Rasterelektronenmikroskop in Abhängigkeit von der Wahl des Kulturmediums während der Inkubation.

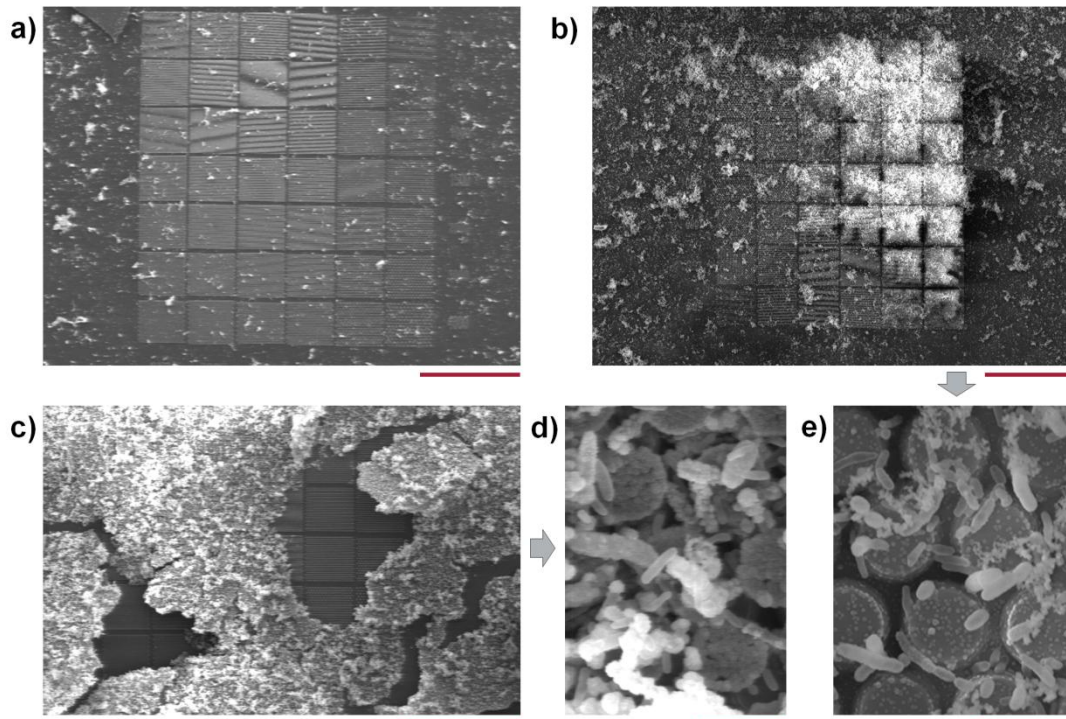


Abbildung 6-10 Zellsubstrate nach Inkubation in unterschiedlichen Kulturmedien

Gezeigt sind Ansichten der Zylindersubstrate a) Substrat inkubiert ohne FeCl_2 , b) Substrat inkubiert mit $0,5 \text{ mM FeCl}_2$, c) Substrat inkubiert mit 3 mM FeCl_2 . d) vergrößerte Ansicht des Substrats c (Feld B3), e) vergrößerte Ansicht des Substrats b (Feld B3). Die Zellsubstrate mit Vertiefungen verhielten sich analog. (Skalen: $200 \mu\text{m}$ (a-c), $5 \mu\text{m}$ (d, e))

Während die Zellsubstrate, die ohne oder mit $0,5 \text{ mM FeCl}_2$ inkubiert wurden, in allen Fällen eine nahezu konstante Bedeckung mit Zellen aufweisen und eine problemlose Sichtung der Strukturen des Zellsubstrats erlauben, zeigen die mit 3 mM FeCl_2 inkubierten Zellsubstrate keine einheitliche Bedeckung.

An einigen Stellen dieser Zellsubstrate ist die Bedeckung so ausgeprägt, dass sich die zugrundeliegende Strukturierung des Substrats nur erahnen lässt. Im Gegensatz dazu gibt es Bereiche, die nahezu vollständig frei von Ablagerungen bzw. Mikroben sind. Eine nähere Betrachtung der Ablagerungen zeigt, dass diese einerseits die Form der PDMS-Unterlage angenommen haben, die entstandene Ablagerungsschicht (Plaque) sich jedoch teilweise vom Substrat gelöst hat (vgl. Abbildung 6-11). Es kann daher vermutet werden, dass es in den Bereichen des Zellsubstrats, die frei von Zellen und Ablagerungen erscheinen, zur vollständigen Ablösung der biogenen Schicht kam.

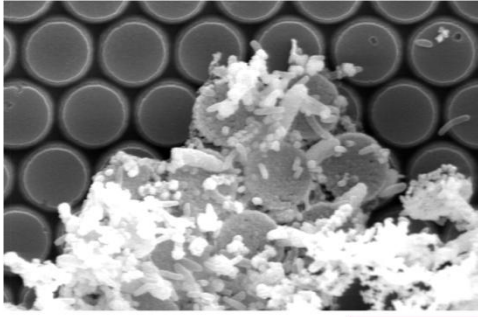


Abbildung 6-11 Eisenablagerungen auf einigen der BoFeN1-Zellsubstraten

Gezeigt ist ein Ausschnitt des Felds A5 auf einem mit 3 mM FeCl_2 inkubierten Zellsubstrat (Skala: 5 μm)

Ob diese Ablösung bereits während der Inkubation der Zellen erfolgte oder eine Folge der Präparationsschritte ist, kann hier nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass solche großflächigen Ablösungsercheinungen auf den ohne bzw. mit 0,5 mM FeCl_2 inkubierten Zellsubstraten nicht beobachtet wurden.

Wie auf den exemplarischen Aufnahmen in Abbildung 6-10d und e, sowie in Abbildung 6-11 zu erkennen ist, konnten die mit hohem Eisenanteil inkubierten Zellsubstrate nicht für die in Abschnitt 6.55.7 erläuterte experimentelle Vorgehensweise genutzt werden, da die geometrischen Zellparameter auf diesen Substraten nicht eindeutig den vorgegebenen Substratstrukturen zugeordnet werden konnten.

Die weiteren Auswertungen wurden folglich nur an den Zellsubstraten durchgeführt, die ohne und mit der geringeren Menge von 0,5 mM Eisen(II)chlorid inkubiert wurden.

6.6.1 Einfluss der Fixiermethode

Die in Abschnitt 6.4.1 geschilderten Fixiermethoden hatten, soweit anhand der REM-Aufnahmen zu erkennen war, keinen Einfluss auf die Anordnung der Zellen. In beiden Fällen waren auf den analog inkubierten Zellsubstraten dieselben Feinstrukturen zu erkennen (siehe Abbildung 6-12).

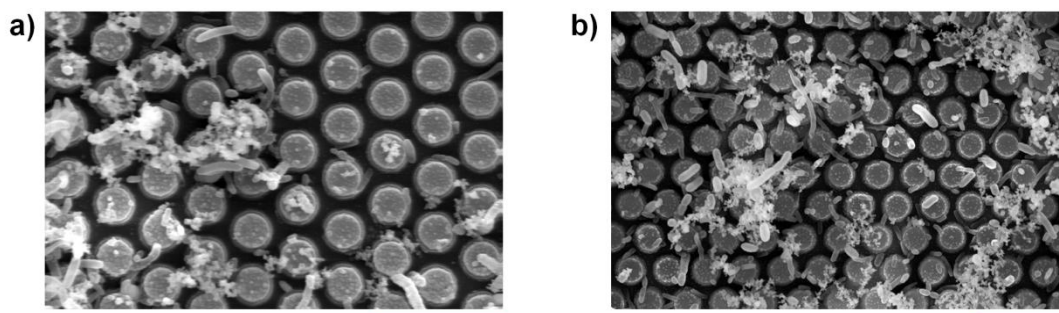


Abbildung 6-12 Zellen, präpariert ohne und mit zusätzlichem Fixierschritt

Gezeigt sind Ausschnitte des Zylinderfelds D3 auf Zellsubstraten, die a) ohne Fixierung, bzw. b) erst nach Fixierung in Glutaraldehyd getrocknet wurden. In beiden Fällen war das Kulturmedium eisenhaltig (Gehalt: 0,5 mM). (Skalen 10 μm)

6.6.2 Zellausrichtung auf Zylinderstrukturen

Wie die Auswertung der Histogramm Daten der Zylinderfelder ergab, waren die gemessenen Zellausrichtungen weitestgehend gleichverteilt im Intervall von $0^\circ \leq \alpha < 180^\circ$. Dies wurde bei allen untersuchten Strukturfeldern beobachtet. Eine signifikante Häufung der Zellausrichtung um einen bestimmten Winkel α konnte nicht beobachtet werden. Die Verteilungen deckten sich im Allgemeinen mit der zu Vergleichszwecken bestimmten, mittleren Zellausrichtung in unstrukturierten Bereichen der PDMS-Zellsubstrate.

Dementsprechend ergab sich für alle untersuchten Feldgeometrien stets ein mittlerer Ausrichtungswinkel von $\alpha \approx 90 \pm 10^\circ$. In Abb. Abbildung 6-13 sind die entsprechenden mittleren Ausrichtungswinkel in Abhängigkeit von den einzelnen Strukturparametern, d.h. dem Zylinderradius R sowie dem Zylinderabstand A, aufgetragen.

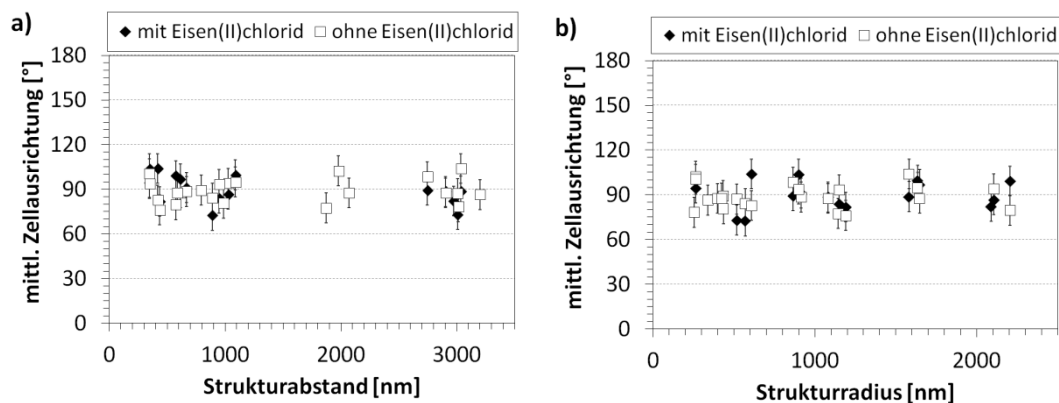


Abbildung 6-13 Mittlere Zellausrichtung in Abhängigkeit von den Strukturgeometrien
a) Abhängigkeit vom Strukturabstand A, b) Abhängigkeit vom Strukturradius R

Weder für die Variation des Strukturabstands, noch für eine Änderung des Strukturradius der Substratgeometrie lässt sich ein Trend hin zu einer Ausrichtung erkennen.

6.6.3 Zellausrichtung auf Vertiefungsstrukturen

Die Auswertung der Zellausrichtungen auf den Zellsubstraten mit den hexagonal angeordneten Vertiefungsstrukturen ergab, wie bereits im Falle der Zylinderstrukturen, keinen signifikanten Einfluss der Substratstrukturierung auf den Ausrichtungswinkel der Zellen.

Wieder waren die Winkel für alle Strukturfelder nahezu gleichverteilt im Intervall von $0^\circ \leq \alpha < 180^\circ$. Die Bestimmung der mittleren Ausrichtungswinkel

α in Abhängigkeit von den jeweils vorliegenden Strukturparametern ergab dementsprechend wiederum Werte für die Ausrichtung $\alpha \approx 90 \pm 10^\circ$ (vgl. Abbildung 6-14). Ein Trend ist auch hier nicht zu erkennen.

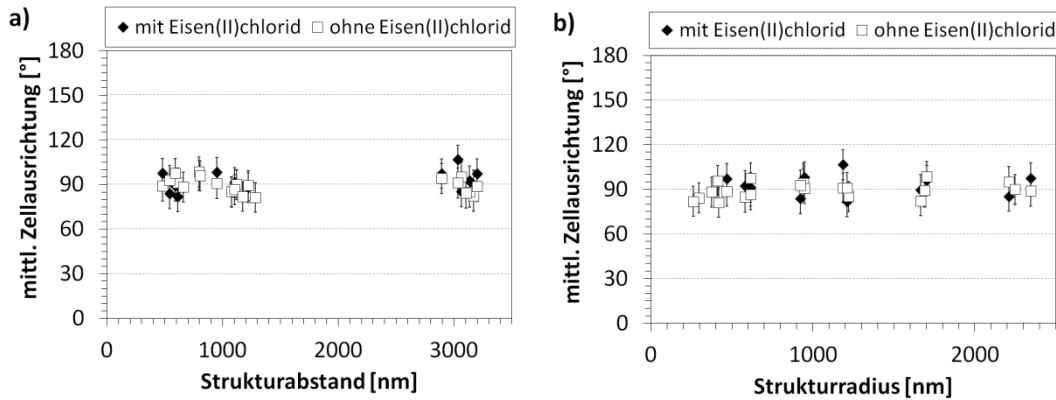


Abbildung 6-14 Mittlere Zellausrichtung in Abhängigkeit von den Strukturgeometrien
a) Abhängigkeit vom Strukturabstand A, b) Abhängigkeit vom Strukturradius R

Der in den strukturierten Bereichen der Zellsubstrate beobachtete, mittlere Ausrichtungswinkel um 90° ist im Rahmen der Messgenauigkeit identisch mit dem mittleren Ausrichtungswinkel in den unstrukturierten Bereichen der Zellsubstrate.

6.7 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte keine Auswirkung mikrostrukturierter Bereiche auf die Ausrichtung von Bakterien des Typs BoFeN1 beobachtet werden.

Durch die gezeigten Ergebnisse kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass eine möglicherweise während des Zellwachstums vorhandene Wechselwirkung zwischen den Zellen und den Substratstrukturen durch die in Unterkapitel 6.4 geschilderte Probenpräparation beeinträchtigt wird. Allerdings deuten sowohl das Vorhandensein feinsten Details, beispielsweise sichtbar in Abbildung 6-10e und Abbildung 6-12, als auch die Erfahrungen aus der Präparation anderer mikrobieller Strukturen (siehe Abschnitt 5.6) darauf hin, dass die verwendeten Präparationsschritte keinen beeinträchtigenden Einfluss auf die gewachsenen Zellanordnungen haben.

Eine andere Ursache für das Ausbleiben einer strukturinduzierten Zellausrichtung ist möglicherweise in der Wahl der Strukturparameter, d. h. des Strukturabstands A sowie des Strukturradius R zu vermuten. Offensichtlich

wirken sich artifizielle Strukturen in derselben Größenordnung wie der untersuchte mikrobielle Modellorganismus nicht auf die Anordnung der Mikroben auf der Oberfläche des Zellsubstrats aus.

Womöglich ist aber auch die physikalisch-chemische Wechselwirkung des Bakteriums mit dem verwendeten Substratmaterial (PDMS) nicht ausreichend, um eine Ausrichtung entlang der vorgegebenen Strukturgeometrien zu ermöglichen.

7 Biokolonisation II: Die Rolle des Benetzungsverhaltens

Im folgenden Kapitel sind die Konzeption und die Durchführung von Experimenten zur Rolle des Benetzungsverhaltens von Zellsubstraten für die Zell-Material-Wechselwirkung zusammengefasst.

Wie in Abschnitt 3.2.2 auf Seite 30 ausgeführt wurde, ist das Ziel dieser Arbeiten, zum Einen ein Verfahren auszuarbeiten, mit dem das Benetzungsverhalten auf einem einzelnen Zellsubstrat variiert werden kann, und zum Anderen eine Methodik zu entwickeln, die es ermöglicht, die Auswirkungen dieser Variation des Benetzungsverhaltens an lebenden Zellen zu erfassen.

Hierzu werden in Abschnitt 7.1 zunächst die Grundlagen der Benetzung von Oberflächen und die Möglichkeiten zur Einflussnahme mithilfe der Methoden der Mikrostrukturierung erläutert. In Abschnitt 7.2 wird anhand der Grundlagen der Diffusion kolloidaler Partikel eine Möglichkeit aufgezeigt, wie sich Veränderungen in der Zell-Material-Wechselwirkung durch zeitaufgelöste Beobachtungen der Zelldiffusion auf Materialoberflächen experimentell erfassen lassen. Experimentelle Grundlagen, sowie eine Zusammenstellung der Ergebnisse folgen dann in den Unterkapiteln 7.3 bis 7.11.

7.1 Grundlagen der Oberflächenbenetzung

Das Benetzungsverhalten von Flüssigkeiten auf einer gegebenen Oberfläche wird bestimmt durch die Oberflächenspannungen σ_i (in Einheiten von Energie pro Einheitsfläche) an den Grenzflächen zwischen den unterschiedlichen Medien (siehe [You05]).

Grundlage einer formalen Beschreibung ist die Annahme, dass sich im Gleichgewicht eine Konfiguration der Oberfläche mit minimaler Oberflächenenergie E einstellen wird, wobei E definiert ist als die Summe der Oberflächenenergien der einzelnen Grenzflächen mit Ausdehnung A_i , d. h.

$$E = \sum A_i \sigma_i \quad (7.1)$$

7.1.1 Ebene Oberflächen nach Young

Wird zunächst die Situation eines stationären Tropfens auf einer glatten Oberfläche betrachtet (siehe Abbildung 7-1), so lässt sich durch Minimieren von Bedingung (7.1), d. h. $dE = 0$, ein Punkt finden, an dem alle drei Phasen, d. h. die flüssige Phase, die feste Phase und die Gasphase koexistieren. Die sogenannte Kontaktlinie zwischen den Medien ist an diesem Punkt fixiert.

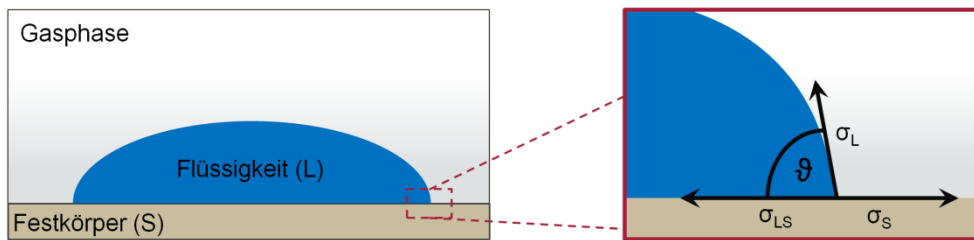


Abbildung 7-1 Kontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens auf einer glatten Oberfläche
Weiter lässt sich der Kontaktwinkel ϑ definieren, dessen Betrag gegeben ist durch das Gleichgewicht der jeweiligen Oberflächenspannungen der Festkörperoberfläche σ_s , der Flüssigkeitsoberfläche σ_l sowie der Grenzfläche beider Medien σ_{ls} , d. h.

$$\cos \vartheta = \frac{\sigma_s - \sigma_{ls}}{\sigma_l}. \quad (7.2)$$

Ist der Kontaktwinkel deutlich kleiner als 90° , so benetzt die Flüssigkeit die Unterlage. Ist ϑ größer als 90° , so ist von entnetzendem Verhalten die Rede. Handelt es sich bei der Flüssigkeit um Wasser, so wird die Materialoberfläche für $\vartheta < 90^\circ$ als hydrophil und für $\vartheta \geq 90^\circ$ als hydrophob bezeichnet; Oberflächen mit $\vartheta \gg 90^\circ$ werden auch superhydrophob genannt (siehe [Bic02]).

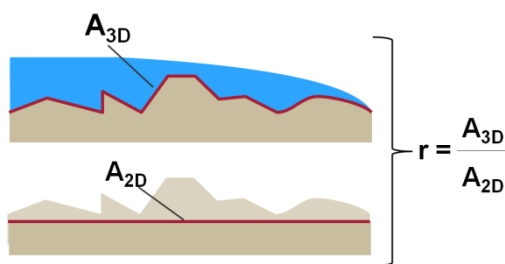
Die obige, Young'sche Betrachtungsweise beschreibt die Benetzung unter Verwendung einer idealisierten, vollständig ebenen Oberfläche. Der Kontaktwinkel ist demnach einzig eine Funktion der Oberflächenspannungen und damit für eine gegebene Flüssigkeit letztendlich eine materialspezifische Größe.

Im Gegensatz zu der in Abbildung 7-1 abgebildeten, idealisierten Modellvorstellung sind reale Oberflächen nicht beliebig glatt und es wurde beobachtet, dass der effektive Kontaktwinkel ϑ^* einer realen Oberfläche ebenfalls eine Funktion der Substratraugigkeit ist (siehe z. B. [Shi96]).

Um die Substrattopographie in die Berechnung des Kontaktwinkels mit einzubeziehen, gibt es verschiedene Ansätze.

7.1.2 Raue Oberflächen nach Wenzel

Verfügt eine augenscheinlich glatte Oberfläche über mikroskopische Unebenheiten, so verändert sich unter Umständen der beobachtete Kontaktwinkel und es ergibt sich ein von Gleichung (7.2) abweichender, effektiver Kontaktwinkel ϑ_W^* .



Nach R.N. Wenzel lässt sich dieser gemäß

$$\cos \vartheta_W^* = r \cdot \cos \vartheta \quad (7.3)$$

mit dem Kontaktwinkel der glatten Oberfläche verknüpfen, wobei

$$r = \frac{A_{3D}}{A_{2D}} \geq 1 \quad (7.3a)$$

Abbildung 7-2 Kontaktwinkel auf einer rauhen Oberfläche nach Wenzel.

das Verhältnis der realen Oberfläche A_{3D} zur in eine Ebene projizierten Fläche A_{2D} angibt (vgl. Abbildung 7-2, [Wen36]).

7.1.3 Poröse Oberflächen nach Cassie und Baxter

Benetzt ein Flüssigkeitstropfen eine Oberfläche mit poröser Oberflächenstruktur, so kann es dazu kommen, dass die Flüssigkeit nicht in alle Kavitäten der Oberfläche eindringt.

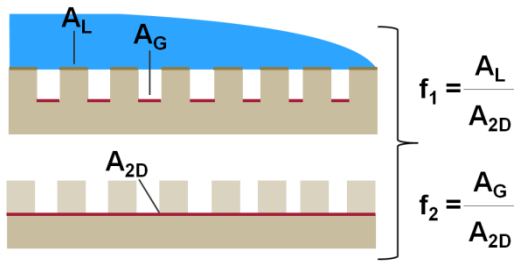


Abbildung 7-3 Kontaktwinkel auf einer porösen Oberfläche nach Cassie und Baxter.

Diese unvollständige Benetzung der Oberfläche führt ebenfalls zu einer Abweichung vom Kontaktwinkel der glatten Oberfläche. In diesem Fall ergibt sich ein effektiver Kontaktwinkel ϑ_{CB}^* , der sich nach [Cas44] wie folgt berechnet:

$$\cos \vartheta_{CB}^* = f_1 \cdot \cos \vartheta - f_2 \quad (7.4)$$

Die Konstanten $f_1 \leq 1$ und $f_2 \leq 1$ geben dabei jeweils den Anteil der Kontaktfläche A_L des Tropfens mit der Oberfläche beziehungsweise der Fläche A_G zwischen Tropfen und den Lufteinschlüssen mit der gesamten, in eine Ebene projizierten Oberfläche A_{2D} an (siehe Abbildung 7-3).

7.1.4 Gemischte Oberflächen nach Quéré

Nach Untersuchungen von D. Quéré und Kollegen (siehe [Bic02], [Que02]) können auf einer gegebenen Materialoberfläche mit lokal variierender Rauigkeit Bereiche mit Wenzel'schem und mit Cassie-Baxter'schem Benetzungsverhalten koexistieren.

Darüber hinaus identifizierten die Forscher noch eine weitere Betrachtungsweise für das Benetzungsverhalten einer Flüssigkeit auf einer porösen Oberfläche: Die Dochtwirkung.

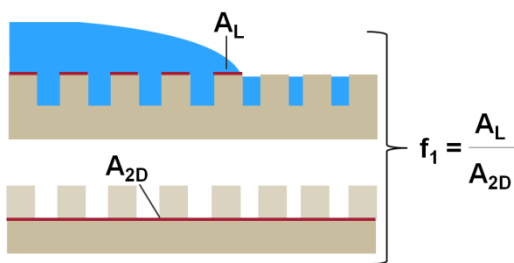


Abbildung 7-4 Kontaktwinkel bei Dochtwirkung nach Quéré und Bico.

Diese tritt dann ein, wenn eine Flüssigkeit eine solche Oberfläche vollständig benetzt und folglich sämtliche Hohlräume der Oberfläche gefüllt sind. Für den Fall, dass gerade noch die höchsten Erhebungen der Oberfläche

che frei von Flüssigkeit sind, ist ein Tropfen in Kontakt sowohl mit dem Festkörper, als auch mit dem Flüssigkeitsfilm. Nach [Bic02] ergibt sich dann ein effektiver Kontaktwinkel \mathcal{G}_D^*

$$\cos \mathcal{G}_D^* = 1 - f_1 \cdot (\cos \mathcal{G} - 1), \quad (7.5)$$

wobei $f_1 \leq 1$ wiederum das Verhältnis zwischen der Fläche A_L unterhalb des Tropfens in Kontakt mit der Oberfläche und der in eine Ebene projizierten Gesamtfläche des Substrats angibt.

Quéré und Kollegen verallgemeinerten die in den vorangegangenen Kapiteln erarbeiteten Modelle für den Kontaktwinkel einer rauen Oberfläche und definierten unter Verwendung des Wenzel'schen Rauigkeitsparameters $r \geq 1$ sowie des Cassie-Baxter'schen Flächenanteils $f_1 \leq 1$ drei mögliche Regime für die Berechnung eines effektiven Kontaktwinkels \mathcal{G}^* :

$$\cos \mathcal{G}^* = f_1 \cdot (\cos \mathcal{G} + 1) - 1 \quad \text{für } \mathcal{G} > \arccos \frac{f_1 - 1}{r - f_1} \quad (7.6a)$$

$$\cos \mathcal{G}^* = r \cdot \cos \mathcal{G} \quad \text{für } \arccos \frac{1 - f_1}{r - f_1} \leq \mathcal{G} \leq \arccos \frac{f_1 - 1}{r - f_1} \quad (7.6b)$$

$$\cos \mathcal{G}^* = 1 - f_1 \cdot (\cos \mathcal{G} - 1) \quad \text{für } \mathcal{G} < \arccos \frac{1 - f_1}{r - f_1} \quad (7.6c)$$

Demnach ist das jeweils vorherrschende Benetzungsregime gegeben durch die Größe des Young'schen Kontaktwinkels \mathcal{G} im Vergleich zu den kritischen Winkeln

$$\mathcal{G}_{krit,min} = \arccos \frac{1 - f_1}{r - f_1} \quad \text{sowie} \quad \mathcal{G}_{krit,max} = \arccos \frac{f_1 - 1}{r - f_1}. \quad (7.7)$$

7.1.5 Experimentelle Bestimmung des Benetzungsverhaltens

Der Kontaktwinkel wird in dieser Arbeit mithilfe eines am Institut erstellten Aufbaus, basierend auf dem in [Kwo99] geschilderten Messprinzip zur Kontaktwinkelmessung, bestimmt. Abbildung 7-5 zeigt den verwendeten Aufbau schematisch und fotografisch.

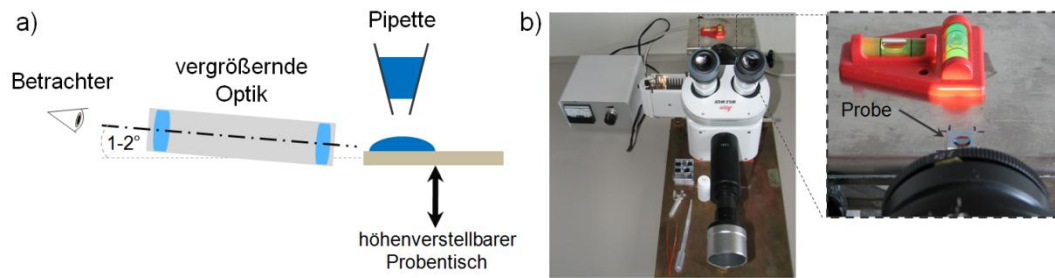


Abbildung 7-5 Messaufbau zur Kontaktwinkelmessung

a) schematische Darstellung, b) Photographie des realen Aufbaus

Die Probe befindet sich auf einem höhenverstellbaren Tisch, dessen Verkippung gegen die Horizontale mithilfe einer Libelle ausgeglichen werden kann. Über eine vergrößernde Optik erfolgt die Betrachtung der Probe im Experiment. Durch leichtes Verkippen der optischen Achse gegen die Horizontale wird sichergestellt, dass die Grenzfläche zwischen Tropfen und Probe vollständig abgebildet wird.

Für eine Messung wurde mithilfe einer Pipette zunächst ein Tropfen demineralisierten Wassers aus einer Höhe von ca. 5 mm auf die zu charakterisierende Oberfläche aufgebracht. Der entstandene, statische Flüssigkeitstropfen wurde sodann mithilfe einer Kamera fotografiert und der Kontaktwinkel unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogramms *GIMP* vermessen. Jede Messung wurde mehrfach wiederholt um mögliche Messfehler, beispielsweise durch das Auftropfen, auszugleichen. Dies ermöglichte die Bestimmung des Kontaktwinkels mit einer Genauigkeit von circa 5 °.

7.2 Die Diffusion kolloidaler Partikel

Sieht man von Bakterienstämmen ab, die über aktive Mechanismen zur Fortbewegung verfügen, so wird die Bewegung von Mikroben bestimmt durch zufällig verteilte Stoßprozesse mit den Molekülen des sie umgebenden Mediums. Ihre Bewegung folgt damit den gleichen Gesetzmäßigkeiten, die bereits 1828 von Robert Brown bei der Beobachtung von Blütenpollen dokumentiert wurden (siehe [Bro28]).

Im zeitlichen Mittel führen die Stoßprozesse zu einer diffusiven Bewegung der Mikroben, oder allgemeiner, der Brown'schen Partikel. Für einzelne Teilchen ist diese Bewegung nicht vorhersagbar; die zeitliche Entwicklung der Ortsvariablen x eines jeden Partikels ist bestimmt durch zufällige Ereignis-

nisse. Jedoch können statistische Aussagen über ein Ensemble von Partikeln mit einer (kontinuierlichen) Dichteverteilung $\rho(x,t)$ gemacht werden.

Diese Verteilung $\rho(x,t)$ entwickelt sich zeitlich und räumlich gemäß der von A. Einstein formulierten Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial \rho(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \rho(x,t)}{\partial x^2} \tag{7.8}$$

mit der Diffusionskonstante D als Proportionalitätsfaktor (siehe [Ein05]).

7.2.1 Grundlegende Eigenschaften diffusiver Prozesse

Eine Lösung dieser Differenzialgleichung für $\rho(x,0) \equiv \delta(x)$ ergibt sich im eindimensionalen Fall nach Einstein mit einer Dichtefunktion

$$\rho(x,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt} . \tag{7.9}$$

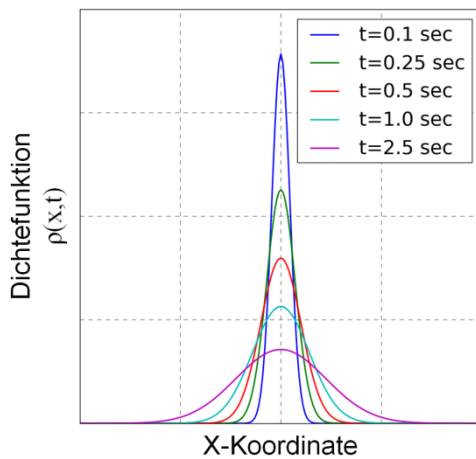


Abbildung 7-6 Zeitliche Entwicklung der Dichtefunktion nach Gl. (7.9).

Die zeitliche Entwicklung der in Gleichung (7.9) formulierten Lösungsfunktion ist in Abbildung 7-6 dargestellt.

Gleichung (7.9) besitzt unter anderen zwei interessante Eigenschaften:

1. Die Berechnung des Erwartungswerts $\langle x \rangle$ führt auf

$$\langle x \rangle \equiv \int_{-\infty}^{\infty} x \cdot \rho(x,t) dx = 0 , \tag{7.10}$$

d. h. die Dichtefunktion bleibt für alle Zeiten t um den Ursprung herum zentriert. Für das Ensemble der betrachteten Partikel bedeutet dies, dass sich im Mittel stets gleich viele Teilchen in positiver x-Richtung, wie auch in negativer x-Richtung bewegen.

2. Wird die Varianz $\langle x^2 \rangle$ der Dichtefunktion betrachtet, so ergibt sich

$$\langle x^2 \rangle \equiv \int_{-\infty}^{\infty} x^2 \cdot \rho(x,t) dx = 2Dt , \tag{7.11}$$

d. h. die Breite der Dichtefunktion ist zeitabhängig. Das Ensemble der Partikel verteilt sich also mit zunehmender Zeit allmählich im zur Verfügung stehenden Raum.

Werden diese Überlegungen auf zwei- oder dreidimensionale Systeme ausgedehnt, so folgt

$$\mathbf{2D:} \quad \langle \bar{r}^2 \rangle = \langle x^2 \rangle + \langle y^2 \rangle = 4Dt \quad (7.11)a$$

$$\mathbf{3D:} \quad \langle \bar{r}^2 \rangle = \langle x^2 \rangle + \langle y^2 \rangle + \langle z^2 \rangle = 6Dt \quad (7.11)b$$

7.2.2 Experimentelle Bestimmung der Diffusionskonstante

Da nach Gleichung (7.11) die Varianz $\langle x^2 \rangle$ proportional zur Zeitvariablen t ist und auch hier wiederum die Diffusionskonstante als Proportionalitätsfaktor eingeht, eröffnet sich eine Möglichkeit zur experimentellen Bestimmung der Diffusionskonstante. Dies ist nachfolgend am Beispiel der Diffusion von Partikeln in zwei Raumdimensionen erläutert.

Wird ein Ensemble aus Brown'schen Partikeln betrachtet, können die Trajektorien der Partikel über die Zeit hinweg verfolgt werden. Jeder Partikel für sich bewegt sich dabei zufällig; die zugehörige Trajektorie wird in der Literatur als *Random Walk* bezeichnet. Dies ist in Abbildung 7-7a am Beispiel der Diffusion von Partikeln in zwei Raumdimensionen gezeigt.

Ein Auftragen der Varianz, oder der in diesem Zusammenhang auch als *mittlere, quadratische Verschiebung* bezeichneten Werte $\langle \bar{r}^2 \rangle$ in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit t für ausreichend viele Partikel ergibt dann einen Verlauf entsprechend Abbildung 7-7b.

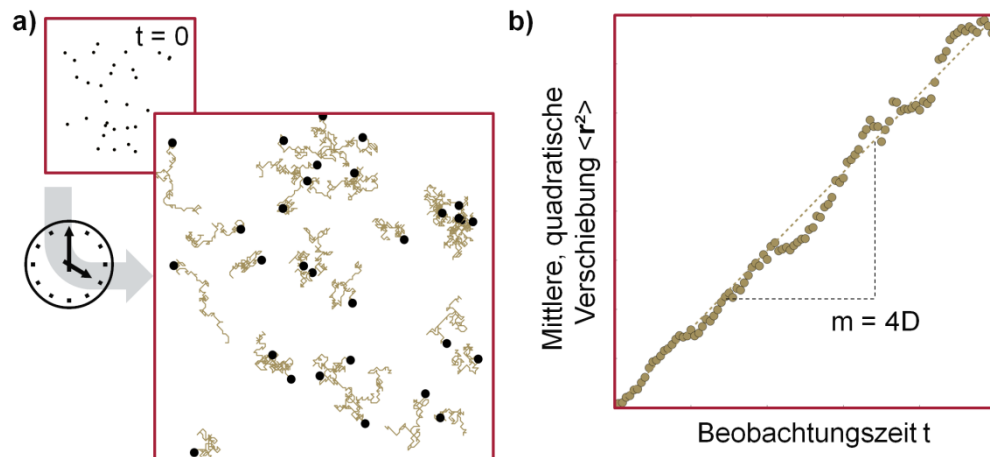


Abbildung 7-7 Experimentelle Bestimmung der Diffusionskonstante

a) Ein Ensemble von Partikeln wird beobachtet, die Trajektorien der einzelnen Partikel werden aufgezeichnet, b) Auftragung der mittleren, quadratischen Verschiebung über die Beobachtungszeit

Die Diffusionskonstante D kann daraufhin aus der Steigung der Ausgleichsgeraden entlang der Messwerte ermittelt werden.

7.2.3 Von der Diffusion zur Zell-Material-Wechselwirkung

Um von der Diffusion Brown'scher Partikel auf die Zell-Material-Wechselwirkung schließen zu können, wird zunächst betrachtet, was geschieht, wenn sich die Teilchen in einem Potenzial $\Phi(x)$ befinden, aufgrund

dessen eine Kraft $F = -\frac{\partial\Phi}{\partial x}$ auf die Teilchen wirkt.

Die Einstein-Smoluchowski-Gleichung

Zunächst werden die Brown'schen Partikel durch die Kraft F beschleunigt, jedoch behindern die zufälligen Stöße zwischen den Partikeln und den Molekülen des umgebenden Mediums diese Bewegung, sodass sich im Gleichgewicht gemäß

$$j_{drift}(x) = \mu \cdot F \cdot \rho(x), \quad (7.12)$$

eine Teilchenstromdichte j_{drift} mit der Teilchenbeweglichkeit μ als Proportionalitätskonstante einstellt.

Da die Partikel zusätzlich der Diffusion unterliegen, tritt eine zweite Teilchenstromdichte $j_{diffusion}$ auf, die gemäß des ersten Fick'schen Gesetzes, d. h. nach

$$j_{diffusion}(x) = -D \cdot \frac{\partial \rho(x)}{\partial x}, \quad (7.13)$$

durch Fluktuationen in der Teilchendichte verursacht wird (siehe [Fic55]).

Im Gleichgewicht werden sich beide Stromdichten gerade zu null addieren, d. h.

$$j_{drift} + j_{diffusion} = \mu \cdot \left(-\frac{\partial \Phi(x)}{\partial x} \right) \cdot \rho(x) - D \cdot \frac{\partial \rho(x)}{\partial x} = 0. \quad (7.14)$$

Wird nun weiterhin vorausgesetzt, dass die Teilchendichte im gegebenen Potenzial $\Phi(x)$ der Boltzmann-Statistik folgt, dann kann die Dichtefunktion im Gleichgewicht in der Form

$$\rho(x) = N \cdot e^{-\Phi/k_B T} \quad (7.15)$$

mit einer Normierungskonstante N , der Boltzmann-Konstante k_B sowie der Temperatur T dargestellt werden. Abgeleitet ergibt sich dafür ganz allgemein

$$\frac{\partial \rho(x)}{\partial x} = \frac{1}{k_B T} \cdot \left(-\frac{\partial \Phi}{\partial x} \right) \cdot \rho(x). \quad (7.16)$$

Einsetzen dieses Ausdrucks für die Dichtefunktion in Gleichung (7.14) führt letztlich auf

$$j_{drift} + j_{diffusion} = \left(-\frac{\partial \Phi(x)}{\partial x} \right) \cdot \rho(x) \cdot \left(\mu - \frac{D}{k_B T} \right) = 0. \quad (7.17)$$

Da dieser Ausdruck im Gleichgewicht für alle Orte x gleich null sein muss, ergibt sich hieraus die Einstein-Smoluchowski-Gleichung

$$D = \mu k_B T \quad (7.18)$$

in ihrer allgemeinsten Form (siehe [Ein05]).

Konsequenzen für die Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung

Nach Gleichung (7.18) ist die Diffusionskonstante, die sich durch statistische Messungen an einzelnen Partikeln bestimmen lässt, verknüpft mit der Beweglichkeit μ , die, allgemein gesprochen, ein Maß dafür ist, mit welcher

Häufigkeit Wechselwirkungsprozesse zwischen den Partikeln und deren Umgebung die Partikelbewegung behindern.

Hat μ einen kleinen Wert, so ist die Häufigkeit der Wechselwirkungen zwischen Partikeln und ihrer Umgebung hoch. Die Bewegung der Partikel wird stark durch die Wechselwirkungen mit dem Material beeinträchtigt; die Diffusionskonstante wird entsprechend einen geringen Wert annehmen.

Im umgekehrten Fall, d. h. bei einer geringen Zahl an Wechselwirkungen, ist die Beweglichkeit hoch und entsprechend wird auch die Diffusionskonstante einen höheren Wert annehmen.

Wird in einem geeigneten Experiment also die Brown'sche Bewegung von Bakterien oberhalb einer zu testenden Substratoberfläche erfasst, so können Veränderungen in der Wechselwirkung zwischen den Bakterien und ihrer Umgebung durch Änderungen der beobachteten Diffusionskonstanten ermittelt werden.

Auch wenn auf diese Weise der Ursprung der auftretenden Wechselwirkungskräfte nicht zugänglich ist, so kann dennoch eine Änderung des mikroskopischen Verhaltens der untersuchten Mikroben direkt mit zuvor explizit festgelegten Substrateigenschaften, wie beispielsweise dem Benetzungsverhalten, korreliert werden.

Die Konzeption und Durchführung entsprechender Experimente wird nachfolgend vorgestellt.

7.3 Mikrobieller Modellorganismus

Als Modellorganismus wurde wieder *Staphylococcus aureus* (Laborstamm SA113) verwendet, da durch die in Abschnitt 3.2 geschilderten, bestehenden Untersuchungen an diesem Bakterium eine Basis für die Diskussion der hier gewonnenen Erkenntnisse vorliegt.

Für eine allgemeine Vorstellung von *Staphylococcus aureus* sei auf Abschnitt 5.2 verwiesen. Ergänzend zu den dort genannten Eigenschaften verfügt der hier verwendete Stamm über eine genetische Modifikation zur Produktion des Fluorophors GFP (aus dem Englischen: *Green Fluorescent Protein*, siehe [Tsi98]). Hierdurch ist es möglich, die Bakterien auf den Zellsubstraten mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu verfolgen. Ei-

ne detaillierte Beschreibung der genetischen Modifikationen ist in [Bur10] zu finden.

7.4 Entwurf und Herstellung der Zellsubstrate

Neben den in Kapitel 4 formulierten, allgemeinen Anforderungen an die Zellsubstrate, ist es insbesondere wichtig, mit den hier konzipierten Substraten das Benetzungsverhalten der Substratoberfläche definiert vorgeben zu können. Darüber hinaus müssen die Zellsubstrate so konstruiert werden, dass eine Vermessung der darauf inkubierten Zellen möglich wird, solange diese sich noch im Nährmedium befinden.

7.4.1 Verwendetes Substratmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der strukturierten Zellsubstrate wird hier wieder das Silikonelastomer Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) verwendet.

7.4.2 Layout der Zellsubstrate

Die räumlich aufgelöste Variation des Benetzungsverhaltens der Zellsubstrate wird erreicht, indem wieder Felder hexagonal angeordneter Zylinderstrukturen auf der Oberfläche des Substrats angeordnet werden (siehe Abbildung 7-8a).

Durch die systematische Variation der Zylinderradien R sowie der Zylinderabstände A in 42 verschiedenen Kombinationen wird somit, analog zu den in Abschnitt 5.3.2 konzipierten Strukturen, wieder eine Variationsmatrix erzeugt (siehe Abbildung 7-8b).

Im Licht der theoretischen Erläuterungen in Abschnitt 7.1 kann diese, zunächst rein geometrische Variation der Substratoberfläche auch als lokale Modifikation des Benetzungsverhaltens interpretiert werden. Jedes Feld mit einer Fläche von $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$ weist damit zusätzlich zu einer festen Kombination geometrischer Strukturparameter auch ein definiertes Benetzungsverhalten auf. Die Variationsmatrix umfasst also auch ein lokal unterschiedliches Benetzungsverhalten.

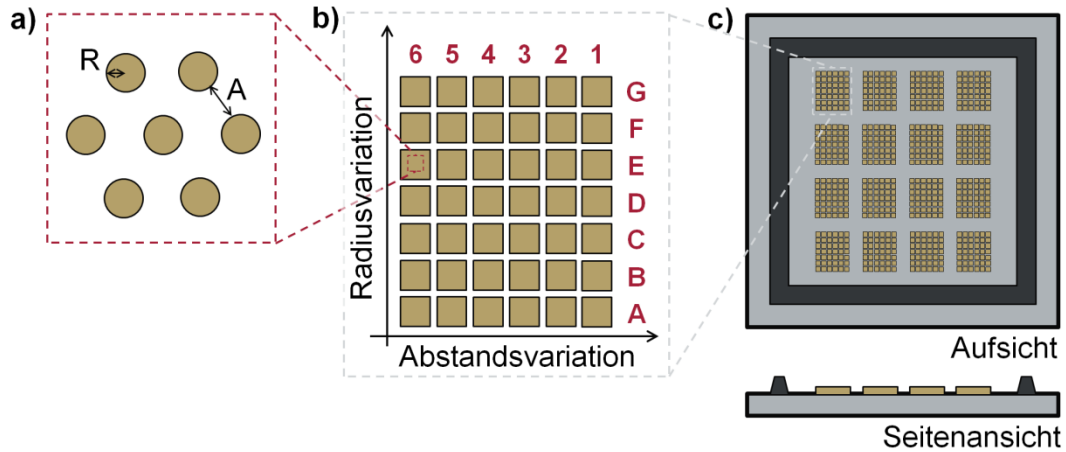


Abbildung 7-8 Entwurf der Zellsubstrate

a) Hexagonal angeordnete Zylinder mit Abstand A und Radius R, b) 42 Kombinationen von R und A zusammengefasst in der Variationsmatrix, c) 16 Variationsmatrizen auf einem Zellsubstrat, umgeben von der Umrandung.

Um einen Vergleich zwischen einzelnen, nominell identischen Oberflächenstrukturen auf demselben Substrat zu erlauben und somit die Basis für die Datenerfassung zu erhöhen, werden auf einem Zellsubstrat insgesamt sechzehn, nominell identische Variationsmatrizen untergebracht (siehe Abbildung 7-8c).

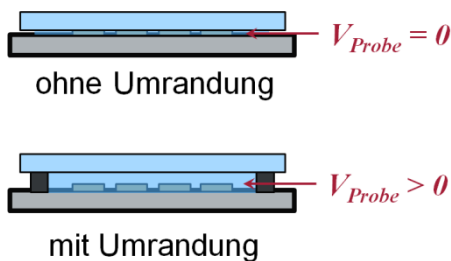


Abbildung 7-9 Umrandung der Substratstrukturen

Schutz der Strukturen durch die Aufrechterhaltung eines definierten Flüssigkeitsvolumens V_{Probe} .

Schließlich wird der Bereich des Zellsubstrats, der die Variationsmatrizen enthält, mit einer Umrandung versehen, die deutlich höher als die Matrixstrukturen ist (analog zu Abschnitt 6.2.3). Auf diese Weise wird erreicht, dass auch nach der Entnahme der Zellsubstrate aus der jeweiligen Nährlösung ein definiertes Flüssigkeitsvolumen V_{Probe} um

die strukturierten Bereiche herum erhalten bleibt. Zudem ist durch die Umrandung gewährleistet, dass das Anbringen eines Deckglases, wie es bei der optischen Mikroskopie üblicherweise verwendet wird, keinen zerstörerischen Einfluss auf die Oberflächenstrukturen hat (vgl. Abbildung 7-9).

Durch die hohe Elastizität des Substratmaterials PDMS ist ein guter Kontakt mit hoher Dichtigkeit zwischen Substrat und Deckglas gewährleistet. Hierdurch kann ein Abtrocknen der Substratoberfläche deutlich verzögert wer-

den und die Zeitspanne, während der die Bakterien auf dem Substrat beobachtet werden können, erhöht sich.

7.4.3 Herstellung der Vergussformen

Als Ausgangspunkt für die hier gemachten Untersuchungen eignen sich die im vorhergehenden Kapitel konzipierten Zylinderstrukturen uneingeschränkt. Es können also die bereits vorhandenen Vergussformen verwendet, beziehungsweise die in Abschnitt 6.2.3 erläuterte Vorgehensweise zur Herstellung neuer, geeigneter Vergussformen herangezogen werden.

7.4.4 Herstellung der PDMS-Zellsubstrate

Die Herstellung der Zellsubstrate erfolgt demnach wieder durch einen Vergussprozess, bei dem die Vorlagenstrukturen in Poly(dimethylsiloxan) abgeformt werden (siehe Abschnitt 6.2.3).

7.5 Geometrische Parameter der Substratstrukturen

Da die Zellsubstrate aus denselben Vergussformen hergestellt wurden, wie die bereits in Abschnitt 6.2.4 diskutierten Substrate, weisen diese dieselben Strukturparameter, d. h. Zylinderradius R , Zylinderabstand A sowie eine einheitliche Höhe $H = 1122 \pm 63 \text{ nm}$, auf.

Die Zylinderradien R sind entlang einer Zeile der Variationsmatrix innerhalb einer Standardabweichung von $\Delta R \approx \pm 30 \text{ nm}$ konstant (vgl. Abbildung 7-10a). Die Abstände A zwischen den einzelnen Zylindern sind entlang einer Spalte der Variationsmatrix bis auf eine Standardabweichung von $\Delta A \approx \pm 120 \text{ nm}$ einheitlich (vgl. Abbildung 7-10b).

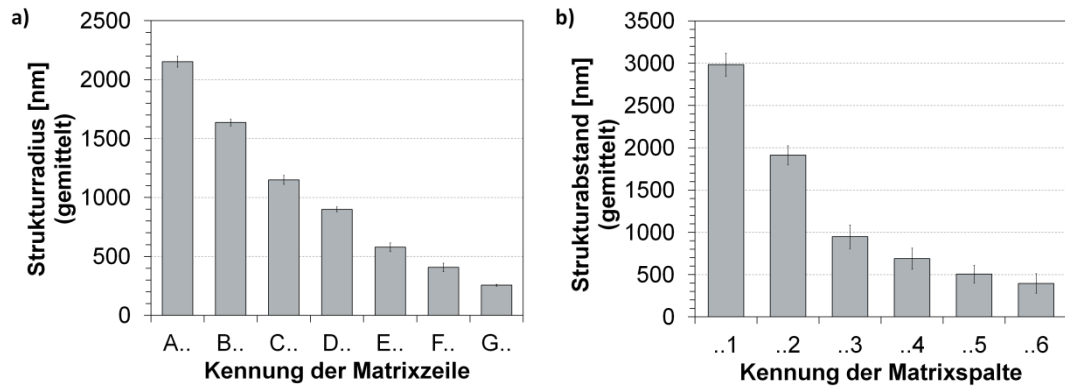


Abbildung 7-10 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrizen

a) Mittlere Strukturradien entlang der Matrixzeilen A bis G, b) mittlere Strukturabstände entlang der Matrixspalten 1 bis 6.

Die individuellen Werte der einzelnen Zylinderfelder sind in Abschnitt C.2 des Anhangs aufgelistet.

7.6 Charakterisierung des Benetzungsverhaltens

Die Felder der Variationsmatrizen lassen sich als Bereiche mit lokal variierender Substratraugigkeit interpretieren. Gemäß den Betrachtungen in Abschnitt 7.1 müsste sich folglich das Benetzungsverhalten des Zellsubstrats innerhalb der Variationsmatrizen ändern.

Die zu erwartenden Kontaktwinkel für die einzelnen Zylinderfelder ließen sich in diesem Fall mithilfe von Gleichung (7.6) berechnen, vorausgesetzt, der durch die Oberflächenchemie des Materials gegebene Kontaktwinkel θ_{PDMS} einer ebenen PDMS-Oberfläche ist bekannt.

7.6.1 Kontaktwinkelmessungen an Poly(dimethylsiloxan)

Zur Bestimmung des materialspezifischen, Young'schen Kontaktwinkels wird zunächst eine ausreichend ebene PDMS-Oberfläche benötigt.

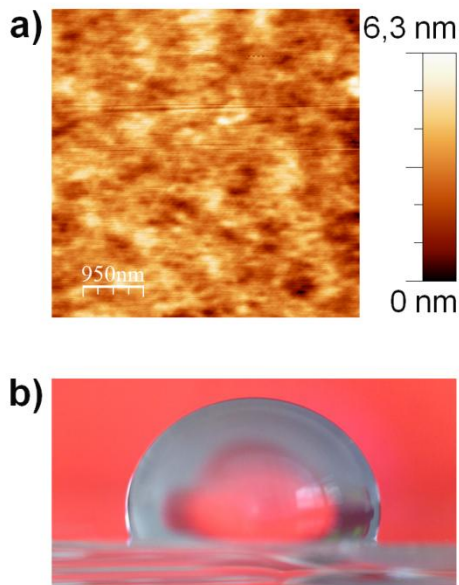


Abbildung 7-11 Kontaktwinkel an ebenen PDMS-Oberflächen.

a) AFM-Messung der Oberfläche (Bild erstellt mit WsXM, siehe [Hor07]), b) Aufnahme zur Kontaktwinkelmessung

Um dies zu erreichen wurde ein unbehandelte Siliziumwafer gemäß Abschnitt 5.3.3 silanisiert und in PDMS abgeformt. In Abbildung 7-11a ist ein repräsentativer Ausschnitt der Oberfläche des so hergestellten Substrats gezeigt. Bei der Aufnahme handelt es sich um die Darstellung einer rasterkraftmikroskopischen Messung.

Mit Höhenschwankungen in der Größenordnung von wenigen Nanometern kann die Oberfläche hinsichtlich des Benetzungsverhaltens als eben angenommen werden. Gleichung (7.6) vereinfacht sich dadurch wie folgt:

$$f_1 = r \approx 1 \Rightarrow \cos \vartheta^* = \cos \vartheta \quad (7.19)$$

Der Kontaktwinkel eines solchen PDMS-Substrats entspricht also dem Young'schen Modell der Benetzung einer ebenen Oberfläche.

Die experimentelle Untersuchung des Substrats ergibt einen Kontaktwinkel von $\vartheta_{\text{PDMS}} = 105 \pm 5^\circ$, d. h. die ebene PDMS-Oberfläche zeigt hydrophobe Eigenschaften (siehe Abbildung 7-11b).

Auswirkungen einer mikroskaligen Rauigkeit

Um anhand eines Beispiels die Auswirkungen mikroskaliger Rauigkeit zu untersuchen, könnten prinzipiell die Zylinderstrukturen der bereits diskutierten Zellsubstrate verwendet werden. Da die individuellen Strukturen dort jedoch nur eine Fläche von $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$ einnehmen, ist eine Vermessung mithilfe des in Abschnitt 7.1.5 beschriebenen Aufbaus allerdings nicht ohne Weiteres möglich.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Vergussform hergestellt, die auf einer Gesamtfläche von $(9 \times 9) \text{mm}^2$ über eine einheitliche Mikrostrukturierung verfügt.

Durch den bekannten Abformprozess wurde diese Strukturierung wiederum in Poly(dimethylsiloxan) übertragen, sodass sich auf der PDMS-Oberfläche ein $(9 \times 9) \text{ mm}^2$ großes Feld aus hexagonal angeordneten Zylinderstrukturen mit einheitlichem Radius⁴ $R = 250 \pm 26 \text{ nm}$, Abstand $A = 1200 \pm 50 \text{ nm}$ und Höhe $H = 980 \pm 30 \text{ nm}$ ergibt. Die Strukturparameter wurden aus stichprobenartigen REM-Messungen an einem solchen Substrat gewonnen (siehe Abbildung 7-12a).

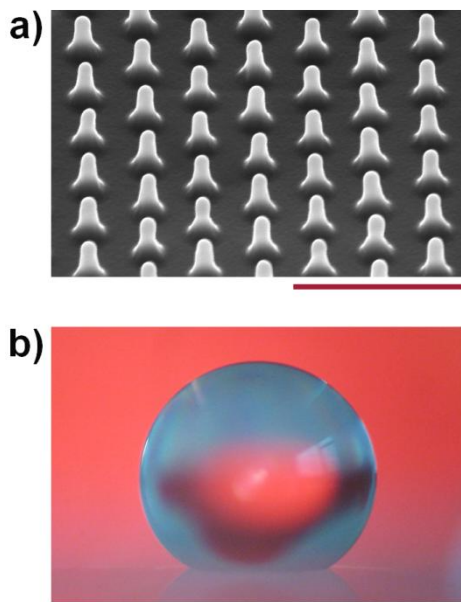


Abbildung 7-12 Kontaktwinkel strukturierter PDMS-Oberflächen

a) REM-Aufnahme der Substratoberfläche (Skala: $5 \mu\text{m}$, Probe gekippt), b) Aufnahme zur Kontaktwinkelmessung

Wird nun an einem Substrat mit dieser mikroskalig rauen Oberfläche eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt, so stellt sich die in Abbildung 7-12b gezeigte Situation ein.

Der gemessene Kontaktwinkel erhöht sich gegenüber dem Fall einer ebenen Oberfläche auf $\vartheta_{\text{PDMS,exp}}^* = 145 \pm 5^\circ$; der Wassertropfen nimmt eine fast vollständige Kugelform an.

Der Messwert für den Kontaktwinkel $\vartheta_{\text{PDMS,exp}}^*$ dieser rauen Oberfläche kann nun mit dem unter Verwendung von Gleichung (7.6) theoretisch zu er-

wartenden Kontaktwinkel $\vartheta_{\text{PDMS,theo}}^*$ verglichen werden.

Die mithilfe der oben genannten Abmessungen berechneten Rauigkeitsparameter f_1 sowie r ergeben sich zu:

$$f_1 \equiv \frac{A_L}{A_{2D}} = \frac{N_{100} \cdot (2\pi R^2)}{(100 \mu\text{m})^2} \approx 0,32$$

$$r \equiv \frac{A_{3D}}{A_{2D}} \approx 1 + \frac{N_{100} \cdot M_{\text{strukt}}}{(100 \mu\text{m})^2} \approx 2,55,$$

⁴Strenggenommen weisen die Strukturen in Abbildung 7-12a eine konische Form mit abgerundeter Spitze auf. Aus Gründen der Übersicht wird jedoch der Begriff „Zylinderstrukturen“ beibehalten. In den Berechnungen wird die konische Form berücksichtigt.

wobei $N_{100} = 8019$ die Zahl der Zylinder auf einer Fläche von $(100 \mu\text{m})^2$ und $M_{\text{strukt}} = 2 \cdot \pi \cdot (R^2 + RH) \approx 1,93 \mu\text{m}^2$ die Mantelfläche der leicht konisch geformten Substratstrukturen angeben.

Das zu erwartende Benetzungsregime lässt sich durch Einsetzen der Werte für f_1 und r in Gleichung (7.7) abschätzen. Es ergeben sich kritische Winkel $\mathcal{G}_{\text{krit,min}} \approx 73^\circ$ sowie $\mathcal{G}_{\text{krit,max}} \approx 107^\circ$.

$\mathcal{G}_{\text{PDMS}}$ liegt demnach nahe $\mathcal{G}_{\text{krit,max}}$, d.h. es kann im Rahmen der Messgenauigkeit angenommen werden, dass es sich hier um eine nur teilweise Benetzung der Oberfläche nach dem Modell von Cassie und Baxter (vgl. Abschnitt 7.1.3) handelt.

Rechnerisch ergibt sich damit schließlich durch Einsetzen in Gleichung (7.6)a ein Kontaktwinkel $\mathcal{G}_{\text{PDMS,theo}}^* \approx 140 \pm 6^\circ$, d. h. das experimentelle Ergebnis kann durch die diskutierten Modelle hinreichend gut reproduziert werden.

Basierend auf diesen Vorüberlegungen können nun die Kontaktwinkel innerhalb der Variationsmatrizen der Zellsubstrate theoretisch abgeschätzt werden.

7.6.2 Variation des Benetzungsverhaltens auf dem Zellsubstrat

Die Berechnung der effektiven Kontaktwinkel $\mathcal{G}_{\text{PDMS}}^* \equiv \mathcal{G}^*(R, A)$ erfolgt analog zum vorhergehenden Abschnitt als Funktion des jeweiligen Zylinderradius R , bzw. des Zylinderabstands A für alle Felder der Variationsmatrizen.

Das vorherrschende Benetzungsregime ergibt sich für die einzelnen Zylinderfelder wieder durch Bestimmen der kritischen Winkel nach Gleichung (7.7). Wie in Abbildung 7-13a grafisch dargestellt ist, führt die Strukturierung in der überwiegenden Zahl der Fälle zu einem Benetzungsverhalten gemäß des Modells von Wenzel, während die übrigen Felder in den Bereich des Cassie und Baxter'schen Modells fallen.

Die entsprechende Berechnung der Kontaktwinkel unter Verwendung der Gleichungen (7.6) führt auf die in Abbildung 7-13b dargestellten, effektiven Kontaktwinkel.

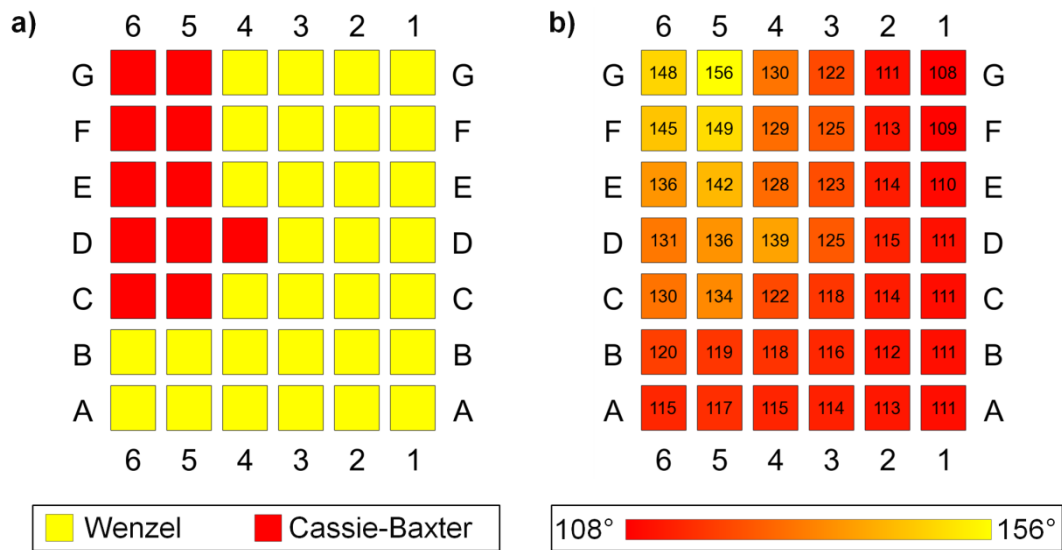


Abbildung 7-13 Kontaktwinkelvariation des strukturierten PDMS-Substrats

a) Theoretisch vorherrschendes Benetzungsregime nach Gleichung (7.6)a, b) Berechnete Kontaktwinkel der einzelnen Zylinderfelder (Fehlergrenzen: $\pm 6^\circ$).

Durch die zunächst rein geometrische Variation zwischen den einzelnen Zylinderfeldern wird also somit das Benetzungsverhalten innerhalb der Variationsmatrix auf dem Zellsubstrat über einen Bereich von $108 \pm 6^\circ \leq \vartheta^* \leq 156 \pm 6^\circ$ verändert.

Besonders interessant für die weiteren Betrachtungen ist dabei, dass sich innerhalb der Variationsmatrix Felder mit nominell gleichem Kontaktwinkel befinden, die sich durch unterschiedliche geometrische Strukturparameter auszeichnen.

Diese Überschneidungen im Benetzungsverhalten erlauben es zu unterscheiden, ob eventuell auftretende Unterschiede in der Biokolonisation einzelner Zylinderfelder eine Funktion des Benetzungsverhaltens, d. h. des Kontaktwinkels, sind oder ob diese ausschließlich von den gegebenen Strukturparametern abhängen.

7.7 Zellkulturbedingungen

Analog zu den in Kapitel 5 diskutierten Experimenten wurde *Staphylococcus aureus* zunächst über Nacht in geeignetem Nährmedium, d. h. einer wässrigen Lösung von 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % Natriumchlorid, 0,1 % Kaliumhydrogenphosphat und 0,1 % Glucose (im Englischen „BM broth“ genannt), inkubiert.

Durch Verdünnen mit frischem Medium wurde am Folgetag eine definierte Zellkonzentration mit einer optischen Dichte von 0,1, gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm, eingestellt.

Jeweils 1 ml dieser kalibrierten Nährlösung wurde in die Gefäße von 24-Well-Zellkulturplatten gegeben, in die zuvor PDMS-Zellsubstrate eingelegt worden waren. Die Kulturplatten wurden abgedeckt und dann auf einer Rüttelplatte bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C inkubiert. Die Zellsubstrate hatten keinen signifikanten Einfluss auf die zeitliche Entwicklung der Zellzahl (vgl. Abbildung 5-14).

7.8 Experimentelle Vorgehensweise

Nach Erreichen einer vorgegebenen Inkubationsdauer wurden die Zellkulturplatten kurzzeitig aus dem Inkubator entnommen, ein PDMS-Zellsubstrat aus dem Nährmedium entfernt und auf einem Mikroskop-Objektträger abgelegt (siehe Abbildung 7-14).



Abbildung 7-14 Entnahme der Zellsubstrate nach der Inkubation

Im Vordergrund: Ein bereits abgedecktes PDMS-Zellsubstrat auf einem Objektträger. Im Hintergrund eine 24-Well-Zellkulturplatte mit weiteren Proben.

Durch vorsichtiges Hantieren wurde dabei sichergestellt, dass der strukturierte Teil des Zellsubstrats zu jeder Zeit mit Medium bedeckt blieb.

Um ein Abtrocknen des Substrats zu vermeiden wurde die strukturierte Fläche schnellstmöglich mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und so innerhalb der Umrandung auf der Probenoberfläche ein definiertes Flüssigkeitsvolumen eingeschlossen.

Das gedeckelte Zellsubstrat wurde dann mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops vermessen. Bei optimaler Versiegelung des strukturierten Bereiches durch das aufgesetzte Deckglas konnten die Bakterien dabei bis zu 90 Minuten *in vitro* beobachtet werden, bevor ein Abtrocknen der Substratoberfläche einsetzte.

7.9 Messprotokoll

Innerhalb des Zeitfensters, in dem die Oberfläche des Zellsubstrats mit Nährmedium bedeckt war, wurden Mikroskopbilder von den Zylinderfeldern einiger Variationsmatrizen angefertigt.

Von jedem Bildausschnitt wurde zunächst eine Weißlichtaufnahme angefertigt, auf der die Zylinderfelder sichtbar waren. An diesem Bild wurde die Fokussierung des Mikroskops auf die Ebene der Zylinderstrukturen eingestellt. Unter Beibehaltung dieser Fokusebene wurde dann über einen Zeitraum von 75 Sekunden bis zwei Minuten eine Serie von Fluoreszenzbildern (empfindlich auf GFP) in einem einheitlichen Zeitabstand von 5 Sekunden aufgenommen, wobei durch den Wechsel auf den Fluoreszenzkanal ausschließlich die Zellen auf dem Substrat verfolgt werden konnten. Wie in Abbildung 7-15 exemplarisch gezeigt ist, lieferten die Zylinderstrukturen keinen Beitrag zum Fluoreszenzsignal.

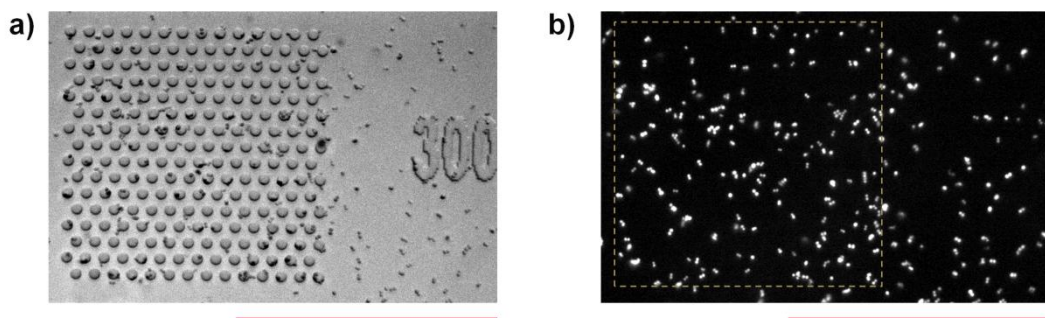


Abbildung 7-15 Fluoreszenzmikroskopische Sichtung der Zellsubstrate

a) In der Weißlichtaufnahme sind die Zylinderstrukturen deutlich erkennbar. b) Durch Umschalten auf den Fluoreszenzkanal können die Zellen ohne Substratbeitrag beobachtet werden. (Skalen: 100 μm)

Der zeitliche Abstand von 5 Sekunden zwischen zwei Bildern war festgelegt durch die maximale Aufnahmezeit des verwendeten Fluoreszenzmikroskops.

Die optische Vergrößerung des Mikroskops wurde so gewählt, dass einerseits einzelne Zellen erkennbar waren, andererseits jedoch auch ein möglichst großes Bildfeld abgedeckt werden konnte. Entsprechende Vorversuche ergaben eine optimale Einstellung bei einer Auflösung von 5 Pixeln pro Mikrometer. Auf diese Weise war es möglich, jeweils vier Felder in einem Bild zu erfassen und so innerhalb des gegebenen Zeitfensters

insgesamt zwei bis drei stichprobenartig ausgewählte Variationsmatrizen auf einem Zellsubstrat zu vermessen.

7.10 Auswertemethodik

Neben der rein qualitativen Analyse der Mikroskopbilder wurden die in zeitlich definiertem Abstand aufgenommenen Fluoreszenzbilder dazu genutzt, für die Zylinderfelder jeweils eine effektive Zelldiffusionskonstante zu ermitteln.

Hierzu wurde zunächst der Bereich eines individuellen Zylinderfeldes im Weißlichtbild identifiziert (siehe Abbildung 7-16a). In den dazugehörigen Fluoreszenzbildern wurden dann innerhalb dieses festgelegten Bereichs einzelne Zellen markiert und deren Position in Bildkoordinaten ausgelesen (siehe Abbildung 7-16b).

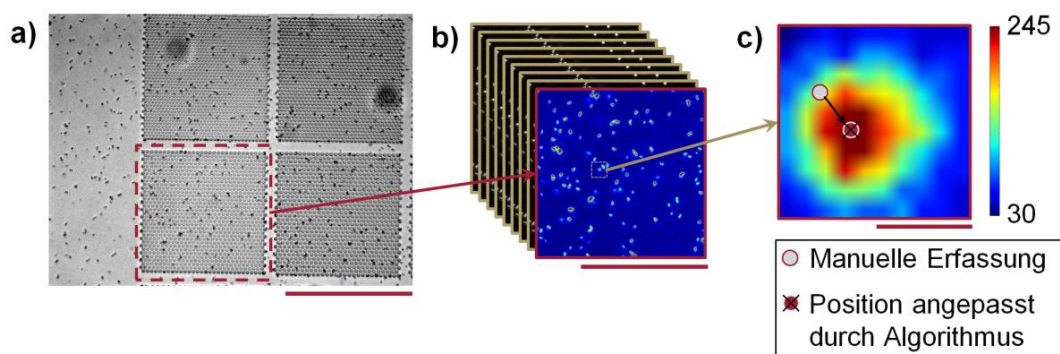


Abbildung 7-16 Experimentelle Erfassung der Zelltrajektorien

a) Vorauswahl eines Zylinderfeldes in der Weißlichtaufnahme (Skala: 100 μm)
 b) Erfassen von Zellpositionen in den Fluoreszenzbildern (Skala: 100 μm), c) Korrektur der zunächst manuell ausgewählten Zellpositionen anhand der Fluoreszenzintensität (Skala: 1 μm).

Dabei erfolgte die Erfassung der ungefähren Zellposition zuerst manuell und wurde dann mithilfe eines computergestützten Algorithmus präzisiert, indem die Lage des nächstgelegenen Maximums der Fluoreszenzintensität als Referenzpunkt bestimmt wurde (siehe Abbildung 7-16c). Mithilfe dieser computerunterstützten Methodik konnten die Zellpositionen zuverlässig bis auf einen Bereich von $\pm 1 \text{ Pixel}^2$ bestimmt werden. Dies entspricht bei den verwendeten Mikroskopvergrößerungen einer Genauigkeit der Ortsbestimmung von ca. $\pm 200 \text{ nm}$.

Durch sukzessives Ausmessen aller Fluoreszenzbilder einer Zeitreihe wurde so für jede identifizierte Zelle der zeitliche Bewegungsverlauf aufge-

zeichnet. Pro Zylinderfeld wurden auf diese Weise mindestens 30 verschiedene Trajektorien erfasst, wobei die Auswahl der Zellen zufällig und stichprobenartig über das Feld verteilt erfolgte.

Anhand dieser Trajektorien wurde schließlich gemäß der in Abschnitt 7.2.2 diskutierten Methode die mittlere Diffusionskonstante der Zellen auf dem jeweiligen Zylinderfeld berechnet. Hierbei wurde angenommen, dass die Bewegungen der erfassten Zellen im Wesentlichen in einer Ebene, d. h. entlang der Substratoberfläche, erfolgen. Die Diffusionskonstante kann demnach über Gleichung (7.11)b aus den Messdaten berechnet werden.

7.11 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen vorgestellt und diskutiert. Hierzu wird zunächst auf eine qualitative Analyse der Mikroskopaufnahmen eingegangen. In Abschnitt 7.11.2 werden dann die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Zelldiffusionskonstanten diskutiert.

7.11.1 Qualitative Sichtung der Zellsubstrate

In Abbildung 7-17 sind sowohl Weißlicht- als auch Fluoreszenzaufnahmen dreier Zellsubstrate zusammengefasst, die den gleichen Bereich einer Variationsmatrix nach jeweils unterschiedlichen Inkubationszeiten, d. h. nach 10 Minuten, 2 Stunden sowie 4 Stunden, zeigen. In allen Fällen waren die Oberflächen der Zellsubstrate während der Aufnahmen noch von Nährmedium bedeckt.

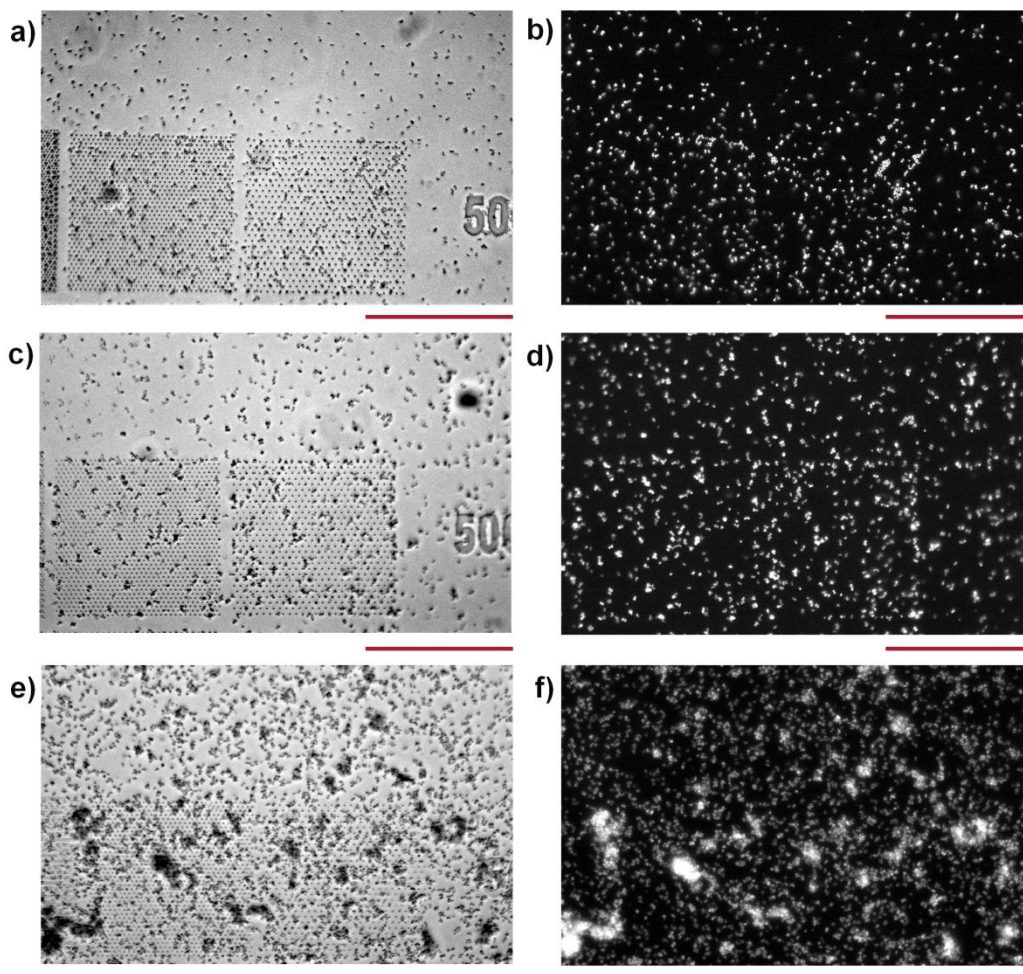


Abbildung 7-17 Qualitative Sichtung der Substratfelder G1 und G2

Gezeigt sind jeweils Weißlicht- und Fluoreszenzaufnahmen: a, b) nach 10 Minuten Inkubationszeit; c, d) nach 2 Stunden Inkubationszeit; e, f) nach 4 Stunden Inkubationszeit. (Skalen: 100 µm)

Grundsätzlich finden sich einzelne oder in kleinen Gruppen angeordnete Mikroben zufällig verteilt auf der gesamten Substratoberfläche; augenscheinlich unabhängig von der vorhandenen Strukturierung.

Bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzbilder lassen sich jedoch Bereiche der Oberfläche identifizieren, in denen die Zelldichte lokal erhöht ist (vgl. Abbildung 7-17b, d). Ein Vergleich mit den Weißlichtaufnahmen zeigt, dass diese Bereiche den Positionen der Zylinderfelder entsprechen.

Die lokal erhöhte Zelldichte lässt sich bereits nach zehnminütiger Inkubationszeit beobachten und bleibt auch nach zwei Stunden Inkubation zunächst bestehen. Für längere Inkubationszeiten (4 h) scheint sich die Zelldichte über die gesamte Substratoberfläche hinweg wieder auszugleichen. Abbildung 7-17e und f lassen keine ausgezeichneten Bereiche mehr erkennen,

die auf einen Effekt der Substratstrukturierung hindeuten würden. Größere Zellkolonien, die sich nach vierstündiger Inkubation gebildet haben, können zufällig verteilt über der gesamten Substratoberfläche beobachtet werden.

Diese zeitliche Entwicklung deutet darauf hin, dass die Strukturierung die Verteilung der Zelldichten bereits zu Beginn der bakteriellen Kolonisierung der Zellsubstrate signifikant beeinflusst und, dass dieser Einfluss mit zunehmender Zellbedeckung der Substrate abnimmt.

Letzteres könnte durch die Höhe der Substratstrukturen bedingt sein: Die Zylinderstrukturen befinden sich mit einer mittleren Höhe von $H = 1122 \pm 63$ nm in derselben Größenordnung wie der mittlere Durchmesser der Mikroben (zwischen $0,8 \mu\text{m}$ und $1,5 \mu\text{m}$). Die Strukturen sollten sich daher nur auf die erste Schicht von Bakterien auf dem Substrat auswirken. Mit zunehmender Zellzahl und demnach wachsender Bedeckung des Substrats würde sich somit die Zelldichte allmählich wieder ausgleichen.

Was die Natur des Einflusses der Substratstrukturen angeht, deutet das Vorhandensein eines sichtbaren Effekts nach nur zehn Minuten Inkubationszeit darauf hin, dass es sich hierbei nicht um eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens der Bakterien handelt. Wird die mittlere Zeit zwischen zwei Zellteilungsvorgängen $T_{2x} \approx 20$ min als charakteristische Zeiteinheit angesetzt, über die sich Änderungen im Wachstumsverhalten auswirken, so wäre die gegebene Inkubationszeit von zehn Minuten zu kurz, um die beobachteten, lokalen Zelldichteschwankungen durch strukturinduzierte Änderungen im Wachstumsverhalten zu erklären.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Substratstrukturen die diffusive Bewegung der ersten Zellen in der Nähe der Substratoberfläche beeinträchtigen. Um dies zu untersuchen, werden nachfolgend die aus den zeitabhängigen Fluoreszenzmessungen gewonnenen, effektiven Zelldiffusionskonstanten diskutiert.

7.11.2 Bestimmung der Zelldiffusionskonstanten

Abbildung 7-18 zeigt am Beispiel eines Zellsubstrats, das für 10 Minuten inkubiert wurde, die erfassten Trajektorien. Dargestellt sind die Trajektorien

auf den Zylinderfeldern G1 und G2, sowie innerhalb des unstrukturierten Bereichs auf der Probe.

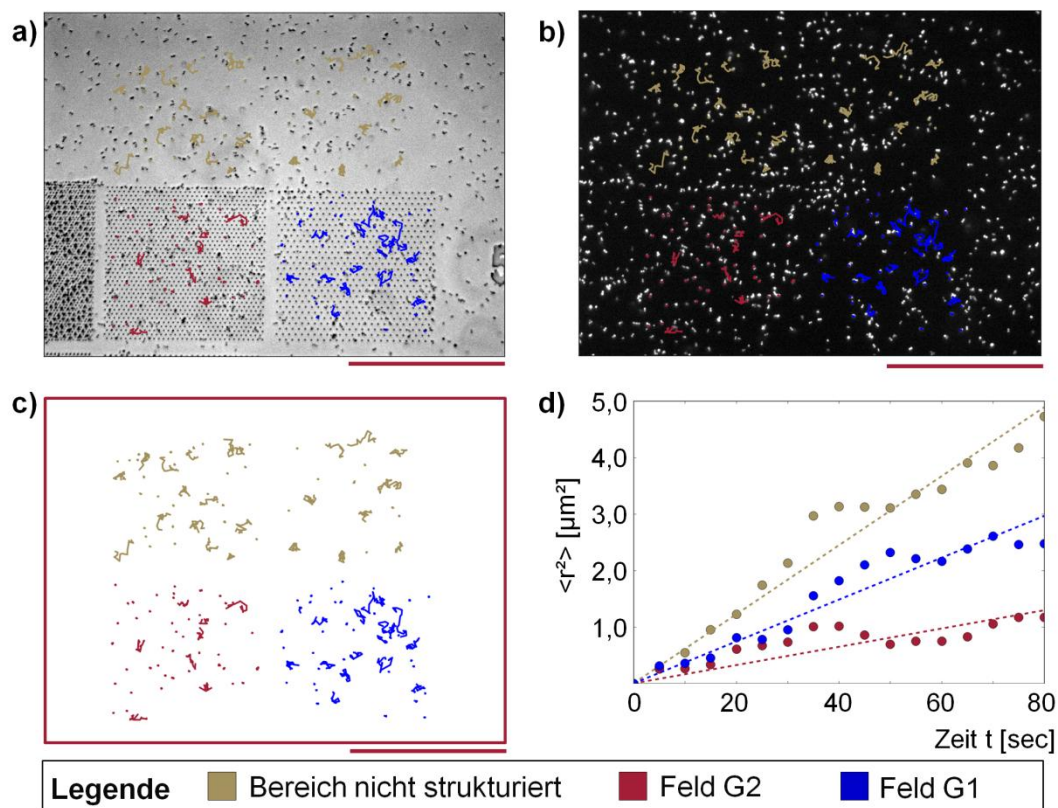


Abbildung 7-18 Bestimmung der effektiven Zelldiffusionskonstanten

Gezeigt sind die Felder G1 und G2 auf einem Zellsubstrat nach circa 10 Minuten Inkubationszeit, jeweils überlagert mit den ermittelten Trajektorien. a) Weißlichtaufnahme, b) Fluoreszenzbild, c) Zelltrajektorien ohne Hintergrundbild, d) Auftragung der entsprechenden mittleren, quadratischen Verschiebung $\langle r^2 \rangle$ über der Beobachtungszeit. (Skalen: 100 μm)

In Abbildung 7-18d sind die aus den Trajektorien berechneten, mittleren, quadratischen Verschiebungen wie sie sich typischerweise aus je 50 Messungen nach einer Beobachtungszeit von 80 Sekunden ergeben, abgebildet.

Die entsprechenden Diffusionskonstanten berechnen sich hier zu

$$\begin{aligned}
 D_{\text{frei}} &\approx 0,08 \pm 0,01 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \\
 D_{G1} &\approx 0,05 \pm 0,01 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \\
 D_{G2} &\approx 0,03 \pm 0,01 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}
 \end{aligned}
 \tag{7.20}$$

Demnach stellt sich für die unstrukturierten Bereiche des Zellsubstrats ein deutlich höherer, effektiver Zelldiffusionskoeffizient ein als in den strukturierten Zylinderfeldern.

Werden die übrigen Zylinderfelder nach dem gleichen Schema vermessen, so ergibt sich nach zehn Minuten Inkubationszeit die in Abbildung 7-19a gezeigte Verteilung.

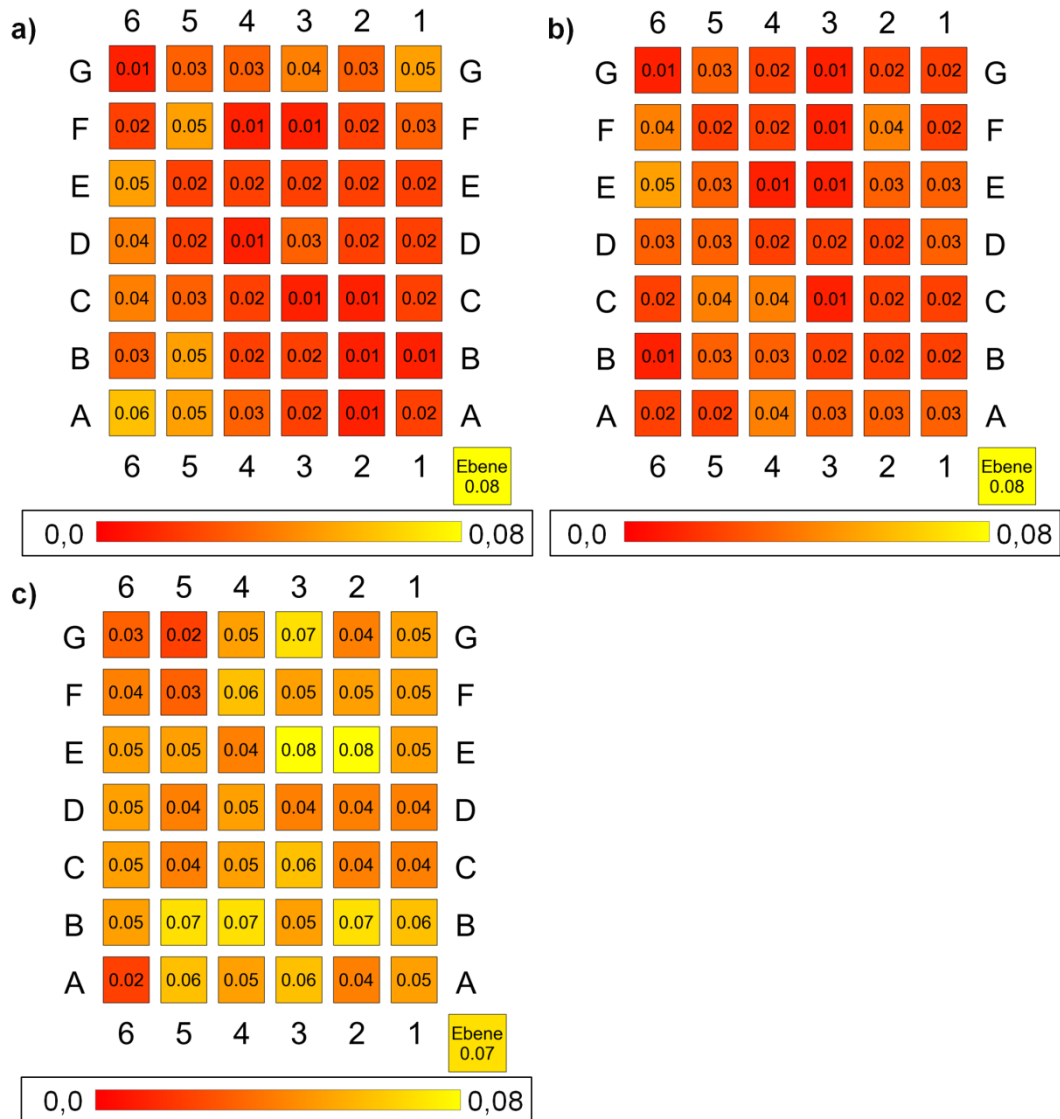


Abbildung 7-19 Zelldiffusionskoeffizienten innerhalb der Zylinderfelder
 Schematische Darstellung der effektiven Zelldiffusionskoeffizienten innerhalb der Variationsmatrizen: a) 10 min Inkubationszeit, b) nach 2 Stunden Inkubationszeit, c) nach 4 Stunden Inkubationszeit (Angaben in $[\mu\text{m}^2/\text{sec}]$).

In Abbildung 7-19b sind die entsprechenden Diffusionskoeffizienten der Zylinderfelder nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden, in Abbildung 7-19c nach vier Stunden abgebildet.

Ein Vergleich der effektiven Diffusionskoeffizienten für die Zellsubstrate nach 10 Minuten Inkubationszeit mit den Werten für Zellsubstrate, die zwei Stunden inkubiert wurden, zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Situationen auf. Nach vier Stunden weisen die Zylinderfelder allerdings im Mittel einen deutlich höheren, effektiven Diffusionskoeffizienten auf. Der Unterschied zur nicht strukturierten („ebenen“) Fläche nimmt deutlich ab.

Werden die ermittelten Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von den Abständen A bzw. den Radien R der einzelnen Zylinderfelder aufgetragen, so zeigt sich hier, dass die Messwerte für die Inkubationszeiten von 10 Minuten und 2 Stunden fast überlappen, während die gemessenen Werte für die Proben nach vier Stunden Inkubationszeit im Mittel erhöht sind. (vgl. Abbildung 7-20a und b). Wird jeweils über alle Felder mit nominell gleichem Strukturradius R oder Strukturabstand A gemittelt, so zeigt sich dies noch deutlicher (vgl. Abbildung 7-20c und d).

Während nach 10 Minuten und zwei Stunden Inkubationszeit innerhalb der strukturierten Bereiche der Proben eine deutlich reduzierte Diffusion der Mikroben zu beobachten ist, so erreichen die Messwerte für den Diffusionskoeffizienten nach vier Stunden fast das selbe Niveau wie von Anfang an auf den nicht strukturierten Bereichen der Zellsubstrate zu beobachten ist.

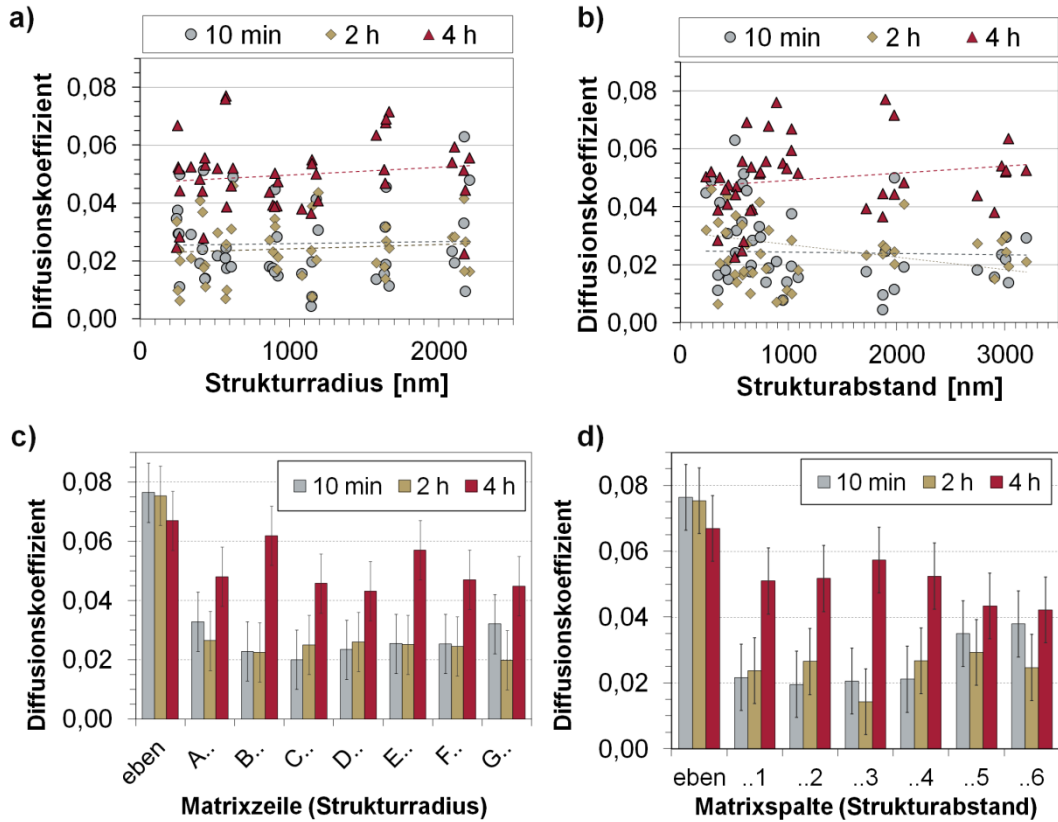


Abbildung 7-20 Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Strukturparameter

a) Abhängigkeit von Strukturabstand A, b) Abhängigkeit von Strukturradius R, c) gemittelt über die Zeilen der Variationsmatrix (gleicher Strukturradius), d) gemittelt über Spalten der Variationsmatrix (gleicher Strukturabstand). Alle Angaben in $[\mu\text{m}^2/\text{sec}]$.

Darüber hinaus zeigen die Auftragungen über die geometrischen Parameter keine signifikante Tendenz, die im Rahmen der Messgenauigkeit ($\Delta D = 0,01 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{sec}}$) eine bestimmte Strukturgeometrie gegenüber den anderen auszeichnet.

Die Auftragung der Diffusionskoeffizienten über den Kontaktwinkeln der einzelnen Zylinderfelder und die Einbeziehung der Werte für die nicht strukturierten Bereiche der Zellsubstrate ($\vartheta_{\text{PDMS}} = 105 \pm 5^\circ$) ist in Abbildung 7-21 gezeigt.

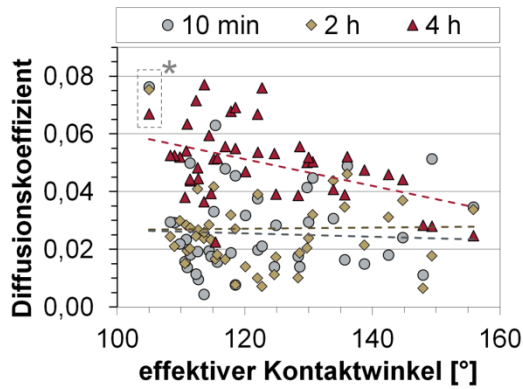


Abbildung 7-21 Abhängigkeit vom Benetzungsverhalten

Diffusionskonstanten in [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$]. Die Werte innerhalb des gestrichelten Kastens beziehen sich jeweils auf Messungen in den nicht-strukturierten Bereichen mit $\theta_{\text{PDMS}} \approx 105 \pm 5^\circ$.

Wie die in der Abbildung eingezeichneten Trendlinien zeigen, sind die durchschnittlichen Zelldiffusionskoeffizienten innerhalb der strukturierten Bereiche zunächst (nach 10 min und 2) deutlich gegenüber denen der nicht strukturierten Bereiche verringert.

Nach vier Stunden Inkubationszeit gleichen sich die Diffusionskonstanten der Zellen in den strukturierten Bereichen mit nur leicht höheren Kontaktwinkeln dem Wert für den

unstrukturierten Bereich an. Mit zunehmend größerem, effektiven Kontaktwinkel nimmt allerdings auch nach 4h der beobachtete Diffusionskoeffizient der Zellen ab. Für Strukturen mit einem Kontaktwinkel größer 140° bleiben die gemessenen Diffusionskoeffizienten auch nach 4h Inkubationszeit deutlich gegenüber dem Wert des unstrukturierten PDMS reduziert.

Es bestätigt sich somit die Hypothese, dass die Substratstrukturen die diffusive Bewegung der Zellen beeinträchtigen. Demnach kommt es gleich zu Beginn der Inkubation, d. h. mit Einlegen der Zellsubstrate in die Zellsuspension, zu einer Beeinflussung der Zelldiffusion innerhalb der strukturierten Substratbereiche. Die Verweilzeit der Zellen innerhalb der strukturierten Bereiche steigt und es lagern sich im Rahmen der allmählichen Sedimentation der Zellen auf den Substratoberflächen mehr Zellen in den Zylinderfeldern ab, als in den nicht strukturierten Bereichen. Dies erklärt den in Abbildung 7-17 gezeigten Unterschied zwischen den strukturierten Bereichen der Zellsubstrate und der nicht strukturierten Umgebung, der den oben genannten Betrachtungen zufolge, mit dem Benetzungsverhalten korreliert zu sein scheint.

Bei längerer Inkubationszeit und damit steigender Zellzahl verliert, wie in Abbildung 7-21 gezeigt ist, der Beitrag der Substratstrukturen an Bedeu-

tung, sofern sich durch diese nur eine kleine Änderung des effektiven Kontaktwinkels ergibt.

Für strukturierte Bereiche mit hohen, effektiven Kontaktwinkeln, d.h. hydrophobem Charakter, bleiben die gemessenen Zell-Diffusionskoeffizienten auch 4h nach dem Beginn der Inkubation reduziert. Diese Beobachtung deutet auf eine stärkere Wechselwirkung der Zellen mit den hydrophob wirkenden Oberflächen hin.

Interessanterweise konnte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beobachtet werden, dass sich dadurch die Zellzahl in den Bereichen mit hohem, effektivem Kontaktwinkel nach 4h Inkubationszeit signifikant von der Zellzahl in den nicht strukturierten Bereichen unterschied. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich während der Inkubationszeit immer wieder auch Zellen bzw. Zellcluster aus dem Flüssigkeitsvolumen oberhalb der Zellsubstrate an der Oberfläche ablagern. Diese Ablagerung ist im Wesentlichen unabhängig von den Verhältnissen an der Substratoberfläche und hauptsächlich durch die Zellzahl im gesamten Flüssigkeitsvolumen bestimmt. Wie in Abbildung 7-17 qualitativ für die Zellsubstrate nach vier Stunden Inkubationszeit gezeigt ist, verschwinden daher mit zunehmender Inkubationsdauer/Zellzahl in der Suspension auch die Unterschiede in der Zellbedeckung an der Oberfläche.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, Methoden und Strukturen zu entwickeln, mit deren Hilfe sich neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungsmechanismen von Zellen und Materialoberflächen gewinnen lassen. Der Fokus der Untersuchungen wurde dabei auf drei Aspekte der Wechselwirkung prokaryotischer Zellen mit Materialoberflächen gelegt, da für diesen Bereich ein großes Potenzial zur Bearbeitung mikrobiologischer Fragestellungen mithilfe von Methoden der Mikrostrukturtechnik identifiziert wurde.

Die drei untersuchten Fragestellungen umfassten die Quantifizierung mikrobieller Kräfte bei der Adhäsion an Materialoberflächen, Experimente zum Einfluss von Mikrostrukturen auf die Zellausrichtung sowie die Bedeutung des Benetzungsverhaltens von Substratoberflächen für die Zell-Material-Wechselwirkung.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde zunächst ein einheitliches Konzept für mikrostrukturierte Zellsubstrate entwickelt, die sich zur Untersuchung der identifizierten Fragestellungen an mikrobiellen Modellorganismen eignen. Basierend auf diesem Konzept wurde unter Verwendung und Optimierung von Methoden der Mikrostrukturtechnik ein Verfahren zur Herstellung dieser Zellsubstrate ausgearbeitet.

Im Hinblick auf die quantitative Erfassung mikrobieller Adhäsionskräfte wurde, in Erweiterung von bestehenden Arbeiten zur Erfassung zellulärer Kräfte mithilfe von Elastomersubstraten, eine geeignete Mess- und Präparationsmethodik entwickelt und an einem mikrobiellen Modellorganismus, dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, getestet. Hiermit konnten die mittleren Adhäsionskräfte des Bakteriums quantifiziert und gezeigt werden, dass diese in derselben Größenordnung wie bei Eukaryoten liegen (siehe [Nil11]).

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Zellausrichtung durch die Vorstrukturierung von Zellsubstraten wurde eine eigene Messmethodik zur statistischen Erfassung von Zellausrichtungen auf mikrostrukturierten Substraten mithilfe des Rasterelektronenmikroskops entwickelt. Ergänzende

Experimente zur Zellausrichtung wurden an einem weiteren mikrobiellen Modellorganismus, dem Bakterium *BoFeN1*, durchgeführt.

Für Experimente zur Rolle des Benetzungsverhaltens für die Zell-Material-Wechselwirkung wurden Zellsubstrate erstellt, auf deren Oberfläche mit Methoden der Mikrostrukturierung eine lokale Variation des Benetzungsverhaltens erzeugt wurde. Weiterhin wurde eine Messmethodik, basierend auf der fluoreszenzmikroskopischen Erfassung der Zelldiffusion, erarbeitet. In Wachstumsexperimenten mit *Staph. aureus* konnte so gezeigt werden, dass eine lokale Erhöhung der Zellkonzentration in den mikrostrukturierten Bereichen der Zellsubstrate auf eine verminderte Zelldiffusion und damit evtl. einer stärkeren Wechselwirkung der Zellen mit den strukturierten Teilen des Substrats zurückzuführen ist. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass die Verminderung der Diffusionskonstante mit dem Benetzungsverhalten (ausgedrückt in Form des effektiven Kontaktwinkels) korreliert ist, da insbesondere Bereiche mit hohen, effektiven Kontaktwinkeln, d.h. hydrophoberem Charakter, auch nach bis zu 4h Inkubationszeit noch eine deutlich reduzierte Zelldiffusion aufweisen.

Während die Elastomerstrukturen zu Kraftmessung die bislang erste Möglichkeiten darstellen, um mikrobielle Kräfte an ungestört gewachsenen Zellkulturen zu ermitteln, zeigen die im Rahmen dieser Arbeit ausgearbeiteten Experimente zur Rolle der Substrattopographie auf Zellausrichtung sowie Biokolonisierung, wie sich mit den Methoden der Mikrostrukturierung auf einem einzelnen Zellsubstrat zahlreiche Umgebungen mit lokal variierten physikalischen Parametern integrieren und detailliert untersuchen lassen. Dieser Ansatz der „Variationsmatrizen“ bietet umfangreiche Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen zu den physikalischen Parametern der Zell-Material-Wechselwirkung.

Es wurde anhand der in dieser Arbeit erarbeiteten Konzepte gezeigt, dass die Methoden der Mikrostrukturierung das Feld herkömmlicher mikrobiologischer Untersuchungen sinnvoll ergänzen und erweitern können. Diese eröffnen, wie hier an einigen Beispielen gezeigt werden konnte, neue und innovative Wege und Ansätze um aktuelle und zukünftige Fragestellungen der Zell-Material-Wechselwirkung zu untersuchen, oder kurz zusammenge-

fasst, das eingangs erwähnte Motto: „*Microfabrication meets microbiology*“ mit Leben zu erfüllen.

Danksagung

Als Herr Professor Kern mir die Chance gab, mich mit „Methoden und Strukturen zur Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung“ zu befassen, begann für mich eine ungemein spannende Zeit, in der ich eine für mich bis dato vollkommen neue Facette der Physik an der Schnittstelle zur Mikrobiologie kennenlernen durfte. Dieses „Kennenlernen“ wurde mir durch vielfältige fachübergreifende Kontakte wesentlich erleichtert und die geschilderten Experimente wären ohne Rat und Tat einer ganzen Reihe von Personen nur schwer möglich gewesen. Ich danke...

- ...Prof. Dr. Dieter P. Kern für das Vertrauen, die Unterstützung und die Freiheiten, die er mir für die Anfertigung dieser Arbeit zukommen ließ.
- ...Prof. Dr. Andreas Peschel und seinen Mitarbeitern für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die Unterstützung meiner Ideen mit Rat, tatkräftiger Hilfe und nicht zuletzt einigen Millionen Staphylokokken aus seinem Labor.
- ...Prof. Dr. Andreas Kappler und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei den Experimenten mit *BoFeN1*.
- ...Dr. Nadine Göhring (AG Peschel) für Einweisung, Hilfe und gute Unterhaltung bei oft stundenlanger Bakterienzucht.
- ...Ronny Löffler (AG Kern) für intensive Diskussionen rund um Zellen, sowie die immer gute Stimmung bei vielen Stunden akademischer und handwerklicher Arbeiten an Plasmaätzen und Elektronenstrahl-Schreibern.
- ...Ralf Stiefel und Bertram Herzog für Ihre unersetzliche Hilfe im Labor und stets die richtigen Werkzeuge, Ätzrezepte oder Kommentare für jede noch so festgefressene Schraube.
- ...allen übrigen Kollegen/innen des Instituts für offene Türen, ein tolles Arbeitsklima („Kaffee? Sudoku!“) und eine Menge schöner Erinnerungen.

Diese Liste ließe sich noch seitenweise fortsetzen. Abschließend möchte ich aber noch drei Personen ganz besonders hervorheben.

Von Herzen „Danke“ ...

- ...meinen Eltern für die Bestärkung, mich dieses Themas anzunehmen und den Rückhalt, den sie mir während dieser drei Jahre immer wieder gegeben haben.
- ...meiner Frau Kerstin für Ihre Geduld, wenn ich mal wieder erst nachts aus dem Labor kam und vor allem für Ihr sonniges Gemüt, das mir mehr als einmal Licht am Ende so manch (experimentellen) Tunnels war.

Literaturverzeichnis

- [Abu03] N.I. Abu-Lail und T.A. Camesano, *Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy*, J. Microscopy **21** S. 217-238 (2003)
- [Adl75] J. Adler, *Chemotaxis in Bacteria*, Ann. Rev. Biochem. **44** S. 341-356 (1975)
- [Alb10] B. Alberts et al., *Essential Cell Biology*, Garland Science, New York, 3. Auflage (2010)
- [An95] Y. An et al., *Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy*, J. Microbiol. Meth. **24** S. 29-40 (1995)
- [An98] Y. An, R.J. Friedman, *Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces*, J. Biomed. Mater. Res. **43**, S. 338-348 (1998)
- [Arn08] M. Arnold et al., *Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing*, Nano Lett. **8**, S. 2063–2069 (2008)
- [Bal01] N.Q. Balaban et al., *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates*, Nat. Cell Biol. **3** S. 466-472 (2001)
- [Ben02] K.A. Beningo und Y.-L. Wang, *Flexible substrata for the detection of cellular traction forces*, TRENDS Cell Biol. **12** S. 79-84 (2002)
- [Bic02] J. Bico et al., *Wetting of textured surfaces*, Coll. and Surf. A **206**, S. 41-46 (2002)
- [Bin86] G. Binnig, C.F. Quate und C. Gerber, *Atomic Force Microscope*, Phys. Rev. Lett. **56**, S. 930-933 (1986)
- [Bra93] D.F. Bray et al., *Comparison of Hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri 11, and Critical-Point Drying Methods for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens*, Microsc. Res. Tech. **26**, S. 489-495 (1993)
- [Bro28] R. Brown, *A brief account of microscopical observations [...] on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies*, Phil. Mag. **4**, 161–173, (1828)
- [Bur10] M. Burian et al., *Temporal Expression of Adhesion Factors and Activity of Global Regulators during Establishment of Staphylococcus aureus Nasal Colonization*, J. Infect. Dis. **201**, S. 1414-1421 (2010)
- [Bus87] H.J. Busscher und A.H. Weerkamp, *Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata*, FEMS Microbiology Letters **46**, S. 165-173 (1987)
- [Car06] M.L. Carman et al., *Engineered antifouling microtopographies – correlating wettability with cell attachment*, Biofouling **22**, S. 11 -21 (2006)
- [Cas44] A.B.D. Cassie und S. Baxter, *Wettability of porous surfaces*, Trans. Faraday Soc. **40**, S. 546-551 (1994)

- [Cav07] E.A. Cavalcanti-Adam et al., *Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands*, Biophys. J. **92**, S. 2964-2974 (2007)
- [Chu07] K.K. Chung et al., *Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of Staphylococcus aureus*, Biointerphases **2**, S. 89-94 (2007)
- [Dal07] M.J. Dalby et al., *The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder*, Nature Mat. **6**, S.997-1003 (2007)
- [Daw08] E. Dawson et al., *Biomaterials for stem cell differentiation*, Adv. Drug Deliv. Rev. **60**, S.215-228 (2008)
- [Day01] A.D. Dayan und A.J. Paine, *Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000*, Human Exp. Toxicol. **20**, S. 439-451 (2001)
- [Dit06] P.S. Dittrich und A. Manz, *Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery*, Nat. Rev. Drug Disc. **5**, S. 210-218 (2006)
- [Doo96] R.F. Doolittle et al., *Determining Divergence Times of the Major Kingdoms of Living Organisms with a Protein Clock*, Science **271**, S. 470-477 (1996)
- [Ech09] P. Echlin, *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Analysis*, 1. Ed. S. 95-185, Springer Business+Media, New York (2009)
- [Ein05] A. Einstein, *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*, Annalen der Physik **322**, S. 549–560 (1905)
- [Elz95] H. Elzanowska et al., *Bactericidal properties of hydrogen peroxide and copper or iron-containing complex ions in relation to leukocyte function*, Free Rad. Biol. Med. **18**, S. 437-449 (1995)
- [Eng06] A.J. Engler et al., *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*, Cell **126**, S. 677–689 (2009)
- [Eva09] N.D. Evans et al., *Substrate Stiffness affects early Differentiation Events in Embryonic Stem Cells*, Eu. Cells Mat. **18**, S. 1-14 (2009)
- [Fad11] E. Fadeeva et al., *Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation*, Langmuir **27**, S. 3012-3019 (2011)
- [Fic55] A. Fick, *Über Diffusion*, Annalen der Physik **170**, S. 59-86 (1855)
- [Fin02] J.A. Finlay, *The Influence of Surface Wettability on the Adhesion Strength of Settled Spores of the Green Alga Enteromorpha and the Diatom Amphora*, Integr. Comp. Biol. **42**, S. 1116-1122 (2002)
- [Fle79] M. Fletcher und G.I. Loeb, *Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to Solid Surfaces*, Appl. Environ. Microbiol. **37**, S. 67-72 (1979)
- [Fos98] T.J. Foster, M. Höök *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*, Trends Microbiol. **6**, S. 484-488 (1998)
- [Gal97] C.B. Galbraith und M.P. Sheetz, *A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces*, Proc. Natl. Acad. Sci. **94**, S. 9114-9118 (1997)

- [Gan94] W. Gander et al., *Least-Squares fitting of Circles and Ellipses*, BIT Numerical Math. **34**, S. 558-578 (1994)
- [Gan06] A. Ganz et al., *Traction forces exerted through N-cadherin contacts*, Biol. Cell **98**, S. 721–730 (2006)
- [Gei01] B. Geiger et al., *Transmembrane Extracellular Matrix–Cytoskeleton Crosstalk*, Nat. Mol. Cell Biol. **2**, S. 793-805 (2001)
- [Gha08] S. Ghassemi et al., *Fabrication of elastomer pillar arrays with modulated stiffness for cellular force measurements*, J. Vac. Sci. Tech. B **26**, S. 2549-2553 (2008)
- [Gha09] S. Ghassemi et al., *Gold-tipped elastomeric pillars for cellular mechanotransduction*, J. Vac. Sci. Tech. B **27**, S. 3088-3091 (2009)
- [Gra98] D. Granchi et al., *Cell death induced by metal ions: necrosis or apoptosis?*, J. Mat. Sci: Mat. in Med. **9**, S. 31-37 (1998)
- [Gri87] A.G. Gristina, *Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration*, Science **237**, S. 1588-1595 (1987)
- [Guo07] L.J. Guo, *Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements*, Adv. Mater. **19**, S. 495-513 (2007)
- [Haa03] K.-H. Haas, K. Rose, *Hybrid inorganic/organic polymers with nanoscale building blocks [...]*, Rev. Adv. Mater. Sci. **5**, S. 47-52 (2003)
- [Har80] A.K. Harris et al., *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*, Science **208**, S. 177-179 (1980)
- [Hir01] K. Hiramatsu, *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*, Lancet Infect. Dis. **1**, S. 147-155 (2001)
- [Hog83] H. Hogt et al., *Adhesion of Coagulase-negative Staphylococci to Biomaterials*, J. Gen Microbiol. **129**, 2959-2968 (1983)
- [Hor07] I. Horcas et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*, Rev. Sci. Instr. **78**, Nr. 013705 (2007)
- [Jan96] H. Jansen et al., *A survey on the reactive ion etching of silicon in microtechnology*, J. Micromech. Microeng **6**, S. 14-28 (1996)
- [Jia04] F. Jiang et al., *Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes*, J. Struct. Biol. **148**, S. 268–278 (2004)
- [Joy94] G.F. Joyce, Vorwort zu D.W. Deamer, G.R. Fleischaker (Hrsg.), *Origins of Life: The Central Concepts*, Jones & Bartlett, Boston, S. xi–xii (1994)
- [Kap05] A. Kappler, B. Schink und K. Newman, *Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1*, Geobiol. **3**, S. 235-245 (2005)
- [Kha09] K. Khanafer et al., *Effects of strain rate, mixing ratio, and stress–strain definition on the mechanical behavior of the polydimethylsiloxane (PDMS) material as related to its biological applications*, Biomed. Microdev. **11**, S. 503-508 (2009)
- [Kot02] G. Kotzara et al., *Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices*, Biomaterials **23**, S. 2737-2750 (2002)
- [Kro91] K.A. Krogfelt, *Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of Escherichia coli*, Rev. Infect. Dis. **13**, S.721-735 (1991)

- [Kwo99] D.Y. Kwok und A.W. Neumann in A.J. Dekker (Hrsg.), *Surface Characterization Methods*, **87**, 1. Auflage, Marcel Dekker Inc., New York, S. 48-50 (1999)
- [Lan87] L.D. Landau, E.M. Lifschitz, *Lehrbuch der Theoretischen Physik VII – Elastizitätstheorie*, 6. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin, (1987)
- [Lem05] C.A. Lemmon et al., *Shear Force at the Cell-Matrix Interface: Enhanced Analysis for Microfabricated Post Array Detectors*, *Med. Chem. Biosyst.* **2**, S. 1-16 (2005)
- [Lem09] C.A. Lemmon et al., *Cell Traction Forces Direct Fibronectin Matrix Assembly*, *BioPhys. J.* **96**, S. 729-738 (2009)
- [Lid04] D.R. Lide (Hrsg.), *CRC Handbook Of Chemistry And Physics*, 85. Auflage, CRC Press LLC, S. 6-53 (2004)
- [Lin81] M. Lindahl, *A new test based on 'salting out' to measure relative hydrophobicity of bacterial cells*, *Biochim. Biophys. Acta* **677**, S.471-476 (1981)
- [Low00] S.K. Lower et al., *Measuring interfacial and adhesion forces between bacteria and mineral surfaces with biological force microscopy*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **64**, S. 3133–3139 (2000)
- [Low98] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus infections*, *N. Engl. J. Med.* **339**, S.520-532 (1998)
- [Lui98] P.L. Luisi, *About Various Definitions of Life*, *Orig. Life Evol. Biosph* **28**, S. 613–622 (1998)
- [Lut05] M.P. Lutolf und J.A. Hubbel, *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*, *Nature Biotechnol.* **23**, S. 47-55 (2005)
- [Mal02] L. Malaquin et al., *Using polydimethylsiloxane as a thermocurable resist for a soft imprint lithography process*, *Microelectron. Eng.* **61-62**, S. 379-284 (2002)
- [Mar71] K.C. Marshall et al., *Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces*, *Microbiology* **68**, S. 337-348 (1971)
- [Mar98] W. Martin, M. Müller, *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*, *Nature* **392**, 37-41 (1998)
- [McD02] J.C. McDonald und G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices*, *Acc. Chem. Res.* **35**, S. 491-499 (2002)
- [McN10] L.E. McNamara et al., *Nanotopographical Control of Stem Cell Differentiation*, *J Tissue Eng.* **2010**, 120623 (2010)
- [Mel78] C.M. Melliar-Smith, C.J. Mogab in J.L. Vossen, W. Kern (Hrsg.), *Thin Film Processes*, Academic Press, New York, 1. Auflage, S. 497-551 (1978)
- [Min01] J.J. Minguell et al., *Mesenchymal Stem Cells*, *Exp. Biol. Med.* **226**, S. 507-520 (2001)
- [Mir02] K. Ruiz-Mirazo, J. Peretó und Alvaro Moreno, *A Universal Definition of Life: Autonomy and Open-Ended Evolution*, *Org. Life Evol. Biosph* **34**, S. 323-346 (2002)

- [Moh05] C. Mohrdieck et al., *A Theoretical Description of Elastic Pillar Substrates in Biophysical Experiments*, Chem. Phys. Chem. **6**, S. 1492-1498 (2005)
- [Mor05] J.R. Morones et al., *The bactericidal effect of silver nanoparticles*, Nanotechnol. **16**, S. 2346–2353 (2005)
- [Mur08] A. Muralimohan et al., *Dissecting microbiological systems using materials science*, Trends Microbiol., **17**, S. 100-108 (2008)
- [Nan07] JPK NanoWizard II, *Benutzerhandbuch*, JPK Instruments AG, Berlin (2007)
- [Nel08] P. Nelson, *Biological Physics*, W.H. Freeman & Co, New York, 1. erw. Auflage (2008)
- [Nil11] P. Nill et al., *Studying bacterial adhesion forces: Staphylococcus aureus on elastic poly(dimethyl)siloxane substrates*, Microelectron. Eng. **88**, S. 1825-1827 (2011)
- [Nil11a] P. Nill et al., *The influence of surface patterning on bacterial growth behavior*, J. Vac. Sci. Technol. B **26**, S. 06FA03 - 06FA03-5 (2011)
- [Nob97] W.C. Noble, *Antibiotic resistance in the staphylococci*, Sci. Prog. **80**, S. 5-20 (1997)
- [Oli95] T. Oliver et al., *Traction forces in locomoting cells*, Cell Motil. Cytoskeleton **331**, S. 225-240 (1995)
- [Ors77] D. Orstavik, *Sorption of Streptococcus faecium to glass*, Acta Pathol. Microbiol. Scand. **85B**, S. 38-46 (1977)
- [Pel99] R.J. Pelham jr. und Y.-L. Wang, *High Resolution Detection of Mechanical Forces Exerted by Locomoting Fibroblasts on the Substrate*, Mol. Biol. Cell **10**, S. 935-945 (1999)
- [Que02] D. Quéré, *Rough ideas on wetting*, Physica A **313**, S. 32-46 (2002)
- [Qui93] M. Quirynen, *An in vivo Study of the Influence of the Surface Roughness of Implants on the Microbiology of Supra- and Subgingival Plaque*, J. Dent. Res. **72**, S. 1304-1309 (1993)
- [Ric84] S.R. Richards und R.J. Turner, *A comparative study of techniques for the examination of biofilms by Scanning Electron Microscopy*, Water Res. **18**, S. 767-773 (1984)
- [Rou05] O. du Roure et al., *Force mapping in epithelial cell migration*, Proc. Natl. Acad. Sci. **102**, S. 2390-2395 (2005)
- [Sch10] I. Schoen et al., *Probing Cellular Traction Forces by Micropillar Arrays: Contribution of Substrate Warping to Pillar Deflection*, Nano Lett. **10**, S. 1823-1830 (2010)
- [Sel10] C. Selhuber-Unkel et al., *Cooperativity in Adhesion Cluster Formation during Initial Cell Adhesion*, Biophys J. **95**, S. 5424–5431 (2010)
- [Shi96] S. Shibuichi et al., *Super Water-Repellent Surfaces Resulting From Fractal Structure*, J. Phys. Chem. **100**, S. 19512-19517 (1996)
- [Sin04] P. Singleton, *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, J. Wiley & Sons, Chichester, 6. Auflage (2004)
- [Son05] J. Song et al., *Elastic Property of Vertically Aligned Nanowires*, Nano Lett. **5**, S. 1954-1958 (2005)

- [Ste55] R.L. Stearman, *Statistical Concepts in Microbiology*, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **19**, S. 160-215 (1955)
- [Sul09] O. Sul et al., *Step-edge calibration of torsional sensitivity for lateral force microscopy*, Meas. Sci. Technol. **20**, 115104 (2009)
- [Syl08] Sylgard® 184 Silicone Elastomer, Datenblatt, Dow Corning USA (2008)
- [Tan03] J. Tan et al., *Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force*, Proc. Natl. Acad. Sci. **100**, S. 1484-1489 (2003)
- [Tay02] P.W. Taylor, P.D. Stapleton, J.P. Luzio, *New ways to treat bacterial infections*, Drug Discov. Today. **7**, S. 1086-1091 (2002)
- [Tri11] S.J. Trietsch, T. Hankemeier, H.J. van der Linden, *Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review*, Chemometr. Intell. Lab. Sys. **108**, S. 64-75 (2011)
- [Tsi98] R.Y. Tsien, *The Green Fluorescent Protein*, Annu. Rev. Biochem. **67**, S. 509-544 (1998)
- [Wan01] H.B. Wang et al., *Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration*, Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, S.11295-11300 (2001)
- [Wei07] D.B. Weibel, W.R. DiLuzio und G.M. Whitesides, *Microfabrication meets microbiology*, Nat. Rev. **5**, S. 209-218 (2007)
- [Wen36] R.N. Wenzel, *Resistance of solid surfaces to wetting by water*, Ind. Eng. Chem. **28**, S. 989-994 (1936)
- [Wes83] G. Westergren, J. Olsson, *Hydrophobicity and Adherence of Oral Streptococci After Repeated Subculture In Vitro*, Infect. Immunol. **40**, S. 432-435 (1983)
- [Wil96] K.R. Williams, R.S. Muller, *Etch Rates for Micromachining Processing*, J. Microelectromech. Sys. **5**, S. 256-269 (1996)
- [Wol00] S. Wolf und R.N. Tauber, *Silicon processing for the VLSI era*, Bd. 1: *Process Technology*, Lattice Press, Sunset Beach, 2. Auflage (2000)
- [Yim05] E.K.F. Yim, *Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells*, Biomaterials **26**, S. 5405–5413 (2005)
- [You05] T. Young, *An Essay on the Cohesion of Fluids*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. **95**, S.65-87 (1805)
- [Zob43] C.E. Zobell, *The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity*, J. Bacteriol. **46**, S.39-56 (1943)

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1 Veröffentlichungen zu Mikrobiologie und Strukturtechnik | 12 |
| Abbildung 2-1 Maßstabsgetreue Zeichnung einiger Zelltypen | 14 |
| Abbildung 2-2 Zeitliche Entwicklung von Prokaryoten und Eukaryoten | 15 |
| Abbildung 2-3 Kopplung von Membranproteinen | 17 |
| Abbildung 2-4 Erfassung von Adhäsionskräften mit dem Rasterkraftmikroskop..... | 20 |
| Abbildung 2-5 Elastische Substrate zur Messung von zellulären Kräften | 22 |
| Abbildung 2-6 Zylindersubstrate zur Messung von Zellkräften..... | 23 |
| Abbildung 2-7 Verbindung von mPADs mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie..... | 24 |
| Abbildung 2-8 Phasen der mikrobiellen Adhäsion an Oberflächen | 25 |
| Abbildung 4-1 Basiseinheit von PDMS | 36 |
| Abbildung 4-2 Grundlegender Entwurf der Zellsubstrate..... | 37 |
| Abbildung 5-1 Staphylococcus aureus im Rasterelektronenmikroskop..... | 41 |
| Abbildung 5-2 Layout der Zellsubstrate zur Kraftmessung..... | 43 |
| Abbildung 5-3 Erzeugung der Oberflächentopographien auf Vergussrohlingen. | 44 |
| Abbildung 5-4 Oberflächenfunktionalisierung der Vergussformen | 45 |
| Abbildung 5-5 Herstellung von Oberflächentopographien in PDMS..... | 46 |
| Abbildung 5-6 REM-Aufnahmen eines PDMS-Zellsubstrats zur Kraftmessung | 47 |
| Abbildung 5-7 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrix..... | 47 |
| Abbildung 5-8 Zusammenhang zwischen Elastizitätsmodul und Mischungsverhältnis der PDMS-Komponenten | 49 |
| Abbildung 5-9 Steifigkeit eines Zylinders gemäß der Balkentheorie | 49 |
| Abbildung 5-10 Nichtideale Einflüsse auf die elastischen Eigenschaften der Elastomerstrukturen | 50 |
| Abbildung 5-11 Bestimmung der elastischen Eigenschaften der Elastomerstrukturen | 53 |
| Abbildung 5-12 Line scans der Kontakt-Messung über PDMS-Strukturen..... | 56 |
| Abbildung 5-13 Lineare Extrapolation der Messdaten | 58 |
| Abbildung 5-14 Zeitliche Entwicklung der Zellzahl während der Inkubation..... | 59 |
| Abbildung 5-15 Phasendiagramm von CO ₂ | 61 |
| Abbildung 5-16 Auswirkungen der Trocknungsmethodik | 61 |
| Abbildung 5-17 Strukturhaltung nach Kritisch-Punkt-Trocknung..... | 62 |
| Abbildung 5-18 Artefaktstrukturen durch den Einsatz von 100 % Ethanol. | 63 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 5-19 Artefaktstrukturen, verursacht durch das Nährmedium | 64 |
| Abbildung 5-20 Erfassung der Zylinderauslenkungen | 65 |
| Abbildung 5-21 Staph. aureus auf PDMS: Typische REM-Aufnahmen..... | 66 |
| Abbildung 5-22 Darstellung der Adhäsionskräfte auf den Zellsubstraten..... | 68 |
| Abbildung 6-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums BoFeN1 | 71 |
| Abbildung 6-2 Zellsubstrate zur Untersuchung strukturinduzierter Zellausrichtung | 73 |
| Abbildung 6-3 Umrandung der Substratstrukturen | 73 |
| Abbildung 6-4 Herstellung eines Vergussrohlings mit Umrandung | 74 |
| Abbildung 6-5 REM-Aufnahmen der PDMS-Zellsubstrate zur Untersuchung strukturinduzierter Zellausrichtung | 77 |
| Abbildung 6-6 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrizen..... | 78 |
| Abbildung 6-7 BoFeN1-Zellkulturflaschen nach dem Transport ans Institut für Angewandte Physik..... | 79 |
| Abbildung 6-8 Experimentelles Vorgehen zur Bestimmung der Zellausrichtung..... | 81 |
| Abbildung 6-9 Schema zur Erfassung der Zellausrichtung..... | 82 |
| Abbildung 6-10 Zellsubstrate nach Inkubation in unterschiedlichen Kulturmedien | 83 |
| Abbildung 6-11 Eisenablagerungen auf einigen der BoFeN1-Zellsubstraten..... | 84 |
| Abbildung 6-12 Zellen, präpariert ohne und mit zusätzlichem Fixierschritt | 84 |
| Abbildung 6-13 Mittlere Zellausrichtung in Abhängigkeit von den Strukturgeometrien | 85 |
| Abbildung 6-14 Mittlere Zellausrichtung in Abhängigkeit von den Strukturgeometrien | 86 |
| Abbildung 7-1 Kontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens auf einer glatten Oberfläche | 90 |
| Abbildung 7-2 Kontaktwinkel auf einer rauen Oberfläche nach Wenzel..... | 91 |
| Abbildung 7-3 Kontaktwinkel auf einer porösen Oberfläche nach Cassie und Baxter. | 92 |
| Abbildung 7-4 Kontaktwinkel bei Dochtwirkung nach Quéré und Bico. | 92 |
| Abbildung 7-5 Messaufbau zur Kontaktwinkelmessung | 94 |
| Abbildung 7-6 Zeitliche Entwicklung der Dichtefunktion nach Gl. (7.9). | 95 |
| Abbildung 7-7 Experimentelle Bestimmung der Diffusionskonstante | 97 |
| Abbildung 7-8 Entwurf der Zellsubstrate..... | 101 |
| Abbildung 7-9 Umrandung der Substratstrukturen | 101 |
| Abbildung 7-10 Mittlere Strukturparameter innerhalb der Variationsmatrizen..... | 103 |
| Abbildung 7-11 Kontaktwinkel an ebenen PDMS-Oberflächen. | 104 |
| Abbildung 7-12 Kontaktwinkel strukturierter PDMS-Oberflächen | 105 |
| Abbildung 7-13 Kontaktwinkelvariation des strukturierten PDMS-Substrats | 107 |
| Abbildung 7-14 Entnahme der Zellsubstrate nach der Inkubation..... | 108 |
| Abbildung 7-15 Fluoreszenzmikroskopischen Sichtung der Zellsubstrate | 109 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 7-16 Experimentelle Erfassung der Zelltrajektorien | 110 |
| Abbildung 7-17 Qualitative Sichtung der Substratfelder G1 und G2 | 112 |
| Abbildung 7-18 Bestimmung der effektiven Zelldiffusionskonstanten | 114 |
| Abbildung 7-19 Zelldiffusionskoeffizienten innerhalb der Zylinderfelder | 115 |
| Abbildung 7-20 Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Strukturparameter..... | 117 |
| Abbildung 7-21 Abhängigkeit vom Benetzungsverhalten | 118 |
| Abbildung A-1 Prinzipskizze zum Unterschied zwischen nasschemischen und Trockenätzprozessen | 139 |
| Abbildung A-2 RIE an Siliziumoxid | 140 |
| Abbildung A-3 Definition des Flankenwinkels ϑ | 142 |
| Abbildung A-4 Zeitreihe des herkömmlichen Ätzrezepts A..... | 142 |
| Abbildung A-5 Variation des Anteils von Trifluormethan in Ätzrezept A | 143 |
| Abbildung A-6 Variation des Anteils von Sauerstoff in Ätzrezept A..... | 143 |
| Abbildung A-7 Zeitlicher Verlauf des Ätzvorgangs mit dem optimierten Rezept A_{opt} | 145 |
| Abbildung A-8 Zeitlicher Verlauf des Ätzvorgangs mit Rezept B..... | 146 |
| Abbildung A-9 RIE von Siliziumoxid: Optimierung der Ätz-Anisotropie | 147 |
| Abbildung A-10 Stufenbildung durch die Verwendung zweier Ätzmasken..... | 149 |
| Abbildung A-11 Lebensdauer der Aluminium Ätzmaske | 150 |
| Abbildung B-1 Funktionsprinzip einer AFM-Messung..... | 151 |
| Abbildung B-2 AFM-Kraftkennlinie zur Bestimmung der vertikalen Sensitivität | 153 |
| Abbildung B-3 Torsion des AFM-Cantilevers durch Gleitreibung beim lateralen Scan | 155 |
| Abbildung B-4 Kräfte am AFM während eines lateralen Scans | 156 |
| Abbildung B-5 Cantilever-Torsion bei lateralen Scans des AFMs | 158 |
| Abbildung B-6 Skizze und REM-Aufnahmen eines AFM-Cantilevers | 159 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 5.1 Effektive Steifigkeiten der PDMS-Strukturen nach Gl. (5.3) | 50 |
| Tabelle 5.2 Korrektur der Struktursteifigkeiten nach Gl. (5.5) | 52 |
| Tabelle 5.3 Experimentell bestimmte Steifigkeiten der PDMS-Strukturen. | 57 |
| Tabelle 5.4 Effektive Steifigkeiten, ermittelt aus den AFM-Messungen. | 58 |
| Tabelle A.1 Prozessparameter Ätzrezept A..... | 142 |
| Tabelle A.2 Prozessparameter Ätzrezept A _{opt} | 145 |
| Tabelle A.3 Prozessparameter Ätzrezept B..... | 146 |
| Tabelle B.1 Kalibrierung des AFM-Torsionssignals – Exp. Daten | 157 |
| Tabelle C.1 Geometrieparameter der Zellsubstrate für Kraftmessungen..... | 161 |
| Tabelle C.2 Geometrieparameter der Zylinderstrukturen | 162 |
| Tabelle C.3 Geometrieparameter der Lochstrukturen | 163 |
| Tabelle D.1 Verwendete Anlagen | 165 |
| Tabelle D.2 Verwendete Prozessgase..... | 165 |
| Tabelle D.3 Verwendete Chemikalien..... | 166 |

Anhang

A Reaktives Ionenätzen von Siliziumoxid

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Proben für zellbiologische Experimente erfordert einen Ätzprozess, mit dessen Hilfe sich topographische Strukturen in Vergussformen aus Siliziumdioxid übertragen lassen.

Ein nasschemischer Ätzprozess scheidet aufgrund der räumlich isotropen Ätzrate eines solchen Ansatzes aus, da das hohe Aspektverhältnis der herzustellenden Strukturen so nicht gewährleistet werden kann (vgl. Abbildung A-1). Es wurde daher als Alternative ein Trockenätzprozess unter Verwendung fluorhaltiger Ätzgase entwickelt.

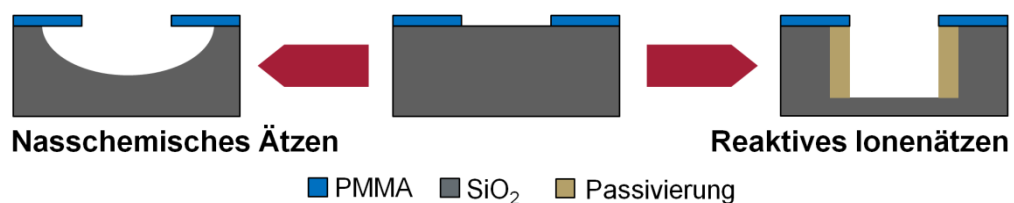


Abbildung A-1 Prinzipskizze zum Unterschied zwischen nasschemischen und Trockenätzprozessen

Für die Ätzversuche stand eine Anlage für reaktives Ionenätzen (engl. *Reactive Ion Etching*, kurz RIE) der Firma Oxford (Modell *Plasmalab 80+*) zur Verfügung. Es handelt sich dabei um einen wassergekühlten Parallelplattenreaktor zur Durchführung von Trockenätzprozessen in einem Hochfrequenzplasma.

Ausgehend von einem bereits in der Arbeitsgruppe bekannten Ätzrezept wird nachfolgend der grundlegende Mechanismus des Ätzens von Siliziumoxid mithilfe fluorbasierter RIE identifiziert, bevor in den Folgekapiteln auf die einzelnen Schritte zur Optimierung des bekannten Ätzprozesses eingegangen wird.

A.1 Reaktionsmechanismen

Im ursprünglichen Rezept für das Ätzen von Siliziumoxid kommen die Ätzgase *Trifluormethan* (CHF₃) und *Sauerstoff* (O₂) zum Einsatz. Die zu-

grundlegenden Mechanismen sind schematisch in Abbildung A-2 dargestellt. Sie erklären sich nach [Mel78] wie folgt:

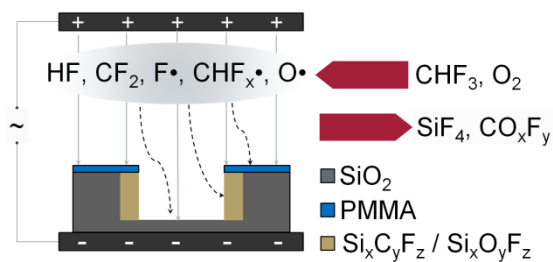


Abbildung A-2 RIE an Siliziumoxid

Schematische Darstellung des Ätzprozesses. Die Zeichnung basiert auf einer Abbildung aus [Jan96]

Freiliegendes Siliziumoxid wird innerhalb der Ätzkammer durch Fluorradikale und den entstehenden Fluorwasserstoff (HF) geätzt. Während der molekulare Sauerstoff in hochreaktive Sauerstoffradikale ($O\bullet$) dissoziiert.

Freiliegendes Siliziumoxid wird innerhalb der Ätzkammer durch Fluorradikale und den entstehenden Fluorwasserstoff (HF) geätzt. Über die Reaktion



entstehen dabei gasförmiges Tetrafluorsilan und Wasser.

Dieser rein chemische Ätzvorgang ist zunächst räumlich isotrop. Anisotropie wird durch die kohlenstoffhaltigen Nebenprodukte der Dissoziation von Trifluormethan (z. B. in CF_2) hervorgerufen.

Teils in Kombination mit dem ebenfalls vorhandenen Sauerstoff bilden sich Polymerverbindungen aus $\text{Si}_x\text{C}_y\text{F}_z$ bzw. $\text{Si}_x\text{O}_y\text{F}_z$ an der Oberfläche des Ätzguts. Die so entstehende Passivierungsschicht verhindert zunächst eine weitere chemische Zersetzung von Siliziumoxid. Durch Radikaleinfang (insbesondere der Sauerstoffradikale) beziehungsweise Ionenbombardement im Plasma der Ätzanlage wird die Schicht jedoch allmählich zerstört. Es bilden sich flüchtige Zersetzungsprodukte; die Oberfläche liegt wieder frei. Die Zersetzung erfolgt dabei primär an den Flächen, auf die Radikale und Ionen mit hoher Energie auftreffen, sodass in der Folge in diesen freigelegten Bereichen wieder durch die in Gleichung A.1 gegebene Reaktion Siliziumoxid geätzt werden kann. Es bildet sich also ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Passivierung und Zersetzung aus, das, bei geeig-

Durch das elektrische Feld innerhalb der Ätzanlage werden die eingeleiteten Gasmoleküle durch Elektronenstöße ionisiert und dissoziieren je nach Spezies; es bildet sich ein Plasma. Aus Trifluormethan entstehen dabei beispielsweise Fluorradikale

neten Wahl der Parameter, eine hohe Anisotropie des Ätzvorgangs und damit fast vertikale Ätzflanken erlaubt. Die erreichbare Ätztiefe ist dabei im Wesentlichen von der Resistenz der Ätzmaske gegenüber den Verbindungen innerhalb der Ätzanlage abhängig. Die Haltbarkeit der hier verwendeten, organischen Lacke wird dabei besonders durch die reaktiven Sauerstoffradikale gefährdet.

A.2 Charakterisierung und Optimierung der Ätzparameter

Um den gegebenen Prozess A zunächst zu charakterisieren und dann zu optimieren, wurden Testreihen nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Experimentelle Vorgehensweise

Für die Experimente wurden mittels Elektronenstrahlolithographie Linienmuster und Quadratstrukturen auf thermisch oxidierten Siliziumwafern hergestellt. Als Lacke wurden sowohl ZEP7000A (Positiv-Elektronenstrahllack, Zeon Corporation, Japan), als auch PMMA 2041 (Positiv-Elektronenstrahllack, DuPont, USA) verwendet.

Beide Lacke wurden dabei jeweils in einer Schichtdicke von ca. 260 nm bis 320 nm per Spincoating aufgetragen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die nachfolgend diskutierten Experimente an ZEP7000A-Strukturen durchgeführt, da dieser Lack eine deutlich geringere Belichtungs-dosis benötigte, was den Zeitaufwand für die Herstellung der Proben verringerte. Die Übertragbarkeit der Testresultate auf PMMA wurde durch Vergleichsmessungen überprüft.

Innerhalb einer Testreihe wurde jeweils ein Prozessparameter variiert. Als Messgröße dienten zum Einen die nach definierter Ätzzeit erreichte Ätztiefe in Siliziumoxid sowie die verbleibende Dicke der als Ätzmaske verwendeten Lackschichten. Dabei wurde mithilfe eines Schichtdickenmessgeräts (Dektak, Modell 3030ST) die Höhe der durch Lack geschützten Strukturen über den ungeschützten Bereichen vor und nach dem jeweiligen Ätzvorgang gemessen. Der Lack wurde anschließend durch ein dreiminütiges Sauerstoffplasma entfernt und letztlich durch nochmaliges Messen die ei-

gentliche Ätztiefe in Siliziumoxid bestimmt. Durch Differenzbildung konnte die zuvor jeweils verbliebene Lackdicke bestimmt werden.

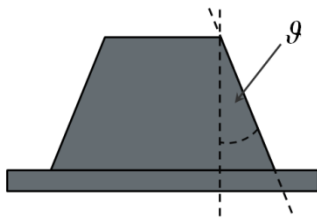


Abbildung A-3 Definition des Flankenwinkels ϑ

ten.

Des Weiteren wurden von allen Testreihen REM-Aufnahmen angefertigt, anhand derer mögliche Strukturveränderungen aufgrund der variierten Prozessparameter sowie die Steilheit der Flanken an den Ätzkanten (d. h. der Flankenwinkel ϑ , vgl. Abbildung A-3) dokumentiert werden konnten.

Charakterisierung des ursprünglichen Rezepts (Rezept A)

Abbildung A-4 zeigt die mithilfe des vorgegebenen Ätzprozesses erreichbaren Struktur Tiefen in Siliziumoxid in Abhängigkeit von der Ätzzeit.

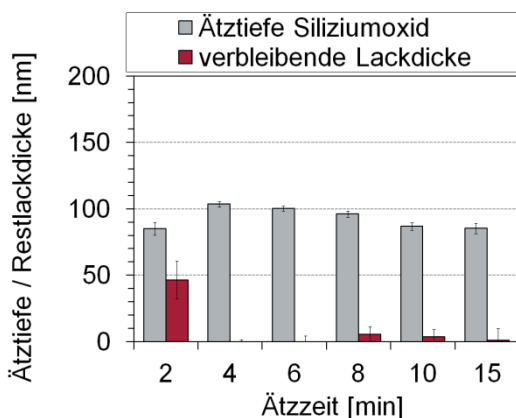


Abbildung A-4 Zeitreihe des herkömmlichen Ätzrezepts A

Es zeigt sich, dass bei Verwendung von Rezept A die Lackmaske bereits nach vier Minuten verbraucht ist. Ohne eine Optimierung der Prozessparameter lassen sich nur Ätztiefen von ca. 100 nm in Siliziumoxid erreichen.

Optimierungsmaßnahmen

Zunächst wurde versucht, die Siliziumoxid-Ätzrate durch eine Erhöhung des Trifluormethan-Anteils an den Ätzgasen und damit einem höheren Anteil fluorhaltiger, ätzaktiver Verbindungen zu steigern.

Tabelle A.1 Prozessparameter Ätzrezept A

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| CHF₃ | 15,6 sccm |
| O₂ | 6,4 sccm |
| Prozessdruck | 79 mTorr |
| Plasmaleistung⁵ | 120 W |

⁵ Die angegebene Plasmaleistung bezog sich auf die verwendete Anlage *PlasmaLab 80plus* von Oxford Instruments mit einem Elektrodendurchmesser vom 8 Zoll.

Wie in Abbildung A-5 zu sehen ist, konnte die erreichbare Ätztiefe nach neun Minuten Ätzzeit durch diese Maßnahme nur von ca. 100 nm auf 175 nm gesteigert werden.

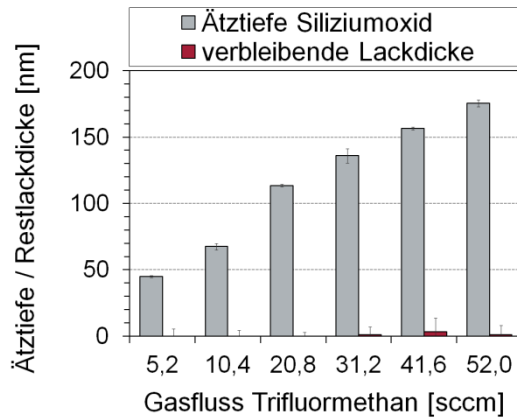


Abbildung A-5 Variation des Anteils von Trifluormethan in Ätzrezept A

den Ätzgasen wurde nicht verfolgt, da mit 52 sccm bereits die maximale Durchflussrate der Zuleitung erreicht war.

Stattdessen wurde im nächsten Optimierungsschritt versucht, die Lebensdauer der Ätzmaske zu erhöhen.

Da insbesondere die im Plasma der Ätzkammer erzeugten Sauerstoffradikale zu einer oxidativen Zersetzung der verwendeten, organischen Lacke beitragen, wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die erreichbaren Ätztiefen untersucht. Abbildung A-6 zeigt die entsprechenden Ätztiefen, wiederum nach einer Ätzzeit von neun Minuten.

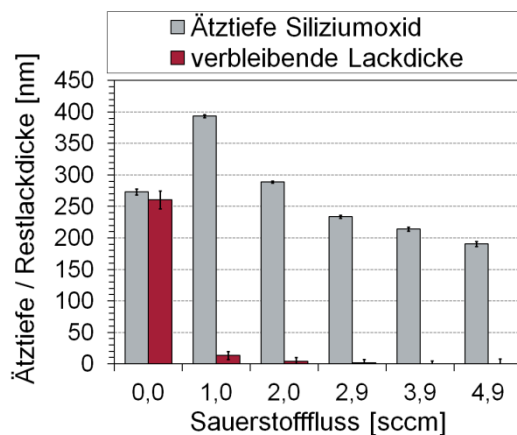


Abbildung A-6 Variation des Anteils von Sauerstoff in Ätzrezept A

Ein Grund hierfür ist, dass die als Ätzmaske verwendete Lackschicht unabhängig von der Konzentration an Trifluormethan stets nach spätestens vier Minuten Ätzzeit verbraucht war. Somit konnte die erhöhte Silizium-Ätzrate nur für einen Bruchteil der Ätzzeit effektiv genutzt werden. Eine weitere Erhöhung des Trifluormethananteils an

Ein kompletter Verzicht auf Sauerstoff hatte einen für die Lackmaske extrem schonenden Ätzvorgang zur Folge. Nach einer Ätzzeit von neun Minuten war diese immer noch intakt. In Siliziumoxid wurde in dieser Zeit eine Ätztiefe von ca. 270 nm erreicht.

Bei geringfügiger Erhöhung des Sauerstoffflusses (1,0 sccm) wur-

den innerhalb von neun Minuten bereits ca. 390 nm Ätztiefe erreicht, wohingegen eine weitere Erhöhung des Sauerstoff-Anteils wieder zu einer Verringerung der nach neun Minuten erreichten Ätztiefen führte.

Im Lichte des in Abschnitt A.1 geschilderten Ablaufs des Ätzprozesses lassen sich diese Beobachtungen wie folgt erklären:

Ein zu geringer Sauerstoffanteil schont zwar den als Ätzmaske verwendeten Lack, jedoch wird zugleich auch die sich bildende Passivierungsschicht nicht mehr ausreichend durch freie Sauerstoffradikale zersetzt; die Ätzrate für Siliziumoxid bleibt gering. Wird der Sauerstoffanteil erhöht, so steigt die Zersetzungsrate der Passivierungsschicht. Die Ätzrate für Siliziumoxid steigt, ebenso sinkt jedoch auch die Lebensdauer der Lackmaske. Nach Erreichen einer maximalen Ätztiefe als Funktion des Sauerstoffanteils nehmen daher die erreichbaren Ätztiefen als Funktion des Sauerstoffanteils wieder ab.

In weiteren Testreihen wurde des Weiteren versucht, die erreichbare Ätztiefe durch Anpassen der Plasmaleistung beziehungsweise des Prozessdrucks weiter zu erhöhen. Diese Maßnahmen brachten jedoch keinen signifikanten Beitrag, sodass die ursprünglichen Parameter beibehalten wurden.

Das optimierte Ätzrezept A_{opt}

Nach Optimierung des ursprünglichen Ätzrezepts A ergab sich somit ein neues Rezept A_{opt} . In Abbildung A-7 ist der zeitliche Verlauf bei Anwendung dieses Rezepts gezeigt. Nach neun Minuten war in diesem Experiment die gesamte Siliziumoxidschicht durchdrungen und es stand noch ein geringfügiger Rest Lackmaske zur Verfügung. Für längere Ätzzeiten sinkt die beobachtete Ätztiefe wieder, da nun die Lackmaske verbraucht ist und so die zuvor geschützten Bereiche der Teststruktur geätzt werden, während das an den übrigen Flächen bereits freigelegte Silizium für das verwendete Rezept als Ätzstopp fungiert.

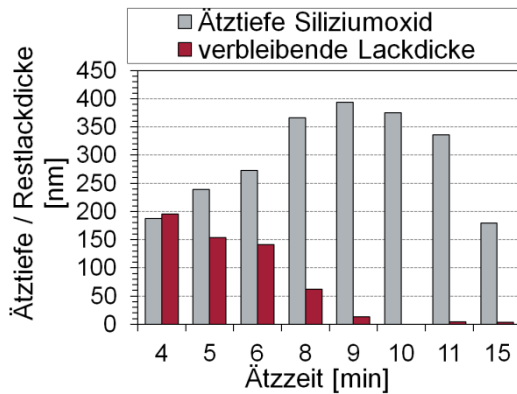


Tabelle A.2 Prozessparameter
Ätzrezept A_{opt}

| | |
|------------------------|-----------|
| CHF₃ | 52,0 sccm |
| O₂ | 1,0 sccm |
| Prozessdruck | 79 mTorr |
| Plasmaleistung | 120 W |

Abbildung A-7 Zeitlicher Verlauf des Ätzvorgangs mit dem optimierten Rezept A_{opt}

Im Vergleich zu dem in Abbildung A-4 gezeigten Zeitverlauf des ursprünglichen Ätzrezepts A lassen sich mithilfe von A_{opt} deutlich größere Ätztiefen erreichen. Im Rahmen der Optimierungsmaßnahmen wurde als wesentlicher Parameter der Sauerstoffanteil an den Ätzgasen ausgemacht, über den sich das Gleichgewicht zwischen Lebensdauer der Lackmaske und Entfernen der Passivierungsschicht für ein effektives Ätzen von Siliziumoxid optimal einstellen ließ. Prinzipiell hätte der gänzliche Verzicht auf Sauerstoff zwar ein noch maskenschonenderes Rezept zur Folge, jedoch um den Preis einer verminderten Ätzrate für Siliziumoxid.

Verwendung von Stickstoff anstatt Sauerstoff – Rezept B

Um die erreichbaren Ätztiefen noch weiter zu steigern, wurde versucht, ein zu Sauerstoff alternatives Gas zu verwenden. Durch den Wegfall möglicher Oxidationsreaktionen sollte sich die Lebensdauer der verwendeten Lacke erhöhen lassen. Zugleich sollte jedoch eine möglichst hohe Ätzrate des Siliziumoxids aufrechterhalten werden.

Die Wahl fiel auf Stickstoff, da dieser als reaktionsträges Gas im Reaktor zwar ionisiert werden kann, dabei jedoch im Gegensatz zu Sauerstoff nicht dissoziiert und somit keine hochreaktiven Radikale bildet (siehe [Jan96]). Prinzipiell sollte Stickstoff daher innerhalb eines RIE-Ätzvorgangs eine hohe physikalische Sputterwirkung bei gleichzeitig geringer chemischer Reaktivität entwickeln. In Abbildung A-8 ist die entsprechende Testreihe dargestellt.

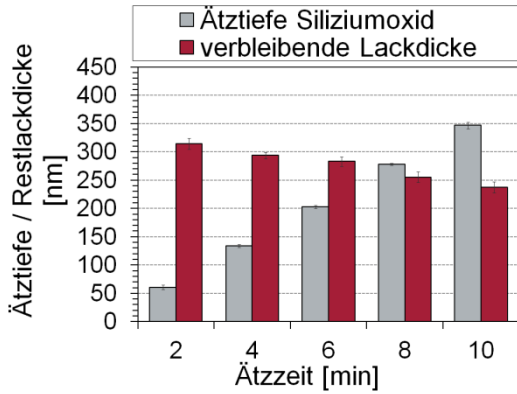


Abbildung A-8 Zeitlicher Verlauf des Ätzvorgangs mit Rezept B

Tabelle A.3 Prozessparameter
Ätzrezept B

| | |
|------------------------|-----------|
| CHF₃ | 52,0 sccm |
| N₂ | 4,3 sccm |
| Prozessdruck | 79 mTorr |
| Plasmaleistung | 120 W |

Es zeigt sich, dass durch den Einsatz von Stickstoff die Ätzrate für Siliziumoxid im Vergleich zu Prozess A_{opt} geringfügig sinkt. Während mithilfe des optimierten Originalrezeptes A_{opt} die Oxidschicht der Testwafer mit einer mittleren Rate von $R_{SiO_2,opt} \approx 44,7 \text{ nm}/\text{min}$ geätzt wurde, erreicht das stickstoffhaltige Rezept B nur eine Rate von $R_{SiO_2,B} \approx 33,4 \text{ nm}/\text{min}$. Allerdings bleibt während des Ätzprozesses auch deutlich mehr von der Lackmaske erhalten.

Der auffälligste Unterschied zeigt sich beim direkten Strukturvergleich. Abbildung A-9 zeigt die entsprechenden REM-Aufnahmen von Quadratstrukturen, die zunächst in ZEP7000A erzeugt und dann in das darunterliegende Siliziumoxid übertragen wurden. In beiden Fällen wurde die Siliziumoxidschicht vollständig durchätzt. Die im stickstoffhaltigen Prozess geätzten Strukturen weisen eine definiertere Oberkante auf, was auf eine deutlich geringere, laterale Ätzrate während des Prozesses schließen lässt.

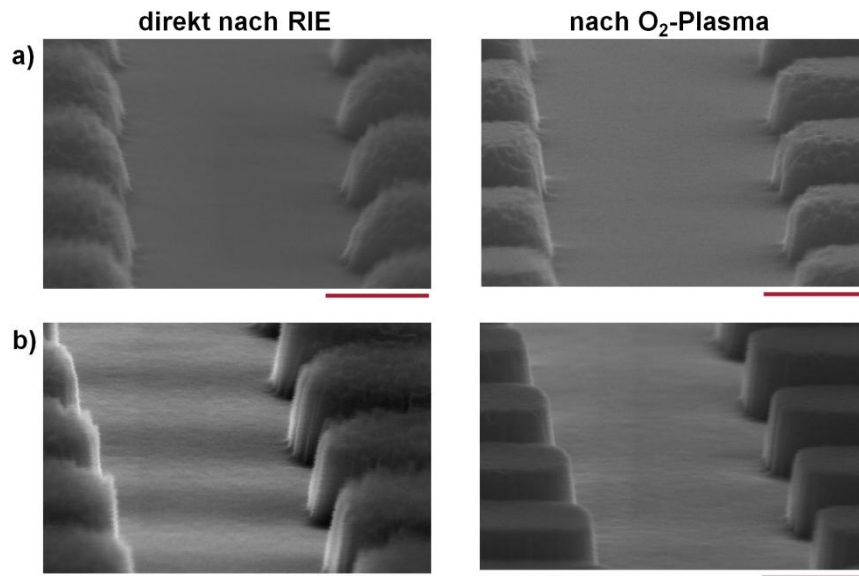


Abbildung A-9 RIE von Siliziumoxid: Optimierung der Ätz-Anisotropie

Teststrukturen a) geätzt mit dem optimierten, sauerstoffhaltigen RIE-Rezept, b) geätzt mit dem stickstoffhaltigen RIE-Rezept. (Skalen: 500 nm, Bilder gekippt)

Dieser qualitative Eindruck spiegelt sich auch in den aus weiteren Aufnahmen der Teststrukturen ausgewerteten Flankenwinkeln wider. So weist der Flankenwinkel der im sauerstoffhaltigen Plasma geätzten Strukturen im Mittel einen Wert von $\varrho_{\text{Sauerstoff}} = 22,90 \pm 2,0^\circ$ auf, während die unter Verwendung von Stickstoff geätzten Strukturen einen durchschnittlichen Flankenwinkel von $\varrho_{\text{Stickstoff}} = 10,5 \pm 2,0^\circ$ zeigen.

A.3 Einführung einer zusätzlichen Maskierungsschicht

Die Konzeption der Zellsubstrate sah Oberflächenstrukturen mit Höhen von mindestens $1,5 \mu\text{m}$ und minimalen lateralen Ausdehnungen von 250 nm vor. Die erforderliche laterale Auflösung beschränkte die verwendbare Lackdicke bei der Strukturierung der entsprechenden Vergussmasken. Als obere Grenze wurden hierbei für PMMA um 250 nm angenommen, da bei höheren Lackdicken die kleinsten Strukturen nicht mehr zuverlässig im Lack dargestellt werden konnten.

Trotz der in Abschnitt A.2 diskutierten Optimierungen des Rezepts reichte diese Lackschichtdicke nicht aus, um die erforderlichen Äztiefen von über einem Mikrometer zu erreichen. Es musste also eine weitere Schicht zwischen Siliziumoxid und Lackmaske eingebracht werden, in die zunächst die

Lackstrukturen übertragen werden konnten und die dann während des Trockenätzprozesses als zusätzliche Ätzmaske fungiert.

Im Allgemeinen wird in derartigen Fällen meist auf Ätzmasken aus Chrom zurückgegriffen (siehe [Jan96]), das jedoch aufgrund der in Kapitel 4 diskutierten, physiologischen Toxizität von Chrom in diesem Fall nicht verwendet werden kann, da nicht auszuschließen ist, dass Reste der Ätzmaske im späteren Prozessverlauf auf die Zellsubstrate gelangen.

Alternative Ätzmasken

Es wurde daher nach alternativen Materialien gesucht: Nickel, das nach [Jan96] ebenfalls gut zur Verwendung als Lackmaske geeignet wäre, scheidet ebenfalls aufgrund seiner Biotoxizität aus. Als biokompatibles Metall mit hoher Ätzresistenz wurde Titan in Betracht gezogen, jedoch standen nach [Wil96] zur Übertragung der Lackstrukturen in Titan nur flusssäurehaltige Ätzmischungen zur Verfügung. Da so durch die Strukturübertragung das Risiko eines unabsichtlichen Ätzens der Siliziumoxidschichten bestand, schied Titan als Maskenmaterial aus.

Es wurde daher auf Aluminium als alternative Ätzmaske zurückgegriffen, da Aluminium zum Einen biokompatibel ist und zum Anderen geeignete Ätzmischungen zur Übertragung der Lackstrukturen in die Aluminiumschicht bekannt waren.

Ätzprozess zur Strukturübertragung in Aluminium

Für die Übertragung wurde eine Ätzmischung aus 70 % Phosphorsäure (H_3PO_4), 3 % Salpetersäure (HNO_3) und Wasser verwendet (siehe [Wil96]). Sowohl Siliziumoxid als auch PMMA sind gegenüber dieser Mischung beständig. Die Ätzlösung wurde in einem Wasserbad auf 30°C erhitzt. So ergab sich eine konstante Ätzrate von ca. $r_{\text{Al}} \approx 30 \frac{\text{nm}}{\text{min}}$.

Stufenbildung durch Verwendung zweier Masken

Durch Verwendung eines nasschemischen Schritts zur Übertragung der Lackmuster in die Aluminiumschicht kam es zu einer Unterätzung der Lackstrukturen aufgrund des isotropen Ätzzvorgangs. Da kein alternativer Trockenätzprozess gefunden werden konnte, mit dessen Hilfe sich Aluminium

anisotrop und ausreichend selektiv zu PMMA hätte ätzen lassen, wurde versucht, die Unterätzung, deren Ausmaß proportional zur Dicke der Aluminiumschicht ist, durch eine möglichst geringe Aluminiumschichtdicke so klein wie möglich zu halten. Aus diesem Grund wurde die Lackmaske nach der Übertragung ins Aluminium auch für den folgenden Siliziumoxid-Trockenätzprozess beibehalten, da so zunächst noch die Maskierung durch die Lackschicht ausgenutzt und eine größere Ätztiefe in Siliziumoxid erreicht werden konnte.

Wie in Abbildung A-10a schematisch dargestellt ist, führt dies zur Ausbildung einer Stufe entlang der Flanken der geätzten Strukturen. Der vermutete Mechanismus für die Stufenbildung ist nachfolgend kurz erläutert.

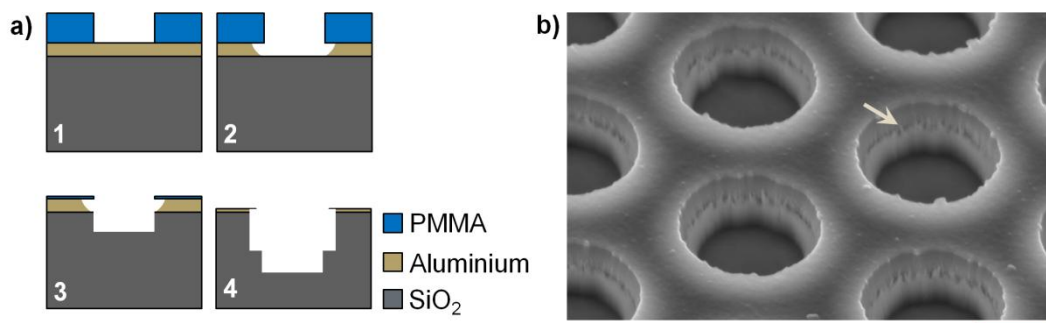


Abbildung A-10 Stufenbildung durch die Verwendung zweier Ätzmasken

a) schematische Darstellung der Stufenbildung, b) REM-Aufnahme von Vertiefungen in Siliziumoxid nach 30 Minuten Ätzzeit. (Skala: 2 μm , Bild gekippt)

Beim Transfer einer Lackstruktur in die darunterliegende Aluminiumschicht tritt eine unvermeidliche Unterätzung auf (Abbildung A-10a, Schritt 1 und 2). Wird die Struktur nun weiter in Siliziumoxid übertragen, ist für die Maskierung zunächst noch die Lackmaske ausschlaggebend (Schritt 3). Ist diese aufgebraucht, wird die darunterliegende, etwas weitere Aluminiummaske strukturbestimmend; es kommt zur Ausbildung der Stufe. In Abbildung A-10b sind solche Stufen anhand einer REM-Aufnahme gezeigt. Geätzt wurde hier insgesamt 30 Minuten. Aus der Lage der Stufe, kann der Zeitpunkt abgeschätzt werden, an dem die Lackmaske versagt hat.

Erreichbare Ätztiefen durch den Doppelmaskenprozess

Durch Aufbringen einer Aluminiumschicht von 75 nm konnte in Kombination mit der Lackmaske eine Ätztiefe von ca. 1,5 μm bis 1,6 μm zuverlässig erreicht werden, während eine Maskierung dieser Dicke für größere Ätztiefen

bzw. längere Ätzzeiten versagte. Dies ist exemplarisch in Abbildung A-11 an REM-Aufnahmen entsprechender Ätzversuche gezeigt.

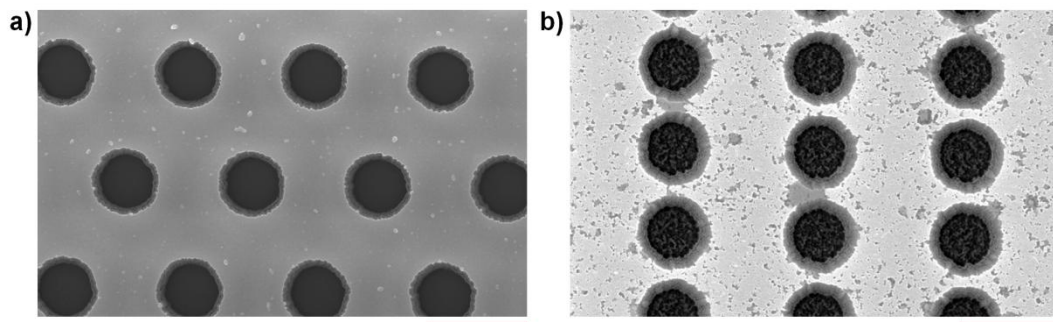


Abbildung A-11 Lebensdauer der Aluminium Ätzmaske

a) intakte Ätzmaske nach 45 min Ätzzeit, b) Versagen der Ätzmaske nach 54 min Ätzzeit (Skalen: 5 μm)

Während der maskierte Teil zwischen den geätzten Vertiefungen in Abbildung A-11a nach 45 Minuten Ätzzeit und Erreichen einer Äztiefe von 1,5 μm noch homogen mit Aluminium bedeckt ist, zeigen sich nach dem Versagen der Ätzmaske an den in Abbildung A-11b gezeigten Strukturen (nach 54 Minuten Ätzzeit) deutliche Lücken in der Aluminiumschicht. Es kommt zudem, vermutlich durch die Redeposition von abgelöstem Maskenmaterial, zur Verunreinigung innerhalb der geätzten Vertiefungen.

B Kalibrierung des AFM für Kraftmessungen

Die in Abschnitt 5.4.4 vorgeschlagene Methode zur Ermittlung der elastischen Eigenschaften von Mikrostrukturen aus Poly(dimethylsiloxan) basieren auf der Erfassung der Verkipfung z sowie des Torsionswinkels α des Cantilevers, während er im Kontakt-Modus über die zu untersuchende Probenoberfläche bewegt wird. Abbildung B- illustriert die entsprechenden Gegebenheiten.

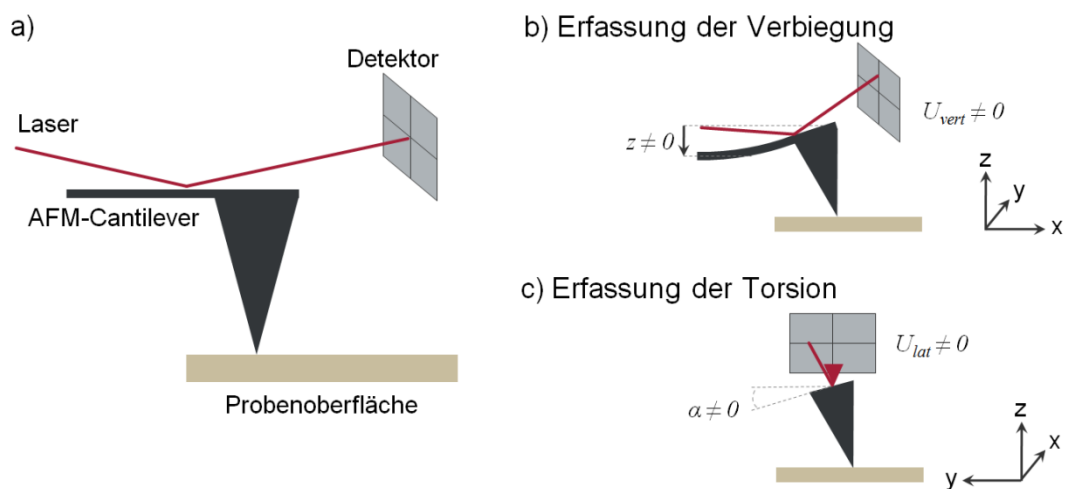


Abbildung B-1 Funktionsprinzip einer AFM-Messung

a) Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops, b) Detektorsignal bei Verbiegung des Cantilevers in z-Richtung, c) Detektorsignal bei lateraler Torsion des Cantilevers

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop erlaubte zwar die Erfassung der Auslenkungen des Cantilevers während ein Höhenprofil aufgenommen wurde, gab diese jedoch nicht direkt in den passenden Einheiten aus. Vielmehr werden nur die Spannungssignale U_{vert} bzw. U_{lat} der 4-Quadrant-Photodiode ausgegeben, mit der die Auslenkung des Cantilevers zunächst nur qualitativ verfolgt werden kann.

Rückschlüsse auf die tatsächlichen Auslenkungen des Cantilevers lassen sich nur ziehen, wenn entsprechende Umrechnungsfaktoren, die sogenannten Empfindlichkeiten (engl. *sensitivities*) S_{vert} bzw. S_{lat} bekannt sind.

Unter der Annahme, dass der Spannungsabfall an der verwendeten Fotodiode linear mit der tatsächlichen Auslenkung des Cantilevers verknüpft ist, gelten die folgenden Zusammenhänge

$$z = S_{\text{vert}} \cdot U_{\text{vert}} \text{ mit } [S_{\text{vert}}] = \frac{\text{nm}}{\text{V}} \text{ und} \quad \text{B.2 a}$$

$$\alpha = S_{\text{lat}} \cdot U_{\text{lat}} \text{ mit } [S_{\text{lat}}] = \frac{1}{\text{V}}. \quad \text{B.2 b}$$

Die einzelnen Empfindlichkeiten sind abhängig von Einbauzustand und Geometrie des verwendeten Cantilevers und müssen somit vor jedem Experiment durch Ausführen einer Kalibrierprozedur ermittelt werden.

Die Kalibrierung der vertikalen Empfindlichkeit des Cantilever erfolgt gemäß einer im Benutzerhandbuch des verwendeten Rasterkraftmikroskops gegebenen Prozedur (siehe [Nan07]). Einzelheiten werden in Abschnitt B.1 erläutert.

Der in Abschnitt B.2 geschilderte Ansatz zur Kalibrierung der lateralen Auslenkung des Cantilevers basiert im Wesentlichen auf einer Arbeit von Onejae Sul und Kollegen (siehe [Sul09]).

B.1 Kalibrierung der vertikalen Empfindlichkeit

Um die Auslenkung des Cantilevers in vertikaler Richtung in Abhängigkeit vom aufgezeichneten Spannungssignal U_{vert} zu bestimmen, wird die AFM-Spitze zunächst in großem Abstand (typischerweise einige Mikrometer) über einer gereinigten, harten Eichoberfläche (Glas oder Siliziumoxid) positioniert und dann lotrecht auf diese zubewegt, während U_{vert} in Abhängigkeit vom Verfahrensweg des Cantilevers aufgezeichnet wird.

Die grafische Darstellung ergibt die sogenannte Kraft-Abstands-Kennlinie, welche die Wechselwirkung der AFM-Spitze mit der Probenoberfläche wiedergibt (siehe Abbildung B-2a).

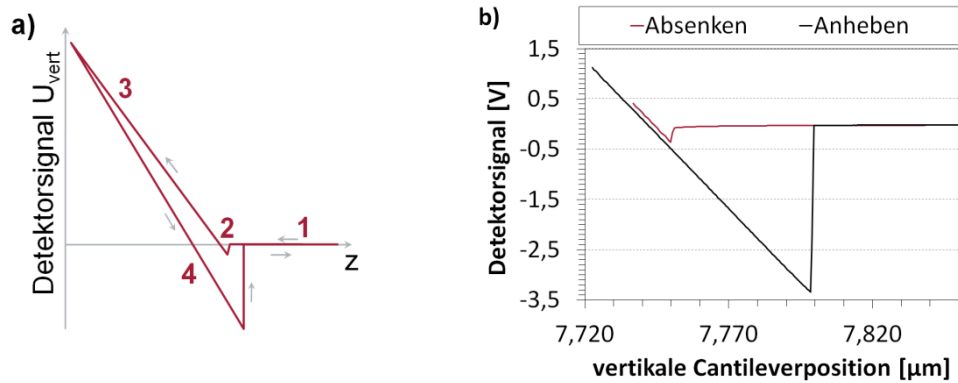


Abbildung B-2 AFM-Kraftkennlinie zur Bestimmung der vertikalen Sensitivität

Der Verlauf der Kennlinie lässt sich in vier Bereiche unterteilen:

Ist die AFM-Spitze weit von der Probenoberfläche entfernt, so findet keine Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze und folglich keine vertikale Auslenkung des Cantilevers statt; das Spannungssignal ist null (Abschnitt 1). Unterschreitet der Abstand eine gewisse Schwelle, gelangt die AFM-Spitze in den attraktiven Teil des Wechselwirkungspotenzials. Übersteigt der Gradient dieser attraktiven Wechselwirkung die Größe der Federkonstante des Cantilevers, wird die AFM-Spitze sprunghaft an die Oberfläche angezogen (Abschnitt 2). Es kommt zur Verbiegung des Cantilevers und damit zu einem Spannungssignal. Bei weiterem Absenken des Cantilevers verhindert der repulsive Teil des Wechselwirkungspotenzials eine weitere Annäherung der Spitze. Der Cantilever wird nun in die entgegengesetzte Richtung ausgelenkt, ohne dass die Spitze im Falle einer harten Oberfläche signifikant in das Material eindringt (Abschnitt 3). Wird der Cantilever wieder von der Oberfläche entfernt, so verringert sich zunächst die vertikale Auslenkung des Cantilevers und wechselt das Vorzeichen, wenn die AFM-Spitze wieder den attraktiven Teil des Wechselwirkungspotenzials durchläuft (Abschnitt 4). Ist die Verbiegung des Cantilevers ausreichend groß, überwindet die AFM-Spitze die Oberflächenadhäsion und löst sich schließlich von der Oberfläche. Die vertikale Auslenkung geht wieder auf null zurück (Abschnitt 1).

Relevant für die Kalibrierung der vertikalen Sensitivität ist der Bereich, in welchem die vertikale Auslenkung des Cantilevers aufgrund der Abstoßung

zwischen Spitze und Oberfläche linear ansteigt. Aus der Steigung der Kennlinie in diesem Bereich lässt sich die Sensitivität nach

$$S_{\text{vert}} \equiv \left| \frac{\partial z}{\partial U_{\text{vert}}} \right| \quad \text{B.3}$$

direkt ablesen.

B.2 Kalibrierung der lateralen Empfindlichkeit

Zur Bestimmung der lateralen Empfindlichkeit des Rasterkraftmikroskops wird die AFM-Spitze zunächst an eine ebene Probenoberfläche mit bekannter Gleitreibungszahl μ_{kalib} angenähert.

Als Kalibrieroberfläche wurde die, vor jeder Messung in Aceton und Isopropanol ultraschall-gereinigte Oberfläche eines Siliziumwafers verwendet, auf dessen Oberfläche zuvor mithilfe thermischer Oxidation bei 1050°C in trockener Sauerstoffatmosphäre eine ca. 450nm dicke Schicht Siliziumoxid erzeugt wurde. Eine solche Oberfläche weist nach [Sul09] eine Gleitreibungszahl von $\mu_{\text{kalib}} = 0,05$ auf.

Durch Einstellen einer definierten vertikalen Auslenkung z des Cantilevers wird hierbei nach

$$F_N = k_N \cdot z \quad \text{B.4}$$

eine definierte Kraft F_N senkrecht zur Oberfläche hervorgerufen, wobei k_N die Steifigkeit des AFM-Cantilevers gegen vertikale Auslenkungen ist.

Diese Kraft wird nun über die Regelautomatik des AFMs konstant gehalten, während der Cantilever lateral über die Oberfläche verfahren wird. Durch Aufzeichnen des Spannungssignals $U_{\text{lat}}(x)$ als Funktion der Cantileverposition x ergibt sich der in Abbildung B-3a dargestellte Verlauf. Die Spannungswerte $U_{\text{lat}}(x)$ spiegeln dabei die laterale Torsion des Cantilevers um einen Winkel α aufgrund von Reibungseffekten während des Scanvorgangs wider.

Zu Beginn der Messung baut sich die Torsion des Cantilevers, ausgehend von einem gewissen durch die Anfangsbedingungen der Messung gegebene

nen Offset, langsam auf (Intervall 1), bleibt dann konstant, solange der Cantilever über die Oberfläche bewegt wird (Intervall 2). Kehrt der Cantilever schließlich seine Bewegungsrichtung um, so nimmt die Torsion zunächst ab und kehrt ihr Vorzeichen um (Intervall 3). Auf dem Rückweg zum Ausgangspunkt der Messung stellt sich wieder eine konstante Torsion – diesmal mit umgekehrtem Vorzeichen im Vergleich zu Intervall 2 – ein (Intervall 4). Es ergibt sich eine um den anfänglichen Offsetwert symmetrische Hysteresekurve.

Wird die Messung des der Torsion entsprechenden Spannungssignals U_{lat} für unterschiedliche Verbiegungen z des Cantilevers wiederholt, ergibt sich die in Abbildung B-3b am Beispiel einer typischen Messung dargestellte Kurvenschar.

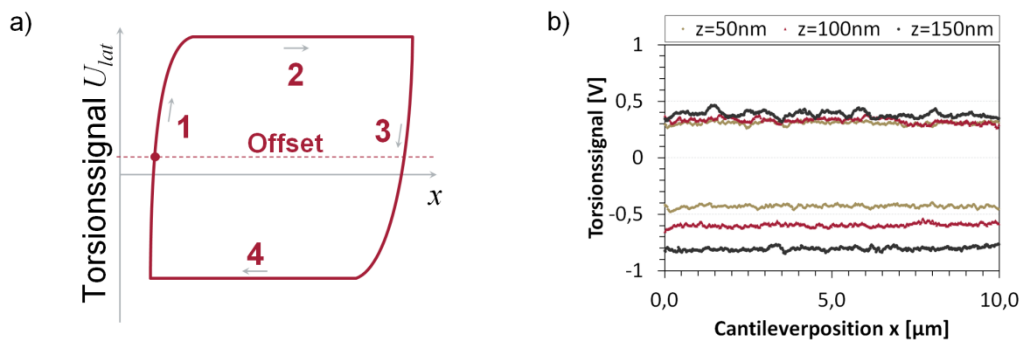


Abbildung B-3 Torsion des AFM-Cantilevers durch Gleitreibung beim lateralen Scan
 a) Schematische Darstellung des zu erwartenden Detektorsignals b) Daten von drei Messungen bei unterschiedlichen Cantileververbiegungen z (Umkehrintervalle 1 und 3 nicht gezeigt).

Wie am Verlauf der Messkurven zu erkennen ist, steigt das Detektorsignal U_{lat} für zunehmende Verbiegungen des Cantilevers an. Des Weiteren zeigt sich, dass auch der anfängliche Offset des Detektorsignals in Abhängigkeit der Verbiegung driftet; die einzelnen Messkurven scheinen leicht gegeneinander verschoben. Diese Offset-Drift ist für mehrere Messwiederholungen mit demselben Cantilever konstant, ändert sich jedoch nach einem Wechsel der AFM-Spitze. Sie wird vermutlich durch einen leicht verkippten Einbau des Cantilevers verursacht, aufgrund dessen der Cantilever bereits während des Anfahrens der Probenoberfläche leicht tordiert wird.

Aus den Werten in den Intervallen 2 und 4 in Abbildung B-3a kann ein mittleres Detektorsignal $\langle U_{\text{lat}} \rangle$ in Abhängigkeit von der jeweiligen Verbiegung z bestimmt werden. Aufgrund des erwähnten Offset-Drifts während der Messungen muss dieses mittlere Detektorsignal hierbei über

$$\langle U_{\text{lat}} \rangle = \frac{1}{2} \cdot (\langle U_{\text{lat},2} \rangle - \langle U_{\text{lat},4} \rangle) \quad \text{B.5}$$

berechnet werden. Abbildung B-5a stellt den entsprechenden funktionalen Zusammenhang für die in Abbildung B-3b exemplarisch gezeigten Scans dar.

Um dieses mittlere Detektorsignal nun einem Torsionswinkel α zuordnen zu können, müssen zunächst die am Cantilever während des lateralen Scanvorgangs angreifenden Kräfte betrachtet werden (siehe Abbildung B-4).

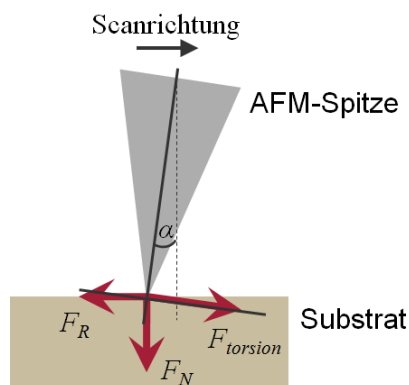


Abbildung B-4 Kräfte am AFM während eines lateralen Scans

zur Folge, die entsprechende Rückstellkräfte innerhalb des Cantilevers verursacht. Im Gleichgewichtsfall kompensieren sich die wirksamen Kräfte gegenseitig. Es gilt:

$$F_{\text{torsion}} = F_N \cdot \sin \alpha + F_R \cdot \cos \alpha . \quad \text{B.6}$$

Wird der Cantilever als ideale, Hooke'sche Feder mit den Federkonstanten k_N gegen Auslenkungen in der Vertikalen bzw. k_T gegen Torsionsbewegungen betrachtet, so gilt weiterhin

Durch das Einstellen einer definierten Verbiegung z am Cantilever, wird die Spitze mit einer Normalkraft F_N gegen die Substratoberfläche gedrückt. Während des Scanvorgangs wirkt die Gleitreibungskraft $F_R \equiv \mu \cdot F_N$ auf die AFM-Spitze. Diese entgegengesetzt zur Scanrichtung des Cantilevers wirksame Gleitreibung hat eine Torsion des Cantilevers

$$F_{\text{torsion}} \equiv k_T \cdot \alpha \quad \text{B.7 a}$$

$$F_N \equiv k_N \cdot z \quad \text{B.7 b}$$

und der Torsionswinkel α lässt sich über

$$\frac{\alpha}{\sin \alpha + \mu \cdot \cos \alpha} = \frac{k_N}{k_T} \cdot z \quad \text{B.8}$$

als Funktion der Verbiegung z darstellen. Unter der Annahme, dass im Experiment nur kleine Torsionswinkel auftreten, lässt sich Gleichung B.8 durch Verwendung von $\sin \alpha \approx \alpha$ und $\cos \alpha \approx 1$ weiter vereinfachen

$$\alpha(z) \approx \frac{\mu \cdot z}{k_T / k_N - z} \quad \text{B.9}$$

Sind also sowohl die Steifigkeiten des verwendeten Cantilevers (siehe Abschnitt B.3), als auch die Gleitreibungszahl einer Eichoberfläche bekannt, lassen sich die theoretisch zu erwartenden Torsionswinkel $\alpha(z)$ näherungsweise berechnen.

Werden nun die experimentell bestimmten Torsionssignale $\langle U_{\text{lat}} \rangle(z)$ gegen die berechneten Werte für $\alpha(z)$ aus Gleichung B.9 aufgetragen, lässt sich durch Ermitteln der Ausgleichsgerade ein Zusammenhang zwischen dem Torsionswinkel α und dem mittleren Detektorsignal $\langle U_{\text{lat}} \rangle$ ableiten.

Für die AFM-Spitze, mit der später auch die Steifigkeiten der PDMS-Pfosten bestimmt wurden, ergab die Kalibrierungsmessung die folgenden Werte, die in Abbildung B-5b grafisch dargestellt sind.

Tabelle B.1 Kalibrierung des AFM-Torsionssignals – Exp. Daten

| Torsionssignal [V] | Torsionswinkel α [rad], aus Gl. B.9 | Torsionssignal [V] | Torsionswinkel α [rad], aus Gl. B.9 |
|--------------------|--|--------------------|--|
| 0,23 | 2,98E-07 | 0,45 | 4,77E-06 |
| 0,26 | 5,96E-07 | 0,47 | 5,37E-06 |
| 0,29 | 1,19E-06 | 0,46 | 5,96E-06 |
| 0,32 | 1,79E-06 | 0,49 | 6,56E-06 |
| 0,35 | 2,38E-06 | 0,52 | 7,15E-06 |
| 0,37 | 2,98E-06 | 0,54 | 7,75E-06 |
| 0,39 | 3,58E-06 | 0,57 | 8,35E-06 |
| 0,42 | 4,17E-06 | 0,59 | 8,94E-06 |

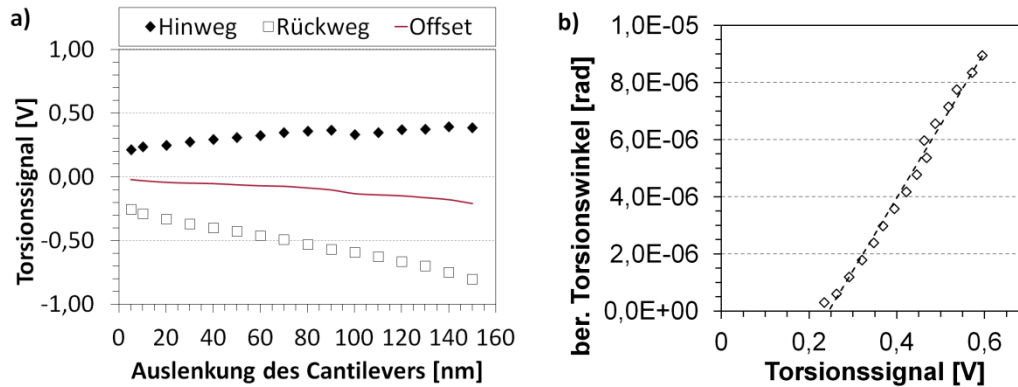


Abbildung B-5 Cantilever-Torsion bei lateralen Scans des AFMs

a) Abhängigkeit des zur Cantilever-Torsion proportionalen Detektorsignals von der Cantileververbiegung z . Die gestrichelte Linie gibt den Offset-Drift an.

b) Zusammenhang zwischen Detektorsignal und realer Cantilevertorsion. Die Steigung ergibt die Empfindlichkeit des AFMs gegen Torsionsbewegung des Cantilevers.

Die Sensitivität des AFMs für torsionale Bewegungen des Cantilevers ergibt sich schließlich aus der Steigung der Regressionsgeraden in Abbildung B-5b zu

$$S_{\text{lat}} \equiv \left| \frac{\partial \alpha}{\partial U_{\text{lat}}} \right| \approx 2,55 \cdot 10^{-5} \frac{1}{V}. \quad \text{B.10}$$

B.3 Bestimmung der elastischen Eigenschaften der AFM-Cantilever

Hinsichtlich der elastischen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten AFM-Cantilever sind im Wesentlichen deren Reaktionen auf eine Verbiegung des Cantilevers in vertikaler Richtung beziehungsweise auf eine Torsion um ihre Längsachse von Bedeutung.

Federkonstante gegen Verbiegen um die Längsachse

Die Federkonstante gegen Verbiegung des Cantilevers in vertikaler Richtung k_N war im Allgemeinen dem Datenblatt des Herstellers zu entnehmen. Diese Angaben wurden verifiziert, indem die Steifigkeit des AFM-Cantilevers gemäß

$$k_N = \frac{Et^3w}{4L^3}. \quad \text{B.11}$$

aus der Geometrie des Cantilevers (d. h. Breite w , Länge L , Dicke t) unter Annahme des Elastizitätsmoduls von Silizium $E_{Si} = 160 \text{ GPa}$ (vgl. [Sul09])

berechnet wurde. Die geometrischen Parameter der Cantilever wurden aus REM-Aufnahmen gewonnen, die jeweils direkt im Anschluss an die AFM-Experimente von den verwendeten Cantilevern angefertigt wurden. Entsprechende Aufnahmen sind exemplarisch in Abbildung B-6 gezeigt.

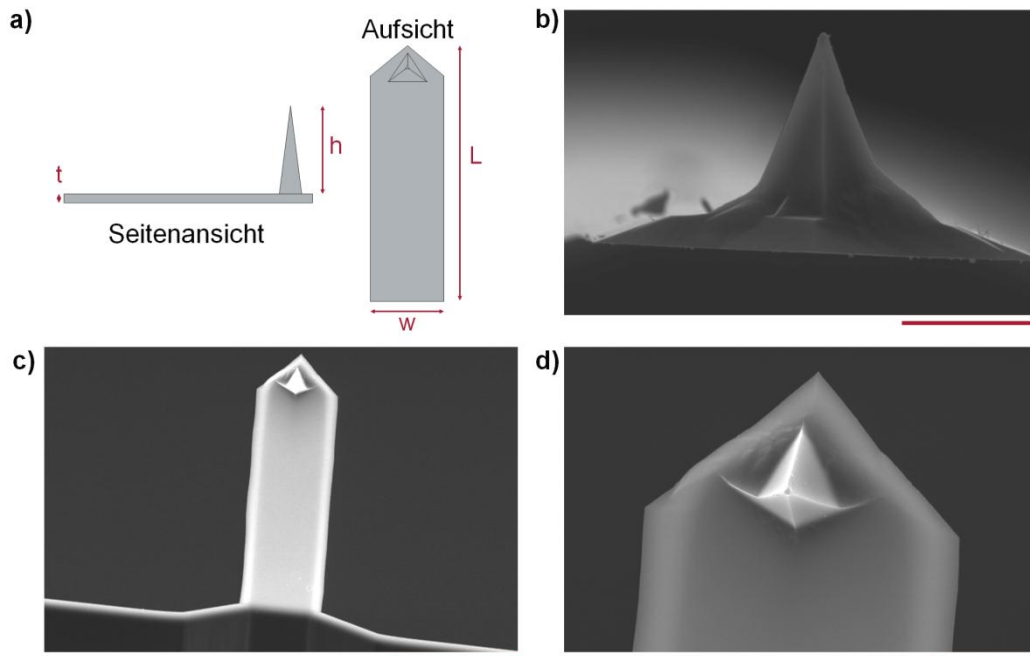


Abbildung B-6 Skizze und REM-Aufnahmen eines AFM-Cantilevers

a) schematische Ansicht, b) zur Bestimmung von Spitzenhöhe und Cantileverdicke (Skala: 10 µm), c) zur Bestimmung der Cantileverlänge (Skala: 50 µm), d) zur Bestimmung der Cantileverbreite (Skala: 10 µm)

Für den in Abbildung B-6 gezeigten Cantilever mit Länge $L=105\mu\text{m}$, Breite $w=35,7\mu\text{m}$ und Dicke $t=2,9\mu\text{m}$ ergibt sich rechnerisch eine Steifigkeit gegen vertikale Auslenkungen von

$$k_N \approx 30,1 \frac{\text{N}}{\text{m}}. \quad \text{B.12}$$

Federkonstante gegen Torsion um die Längsachse

Die torsionale Federkonstante k_T wurde nach Ermittlung von k_N aus der Geometrie (Cantileverlänge L und Spitzenhöhe h) und den Materialparametern des Cantilevers (Poissonzahl $\nu=0,27$) rechnerisch bestimmt, da nach [Sul09] gilt:

$$k_T = \frac{Et^3w}{3(1+\nu)Lh}. \quad \text{B.13}$$

Der Cantilever aus Abbildung B-6 hat demnach eine Steifigkeit gegen torsionale Bewegungen von

$$k_T \approx 0,025 \frac{\text{N}}{\text{rad}} .$$

B.14

C Strukturparameter der Zellsubstrate

Alle Abmessungen sind in Nanometern angegeben. Für die dargestellten Werte gilt ein mittlerer Fehler von $\Delta(R) = \Delta(A) = \pm 30$ nm.

C.1 Zellsubstrate für Kraftmessungen

Tabelle C.1 Geometrieparameter der Zellsubstrate für Kraftmessungen

| Feldkennung | Radius Oberkante | Radius am Boden | Abstand |
|-------------|------------------|-----------------|---------|
| A1 | 1316 | 1792 | 3368 |
| A2 | 1364 | 1817 | 2272 |
| A3 | 1315 | 1804 | 1371 |
| A4 | 1377 | 1767 | 997 |
| A5 | 1315 | 1711 | 871 |
| B1 | 778 | 1215 | 3444 |
| B2 | 782 | 1239 | 2435 |
| B3 | 842 | 1234 | 1315 |
| B4 | 843 | 1253 | 1063 |
| B5 | 843 | 1184 | 813 |
| C1 | 289 | 667 | 3421 |
| C2 | 302 | 662 | 2396 |
| C3 | 306 | 640 | 1387 |
| C4 | 321 | 671 | 1108 |
| C5 | 341 | 679 | 817 |
| D1 | 228 | 579 | 3294 |
| D2 | 239 | 514 | 2273 |
| D3 | 263 | 528 | 1224 |
| D4 | 266 | 506 | 968 |
| D5 | 253 | 506 | 745 |
| E1 | 217 | 439 | 3066 |
| E2 | 219 | 444 | 2062 |
| E3 | 224 | 482 | 1051 |
| E4 | 199 | 442 | 853 |
| E5 | 234 | 402 | 531 |

C.2 Zellsubstrate für Biokolonisationsexperimente

Tabelle C.2 Geometrieparameter der Zylinderstrukturen

| Feldkennung | Radius Oberkante | Radius am Boden | Abstand |
|-------------|------------------|-----------------|---------|
| A1 | 2089 | 2979 | 2972 |
| A2 | 2178 | 2990 | 1873 |
| A3 | 2105 | 2908 | 1027 |
| A4 | 2168 | 2892 | 730 |
| A5 | 2206 | 2762 | 573 |
| A6 | 2170 | 2615 | 504 |
| B1 | 1581 | 2434 | 3035 |
| B2 | 1667 | 2405 | 1978 |
| B3 | 1634 | 2327 | 1089 |
| B4 | 1644 | 2340 | 816 |
| B5 | 1647 | 2290 | 614 |
| B6 | 1641 | 2140 | 519 |
| C1 | 1082 | 1913 | 2905 |
| C2 | 1145 | 1885 | 1871 |
| C3 | 1150 | 1801 | 948 |
| C4 | 1150 | 1845 | 655 |
| C5 | 1192 | 1774 | 435 |
| C6 | 1178 | 1606 | 365 |
| D1 | 866 | 1594 | 2746 |
| D2 | 888 | 1599 | 1719 |
| D3 | 916 | 1623 | 667 |
| D4 | 922 | 1589 | 444 |
| D5 | 900 | 1458 | 348 |
| D6 | 902 | 1317 | 237 |
| E1 | 517 | 1115 | 3008 |
| E2 | 574 | 1169 | 1897 |
| E3 | 570 | 1181 | 889 |
| E4 | 579 | 1165 | 646 |
| E5 | 609 | 1113 | 418 |
| E6 | 621 | 984 | 285 |
| F1 | 340 | 887 | 3199 |
| F2 | 399 | 959 | 2068 |
| F3 | 436 | 1005 | 985 |
| F4 | 433 | 951 | 792 |
| F5 | 424 | 916 | 586 |
| F6 | 417 | 749 | 510 |
| G1 | 255 | 632 | 3013 |
| G2 | 265 | 655 | 1980 |
| G3 | 250 | 621 | 1029 |
| G4 | 259 | 651 | 740 |
| G5 | 243 | 587 | 569 |
| G6 | 263 | 540 | 346 |

Tabelle C.3 Geometrieparameter der Lochstrukturen

| Feldkennung | Radius am Boden | Radius Oberkante | Abstand |
|-------------|-----------------|------------------|---------|
| A1 | 2210 | 2767 | 3063 |
| A2 | 2322 | 2826 | 1891 |
| A3 | 2248 | 2671 | 1120 |
| A4 | 2335 | 2739 | 716 |
| A5 | 2345 | 2716 | 479 |
| A6 | 2405 | 2726 | 159 |
| B1 | 1666 | 2216 | 3168 |
| B2 | 1786 | 2307 | 1957 |
| B3 | 1691 | 2140 | 1219 |
| B4 | 1819 | 2193 | 788 |
| B5 | 1704 | 2050 | 796 |
| B6 | 1824 | 2094 | 383 |
| C1 | 1185 | 1685 | 3030 |
| C2 | 1245 | 1723 | 1932 |
| C3 | 1219 | 1603 | 1078 |
| C4 | 1283 | 1642 | 725 |
| C5 | 1211 | 1576 | 613 |
| C6 | 1310 | 1592 | 247 |
| D1 | 942 | 1374 | 2890 |
| D2 | 998 | 1386 | 1822 |
| D3 | 948 | 1307 | 951 |
| D4 | 1025 | 1367 | 563 |
| D5 | 922 | 1241 | 543 |
| D6 | 1066 | 1297 | 93 |
| E1 | 582 | 922 | 3136 |
| E2 | 665 | 1058 | 1917 |
| E3 | 615 | 922 | 1103 |
| E4 | 671 | 931 | 788 |
| E5 | 615 | 935 | 590 |
| E6 | 651 | 887 | 352 |
| F1 | 469 | 760 | 3197 |
| F2 | 434 | 769 | 2223 |
| F3 | 420 | 725 | 1281 |
| F4 | 445 | 725 | 1006 |
| F5 | 412 | 710 | 804 |
| F6 | 441 | 660 | 576 |
| G1 | 295 | 501 | 3103 |
| G2 | 269 | 499 | 2131 |
| G3 | 260 | 464 | 1175 |
| G4 | 249 | 486 | 915 |
| G5 | 375 | 365 | 660 |
| G6 | 254 | 460 | 436 |

D Verwendete Anlagen und Materialien

D.1 Anlagen

Tabelle D.1 Verwendete Anlagen

| Verwendung | Modellbezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| Elektronenstrahl-Lithographie | FELS-1 (Laboraufbau) | IBM, USA und Inst. für Angew. Physik, Universität Tübingen, GER |
| Hochvakuum-Aufdampfanlage | <n.v.> (modifiziert) | Balzers, jetzt Oerlikon/Balzers, Pfäffikon, CH |
| Kritisch-Punkt-Trocknung | CPD | Bal-Tec, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar, GER |
| Plasmagestützte Gasphasenabscheidung | Plasmalab 80plus | Oxford Plasma Technology, Bristol, UK |
| Plasmagestützte Goldbeschichtung | Manual Sputter coater B7340 | Agar Scientific Ltd., Stansted, UK |
| Rasterkraftmikroskopie | JPK NanoWizard II | JPK Instruments AG, Berlin, GER |
| Rasterelektronenmikroskopie | XL 30 FEG-SEM | Philips/FEI, Eindhoven, NL |
| Reaktives Ionenätzen | Plasmalab 80plus | Oxford Plasma Technology, Bristol, UK |
| Reinstwassergewinnung | Milli-Q+ 185 | Millipore, Billerica, USA |
| Schichtdickenmessung | Dektak 3030ST | Veeco, Plainview, USA |

D.2 Prozessgase

Tabelle D.2 Verwendete Prozessgase

| Bezeichnung | Gehalt/Reinheit | Hersteller |
|---------------------|-------------------|--|
| Distickstoffmonoxid | 4.8 | Praxair, Düsseldorf, GER |
| Kohlenstoffdioxid | 4.5 | Westfalen AG, Münster, GER |
| Sauerstoff | 4.8 | Air liquide, Düsseldorf, GER |
| Silan | 2 % in Stickstoff | Messer Industriegase GmbH, Sulzbach, GER |
| Stickstoff | Hausleitung | - |
| Trifluormethan | 5.0 | Linde Gas, Pullach, GER |

D.3 Chemikalien

Tabelle D.3 Verwendete Chemikalien

| Bezeichnung | Gehalt / Reinheit | Hersteller |
|---|-------------------------|---|
| Aceton | ≥ 99,5 % | Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, USA |
| Ammoniumfluorid | 87,5+12,5 % (HF-Gehalt) | Merck KGaA, Darmstadt, GER |
| Ethanol | 100 % | Merck KGaA, Darmstadt, GER |
| Glutaraldehyd | 25 % | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, GER |
| Hexamethyldisilazan | ≥ 98 % | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, GER |
| Isopropanol | ≥ 99,5 % | Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, USA |
| Kaliumhydroxid-Plättchen | ≥ 98,5 % | Honeywell Riedel-deHaen, Morristown, USA |
| ma-D 331 (Entw. für ma-P 1215) | - | Micro resist technologies GmbH, Berlin, GER |
| ma-P 1215 (UV-Lack) | - | Micro resist technologies GmbH, Berlin, GER |
| Methylisobutylketon | ≥ 99 % | Merck KGaA, Darmstadt, GER |
| n-Heptan | ≥ 99 % | Fluka Analytical, Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, USA |
| Octadecyltrichlorosilan | ≥ 90 % | Sigma-Aldrich LLC, St. Louis, USA |
| Ormostamp | - | Micro resist technologies GmbH, Berlin, GER |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,00) | - | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, GER |
| Phosphorsäure | 85 % a.q. | Merck KGaA, Darmstadt, GER |
| Poly(dimethylsiloxan) "Sylgard 184" | Rein | Dow Corning Germany, Wiesbaden, GER |
| Poly(methylmethacrylat) „Evalcite 2041“ | - | DuPont, Wilmington, USA |
| Salpetersäure | 85 % a.q. | Merck KGaA, Darmstadt, GER |
| Schwefelsäure | ≥ 95 % | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, GER |
| Wasserstoffperoxid | 30% a.q. | J.T. Baker, Philipsburg, USA |
| ZEP 7000A | - | Zeon Corp. JPN |

E Lebenslauf des Autors

Peter Sebastian Nill, geboren am 21. September 1981 in Nürtingen, Landkreis Esslingen

1988 – 1992 Besuch der Anne-Frank-Grundschule in Waldbronn

1992 – 2001 Besuch des Gymnasiums am Schelmenbusch in Karlsbad, abgeschlossen mit dem Abitur im Juli 2001

2001 – 2002 Zivildienst in Ettlingen, Landkreis Karlsruhe

2002 – 2007 Studium der Physik (Diplom) an der Universität Stuttgart mit den Schwerpunkten Biophysik und Oberflächen- und Grenzflächenphysik.

2006 – 2007 Anfertigung einer Diplomarbeit auf dem Gebiet der organischen Halbleitertechnik, Festkörperphysik mit dem Thema „Untersuchung des Injektionsverhaltens in organischen Feldefekt-Transistoren“ betreut durch die Herren Prof. Dr. Jörg Wrachtrup sowie Prof. Dr. Jens Pflaum.

Juni 2007 Abschluss des Physikstudiums als Diplom-Physiker

2007 – 2008 Angestellter IT-Berater und Softwareentwickler, IndustrieHansa Consulting & Engineering GmbH, München

2008 – 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Physik der Eberhard Karls Universität Tübingen

seit 2011 Produktbetreuer für Integrierte Schaltungssysteme, Robert Bosch GmbH, Reutlingen