

Thermoresponsive Zellkultursubstrate für zeitlich-räumlich gesteuertes Auswachsen neuronaler Zellen

Laura Vera Johanna Behm

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin "Biotechnologie"

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Institut für Biochemie

der Universität Potsdam

Soweit nicht anders gekennzeichnet ist dieses Werk unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung 4.0 International. Dies gilt nicht für zitierte Inhalte anderer Autoren.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Ort und Tag der Disputation: Potsdam-Golm, 26.09.2019

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Frank Bier
Betreuer: Dr. Michael Kirschbaum

Gutachter:
Prof. Dr. Frank Bier
Prof. Dr. Roland Lauster
Prof. Dr. Andreas Offenhäusser

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-43619>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-436196>

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen. Ich habe mich auch früher um keine Promotion bemüht.

Summary

An important goal of neurosciences is to understand the fascinating, complex and highly ordered neuronal circuits of the brain that are underlying important neuronal processes such as learning and memory, as well as neuropathologies. For detailed studies of these processes improved neuronal cell culture models that allow a reconstruction of ordered neuronal connections are crucial. Neuronal cells can be patterned in vitro with structured surface coatings of cell repellent and cell attractive substances. For controlling also the direction of neuronal cell connections the outgrowth of the axons towards neighbouring cells needs to be dynamically controlled, which can be achieved for example by surface structures that can be changed due to switchable surface properties.

The main goal of this work was to explore if cell culture substrates with coatings of thermoresponsive polymer (TRP) are suitable for dynamically controlling the outgrowth of neuronal cells. TRPs can be switched via temperature between a cell repellent and a cell attractive state, which enables a dynamic change of surface properties. The TRP coating was microstructured in order to pattern neuronal cells and to spatio-temporally control the outgrowth of cells and neurites across defined TRP-coated areas in dependence of the temperature. The protocol was established with the neuronal cell line SH-SY5Y and transferred to human induced neuronal cells. The cell patterns could be maintained for up to 7 days of cultivation when the TRP was kept in the cell repellent state. By switching the TRP to the cell attractive state the outgrowth of neurites and cells was induced at defined time points and areas. Immunocytochemical staining and patch-clamp recordings of the neurons demonstrated the cell compatibility and easy applicability of these TRP-substrates.

A more precise spatial control of the outgrowth of cells should be further achieved by local switching of the TRP-coating. Therefore, microheaters comprising microelectrodes were developed for locally heating the substrate surface. For evaluation of the generated temperature profiles a thermometry method was developed and the values obtained were correlated with numerically simulated data. The thermometry method is based on easily applicable sol-gel-films containing the temperature-sensitive fluorophore Rhodamine B. It allows temperature measurements close to the surface under both dry and liquid conditions with high resolution regarding space (lower μm -range) and temperature ($\leq 1^\circ\text{C}$). Numerical simulations of the temperature profiles correlated well with experimental data. On this basis geometry and material of the microelectrodes were optimized with regard to locally restricted temperature changes. Furthermore, a chip environment for cultivating the cells on the microheater chips was developed comprising a cell culture chamber and a contact board for electrically contacting the microelectrodes.

The results presented in this work demonstrate for the first time the great potential of thermoresponsive cell culture substrates for a spatio-temporally controlled formation of neuronal connections in vitro. In future this could facilitate detailed studies of information processing in neuronal networks or of neuropathologies using relevant human neuronal cell models.

Zusammenfassung

Ein wichtiges Ziel der Neurowissenschaften ist das Verständnis der komplexen und zugleich faszinierenden, hochgeordneten Vernetzung der Neurone im Gehirn, welche neuronalen Prozessen, wie zum Beispiel dem Wahrnehmen oder Lernen wie auch Neuropathologien zu Grunde liegt. Für verbesserte neuronale Zellkulturmodelle zur detaillierten Untersuchung dieser Prozesse ist daher die Rekonstruktion von geordneten neuronalen Verbindungen dringend erforderlich. Mit Oberflächenstrukturen aus zellattraktiven und zellabweisenden Beschichtungen können neuronale Zellen und ihre Neuriten in vitro strukturiert werden. Zur Kontrolle der neuronalen Verbindungsrichtung muss das Auswachsen der Axone zu benachbarten Zellen dynamisch gesteuert werden, zum Beispiel über eine veränderliche Zugänglichkeit der Oberfläche.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mit thermoresponsiven Polymeren (TRP) beschichtete Zellkultursubstrate für eine dynamische Kontrolle des Auswachsens neuronaler Zellen geeignet sind. TRP können über die Temperatur von einem zellabweisenden in einen zellattraktiven Zustand geschaltet werden, womit die Zugänglichkeit der Oberfläche für Zellen dynamisch gesteuert werden kann. Die TRP-Beschichtung wurde mikrostrukturiert, um einzelne oder wenige neuronale Zellen zunächst auf der Oberfläche anzuordnen und das Auswachsen der Zellen und Neuriten über definierte TRP-Bereiche in Abhängigkeit der Temperatur zeitlich und räumlich zu kontrollieren. Das Protokoll wurde mit der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y etabliert und auf humane induzierte Neurone übertragen. Die Anordnung der Zellen konnte bei Kultivierung im zellabweisenden Zustand des TRPs für bis zu 7 Tage aufrecht erhalten werden. Durch Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand konnte das Auswachsen der Neuriten und Zellen zeitlich und räumlich induziert werden. Immunozytochemische Färbungen und Patch-Clamp-Ableitungen der Neurone demonstrierten die einfache Anwendbarkeit und Zellkompatibilität der TRP-Substrate.

Eine präzisere räumliche Kontrolle des Auswachsens der Zellen sollte durch lokales Schalten der TRP-Beschichtung erreicht werden. Dafür wurden Mikroheizchips mit Mikroelektroden zur lokalen Jouleschen Erwärmung der Substratoberfläche entwickelt. Zur Evaluierung der generierten Temperaturprofile wurde eine Temperaturmessmethode entwickelt und die erhobenen Messwerte mit numerisch simulierten Werten abgeglichen. Die Temperaturmessmethode basiert auf einfach zu applizierenden Sol-Gel-Schichten, die den temperatursensitiven Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B enthalten. Sie ermöglicht oberflächennahe Temperaturmessungen in trockener und wässriger Umgebung mit hoher Orts- und Temperaturauflösung. Numerische Simulationen der Temperaturprofile korrelierten gut mit den experimentellen Daten. Auf dieser Basis konnten Geometrie und Material der Mikroelektroden hinsichtlich einer lokal stark begrenzten Temperierung optimiert werden. Ferner wurden für die Kultivierung der Zellen auf den Mikroheizchips eine Zellkulturkammer und Kontaktboard für die elektrische Kontaktierung der Mikroelektroden geschaffen.

Die vorgestellten Ergebnisse demonstrieren erstmalig das enorme Potential thermoresponsiver Zellkultursubstrate für die zeitlich und räumlich gesteuerte Formation geordneter neuronaler Verbindungen in vitro. Zukünftig könnte dies detaillierte Studien zur neuronalen Informationsverarbeitung oder zu Neuropathologien an relevanten, humanen Zellmodellen ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen und Stand der Forschung	4
3.1	Methoden der Neurobiologie	4
3.1.1	Neurobiologische Untersuchungen an intakten Hirnstrukturen	4
3.1.2	Neurobiologische Untersuchungen an isolierten Zellen	4
3.1.3	Polarisierung neuronaler Zellen.....	5
3.2	Adhäsion und Migration von neuronalen Zellen.....	6
3.2.1	Zytoskelett	6
3.2.2	Interaktionen über Integrinrezeptoren.....	7
3.2.3	Wechselwirkung neuronaler Zellen mit Oberflächen in vitro	7
3.3	Neuronale Netzwerke in vitro	8
3.3.1	Chemische Oberflächenstrukturierung	9
3.3.2	Topografische Oberflächenstrukturierung	10
3.3.3	Netzwerke mit directionalen Verbindungen	11
3.3.4	Dynamische Steuerung von Axonwachstum	13
3.4	Stimuli-responsive Oberflächen.....	14
3.4.1	Funktionsweise von TRP.....	14
3.4.2	Optimierung der TRP-Beschichtung für verbesserte Zelladhäsion	15
3.5	Technologien zur lokalen Heizung von Oberflächen.....	16
3.5.1	Methoden für lokales Heizen	16
3.5.2	Lokales Heizen durch Joulesche Erwärmung.....	17
3.6	Temperaturmessmethoden	18
3.6.1	Invasive Messungen	18
3.6.2	Nicht-invasive Messungen	18
3.6.3	Semi-invasive Messungen	19
3.7	Wärmetransport	20
4	Material und Methoden	22
4.1	Herstellung thermoresponsiver Oberflächen	22
4.1.1	Reinigung der Deckgläser.....	22
4.1.2	Goldbedampfung	22
4.1.3	Reinigung der Goldoberflächen.....	23
4.1.4	Polymerbeschichtung.....	23

4.1.5	Koadsorption mit Peptiden	24
4.1.6	Proteinbeschichtung	25
4.2	Strukturierung der TRP-Beschichtung.....	25
4.2.1	Laserablation	25
4.2.2	Fotolithografie.....	25
4.3	Zellkultur.....	26
4.3.1	L929-Zellen.....	26
4.3.2	SH-SY5Y-Zellen	27
4.3.3	Astrozyten und humane induzierte Neurone	28
4.3.4	Kultivierung von Zellen auf TRP-Substraten in Zellkulturkammern.....	29
4.3.5	Mikroskopische Analyse und Evaluierung der Zelladhäsion	29
4.3.6	Mikroskopische Analyse und Evaluierung des Zellwachstums auf strukturierten TRP-Substraten.....	30
4.3.7	Immunocytochemie.....	32
4.3.8	Elektrophysiologie.....	32
4.4	Herstellung der Mikroheizung	32
4.4.1	Laserablation von ITO-Schichten.....	32
4.4.2	Fotolithografie.....	33
4.5	Temperaturmessung an Oberflächen mit Rhodamin B.....	33
4.5.1	Herstellung von Sol-Gel-Schichten mit Rhodamin B	33
4.5.2	Analyse der Schichtdicke.....	33
4.5.3	Thermometrie mittels Fluoreszenzmikroskopie	33
4.5.4	Numerische Simulation der Temperaturverteilung	34
5	Ergebnisse.....	36
5.1	Strukturierte thermoresponsive Zellkultursubstrate zur Kontrolle neuronaler Zellen	36
5.1.1	Konzept und Strukturierung der thermoresponsiven Zellkultursubstrate... 36	
5.1.2	Besiedlung der TRP-Substrate mit neuronalen Zellen.....	38
5.1.3	Eingrenzung des Zellwachstums auf TRP-freie Strukturen	39
5.1.4	Zeitlich kontrollierte Migration von neuronalen Zellen.....	40
5.1.5	Zeitlich und räumlich gesteuertes Auswachsen von Neuriten.....	42
5.1.6	Anwendung des Protokolls auf humane induzierte Neurone	44
5.2	Mikroheizung zur lokalen Temperierung und Schaltung der TRP-Substrate....	46
5.2.1	Hochaufgelöste Temperaturmessung mit Rhodamin B	47
5.2.2	Mikroelektroden-Design zur lokalen Beheizung der Oberfläche	52
5.2.3	Temperaturverteilung über Heizelektroden	58

5.2.4	Verwendung der TRP-beschichteten Mikroheizchips in der Zellkultur	60
5.3	Optimierung der Initialadhäsion von neuronalen Zellen auf der TRP-Beschichtung für andere Anwendungen	63
5.3.1	Koadsorption des TRPs mit den Peptiden RGD und YIGSR	63
5.3.2	Beschichtung der TRP-Oberflächen mit EZM-Proteinen.....	64
5.3.3	Expression neuronaler Marker auf TRP-Substraten	66
6	Diskussion	68
6.1	Zweck der thermoresponsiven Zellkultursubstrate.....	68
6.2	Handhabbarkeit der thermoresponsiven Zellkultursubstrate	68
6.2.1	Einfache dynamische Steuerung der Oberflächenzugänglichkeit	68
6.2.2	Komfortable Herstellung der mikrostrukturierten TRP-Beschichtung	69
6.2.3	Simple Besiedlungs- und Kultivierungsprotokoll	70
6.2.4	Zugänglichkeit für Analysemethoden	71
6.2.5	Stabilität der Oberflächenstrukturierung	72
6.2.6	Zellkompatibilität der TRP-Substrate.....	74
6.3	Anwendungsmöglichkeiten der Methode	75
6.3.1	Anwendbarkeit auf relevante Zelltypen.....	75
6.3.2	Dimensionen der Mikrostrukturen zur Kontrolle neuronaler Zellen	77
6.4	Mikroheizung für lokales Schalten des TRPs	80
6.4.1	Entwicklung der Mikroheizung mit scharfen Temperaturgradienten.....	80
6.4.2	Aufheiz- und Abkühlungszeiten	81
6.4.3	Eigenschaften der Temperaturmessmethode.....	81
7	Fazit	85
8	Literaturverzeichnis	86
9	Anhang.....	101
	Abbildungsverzeichnis.....	101
	Tabellenverzeichnis.....	102
	Abkürzungsverzeichnis	103
	Veröffentlichungen	104
	Danksagung.....	105

1 Einleitung

Das menschliche Gehirn ist ein extrem komplexes und faszinierendes Organ. Es besteht aus Milliarden verschiedener Neurone, die in einer hochgeordneten Netzwerkarchitektur miteinander verknüpft sind, um komplexe Informationen über elektrische und chemische Signale zu verarbeiten und präzise Reaktionen zu generieren. Ein wichtiges Ziel der Neurowissenschaften ist es, diese leistungsstarken Informationsverarbeitungsprozesse genauer zu verstehen (Kandel et al., 2012). Dazu gehört die detaillierte Aufklärung der Beziehungen zwischen bestimmten neuronalen Verschaltungsmustern und bestimmten Reaktionen (Form-Funktion-Beziehung) sowie der neuronalen Kommunikation und ihrer Modifikation durch Erfahrung (Albers and Offenhäusser, 2016). Das Verständnis solcher Prozesse kann helfen, die Ursachen von Neuropathologien wie Alzheimer, Parkinson oder Depression zu verstehen und neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, was von herausragender gesellschaftlicher Bedeutung ist (Albright et al., 2000).

Zur Erforschung dieser Themen sind neuronale Netzwerke *in vitro* ein wichtiges Instrument, da sie aufgrund ihrer geringeren Komplexität und der hohen Kontrollierbarkeit von Einflussfaktoren gegenüber *in vivo* Modellen detaillierte Studien auf zellulärer und molekularer Ebene erleichtern (Millet and Gillette, 2012a). Um neuronale Zellen und ihre Netzwerkarchitektur *in vitro* zu kontrollieren, wurden in den letzten Jahrzehnten diverse Techniken entwickelt, welche vornehmlich auf chemisch mikrostrukturierten Oberflächen oder topografisch begrenzenden Strukturen wie mikrofluidischen Kanälen basieren (Hasan et al., 2016). Die Rekonstruktion von direktionalen neuronalen Verbindungen ist dabei von herausragender Bedeutung, da die unidirektionale Signaltransmission vielen kritischen neuronalen Funktionen zu Grunde liegt (Gladkov et al., 2017). Mikrostrukturierte Oberflächen erlauben die Kontrolle der Ausbreitung einzelner neuronaler Zellen und ihrer Neuriten, den Axonen und Dendriten und haben den Vorteil, dass sie für Standardmethoden der Neurobiologie wie der Patch-Clamp-Technik zugänglich sind (Vogt et al., 2005). Die Kontrolle der Richtung der Signaltransmission ist mit diesen Methoden jedoch bisher nicht zufriedenstellend gelöst worden. Hierfür muss eine zunächst widersprüchliche Bedingung gelöst werden: während jede Zelle für die Axone der benachbarten Zelle zugänglich sein muss, darf diese Zelle ihr eigenes Axon eben nicht in die Richtung dieser benachbarten Zellen ausbilden. Ein Lösungsansatz dafür sind flexible Mikrostrukturen, die zeitlich und räumlich kontrolliert verändert werden können, sodass das schrittweise Auswachsen der Axone in eine Richtung gesteuert werden kann (Yamamoto et al., 2016). Bisherige Techniken für eine solche dynamische Steuerung des Axonwachstums sind allerdings sehr aufwendig und / oder benötigen Expertise mit anspruchsvollen Techniken.

Alternative Technologien zur dynamischen Steuerung des neuronalen Wachstums sind deshalb dringend erforderlich. In dieser Arbeit wurde dafür erstmalig die Möglichkeit der Nutzung von mikrostrukturierten Zellkulturbeschichtungen aus thermoresponsiven Polymeren (TRP) demonstriert. TRP-Beschichtungen können durch einfache Temperaturänderung von einem zellabweisenden in einen zellattraktiven Zustand geschaltet werden (Okano et al., 1995). Dies erlaubt, beliebige Bereiche des Zellkultursubstrates im Laufe der Kultivierung zugänglich oder unzugänglich zu schalten,

wodurch das Auswachsen von neuronalen Zellen oder ihrer Fortsätze örtlich und zeitlich kontrolliert werden kann.

Mikrostrukturierte thermoresponsive Oberflächen wurden in dieser Arbeit konzipiert, und mit Mikrofertigungstechnologien erfolgreich hergestellt. Für die Etablierung eines Protokolls zur dynamischen Steuerung des neuronalen Wachstums und der neuronalen Vernetzung mit Hilfe dieser Substrate wurde die humane Zelllinie SH-SY5Y verwendet und das Protokoll später auf humane induzierte Neurone (iN) übertragen. Zwar sind die meist verwendeten Zellen für neuronale Zellkulturmodelle primäre Neurone aus der Maus oder Ratte (Kaech and Banker, 2006). Aus ethischen, praktischen, und auch aus Übertragbarkeitsgründen werden jedoch auch vielfach humane neuronale Zelllinien und zunehmend humane iN verwendet (Gordon et al., 2013). Mikroskopische, immunozytochemische, und elektrophysiologische Analysen der Zellen auf den strukturierten thermoresponsiven Zellkultursubstraten zeigten zum einen die Anwendbarkeit der Methode für derartige Untersuchungen, und zum anderen die Vitalität der Zellen im Verlauf der Kultivierung auf den Substraten.

Für eine noch präzisere räumliche Kontrolle der Oberflächenzugänglichkeit und damit des Auswachsens der Zellen wurde darüber hinaus eine Möglichkeit für ein lokales Schalten der TRP-Beschichtung in der Größenordnung der Zelle mittels lokaler Heizung der Substratoberfläche entwickelt. Die lokale Heizung wurde über die Erzeugung Joulescher Wärme durch Heizwiderstände bzw. Mikroelektroden realisiert, welche unterhalb der TRP-beschichteten Substratoberfläche integriert wurden. Für eine lokale Begrenzung der Temperaturerhöhung sind steile Temperaturgradienten von großer Bedeutung. Dafür wurden die Mikroelektroden in dieser Arbeit bezüglich Geometrie und Materialien optimiert. Wichtige Parameter für eine effektive Wärmeabfuhr sowie die lokal definierte Entstehung von Joulescher Wärme wurden systematisch untersucht und herausgearbeitet.

Zur Optimierung der Mikroelektroden mussten die generierten Temperaturprofile auf der Oberfläche mittels Thermometrie evaluiert werden. An die Temperaturmessmethode ergaben sich aufgrund der experimentellen Rahmenbedingungen mehrere Anforderungen: die Temperaturmessungen sollten 1) nicht nur im Trockenen, sondern auch im Flüssigen, 2) nah an der Oberfläche (im Bereich von 1 μm), 3) mit einer hohen örtlichen Auflösung (μm -Bereich) 4) mit einer hohen Temperaturentauflösung (besser als 1 $^{\circ}\text{C}$) und 4) über größere Oberflächenbereiche hinweg möglich sein. Zudem sollte sie möglichst auf verschiedenen Oberflächen wie Glas, Gold und Indiumzinnoxid (Englisch: indium tin oxide, ITO) anwendbar sein. Da sich in der Literatur trotz eines breiten Spektrums an Temperaturmessmethoden keine Methode fand, die all diese Anforderungen zugleich hinreichend erfüllte, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine eigene fluoreszenzbasierte Temperaturmessmethode entwickelt (Behm et al., 2018). Diese basiert auf einem kommerziell erhältlichen Sol-Gel, welches den temperatursensitiven Farbstoff Rhodamin B (RhB) enthält. Die Temperaturprofile oberhalb der Mikroelektroden wurden außerdem mit Hilfe der Finite-Elemente-basierten Software COMSOL numerisch simuliert und mit experimentellen Messungen verglichen.

TRP-Beschichtungen von Zellkultursubstraten mit dem weit verbreiteten TRP Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) bzw. mit dem in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenglykol (PEG)-basierten TRP wurden bisher kaum bzw. gar nicht für die

Kontrolle von neuronaler Zelladhäsion angewendet (Takahashi et al., 2016; Uhlig et al., 2010). Verschiedene Zelltypen reagieren jedoch sehr unterschiedlich auf die TRP-Beschichtungen, was sich in unterschiedlichem Verhalten bezüglich Initialadhäsion, Ausbreitungszeit und Ablöseverhalten äußert (Uhlig et al., 2010). Für Anwendungen, in denen die Initialadhäsion der neuronalen Zellen auf der TRP-Beschichtung erforderlich ist, wurde die TRP-Beschichtung daher hinsichtlich einer verbesserten Adhäsion von neuronalen SH-SY5Y-Zellen optimiert. Dafür wurden gängige Methoden zur Optimierung der Adhäsion von Zellen wie die zusätzliche Beschichtung der TRP-Oberfläche mit Proteinen der Extrazellulären Matrix (EZM) wie Fibronectin oder Laminin mit der Koadsorption von TRP und Peptidsequenzen wie RGD oder YIGSR, welche als essentielle Bindesequenzen für Integrinrezeptoren bekannt sind (Saneinejad and Shoichet, 1998), verglichen.

2 Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Protokolls zur dynamischen Steuerung des Auswachsens von neuronalen Zellen und deren Vernetzung in vitro auf der Basis von mikrostrukturiert TRP-beschichteten Zellkultursubstraten. Hierfür sollte ein PEG-basiertes TRP verwendet werden, welches selektiv auf Goldoberflächen immobilisiert werden kann. Folglich sollte die TRP-Beschichtung über eine Strukturierung der Goldoberfläche strukturiert werden. Mit TRP-freien (d.h. goldfreien) Mikrostrukturen sollte die initiale Anordnung der neuronalen Zellen kontrolliert werden. Die Entwicklung des Protokolls zum kontrollierten Auswachsen der Zellen beinhaltete ein Protokoll für die Adhäsion und Kultivierung der neuronalen Zellen (SH-SY5Y Zelllinie und humane iN) innerhalb der TRP-freien Strukturen sowie das induzierte Auswachsen der Zellen und Neuriten durch ein Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand. Dazu gehörte auch die Untersuchung der Vitalität der Zellen auf den Substraten. Der zweite Teil der Arbeit adressierte die Entwicklung einer Methode zur lokalen Heizung der Substratoberfläche, um die TRP-Beschichtung lokal begrenzt zu schalten und damit das Protokoll zur kontrollierten Vernetzung der Neurone zu verbessern. Die dafür entwickelten Mikroelektroden wurden hinsichtlich Material, Geometrie und Umgebungsbedingungen für scharfe Temperaturgradienten optimiert. Zur Evaluierung der Temperaturprofile musste ein Protokoll zur Temperaturmessung auf der Oberfläche sowie numerische Simulationsmodelle etabliert werden. Schließlich sollte auch eine entsprechende Chipumgebung zur Kultivierung der Zellen bei gleichzeitigem Betrieb der Mikroelektroden gestaltet werden. Für andere Anwendungen der TRP-Beschichtung zur Kontrolle von Neuronen sollte außerdem die Initialadhäsion von neuronalen Zellen auf der TRP-Beschichtung optimiert werden.

3 Theoretische Grundlagen und Stand der Forschung

3.1 Methoden der Neurobiologie

3.1.1 Neurobiologische Untersuchungen an intakten Hirnstrukturen

Ein großer Teil der neurowissenschaftlichen Forschung basiert auf Tierversuchen. Versuche mit lebenden Tieren (*in vivo*) ermöglichen Untersuchungen am intakten Gehirn (Albright et al., 2000). Mit nicht-invasiven Methoden wie z.B. der funktionellen Magnetresonanztomografie können Veränderungen oder Aktivitäten bestimmter Areale während bestimmter Verhaltensweisen oder Krankheitsverläufe untersucht werden und mit invasiven Methoden können Neurone elektrophysiologisch abgeleitet oder mittels Optogenetik hinsichtlich ihrer Aktivität manipuliert werden (Deisseroth, 2015; Hyung Lee, 2018). Detailliertere Untersuchungen finden darüber hinaus häufig mit ca. 100–500 µm dicken Hirnschnitten (*ex vivo*) statt, bei denen neuronale Netzwerke im physiologischen Gewebekontext erhalten bleiben. Sie können über einige Wochen kultiviert werden und elektrophysiologisch oder histologisch analysiert werden (Humpel, 2015). Elektrophysiologische Ableitungen werden allgemein mit der Patch-Clamp-Technik (Neher and Sakmann, 1976) oder mit Multielektroden-Arrays (MEAs) durchgeführt (Gross, 1979; Pine, 1980; Thomas et al., 1972). Mit diesen Methoden kann die Informationsverarbeitung in Form von elektrischen Signalen zwischen einzelnen Zellen oder Zellverbänden direkt verfolgt werden, weshalb sie enorm zum Verständnis der Kommunikation zwischen Neuronen beitragen. Die meist genutzten Spezies für Tierversuche sind Mäuse und Ratten, da bei ihnen die Auswirkung bestimmter Gene auf Hirnstrukturen und Verhaltensweisen mittels Genmanipulation (z.B. mit Hilfe der CRISPR-Cas Methode (Dow, 2015)) relativ einfach analysiert werden kann. Allerdings gibt es auch deutliche Spezies-Unterschiede zwischen Nagern und Menschen, sodass manche Ergebnisse schwer übertragbar sind (Ellenbroek and Youn, 2016). Da derartige Experimente auch mit dem Leiden und Töten der Tiere einhergehen, müssen sie auch aus der moralischen Verantwortung heraus stets ethisch abgewogen und gerechtfertigt werden (Shanks et al., 2009).

Weitere Nachteile von *in vivo*- und *ex vivo*-Methoden sind, dass Ergebnisse von unterschiedlichen Tieren und / oder unterschiedlichen Präparationen stark variieren können (Raimondo et al., 2017). Darüber hinaus sind die neuronalen Netzwerke sehr komplex und beinhalten eine Menge verschiedener Zelltypen, was die Interpretation der Messdaten erschweren kann. Zudem können Netzwerke in den Hirnschnitten beschädigt werden (Raimondo et al., 2017). Detaillierte Studien auf zellulärer oder gar molekularer Ebene sind mit diesen Methoden limitiert.

3.1.2 Neurobiologische Untersuchungen an isolierten Zellen

Dissoziierte Zellkultur-Systeme (*in vitro*) hingegen werden häufig für Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene verwendet. Diese Systeme sind weniger komplex, weshalb elektrophysiologische und histologische Analysen unkomplizierter sind (Meberg and Miller, 2003). Zudem können viele Einflussfaktoren besser kontrolliert werden und

ermöglichen so eine bessere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Ergebnissen. Die Zellen können außerdem leichter für weitere molekularbiologische Methoden wie DNA- oder Proteinanalysen prozessiert werden.

Oft handelt es sich um kortikale oder hippocampale primäre Neurone aus der Maus oder Ratte, die frisch aus dem Hirngewebe gewonnen werden können. Diese Kulturen umfassen meist unterschiedliche neuronale Subtypen sowie Gliazellen (Hasan et al., 2016). Da sie ausdifferenziert sind, teilen sie sich nicht mehr und lassen sich daher nur für begrenzte Zeit kultivieren. Im Gegensatz dazu stehen Zelllinien aus Tumorgewebe, welche sich unbegrenzt vermehren und häufig in einen neuronalen Phänotyp differenzieren lassen, wie zum Beispiel SH-SY5Y-Zellen, NT2-Zellen (NTera, human neuronally committed teratocarcinoma cell line), PC12-Zellen (rat, heochromocytoma of the adrenal medulla) sowie murine embryonale Stammzelllinien wie F9 und P19 (Gordon et al., 2013). SH-SY5Y-Zellen zum Beispiel lassen sich in neuronale Zellen mit morphologischen und biochemischen Eigenschaften ähnlich zu reifen, humanen Neuronen differenzieren (Encinas et al., 2000; Kovalevich and Langford, 2013). Ein Nachteil von Zelllinien ist, dass sie aufgrund der Immortalisierung leicht veränderte Eigenschaften besitzen (Gordon et al., 2013). Humane embryonale Stammzellen und zunehmend auch induzierte pluripotente Stammzellen (Englisch: induced pluripotent stem cells, iPSCs), welche zu spezifischen neuronalen Zelltypen differenziert werden können, werden ebenfalls für neurowissenschaftliche Studien verwendet. Die humanen iPSCs haben den Vorteil, dass sie Patientenspezifisch aus somatischen Zellen gewonnen werden können (Yang et al., 2011). Ergebnisse von humanen Zellen können besser auf den Menschen übertragen werden und Tierversuche können so vermieden oder reduziert werden.

Der Nachteil von klassischen dissoziierten neuronalen Zellkulturen im Allgemeinen ist, dass die natürlichen Gewebebedingungen *in vitro* nur unzulänglich nachgebildet werden können und die gerichtete definierte Vernetzung der Zellen verloren geht.

3.1.3 Polarisierung neuronaler Zellen

Allen neuronalen Zellen gemein und eines ihrer wichtigsten Merkmale ist die funktionale Polarisierung der Zellen in Zellkörper, Axone und Dendriten, welche der gerichteten Signaltransmission zugrunde liegt. Beispielsweise werden Signale über mehrere Dendriten empfangen, im Zellkörper integriert und – im Falle von Überschwelligkeit – über ein einzelnes Axon an die nächste(n) Zelle(n) weitergeleitet. Schnittstellen zwischen Axonen und Dendriten sind die Synapsen, an denen die Signaltransmission von der einen zur nächsten Zelle stattfindet (Albright et al., 2000). Axone und Dendriten lassen sich sowohl morphologisch (Bartlett and Banker, 1984a, 1984b) als auch molekular aufgrund unterschiedlicher Proteine des Zytoskeletts (Caceres et al., 1984; Shaw et al., 1985) unterscheiden. So finden sich beispielsweise die zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine gehörenden Proteine MAP-2 nur in Dendriten und Tau vorwiegend in Axonen (Dotti et al., 1988; Wood et al., 1986).

Auch *in vitro* bilden neuronale Zellen die polarisierte Morphologie aus. Hippocampale Neurone zum Beispiel bilden in den ersten 24 Stunden der Kultivierung zunächst viele kurze Neuriten aus, von denen ein Neurit in den darauf folgenden Stunden schneller und

länger wächst und zum Axon wird (Dotti et al., 1988). Stenger et al. sowie einige weitere Gruppen zeigten darüber hinaus, dass die Polarisierung in vitro gesteuert werden kann, indem nur einem Neuriten die Möglichkeit geboten wird, entlang eines langen adhäsiven Pfades auszuwachsen (Stenger et al., 1998; Tomba et al., 2014; Yamamoto et al., 2012). Diese Ergebnisse liegen auch dem Konzept der in dieser Arbeit entwickelten Mikrostrukturen zu Grunde.

3.2 Adhäsion und Migration von neuronalen Zellen

Im sich entwickelnden Nervensystem migrieren Neurone in vivo entweder entlang der langen Fortsätze von Radialen Gliazellen, entlang von anderen Axonen oder Zellen, oder entlang der EZM. Die Migration beinhaltet zunächst die Adhäsion auf den Oberflächen. Extrazelluläre Signale initiieren schließlich die Neuordnungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Marín et al., 2010). Auch das Auswachsen von Axonen und die Wegfindung an das spezifische Ziel erfolgt in vivo entlang von anderen Zellen, Axonen und der EZM. Der Wachstumskegel nimmt dabei extrazelluläre Führungssignale über Rezeptor-Liganden-Interaktionen wahr und über aktive motorische Strukturen wird die Verlängerung der Axone vorangetrieben. Die Liganden, welche als Führungssignale dienen, können Membran-, EZM-gebunden oder löslich sein, und attraktiv oder abweisend wirken (Tahirovic and Bradke, 2009).

3.2.1 Zytoskelett

Prozesse wie Polarisierung und Migration sind mit einer Reorganisation des Zytoskeletts verknüpft. An der Organisation der Plasmamembran sind vor allem Mikrofilamente (Aktin Polymere) beteiligt. Filopodien und Lamellipodien sind Membranausstülpungen (beim Axon im Wachstumskegel), über welche die Adhäsion und Migration (bzw. das Axonwachstum) initiiert wird, wobei ein schneller Auf- und Abbau der Aktinfilamente schnelle Veränderungen des Zytoskeletts erlaubt. Die langen, stabförmigen Filopodien sind besonders beweglich und tasten die Umgebung weit vor dem zentralen Wachstumskegel (Dent and Gertler, 2003). Spezialisierte Regionen, die Fokalkontakte (oder Fokale Adhäsionen), bilden bei entsprechenden Möglichkeiten zur Adhäsion einen Anker zum Substrat und sind mit besonders vielen Molekülen für Zell-Matrix-Interaktionen und Signaltransduktionswege ausgestattet (Dent and Gertler, 2003). Über Zelladhäsionsproteine binden die Zellen an andere Zellen oder an die EZM. Die Adhäsion an andere identische oder unterschiedliche Zellen erfolgt vorwiegend über homophile und heterophile Interaktionen mit Cadherinen oder Immunoglobulinen (NCAM, L1, TAG1). Die Adhäsion der Zellen an die EZM wird über Integrinrezeptoren vermittelt. Wichtige Komponenten der EZM sind zum Beispiel Kollagen (Typ I und IV), Fibronectin und für Neurone vor allem Laminin (Albright et al., 2000). Innerhalb der Peptidkette dieser EZM-Proteine wurden Zell-bindende Regionen identifiziert, welche als minimale Sequenz für die Erkennung durch Integrinrezeptoren gelten, wozu die RGD-Sequenz ((Arg-Gly-Asp) z.B. aus Fibronectin; (Hersel et al., 2003)) und die YIGSR- und IKVAV-Sequenz (aus Laminin, (Graf et al., 1987; Jucker et al., 1991; Yamada and Kleinman, 1992)) gehören. Die IKVAV-Sequenz auf der A-Kette des Laminin unterstützt

zum Beispiel das Neuritenwachstum, während die YIGSR-Sequenz auf der B1-Kette die Zelladhäsion fördert (Graf et al., 1987; Saneinejad and Shoichet, 1998).

3.2.2 Interaktionen über Integrinrezeptoren

Integrine bestehen aus Typ 1 Transmembran Glycoproteinen, wobei 8 β - und 18 α -Untereinheiten in Säugern zu einer großen Diversität der Integrine beitragen. Bindestellen für Liganden, wie die RGD-Sequenz oder Laminin-spezifische Sequenzen, liegen innerhalb der großen extrazellulären Domänen (Bökel and Brown, 2002). Die cytoplasmatische Domäne hingegen ist über verschiedene Vermittlerproteine wie Talin und Vinculin mit dem Aktin Zytoskelett verbunden. Integrine tragen nicht nur zur Adhäsion bei, sondern vermitteln als Rezeptoren auch Signale zwischen außen und innen. Mittels Adapterproteinen (wie Talin, Paxilin und Vinculin) und Tyrosinkinasen (wie src-Kinasen oder Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK)) kontrollieren Integrine über verschiedenste Signalkaskaden diverse Zellfunktionen wie Adhäsion, Migration, Proliferation (Zellzyklus), Zellüberleben, und Differenzierung (Miranti and Brugge, 2002). Die genauen Mechanismen und Signalkaskaden sind dabei weiterhin Gegenstand der Forschung. Kleine GTPasen der Rho-Proteine, wie Cdc42, Rac und Rho kontrollieren die Organisation des Aktin Zytoskeletts. Insgesamt sind über 60 Proteine in die Interaktionen zwischen Integrinen und Aktin involviert (Bökel and Brown, 2002). Schließlich folgt aus der Interaktion mit Aktin auch eine Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts und folglich eine Veränderung der Zellform oder Bewegung.

Frühe Studien zur Auswirkung von Laminin auf das Axonwachstum *in vitro* zeigten, dass die Polarisierung und insbesondere das Axonwachstum durch eine starke Adhäsion gefördert werden (Letourneau, 1975a). Die Wechselwirkung von Integrinrezeptoren mit Laminin ist auch an der Formation und Orientierung von Neuriten, an der Wegfindung der Axone, sowie der synaptischen Formation und Plastizität beteiligt (Lei et al., 2012). Einige spezifische Signalkaskaden-Proteine wie zum Beispiel Par Proteine und kleine GTPasen (Rap1B und Cdc42) wirken über Effektorproteine auf die Aktinpolymerisierung, und sind für die Aufrechterhaltung der Polarisierung von Bedeutung (Jiang and Rao, 2005). Ob bei der Polarisierung das Axonwachstum der Spezifikation zum Axon vorangeht oder anders herum ist jedoch nicht vollständig geklärt, wobei einiges auf die erste Version hindeutet (Jiang and Rao, 2005; Yamamoto et al., 2012). Darüber hinaus gibt es heute unzählige Studien zur Auswirkung von EZM-Proteinen wie Kollagen, Laminin, aber auch anderen verschiedenen Oberflächenproteinen wie NCAM, N-Cadherin, oder Neurexin auf neuronales Wachstum, Axonspezifikation und Synapsenbildung *in vitro* (Beispiele: (Czöndör et al., 2013; Esch et al., 1999).

3.2.3 Wechselwirkung neuronaler Zellen mit Oberflächen *in vitro*

Die initiale Anhaftung von Zellen kann *in vitro* neben einer Beschichtung mit EZM-Proteinen auch durch weitere Oberflächeneigenschaften wie zum Beispiel Oberflächentopografie, bestimmte funktionelle Gruppen (z.B. Carboxyl-, Amino- oder Hydroxylgruppen) oder elektrische Ladungen kontrolliert werden (Roach et al., 2007). Positiv geladene, artifizielle Peptide oder Polymere wie Poly-L-Lysin (PLL), Polyornithin oder Polyethylenimin (PEI) werden zum Beispiel genutzt, um die elektrostatische

Abweisung zwischen der negativ geladenen Substratoberfläche und der negativ geladenen Zelloberfläche zu reduzieren (Yavin and Yavin, 1974). Allerdings spielen Matrixbestandteile oder Proteine, die von den Zellen sezerniert werden oder aus der Lösung (zum Beispiel serum-haltigem Medium) an die Oberfläche binden, bei der langfristigen Adhäsion bzw. für das weitere Überleben der Zellen eine essentielle Rolle, da nur sie die rezeptorvermittelten Signalkaskaden auslösen. Langfristig wird die Adhäsion von Zellen an Oberflächen also über Proteine vermittelt. Daher zielt die Gestaltung der Oberflächeneigenschaften vorwiegend auf die Fähigkeit der Adsorption von Proteinen ab, welche durch hydrophobe van-der-Waals-Wechselwirkungen, elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt wird. Diese Interaktionen werden wiederum davon beeinflusst, wie stark die Eigenschaften der Oberfläche eine Anlagerung von Wassermolekülen und die Ausbildung einer Wasserhülle fördern (Roach et al., 2007). Für manche Anwendungen wird auch eine minimierte Protein- und Zelladhäsion angestrebt. Sehr häufig wird hierfür eine Beschichtung mit dem zellverträglichen Polymer PEG verwendet. Zum Mechanismus, welcher hierbei zur geringen Proteinadsorption führt, existieren detaillierte Modelvorstellungen. PEG-Moleküle sind stark hydratisiert, d.h. von einer Hydrathülle umgeben, relativ beweglich und durch entropische Abstoßung wird die Adhäsion von Proteinen und Zellen erschwert. Die geringe freie Grenzflächenenergie zwischen PEG und Wasser spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle (Gombotz et al., 1991; Jeon et al., 1991). Weitere verwendete zellabweisende Materialien sind z.B. Albumin, Agarose, oder Pluronic (Corey et al., 2010; Hammarback and Letourneau, 1986; Suzuki et al., 2005).

3.3 Neuronale Netzwerke in vitro

Die Zellform und Polarisierung, sowie die Art der Vernetzung der neuronalen Zellen haben einen großen Einfluss auf die Funktion der neuronalen Zellen bzw. neuronaler Netzwerke. Aufgrund dieser speziellen Beziehung zwischen Form und Funktion ist die Kontrolle des Zellwachstums, der Polarisierung und der Vernetzung in der Zellkultur für Neurone von herausragender Bedeutung. Zelluläre Reaktionen auf bestimmte Faktoren oder Medikamente können mittels strukturierter Zellkultursubstrate zum Beispiel für pharmakologische Tests genauer untersucht werden (Hardelauf et al., 2011). Im Bereich der regenerativen Therapien wird zum Beispiel ein gerichtetes Auswachsen von Axonen in Gewebekulturen angestrebt, mit Bedeutung für die Heilung von neurologischen Schäden wie traumatischen Verletzungen (z.B. Querschnittslähmung) oder neurodegenerativen Krankheiten (Cullen et al., 2012; Takahashi et al., 2016). Das Wissen über die Interaktion von neuronalen Zellen mit verschiedenen Materialeigenschaften kann auch für die Entwicklung von Implantaten hilfreich sein. Definierte Netzwerke mit bekannten Verbindungsrichtungen können durch Analysen der Antworten einzelner Zellen auf einen bestimmten Stimulus Aufschluss über Art und Weise der Informationsverarbeitung- und Speicherung geben (Feinerman et al., 2008; Wyart et al., 2002). Zudem können Mechanismen von Neuropathologien wie zum Beispiel in Alzheimer die trans-synaptische Übertragung von pathologischen Merkmalen (z.B. Ablagerungen des β -Amyloid-Peptids) im Detail untersucht werden (Deleglise et al., 2014).

Um Neurone und ihre Netzwerke zu strukturieren, kommen sowohl topografische als auch chemische Modifikationen der Oberfläche in Betracht. Vor allem für letztere werden die Möglichkeiten zur Kontrolle der Adhäsion von neuronalen Zellen mit zellattraktiven und zellabweisenden Bereichen genutzt.

3.3.1 Chemische Oberflächenstrukturierung

Letourneau zeigte schon früh mit gitterförmig aufgebrachtem Palladium auf unterschiedlichen Substratoberflächen, dass das Axonwachstum am stärksten auf Oberflächen ausgeprägt ist, auf denen die Adhäsion am stärksten ist (Abb. 3-1 A, (Letourneau, 1975b)). In einem anderen Ansatz wurden Mikroinseln (300–500 µm groß) aus Kollagen vor einem Polystyrol-Hintergrund für Neurotransmitter-Studien an darauf ausgesäten einzelnen Neuronen und deren Autosynapsen eingesetzt (sogenannte Autapsen; Abb. 3-1 B; (Furshpan et al., 1976)). Diese Methode ist inzwischen weit verbreitet und weiterentwickelt worden (Allen, 2006). Für die Nutzung der Fotolithografie-Technik zur Strukturierung der Oberfläche mit Silanen in hydrophobe und hydrophile Bereiche und damit zur Strukturierung von neuronalen Netzwerken sind die Arbeiten von Kleinfeld et al. ein frühes und prominentes Beispiel (Abb. 3-1 C, (Kleinfeld et al., 1988)).

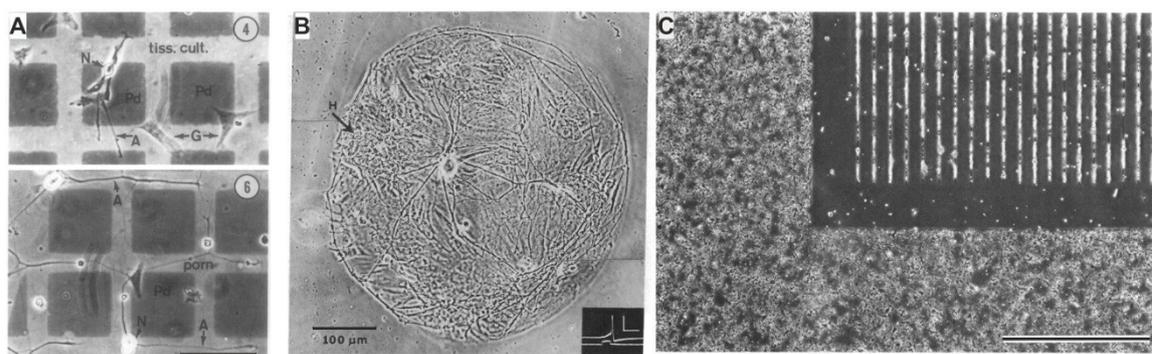


Abb. 3-1 Frühe Beispiele der chemischen Oberflächenmodifikation für die Eingrenzung neuronaler Zellen in Kultur. (A) Kultivierte sensorische, embryonale Hühner-Ganglionneurone auf reiner bzw. mit Polyornithin (porn.) beschichteter Zellkulturoberfläche (tiss. cult.), auf die 80 µm große Quadrate von Palladium (Pd) aufgedampft wurden. Neurone wuchsen bevorzugt auf porn. und Gliazellen gegenüber Pd, und auf Pd gegenüber tiss.cult.. Maßbalken, 100 µm (Letourneau, 1975b) (B) Einzelnes autaptisches hippokampales Neuron auf Gliazellen-Rasen nach 19 Tagen in Kultur auf Mikroinseln aus Kollagen vor Polystyrol-Hintergrund. Maßbalken, 100 µm (Furshpan et al., 1976). (C) Cerebellum-Neurone nach 2 Tagen in Kultur auf 10 µm weiten Linien aus Amino-Silan (EDA-P) mit einem Hintergrund aus Alkyl-Silanen (n-Tetradekan) und einem Feeder-Zellrasen in der Umgebung der Strukturen. Maßbalken, 1000 µm (Kleinfeld et al., 1988)

Heute gibt es vielzählige, verschiedene Techniken und Methoden zur chemischen Strukturierung von Oberflächen (Hasan et al., 2016; Wheeler and Brewer, 2010). Dafür genutzte Substanzen sind zum Beispiel hydrophobe Alkyl-, und hydrophile Amino-Silane auf Glas und deren Thiol-Äquivalente auf Gold (Kleinfeld et al., 1988; Matsuzawa et al., 1993). Weitere gängige Substanzen sind PEG, PLL, Polymere und Proteine sowie Peptidsequenzen wie RGD, YIGSR oder IKVAV (Dermutz et al., 2014; Saneinejad and Shoichet, 1998; Withers et al., 2006; Wyart et al., 2002).

Häufig verwendete Techniken zur Strukturierung dieser Substanzen sind Fotolithografie und UV-basierte Techniken, aber auch Mikrokontaktdruck und Mikrofluidik (Lom et al.,

1993; Millet and Gillette, 2012b; Scott et al., 2012; Singhvi et al., 1994; Vielmetter et al., 1990). Vor allem in Verbindung mit MEAs wurden viele Strukturierungsmethoden entwickelt. Daher gehören zu den Substraten neben Glas vor allem Metalle der MEAs (Gold, Platin, ITO, Titan), oder deren Passivierungsmaterial (Siliziumnitrid, Siliziumdioxid, Polyimid, Polydimethylsiloxan (PDMS)) (Wheeler and Brewer, 2010).

Viele dieser Methoden dienen zur Strukturierung von großen Zellgruppen. Jedoch wurden Neurone in einigen Ansätzen auch auf Einzelzellbasis strukturiert, und damit wichtige Erkenntnisse zum Beispiel zur Polarisierung gewonnen (siehe 3.1.3). Dafür wurden asymmetrische Strukturen aus Silanen oder Proteinen fotolithografisch oder per Mikrokontaktdruck auf zellabweisendem Hintergrund erzeugt (Abb. 3-2). Diese Strukturen bestehen zum Beispiel aus einem kleinen adhäsiven Feld für die Adhäsion der Zellkörper (14–25 μm Durchmesser), von welchem zwei oder mehrere schmale, adhäsive Pfade (1–6 μm Breite) in unterschiedliche Richtungen entspringen, und von denen nur einer besonders lang ist bzw. ungebremstes Auswachsen der Neuriten und folglich eine Differenzierung in Axone ermöglicht (Stenger et al., 1998; Tomba et al., 2014; Yamamoto et al., 2012).

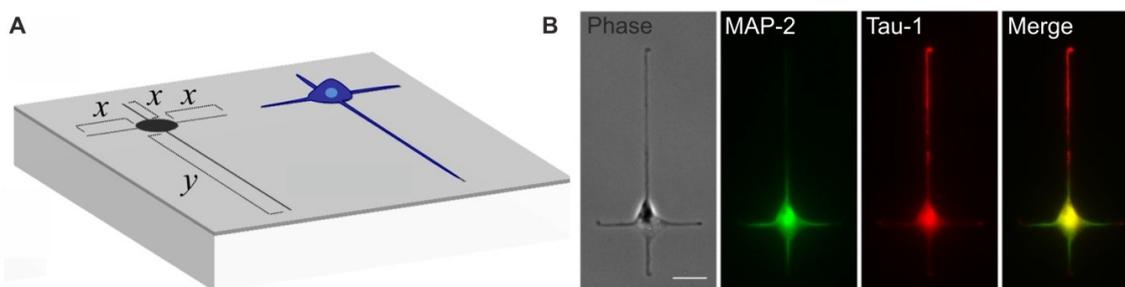


Abb. 3-2 Strukturierte Zellkultursubstrate zur Untersuchung der Polarisierung. (A) Schematische Darstellung der Strukturen mit zellattraktiven Aminosilanen auf zellabweisendem Alkylsilan-Hintergrund. Adhäsives Feld mit 15 μm Durchmesser für die Zellkörper und drei kurzen (20 μm) sowie einem langen (100 μm) Pfad mit 1 μm Breite für das Neuritenwachstum. (B) Immunocytochemische Färbung eines hippocampalen Neurons nach 2 Tagen in Kultur auf den Strukturen. MAP-2 ist ein Marker für Zellkörper und Dendriten und Tau-1 ein Marker für Axone. Maßbalken, 20 μm (aus (Yamamoto et al., 2012))

3.3.2 Topografische Oberflächenstrukturierung

Neben den chemischen dienen auch topografische Signale zur Strukturierung von neuronalen Zellen auf Substraten. Topografische Modifikationen der Oberfläche im Nanometer-Bereich können zur Orientierung der Zellen genutzt werden (Khan and Newaz, 2010). Im mikroskopischen Bereich dagegen wurden Zellen physikalisch begrenzt vor allem auf MEAs kultiviert, zum Beispiel mit Mikrokanälen aus Fotolack (Merz and Fromherz, 2005), mikroskopischen Begrenzungspfählen aus Polyimid (Zeck and Fromherz, 2001), Kammern oder Vertiefungen aus Silizium (Maher et al., 1999), Parylen (Erickson et al., 2008) oder Agarose (Suzuki et al., 2004), oder Tunneln aus PDMS (Morin et al., 2006). Große Popularität erhielt der von Taylor entwickelte Mikrofluidik-Ansatz zur physikalischen Eingrenzung von neuronalen Zellkörpern und Axonwachstum (Park et al., 2006; Taylor et al., 2003, 2005), welcher auf einer ersten von Campenot stammenden Zweikompartimenten-Kammer zur physischen Trennung von Soma und Axon basiert, die für wichtige biochemische Studien genutzt wurde

(Campenot, 1977). Für die Mikrofluidik-Kammern wurden mit der Soft-Lithografie-Technik, basierend auf PDMS, zwei Zellkulturkammern für die Zellkörper (einige mm lang) erzeugt, welche durch Mikrokanäle für das Axonwachstum (wenige μm hoch und breit, und einige 100 μm lang) getrennt waren (Park et al., 2006; Taylor et al., 2003, 2005). Mit dieser und ähnlichen Methoden konnten sogar Verbindungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen hergestellt werden (Brewer et al., 2013; Kanagasabapathi et al., 2012).

3.3.3 Netzwerke mit direktionalen Verbindungen

Ein wichtiger Aspekt von neuronalen Verbindungen ist die gerichtete Signaltransmission, welche über die Polarisierung der beteiligten Zellen bestimmt wird. Die unidirektionale Signaltransmission liegt der fein abgestimmten Informationsverarbeitung neuronaler Netzwerke zu Grunde. Für die Kontrolle der unidirektionalen Transmission *in vitro* muss das Axonwachstum in seiner Richtung gesteuert werden. Dies ist sowohl mit topografischen als auch mit chemischen Oberflächenstrukturen bereits gezeigt worden.

Durch Adaptionen der oben beschriebenen mikrofluidischen Methode von Taylor sind unidirektionale Netzwerke erzielt worden. Dafür wurden Zellen zum Beispiel zeitlich versetzt in die Zellkulturkammern ausgesät, sodass die zuerst ausgesäten Zellen ihre Axone bereits entlang der Mikrokanäle ausstrecken und auf die später ausgesäten Zellen projizieren konnten (DeMarse et al., 2016; Pan et al., 2011, 2015). Alternativ wurde das Axonwachstum entlang der Mikrokanäle nur in eine Richtung zugelassen, indem die Kanäle asymmetrisch geformt waren (Abb. 3-3, (le Feber et al., 2015; Gladkov et al., 2017; Peyrin et al., 2011; Renault et al., 2016)). Durch Aussäen verschiedener Zelltypen, z.B. kortikaler und hippocampaler Neurone in die verschiedenen Zellkulturkammern, konnten direktionale Verbindungen auch zwischen Zellpopulationen unterschiedlichen neuronalen Zelltyps hergestellt werden (Deleglise et al., 2014; Peyrin et al., 2011; Renault et al., 2015).

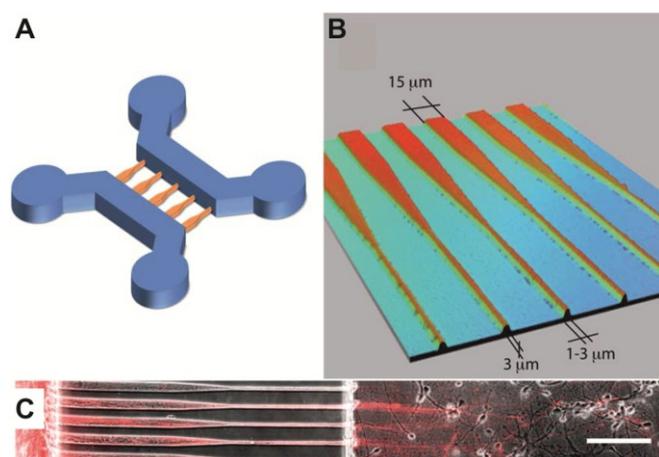


Abb. 3-3 Mikrofluidische Zellkulturkammern zur Richtungskontrolle der neuronalen Verbindungen. (A) Schematische 3D-Darstellung der Zellkulturkammern (blau) mit asymmetrischen Mikrokanälen für das Axonwachstum (orange). (B) Detailliertere Ansicht der asymmetrischen Mikrokanäle mit 15 μm weiten Eingängen und 1-3 μm weiten Ausgängen. (C) Phasenkontrast-Bild kombiniert mit Epifluoreszenzbild des generierten neuronalen Netzwerkes nach 8 Tagen in Kultur. Kortikale Neurone in der linken Kammer wurden mit dem m-Cherry Sindbis Virus Vektor transduziert, um

die Projektion der Axone in die rechte Kammer sichtbar zu machen, während striatale Neurone in der rechten Kammer nicht gefärbt wurden. Maßbalken, 50 μm (Peyrin et al., 2011)

Der Nachteil von geschlossenen mikrofluidischen Methoden ist, dass sie für die standardmäßig verwendete Patch-Clamp-Methode zur intrazellulären elektrophysiologischen Ableitung der Neurone in der Regel nicht zugänglich ist (Albers and Offenhäusser, 2016). Mit der Patch-Clamp-Technik sind jedoch hochaufgelöste Untersuchungen z.B. zu Effekten von Substanzen oder Neurotransmittern auf einzelne Neurone oder sogar einzelne Ionenkanäle möglich. Solche Untersuchungen, die auch unterschwellige elektrophysiologische Vorgänge einbeziehen, sind für detaillierte Studien zu neuronalen Prozessen der Informationsverarbeitung in definierten Netzwerken von großer Bedeutung (Spira and Hai, 2013). Außerdem sind geringe Zelldichten, wie sie für detaillierte Untersuchungen an einzelnen Zellkompartimenten benötigt werden, mit primären Neuronen in diesen mikrofluidischen Systemen nur unter bestimmten Bedingungen kultivierbar (Millet et al., 2007). Einzelne Zellen oder kleine Zellcluster wurden aus diesem Grund bisher eher selten vernetzt, und wenn dann mit relativ großem Präparationsaufwand (Dinh et al., 2014).

Mit chemisch strukturierten Substraten wurden direktionale Verbindungen dagegen nicht nur zwischen neuronalen Zellpopulationen (Albers and Offenhäusser, 2016; Feinerman et al., 2008), sondern auch zwischen einzelnen neuronalen Zellen hergestellt (Roth et al., 2012; Yamamoto et al., 2016). Ein eindrucksvolles Beispiel von Yamamoto et al. basiert auf den oben beschriebenen statischen Polarisationsstrukturen (Yamamoto et al., 2016). Diese Polarisationsmuster wurden in einem Abstand von 10 μm entlang der langen Pfade für Axone aneinandergereiht (Abb. 3-4). Einzelne primäre Neurone wurden auf diesen Strukturen angeordnet und polarisierten in der vorgesehenen Richtung. Die Zellen verknüpften sich mit benachbarten Zellen entlang der langen Pfade, und die Autoren konnten mit der Patch-Clamp-Methode sogar unidirektionale Signaltransmission zeigen. Allerdings wuchsen viele der Axone (ca. 30 %) in die entgegengesetzte Richtung, wodurch die Transmissionsrichtung nicht sicher vorhergesagt werden konnte. Dies schränkt die Verlässlichkeit der Methode für Studien, in denen unidirektionale Verbindungen dringend vorausgesetzt werden, ein. Das zugrundeliegende Problem ist, dass der Spalt mit zellabweisendem Material prinzipiell für die Axone beider benachbarter Zellen gleichermaßen blockierend, aber auch überwindbar ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Axon also erst den Spalt überwindet und dann entlang des langen Pfades auswächst liegt immer noch bei 30 %.

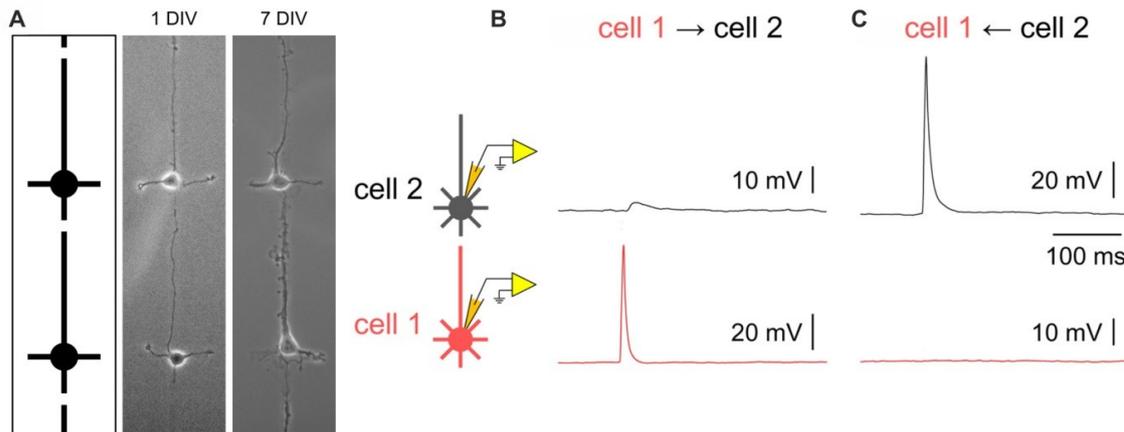


Abb. 3-4 Direktionale Signaltransmission zwischen einzelnen strukturierten primären Neuronen. (A) Schematische Darstellung der aneinander gereihten Strukturen mit Adhäsionsfeld und davon ausgehenden Pfaden, sowie Phasenkontrast-Bild mit darauf kultivierten hippocampalen Neuronen nach 1 und 7 Tagen in Kultur (1 und 7 DIV). (B und C) Doppel-Patch-Clamp Ableitungen der mikrostrukturierten Neurone nach 10 Tagen in Kultur zur Überprüfung der unidirektionalen Signaltransmission. Stimulation der Zelle 1 löste in Zelle 1 ein Aktionspotential aus und in Zelle 2 wurde ein erregendes postsynaptisches Potential (EPSP) beobachtet (B). Die Stimulation der Zelle 2 löste ebenfalls ein Aktionspotential in Zelle 2 aus, aber in Zelle 1 wurde kein EPSP beobachtet (C). (Yamamoto et al., 2016)

3.3.4 Dynamische Steuerung von Axonwachstum

Ein Lösungsansatz für das oben genannte Problem sind flexible Mikrostrukturen, die durch zeitlich und räumlich kontrollierte Änderung der Oberflächeneigenschaften geschaffen werden und so eine dynamische Steuerung des Axonwachstums erlauben. Zuvor unzugängliche Bereiche können dann zugänglich geschaltet werden, sobald die Axone der Zellen in die vorbestimmte Richtung ausgewachsen sind. Eine solche dynamische Steuerung des Axonwachstums wurde zum Beispiel mit einer dynamischen Modifikation der PEG-Oberflächenbeschichtung erreicht. Dabei wurde während der Kultivierung der Zellen die PEG-Beschichtung entlang eines schmalen Pfades zwischen zwei Adhäsionsfeldern entweder mit einer modifizierten Spitze eines Rasterkraft-Mikroskops (Englisch: atomic force microscope, AFM) durch PLL ausgetauscht (Dermutz et al., 2014) oder elektrochemisch mit Hilfe von integrierten ITO-Elektroden entfernt (Gabi et al., 2010). In ähnlicher Weise wurden Linien für Neuriten auch mit Hilfe eines Lasers in situ verlängert, durch photoaktivierte Hydrogele (Farrukh et al., 2018), Zerstörung der zellabweisenden Eigenschaften von photoreaktiven oder photosensiblen selbst-assemblierten Monoschichten (SAMs) (Edagawa et al., 2012; Yamamoto et al., 2011) oder Agaroseschichten in diesem Bereich (Suzuki et al., 2005). Ein anderer Ansatz zur dynamischen Steuerung des Axonwachstums in mikrofluidischen Kanälen war das An- und Ausschalten von elektrokinetischen Kräften, die das Axonwachstum wie eine immaterielle Schranke entweder hemmen oder zulassen (Honegger et al., 2013). Viele dieser Methoden erfordern allerdings eine aufwendige Ausrichtung und Abtastung der Bereiche, wie zum Beispiel mit modifizierten Spitzen eines AFMs oder präzisen UV- oder IR-Lasern, sowie Expertise mit anspruchsvollen Technologien. Eine verlässliche Kontrolle der Übertragungsrichtung ist mit diesen Methoden kaum gegeben und aktive synaptische Verbindungen wurden nur in wenigen Ansätzen nachgewiesen. Ein

alternativer, simpler Ansatz zur dynamischen Steuerung des Neuritenwachstums ist deshalb unbedingt erforderlich.

3.4 Stimuli-responsive Oberflächen

Ein eleganter Ansatz, um Zelladhäsion und –wachstum dynamisch zu steuern sind stimuli-responsive Oberflächen. Die Zugänglichkeit der Oberfläche für Zellen wird dabei während der Kultivierung durch einfaches Schalten eines Parameters wie pH oder Temperatur verändert (Mano, 2008; Robertus et al., 2010). Neben Zellkulturanwendungen werden stimuli-responsive Polymere auch für andere biomedizinische Anwendungen genutzt, wie zum Beispiel zur Wirkstofffreisetzung (Mano, 2008). Als Zellkultursubstrate sind solche mit einer Beschichtung aus TRP am meisten verbreitet (Nagase et al., 2018). Die TRP-Beschichtungen können von einem protein- und zellabweisenden Zustand in einen protein- und zellattraktiven Zustand geschaltet werden, indem die Temperatur auf dem Substrat auf einen Wert oberhalb der Phasenübergangstemperatur (Englisch: Lower Critical Solution Temperature, LCST) gebracht wird und vice versa (Kessel et al., 2010; Lutz et al., 2007). TRP-Beschichtungen wurden in diversen und faszinierenden zellbasierten Anwendungen implementiert (Sekine et al., 2013; Uhlig et al., 2016). Meist wird dabei das Schalten der TRP-Beschichtung in den zellabweisenden Zustand genutzt, um ganze Zellrasen von der Oberfläche abzulösen, ohne den enzymatischen Abbau von Zelloberflächenmolekülen z.B. durch Trypsin anzuwenden (Nagase et al., 2018). Dies nützt zum einen dem Erhalt von wichtigen Oberflächenproteinen für weitere Analysen. Zum anderen bleibt so auch die EZM erhalten, wodurch auch die Ablösung von Zellrasen samt EZM möglich wird, was sie zum Beispiel für einen Einsatz in regenerativen Therapien nutzbar macht (Nishida et al., 2004; Ohki et al., 2006; Sawa et al., 2012). Strukturierte TRP-Beschichtungen sind zum Beispiel für die Ko-Kultivierung verschiedener Zelltypen oder die Steuerung der Zellausbreitung entwickelt worden. Für die Strukturierung wurden beispielsweise Fotomasken (Tsuda et al., 2005), Fotolithographie (Takahashi et al., 2016) oder Mikrokontaktdruck (Uhlig et al., 2016) genutzt. Für die neuronale Zellkultur ist die bisher einzige bekannte Anwendung von strukturierten TRP-beschichteten Substraten die Herstellung von dreidimensionalem, anisotropem Nervengewebe mit Neuronen aus humanen iPSCs (Takahashi et al., 2015, 2016). Allerdings handelt es sich bei diesen Strukturen um lange Bahnen von 50–200 µm Breite für die Anordnung vieler Zellen entlang dieser Bahnen, wohingegen eine Strukturierung von TRP-Substraten in Dimensionen von einzelnen Zellen bisher nicht beschrieben wurde. Zudem wurde im beschriebenen Ansatz das Auswachsen der Neurite nicht dynamisch, sondern lediglich lokal kontrolliert.

3.4.1 Funktionsweise von TRP

TRP besitzen eine LCST, bei der sich die Löslichkeit in wässriger Lösung ändert. Das am häufigsten verwendete TRP ist PNIPAM, welches eine LCST von 32 °C hat. Nachteile von PNIPAM sind allerdings, dass der Phasenübergang nicht vollständig reversibel ist, und einige Amidgruppen in den Seitenketten des Polymers mit Proteinen interagieren können (Bianco-Peled and Gryc, 2004; Lutz et al., 2007; Wischerhoff et al.,

2008). Eine andere Art von TRP sind PEG-basierte TRP mit kurzen Oligo(ethylenglycol) (OEG)-basierten Seitenketten, wie das in dieser Arbeit verwendete Co-Polymer aus den Monomeren 2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylat (MEO2MA) und Oligo(ethylenglycol) methacrylat ((OEGMA), (Mertoglu et al., 2005)). Durch Änderung der Komposition der beiden Monomere, sowie durch die Änderung der OEG-Kettenlänge kann die LCST präzise eingestellt werden (Lutz et al., 2007; Uhlig et al., 2012; Wischerhoff et al., 2008). Für diese Arbeit wurde vorwiegend ein TRP mit einer LCST von 35,2 °C (Messung durch Trübungskurve mit 3 g/l in Phosphat gepufferter Salzlösung (Englisch: phosphate buffered saline, PBS) (Lutz et al., 2007)) verwendet.

Unterhalb der LCST liegt das TRP in einem expandierten, hydratisierten Knäuel-Zustand vor, und Proteine und Zellen können nicht adhären. Oberhalb der LCST dominieren dagegen die intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophobe Interaktionen, die Interaktion mit den Wassermolekülen wird aufgehoben und das Polymer liegt in einem kompakten, kollabierten Zustand vor. In diesem Zustand können Proteine und folglich auch Zellen über Wasserstoffbrückenbindungen adhären (Roy et al., 2013; Uhlig et al., 2012; Yamada et al., 1990).

Die hier verwendeten PEG-basierten Polymere können in Lösung synthetisiert und dann chemisorbiert werden. Sie sind an eine zentrale Disulfidgruppe gekoppelt, über welche die Polymere aufgrund der Reaktivität von Sulfuratomen gegenüber Goldatomen in einem „grafting-onto“ Prozess kovalent auf Goldschichten immobilisiert werden können (Uhlig et al., 2012; Wischerhoff et al., 2008). So entstehen Schichten aus sogenannten Bürstenpolymeren von wenigen Nanometern Schichtdicke (Uhlig et al., 2012). Dass eine Goldschicht zur Immobilisierung notwendig ist, schränkt die Anwendung dieser Polymere einerseits ein, da eine Goldschicht nicht für alle Anwendungen verwendbar sein mag, und die Anwendung von Goldschichten in der Durchlicht-Mikroskopie nur bei sehr dünnen Schichtdicken gegeben ist. Andererseits erlaubt die Goldschicht eine elegante Strukturierung der TRP-Schicht in Dimensionen von einzelnen Zellen (μm -Bereich), sowie extreme Verhältnisse der Strukturgrößen (sehr kleine Strukturen neben sehr großen Strukturen) und Aspektverhältnisse (Tiefe zu Breite) der Strukturen. Die mit der Goldstrukturierung einhergehende Strukturierung der TRP-Beschichtung im μm -Bereich wird in dieser Arbeit erstmalig vorgestellt.

3.4.2 Optimierung der TRP-Beschichtung für verbesserte Zelladhäsion

Thermoresponsive Substrate wurden für die Kultivierung von verschiedensten Zelltypen verwendet (Nagase et al., 2018; Uhlig et al., 2010). Das in dieser Arbeit verwendete TRP wurde ebenfalls zuvor für Zellkulturanwendungen etabliert, wobei unterschiedliche chemische Strukturen (Anteile der Monomere und Länge der Polymerketten) und Oberflächendichten des TRPs hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Zelladhäsion und Zellablösung untersucht wurden (Uhlig et al., 2012). Diese Etablierung erfolgte vorwiegend mit der Maus-Fibroblasten Zelllinie L929, welche kaum Zell-Zell-Kontakte ausbildet, weshalb sich Zell-Substrat-Interaktionen (Adhäsion und Abrundung) morphologisch gut erkennen und quantifizieren lassen (Uhlig et al., 2014). Allerdings reagieren verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf die TRP-Beschichtungen, was sich in unterschiedlichen Initialadhäsionen, Ausbreitungszeiten und unterschiedlichem Ablöseverhalten äußert (Okano et al., 1995; Uhlig et al., 2010, 2014). Einige wichtige

Zelltypen, wie neuronale Zellen, konnten mit den konventionellen TRP-Beschichtungen bisher nicht vernünftig prozessiert werden. Zur Optimierung der Adhäsion solcher Zelltypen, wurden bereits einige Ansätze vorgeschlagen. Eine sehr populäre Methode, um Zelladhäsion auf Oberflächen allgemein zu verbessern, ist die gezielte Beschichtung mit EZM-Proteinen. Auf Kollagen-PNIPAM-Polymer-Netzwerken konnte die Adhäsion und Ausbildung von Neuriten durch PC12-Zellen zum Beispiel mit höherem Kollagen-Gehalt verbessert werden (Doleski et al., 2010). Für Maus-Fibroblasten konnte die Adhäsion auf PNIPAM -Schichten durch Beschichtung mit Kollagen, Laminin oder PLL ohne Funktionalitätsverlust PNIPAM-Schicht verbessert werden (Moran et al., 2007). Für die PEG-basierten TRP-Beschichtungen wurde allerdings gezeigt, dass eine zu hohe Konzentration (ab $> 1 \mu\text{g/ml}$) der Proteinlösungen die Funktionalität der Schichten stark einschränkte (Uhlig, 2014). Auch Peptidsequenzen aus EZM-Proteinen, wie das RGD-Peptid können auf Oberflächen immobilisiert werden und die Adhäsion von Zellen verbessern. Für die PEG-basierten TRP-Substrate wurde zum Beispiel durch die Koadsorption von RGD-Peptiden eine verbesserte Zelladhäsion von Fibroblasten gezeigt (Uhlig et al., 2014). Die Adhäsion von neuronalen Zellen auf PEG-basierten TRP-Schichten wurde bisher nicht gezeigt.

3.5 Technologien zur lokalen Heizung von Oberflächen

Alle bisher dargestellten Anwendungen von TRP-Substraten sind darauf ausgelegt, die Temperatur des gesamten Substrats zu kontrollieren ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank, oder Raumtemperatur). Lokales Heizen von TRP-Substraten zur räumlich begrenzten Schaltung des TRPs wurde dagegen bisher kaum verwendet (Cheng et al., 2004, 2010). In einem Ansatz von Cheng et al. wurden fotolithografisch erzeugte Mikroheizfelder in der Größenordnung von $1 \times 1 \text{ mm}$ unterhalb der Substratoberfläche integriert, um thermoresponsive PNIPAM-Schichten räumlich begrenzt adhäsiv zu schalten (Cheng et al., 2004). Damit wurde eine ortsspezifische Adhäsion von zwei verschiedenen Zelltypen erzielt, allerdings mit relativ geringer örtlicher Auflösung im mm-Bereich.

3.5.1 Methoden für lokales Heizen

Der Einsatz von Joulescher Wärme durch Heizwiderstände ist nur eine der vielen Möglichkeiten, um Mikrosysteme zu heizen. Neben Joulescher Erwärmung kommen für die lokale Beheizung auch häufig Peltier-Elemente zum Einsatz. Mikro-Peltier-Elemente ($0,6 \times 0,6 \times 1 \text{ mm}^3$) wurden zum Beispiel für das Heizen und Kühlen von Nanoliter-Flüssigkeitsvolumen verwendet, um PCR-Reaktionen zu beschleunigen (Maltezos 2010). Auch Laser werden dank heutzutage erschwinglicher Laserdioden zunehmend zum Heizen in Mikrosystemen verwendet, wobei die örtliche Auflösung durch die Strahlgröße vorgegeben wird und zum Beispiel bei etwa $6 \mu\text{m}$ liegt (Miralles et al., 2013; Ohta et al., 2007). Ein computergesteuerter IR-Laser wurde auch genutzt, um TRP-Schichten in einem Bereich von $10 \mu\text{m}$ lokal zu heizen und Proteine damit strukturiert auf den Schichten anzulagern (Cheng et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit vor allem in der Mikrofluidik ist die Nutzung von endothermen und exothermen Reaktionen zur Temperaturkontrolle (Guijt et al., 2003). In den bisher beschriebenen Mikroheizsystemen kommen für die Temperaturregelung oft auch Thermosensoren und Kühlkörper zum

Einsatz, wie zum Beispiel Aluminium-Blöcke und durch ein Gebläse erzwungene Konvektion, wie sie auch in der Computerindustrie verwendet werden (Selva et al., 2010; Yang et al., 2002). Für ein direktes Heizen von Flüssigkeiten ohne externe Heizquelle werden zum Beispiel Mikrowellen eingesetzt (Issadore et al., 2009; Shah et al., 2007). Da jede neue Anwendung viele spezifische Anforderungen stellt, gibt es im Bereich Lab-on-a-Chip-Technologien anscheinend keinen Konsens für eine spezielle Heizmethode, wie von Miralles treffend formuliert (Miralles et al., 2013).

3.5.2 Lokales Heizen durch Joulesche Erwärmung

Heizmethoden mit Heizwiderständen, wie in dem Ansatz von Cheng et al. beschrieben, basieren auf der Jouleschen Wärmeentwicklung, d.h. der Wärme, welche durch den Stromfluss durch ein Material mit einem gewissen Widerstand freigesetzt wird. Diese Methode ist am weitesten verbreitet (Miralles et al., 2013) und wird nachfolgend genauer beschrieben.

Bei der Jouleschen Erwärmung besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Verlustleistung, welche sich aus der angelegten Spannung und dem Widerstand des Materials ergibt, und der erzeugten Wärmeenergie, entsprechend dem Jouleschen Gesetz:

$$Q_w = P \cdot t = I^2 \cdot R \cdot t = U^2 \cdot R^{-1} \cdot t \quad (3-1)$$

Die Wärmeenergie Q_w , die von dem Widerstand über die Zeit abgeführt wird, wird über die Leistung P als Integral über die Zeit t definiert, wobei die Leistung wiederum entsprechend des Ohmschen Gesetzes vom Quadrat des den Widerstand R durchfließenden Stromes I abhängt. Verwendete Materialien für Heizwiderstände in Mikrosystemen sind zum Beispiel Aluminium (Shu et al., 2005), Chrom (Selva et al., 2010), Nickel (Löw et al., 2008), Platin (Lao et al., 2000), Titan (Darhuber et al., 2010), Gold (Ginet et al., 2011), Silberpaste (Wu et al., 2009), oder ITO (Yin et al., 2009). Die Metalle werden zum Beispiel mittels Elektronenstrahl-Evaporation aufgedampft und mit Standard-Lift-Off-Prozessen strukturiert. Die erreichbaren Dimensionen für die Strukturen liegen dabei in Standardprozessen bei etwa 1–3 μm (Ginet et al., 2011; Löw et al., 2008).

Für die Anwendung von Heizwiderständen in flüssiger Umgebung ist eine elektrische Isolierung zwischen der Elektrode und der Flüssigkeit nötig. Zur Passivierung werden verschiedene isolierende Materialien verwendet (Faßbender et al., 2000), dazu gehören zum Beispiel SiO_2 (Darhuber et al., 2010), Schichtstapel aus SiO_2 , Si_3N_4 , SiO_2 („ONO“, (Faßbender et al., 2000; Rinklin et al., 2015)), Polyimid (Jiao et al., 2007; Rinklin et al., 2015), PDMS (Selva et al., 2010) oder Tetraethoxysilan (Shu et al., 2005).

Dimensionen von lokalen Heizbereichen

Lokal begrenzte Heizbereiche mit steilen Temperaturgradienten auf der Oberfläche sind notwendig, wenn biologische oder chemische Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen nebeneinander auf einer Oberfläche untersucht werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden scharfe Temperaturprofile angestrebt, um die TRP-

Beschichtung durch lokale Erwärmung der Oberfläche in einem eng begrenzten Bereich (Dimensionen im Mikrometerbereich) zu schalten, und damit die Zugänglichkeit für Neuriten zeitlich und räumlich zu steuern. Scharfe Temperaturprofile können zum Beispiel durch thermisch isolierte Heizwiderstände erzielt werden (Vakuumkammern, (Shu et al., 2005; Yang et al., 2004)). In der Studie von Shu et al. sollten zur Analyse der Zellreaktion bzw. zum Anordnen von Zellen geheizte Regionen beispielsweise nicht größer als 100 μm sein und durch scharfe Temperaturgradienten abgegrenzt sein. In vielen Ansätzen zur lokalen Heizung mit Heizwiderständen wird der Temperaturgradient jedoch kaum thematisiert, oder er erscheint anhand der thermografischen Bilder relativ breit (Cheng et al., 2004; Ginet et al., 2011; Rinklin et al., 2015).

3.6 Temperaturmessmethoden

Um die mit den Heizmethoden erzeugten Temperaturprofile evaluieren zu können, steht wiederum ein breites Spektrum an invasiven, semi-invasiven und nicht-invasiven Temperaturmessmethoden zur Verfügung (Childs et al., 2000). Bei den invasiven Methoden ist der Messfühler in direktem Kontakt mit der Probe, während bei nicht-invasiven Methoden aus der Ferne gemessen wird. Als semi-invasiv können solche Methoden bezeichnet werden, bei denen die Probe in bestimmter Weise behandelt wird, um eine Messung aus der Ferne zu ermöglichen (Childs et al. 2000).

3.6.1 Invasive Messungen

Vielfach werden Thermoelemente (Childs et al., 2000; Wang et al., 2009) und Widerstandsfühler (z.B. Platin-Widerstand, (Shu et al., 2005; Velve Casquillas et al., 2011)) zur Temperaturkontrolle in biomedizinischen Apparaturen verwendet. Solche Sensoren werden häufig auch für Feed-Back-Mechanismen genutzt (Hsieh et al., 2008; Velve Casquillas et al., 2011). Alternativ kann die Temperatur auch elektrochemisch über das freie Korrosionspotential der Elektrode gemessen werden, während diese in Lösung mit einem Redox-Paar liegt, da das Redox-Potential linear von der Temperatur abhängt (Yang et al., 2004). Bei allen beschriebenen Methoden beschränken sich die Messungen jedoch auf einen oder mehrere spezifische, vorab festgelegte Orte und unterbinden damit eine Darstellung der Temperaturverteilung über die gesamte geheizte Region.

3.6.2 Nicht-invasive Messungen

Eine kontinuierliche Messung der Temperaturverteilung auf einer Oberfläche wird mit nicht-invasiven Methoden wie der Infrarot (IR)-Thermometrie (Shu et al., 2005; Wang et al., 2013; Wu et al., 2009), oder der Raman-Thermometrie (Kuball et al., 2005; Pomeroy et al., 2005) möglich. Bei der IR-Thermometrie hängt die örtliche Auflösung von der Beugungsbegrenzung ab und liegt bei etwa 5 μm (Löw et al., 2008; Pomeroy et al., 2005). Die Temperaturentauung liegt oft zwischen 1 und 10 $^{\circ}\text{C}$ (Childs et al., 2000). Mit der Raman-Thermometrie ist eine höhere örtliche Auflösung von 1 μm oder weniger erreichbar. Die Temperaturentauung liegt allerdings eher im Bereich von 10 $^{\circ}\text{C}$ (Kuball et al., 2005; Pomeroy et al., 2005). IR- und Raman-Thermometrie ermöglichen zwar

örtliche Flexibilität, allerdings brauchen sie zum Scannen größerer Oberflächen relativ lange (Löw et al., 2008), und sie benötigen Expertise mit anspruchsvoller Technik. In Flüssigkeiten und / oder vor Metalloberflächen sind sie zudem fehlerbehaftet. Gründe dafür sind, dass Wasser die IR-Strahlung stark absorbiert, und der für die Messung erforderliche Emissionsgrad bei metallischen Oberflächen oft nicht genau bekannt ist, bzw. stark von der Temperatur und dem Oxidationsgrad abhängt (Shu et al., 2005; Vollmer and Möllmann, 2017). Raman Spektren sind ebenfalls ungeeignet für Temperaturmessungen auf Metallen, da die Intensität der gestreuten Strahlung aufgrund der niedrig-energetischen Gitterschwingungen (Phononen) in metallischen Oberflächen sehr schwach ist (Kuball et al., 2005; Löw et al., 2008). Im Nanobereich wird auch häufig die thermische Rastermikroskopie (Scanning Thermal Microscopy, SThM) genutzt, wobei die Oberfläche mit der am Cantilever des Rastermikroskops befestigten thermischen Probe gescannt wird (Aigouy et al., 2005; Binnig et al., 1982). Die thermischen Proben können Thermoelemente, Thermistor-Elemente, oder Fluoreszenzproben sein und es sind räumliche Auflösungen von 20–50 nm möglich (Shi and Majumdar, 2001).

3.6.3 Semi-invasive Messungen

Andere optische, semi-invasive Ansätze für Temperaturmessungen basieren auf temperatursensitiven Farbstoffen, Flüssigkristallen oder Quantenpunkten. Die Temperatursensitivität dieser Stoffe resultiert aus einer temperaturabhängigen Fluoreszenzquantenausbeute, Fluoreszenzlebenszeit oder Farbänderung (Thermochromie, (Kubin and Fletcher, 1982; Lou et al., 2011; Wang et al., 2013)).

Rhodamin B

Der häufigste verwendete temperatursensitive Fluoreszenzfarbstoff ist RhB. Dessen Fluoreszenzquantenausbeute sinkt mit ansteigender Temperatur aufgrund der Rotation der Diethylaminogruppen am Xanthen-Ring (Casey and Quitevis, 1988), insbesondere in einem Temperaturbereich von 273 bis 373 Kelvin, also etwa 0 bis 100 °C (Wang et al., 2013). Durch eine stärkere Rotation bei höheren Temperaturen steigt die Wahrscheinlichkeit von strahlungslosen Deaktivierungsprozessen durch interne Konversion (Onganer and Quitevis, 1992), wodurch die Fluoreszenzausbeute sinkt. RhB wird extensiv als Temperatursensor eingesetzt, ob in Lösung (Ross et al., 2001; Sakakibara et al., 1993), auf der Oberfläche gebunden (Jung et al., 2011; Löw et al., 2008), oder eingebettet in dünnen Filmen (Gui and Ren, 2008; Khan and Kang, 2016; Samy et al., 2008) oder Nanopartikeln (Soleilhac et al., 2016). Die von Ross et al. vor allem für Anwendungen in der Mikrofluidik entwickelte Thermometrie in Lösung wurde seitdem vielfach verwendet, aber auch Temperaturmessungen in lebenden Zellen wurden mit RhB durchgeführt (Moreau et al., 2015). Das Anwendungsspektrum dieses Farbstoffes ist enorm.

Für Temperaturmessungen auf Oberflächen wurden einige Ansätze zur Immobilisierung des Farbstoffes auf den Oberflächen vorgestellt. Für Messungen auf Substraten, die in Kontakt zur Luft stehen („im Trockenen“), kann die schlichte Trocknung einer wässrigen RhB-Lösung auf der Oberfläche ausreichen (Löw et al., 2008). Für Oberflächen, die

während der Temperaturmessung in Kontakt zu wässrigen Lösungen stehen („im Flüssigen“) ist allerdings eine stabilere Bindung von RhB an die Oberfläche erforderlich. Dies kann zum Beispiel über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion (Akiyama et al., 2009; Ginet et al., 2011) oder eine kovalente Kopplung mittels Succinimidylester (Elibol et al., 2009) realisiert werden. Auch durch das Einschließen in Silica gel oder Sol-Gel wurde RhB für Temperaturmessungen immobilisiert – z.B. an Glasfaserspitzen für Messungen im Flüssigen oder in Nanopartikeln (Chauhan et al., 2014; Duong and Rhee, 2007). Bei den hier vorgestellten Methoden gehen die Autoren meist nicht im Detail auf die Orts- und / oder Temporauflösung ein, jedoch ist anhand der gezeigten Daten in den entsprechenden Veröffentlichung zu entnehmen, dass die Temporauflösung im Bereich von 2–5 °C liegt (Akiyama et al., 2009; Elibol et al., 2009; Ginet et al., 2011).

Zur Evaluierung der in dieser Arbeit entwickelten Mikroheizung sollte die Oberflächentemperatur gemessen werden. Die sich durch die relativ spezielle Anwendung ergebenden Anforderungen an die Temperaturmessung wurden von keiner in der Literatur zu findenden Methode zugleich hinreichend erfüllt, weshalb hierfür eine neuartige Methode gefragt war.

3.7 Wärmetransport

Für die Optimierung von Temperaturprofilen ist nicht nur die Analyse der Temperaturverteilung mittels experimenteller Messungen sinnvoll, sondern auch ein Verständnis der Temporausbreitung (d.h. des Wärmetransports) in dem entsprechenden System. Es gibt drei Mechanismen des Wärmetransports: Konvektion, Wärmestrahlung und Wärmeleitung. Bei der Konvektion wird die Wärmeenergie als innere Energie durch das makroskopische Strömen eines Fluids (flüssiges oder gasförmiges Material) transportiert. Dazu gehört zum Beispiel auch der aktive Wärmeabtransport durch erzwungene Luftströme, z.B. bei ungewollter Erwärmung in Computerchips. Wärmestrahlung ist die Ausstrahlung oder Aufnahme von elektromagnetischer Strahlung nach dem Stefan-Boltzmann-Gesetz. Jeder Körper mit einer endlichen Temperatur strahlt demnach Wärme ab, meist in der Form von infraroten Wellen. Diese Art von Wärmetransport benötigt kein Transportmedium, d.h. sie findet auch im Vakuum statt. Die Wärmeleitung ist die Energieübertragung in einem Körper oder durch direkten Kontakt zwischen zwei Körpern. Die kinetische Energie der Teilchen (Atome, Moleküle) wird entlang des Temperaturgradienten durch Stöße von Teilchen innerhalb eines Körpers oder von Teilchen des einen Körpers auf Teilchen des anderen Körpers übertragen. Die Wärmestromdichte \vec{q} ist dabei proportional zum Temperaturgradienten und erfolgt entsprechend des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik immer in Richtung des Ortes mit geringerer Temperatur:

$$\vec{q} = -k \nabla T \quad (3-2)$$

mit der Wärmeleitfähigkeit k [W/(mK)] und dem Temperaturgradienten ∇T . Die zeitliche und räumliche Verteilung der Wärme kann mit der folgenden Wärmeleitungsgleichung beschrieben werden:

$$\nabla \cdot (-k\nabla T) + \dot{q} = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (3-3)$$

Dabei beschreibt der erste Term den Wärmetransport, \dot{q} die durch externe oder interne Quellen eingebrachte Wärme in $[\text{W}/\text{m}^3]$, und der dritte Term die Energiezunahme, mit der Dichte ρ $[\text{kg}/\text{m}^3]$, der Wärmekapazität bei konstantem Druck c_p $[\text{J}/\text{kg}\cdot\text{K}]$, und der Temperaturänderung T in Kelvin $[\text{K}]$ über die Zeit t . Diese Gleichung beinhaltet keine Konvektion und keine Expansionsarbeit (John H. Lienhard IV and John H. Lienhard V, 2008). Die Wärmeleitfähigkeit beschreibt die Materialeigenschaft, Wärme zu leiten. Sie ist durch die inneren Eigenschaften des Materials wie Dichte, spezifische Wärmekapazität und mittlere freie Weglänge eines Teilchens zwischen zwei Stößen bestimmt. Die Wärmeleitfähigkeit von Metallen ist sehr hoch, die von Gasen sehr gering. Innerhalb von nicht-permeablen Feststoffen findet nur Wärmeleitung statt, wohingegen bei Flüssigkeiten und Gasen die Konvektion dazukommt.

Der Wärmeübergang ist der Wärmetransport an der Grenzfläche zwischen zwei Stoffen verschiedener Temperatur (z.B. zwischen Festkörper und Fluid). Wärmeleitung, Konvektion und Wärmestrahlung treten hier gemeinsam auf. Der Wärmeübergang wird durch den Wärmestrom beschrieben. Dieser wird wiederum mathematisch durch den Wärmeübergangskoeffizienten (α , Englisch: heat transfer coefficient, h) beschrieben. Der Wärmeübergangskoeffizient ist keine Materialkonstante, er hängt von den Eigenschaften des wärmeableitenden und des wärmeliefernden Mediums (u.a. Wärmeleitfähigkeit), der Geometrie und der Oberfläche des erwärmten Stoffes ab.

In einem neuen, zu untersuchenden System wie zum Beispiel einem Substrat mit Heizwiderständen, haben also extrem viele Parameter, darunter die Geometrie sowie Materialeigenschaften, einen Einfluss auf den Wärmetransport. Daher kann anhand von Literaturdaten kaum auf die Temperaturlausbreitung in dem neuen System geschlossen werden. Die Temperaturlausbreitung kann jedoch numerisch simuliert werden, wobei heutzutage vor allem in technischen Bereichen die Finite-Elemente-Methode genutzt wird. Dabei wird das System in eine endliche Anzahl von Elementen unterteilt, und innerhalb dieser Elemente, bzw. zwischen diesen Elementen wird der Wärmetransport mit Hilfe der oben beschriebenen, thermodynamischen Gesetze berechnet.

4 Material und Methoden

4.1 Herstellung thermoresponsiver Oberflächen

Die in dieser Arbeit verwendeten TRP können über einen sogenannten grafting-onto Prozess mittels Thiolchemie auf Goldoberflächen immobilisiert werden, da sie Disulfidgruppen enthalten, die nach Spaltung der Bindung an Gold koppeln. Dazu mussten zunächst homogene und reine Goldoberflächen hergestellt werden.

4.1.1 Reinigung der Deckgläser

Um eine homogene dünne Goldschicht zu erhalten, wie sie für die Thiolchemie erforderlich ist, wurden zunächst saubere Glasträger benötigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Glasträger (20 mm x 20 mm, Stärke 0,23–0,32 mm, Menzel, Deutschland) wurden in Halterungen aus Teflon nach dem Hellmanex-Reinigungsprotokoll gereinigt (Tabelle 1), welches aus Ultraschall- und Spülschritten in 2 % Hellmanex-Lösung (Hellma, Deutschland), Reinstwasser (Arium 611 VF, Sartorius AG, Deutschland) und 99,9 %-igem Ethanol (LiChrosolv, Merck KGaA, Deutschland; im weiteren Verlauf als reines Ethanol bezeichnet) bestand.

Tabelle 1 Hellmanex-Reinigungsprotokoll

Nr.	Reinigungsschritt
1	10 x Spülen mit Wasser
2	15 Min. Ultraschall mit Wasser
3	10 x Spülen mit Wasser
4	15 Min. Ultraschall mit Hellmanex
5	20 x Spülen mit Wasser
6	15 Min. Ultraschall mit Wasser
7	20 x Spülen mit Wasser
8	15 Min. Ultraschall mit Hellmanex
9	20 x Spülen mit Wasser
10	15 Min. Ultraschall mit Wasser
11	20 x Spülen mit Wasser
12	15 Min. Ultraschall mit Wasser
13	20 x Spülen mit Wasser
14	15 Min. Ultraschall mit reinem Ethanol
15	Bis zum Einsatz Lagerung in reinem Ethanol

4.1.2 Goldbedampfung

Die gereinigten Deckgläser wurden mit Druckluft getrocknet und in einer Bedampfungsanlage (BOC Edwards Auto 500 electron-beam evaporation system, Edwards, UK) mit 3 nm Chrom (Granules, 99,98 %, ChemPur, Deutschland) und 47 nm Gold (Granules, 99,99 %, MaTeck oder ESG Edelmetall- Service GmbH & Co.KG, Deutschland) bedampft. Die Bedampfung erfolgte mittels Elektronenstrahlverdampfer bei einem Druck von 10^{-5} bar und einer Rate von 0,05 nm/Sekunde. Durch Auflage auf der Halterung blieb ein etwa 2 mm breiter nicht-beschichteter Glasrand. Sofern die

goldbeschichteten Deckgläser nicht sofort mit Polymer beschichtet wurden, wurden sie zwischen Tüchern gebettet gelagert.

4.1.3 Reinigung der Goldoberflächen

Reine Goldoberflächen sind für eine effiziente Ausbildung von SAMs wie den PEG-basierten TRP unabdingbar (Xue et al., 2014). Daher wurden gelagerte goldbeschichtete Deckgläser in einer Teflonhalterung direkt vor der Polymerbeschichtung noch einmal gereinigt. Eine gängige Methode hierfür ist die Oxidierung der Goldoberfläche mit der sogenannten Piranhasäure (Xue et al., 2014). Dazu wurden die Goldoberflächen in einer Lösung aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30 %-ig, VWR Chemicals, Deutschland), und Schwefelsäure (H_2SO_4 , 95–97 %, Merck KGaA, Deutschland) im Verhältnis 1:3 (v/v) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Gläser im Becherglas 10 Mal mit Reinstwasser gespült (in dieser Arbeit Standard-Piranha-Reinigungsprotokoll genannt). Falls die Polymerbeschichtung in Ethanol durchgeführt wurde, wurden die Gläschen vor dem Transfer in die Polymerlösung kurz in reines Ethanol getaucht.

Für ein schonenderes Reinigungsverfahren für die Mikroheizchips (siehe 5.2.4), wurden weitere Reinigungslösungen ausgetestet (Protokolle 1) und 2) aus (Fischer et al., 2009):

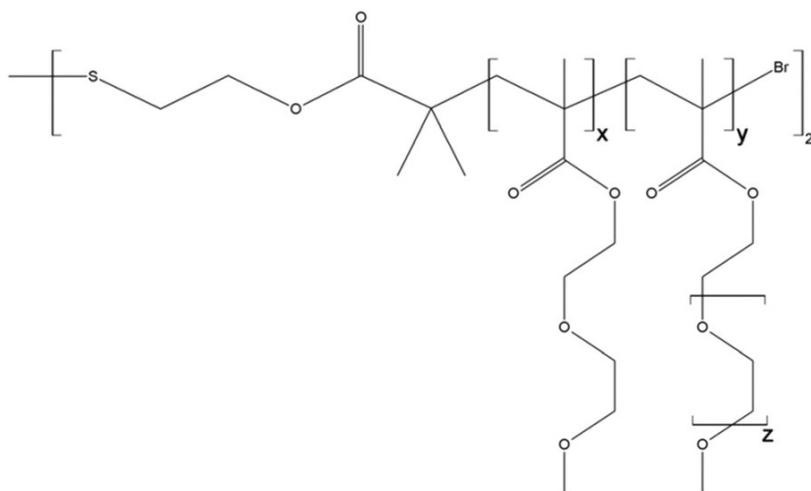
- 1) „Piranha mild“: 50 mM H_2SO_4 und 25 % H_2O_2 , 30 Minuten auf Eis,
- 2) „Piranha base“: 50 mM KOH und 25 % H_2O_2 , 30 Minuten bei Raumtemperatur und
- 3) „Aceton US + Piranha dip“: 15 Minuten Ultraschallbad in Aceton, dann 30 Sekunden in Piranhasäure.

Nach Reinigung in diesen Lösungen wurden die Deckgläser wieder in Reinstwasser gespült. Das „Piranha base“ Protokoll wurde schließlich für die meisten Versuche verwendet.

Zur Wiederverwertung von strukturierten Gold-Glasträgern wurden die Oberflächen direkt nach Beendigung eines Versuches mit PBS ohne Calcium / Magnesium (PBS o. Ca^{2+} / Mg^{2+}) zunächst drei Mal gründlich gespült. Bei jedem Spülgang wurde je vier Mal über die Oberfläche des strukturierten Deckglases gespült (einmal von jeder Seite) und vor dem dritten Spülgang wurde die Petrischale gewechselt. Restliche adhärenzte Zellen wurden dann enzymatisch durch Inkubation in 0,5 ml Trypsin (0,25 %) für 10 Minuten bei 37 °C von der Oberfläche gelöst. Es folgten drei weitere Spülgänge mit PBS. Anschließend wurden die Deckgläser in einer Teflonhalterung im Becherglas 20 Mal mit Reinstwasser gespült, mit Stickstoff getrocknet und gelagert.

4.1.4 Polymerbeschichtung

Zwei verschiedene Varianten der PEG-basierten TRP mit variierendem Anteil von MEO2MA (x) und OEGMA (y), sowie Kettenlänge der OEG-Seitenketten (z) wurden in dieser Arbeit verwendet (Abb. 4-1).



TRP	x / %	y / %	z	LCST / °C in PBS	Mw / g/mol
AH90	90	10	8,5	37	20000
SaSt0111	89	11	7,5	35	22000

Abb. 4-1 Strukturformel des verwendeten TRPs. Der Anteil der Monomere MEO2MA (x) und OEGMA (y) sowie die Kettenlänge der OEG-Seitenketten (z) können variieren und sind in der darunter stehenden Tabelle aufgelistet. Sie bestimmen die LCST und die molekulare Masse (Mw). (adaptiert von (Uhlig et al., 2012))

Für Kontrollversuche wurden die strukturierten Goldoberflächen außerdem mit Thiol-PEG (CH30-PEG-SH, Mw 2 kDa, Rapp Polymere GmbH, Deutschland) beschichtet, welches unabhängig von der Temperatur zellabweisend ist.

Für die Chemisorption wurden die Polymere in unterschiedlichen Konzentrationen (1 oder 5 μM für TRP und 0,56 mM für PEG) in reinem Ethanol gelöst. Frisch bedampfte oder gereinigte Goldoberflächen wurden diesen Lösungen in Glasschalen (Glaspetrischalen, 40 mm x 12 mm, Schottglas, Deutschland) für 3 Stunden bei Raumtemperatur ausgesetzt. Dabei wurden die Glasschalen in einen Metallbehälter mit Ethanol-Atmosphäre gestellt, um Verdunstung zu vermeiden und die Konzentration konstant zu halten. Ungebundenes Polymer wurde durch dreimaliges Spülen in reinem Ethanol und einer weiteren 30-minütigen Immersion in reinem Ethanol entfernt. Schließlich wurde das Lösungsmittel noch einmal ausgetauscht und die Substrate in Stickstoff getrocknet. In der Regel wurden die Substrate sofort für Zellexperimente eingesetzt, wenn sie nicht, wie nachfolgend beschrieben, zunächst weiter modifiziert wurden (4.1.6).

4.1.5 Koadsorption mit Peptiden

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide RGD (CGGRGDS, synthetisiert von Hans Börner, MPI für Kolloid- und Grenzflächen, Deutschland) und YIGSR (CDPGYIGSR, Bachem, Deutschland) können über die Thiolgruppe in der endständigen Aminosäure Cystein mit den Polymeren auf Gold koadsorbiert werden. Die Koadsorption erfolgte auf Grund der besseren Löslichkeit der Peptide in Reinstwasser. Während für das Peptid

RGD bzw. YIGSR eine Konzentration von 50 bzw. 20 μM eingestellt wurde, wurde das TRP – AH90 oder SaSt0111 – in einer Konzentration von 25 bzw. 10 μM gelöst, da sich in der Mitte dieser Polymere eine Disulfidbindung befindet, die in Lösung gespalten wird. Anschließend wurden die Lösungen über die unterschiedlichen Teilvolumina in den entsprechenden Verhältnissen (0, 10, 15, 20, 50 oder 100 % Peptidlösung) zusammengeführt. Die Chemisorption auf frisch bedampften oder gereinigten, goldbeschichteten Deckgläsern erfolgte wie für das reine Polymer beschrieben, nur dass als Lösungsmittel statt reinem Ethanol Reinstwasser verwendet wurde (4.1.4).

4.1.6 Proteinbeschichtung

Thermoresponsive Substrate oder Hellmanex-gereinigte Deckgläser (Kontrolle, siehe 5.3.2) wurden mit verschiedenen Proteinen der EZM beschichtet. Dazu wurden die frisch hergestellten thermoresponsiven Substrate oder Deckgläser in 2 ml der Proteinlösung (Laminin oder Fibronectin (beide Sigma Aldrich, Deutschland), je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) bei 37 °C für 1–2 Stunden ausgesetzt. Anschließend wurden die Substrate dreimal mit PBS bei 37 °C gewaschen und bis zum Aussäen der Zellen in PBS im Brutschrank belassen.

4.2 Strukturierung der TRP-Beschichtung

Die Strukturierung der TRP-Beschichtung wurde durch eine Strukturierung der goldbeschichteten Deckgläser realisiert. Für die Strukturen wurden zwei Designs entwickelt, welche in Kapitel 5.1.1 näher beschrieben sind.

4.2.1 Laserablation

Die Strukturen entsprechend Design 1 wurden mittels Laserablation von unserem Projektpartner Philipp Wysotzki an der Universität Rostock hergestellt. Dafür wurde ein Pikosekundenlaser (TruMicro 5X50, TRUMPF Laser- und Systemtechnik GmbH, Ditzingen, Germany) mit einem Hochpräzisions Mikrobearbeitungssystem (GL.5, GFH GmbH, Deggendorf, Germany) und den folgenden Parametern genutzt: Pulsdauer 6 Pikosekunden, Wellenlänge 343 nm, Brennweite 54 nmm (f-Theta-Objektiv), Pulsenergie 1 μJ , Scangeschwindigkeit 5 mm/s, Repetitionsrate 4 kHz. Der 2 mm breite Glasrand (siehe 4.1.2) blieb bei diesen Strukturen bestehen.

4.2.2 Fotolithografie

Die Strukturen entsprechend Design 2, wie auch entsprechend der Prototypen von Mikroelektroden, wurden von Felix Pfisterer mittels Fotolithografie unter Reinraumatmosfera am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (Fraunhofer IZI-BB) hergestellt. Dabei wurden ein Positivlack und ein Nassätzverfahren verwendet. Mit dem Fotolack und selektiver Belichtung wird eine strukturierte Maske auf der Goldschicht hergestellt. Beim Positivlack werden nicht-belichtete Bereiche bei der Entwicklung fixiert und belichtete Bereiche freigelegt. Diese freigelegten, nicht maskierten Bereiche der Goldschicht können folglich selektiv prozessiert, d.h. im Nassätzverfahren geätzt, werden. Nach anschließender

Entfernung des Fotolacks bleiben die darunterliegenden Goldstrukturen stehen. Bei diesem Design wurde der 2 mm breite Glasrand (siehe 4.1.2) auf etwa 5 mm erweitert.

Goldbeschichtete Deckgläser wurden zunächst mit 300 μl Fotolack (AZ 1514 H, AZ Electronic Materials, Deutschland) rotationsbeschichtet (30 Sekunden, Beschleunigung 4000 s^{-2}) und dieser bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einer Heizplatte für 3 Minuten getrocknet („Softbaking“, Rotationsbeschichter und Heizplatte von solar semi, Deutschland, für weitere Details siehe Pfisterer, 2017). Anschließend wurde das entsprechende Design mit dem Laserbelichter ($\mu\text{PG 101}$, Heidelberg Instruments Mikrotechnik, Deutschland) unter Verwendung des Laserkopfes „Writemode III“ in den Fotolack geschrieben (invertiert mit $500 \mu\text{m}$ Kanten, Laserenergie 50 mW, Energiemodus 1 x 1, Pixelduration 65 % (prozentuale Belichtungszeit)). Es sei angemerkt, dass die Energie verhältnismäßig hoch war, um scharfe Strukturumrisse zu erhalten. Durch die hohe Energie wurden die finalen Strukturen im Vergleich zum Design etwas verkleinert. Um dies zu kompensieren, wurden die Strukturen im Design um einen etwa $3 \mu\text{m}$ breiten Rand ergänzt, sodass die finalen Strukturen schließlich den gewünschten Maßen entsprachen. Die Substrate wurden durch Vakuum fixiert und pneumatisch fokussiert. Die Entwicklung des Fotolacks erfolgte auf dem Rotationsbeschichter durch das Spülen mit Entwickler (30 Sekunden, AZ 400 K, AZ Electronic Materials, Deutschland) und anschließend mit Wasser im Flüssigkeitsstrahl (30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 500 s^{-1} und einer Beschleunigung von 100 s^{-2}). Nach Wegschleudern überschüssiger Flüssigkeit und folgender Trocknung in Stickstoff wurde der Fotolack erneut bei $115 \text{ }^\circ\text{C}$ gebacken („Hardbaking“). Nicht entwickelte Bereiche waren folglich vom Fotolack befreit, und die darunter liegende Metallschicht konnte anschließend gelöst werden. Die Goldschicht wurde durch Eintauchen in ein Goldätzbad (40 Sekunden, TechniEtch ACI2, Technic, Frankreich) und die Chromschicht durch Eintauchen in ein Chromätzbad (5 Sekunden, ChromeEtch n°1, Technic, Frankreich) gelöst. Zwischen den Ätzschritten und danach wurden die Substrate mit destilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Der restliche Fotolack über den stehengebliebenen Metallschichten wurde durch Spülen mit Aceton, Isopropanol und destilliertem Wasser entfernt. Für die TRP-Beschichtung wurden die fotolithografisch strukturierten Substrate abschließend noch einmal mit heißer Natronlauge (8 %, $70 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 Minuten in Bewegung) und einer Plasmabehandlung (Sauerstoffplasma, 1 Minute) von Lackresten befreit.

4.3 Zellkultur

Für die Etablierung eines Kultivierungsprotokolls zur Kontrolle neuronaler Zellen auf thermoresponsiven Substraten wurde in dieser Arbeit die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Für vergleichende Untersuchungen der Funktionalität der TRP-Beschichtungen wurden Maus-Fibroblasten (L929-Zellen) genutzt.

4.3.1 L929-Zellen

L929-Zellen (ACC 2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, Deutschland) wurden in DMEM / HEPES (Sigma-Aldrich, Deutschland) mit Ergänzung durch 10 % Fötalem Kälber Serum (FKS), 4 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin /

Streptavidin (alle von Biochrom AG, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 3–4 Tage wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurden sie zweimal mit PBS o. Ca²⁺/Mg²⁺ gespült und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C in 0,05 % Trypsin (Biochrom AG, Deutschland) inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Medium wurde die enzymatische Ablösung gestoppt und die Zellen wurden resuspendiert, bevor sie in einer Zählkammer gezählt wurden. Für die Subkultivierung wurden 2 bis 4 x 10³ Zellen / cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Auf die thermoresponsiven Substrate, welche in 9 cm² Zellkulturpetrischalen platziert wurden, wurden 10⁵ Zellen ausgesät.

4.3.2 SH-SY5Y-Zellen

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (ACC 209, DSMZ, Deutschland) ist eine Klonierung der ursprünglichen Neuroepitheliom-Zelllinie SK-N-SH (Ross et al., 1983), welche aus einer Knochenmarks-Biopsie einer 4-jährigen Neuroblastom-Patientin stammt (Biedler et al., 1973). Die Zelllinie enthält neben den kleineren Neuroblastom-artigen Zellen auch größere und flachere, epithelartige Zellen (Ross et al., 1983).

SH-SY5Y-Zellen wurden in DMEM / Hepes (Sigma-Aldrich, Deutschland) mit Ergänzung durch 15 % FKS, 2–4 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin / Streptavidin (alle von Biochrom AG, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden einmal pro Woche umgesetzt, nach dem gleichen Protokoll wie die L929-Zellen, nur dass 0,25 % Trypsin verwendet wurden und 1,2 x 10⁴ Zellen / cm² in Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder auf den Substraten differenziert, indem ein Tag nach dem Aussäen 10 µM Retinsäure (Englisch: retinoic acid, RA, Sigma Aldrich, Deutschland, 1 mM Stocklösung in Ethanol) zu dem Medium gegeben wurde (Zellen vor Zugabe von RA, siehe Abb. 4-2 A). Nach 5 Tagen wurde das Vollmedium gegen serumfreies Medium (DMEM / Hepes mit 2–4 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin / Streptavidin) ausgetauscht, welches zudem 50 ng/ml des Wachstumsfaktors BDNF (Englisch: Brain Derived Neurotrophic Factor) enthielt (Zellen vor Austausch von Medium, siehe Abb. 4-2 B). Durch diesen Schritt wird die Differenzierung noch verstärkt und das Überwachsen durch nicht-differenzierte, epithelartige Zellen minimiert (Encinas et al., 2000).

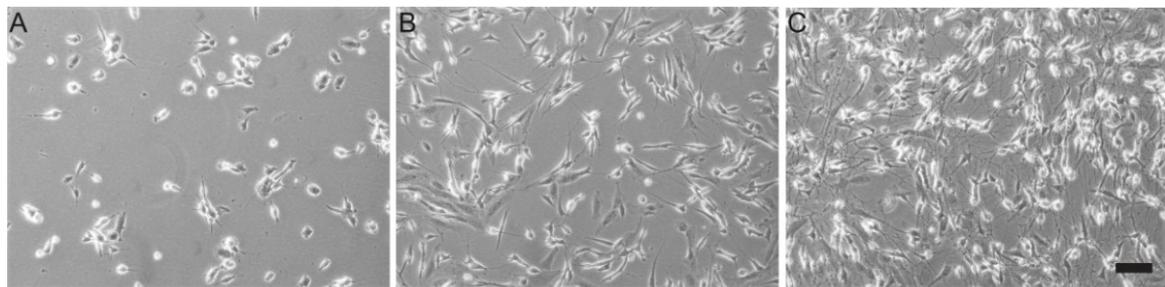


Abb. 4-2 Phasenkontrastbilder von SH-SY5Y-Zellen während der Differenzierung. Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät. (A) 1 Tag nach dem Aussäen wurde RA (10 µM) hinzugefügt. (B) Nach 5 Tagen mit RA wurde das Medium zu serumfreiem Medium gewechselt und BDNF

(50 ng/ml) hinzugegeben. (C) 9–10 Tage nach dem Aussäen waren die differenzierten Zellen über lange Neuriten stark vernetzt und wurden für Versuche verwendet. Maßbalken 100 μm

Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen auf unstrukturierten TRP-Substraten

Auf den unstrukturierten thermoresponsiven Substraten mit oder ohne Modifikation in 9 cm^2 Zellkulturpetrischalen wurden jeweils 10^5 Zellen und auf den Laminin-beschichteten Kontrolldeckgläsern etwa 5×10^4 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden auf den Substraten bei 37 °C oder 33 °C und 5 % CO_2 kultiviert und auf den Substraten wie beschrieben differenziert.

Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen auf strukturierten TRP-Substraten

Für die Versuche mit den strukturierten thermoresponsiven Substraten wurden die SH-SY5Y-Zellen in T-75-Zellkulturflaschen (75 cm^2) vordifferenziert, für insgesamt 9–10 Tage nach dem oben beschriebenen Differenzierungsprotokoll mit RA und BDNF. Die differenzierten Zellen wurden vorsichtig mit PBS o. $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ gespült, durch Inkubation für ca. 10 Minuten in 0,05 % Trypsin (Biochrom AG, Deutschland) bei 37 °C abgelöst und anschließend in Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und in 2,5 ml Medium mit 10 μM RA sorgfältig resuspendiert. Um größere Zellcluster auszuschließen, wurden die Zellen sedimentiert. Dazu wurden 5 ml RA-haltiges Medium mit der Zellsuspension überschichtet und nach 10 Minuten wurden 5 ml aus der oberen Hälfte des Gesamtvolumens abgenommen. Nach weiteren 10 Minuten wurde nochmal 1 ml von oben abgenommen, mit den vorigen 5 ml vermengt und resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde die Konzentration bestimmt. $3\text{--}6 \times 10^5$ Zellen wurden in Medium mit 10 μM RA auf die strukturierten thermoresponsiven Substrate ausgesät, welche in nicht-behandelten Zellkulturschalen (3 cm Durchmesser, Greiner Bio-one, Deutschland) platziert wurden. Die Zellen wurden auf den Substraten für 30 Minuten auf einem Schüttler, und für weitere 20–24 Stunden ohne Schüttler bei 33 °C kultiviert. In dieser Zeit sollten die Zellen auf den TRP-freien Bereichen adhären. Danach wurden nicht-adhären Zellen von den Oberflächen gespült, indem dreimal von allen Seiten mit Medium über das Substrat gespült wurde, das Substrat in eine frische Zellkulturschale mit frischem Medium mit 10 μM RA transferiert wurde und noch einmal von allen Seiten über das Substrat gespült wurde. Die Substrate wurden weiter bei 33 °C und 5 % CO_2 kultiviert, wobei nach 4–6 Tagen das Medium gewechselt wurde. In einigen Fällen, vor allem für längere Inkubation bei 33 °C und damit im zellabweisenden Zustand des TRPs, wurde nach 3 Tagen das Vollmedium gegen BDNF-haltiges serum-freies Medium ausgetauscht. Nach 4–7 Tagen wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht, entweder durch einen Transfer der Substrate in einen Brutschrank mit 37 °C oder durch einen Transfer in die Klimakammer des Mikroskops, die auf 37 °C eingestellt war.

4.3.3 Astrozyten und humane induzierte Neurone

Die Versuche mit Mausastrozyten und humanen iN wurden in Kooperation mit Katharina Grauel in der AG Rosenmund an der Charité Universitätsmedizin durchgeführt, wo diese Zelltypen kultiviert und generiert wurden.

Für die Astrozyten (Feeder-Zellschichten) wurde der Kortex von neugeborenen Mäusen (postnatal Tag 0, P0) mit Trypsin verdaut. Die Zellen wurden für eine Woche in T-75-Zellkulturflaschen in DMEM (ThermoFisher Scientific, Deutschland) mit Ergänzung von 10 % FKS (PanBiotech, Deutschland) und 0,2 % Penicillin / Streptomycin (Sigma Aldrich, Deutschland) kultiviert. $1,5 \times 10^5$ Astrozyten wurden auf den strukturierten thermoresponsiven Substraten in nicht-behandelten Zellkulturschalen (3 cm Durchmesser, Greiner Bio-one, Deutschland) ausgesät und für einen Tag bei 32 °C kultiviert. Die Substrate wurden mit neuronalem Medium (Neurobasalmedium A (NBA), ergänzt durch B27, Glutamax (alle ThermoFisher Scientific, Deutschland), 2 µg/ml Doxycycline (Sigma Aldrich, Deutschland) und 2,5 % FKS) gespült, bevor humane iN ausgesät wurden. Exzitatorische humane iN wurden im Wesentlichen gemäß (Zhang et al., 2013) generiert. Die Zellen wurden transduziert, sodass sie induzierbares EGFP zur besseren Identifizierung exprimierten. Etwa 3×10^5 Zellen wurden auf die gespülten TRP-Substrate mit den Mausastrozyten ausgesät. Nach 1 Tag bei 32 °C wurden die Substrate erneut mit neuronalem Medium gespült (wie in 4.3.2 beschrieben, aber nur zweimal von allen Seiten und etwas vorsichtiger), um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Dann wurden die Substrate in 6-well Platten transferiert, in denen 1 Woche zuvor Astrozyten Feeder-Zellschichten ausgesät wurden. Die iN wurden für 4 weitere Tage bei 32 °C auf den Substraten kultiviert, bevor die Temperatur auf 37 °C erhöht wurde. Bei dieser Temperatur wurden die Zellen für weitere 6 Tage kultiviert.

4.3.4 Kultivierung von Zellen auf TRP-Substraten in Zellkulturkammern

Für die Kultivierung der Zellen auf elektrisch angeschlossenen Mikroheizchips mit finaler oberer TRP-beschichteter Goldschicht wurde eine Zellkulturkammer entwickelt (siehe 5.2.4). Die Kultivierung der Zellen in diesen Kammern wurde entsprechend der Kultivierung ohne Kammer durchgeführt (siehe 4.3.2, nur dass der kleineren Fläche entsprechend etwa 1×10^5 Zellen ausgesät wurden). Für die Wiederverwendung der Goldoberfläche wurden die Zellen von den Substraten abgespült, bzw. mittels Trypsinbehandlung abgelöst, und die Substrate intensiv mit PBS gespült. Dann wurden die Substrate mit Kammer in reines Ethanol gelegt, um das PSA zu lösen. Nach etwa 10 Minuten wurde die Kammer mittels Skalpel vorsichtig von der Oberfläche gelöst und die Substrate wurden mindestens 20 weitere Stunden in reines Ethanol (über Nacht) gelegt, bevor sie abschließend 20 Mal in Reinstwasser gespült und getrocknet wurden. Es stellte sich heraus, dass eine lange Immersion in Ethanol notwendig war, um später wieder funktionale TRP-Beschichtungen zu erhalten (Daten nicht gezeigt).

4.3.5 Mikroskopische Analyse und Evaluierung der Zelladhäsion

Zur Untersuchung der Adhäsion und Abrundung von L929-Zellen und SH-SY5Y-Zellen auf thermoresponsiven Substraten wurden die Substrate im Phasenkontrast bei Raumtemperatur mikroskopiert (Leica, Deutschland), wobei ein 5x- und 10x-Objektiv verwendet wurde und 3–5 exemplarische Bilder mit einer angeschlossenen Kamera (Nikon, Deutschland) aufgenommen wurden.

L929-Zellen

Auf den (modifizierten,) unstrukturierten Substraten wurden nach dem Aussäen der Zellen täglich Bilder aufgenommen. Für die Bewertung der Adhäsion der L929-Zellen wurden die Zellen mit Lamellipodien (= adhären Zellen) gezählt. Bei $\geq 50\%$ adhären Zellen wurde die Abrundungseffizienz bestimmt. Hierfür wurden die Substrate für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter das Mikroskop gestellt, wobei direkt nach dem Herausnehmen das erste und alle 2 Minuten ein weiteres Bild aufgenommen wurde. Die Abrundungseffizienz wurde aus dem Quotienten der Differenz der adhären Zellen des ersten Bildes (N_{t_0} , $t = 0$ Minuten) und des letzten Bildes ($N_{t_{30}}$) und der adhären Zellen des ersten Bildes (N_{t_0}) bestimmt.

$$\text{Abrundungseffizienz} = \frac{N_{t_0} - N_{t_{30}}}{N_{t_0}} \cdot 100 \quad (4-1)$$

SH-SY5Y-Zellen

Für die Adhäsion der SH-SY5Y-Zellen war diese Art der Auswertung nicht praktikabel, da Lamellipodien bei diesen Zellen oft nicht so eindeutig sind wie bei den L929-Zellen, und die Zellen häufig in Zellklumpen adhären. Zudem adhären epithelartige und neuroblastom-artige Zelltypen unterschiedlich schnell, es sollte jedoch vor allem die Adhäsion des neuronalen Phänotyps beurteilt und bevorzugt werden. Daher wurde die Adhäsion über die Bestimmung der Anzahl von Zellen mit Neuriten pro Fläche bewertet. Zellen mit Neuriten wurden als Typ 1 (in blau, Abb. 4-3) gezählt. Zu große Zellklumpen mit mehr als etwa 10 Zellen (Typ 2, hellblau) und eindeutig epithelartige Zellen (Typ 3, grün) wurden nicht gezählt (Abb. 4-3).

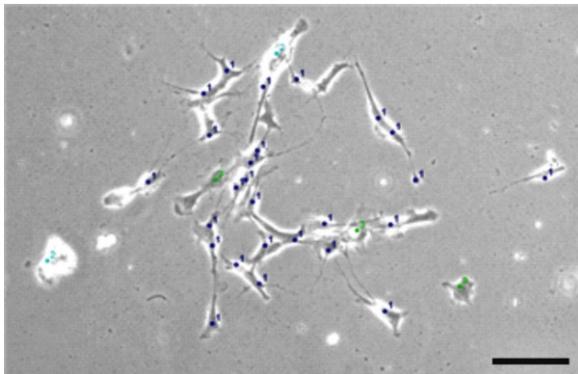


Abb. 4-3 Beispielbild aus einer Zählung von Zellen mit Neuriten. Ausschnitt mit vielen Zellen aus Phasenkontrastbild von SH-SY5Y-Zellen nach 4 Tagen bei 37 °C auf einer reinen TRP-Oberfläche. Zellen mit Neuriten wurden als Typ 1 (in blau) gezählt. Zu große Zellklumpen mit mehr als etwa 10 Zellen (Typ 2, hellblau) und eindeutig epithelartige Zellen (Typ 3, grün) wurden nicht gezählt. Maßbalken, 100 μm

4.3.6 Mikroskopische Analyse und Evaluierung des Zellwachstums auf strukturierten TRP-Substraten

Die Bewertung des Zellwachstums auf den strukturierten TRP-Substraten wurde 1 Tag nach dem Aussäen und jeden Tag nach dem 4. Tag vorgenommen. Dazu wurden an diesen Zeitpunkten Bilder von 5 zufälligen Positionen innerhalb des mikrostrukturierten TRP-Bereiches und von 1–2 Positionen innerhalb des unstrukturierten Glasbereiches

(Glasränder der Substrate, die zur Kontrolle der Vitalität der Zellen dienen) aufgenommen. Für die Dokumentation der TRP- und Gold-freien und der TRP- und Gold-beschichteten Bereiche wurden verschiedene Belichtungszeiten verwendet.

Zeitrafferaufnahmen von den Zellen auf den Substraten wurden mit dem vollautomatisierten Mikroskopsystem (cell[^]R, Olympus, Deutschland) und einer angeschlossenen CCD-Kamera (F-view II, Olympus, Deutschland) angefertigt. Über eine Klimakammer (Evotech Technologies GmbH, Deutschland) um dieses Mikroskopsystem konnte die Umgebungstemperatur (33 °C oder 37 °C), der CO₂ -Gehalt (5 %) und die Feuchtigkeit (~60 %) reguliert werden. In der Regel wurden 4–6 Positionen im 10-Minuten-Intervall mit einem 10x-Objektiv aufgenommen. Zur besseren Darstellung wurden unterschiedlich belichtete Aufnahmen der gleichen, repräsentativen Position in ImageJ überlagert.

Für die Bestimmung der Zelldichte auf den TRP-Bereichen wurden je Bild alle Zellen auf den TRP-Bereichen gezählt und durch die Gesamtfläche des TRP-Bereiches im Bild geteilt. Zur Bestimmung der Zelldichte in den TRP-freien Feldern wurde die Zahl der besetzten Felder mit der durchschnittlichen Zahl an Zellen pro Adhäsionsfeld (6,0) multipliziert, welche gesondert mittels DAPI-Färbung evaluiert wurde (siehe Anhang Abb. 9-1), und diese Zellzahl wurde durch die Gesamtfläche der Felder in einem Bild geteilt.

Um das Auswachsen der Zellen im Zeitverlauf zu quantifizieren, wurde der Prozentsatz der Konfluenz (= lückenlose Bedeckung der Oberfläche durch Zellen) für die Zeitrafferaufnahmen sowie für Start- und Endbilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm PHANTAST (einem Plugin für Image J, Einstellungswerte für Sigma: 4,5 und Epsilon: 0,09, inklusive rechnerische Korrektur des Haloeffekts (Jaccard et al., 2014)) bestimmt.

Der Anteil der von Neuriten überbrückten TRP-Spalte in Experimenten mit Substraten des Designs 2 wurde für jedes Bild bestimmt, indem die Anzahl der überbrückten TRP-Spalte durch die Gesamtzahl der TRP-Spalte in einem Bild geteilt wurde, und schließlich der Mittelwert über alle Positionen aller Experimente gebildet wurde. Über die absoluten Werte und mittels eines 2-seitigen Fischers Exakter Tests wurden die statistischen Unterschiede zwischen TRP-beschichteten Substraten, die auf 37 °C gebracht oder bei 33 °C belassen wurden (d.h. zwischen Schalten und Nicht-Schalten des TRPs) und zwischen TRP-beschichteten und PEG-beschichteten Substraten, die beide auf 37 °C gebracht wurden (d.h. zwischen schaltbarem und nicht-schaltbarem Polymer), ermittelt.

Zur Untersuchung der Astrozyten und iN auf den thermoresponsiven Substraten wurden die Substrate jeweils einen Tag nach dem Aussäen der Zellen (vor und nach dem Spülen) sowie 2, 4, 5, 7 und 10 Tage nach dem Aussäen der Astrozyten (d.h. jeweils -1 Tag nach dem Aussäen der iN) bei Raumtemperatur mikroskopiert. Dies wurde mit einem Lichtmikroskop (CKX53 invertiertes Mikroskop, Olympus, Deutschland) und einer angeschlossenen CCD-Farbkamera (DP70, Olympus, Deutschland) durchgeführt, ausgestattet mit einem 10x-Objektiv (CACHN10XIPC, Olympus, Deutschland), einer integrierten LED-Beleuchtung und einem Phasenkontrast, einer 100 W Quecksilberlampe (U-LH100HG mit Stromversorgung U-RFL-T, Olympus, Deutschland) sowie einem EGFP-Filter.

4.3.7 Immunocytochemie

Die Zellen wurden auf den Substraten mit 4 % PFA für 10 Minuten fixiert, mit 0,5 % Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert und mit 1 % BSA in PBS für 20 Minuten blockiert. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper β 3-Tubulin (monoklonal, 1:300 in PBS, TUJ-1, Santa Cruz) für 2 Stunden wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:300 in PBS; Cy3, Jackson ImmunoResearch) für 2 Stunden. Danach wurden die Substrate dreimal mit PBS gespült, für 10 Minuten mit DAPI (0,5 μ g/ml) inkubiert und wieder dreimal mit PBS gespült, bevor sie mit Fluoromount (Southern Biotech, USA) eingedeckt wurden oder direkt mikroskopisch analysiert wurden. Alle Schritte dieses Protokolls wurden mit vorgewärmten Lösungen und vorsichtigen Spül- und Inkubationsschritten bei 37 °C durchgeführt, um ein Schalten des TRPs und ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Fluoreszenzbilder wurden mit einem vollautomatisierten Mikroskopsystem (cell[^]R, Olympus, Deutschland) aufgenommen, welches mit einer CCD-Kamera (F-view II, Olympus, Deutschland), einem 10x-Objektiv (UPLFLN, Olympus, Deutschland), einer Xenon Kurzbogenlampe (Ushio, Japan) und dem entsprechenden Filterset (Anregung: 540-550 nm, Emission: 575-625 nm) ausgestattet war.

4.3.8 Elektrophysiologie

Elektrophysiologische Ableitungen der iN wurden nach insgesamt 10 Tagen Kultivierung auf den thermoresponsiven Substraten durchgeführt, wofür die Substrate am Messplatz in die Messkammer gelegt wurden. Whole-Cell Patch-Clamp-Messungen wurden bei Raumtemperatur mit dem Multiclamp 700B Verstärker (Molecular Devices) durchgeführt. Die Messdaten wurden bei 3 kHz gefiltert, und mit 10 kHz digitalisiert. Die Aufnahme erfolgte mit pClamp 10 (Molecular Devices). Die intrazelluläre Messlösung in der Patch-Pipette enthielt 136 mM KCl, 17,8 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0,6 mM MgCl₂, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na, 12 mM Phosphokreatin, und 50 Einheiten/ml Phosphokreatin Kinase (300 mOsm, pH 7,4, alle Bestandteile von Carl-Roth). Die Messkammer wurde fortwährend mit extrazellulärer Lösung gespült. Die extrazelluläre Lösung enthielt 140 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, and 10 mM Glucose (pH 7.3 eingestellt mit NaOH, 300 mOsm, alle Bestandteile von Carl-Roth).

Aktionspotentiale wurden in der Stromklemme (Englisch: current clamp) gemessen. Hierfür wurde für jeweils 300 ms Strom unterschiedlicher Stärke injiziert (von -40 pA bis +100 pA). Für Messungen der spontanen synaptischen Aktivität wurden die iN in der Spannungsklemme (Englisch: voltage clamp) bei einem Ruhepotential von -70 mV gehalten.

4.4 Herstellung der Mikroheizung

4.4.1 Laserablation von ITO-Schichten

Die Mikroelektroden aus reinem ITO zur Etablierung der Temperaturmessmethode wurden mittels Laserablation von ITO-beschichteten Glasträgern (200 nm ITO, 1 mm dickes 20 x 20 mm² Glas, AF45, DESAG, Deutschland) mit einem Excimer Laser (Lextra

100 (9404), Deutschland) hergestellt. Die produzierten Mikroelektroden waren 45 μm breit, 12 mm lang und mit 4 x 4 mm^2 großen Kontaktpads verbunden. Der Widerstand dieser Elektroden war 10,8 k Ω , wobei temperaturbedingte Änderungen des Widerstands vernachlässigt wurden. Anschließend wurden die Mikroelektroden unter Aussparung der Kontaktpads mit einer 200 nm dicken Siliziumdioxid passiviert (GeSiM mbH, Deutschland). Die Kontaktpads wurden schließlich mit 3 nm Chrom und 47 nm Gold beschichtet (BOC Edwards Auto 500 electron-beam evaporation system, Edwards, Großbritannien), um die Stabilität des elektrischen Kontakts zu verbessern.

4.4.2 Fotolithografie

Die Mikroelektroden aus Chrom und Gold, bzw. aus ITO, Chrom und Gold wurden mittels Fotolithografie unter Reinraumatmosfera hergestellt, entweder von Felix Pfisterer am Fraunhofer IZI-BB (siehe 4.2.2) oder durch die Firma GeSiM mbH (Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Deutschland). Die Passivierung erfolgte ausschließlich durch die Firma GeSiM mbH.

4.5 Temperaturmessung an Oberflächen mit Rhodamin B

4.5.1 Herstellung von Sol-Gel-Schichten mit Rhodamin B

Vor der Beschichtung mit Sol-Gel wurden die Oberflächen mit Ethanol gereinigt und getrocknet. 200 bis 300 μl der RhB-haltigen Sol-Lösung SensoSol T-SB (SolSens GmbH, Schweiz) wurden auf die Oberflächen mittels Rotationsbeschichtung (Semitec CPS 20, esitron-electronic GmbH, Germany) bei 6000 Umdrehungen pro Minute (rpm, Englisch: revolutions per minute) für 30 Sekunden in einem dünnen Film aufgetragen. Kontaktpads von Mikroelektroden wurden während diesem Schritt mit Klebeband (Scotch Magic, 3M, USA) abgedeckt, um sie von dem elektrisch isolierenden Sol-Gel freizuhalten. Für eine Aushärtung des Sol-Gel-Films wurde dieser schließlich für 1 Stunde bei 160 $^{\circ}\text{C}$ gebacken. Vor der Verwendung wurden die Beschichtungen mit Ethanol gespült und getrocknet.

4.5.2 Analyse der Schichtdicke

Die Schichtdicke der Sol-Gel-Filme wurde mittels AFM bestimmt. Dafür wurden reine oder goldbeschichtete Deckgläser nach dem in 4.5.1 beschriebenen Protokoll mit Sol-Gel beschichtet. Anschließend wurde die Sol-Gel Schicht per Hand mit einer Kanüle eingeritzt, und erneut mit Ethanol gespült und getrocknet. Schichtdicken-Messungen anhand der Ritze wurden mit Unterstützung durch Vladimir Prokopovic (Fraunhofer IZI-BB) mit einem AFM (JPK Instruments AG) im Kontaktmodus durchgeführt.

4.5.3 Thermometrie mittels Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzbilder der RhB-Sol-Gel-beschichteten Oberflächen wurden mit einem vollautomatisierten Mikroskopsystem (cell[^]R, Olympus, Deutschland) und einer angeschlossenen CCD-Kamera (F-view II, Olympus, Deutschland) aufgenommen, bei

einem Binning von 2 x 2 (d.h. 688 x 516 Pixel), einem 10x-Objektiv (UPLFLN, Olympus, Deutschland), einer Xenon Kurzbogenlampe (Ushio, Japan) und dem entsprechenden Filterset für RhB Fluoreszenz (Anregung: 540–550 nm, Emission: 575–625 nm). Besonders wichtig für diese Art von Intensitätsmessungen ist außerdem die genaue Kontrolle weiterer experimenteller Parameter, wie der Fokusebene (Vermeidung von Änderungen um mehr als 0,7 µm), der lateralen Position des Substrats (Vermeidung von Verschiebungen um mehr als 1–2 µm) sowie die Belichtungszeit, um das Ausbleichen und andere Artefakte in der Messung minimal zu halten, während gleichzeitig das Signal-Rausch-Verhältnis maximiert werden sollte.

Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware xcellence (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany) oder mit ImageJ wie folgt bearbeitet: Pro Messpunkt wurden 5 Fluoreszenzbilder in einem Intervall von 150 ms mit einer Belichtungszeit von 60–100 ms und einer Beleuchtungsstärke von 0,8 mW aufgenommen und gemittelt. Referenzbilder wurden bei Raumtemperatur (21–23 °C), vor und nach jedem Messpunkt (wenn möglich) oder zu Beginn und (wenn möglich) nach Beendigung einer Zeitserie, und sofern es vorher und nachher gab, gemittelt. Nach dem Abzug des Hintergrundwertes von allen Bildern, wurden die Bilder eines Messpunktes auf die gemittelten Referenzbilder normiert. Für die Berechnung der Änderung der Temperatur mit Bezug zur Raumtemperatur (d.h. ΔT) wurde die ermittelte Kalibrierungsgleichung (siehe Kapitel 5, Abb. 5-10) verwendet, und zwar für jeden Pixelwert eines normalisierten Fluoreszenzbildes (d.h. die Relativbilder). Aus dem erhaltenen Relativbild konnte beispielsweise das Temperaturprofil quer zur Mikroelektrode (entlang der x-Richtung) erhalten werden, indem die Linienintensitätsprofilie über einen Bereich von etwa 200 µm in y-Richtung gemittelt wurden und anschließend ein gleitender Mittelwert ($n = 3$) entlang der y-Richtung angelegt wurde.

4.5.4 Numerische Simulation der Temperaturverteilung

Numerische Simulationen der Temperaturprofile oberhalb der Mikroelektroden wurden mit der Finite-Elemente-basierten Software COMSOL 4.3 durchgeführt. Zur Etablierung der Temperaturmessmethode wurde der Wärmetransport im 2D-Modell mit folgenden Parametern simuliert: Geometrisch bestand das Modell aus einem Glassubstrat (20 mm breit und 1 mm dick) mit einer einzelnen ITO-Elektrode (45 µm breit und 200 nm dick) und einer abschließenden SiO₂-Passivierungsschicht (200 nm dick, siehe Abb. 5-11). Die im Modell angenommenen physikalischen Eigenschaften für die verschiedenen Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Mathematisch wurde Gleichung

$$\nabla \cdot (-k\nabla T) + \dot{q} = \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (3-3)$$

für den Wärmetransport im Modell angewendet. Der Wärmeeintrag wurde an den Grenzen der Elektrode als Leistungsabgabe definiert, welche mit Hilfe des Ohmschen und Jouleschen Gesetz aus den Elektrodengeometrien, dem gemessenen Widerstand und der angelegten Spannung berechnet wurde.

Für die weitere Optimierung der Mikroelektroden wurden zudem 3D-Modelle erstellt. Die Grundstruktur dieser Modelle war ein quadratisches Glassubstrat (Borosilikatglas

D263M, 20 mm Kantenlänge und 300 μm dick), mit einer rechteckigen, variablen Heizfeldfläche mittig auf der Oberseite, über welche eine bestimmte Leistung eingebracht wurde und welche die Mikroelektrode simulieren sollte. Der Leistungseintrag durch die Mikroelektrode über die Oberfläche wurde so eingestellt, dass das Maximum des Temperaturprofils bei $\Delta T = 5\text{ }^\circ\text{C}$ liegt.

Die initiale und externe Temperatur wurde auf 296,15 K gesetzt. An Luft- bzw. Wasserangrenzenden Übergängen wurde eine Wärmeabgabe gemäß natürlicher Konvektion angenommen (Incropera et al., 2011). Aus einer Reihe typischer Wärmeleitkoeffizienten (Incropera et al., 2011) wurden die Werte $15\text{ W / (m}^2\text{K)}$ für Luftgrenzen und $600\text{ W / (m}^2\text{K)}$ für Wassergrenzen so gewählt, dass die simulierten und experimentellen Daten für einen bestimmten Fall am besten übereinstimmen (siehe Abb. 5-17). Für alle weiteren numerischen Simulationen wurden ebenfalls diese Werte angenommen. Da das Flüssigkeitsvolumen oberhalb der Heizelektrode sehr klein war und kein externer Abtransport angelegt wurde, wurde der Wärmetransport durch Konvektion in diesem Fall vernachlässigt. Außerdem wurde die Wärmestrahlung aufgrund des niedrigen betrachteten Temperaturbereiches vernachlässigt (Rossi et al., 1997).

Tabelle 2 Thermophysikalische Eigenschaften der Materialien im Simulationsmodell

Material	Wärmeleitfähigkeit $k\text{ (W / m K)}$	Dichte $\rho\text{ (kg / m}^3\text{)}$	Wärmekapazität $C_p\text{ (J / kg K)}$	Referenzen
ITO	10,20	7180	340	(Roxworthy et al., 2014)
Glas AF45	0,93	2720	830	Produktdatenblatt
SiO ₂	1,40	2200	730	(Darvishian et al., 2014)
Sol-Gel	1,00	2000	800	Persönlicher Kontakt mit SolSens GmbH
Borosilikatglas	1,20	2230	830	Produktdatenblatt

5 Ergebnisse

5.1 Strukturierte thermoresponsive Zellkultursubstrate zur Kontrolle neuronaler Zellen

5.1.1 Konzept und Strukturierung der thermoresponsiven Zellkultursubstrate

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der TRP-Beschichtung das Auswachsen von neuronalen Zellen und insbesondere ihrer Neuriten zeitlich und räumlich zu steuern. Um die Zellen zunächst auf der Oberfläche anzuordnen und die Richtung des Neuritenwachstums vorzugeben, sollte die TRP-Beschichtung strukturiert werden. Eine sehr elegante und effektive Lösung hierfür ist die Strukturierung der Goldschicht auf dem Glassubstrat. Da das TRP über die enthaltene Disulfidgruppe selektiv an Gold gekoppelt wird, nicht aber an Glas, bleiben von Gold freigelegte Glasbereiche konsequenterweise TRP-frei und erlauben eine temperaturunabhängige Adhäsion der Zellen. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Designs für die TRP-freien Strukturen entwickelt. Design 1 besteht aus Feldern von 50 μm Kantenlänge, die jeweils 200 μm in x- und y-Richtung über eine TRP-beschichtete Goldoberfläche voneinander getrennt sind (Abb. 5-1 B). Die Größe der Felder ist in etwa 2 bis 5-mal so groß wie ein Zellkörper und sollte die Adhäsion von kleinen Zellgruppen bis hin zu einzelnen Zellen ermöglichen. Der Abstand von 200 μm war groß genug sein, dass Zellen oder Zellfortsätze diesen im zellabweisenden Zustand des TRPs nicht überbrücken können. Er war aber auch klein genug, sodass Neuriten diesen Abstand, sobald das TRP im zellattraktiven Zustand ist, überwinden und sich mit benachbarten Zellen verbinden bzw. aufeinander zuwandern können. Das Design 2 erweitert das Design 1 mit Reihen von Triplets aus drei TRP-freien Feldern mit 50 μm Kantenlänge und 200 μm Abstand, wobei zwei dieser Felder über einen 150 μm langen und 5 μm breiten TRP-freien Pfad miteinander verknüpft werden (Abb. 5-1 B). Dieser Pfad sollte so schmal sein, dass nur Neuriten dort entlang wachsen können, nicht aber Zellkörper. Über den TRP-beschichteten 50 μm breiten Spalt zwischen dem Ende des langen Pfades und dem benachbarten Feld sollte das weitere Auswachsen der Neuriten zur nächsten Zelle zeitlich kontrolliert werden, indem das TRP an einem bestimmten Zeitpunkt vom zellabweisenden in den zellattraktiven Zustand geschaltet wird (Abb. 5-1 D). Die Strukturen nach Design 1 wurden durch Laserablation der Goldschicht hergestellt, die Strukturen nach Design 2 mittels Fotolithografie. Aufgrund von technischen Limitationen lag die Breite der Pfade für die Neuriten in der Praxis bei etwa 7 bis 9 μm .

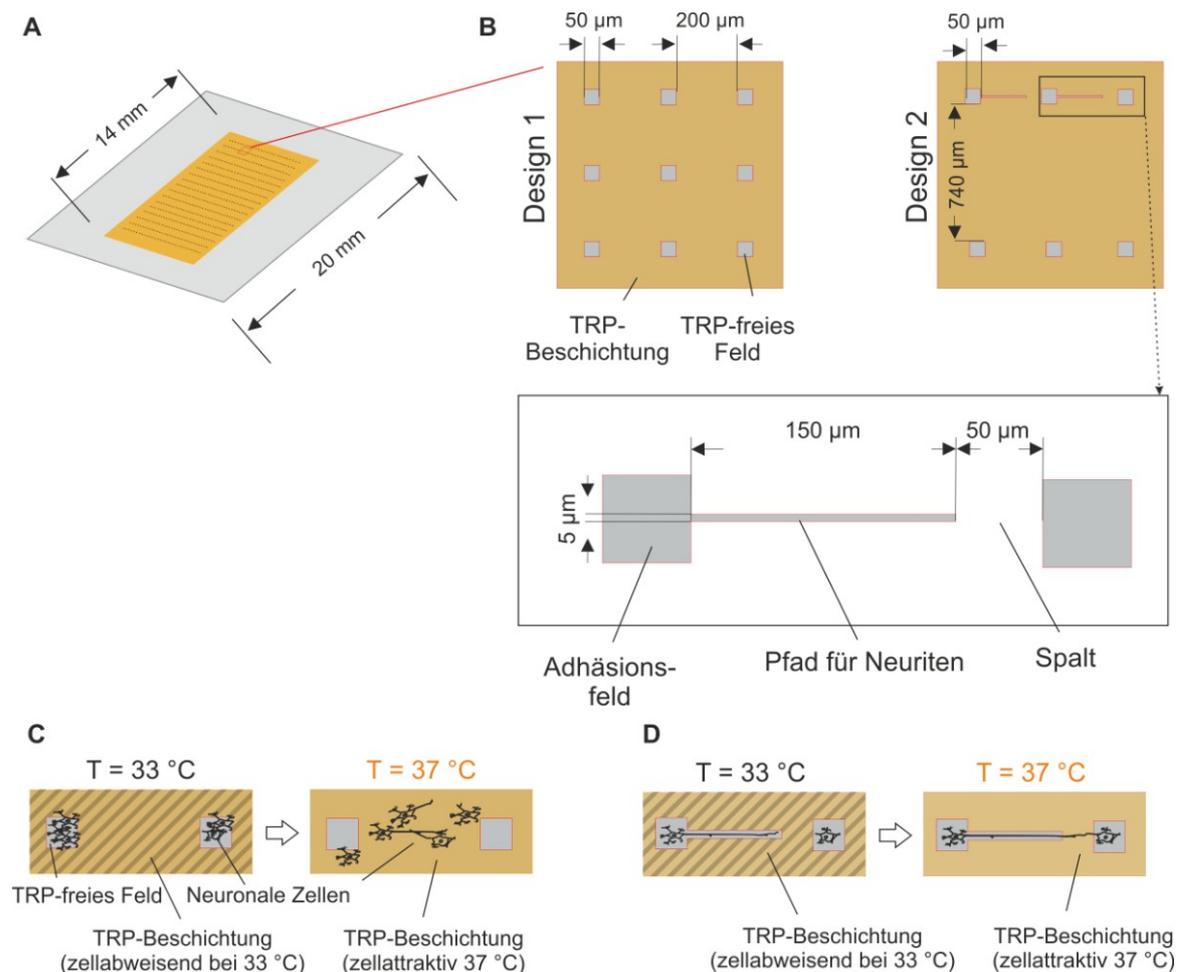


Abb. 5-1 Schematische Darstellung und Konzept der mikrostrukturierten thermoresponsiven Substrate. (A) Das Substrat basiert auf einem 20 x 20 mm Deckglas, auf welchem eine 50 nm dicke und 16 x 20 bzw. 14 x 9 mm (Design 1 bzw. 2) große Goldschicht aufgedampft wurde. (B) Die Goldschicht ist entsprechend dem Design 1 oder 2 strukturiert. Design 1 besteht aus Gold- und TRP-freien Feldern mit 50 µm Kantenlänge, die jeweils 200 µm in x- und y-Richtung über eine TRP-beschichtete Goldoberfläche voneinander getrennt sind. Design 2 erweitert Design 1 durch Reihen von Triplets aus drei Gold- und TRP-freien Feldern mit 50 µm Kantenlänge und 200 µm Abstand, wobei zwei dieser Felder über einen 150 µm langen und 5 µm breiten Pfad für Neuriten miteinander verknüpft werden. Dadurch bleibt ein 50 µm weiter TRP-beschichteter Spalt zur Kontrolle des Neuritenwachstums. (C bzw. D, jeweils linkes Bild) Bei einer Kultivierung unterhalb der LCST des TRPs (z.B. 33 °C) wird die Ausbreitung der Zellkörper bzw. Neuriten auf die TRP-freien Adhäsionsfelder bzw. Pfade beschränkt. (C bzw. D, jeweils rechtes Bild) Eine Temperaturerhöhung und damit verbundenes Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand induziert das Auswachsen der Zellen aus den Adhäsionsfeldern bzw. der Neuriten über den TRP-beschichteten Spalt hinweg zu benachbarten Zellen.

Der Zustand bzw. die Reinheit der Goldoberfläche ist wichtig für die Bindung des Schwefels an Gold und damit für eine homogene und funktionale TRP-Beschichtung (Xue et al., 2014). Um auszuschließen, dass die Goldoberfläche durch die Strukturierungsmethoden beeinflusst wird, zum Beispiel durch Rückstände des Fotolacks bei der Fotolithografie, und dadurch möglicherweise Beeinträchtigungen der TRP-Beschichtung nach sich zieht, wurde die Funktionalität der TRP-Beschichtung nach der erfolgten Strukturierung untersucht. Dazu wurden die gereinigten, strukturierten Goldoberflächen mit TRP beschichtet, und L929-Zellen darauf bei 37 °C, d.h. oberhalb der LCST des TRPs, kultiviert. Waren genügend Zellen adhärirt, wurden die Substrate für 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht, um das TRP in den zellabweisenden

Zustand zu schalten und die dadurch ausgelöste Abrundung der Zellen zu verfolgen. Schließlich wurde die Abrundungseffizienz von L929-Zellen auf den strukturierten und mit TRP-beschichteten Goldoberflächen evaluiert. Die Abrundungseffizienz war mit 85 bzw. 77 % auf mittels Fotolithografie bzw. Laserablation strukturierten Oberflächen vergleichbar mit der Abrundungseffizienz auf unstrukturierten TRP-beschichteten Standard-Goldoberflächen (Abb. 5-2).

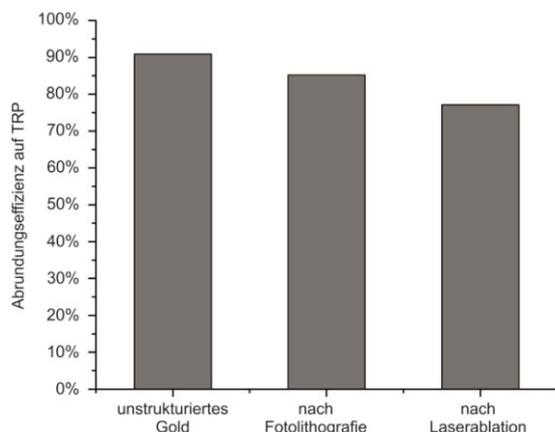


Abb. 5-2 Funktionalität der TRP-Beschichtung vor und nach der Strukturierung von Gold. Unstrukturierte sowie mittels Fotolithografie oder Laserablation strukturierte Goldoberflächen wurden mit TRP beschichtet und L929-Zellen darauf bei 37 °C kultiviert, bis mindestens 50 % der Zellen adhärirt waren. Dann wurden die Substrate für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Phasenkontrast mikroskopiert und exemplarische Bilder aufgenommen. Anhand dieser wurde die Abrundungseffizienz als Maß für die TRP-Funktionalität ermittelt.

5.1.2 Besiedlung der TRP-Substrate mit neuronalen Zellen

Für die Etablierung eines Protokolls zur Herstellung neuronaler Netzwerke mit strukturierten TRP-Substraten wurden neuronale Zellen der Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Vordifferenzierte SH-SY5Y-Zellen wurden auf die strukturierten thermoresponsiven Zellkultursubstrate ausgesät und die nicht-adhärenenten Zellen nach einem Tag bei 33 °C, d.h. unterhalb der LCST, abgespült. Hierbei wurden meist auch Zellen von den TRP-freien Feldern abgespült, sodass nach dem Spülen schließlich etwa 50 % der Felder von Zellen besetzt blieben (Abb. 5-3). Außerhalb der Felder blieben nur vereinzelte Zellen über der TRP-Oberfläche, welche aber im Laufe der weiteren Kultivierung verschwanden.

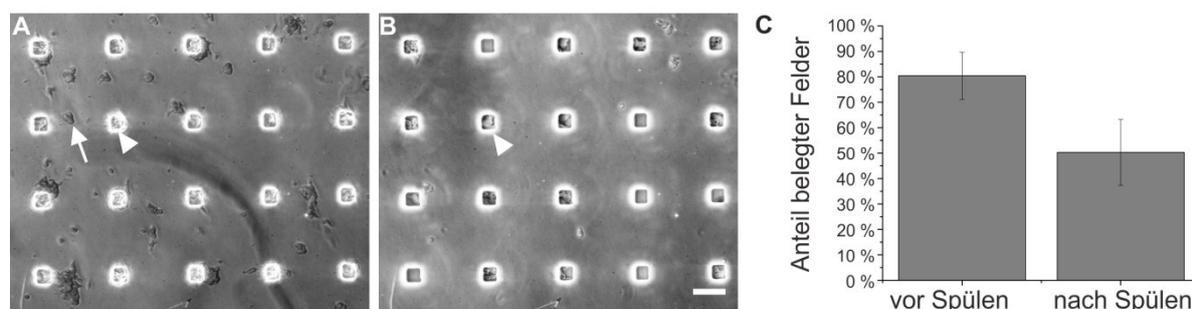


Abb. 5-3 Besiedlung der TRP-Substrate. SH-SY5Y-Zellen wurden auf die TRP-Substrate ausgesät und bei 33°C kultiviert. Nach einem Tag wurden nicht-adhärenenten Zellen abgespült. (A und B) Vor und nach dem Spülen wurden Phasenkontrastbilder aufgenommen. Von Zellen

belegte Felder sind beispielhaft mit Pfeilspitzen markiert, nicht-adhärerte Zellen mit Pfeilen. Maßbalken, 100 μm . (C) Der Anteil der von Zellen belegten Adhäsionsfelder wurde ermittelt. Durch das Spülen wurde dieser Anteil verringert. Fehlerbalken, SD ($n = 19$)

5.1.3 Eingrenzung des Zellwachstums auf TRP-freie Strukturen

Nach der Besiedlung der TRP-Substrate des Designs 1 und 2 wurden die Zellen weiterhin bei 33 °C kultiviert. Diese Temperatur war unterhalb der LCST des TRPs, sodass es sich im zellabweisenden Zustand befand. Gleichzeitig war diese Temperatur noch akzeptabel für das Überleben der Zellen, wie morphologische Untersuchungen und die daraus ermittelte Anzahl an Zellen mit Neuriten zeigten (Abb. 5-4 B+C). Die Zellen konnten während der Kultivierung bei 33 °C bis zu 7 Tage in den TRP-freien Bereichen gehalten werden (Abb. 5-4 A). Es befanden sich nahezu alle Zellen in den TRP-freien Bereichen, die allerdings nur etwa 3 % der gesamten strukturierten Fläche ausmachten. Dadurch war die Zelldichte um etwa drei Größenordnungen höher als auf der TRP-beschichteten Fläche. In den Feldern lag die Zelldichte nach 7 Tagen bei 1800 Zellen / mm^2 (mit durchschnittlich 6,0 Zellen pro Feld), während sie bei nur 3,7 Zellen / mm^2 auf der TRP-beschichteten Fläche lag. Diese Verteilung blieb bei einer Kultivierung bei 33 °C über den Zeitraum von 7 Tagen etwa gleich.

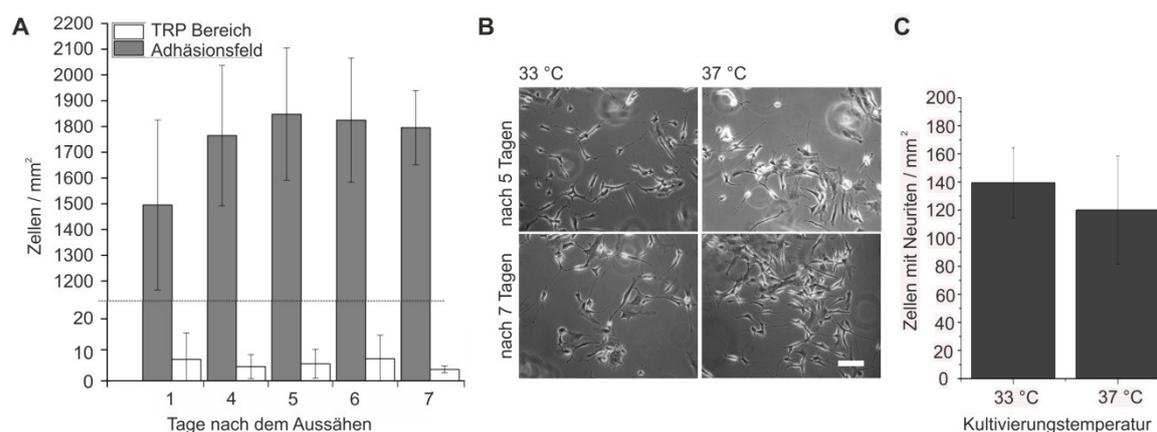


Abb. 5-4 Eingrenzung der Zellen auf TRP-freie Bereiche bei 33 °C und Vergleich der Morphologie von SH-SY5Y-Zellen bei 33 °C und 37 °C. (A) Zellen wurden auf die TRP-Substrate (Design 1 und 2) gesät und darauf mindestens 7 Tage bei Temperaturen unterhalb der LCST kultiviert. Anhand von Phasenkontrastbildern, aufgenommen an Tag 1 und 4 ($n = 13$) und bis Tag 7 ($4 \leq n \leq 6$), wurde die Zelldichte in den Adhäsionsfeldern und auf der TRP-Oberfläche analysiert. Fehlerbalken, SD. (B) SH-SY5Y-Zellen, die auf Kontroll-Deckgläsern bei 33 °C oder 37 °C kultiviert und differenziert wurden, zeigten keine morphologischen Unterschiede. (C) Quantifizierung der Zellen mit Neuriten an Tag 5 der Kultivierung bei 33 °C oder 37 °C. Fehlerbalken, SD ($n = 7$).

Auf Substraten mit Design 2 begannen die SH-SY5Y-Zellen etwa 1–3 Tage nach dem Aussäen Neuriten entlang der schmalen, TRP-freien Pfade auszustrecken. Von den sich auf diesen Substraten befindlichen Strukturen mit Pfaden waren nach 4 Tagen bei 33 °C etwa 96 % mit Zellen belegt. Von diesen waren in 86 % der Fälle auch die Pfade mit Zellen oder Neuriten besetzt, ohne dass außerordentliche Migration auf die angrenzende TRP-Fläche beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Manchmal konnte anhand der Durchlichtbilder schwer oder gar nicht zwischen Zellen und Neuriten unterschieden

werden. Aufgrund der tatsächlichen Breite der Pfade für Neuriten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch Zellkörper in die Pfade migrierten.

5.1.4 Zeitlich kontrollierte Migration von neuronalen Zellen

Im nächsten Schritt sollte die dynamische Kontrolle des Auswachsens neuronaler Zellen mittels TRP-Beschichtung demonstriert werden. Die SH-SY5Y-Zellen wurden dazu auf den TRP-Substraten ausgesät und für 4–5 Tagen bei 33 °C kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die TRP-Beschichtung durch eine Temperaturerhöhung von 33 °C auf 37 °C in den zellattraktiven Zustand geschaltet. An verschiedenen Zeitpunkten wurden Beispielbilder im Phasenkontrast aufgenommen, sowie Zeitraffer-Aufnahmen ab dem Zeitpunkt der Temperaturerhöhung. Nach 4 Tagen bei 33 °C, waren die meisten Zellen auf die TRP-freien Adhäsionsfelder begrenzt. Durch das Schalten der TRP-Beschichtung in den zellattraktiven Zustand konnte das Auswachsen von Neuriten und Zellen aus den Feldern mit den strukturierten TRP-Substraten vom Design 1 zeitlich gesteuert werden (Abb. 5-5). In Zeitraffer-Aufnahmen konnte beobachtet werden, wie die Zellen zunächst Neuriten bzw. Zellfortsätze auf die umgebende TRP-Oberfläche ausstrecken und langsam aus den Feldern herauswachsen (ca. 1 Stunde nach dem Hochschalten), wie sie anfangen über die Oberfläche zu migrieren und wie sie sich mit benachbarten Zellen verknüpfen. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in einem Anstieg der Konfluenz auf der TRP-Fläche wieder, welche für die Zeitraffer-Aufnahmen ausgewertet wurde (Abb. 5-5 E). Diese Art der Auswertung zeigt zudem, dass der Anstieg der Konfluenz nach etwa 10 Stunden ein Plateau erreichte, bei dem alle auf der Oberfläche vorhandenen Zellen über die Oberfläche migrierten.

Um zu zeigen, dass das Auswachsen und Migrieren der Zellen durch das Schalten der TRP-Beschichtung in den zellattraktiven Zustand verursacht wurde, und nicht durch eine in dieser Zeit abnehmende zellabweisende Eigenschaft des TRPs, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben auf den TRP-Substraten bei 33 °C kultiviert. Im Gegensatz zum obigen Experiment wurde die Temperatur jedoch nach den 4–5 Tagen weiterhin bei 33 °C gehalten. In diesem Zustand blieben die Zellen in den Feldern (Abb. 5-5 C). Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass das Auswachsen der Zellen nicht allein durch eine mit dem Temperaturanstieg verbundene Zunahme metabolischer Zellprozesse passierte, sondern durch das Schalten der TRP-Beschichtung in einen zellattraktiven Zustand. Dafür erfolgten weitere Kontrollversuche mit Substraten, die mit Thiol-PEG beschichtet wurden, welches unabhängig von der Temperatur zellabweisend ist. Zellen wurden auch auf diesen Substraten für 4–5 Tage bei 33 °C kultiviert, und danach für weitere zwei Tage bei 37 °C. Hier blieben die Zellen auch bei einer Temperaturerhöhung auf 37 °C in den Feldern (Abb. 5-5 D). Das gegenteilige Verhalten der Zellen auf TRP- und PEG-beschichteten Substraten wurde in vielfachen Versuchen beobachtet, wobei der Anstieg der Konfluenz auf den TRP-Substraten unterschiedlich stark verlief, was durch die Streuung der Ergebnisse deutlich wird (Abb. 5-5 F).

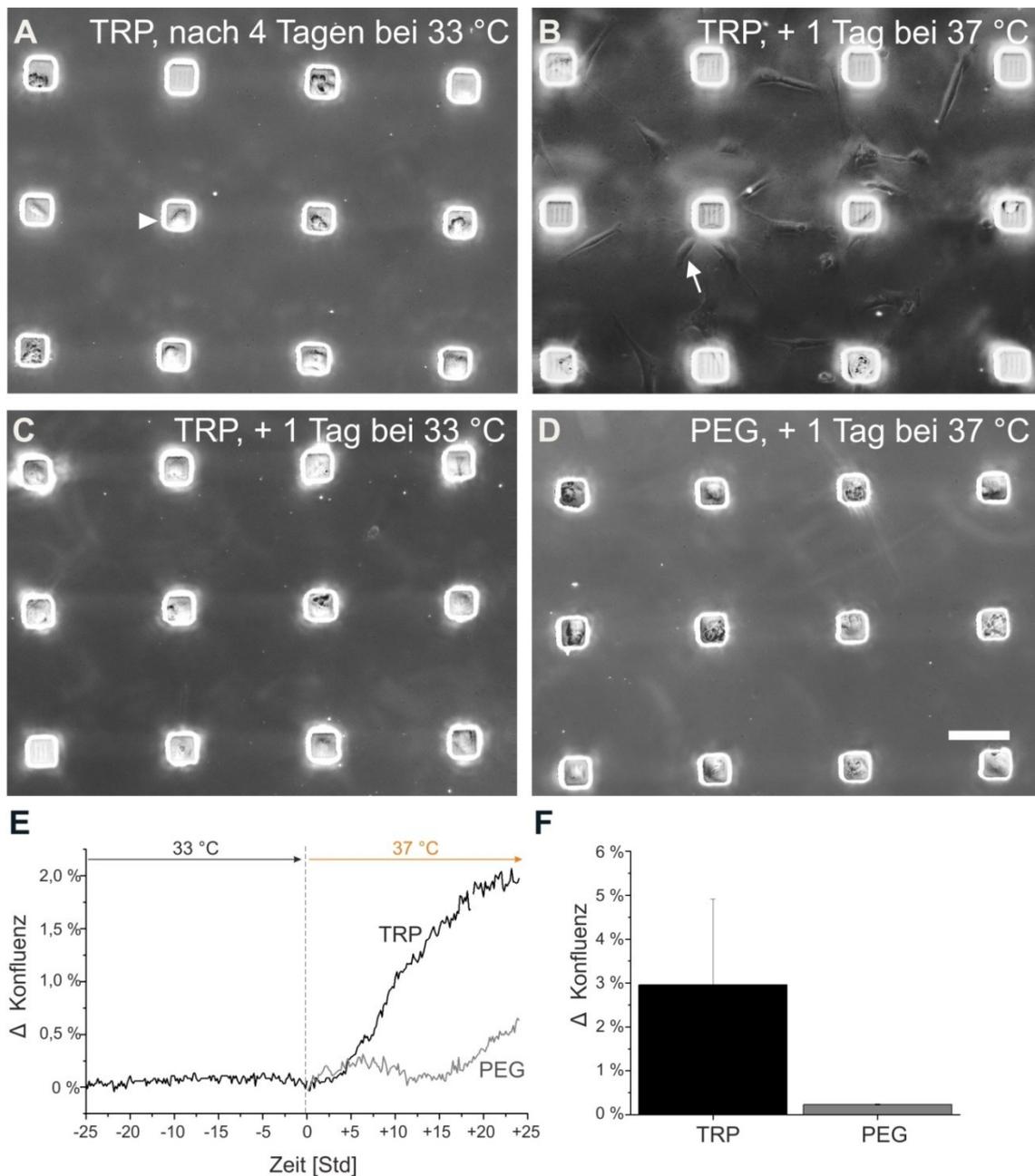


Abb. 5-5 Begrenzung und induziertes Auswachsen von neuronalen Zellen mit PEG- und TRP-beschichteten Substraten (Design 1). SH-SY5Y-Zellen wurden auf den Substraten ausgesät und für 4–5 Tage durch Kultivierung bei 33 °C in den Polymer-freien Feldern gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur für 1–2 weitere Tage auf 37 °C erhöht oder unverändert gelassen (Kontrolle). (A) Nach 4 Tagen bei 33 °C, waren die meisten Zellen auf die Polymer-freien Adhäsionsfelder begrenzt (beispielhaft mit Pfeilspitze markiert). (B) Durch Temperaturerhöhung auf 37 °C wurde das TRP zellattraktiv geschaltet und die Migration von Zellen auf die TRP-Fläche (beispielhaft mit Pfeil markiert) und die Formation von Zell-Zell-Kontakten induziert. (C) Dagegen blieben die Zellen weiterhin in den Feldern, wenn die Temperatur bei 33 °C gehalten wurde. (D) Auf PEG-beschichteten Substraten wurden die Zellen unabhängig von der Temperatur auf die PEG-freien Bereiche begrenzt. Maßbalken, 100 μ m. (E, F) Änderung der Konfluenz auf TRP- und PEG-beschichteten Bereichen während der Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen. (E) Zeitliche Änderung der Konfluenz auf TRP- und PEG-beschichteten Bereichen vor und nach dem Schaltpunkt. (E) Endpunkt-Analyse der Konfluenzänderung nach 1–2 zusätzlichen Tagen Kultivierung bei 37 °C auf TRP- und PEG-beschichteten Bereichen (n = 6 und n = 2). Fehlerbalken, SD.

5.1.5 Zeitlich und räumlich gesteuertes Auswachsen von Neuriten

Mit den Substraten vom Design 1 konnte das Auswachsen der neuronalen Zellen zeitlich kontrolliert werden. Das Ziel des nächsten Schrittes war eine zusätzliche räumliche Kontrolle über das Auswachsen der Neuriten. Dies sollte zunächst dazu dienen, neuronale Verbindungen nur zwischen bestimmten Feldern zu knüpfen. Dazu wurden weitere Versuche mit den Substraten vom Design 2 durchgeführt, bei welchem einige der Felder mit einem 150 µm langen und 7–9 µm breiten Pfad für Neuriten in Richtung des nächsten Feldes verbunden sind. Der 50 µm weite TRP-beschichtete Spalt erlaubt die Kontrolle über das Auswachsen der Neuriten über diesen Spalt hinweg. Kontrollversuche wurden außerdem wieder mit PEG-beschichteten TRP-Substraten vom Design 2 durchgeführt.

SH-SY5Y-Zellen wurden auf den Substraten ausgesät und für 4–5 Tage durch Kultivierung bei 33 °C in den Polymer-freien Strukturen gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur für 1–2 weitere Tage auf 37 °C erhöht oder unverändert gelassen (Kontrolle). Auch in diesen Versuchen wurden die Zellen wieder in den Strukturen gehalten, indem das TRP durch Kultivierung bei 33 °C in den zellabweisenden Zustand gebracht wurde (Abb. 5-6 A). Durch eine Temperaturerhöhung und folglich ein Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand, konnte nach den 4–5 Tagen das Auswachsen der Neuriten über den TRP-Spalt zwischen Pfad und benachbartem Feld induziert werden (Abb. 5-6 B, C). Nach einem Tag bei 37 °C waren 28 % und nach 2 Tagen 56 % der TRP-Spalte von Neuriten (oder Zellen) überbrückt (Abb. 5-6 G) und damit signifikant mehr als bei Substraten, die stattdessen zwei weitere Tage bei 33 °C kultiviert wurden (Abb. 5-6 D und G). Auf den PEG-beschichteten Substraten hingegen blieben die Zellen und Neuriten auch nach der Temperaturerhöhung auf 37 °C in den Strukturen (Abb. 5-6 E, F, G). Auch auf TRP-beschichteten Substraten, die für 2 weitere Tage bei 33 °C kultiviert wurden, blieben die Zellen in den Strukturen.

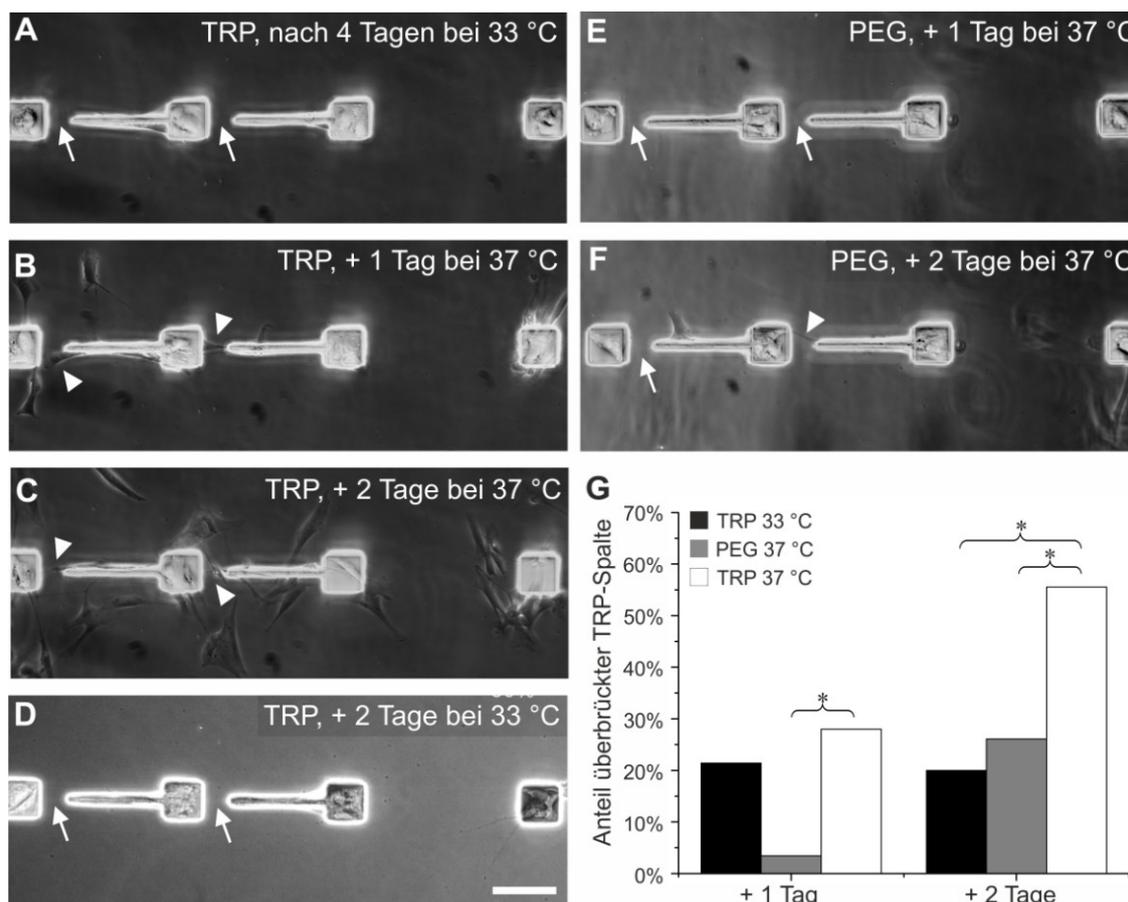


Abb. 5-6 Dynamisch kontrolliertes Auswachsen der Neuriten und Formation kleiner neuronaler Schaltkreise auf Substraten (Design 2). SH-SY5Y-Zellen wurden auf den Substraten ausgesät und für 4–5 Tage durch Kultivierung bei 33 °C in den Polymer-freien Strukturen gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Temperatur für 1–2 weitere Tage auf 37 °C erhöht oder unverändert gelassen (Kontrolle). (A) Nach 4 Tagen bei 33 °C waren die meisten Zellen auf die Polymer-freien Strukturen begrenzt (Pfeile markieren Zell- und Neuriten-freie TRP-Spalte). (B oder C) Durch Temperaturerhöhung auf 37 °C für 1 oder 2 Tage wurde das TRP zellattraktiv geschaltet und das Auswachsen von Neuriten und Zellen über den TRP-beschichteten Spalt hinweg ermöglicht (markiert durch Pfeilspitze). (E,F) Bei PEG-beschichteten Substraten blieben die Zellen größtenteils in den Strukturen, auch nach Temperaturerhöhung auf 37 °C. (D) Auch auf TRP-beschichteten Substraten, die für 2 weitere Tage bei 33 °C kultiviert wurden, blieben die Zellen in den Strukturen. Maßbalken, 100 µm. (G) Quantifizierung des Anteils überbrückter TRP-Spalte an verschiedenen Zeitpunkten. Der Anteil überbrückter TRP-Spalte war nach 2 Tagen bei 37 °C signifikant höher auf TRP-beschichteten Substraten als auf PEG-beschichteten Substraten oder TRP-beschichteten Substraten, die für 2 weitere Tage bei 33 °C kultiviert wurden (*: $p < 0,05$, 2-seitiger Fischers Exakter Test). $23 \leq n \leq 80$ Zahl der analysierten Spalte (in 2–6 Experimenten).

Somit konnte gezeigt werden, dass mit den TRP-beschichteten Substraten und geeigneter Strukturierung die Formation neuronaler Verbindungen zwischen SH-SY5Y-Zellen zeitlich und räumlich gesteuert werden kann. Durch die immunozytochemische Färbung des neuronalen Markers $\beta 3$ -Tubulin in den SH-SY5Y-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Standardprotokolle wie Immunozytochemie auf diesen Substraten in einfacher Weise durchgeführt werden können, und dass die SH-SY5Y-Zellen während dieser Versuche ihren differenzierten neuronalen Phänotyp behielten (Abb. 5-7).

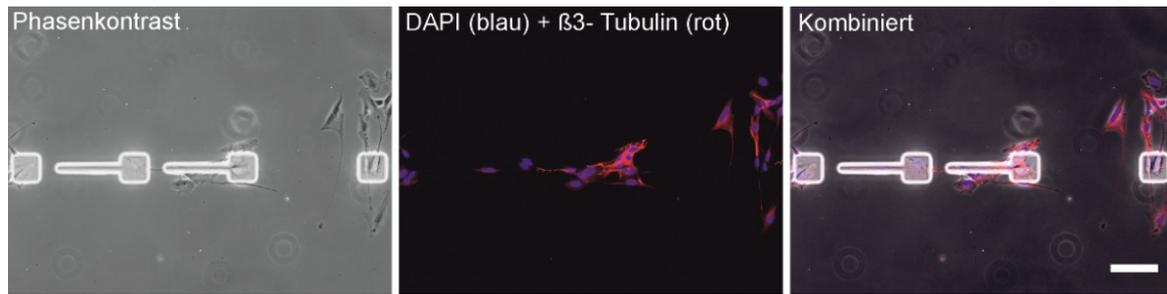


Abb. 5-7 Färbung des neuronalen Markers β 3-Tubulin auf den TRP-Substraten. SH-SY5Y-Zellen wurden auf TRP-beschichtete Substrate ausgesät, und für 4 Tage bei 33 °C und 2 Tage bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und nach einem Standard-Immunocytochemie-Protokoll wurde der neuronale Marker β 3-Tubulin (rot) sowie Zellkerne (blau) angefärbt. Maßbalken, 100 μ m.

5.1.6 Anwendung des Protokolls auf humane induzierte Neurone

Um die Anwendungsmöglichkeiten des zuvor etablierten Protokolls zum kontrollierten Auswachsen von Neuriten auf andere neurobiologisch relevante Zelltypen zu demonstrieren, wurden in Kooperation mit Katharina Grauel (AG Rosenmund, Charité – Universitätsmedizin Berlin) Versuche mit humanen iN durchgeführt. Die humanen iN wurden mittels Transduktion mit EGFP markiert, um sie leichter von anderen Zellen unterscheiden zu können. Zur verbesserten Adhäsion und Überlebensfähigkeit der humanen iN wurden zunächst Mausastrozyten auf den Substraten ausgesät und für einen Tag bei 32 °C kultiviert. Nach dem Abspülen nicht-adhärenter Astrozyten wurden die iN auf die strukturierten thermoresponsiven Zellkultursubstrate ausgesät. Die Zellen wurden für weitere 4 Tage bei 32 °C, d.h. unterhalb der LCST, kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das TRP durch eine Temperaturerhöhung auf 37 °C in den zellattraktiven Zustand geschaltet. Sowohl Mausastrozyten als auch iN adhärten und blieben während der Kultivierung bei 32 °C in den TRP-freien Strukturen (Abb. 5-8 A). Durch das Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand konnte das Auswachsen von Neuriten und Zellen induziert werden (Abb. 5-8 B). Wie erwartet, folgten die humanen Neurone den Mausastrozyten in ihrem Wachstum.

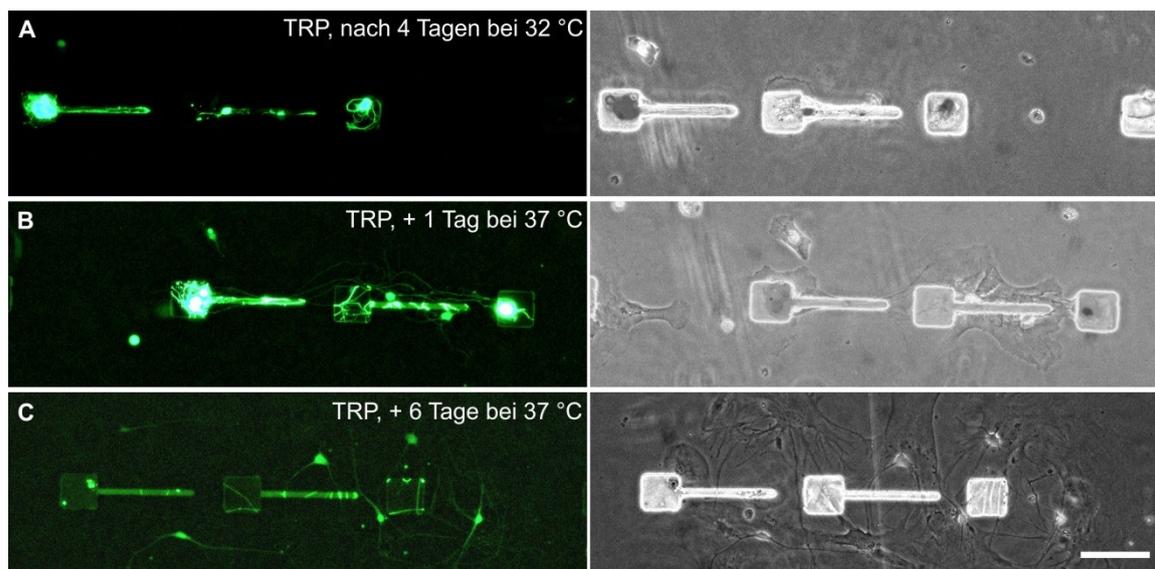


Abb. 5-8 Kontrolliertes Auswachsen von humanen iN auf TRP-Substraten. Die TRP-beschichteten Substrate wurden zunächst mit Mausastrozyten, und einen Tag später mit EGFP-markierten iN besiedelt. Astrozyten und iN wurden für weitere 4 Tage bei 32 °C kultiviert. Dann wurde das TRP durch Temperaturerhöhung auf 37 °C in den zellattraktiven Zustand geschaltet und die Zellen für weitere 10 Tage auf den Substraten kultiviert. (A) Mausastrozyten und iN wurden während der Kultivierung bei 32 °C in den TRP-freien Strukturen gehalten. (B) Schalten des TRPs induzierte ein Auswachsen von Zellen und Neuriten über den TRP-beschichteten Spalt und zu benachbarten Zellen. (C) Nach 6 Tagen bei 37 °C waren die iN weiter über die TRP-Fläche ausgebreitet und vernetzt. Maßbalken, 100 µm.

10 Tage nach dem Aussäen auf die TRP-Substrate (4 Tage bei 32 °C und 6 Tage bei 37 °C) wurden die iN elektrophysiologisch mit der Patch-Clamp-Methode in der Whole-Cell-Konfiguration untersucht, um die elektrische Aktivität der Zellen zu testen. Dies war auf den TRP-Substraten ohne Umbau des Elektrophysiologie-Setups möglich. Aktionspotentiale wurden in der Stromklemme (Englisch: current clamp) gemessen, wofür Ströme unterschiedlicher Stärke (von -40 pA bis +100 pA) für jeweils 300 ms injiziert wurden. Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass die iN nach 10 Tagen auf den TRP-Substraten in der Lage sind, Aktionspotentiale zu generieren (Abb. 5-9 A). Die spontane synaptische Aktivität der iN wurde in der Spannungsklemme bei einem gehaltenem Ruhepotential von -70 mV gemessen. Die hierbei gemessenen spontanen erregenden postsynaptischen Ströme (Englisch: miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs) demonstrieren, dass die vermessenen iN funktionelle Synapsen bilden und von anderen iN synaptischen Input erhielten (Abb. 5-9 B). Da die vermessenen iN bei intrazellulärer Stimulation keine autaptischen postsynaptischen Ströme aufwiesen (Daten nicht dargestellt), müssen diese Inputs von anderen iN stammen.

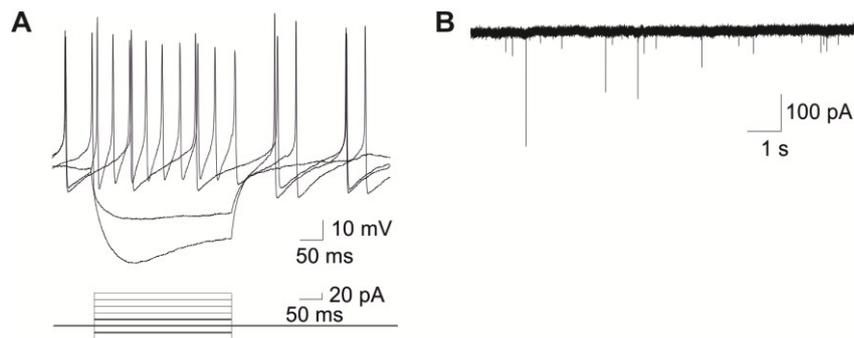


Abb. 5-9 Elektrophysiologische Ableitungen der iN auf den TRP-Substraten. Die Zellen wurden 10 Tage nach dem Aussäen auf den Substraten bei Raumtemperatur mit der Patch-Clamp-Methode in der Whole-Cell-Konfiguration vermessen. (A) Aktionspotentiale wurden in der Stromklemme gemessen, wobei Ströme von -40 pA bis +100 pA (unteres Schema) für jeweils 300 ms injiziert wurden. Zur besseren Übersicht sind nur die Potentiale (obere Kurven) für die Stromstärken von -40 pA bis +20 pA (im Schema unter dicke Linien) dargestellt. (B) Die spontane synaptische Aktivität der Zellen wurde in der Spannungsklemme gemessen, wobei die Zellen bei einem Ruhepotential von -70 mV gehalten wurden. Der Ausschnitt der Messung über einen Zeitraum von 12 Sekunden zeigt die gemessenen Miniaturströme (mEPSCs).

Nach der Temperaturerhöhung auf 37 °C wuchsen Neuriten und Zellen auf den TRP-beschichteten Substraten allerdings auch in anderen Bereichen vermehrt aus den Feldern heraus, oder Zellen wanderten entlang der Pfade für die Neuriten und über den Spalt hinweg, sodass einige unkontrollierte neuronale Verbindungen entstanden, vor allem je länger bei 37 °C kultiviert wurde (Abb. 5-6 C und Abb. 5-8 B-C).

Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die TRP-Substrate lokal zu heizen, sodass nur kleine Bereiche wie z.B. die TRP-Spalte zwischen Pfad und Adhäsionsfeld vom zellabweisenden in den zellattraktiven Zustand geschaltet werden können. Um dies zu erreichen, sollten Mikroheizelektroden unterhalb der Substratoberfläche integriert werden. Die Entwicklung einer solchen Mikroheizung ist das Thema der folgenden Kapitel.

5.2 Mikroheizung zur lokalen Temperierung und Schaltung der TRP-Substrate

Zur orts aufgelösten Schaltung des TRP mittels lokaler Temperierung der Substratoberfläche sollten Heizwiderstände unterhalb der Substratoberfläche integriert werden (Abb. 5-15). Diese sollten die Oberfläche in definierter Weise über Joulesche Wärme heizen. Dabei wurde eine Begrenzung der geheizten und damit geschalteten TRP-Bereiche im Mikrometerbereich mit möglichst scharfen Temperaturgradienten angestrebt. Die Entwicklung einer Temperaturmessmethode zur Evaluierung von Temperaturprofilen über Mikroelektroden ist in den nächsten Kapiteln dargestellt. In den späteren Kapiteln wird die Optimierung der Geometrie der Mikroelektroden zur Optimierung der Temperaturgradienten beschrieben.

5.2.1 Hochaufgelöste Temperaturmessung mit Rhodamin B

Zur Evaluierung der Temperaturverteilung auf der mit Mikroelektroden beheizten Substratoberfläche wurde ein Protokoll zur Temperaturmessung auf Oberflächen entwickelt. Dieses basiert auf einem kommerziell erhältlichen Sol-Gel, welches den temperatursensitiven Fluoreszenzfarbstoff RhB enthält. Die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Quantenausbeute von der Temperatur wurde in der Literatur schon vielfach dargestellt (siehe Kapitel 3.6.3). Jedoch hängt die Fluoreszenzintensität am Detektor schließlich auch von vielen anderen experimentellen Bedingungen ab, wie zum Beispiel der Konzentration des Farbstoffes, der Schichtdicke des farbstoffhaltigen Sol-Gels, der chemischen Umgebung des Farbstoffes, sowie den Beleuchtungseinstellungen. Daher wurde zunächst die Temperaturabhängigkeit der RhB-Fluoreszenzintensität in dem hier verwendeten System kalibriert. Dazu wurden Fluoreszenzaufnahmen der Sol-Gel-beschichteten Deckgläser bei definierten Umgebungstemperaturen zwischen 22 und 44 °C aufgenommen, sowohl in trockener als auch in flüssiger Umgebung. Die Umgebungstemperaturen wurden mit Hilfe einer Klimakammer in 3–4 Zyklen variiert, wobei aktiv geheizt und passiv gekühlt wurde. Für die Kalibrierungsgleichungen im Trockenen oder Flüssigen wurden die Daten jeweils auf die Werte bei 22 °C normiert und lineare Funktionen daran angepasst (Abb. 5-10). Die Gleichungen dieser Funktionen waren vergleichbar mit Literaturwerten (Akiyama et al., 2009).

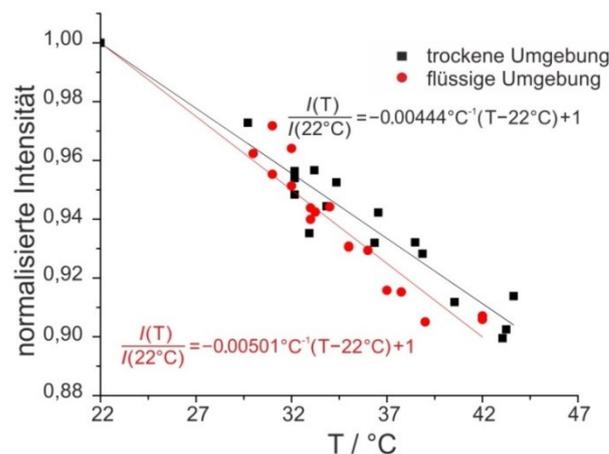


Abb. 5-10 Temperaturabhängigkeit der RhB-Fluoreszenzintensität im Trockenen und Flüssigen. Sol-Gel-beschichtete Deckgläser wurden auf einem Fluoreszenzmikroskop platziert, welches von einer Klimakammer umgeben war, mit welcher die Umgebungstemperatur der Proben durch aktives Heizen und passives Kühlen reguliert wurde. Fluoreszenzaufnahmen wurden bei Temperaturen zwischen 22 und 44 °C aufgenommen, sowohl in trockener (schwarze Quadrate) als auch in flüssiger (rote Kreise) Umgebung. Die Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils auf die Werte bei 22 °C normiert und eine lineare Funktion daran angepasst.

Auflösung der Temperaturmessung im Trockenen und Flüssigen

Zur Demonstration der Orts- und Temperatur-Auflösung des Verfahrens wurden Temperaturmessungen auf Sol-Gel-beschichteten Mikroheizelektroden aus ITO in Umgebung von Luft und in wässriger Umgebung durchgeführt und die Messdaten mit numerischen Simulationen verglichen. Dafür wurden verschiedene Spannungen für 30 Sekunden an 45 µm breite und 12 mm lange Mikroelektroden aus ITO (Abb. 5-11) angelegt, und die Temperaturverteilung wurde quer zur Elektrode analysiert (Abb. 5-12).

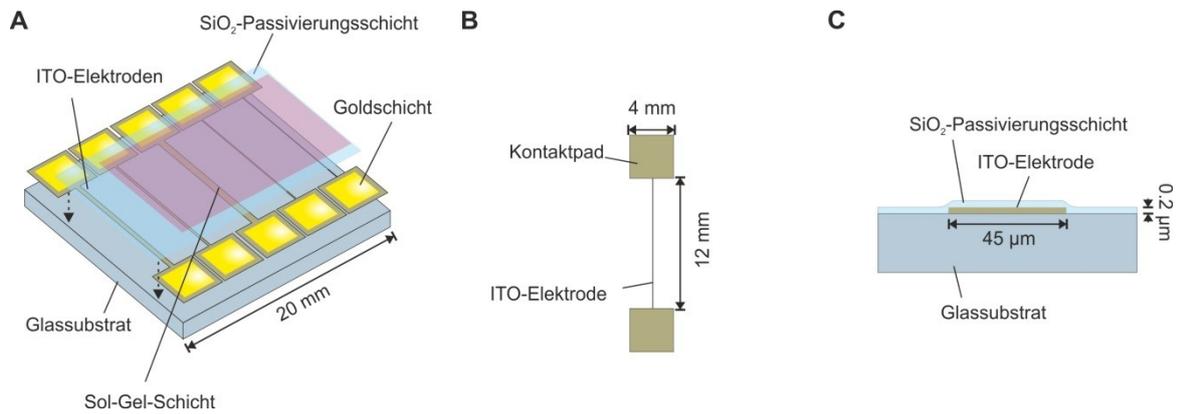


Abb. 5-11 Schematische Darstellung der ITO-Mikroheizelektroden. (A) Aufbau der Mikroheizchips zur Temperaturmessung mit Substrat, Elektroden, Passivierung und Sol-Gel-Schicht. (B) Geometrische Darstellung der 45 µm breiten vermessenen Mikroelektrode (Draufsicht). (C) Schnitt der vermessenen Mikroelektrode im Detail.

Die analysierten Ausschnitte lateral zur Mikroelektrode in Abb. 5-12 C zeigen die sehr genauen Temperaturgradienten über einen kleinen Temperaturbereich bei einer angelegten Spannung von 32 V (d.h. 94,5 mW) in flüssiger und trockener Umgebung. Mit den hier verwendeten mikroskopischen Einstellungen wurde eine örtliche Auflösung von 0,77 Datenpunkten (d.h. Pixel) pro µm in x-Richtung erreicht. Die Temperaturverteilung wurde außerdem mit der Finite-Elemente-Methode COMSOL im 2D-Modell simuliert und mit den experimentellen Daten verglichen. Wie in Abb. 5-12 C zu sehen ist, stimmen die experimentellen Temperaturgradienten gut mit den simulierten Temperaturgradienten überein. Auffällig ist, dass bei gleicher Spannung die Temperaturerhöhung im Flüssigen 10 °C unterhalb der Temperaturerhöhung im Trockenen liegt. Da die Wärmeleitfähigkeit von Wasser ($k = 0,54 \text{ W/mK}$) deutlich höher ist als von Luft ($k = 0,024 \text{ W/mK}$, beide Werte bei 0 °C, (Gerthsen, 2013)), kann der beobachtete Effekt durch eine stärkere Temperaturdissipation in Wasser erklärt werden. Dies macht deutlich, dass eine Unterscheidung zwischen trockener und flüssiger Umgebung für akkurate Temperaturabschätzungen äußerst wichtig ist.

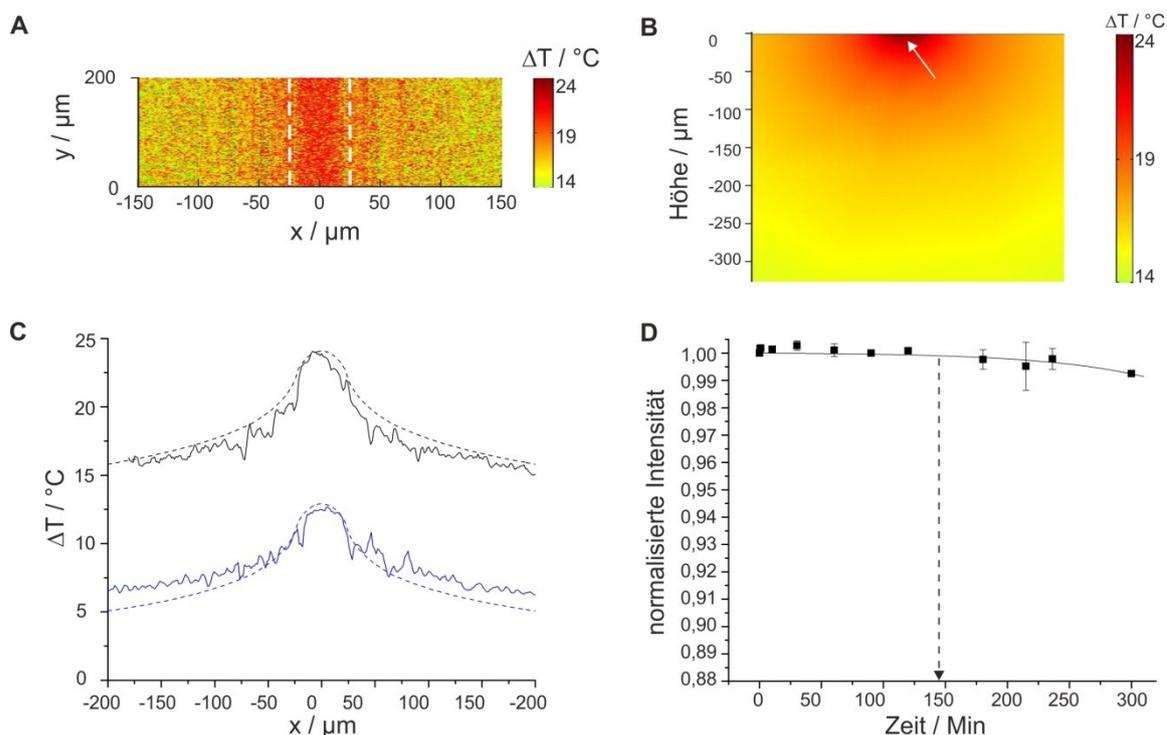


Abb. 5-12 Temperaturmessung im Trockenem und im Flüssigen. (A) Draufsicht auf den vermessenen Bereich des normalisierten und kalibrierten RhB-Fluoreszenzbildes mit der Mikroelektrode im zentralen Bereich (durch gestrichelte Linie markiert). Von diesem Ratio-Bild wurde das Temperaturprofil im Trockenem mit 32 V (C) erhalten, indem die Pixelwerte über den 200 μm Bereich in y-Richtung gemittelt wurden und in x-Richtung ein gleitender Mittelwert angewendet wurde ($n = 3$). (B) Seitenansicht auf den Temperaturverlauf bei simulierter Joulescher Erwärmung durch die zentrale Mikroheizelektrode an der Chipoberfläche (markiert durch Pfeil). Das daraus erhaltene Temperaturprofil in x-Richtung an der Oberfläche ist in (C) durch die gestrichelte schwarze Linie dargestellt. (C) Temperaturprofile quer zur 45 μm breiten Mikroelektrode (Zentrum bei $x = 0$) bei Anlegen einer Spannung von 32 V im Trockenem (schwarz) und im Flüssigen (PBS, blau). Die Temperaturprofile wurden experimentell gemessen (durchgehende Linien) und numerisch simuliert (gestrichelte Linie). Die Temperaturprofile demonstrieren eine hohe Orts- (unterer μm -Bereich) und eine hohe Temperatur-Auflösung (wenige $^\circ\text{C}$) im Trockenem und im Flüssigen. (D) Stabilität der Fluoreszenzintensität der RhB-haltigen Sol-Gel-Schicht in wässriger Umgebung in Abhängigkeit der Zeit. Die Temperatur wurde dabei konstant gehalten. Die Intensität nimmt sehr langsam über die Zeit ab. Nach 145 Minuten (Pfeil) lag die normalisierte Fluoreszenzintensität noch bei über 99,9 % der Anfangsintensität (einem hypothetischen Temperaturanstieg von 0,2 $^\circ\text{C}$ entsprechend). Dies wurde für zeitabhängige Temperaturmessungen im Flüssigen basierend auf Fluoreszenzintensitätsunterschieden als akzeptabel erachtet.

Vorab wurde die Stabilität der RhB-haltigen Sol-Gel-Schicht in wässriger Umgebung untersucht, um Messfehler durch ein Auswaschen des RhB-Farbstoffes aus der Sol-Gel-Schicht oder eine Ablösung der Sol-Gel-Schicht ausschließen zu können. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität an bestimmten Zeitpunkten (0,5; 1; 30; 60; 90; 120; 180; 215; 236 und 300 Minuten) nach Immersion in wässriger Lösung (PBS) bei konstanter Temperatur analysiert und auf den Ausgangswert normalisiert (Abb. 5-12 D). Es zeigte sich, dass die normalisierte Fluoreszenzintensität mit der Zeit im Flüssigen langsam abnimmt. Allerdings war die Fluoreszenzintensität nach 145 Minuten noch bei 99,9 % des ursprünglichen Wertes, was einem hypothetischen Temperatursprung von $\pm 0,2$ $^\circ\text{C}$ entspricht, und was für hochauflösende, zeit-abhängige Temperaturmessungen als akzeptabel erachtet wurde.

Zusammenfassend wurde eine hohe Temperrauflösung von wenigen °C erreicht, sowie eine hohe laterale Auflösung (eindimensional, d.h. in x-Richtung) im unteren µm-Bereich.

Zeitabhängige Temperaturmessungen

Für das lokale Schalten der TRP-Oberfläche sollten Aufheiz- und Abkühlzeiten mit dieser Methode ebenfalls charakterisierbar sein, um den Schaltvorgang möglichst genau zu kontrollieren. Eine solche zeitliche Charakterisierung kann auch für andere Anwendungen, in denen zyklische Temperierungen genutzt werden, wie z.B. on-chip PCR-Anwendungen, von Bedeutung sein. Es wurden 20 V an die 45 µm breite ITO-Mikroelektrode angelegt und die zeitabhängige Temperaturerhöhung an der Elektrodenoberfläche im Trockenem gemessen (Abb. 5-13). Im Falle der hier verwendeten Mikroelektrode steigt die Temperatur über der Elektrode über einen Zeitraum von einigen Minuten stark an, und pendelt sich etwa 30–60 Minuten nach Anlegen der Spannung ein. Wie zuvor, stimmen die experimentellen Daten gut mit den simulierten Daten überein.

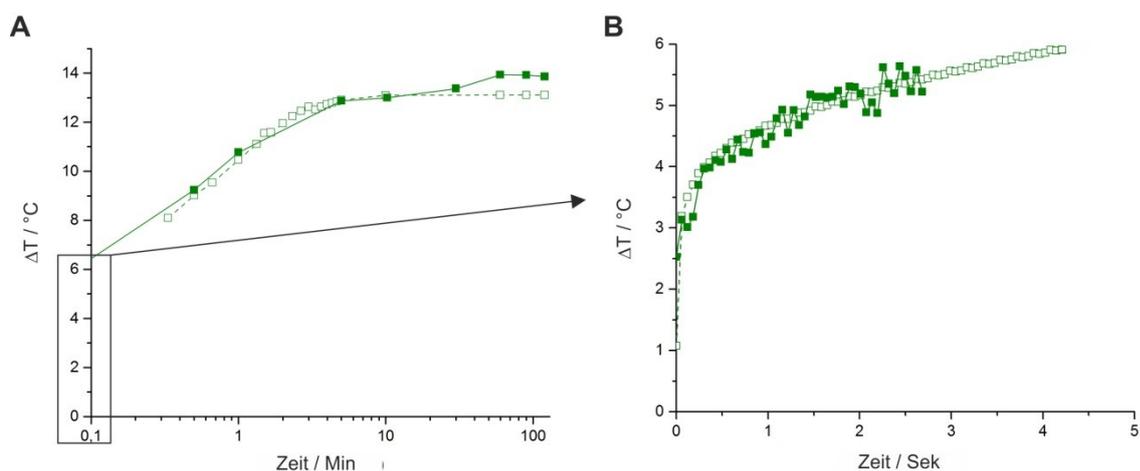


Abb. 5-13 Zeitabhängige Temperaturmessungen im Sub-Sekunden- und Stunden-Bereich. An die 45 µm breite und 12 mm lange, Sol-Gel-beschichtete ITO-Heizelektrode wurde eine Spannung von 20 V angelegt, und der Temperaturanstieg über der Elektrode an verschiedenen Zeitpunkten mit der Fluoreszenzbasierten Methode gemessen, in einem Zeitraum von (A) Minuten, und (B) Sekunden. Gefüllte Kästchen stellen experimentell gemessene Werte dar, offene Kästchen numerisch simulierte Werte. Beide Werte stimmen gut überein und demonstrieren die hohe Präzision der Methode für hoch auflösende Temperaturmessungen im Sub-Sekunden-Bereich als auch über Zeiträume von Stunden. Zu beachten ist, dass die Datenpunkte im Sub-Sekunden-Bereich auf einzelnen Fluoreszenzbildern basieren, die mit einer Belichtungszeit von 100 ms und einer 8-fachen Beleuchtungsstärke aufgenommen wurden.

Die Ergebnisse dieser Messungen verdeutlichen, dass sich die hier etablierte Messmethode aufgrund der kurzen Aufnahmezeiten und der hohen Stabilität des Sol-Gel-Filmes in trockener Umgebung hervorragend für zeitliche Messungen im Sub-Sekunden-Bereich sowie im Stundenbereich eignet.

Sol-Gel-Schichtdicke und oberflächennahe Temperaturmessungen

Für die lokale Schaltung des TRPs auf der Oberfläche mittels Mikroheizung, ist die exakte Temperatur an der Stelle des TRPs von Bedeutung, d.h. in etwa 1–10 nm über der Goldschicht. Die Nähe des Temperatursensors zur Oberfläche ist zudem fundamental für alle Oberflächen-Temperaturmessungen und wurde in der Literatur zuvor diskutiert (Gui and Ren, 2008; Samy et al., 2008). Aus diesem Grund wurde die Dicke der RhB-haltigen Sol-Gel-Schicht mit freundlicher Unterstützung durch Vladimir Prokopovic (Fraunhofer IZI-BB, Potsdam) mit einem AFM analysiert (Abb. 5-14 A). Die Schichtdicke lag bei $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, unabhängig davon, ob das Sol-Gel auf Glas oder Gold aufgebracht wurde. Geringe Abweichungen der Schichtdicke bzw. der absoluten Menge von RhB im Film sollten die Temperaturmessungen nicht beeinträchtigen, da sie auf ratiometrischen Messungen der Fluoreszenz-Intensität beruhen.

Um zu überprüfen, ob die Sol-Gel-Schicht selbst die Temperatursausbreitung und damit die gemessenen Temperaturprofile beeinflusst, wurde die Temperaturverteilung mit und ohne diese Schicht numerisch simuliert (Abb. 5-14 B). Der Wärmeleitkoeffizient der Sol-Gel-Schicht wurde dafür entsprechend der Herstellerangaben auf 1 W/mK gesetzt. Mit diesen Parametern konnte kein signifikanter Einfluss der Sol-Gel-Schicht auf die Temperatursausbreitung festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass in dieser Konstellation keine signifikanten Temperaturgradienten innerhalb der $1 \mu\text{m}$ dicken Schicht auftreten, und die Methode daher ein verlässliches Maß für die tatsächliche Oberflächen-Temperaturverteilung ist.

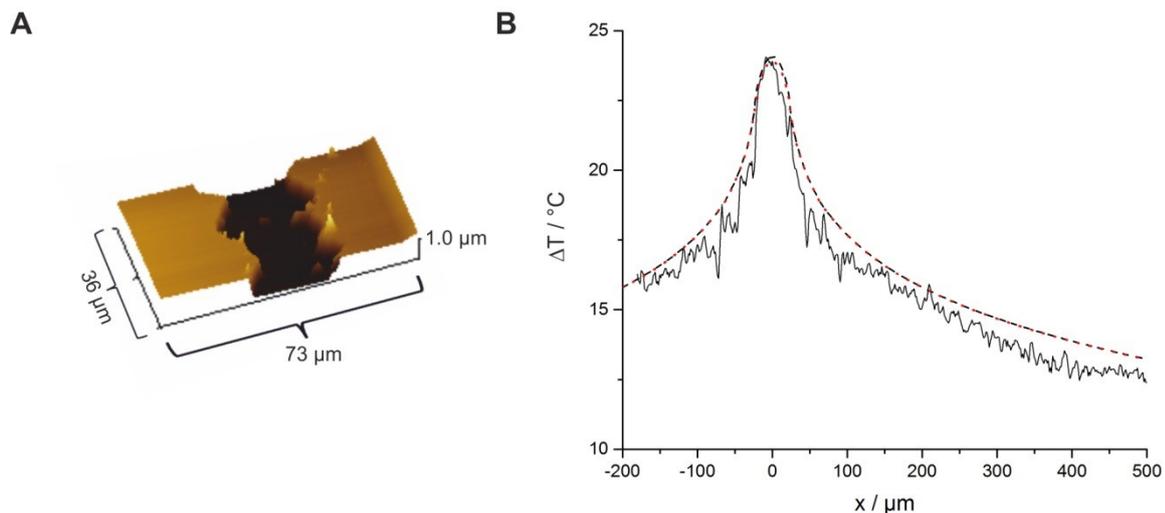


Abb. 5-14 Dicke der Sol-Gel-Schicht und Einfluss auf die Temperaturentwicklung. (A) Die Dicke der Sol-Gel-Schicht wurde mittig auf dem Substrat an einem Ritz in der Schicht mit einem AFM analysiert. Sie lag bei $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ unabhängig vom Substrat (Gold oder Glas). (B) Das Temperaturprofil wurde oberhalb einer modellierten $1 \mu\text{m}$ dicken Sol-Gel-Schicht oder direkt über der $45 \mu\text{m}$ breiten Mikroelektrode numerisch simuliert (gepunktete oder gestrichelte Linie) und mit experimentellen Temperaturmessungen mit der Sol-Gel-Schicht verglichen (durchgehende Linie). Dafür wurden 20 V an die $45 \mu\text{m}$ lange ITO-Elektrode für 30 Sekunden angelegt. Die Temperaturprofile stimmen überein und zeigen keinen Einfluss der Sol-Gel-Schicht auf das Temperaturprofil.

5.2.2 Mikroelektroden-Design zur lokalen Beheizung der Oberfläche

Ziel der Mikroheizung ist eine Temperaturerhöhung von $4\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$ (z.B. von 33 auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$) in einem örtlich sehr begrenzten Bereich von maximal $50 \mu\text{m}$ Breite, um das TRP auf der Oberfläche exakt in diesem Bereich von dem einen in den anderen Zustand zu schalten und nur in diesem Bereich das Auswachsen von Neuriten oder Zellen zu ermöglichen (Abb. 5-15). Für diesen Zweck sind sehr scharfe Temperaturgradienten erforderlich. Um solche Gradienten zu erreichen, müssen sowohl Geometrie als auch Material und Umgebung der Mikroelektroden optimiert werden. Dazu wurden Prototypen von Mikroelektroden aus ITO-Schichten mittels Laserablation (in Zusammenarbeit mit Ilka Schlenker) und aus Chrom (als Haftvermittler) und Gold mittels Fotolithografie (in Zusammenarbeit mit Felix Pfisterer) hergestellt. Zudem wurden 2D- und 3D-Simulationsmodelle mit der Finite-Elemente-basierten Software COMSOL erstellt. Eine wichtige Voraussetzung für lokales Heizen ist, dass sich der Leistungsverlust und damit die Wärmeentwicklung möglichst auf die gewünschten Bereiche, d.h. auf die eigentlichen Heizwiderstände, konzentriert, und in den Elektroden-Zuleitungen auf das minimalste verringert.

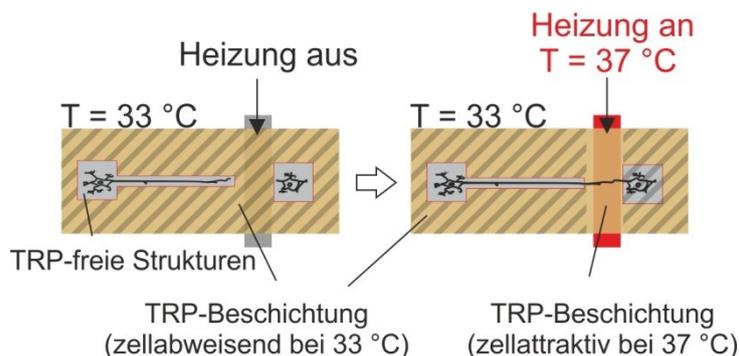


Abb. 5-15 Konzept des lokalen Schaltens des TRPs mit Heizwiderständen. Mikroelektroden zur Erzeugung von Joulescher Wärme werden unterhalb der Substratoberfläche integriert. (A) Durch Inkubation der Substrate bei 33 °C ist das TRP in seinem zellabweisenden Zustand und begrenzt das Zellwachstum auf die TRP-freien Strukturen. (B) Durch einen definierten Stromfluss wird oberhalb des Heizwiderstandes eine Temperaturerhöhung von 4 °C erzeugt, sodass dort 37 °C erreicht werden und das TRP nur dort in den zellattraktiven Zustand geschaltet wird. In diesem lokal begrenzten Bereich können folglich Neuriten oder Zellen auswachsen. Der durch die Heizwiderstände erzeugte Temperaturgradient sollte möglichst steil sein, um lokal begrenzte Bereiche wie den $50\text{ }\mu\text{m}$ weiten TRP-Spalt zu heizen, während das restliche Substrat nicht erwärmt werden sollte.

Einfluss der Geometrie der Mikroelektroden auf den lokalen Leistungsverlust

Der Leistungsverlust an verschiedenen Orten der Elektrode kann durch die Geometrie beeinflusst werden: je dicker und breiter die Elektrode, desto geringer der Leistungsverlust. Durch Verschmälerung der Heizelektrode gegenüber der Leitungselektrode konnte folglich der Anteil des Leistungsverlusts an der Heizelektrode aus Gold erhöht werden. Damit konnte die Breite des Temperaturprofils von $3300\text{ }\mu\text{m}$ bei 37% Leistungsverlust an der Heizelektrode auf $1800\text{ }\mu\text{m}$ bei 50% und auf 1000 oder sogar $650\text{ }\mu\text{m}$ bei 83% bzw. 98% verringert werden (experimentell gemessen sowie numerisch simuliert, Profilbreite gemessen auf der Höhe von $0,5\text{ °C}$ bei einem Profilmaximum von $\Delta T = 4\text{ °C}$, Abb. 5-16).

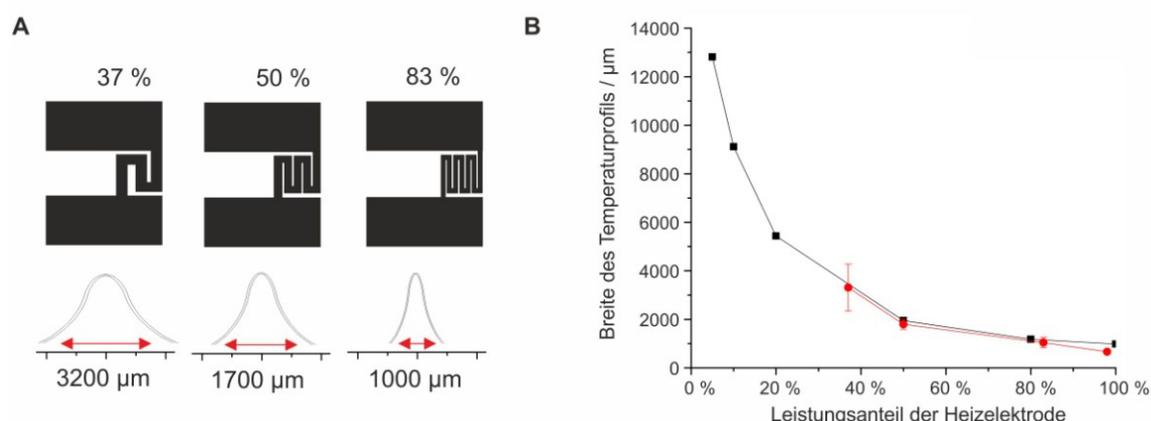


Abb. 5-16 Anteil des Leistungsverlusts an der Heizelektrode und Einfluss auf die Breite des Temperaturprofils. (A) Der Anteil des Leistungsverlusts an der Heizelektrode gegenüber den elektrischen Zuleitungen wurde für fotolithografisch erzeugte Mikroelektroden aus Gold geometrisch durch Verschmälerung und Verlängerung der Heizelektrode auf 37% , 50% oder 83% eingestellt. Für numerische Simulationen im 3D-Modell wurde der Anteil entsprechend eingestellt. (B) Durch Anpassen der elektrischen Leistung wurden Temperaturprofile mit einem

Profilmaximum von 4 °C oberhalb der Mikroelektroden experimentell oder numerisch erzeugt (rote oder schwarze Kurve) und die Breite des Temperaturprofils gemessen. Diese wurde in Abhängigkeit des Leistungsanteils der Heizelektrode aufgetragen. Je höher der Anteil des Leistungsverlusts, desto steiler ist der Temperaturgradient oberhalb der Heizelektrode.

Einfluss des Materials der Mikroelektroden auf den Leistungsverlust

Zusätzlich zur Geometrie kann der Anteil des Leistungsverlusts an der Heizelektrode gegenüber den Zuleitungen über das Material, genauer gesagt den spezifischen Widerstand reguliert werden, sowie über die Materialdicke: um den Leistungsverlust auf die Heizelektrode zu fokussieren, sollte der spezifische Widerstand an der Heizelektrode möglichst hoch und an den Zuleitungen möglichst gering sein. Verwendbare leitfähige Materialien mit relativ hohem spezifischem Widerstand sind z.B. Chrom, Eisen, Platin, Titan, ITO. Mögliche leitfähige Materialien mit niedrigem spezifischem Widerstand sind z.B. Silber, Kupfer, Gold, oder Aluminium. Für die Beobachtung von Zellen im Bereich über der Heizelektrode sollte dieser Bereich mittels Durchlichtmikroskopie analysierbar sein. ITO bietet für diesen Fall gute Eigenschaften, da es einen relativ hohen spezifischen Widerstand besitzt und genügend transparent ist, um Durchlichtmikroskopie auch nach Aufbringen einer zusätzlichen dünnen Goldschicht für die TRP-Beschichtung zu ermöglichen. Als Material für die Leitungselektroden bietet Gold optimale Eigenschaften. Zudem konnten Elektroden dieser Materialien am Fraunhofer IZI-BB selbst hergestellt bzw. bearbeitet werden. Bei den Schichtdicken wurde jeweils darauf geachtet, den Schichtwiderstand an der Heiz- bzw. Leitungselektrode möglichst hoch bzw. niedrig zu halten. Aus diesen Gründen wurden für die Mikroheizung schließlich Mikroelektroden mit Kontaktpads und Zuleitungen aus 200 nm dickem Gold verwendet, wohingegen die Heizelektroden aus einer 100 nm dicken ITO-Schicht bestanden, um hier einen höheren Widerstand zu erzeugen (Abb. 5-18 B).

Einfluss der Wärmeabfuhr

Neben dem Anteil des Leistungsverlusts gibt es noch einige weitere Einflussfaktoren auf die Breite der Temperaturgradienten, die sich vor allem auf die Wärmeabfuhr, d.h. den Wärmeübergang zwischen den Mikroelektroden und der Umgebung, beziehen. Der Wärmeübergang erfolgt über das Substrat der Mikroelektroden (abhängig von Material und Schichtdicke) sowie über das an das Substrat angrenzende Medium (Gas, Flüssigkeit oder Feststoff). Der Wärmeübergang wird durch den Wärmeübergangskoeffizienten bestimmt. Um dessen Einfluss auf die Temperaturgradienten genauer zu beleuchten, wurden im 3D-Simulationsmodell mit einem 50 x 50 µm großen Heizfeld auf der Oberfläche eines 300 µm dicken Glassubstrats verschiedene Wärmeübergangskoeffizienten an der Unterseite des Substrats eingestellt und der Leistungseintrag so angepasst, dass jeweils ein Profilmaximum von 5 °C über der Elektrode erreicht wurde. Die Breiten der Temperaturprofile bei 0,5 °C wurden bestimmt und in Abhängigkeit der Wärmeabfuhr dargestellt (Abb. 5-17 A). Je höher die Wärmeabfuhr ist, desto schmaler sind die Temperaturprofile über der Heizelektrode.

Für die in dieser Arbeit unter realen Umgebungsbedingungen genutzten Mikroheizchips wurde der Wärmeübergangskoeffizient aus dem Abgleich von experimentellen Daten mit

simulierten Daten ermittelt, da der tatsächliche, exakte Wärmeübergangskoeffizient in einem bestimmten Aufbau theoretisch kaum vorhergesagt werden kann. Dafür wurden Temperaturprofile oberhalb der 45 μm breiten Mikroelektroden aus ITO bei einer angelegten Spannung von 32 V (d.h. 94,5 mW) und angrenzender Luft („im Trockenen“) bzw. angrenzender wässriger Lösung (PBS, „im Flüssigen“) experimentell gemessen (siehe 5.2.1). Parallel wurden die Temperaturprofile im 2D-Modell numerisch simuliert. Für die Wärmeabfuhr wurden verschiedene Werte für den Wärmeübergangskoeffizienten eingestellt. Aus dem Abgleich der experimentell gemessenen und numerisch simulierten Temperaturprofile wurde für Mikroheizchips, die an Luft grenzten und mit den Kanten auf einem Kontaktboard aus Polymethylmethacrylat (PMMA) auflagen, auf der Oberseite und Unterseite des Chips eine Wärmeabfuhr von 15 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ ermittelt (Abb. 5-17 B). Mit angrenzendem Wasser (bzw. PBS) an der Oberseite wurde eine erhöhte Wärmeabfuhr von 600 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ ermittelt (Abb. 5-17 C), ebenso für den Fall, in dem der Mikroheizchip mit Wärmeleitpaste auf einer Aluminiumplatte auflag (Daten nicht gezeigt). Da im Anwendungsfall über dem Substrat Medium für die Kultivierung der Zellen vorliegen wird, kann hier also mit einer Wärmeabfuhr von 600 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ gerechnet werden.

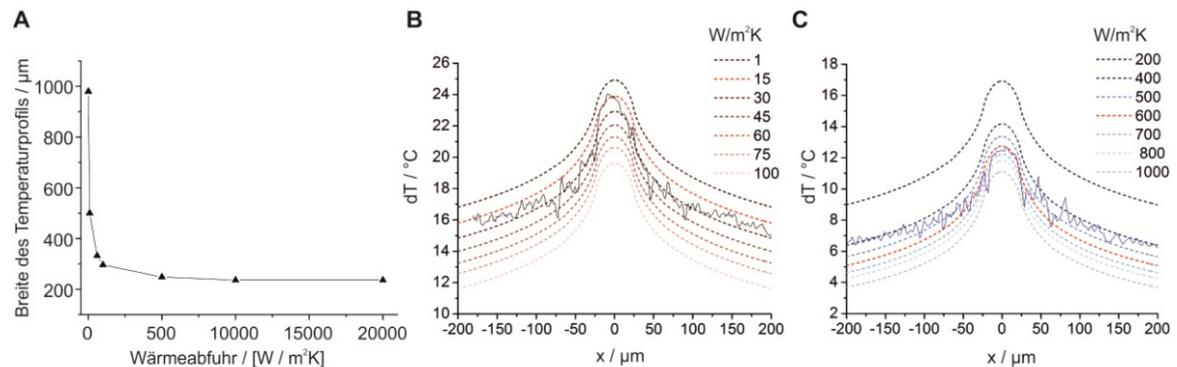


Abb. 5-17 Einfluss der Wärmeabfuhr auf die Temperaturprofile. (A) Im 3D-Simulationsmodell mit einem 50 x 50 μm großen Heizfeld und einem 300 μm dicken Glassubstrat wurden verschiedene Wärmeübergangskoeffizienten für die Unterseite des Substrats eingestellt und die Breite der simulierten Temperaturprofile mit einem Profilmaximum von 5 $^{\circ}\text{C}$ bei 0,5 $^{\circ}\text{C}$ gemessen. (B+C) Ermittlung der Wärmeübergangskoeffizienten durch Abgleich von experimentell gemessenen mit simulierten Temperaturprofilen. Temperaturprofile wurden experimentell oberhalb der 45 μm breiten Mikroelektroden aus ITO bei Anlegen einer Spannung von 32 V im Trockenen (B) bzw. im Flüssigen (B, jeweils durchgehende Linien) gemessen. Die Temperaturprofile wurden außerdem numerisch im 2D-Modell simuliert (gestrichelte Linien), wobei für die Wärmeabfuhr verschiedene Werte zwischen 1–100 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ (B) bzw. 200–1000 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ (C) für den Wärmeübergangskoeffizienten an der Oberseite eingestellt wurden (untere Seite fest bei 15 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$). Die Profile bei einem Wert von 15 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ bzw. 600 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$ (jeweils hellrote gestrichelte Linie) stimmten am besten mit den experimentellen Daten überein.

Optimierung der Packungsdichte der Mikroelektroden

Die Temperaturerhöhung zwischen einzelnen Heizelektroden sollte deutlich geringer sein als über der Heizelektrode, um abgegrenzte Bereiche der Oberfläche zu heizen (und damit das TRP zu schalten) und eine Gesamtaufheizung des Substrats zu vermeiden. Die Schärfe der Temperaturgradienten über den einzelnen Heizelektroden bestimmt letztendlich, wie viele dieser Heizelektroden auf einem Chip untergebracht werden können (= Packungsdichte). Für das finale Design der Mikroheizchips wurde

festgelegt, dass bei einem Temperaturprofilmaximum von 5 °C über den Heizelektroden die Temperaturerhöhung dazwischen nicht höher als 0,5 °C sein soll. Entsprechend des Designs der mikrostrukturierten Goldoberfläche für die TRP-Beschichtung sollten Heizelektroden von 20 x 200 µm bzw. 10 x 50 µm verwendet werden, um entweder den 200 µm breiten TRP-Bereich zwischen den Adhäsionsfeldern im Design 1 oder den 50 µm breiten TRP-Spalt im Design 2 lokal zu heizen. Anhand dieser Maße und der gewonnenen Erkenntnisse zum Anteil des Leistungsverlusts an den Heizelektroden sowie der Wärmeabfuhr wurde für das finale Design der Mikroheizchips zunächst ein 3D-Simulationsmodell erstellt. Bei 300 µm dickem Glas als Substratmaterial, einer angenommenen Wärmeabfuhr von 600 W/m²K auf der Vorderseite und 10 W/m²K auf der Rückseite des Substrats, sowie den beschriebenen Maßen der Heizelektroden bezüglich Design 2 bzw. Design 1, wurde folglich eine optimale Packungsdichte von etwa 156 bzw. 40 Heizelektroden pro cm² für das Design 2 bzw. Design 1 ermittelt.

Resultierendes Design der Mikroheizchips

Anhand der gewonnenen Daten wurde schließlich ein komplettes, neuartiges Mikroelektroden-Chipdesign entwickelt (Abb. 5-18). Die Herstellung dieser Mikroheizchips erfolgte durch die Firma GeSiM GmbH. Als Substrat wurde 300 µm dickes Glas verwendet. Glas als Substrat hat die Vorteile, dass es durchsichtig ist, und fast alle Prozessschritte unverändert übersteht. Die Dicke von 300 µm ist für die Handhabung bei der Prozessierung und in der Zellkultur relativ bruchstabil. Die Zuleitungen aus ITO und Gold waren 150 µm breit und 12000 µm lang, dagegen waren die Heizelektroden aus ITO 10 bzw. 20 µm breit und 50 bzw. 200 µm lang. Die Schichtdicken sind in Tabelle 3 aufgelistet. Infolge dieser Parameter (unterschiedliche Breiten sowie unterschiedliche spezifische Widerstände bei ITO und Gold) ergäbe sich für die kleinen Heizfelder beispielsweise ein Anteil des Leistungsverlusts von 66–88 %, je nach tatsächlichem spezifischem Widerstand der Schichten. Die Mikroelektroden (exklusive der Kontaktpads) wurden mit einem 1100 µm dicken Schichtstapel aus SiO₂ / Si₃N₄ / SiO₂ (auch ONO-Passivierung genannt) passiviert.

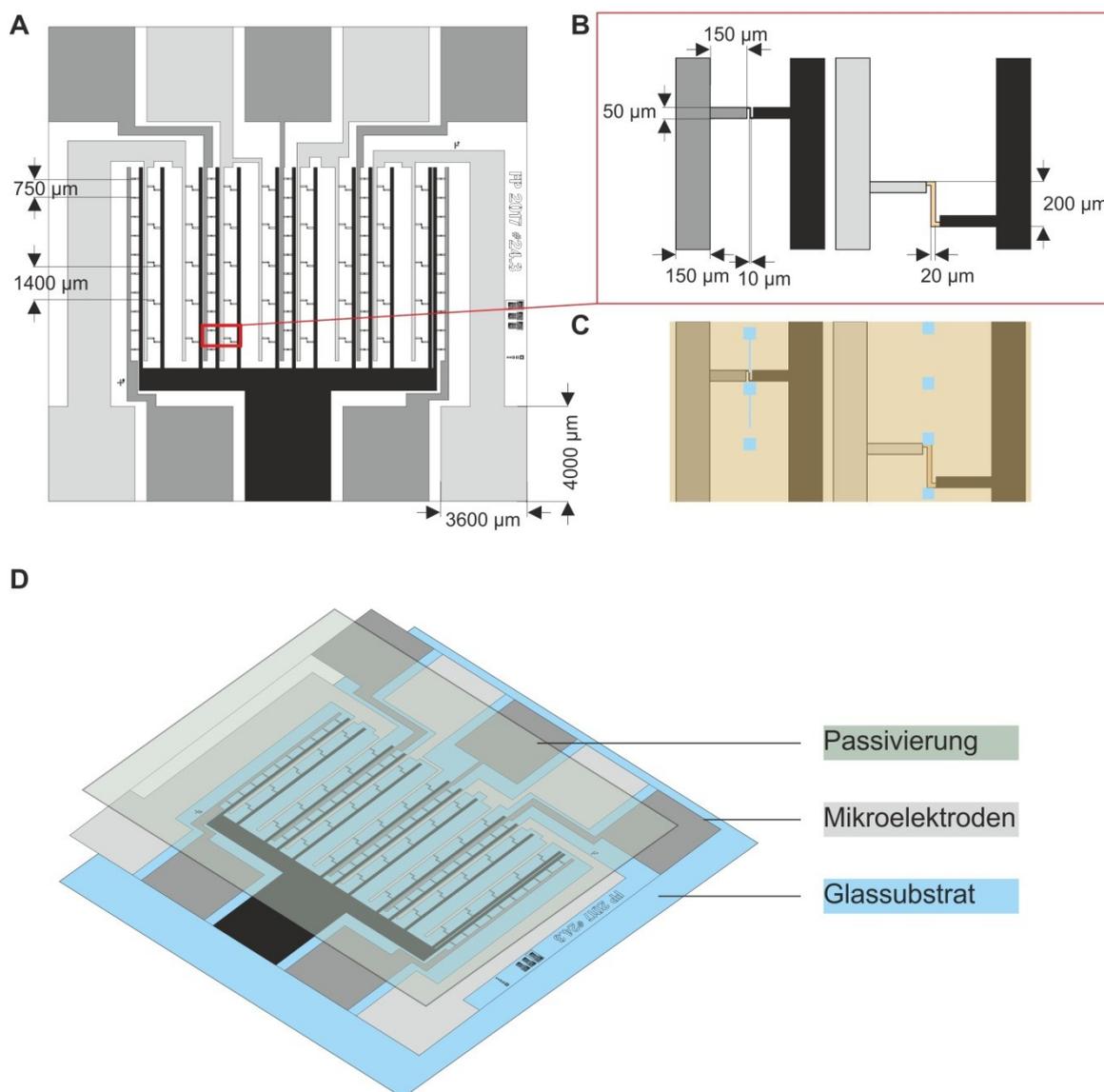


Abb. 5-18 Design und Schichtaufbau der Mikroheizchips. (A) Design der Mikroelektroden mit ca. 4 x 4 mm Kontaktpads und breiten Leitungselektroden aus ITO und Gold. Je 10 kleine oder große Heizelektroden sind über die jeweiligen Leitungselektroden (hellgrau und dunkelgrau) an eine Masselektrode (schwarz) angeschlossen. (B) Vergrößerter Ausschnitt aus A zur Darstellung der Maße der Leitungselektroden (grau) bzw. Heizelektroden (gelb), welche aus ITO und Gold bzw. nur aus ITO bestehen. (C) Die Größe von 10 x 50 µm bzw. 20 x 200 µm für die Heizelektroden aus ITO wurde so gewählt, dass sie den TRP-Spalt zwischen Pfad für die Neuriten und Adhäsionsfeld (hellblau) bzw. zwischen zwei Adhäsionsfeldern lokalisiert heizen können. (D) Schichtaufbau der Mikroheizchips. Das Substrat für die Mikroelektroden besteht aus 300 µm dickem Glas. Die Mikroelektroden bestehen aus ITO (+ Gold) und werden – bis auf die Kontaktpads – passiviert. Auf die Passivierungsschicht kann später eine dünne Goldschicht für die TRP-Beschichtung aufgebracht und fotolithografisch strukturiert werden.

Tabelle 3 Schichtdicken und Funktion der verschiedenen Schichten der Mikroheizchips

Material	Schichtdicke [nm]	Funktion
Borosilikatglas D263	300000	Substrat
Titan	10	Haftvermittler
Gold	200	Leitungselektrode
ITO	100	Heizelektrode
SiO ₂ / Si ₃ N ₄ / SiO ₂	300 / 500 / 300	Passivierung

5.2.3 Temperaturverteilung über Heizelektroden

Die tatsächliche Temperaturverteilung wurde nach Fertigstellung der Mikroheizchips experimentell überprüft. Dafür wurde an zwei Mikroelektroden mit jeweils 10 parallel geschalteten, $10 \times 50 \mu\text{m}$ großen Heizelektroden im Trockenen jeweils eine Spannung von $1,51 \text{ V}$ angelegt (entsprechend einer Leistung von 3 mW , Abb. 5-19 A). Diese Spannung wurde pro Mikroelektrode für die einzelnen Heizelektroden für jeweils 2 Minuten angelegt, mit den jeweiligen Referenzbildern bei Raumtemperatur dazwischen. Basierend auf den Fluoreszenzbildern wurde die mittlere Temperaturerhöhung über jeder Heizelektrode analysiert (Abb. 5-19 B). Der dargestellte Temperaturwert stellt den Mittelwert aller Temperaturwerte (Pixel) oberhalb des $10 \times 50 \mu\text{m}$ großen Heizfeldes dar. Die Temperaturerhöhung lag über allen einzelnen vermessenen Heizelektroden in etwa bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$), wobei die Temperatur über den mittleren Heizelektroden (d.h. mittig auf dem Chip) etwa $1 \text{ }^\circ\text{C}$ höher lag als über den äußeren Heizelektroden. Weiterhin sollte das Temperaturprofil über den Heizelektroden validiert werden. Dafür wurde an einer weiteren Mikroelektrode (Abb. 5-19 A, rote Markierung) jeweils für 2 Minuten eine Spannung von $1,49 \text{ V}$ (Leistung von 3 mW) bzw. $1,59 \text{ V}$ im Trockenen bzw. im Flüssigen angelegt, und das Temperaturprofil quer zur Heizelektrode evaluiert (Abb. 5-19 C). Wie anhand der Simulationsdaten zuvor angenommen, konnten mit diesem neuartigen Mikroelektroden-Design auch experimentell scharfe Temperaturgradienten gemessen werden (Abb. 5-19 D). Im Trockenen wurde über der $50 \mu\text{m}$ breiten Heizelektrode eine Temperaturerhöhung von $4,5 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen, wohingegen die Temperatur in den anliegenden Bereichen innerhalb von $50 \mu\text{m}$ auf etwa $1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ abfiel und $150 \mu\text{m}$ entfernt nur noch bei etwa $1 \text{ }^\circ\text{C}$ lag (Abb. 5-19 D). Mit angrenzendem PBS anstelle von Luft an der Oberseite der Mikroelektrode, fällt die Temperatur lateral auf etwa $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ab.

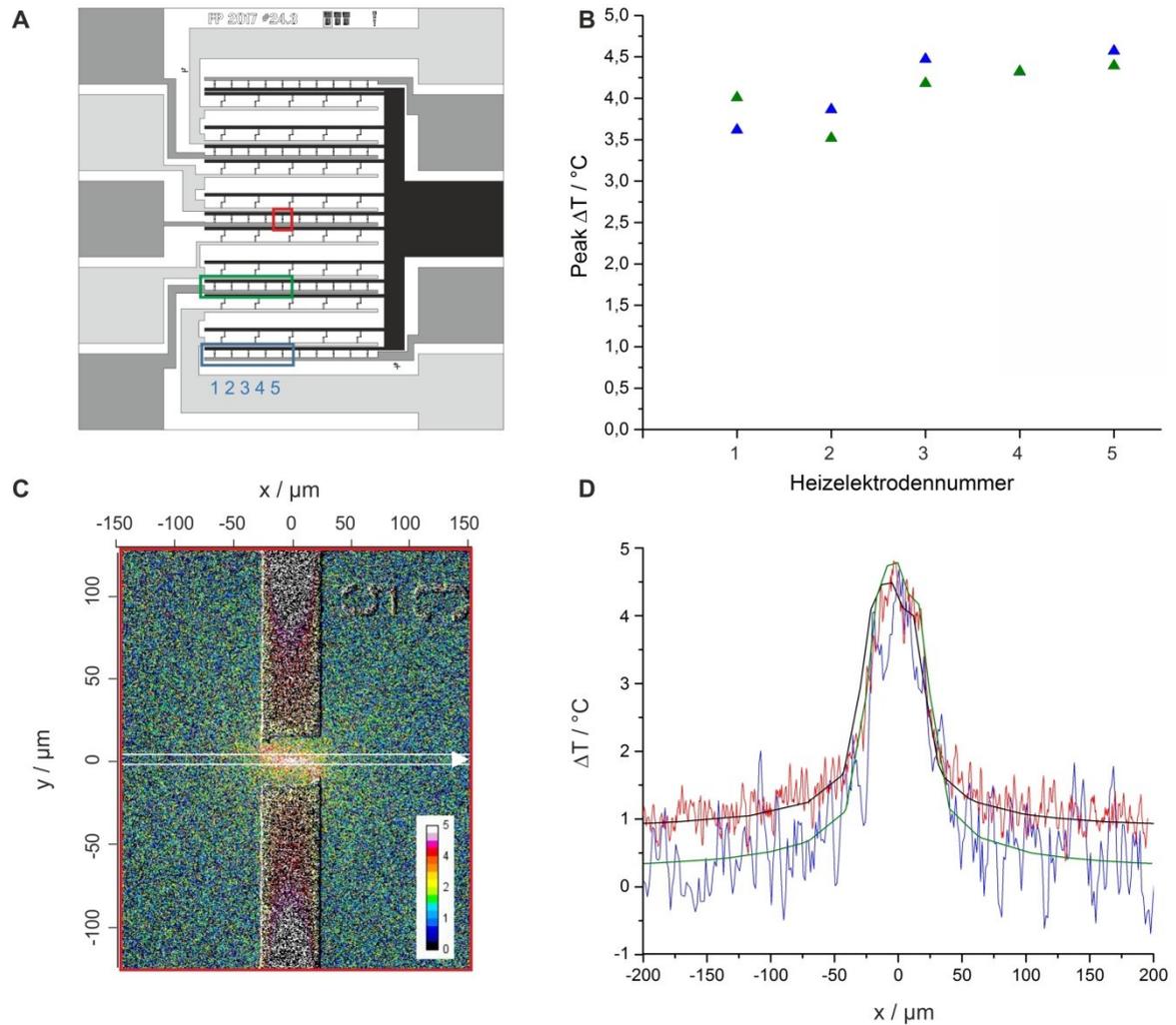


Abb. 5-19 Experimentell gemessene Temperaturverteilung auf den Mikroheizchips. Die Mikroheizchips wurden mit RhB-haltigem Sol-Gel beschichtet und die Temperaturverteilung mit Hilfe dem etablierten Thermometrie-Verfahren ermittelt. (A) Markierung der vermessenen Mikroelektroden im Layout mit blauem, grünem und rotem Rechteck. (B) Temperaturverteilung über einzelnen Heizelektroden von zwei Mikroelektroden (blau und grün markiert in A). Für jede einzelne Messung über jeder Heizelektrode wurde im Trockenem für jeweils 2 Minuten eine Leistung von 3 mW angelegt und die Temperaturerhöhung gemessen. Der jeweilige Temperaturwert stellt den Mittelwert aller Temperaturwerte (Pixel) oberhalb des $10 \times 50 \mu\text{m}$ großen Heizfeldes dar. (C + D) Zur Ermittlung des Temperaturprofils über der Heizelektrode wurde an einer weiteren Mikroelektrode (rote Markierung in A) ebenfalls jeweils für 2 Minuten eine Spannung von 1,49 V bzw. 1,59 V im Trockenem bzw. im Flüssigen angelegt, und das Temperaturprofil quer zur Heizelektrode evaluiert (C) Exemplarisches normalisiertes und kalibriertes RhB-Fluoreszenzbild mit der Heizelektrode im Zentrum. Oberhalb des Heizfeldes ist eine deutliche Temperaturerhöhung von 4–5 °C (rot, pink, weiß) zu erkennen, während die Temperaturerhöhung rundherum unterhalb von 1,5 °C liegt (blau, grün). Von dem weiß markierten Ausschnitt (Rechteck) wurde das Temperaturprofil in D erhalten, indem die Pixelwerte in y-Richtung über einen Bereich von etwa $10 \mu\text{m}$ gemittelt wurden und in x-Richtung ein gleitender Mittelwert angewendet wurde ($n = 3$). (D) Die experimentell gemessenen Temperaturprofile im Trockenem (rote Linie) und im Flüssigen (blaue Linie) stimmen gut mit den jeweiligen simulierten Temperaturprofilen (Wärmeabfuhr $15 \text{ W/m}^2\text{K}$ = schwarze Linie, Wärmeabfuhr $600 \text{ W/m}^2\text{K}$ = grüne Linie) überein.

5.2.4 Verwendung der TRP-beschichteten Mikroheizchips in der Zellkultur

Wiederverwendung der Substrate

Eine Wiederverwendung der Substrate ist insbesondere für die aufwendig hergestellten Mikroheizchips mit integrierten Mikroelektroden von Bedeutung. Um die Möglichkeit zur Wiederverwendung gereinigter Goldflächen für die TRP-Beschichtung zu zeigen, wurden unstrukturierte goldbeschichtete Deckgläser in drei Zyklen verwendet. Pro Zyklus wurden die Substrate gereinigt (mit dem Standard Piranha-Reinigungsprotokoll, siehe 4.1.3), mit TRP beschichtet, mit L929-Zellen besiedelt und für ca. 4 Tage bei 37 °C in Kultur gehalten. Dann wurden die Substrate für 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und die Abrundung der Zellen wurde analysiert. Anschließend wurden die restlichen Zellen mittels Trypsinbehandlung abgelöst, und die Substrate intensiv gespült. Damit begann der nächste Zyklus. Die ermittelte Abrundungseffizienz der L929-Zellen auf den mit TRP beschichteten, wiederverwendeten Oberflächen wurde als Maß für die Funktionalität und Homogenität der TRP-Beschichtung genutzt. Die Abrundungseffizienz lag in allen drei Zyklen zwischen 78 und 100 %, was der normalen Schwankung zwischen Experimenten und zwischen Bereichen auf den Substraten entspricht und darauf schließen lässt, dass die TRP-Beschichtung auch auf wiederverwendeten Goldoberflächen voll funktionsfähig ist (Abb. 5-20 A).

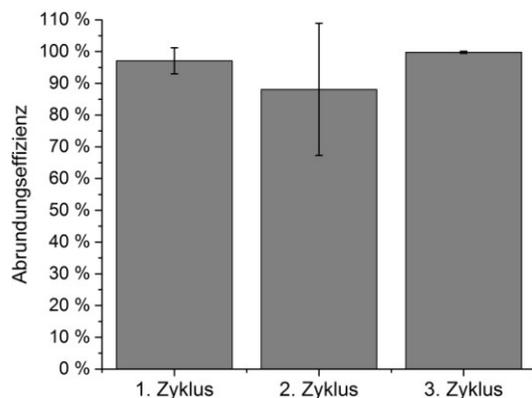


Abb. 5-20 Funktionalität der TRP-Beschichtung bei Wiederverwendung der Goldoberflächen. Unstrukturierte Goldoberflächen wurden in 3 Zyklen verwendet. Je Zyklus wurden die Oberflächen gereinigt, mit TRP beschichtet, mit L929-Zellen besiedelt und für ca. 4 Tage bei 37 °C kultiviert, dann zur Abrundung der Zellen für 30 Minuten auf RT gebracht (Analyse der Abrundungseffizienz) und anschließend extensiv gespült und gereinigt. Die Abrundungseffizienz war in allen drei Zyklen vergleichbar hoch zwischen 78 und 100 %, Fehlerbalken, SD ($2 \leq n \leq 4$).

Schonendes Reinigungsprotokoll für Wiederverwendung der Mikroheizchips

Es stellte sich heraus, dass die Mikroelektroden aus ITO von dem bis dahin standardmäßig verwendeten, säurebasierten Piranha-Protokoll zerstört werden. Nach einer solchen Reinigung zeigten die meisten Mikroelektroden eines Chips keine Leitfähigkeit mehr auf. Aus diesem Grund wurden mildere Reinigungsprotokolle getestet, mit Hinblick auf ihre Eignung für eine nachfolgende homogene und funktionale TRP-

Beschichtung, sowie auf ihre Auswirkungen auf die ITO-Mikroelektroden. Dafür wurden Gold-beschichtete Deckgläser nach drei verschiedenen Protokollen, sowie zum Vergleich mit dem Standard-Protokoll gereinigt, nachfolgend mit TRP beschichtet, und mit L929-Zellen besiedelt. Waren mehr als 50 % der Zellen adhäriert, wurden die TRP-Beschichtungen durch einen Transfer auf Raumtemperatur in den zellabweisenden Zustand geschaltet, und die Abrundungseffizienz bestimmt. Aus der Abrundungseffizienz der Zellen konnte geschlussfolgert werden, dass das relativ milde, basische Piranha-Reinigungsprotokoll mindestens gleich gute TRP-Beschichtungen, d.h. homogene und funktionale Beschichtungen, ermöglicht wie das Standard-Piranha-Protokoll (Abb. 5-21 B). Bei der Reinigung von Mikroheizchips mit dem basischen Piranha-Reinigungsprotokoll wurden keine Auswirkungen auf die Leitfähigkeiten der ITO-Mikroelektroden festgestellt, sodass es als effiziente, aber schonende Alternative zum säurebasierten Standard-Piranha-Reinigungsprotokoll betrachtet werden kann.

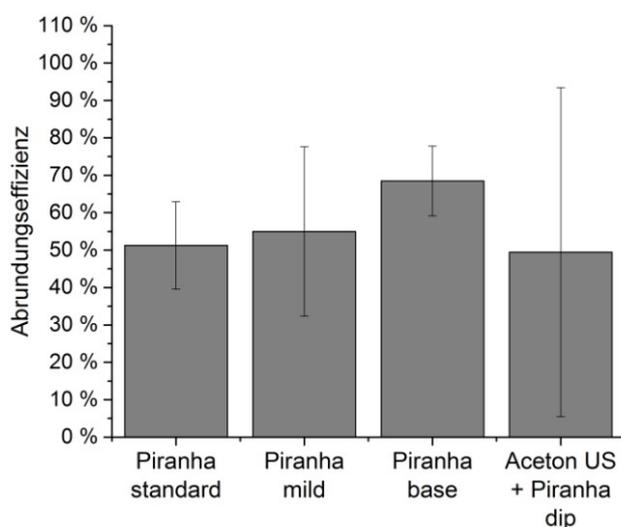


Abb. 5-21 Funktionalität der TRP-Beschichtung bei Anwendung verschiedener Reinigungsprotokolle. Unstrukturierte Goldoberflächen wurden mit vier verschiedenen Reinigungsprotokollen gereinigt (Standard-Piranha-, mildes Piranha-, basisches Piranha-Reinigungsprotokoll sowie Ultraschall in Aceton und Dippen in Piranha-Lösung), anschließend mit TRP beschichtet und mit L929-Zellen besiedelt. Nach ausreichender Adhärenz der Zellen wurde das TRP zellabweisend geschaltet und die Abrundung der Zellen analysiert. Das basische Piranha-Reinigungsprotokoll ermöglicht ebenso gute TRP-Beschichtungen wie das Standard-Protokoll.

Reversible elektrische Kontaktierung der Mikroelektroden

Für eine stabile, aber auch reversible Kontaktierung der Mikroheizchips wurde ein Kontaktboard aus PMMA entwickelt (Abb. 5-22). In die mittige Aussparung kann der Mikroheizchip hineingelegt werden und über Stellschrauben können gefederte Goldpins auf die Kontaktpads der Chips geklemmt werden. Diese Goldpins können über Kabelverbindungen an einen Stromgenerator angeschlossen werden. Das Kontaktboard wurde so konzipiert, dass es beidseitig auf den Objektstisch des Fluoreszenzmikroskops platziert werden kann, sodass sowohl Fluoreszenz- als auch Durchlichtaufnahmen von der Oberseite oder der Unterseite des Chips möglich sind. Für Fluoreszenzintensitätsmessungen, in denen z.B. die mit dem temperatursensitiven Sol-

Gel beschichtete Oberseite des Chips an ein Flüssigkeitsreservoir (d.h. PBS) grenzen soll, wurde eine kleine Flüssigkeitskammer entwickelt. Diese besteht aus einem 2 mm hohen Rahmen aus PMMA und einem Deckel aus Zeonor Folie, welche wegen der geringen Autofluoreszenz für Fluoreszenzmessungen geeignet ist. Diese werden mit drucksensitiver Klebefolie (Englisch: pressure sensitive adhesive, PSA) zusammen und auf den Mikroelektrodenchip geklebt und mit Nagellack oder Eindeckmittel (Merckoglas®) abgedichtet. Über kleine Öffnungen und Silikonschläuche kann die Kammer schließlich mit wässrigen Lösungen gefüllt werden. Dies erlaubt Fluoreszenzmessungen auf dem inversen Fluoreszenzmikroskop, während der Chip elektrisch kontaktiert werden kann, und die Oberseite des Chips an Flüssigkeit grenzt und gleichzeitig zum Objektiv zeigt. Für diesen Fall und bei Verwendung des 10x-Objektivs wurde ermittelt, dass die Flüssigkeitskammer nicht höher als 2 mm sein darf, um den Arbeitsabstand des 10x-Objektivs einzuhalten.

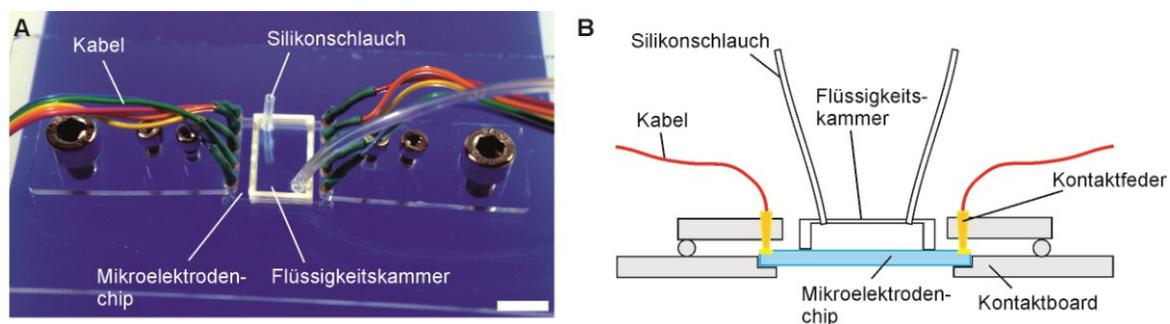


Abb. 5-22 Kontaktboard aus PMMA mit Mikroheizchips und Flüssigkeitskammer. (A) Fotografische (Maßbalken, 10 mm) und (B) schematische Darstellung des Kontaktboards für die Mikroheizungen. Kontaktfedern ermöglichen die reversible elektrische Kontaktierung der Mikroelektroden und die Verbindung mit dem Spannungsgenerator über Kabel. Die Flüssigkeitskammer aus einem Rahmen aus PMMA und einem Deckel aus Zeonor ermöglicht Messungen in flüssiger Umgebung, auch während die Oberseite des Chips zum Objektiv zeigt. Silikonschläuche ermöglichen ein blasenfreies Befüllen der Kammer mit PBS.

Zellkultivierung auf TRP-beschichteten Mikroheizchips

Für die Kultivierung von Zellen auf den im Kontaktboard eingespannten Mikroheizchip wurde eine weitere Kammer aus PMMA entwickelt (Abb. 5-23). Im Gegensatz zur oben beschriebenen Flüssigkeitskammer bleibt diese Kammer offen, um einen Gasaustausch und eventuellen Mediumwechsel zu ermöglichen. Sie wird mit PSA auf den Mikroheizchip geklebt und mit Nagellack oder Eindeckmittel (Merckoglas®) abgedichtet. Dieses System ist auch über längere Zeiträume stabil und dicht. Die Kammer war 5 oder 10 mm hoch.

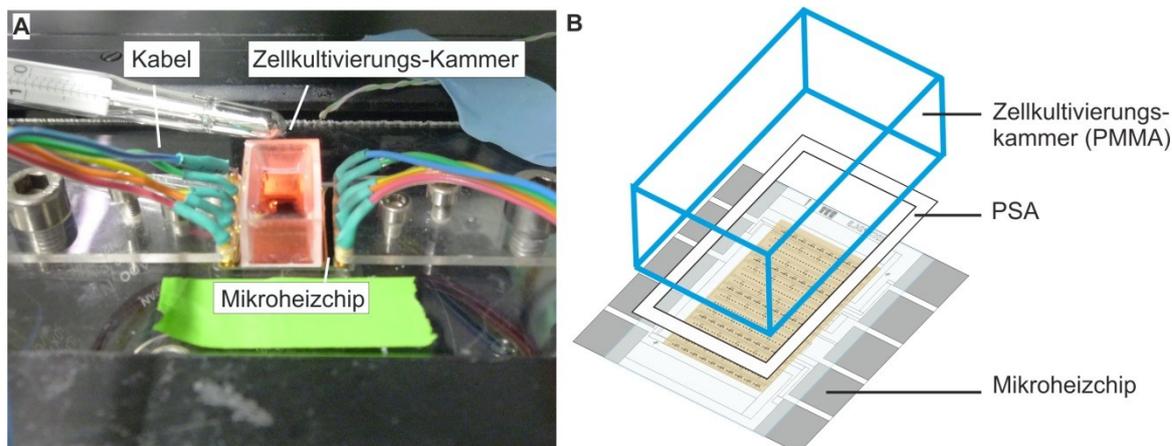


Abb. 5-23 Kammer für Zellkultivierung auf elektrisch angeschlossenen Mikroheizchips. Die Kammer besteht aus einem 5 oder 10 mm hohen und 1 mm starken Rahmen aus PMMA in der Größe der strukturierten Goldoberfläche. Er wird mit PSA auf den Chip geklebt und mit Eindeckmittel abgedichtet und ist über einen längeren Zeitraum dicht. Die Abgrenzung der flüssigen Zellkulturumgebung ist wichtig für eine elektrische Kontaktierung der Kontaktpads der Mikroelektroden ohne Kurzschlüsse.

5.3 Optimierung der Initialadhäsion von neuronalen Zellen auf der TRP-Beschichtung für andere Anwendungen

Das TRP sollte in dieser Arbeit für die Steuerung des Wachstums neuronaler Zellen verwendet werden. Dies wurde erfolgreich mit strukturierten TRP-Beschichtungen gezeigt, bei denen die Zellen nach einiger Zeit von TRP-freien auf TRP-beschichtete Bereiche migrierten. Die Initialadhäsion von neuronalen Zellen auf PEG-basierten TRP-Schichten wurde bisher noch nicht gezeigt. Für Anwendungen, bei denen jedoch die Initialadhäsion der neuronalen Zellen auf der TRP-Beschichtung benötigt wird, wurde diese im Weiteren untersucht und optimiert. Zur Optimierung der neuronalen Zelladhäsion wurden die TRP-Beschichtungen modifiziert und mit unmodifizierten Oberflächen über die Anzahl von Zellen mit Neuriten pro Fläche verglichen.

5.3.1 Koadsorption des TRPs mit den Peptiden RGD und YIGSR

Peptidsequenzen aus Proteinen der EZM, wie das RGD-Peptid, können auf Goldoberflächen zusammen mit dem TRP immobilisiert werden, wenn sie für die Gold-Schwefel-Bindung einen Cysteinrest besitzen. In dieser Arbeit wurde eine Koadsorption des RGD-Peptids mit einer Koadsorption des YIGSR-Peptids, welches in Laminin vorkommt und für die Adhäsion von neuronalen Zellen wichtig ist, hinsichtlich der Initialadhäsion von SH-SY5Y-Zellen verglichen.

Dafür wurden Lösungen aus TRP und RGD- oder YIGSR-Peptid in unterschiedlichen Verhältnissen angesetzt, unstrukturierte Goldoberflächen damit beschichtet, SH-SY5Y-Zellen auf diesen Substraten ausgesät und für insgesamt 11 Tage bei 37 °C kultiviert und differenziert. An jedem der ersten 4 Tage und am 7. Tag nach dem Aussäen wurde die Adhäsion der Zellen auf den Substraten mikroskopisch analysiert und Phasenkontrastbilder von mehreren Bereichen auf den Substraten aufgenommen.

Anhand dieser Bilder wurde die Anzahl der Zellen mit Neuriten auf den verschiedenen Substraten und an den verschiedenen Tagen analysiert.

Eine Koadsorption des YIGSR-Peptids mit dem TRP führte zu einer deutlichen Verbesserung der Zelladhäsion von SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen waren stärker vereinzelt und ausgebreitet und bildeten lange Neuriten aus (Abb. 5-25 D). Je höher der YIGSR-Peptidanteil war, desto mehr Zellen mit Neuriten waren auf den TRP-Oberflächen zu sehen (Abb. 5-24 A). Die Funktionalität des TRPs nahm jedoch mit steigendem Peptidanteil ab, was durch die Abrundungseffizienzen von L929-Zellen sowie durch die Adhäsion von SH-SY5Y-Zellen bei 33 oder 34 °C gezeigt wurde (Daten nicht dargestellt). Ein Anteil von 15 % YIGSR-Peptid wurde als Optimum ermittelt, da hier eine ausreichend schnelle Adhäsion von SH-SY5Y-Zellen inklusive des Auswachsens von Neuriten bei 37 °C (oberhalb der LCST) erreicht wurde, während die Zellen bei 33 °C (unterhalb der LCST) nicht adhärten (Abb. 5-24 A, blaue Linie). Die Abrundungseffizienz bei L929-Zellen betrug auf TRP-Oberflächen mit diesem Peptidanteil 94 % (± 5 %). Auf RGD-modifizierten TRP-Oberflächen dagegen konnte die Adhäsion und das Auswachsen von SH-SY5Y-Zellen nicht verbessert werden (Abb. 5-24 B).

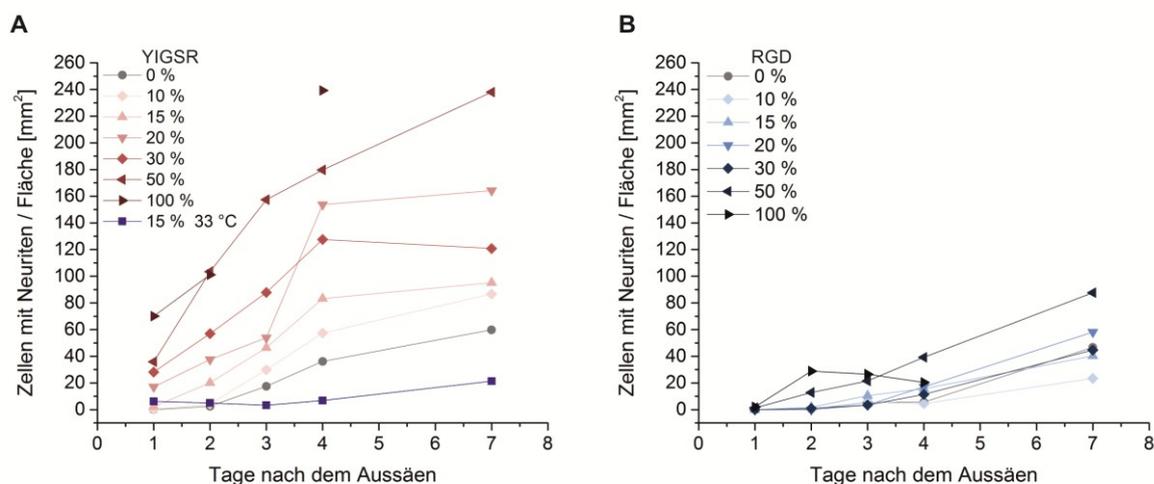


Abb. 5-24 Verlauf der Zelladhäsion neuronaler SH-SY5Y-Zellen auf TRP-Schichten, bei welchen die Peptide YIGSR und RGD koadsorbiert wurden. Goldoberflächen wurden mit TRP und RGD- oder YIGSR-Peptid in unterschiedlichen Verhältnissen beschichtet, SH-SY5Y-Zellen darauf ausgesät und für insgesamt 11 Tage bei 37 °C kultiviert und differenziert. An Tag 1–4 und 7 nach dem Aussäen wurden Phasenkontrastbilder von unterschiedlichen Bereichen auf den Substraten aufgenommen. Die Anzahl der Zellen mit Neuriten wurde anhand dieser Bilder gezählt und für die verschiedenen Substrate gegen die Tage nach dem Aussäen aufgetragen. (A) Koadsorption mit dem YIGSR-Peptid. Die Anzahl der Zellen mit Neuriten pro Fläche war umso höher je höher der YIGSR-Peptidanteil war. Bei einem Anteil von 15 % YIGSR ist das TRP bei 33 °C weiterhin zellabweisend (d.h. kaum adhärte Zellen, blaue Linie), sodass dieser Anteil als Optimum ausgewählt wurde. (B) Durch Koadsorption mit dem RGD-Peptid konnte die Zahl an Zellen mit Neuriten dagegen nicht deutlich erhöht werden.

5.3.2 Beschichtung der TRP-Oberflächen mit EZM-Proteinen

Eine weitere, weit verbreitete Methode zur Förderung der Adhäsion ist die Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen der EZM. Die Koadsorption der Peptide mit dem TRP wurde daher mit einer nachfolgenden Proteinbeschichtung der TRP-Beschichtung

verglichen. Hierzu wurden die TRP-Oberflächen (mit 1 oder 5 μM TRP) mit Laminin oder Fibronectin in geringen Konzentrationen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet oder unbeschichtet belassen. SH-SY5Y-Zellen wurden auf diesen Substraten wie auf den oben beschriebenen Substraten mit koadsorbierten Peptiden ausgesät und für insgesamt 11 Tage bei 37 °C kultiviert und differenziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach dem Aussäen wurde die Adhäsion der Zellen auf den Substraten mikroskopisch analysiert und Phasenkontrastbilder von mehreren Bereichen auf den Substraten aufgenommen. Anhand dieser Bilder wurde die Anzahl der Zellen mit Neuriten auf den verschiedenen Substraten an Tag 4 nach dem Aussäen analysiert.

Auf reinen, unstrukturierten TRP-Beschichtungen benötigten die Zellen sehr lange (7 Tage), um überhaupt zu adhären und zumeist waren sie dann stark aggregiert und kaum ausgebreitet, oder überwiegend epithelartigen Phänotyps (Abb. 5-24 A+B jeweils graue Linien und Abb. 5-25 A). Auch durch Beschichtung mit EZM-Proteinen konnte keine Verbesserung der Adhäsion und des Ausbreitens der SH-SY5Y-Zellen auf dem TRP erreicht werden (Abb. 5-25 B+C). Nach 4 Tagen bei 37 °C waren genauso wenige Zellen mit Neuriten auf den modifizierten wie auf den reinen TRP-Oberflächen zu sehen (Abb. 5-25 D). Höhere Konzentrationen der jeweiligen Proteine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten zwar zu verbesserter Zelladhäsion, schränkten aber auch die TRP Funktionalität ein, wie Kontrollexperimente zeigten (Daten nicht dargestellt).

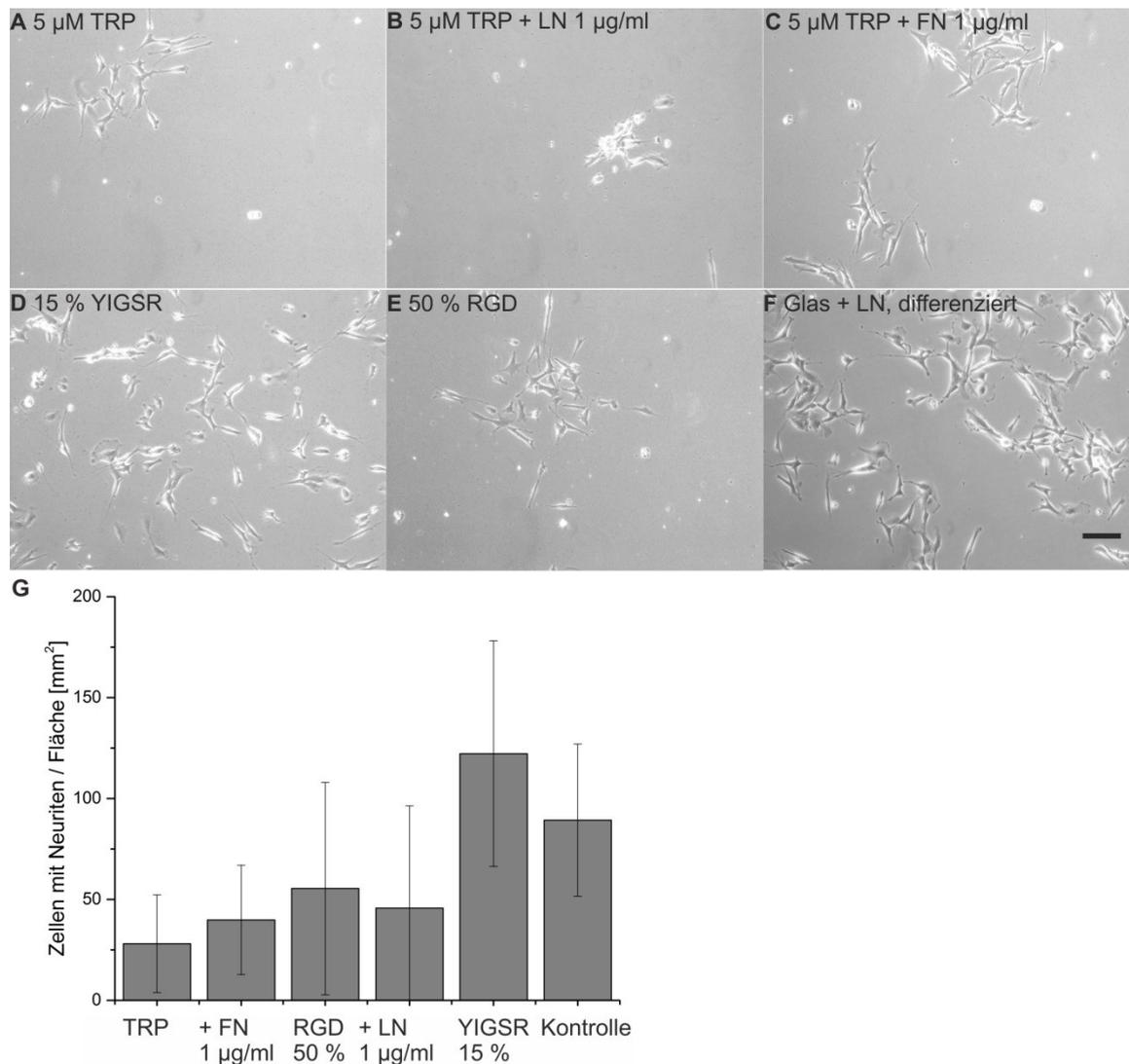


Abb. 5-25 Adhäsion und Morphologie von SH-SY5Y-Zellen auf unterschiedlich modifizierten TRP-Beschichtungen. TRP-Oberflächen (mit 1 oder 5 μM TRP) oder Deckgläser wurden mit Laminin (LN) oder Fibronectin (FN) in geringen Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet oder unbeschichtet belassen. Weitere Goldoberflächen wurden mit TRP und 15 % YIGSR oder 50 % RGD beschichtet. SH-SY5Y-Zellen wurden auf diesen Substraten ausgesät und für insgesamt 11 Tage bei 37 °C kultiviert und differenziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach dem Aussäen wurde die Adhäsion der Zellen auf den Substraten mikroskopisch analysiert und Phasenkontrastbilder von mehreren Bereichen auf den Substraten aufgenommen. Anhand dieser Bilder wurde die Anzahl der Zellen mit Neuriten auf den verschiedenen Substraten an Tag 4 nach dem Aussäen analysiert (A–F) Phasenkontrastbilder an Tag 4 nach dem Aussäen. Maßbalken, 100 μm . (G) Die Anzahl an Zellen mit Neuriten pro Fläche wurde an Tag 4 nach dem Aussäen für die verschiedenen Oberflächen ermittelt. Fehlerbalken, SD (Anzahl Experimente $2 \leq n \leq 6$)

5.3.3 Expression neuronaler Marker auf TRP-Substraten

Um zu überprüfen, ob die SH-SY5Y-Zellen ihren neuronalen Phänotyp auf den unmodifizierten oder modifizierten TRP-Oberflächen in vergleichbarer Weise ausprägen wie auf Kontrolloberflächen (mit Laminin beschichtetes Glas), wurden die Zellen auf den verschiedenen Oberflächen ausgesät, für jeweils 5 Tage mit RA und BDNF differenziert, am 11. Tag nach dem Aussäen fixiert und mittels Antikörper-Färbungen auf die Expression neuronaler Markerproteine überprüft. Die eingesetzten Antikörper waren

gegen die Markerproteine β 3-Tubulin und NF-L gerichtet, welche beide in differenzierten SH-SY5Y-Zellen exprimiert werden. Wie in Abb. 5-26 zu sehen ist, bildeten die differenzierten Zellen auf allen Oberflächen über den Zeitraum von 11 Tagen ausgedehnte neuronale Netzwerke aus, wobei diese auf den mit dem YIGSR-Peptid modifizierten TRP-Oberflächen am stärksten ausgeprägt waren (Abb. 5-26 B). Nicht differenzierte Zellen hingegen besaßen kaum Neuriten und waren kaum ausgebreitet. Die Expression der Markerproteine war zudem schwächer und auf den Zellkörper beschränkt (Abb. 5-26 D).

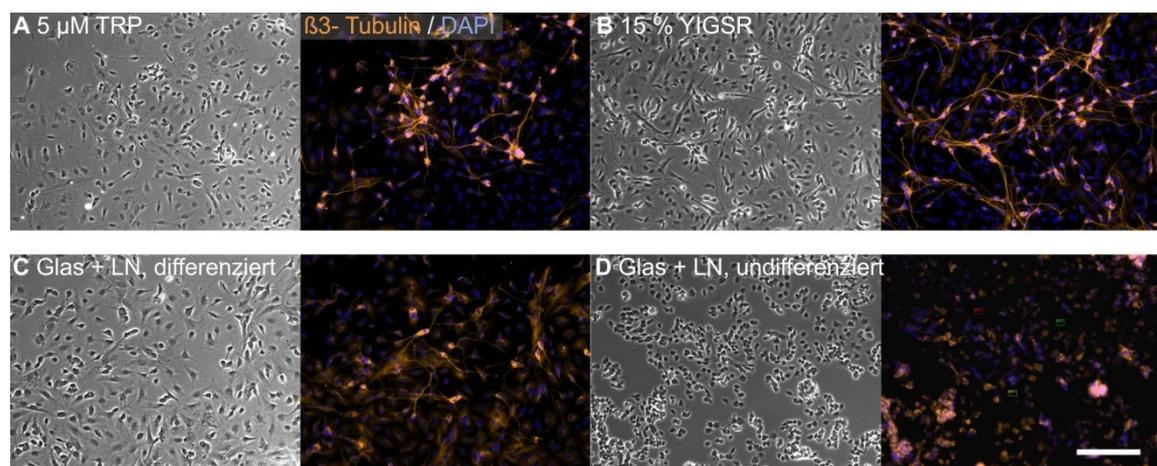


Abb. 5-26 Expression des neuronalen Markers β 3-Tubulin in SH-SY5Y-Zellen auf TRP-Oberflächen und Kontrolloberflächen. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Substrate mit 5 μ M TRP oder mit TRP und 15 % YIGSR oder auf mit Laminin beschichtetem Glas ausgesät und für 11 Tage inklusive Differenzierung oder exklusive Differenzierung (A-C oder D) bei 37 °C kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen immunocytochemisch mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin (orange) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt (jeweils rechts neben den Phasenkontrastbildern). Maßbalken, 200 μ m.

6 Diskussion

6.1 Zweck der thermoresponsiven Zellkultursubstrate

Die Rekonstruktion von geordneten neuronalen Verbindungen in vitro ist ein dringend erforderlicher Aspekt, um neuronale Zellkulturmodelle zu verbessern. Zur Untersuchung einzelner, definiert miteinander verbundener Zellen und ihrer Antwort auf einen definierten Stimulus fehlt es bisher an verlässlichen und einfachen Methoden. Flexible Mikrostrukturen, mit denen das Auswachsen von Zellen und Neuriten durch die Änderung der Oberflächeneigenschaften dynamisch gesteuert werden kann, sind für eine genauere Kontrolle neuronaler Netzwerkgeometrien mittels oberflächenstrukturierter Zellkultursubstrate dringend erforderlich.

In dieser Arbeit wurde erstmalig das enorme Potential von thermoresponsiven Zellkultursubstraten für die dynamische Kontrolle neuronalen Zellwachstums in vitro demonstriert. Mit einer mikrostrukturierten TRP-Beschichtung konnte die Anordnung von einzelnen oder wenigen neuronalen Zellen auf der Oberfläche kontrolliert und das Auswachsen der Neurone und ihre Vernetzung in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur zeitlich und räumlich gesteuert werden. Das Protokoll wurde mit humanen, neuronalen Zellen der SH-SY5Y-Zelllinie etabliert und erfolgreich auf humane iN angewendet. Darüber hinaus wurde die prinzipielle Möglichkeit zur Erweiterung des Protokolls durch orts aufgelöstes Schalten der TRP-Beschichtung mittels lokaler Heizung der Substratoberfläche erarbeitet.

Relevante Aspekte für die Anwendung der mikrostrukturierten TRP-Substrate sind eine einfache Durchführung der Methode, die Kompatibilität mit anderen Analysemethoden und Versuchsbedingungen, die Biokompatibilität sowie eine Anwendbarkeit für relevante Zelltypen. Die besonderen Eigenschaften und Einschränkungen der thermoresponsiven Zellkultursubstrate hinsichtlich dieser Aspekte sowie Potentiale zur Erweiterung des Protokolls werden nachfolgend anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bewertet.

6.2 Handhabbarkeit der thermoresponsiven Zellkultursubstrate

6.2.1 Einfache dynamische Steuerung der Oberflächenzugänglichkeit

Thermoresponsive Beschichtungen bieten den Vorteil, dass die Oberfläche zur Veränderung der Zugänglichkeit während der Kultivierung der Zellen sehr einfach von einem zellabweisenden in einen zellattraktiven Zustand geschaltet werden kann und vice versa. Da dies durch einfache Temperaturänderung erreicht werden kann, ist hierfür zunächst keine anspruchsvolle Technik notwendig, außer zwei Inkubatoren zur Kultivierung der Zellen bei zwei verschiedenen Temperaturen – in diesem Fall 33 und 37 °C. Dadurch kann die Methode relativ einfach in diversen Zellkulturlaboren realisiert werden. Andere Methoden zur dynamischen Kontrolle des Auswachsens von neuronalen Zellen benötigen hingegen für die Änderung der Oberflächeneigenschaften eine aufwendige Bearbeitung mit hochauflösenden Laser-Scanning- oder AFM-Systemen

(Dermutz et al., 2014; Edagawa et al., 2012; Farrukh et al., 2018; Suzuki et al., 2005). Zudem sind diese Systeme nicht reversibel, das heißt einmal modifizierte – zum Beispiel zellattraktiv geschaltete – Oberflächen bleiben während der restlichen Kultivierung zellattraktiv. Das hier verwendete PEG-basierte TRP kann jedoch auch wieder in den zellabweisenden Zustand geschaltet werden (Kessel et al., 2010). Dies bietet theoretisch die Möglichkeit, bestimmte Bereiche nach dem Auswachsen der Neuriten (Axone) wieder zellabweisend zu schalten, sodass weitere Neuriten bzw. Zellen daran gehindert werden könnten, ebenfalls auszuwachsen. Vorversuche am Fraunhofer IZI-BB deuteten darauf hin, dass bereits geknüpfte neuronale Zellkontakte in einem solchen Fall bestehen bleiben (Daten nicht gezeigt).

Einen möglichen Nachteil hinsichtlich Reproduzierbarkeit des Schaltvorgangs stellen die beobachteten Schwankungen im zeitlichen Verlauf sowie im Ausmaß des Auswachsens der Zellen dar (siehe Abb. 5-5 F). Dies könnte in der ebenfalls beobachteten Variabilität der TRP-Funktionalität verschiedener Beschichtungsvorgänge begründet liegen (Abrundungseffizienzen bei L929-Zellen zwischen 60 und 100 %). Möglich ist aber auch, dass in den verschiedenen Versuchen unterschiedlich viele Zellen in den TRP-freien Bereichen vorhanden waren, zum Beispiel durch Ungenauigkeiten in der Bestimmung der Zellzahl beim Aussäen oder Unterschiede in der Stärke beim Spülen der Substrate, was eine gewisse Variabilität der Methode darstellt. Unterschiedliche Zeitfenster für das Auswachsen der Neuriten bzw. Zellen wurden jedoch auch in anderen Methoden beschrieben (Dermutz et al., 2014). Während die Zeit für das Schalten der Oberflächeneigenschaften relativ kurz ist, benötigt die aktive, metabolische Reaktion der Zellen auf die veränderten Oberflächeneigenschaften verhältnismäßig viel Zeit (Branch et al., 2001; Uhlig et al., 2014). Die Zellen tasten sich langsam mit Hilfe der Filopodien vor und müssen zum Auswachsen bzw. Migrieren Umstrukturierungen im Zytoskelett aktivieren. Solche Prozesse sind in Zellpopulationen in der Regel nicht synchronisiert und daher schwer zu kontrollieren. Zum Beispiel kann die zeitliche Distanz zwischen Zellteilung und Polymerschaltung die Kinetik der Reorganisation des Zytoskeletts und damit das Auswachsen beeinflussen. Dass das Auswachsen der Zellen tatsächlich durch ein Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand und nicht aufgrund einer zeitlich abnehmenden abweisenden Eigenschaft oder eines veränderten metabolischen Stoffwechsels erfolgte, wurde durch Kontrollen, wie die Beibehaltung der Temperatur unterhalb der LCST oder temperaturunabhängig zellabweisende PEG-Beschichtungen, untermauert (Abb. 5-5 und Abb. 5-6).

Zusammenfassend stellt das auf thermoresponsiven Zellkultursubstraten basierende Protokoll eine einfache und, abgesehen von hinzunehmenden Schwankungen im zeitlichen Verlauf bzw. Ausmaß des Auswachsens der Zellen, eine robuste Methode zur Kontrolle des neuronalen Zellwachstums dar.

6.2.2 Komfortable Herstellung der mikrostrukturierten TRP-Beschichtung

Die Strukturierung der TRP-Beschichtungen erfolgte mittels Strukturierung der Goldoberfläche im Mikrometermaßstab. Der Einsatz von Gold zur Immobilisierung des in dieser Arbeit verwendeten PEG-basierten TRPs bringt einige Vorteile mit sich:

- 1) Für die Strukturierung des Goldes sind viele hochauflösende Technologien vorhanden.
- 2) Die Ausbildung von SAM auf Gold ist eine weit verbreitete und erforschte Methode und ermöglicht eine relativ einfache und robuste Beschichtung (Yuan et al., 2008).
- 3) Nach Gebrauch der strukturierten Goldoberflächen können diese leicht gereinigt und erneut selektiv mit TRP beschichtet werden und erlauben somit eine komfortable Methode zur Wiederverwendung.

Eine weit verbreitete, hochauflösende Technologie zur Strukturierung von Gold ist die Fotolithografie. Diese Methode wird vorwiegend auch in der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik verwendet und erfordert eine geeignete Infrastruktur. Dies macht die Strukturierung zunächst aufwendig und kostspielig, wenn man den Bedarf einfacher biologischer Labore betrachtet. Die einmal strukturierten Goldoberflächen können jedoch durchaus – auch dank der hohen chemischen Beständigkeit des Goldes – vielfach wiederverwendet werden. Dies bietet wiederum den großen Vorteil, dass die Mikrostrukturen bei Wiederholungsversuchen gut reproduziert werden können. In vielen anderen Ansätzen zur dynamischen Kontrolle des Neuritenwachstums dagegen müssen die Strukturen für jeden Versuch neu hergestellt werden. Für die mikrofluidischen Ansätze (siehe Kapitel 3.3.2) bedeutet dies die Herstellung von PDMS-Strukturen und die Assemblierung dieser Strukturen auf Glas (le Feber et al., 2015; Honegger et al., 2013; Pan et al., 2015; Peyrin et al., 2011; Renault et al., 2015, 2016; Taylor et al., 2005), und für Oberflächenstrukturierungen zum Beispiel die aufwendige Strukturierung der PEG-, SAM- oder Hydrogel-Beschichtung mittels Foto-oder IR-Laser-Systemen (Dermutz et al., 2014; Edagawa et al., 2012; Farrukh et al., 2018; Yamamoto et al., 2011).

Die Ausbildung von homogenen und funktionalen TRP-Schichten auf Gold erfordert sehr saubere Oberflächen (Ron et al., 1998). Erfreulicherweise konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit mittels Fotolithografie und Laserablation erfolgte Strukturierung des Goldes nach entsprechender Reinigung keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität der TRP-Beschichtung hat (siehe Abb. 5-2). Auch die Wiederverwertung der Goldoberflächen für eine funktionale TRP-Beschichtung nach Einsatz in der Zellkultur wurde systematisch für 3 Zyklen gezeigt (siehe Abb. 5-21) und für strukturierte Goldoberflächen durch vielfach reproduzierte Versuche mit denselben Oberflächen bestätigt.

Die strukturierte TRP-Beschichtung ist folglich relativ einfach und reproduzierbar herstellbar, sobald die Goldoberflächen einmal strukturiert sind. Die Strukturierung der TRP-Beschichtungen mittels Strukturierung des Goldes und die erreichten Dimensionen der damit erfolgten Zellstrukturierungen sind in dieser Arbeit erstmalig demonstriert worden.

6.2.3 Simples Besiedlungs- und Kultivierungsprotokoll

Die TRP-beschichteten Substrate sind prinzipiell wie übliche verwendete Deckgläser in Zellkulturschalen handhabbar. Aus diesem Grund folgt auch das Aussäen und Kultivieren der Zellen auf den Substraten einem relativ einfachen Protokoll.

Verschiedene Zellsuspensionen können über die Substrate gegeben werden, und durch die Kultivierung der Neurone auf den Substraten unterhalb der LCST (bei 32 bzw. 33 °C) adhären die Zellen in den TRP-freien Strukturen und nicht in den zellabweisend geschalteten TRP-Bereichen. Nicht-adhärenente Zellen können von der TRP-Oberfläche abgespült werden, wohingegen in den Adhäsionsfeldern und am Glasrand des Substrats die meisten Zellen haften bleiben. Dies konnte sowohl für SH-SY5Y Zellen als auch für Mausastrozyten und humane iN erfolgreich gezeigt werden.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll wurden für die initiale Adhäsion in den Adhäsionsfeldern relativ hohe Belegungsraten von etwa 50 % erreicht (siehe Abb. 5-3). Auch im weiteren Verlauf konnten die neuronalen Zellen durch die Kultivierung unterhalb der LCST gut auf die TRP-freien Strukturen begrenzt werden (siehe Abb. 5-4 A). Die Begrenzung des Zellwachstums auf die Strukturen verbesserte sich sogar während der ersten Tage der Kultivierung bei 33 °C (1. Bis 5. Tag nach dem Aussäen), was durch eine Migration der Zellen in die TRP-freien Bereiche oder ein weiteres Abspülen z.B. beim Mediumwechsel erklärt werden könnte. Dies wurde auch in anderen Methoden mit strukturierten Oberflächen für Neurone beobachtet (Edwards et al., 2013).

Das Aussäen der Zellen, Abspülen nicht adhärenter Zellen, sowie der Mediumwechsel oder die Zugabe von Substanzen erfolgte wie bei Standardzellkulturschalen üblich mit Pipetten und ist damit in einfacher Weise durchführbar.

6.2.4 Zugänglichkeit für Analysemethoden

Dass die TRP-Substrate wie zuvor beschrieben weitestgehend wie übliche Deckgläser gehandhabt werden können, hat außerdem entgegen anderer Methoden wie mikrofluidischen Kammern den Vorteil, dass die Zellen für standardmäßig verwendete Untersuchungsmethoden wie Immunocytochemie und elektrophysiologische Patch-Clamp-Ableitungen leicht zugänglich sind. Dies wurde durch die Färbung des neuronalen Markers β 3-Tubulin in den SH-SY5Y-Zellen (Abb. 5-7) sowie durch Patch-Clamp-Ableitungen an den iN (Abb. 5-9) auf diesen Substraten beispielhaft demonstriert.

Die Verwendung von Gold zur Immobilisierung des TRPs stellt hingegen im Hinblick auf optische Analysemethoden einen gewissen Nachteil dar, da die Goldschichten die Transmission in der Lichtmikroskopie einschränken und eine hohe Belichtung erfordern. Zudem sind bei der Fluoreszenzmikroskopie auf Gold gesonderte Effekte, wie z.B. Quenching der Fluoreszenz oder Oberflächenplasmonen zu beachten. Damit ist eine veränderte Anregungs- und Emissionseffizienz, insbesondere in einem Abstand von 0–40 nm vom Gold, verbunden (Enderlein, 2000; Vasilev et al., 2004). Dies kann für quantitative Analysen auf der Basis von Fluoreszenzmarkierungen an Zellen hinderlich sind.

Prinzipiell sind Standardprotokolle für Immunocytochemie oder Patch-Clamp-Ableitungen jedoch einfach auf die TRP-Substrate übertragbar.

6.2.5 Stabilität der Oberflächenstrukturierung

Die Stabilität von hergestellten neuronalen Netzwerkgeometrien *in vitro* für längere Zeit ist insbesondere für elektrophysiologische Studien, in denen eine längere Kultivierung der Neurone erforderlich ist, ein kritischer Parameter (Edwards et al., 2013; Vogt et al., 2004, 2005). Elektrisch erregbare Zellen bzw. stimulierte postsynaptische Potentiale können bei dissoziierten primären Neuronen zwar nach etwa 10 Tagen gemessen werden (Kleinfeld et al., 1988; Yamamoto et al., 2016), jedoch werden viele Untersuchungen oft erst nach 2–3 Wochen Kultivierung durchgeführt, um eine gewisse Reife der Neurone bzw. eine ordentliche Netzwerkaktivität und Effekte wie Plastizität zu erreichen (zum Beispiel: (Kawabe et al., 2017; Wu et al., 2017)).

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll konnten die neuronalen Zellen durch die Kultivierung unterhalb der LCST bis zu 7 Tage auf die vorgegebenen TRP-freien Strukturen begrenzt werden (siehe Abb. 5-4). Nach diesem Zeitraum fingen die Zellen jedoch auch ohne Temperaturerhöhung verstärkt an, auf die TRP-Bereiche zu migrieren, was auf eine abnehmende zellabweisende Funktion der TRP-Beschichtung schließen lässt. Ein unkontrolliertes Auswachsen der Zellen hebt jedoch die Kontrolle über die Netzwerkgeometrie wieder auf. Zwar ist eine erfolgreich beibehaltene Netzwerkgeometrie auch bei vielen anderen Methoden zur Oberflächenstrukturierung auf einen Kultivierungszeitraum von etwa einer Woche begrenzt (Edagawa et al., 2012; Kleinfeld et al., 1988), jedoch ist eine Möglichkeit zur Langzeitstabilität der Strukturen aus den oben genannten Gründen erstrebenswert. Dies könnte durch eine Erhöhung des Kontrastes zwischen zellabweisenden und zellattraktiven Eigenschaften der verschiedenen Bereiche erreicht werden. Dafür sind verschiedene Lösungsansätze denkbar: eine Verbesserung der zellabweisenden Eigenschaften der TRP-Beschichtung durch 1. Reduktion des Abbaus bzw. der Proteinbelegung oder 2. eine Kultivierung bei geringeren Temperaturen bzw. eine Änderung der LCST oder 3. eine Verbesserung der zellattraktiven Eigenschaften in den TRP-freien Bereichen.

1. Verbesserung der zellabweisenden Eigenschaften der TRP-Beschichtung durch Reduktion des Abbaus bzw. der Proteinbelegung

Eine mit der Kultivierungszeit abnehmende protein- und zellabweisende Funktion ist auch bei anderen zellabweisenden Beschichtungen bekannt und kann mehrere Gründe haben. Für PEG-basierte Beschichtungen ist ein möglicher Grund der chemische Abbau (Branch et al., 2001) bzw. die Oxidation der PEG-Seitenketten (Han et al., 1997), welche auch bei dem hier verwendeten TRP für die zellabweisenden Eigenschaften verantwortlich sind. Zusätzlich, bzw. auch dadurch, ist eine Belegung der Oberfläche mit Proteinen aus dem Medium, oder mit von den Zellen sekretierten Proteinen, welche die zellabweisenden Eigenschaften maskieren, vielfach erwähnt und vereinzelt nachgewiesen worden (Branch et al., 2001).

Zur Lösung dieser Probleme könnte eine andere Zusammensetzung des Co-Polymers, zum Beispiel mit längeren PEG-Seitenketten, oder eine höhere Dichte der Polymermoleküle auf der Oberfläche verwendet werden, sodass der Abbau bzw. die Anlagerung von Proteinen zwischen den Polymerketten erschwert wird. Eine veränderte TRP-Komposition bzw. –dichte hätte jedoch gleichzeitig Auswirkungen auf die LCST

bzw. auf die zellattraktiven Eigenschaften des TRPs oberhalb der LCST und könnte damit das induzierte Auswachsen der Zellen erschweren. Die Dichte der Polymermoleküle auf der Oberfläche wird durch die Konzentration der TRP-Lösung sowie die Immersionszeit bei der Beschichtung der Goldoberfläche beeinflusst (Kessel et al., 2010; Uhlig et al., 2012). Bei zu dichten Polymeren werden allerdings auch wieder die zellabweisenden Eigenschaften negativ beeinflusst.

Der oxidative Abbau der PEG-Seitenketten könnte auch möglicherweise durch Zugabe von Antioxidantien ins Medium wie z.B. n-Propylgallat oder Ascorbinsäure verringert werden (Branch et al., 2001; Han et al., 1997). Vielfach wird auch das Vorhandensein von Serum im Medium in diesem Zusammenhang diskutiert: Die Belegung der zellabweisenden Oberfläche mit Serumproteinen, und die damit verbundene Maskierung der zellabweisenden Eigenschaften, kann durch die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium reduziert werden (Cheng et al., 2004; Edagawa et al., 2012; Matsuzawa et al., 1993; Vogt et al., 2003).

Auch in dieser Arbeit konnte in Versuchen mit SH-SY5Y-Zellen, in denen die Zellen für mehr als 4 Tage bei 33 °C kultiviert wurden, durch Austausch zu serumfreiem Medium 3 Tage nach dem Aussäen eine bessere Begrenzung auf die TRP-freien Strukturen erzielt werden. Ein zu frühzeitiges Entfernen des Serums (z.B. direkt beim Aussäen oder 1 Tag nach dem Aussäen) kann jedoch bei manchen Zelltypen, wie den SH-SY5Y-Zellen, zum Absterben führen. So hinderlich eine Anhaftung von EZM-Proteinen auf der TRP-Beschichtung unterhalb der LCST ist, so wichtig ist diese gleichzeitig in den TRP-freien Bereichen für die Interaktionen mit Integrinrezeptoren und damit für die Adhäsion und das Überleben der Zellen. Sofern die Zellen selbst nicht schnell genug EZM-Proteine sekretieren können (zum Beispiel aufgrund eines gestressten Zustands durch das Besiedlungsprotokoll), müssen diese Proteine aus der Lösung kommen. Andere Zelltypen, wie die in dieser Arbeit verwendeten Astrozyten, können jedoch auch einen Tag nach dem Aussäen in serumfreiem Medium kultiviert werden und im Fall der Astrozyten darüber hinaus die Adhäsion neuronaler Zellen wie den iN vermitteln.

2. Verbesserung der zellabweisenden Eigenschaften der TRP-Beschichtung durch Kultivierung bei geringeren Temperaturen bzw. Änderung der LCST

Ein weiterer Ansatz, die zellabweisenden Eigenschaften der TRP-Oberflächen zu verbessern, könnte in der Kultivierung der Zellen auf den Substraten bei geringeren Temperaturen, z.B. 31 °C, liegen. Der Phasenübergang des TRPs zwischen dem zellabweisenden und dem zellattraktiven Zustand ist nicht sehr scharf: in Trübungskurven in PBS ist der Übergang etwa 3–4 °C breit (Lutz et al., 2007; Wischerhoff et al., 2008). Damit liegt das hier verwendete TRP mit einer LCST von 35,2 °C möglicherweise bei 33 °C nicht vollständig im zellabweisenden Zustand vor. Stark von der physiologischen Temperatur abweichende Kultivierungstemperaturen könnten jedoch wiederum andersartiges Zellverhalten auslösen (wie in 6.2.6 diskutiert). Alternativ wäre ein TRP mit einer höheren LCST denkbar.

3. Verbesserung der zellattraktiven Eigenschaften in den TRP-freien Bereichen

Eine längerfristige Eingrenzung der neuronalen Zellen auf die TRP-freien Bereiche könnte bei einer Kultivierung unterhalb der LCST auch durch eine höhere Attraktivität dieser TRP-freien Bereiche erreicht werden, da es bei der Migration in bestimmte Bereiche stets um den Kontrast zwischen zellattraktiven und zellabweisenden Eigenschaften geht (siehe auch Abb. 3-1 A, (Letourneau, 1975b; Vielmetter et al., 1990). Das Aussäen und Strukturieren von Gliazellen vor dem Aussäen von Neuronen, wie in dieser Arbeit für iN mit den Astrozyten gezeigt, zur Erhöhung der Attraktivität der TRP-freien Bereiche scheint demnach ein guter Ansatzpunkt auch für die Verbesserung der langfristigen Eingrenzung der Zellen in TRP-freie Bereiche. Eine andere Möglichkeit wäre eine selektive Beschichtung der TRP-freien, d.h. gold-freien Bereiche mit zelladhäsionsfördernden Substanzen. Hier wäre zum Beispiel eine Beschichtung mit Aminosilanen denkbar, wie sie vielfach auch für Strukturierungsmethoden von Neuronen verwendet wurde (Matsuzawa et al., 1993; Kleinfeld et al., 1988). Inwieweit der Beschichtungsprozess mit der TRP-Beschichtung interferiert, müsste jedoch getestet werden.

6.2.6 Zellkompatibilität der TRP-Substrate

Damit mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode verlässliche und relevante Ergebnisse erzielt werden können, sollten die Zellkultursubstrate bzw. das Protokoll zur Kultivierung der Zellen auf den Substraten möglichst keine negativen Effekte auf die neuronalen Zellen haben. Weder bei den SH-SY5Y-Zellen noch bei den Astrozyten und den iN wurden während der Kultivierung auf den mikrostrukturierten, thermoresponsiven Zellkultursubstraten eine toxische Wirkung oder auffällige Zellveränderungen beobachtet, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die hier entwickelten Substrate zellkompatibel sind. Für die SH-SY5Y-Zellen wurde zudem mit der Färbung des neuronalen Markers β 3-Tubulin (Abb. 5.7) nach 7 Tagen Kultivierung auf den Substraten gezeigt, dass diese Zellen ihren differenzierten neuronalen Phänotyp auf den Substraten beibehalten. Auch die iN zeigten bei Patch-Clamp-Ableitungen nach 10 Tagen Kultivierung auf den Substraten Aktionspotentiale und spontane elektrische Aktivität (Abb. 5-9), was auf eine normale Funktion der Zellen hindeutet.

Monoschichten von Feeder-Gliazellen in der Umgebung, und eventuell auch innerhalb der Strukturen verbessern im Allgemeinen die Vitalität der Zellen, insbesondere einzelner Zellen, auf den Substraten. Dies wurde für strukturierte Zellkulturmodelle oder Kulturen mit geringen Zelldichten bereits vielfach erwähnt und gezeigt (Bartlett and Banker, 1984a; Kaech and Banker, 2006; Kleinfeld et al., 1988; Millet et al., 2007; Yamamoto et al., 2012). Aus diesem Grund wird auch den adhärenz Zellen auf dem Glasrand bei den TRP-Substraten eine große Bedeutung für die Vitalität der Zellen zugeschrieben,

Die anfängliche Kultivierungstemperatur von 32 bzw. 33 °C ist ein kritischer Punkt bei dem in dieser Arbeit entwickelten Zellkultivierungsprotokoll auf den mikrostrukturierten TRP-Substraten. Die physiologische Temperatur für die meisten Säugerzellen liegt bei etwa 37 °C, weshalb langfristige Versuche mit Zellen typischerweise bei dieser Temperatur durchgeführt werden (Gstraunthaler and Lindl, 2013). Zwischen SH-SY5Y-

Zellen, die bei 37 °C oder bei 33 °C kultiviert und differenziert wurden, wurden jedoch über einen Zeitraum von 7 Tagen morphologisch keine Unterschiede festgestellt (Abb. 5-4 B). Auch bei den Astrozyten und den iN konnten innerhalb des Zeitraums der Kultivierung bei 32 °C keine Auffälligkeiten an den Zellen beobachtet werden. Temperaturschwankungen von 2–3 °C können auch im lebenden Gehirn auftreten (Andersen and Moser, 1995), und in Rattenhirnen künstlich induzierte Temperaturunterschiede von 30–39 °C riefen keine Defizite im räumlichen Lernen der Ratten hervor (Moser and Andersen, 1994). Allerdings unterscheiden sich elektrophysiologische Reaktionen wie Feldpotentiale, Amplituden von Aktionspotentialen oder synaptische Transmission bei unterschiedlichen Temperaturen deutlich (Andersen and Moser, 1995; Moser and Andersen, 1994; Shibasaki et al., 2007). Dies sollte zumindest bedacht und notiert werden, wenn Experimente mit Neuronen auf den Substraten z.B. bei 33 °C durchgeführt werden.

Eine Lösung bezüglich der Kultivierungstemperatur wäre die Verwendung eines TRPs mit einer höheren LCST. Allerdings müssten die zu schaltenden TRP-Bereiche bei einer LCST von beispielsweise 37 °C mindestens auf 39–40 °C erwärmt werden, um ein Schalten des TRPs und damit ein Auswachsen der Zellen zu induzieren. Für kürzere Zeiten ist dies möglicherweise akzeptabel, wie auch in anderen Studien zur Strukturierung von Zellen für Temperaturen von 40–50 °C gezeigt wurde (Rinklin et al., 2015; Shu et al., 2005; Suzuki et al., 2005). Bei 42–44 °C wird allerdings in den Zellen als Reaktion schon die Expression von Hitzeschockproteinen ausgelöst (Ginet et al., 2011).

Zusammenfassend können die TRP-Substrate anhand der Ergebnisse als zellkompatibel erachtet werden. Vitalitätsassays und genauere Untersuchungen zur Auswirkung der Kultivierungstemperatur könnten jedoch mehr Garantie dafür bringen.

6.3 Anwendungsmöglichkeiten der Methode

6.3.1 Anwendbarkeit auf relevante Zelltypen

Für die Anwendung einer neuen Methode in der Neurowissenschaft ist die Übertragbarkeit des Protokolls auf die jeweils verwendeten relevanten Zelltypen von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde das Protokoll zur Steuerung des Auswachsens neuronaler Zellen mit den mikrostrukturierten thermoresponsiven Zellkultursubstraten mit der Zelllinie SH-SY5Y etabliert. Diese Zellen lassen sich in neuronale Zellen mit morphologischen und biochemischen Eigenschaften ähnlich zu reifen, humanen Neuronen differenzieren (Encinas et al., 2000; Kovalevich and Langford, 2013), weshalb sie zum Beispiel für Studien zu Alzheimer genutzt werden (Agholme et al., 2010). Für elektrophysiologische Untersuchungen von neuronalen Verschaltungsmustern und Effekten auf die Netzwerkaktivität eignet sich die SH-SY5Y-Zelllinie jedoch weniger, da sie eine diverse Population von neuronalen Zelltypen darstellt und elektrophysiologische Reaktionen sehr variabel sind (Santillo et al., 2014).

Für Studien zur synaptischen Plastizität oder Informationsverarbeitung in Neuronen mit elektrophysiologischen Methoden werden vorwiegend primäre Neurone aus der Maus oder Ratte oder humane iN verwendet. Auf humane iN konnte das Protokoll zur Steuerung des Auswachsens von Neuronen mit Hilfe der TRP-Substrate erfolgreich übertragen werden. Die Kultivierung der iN auf den TRP-Substraten war durch die Adhäsion von Astrozyten innerhalb der Strukturen sowie durch Monoschichten von Astrozyten unterhalb der Substrate gelungen (siehe Kapitel 5.1.6). Für die Kultivierung von primären Neuronen auf den in dieser Arbeit vorgestellten TRP-Substraten bedarf es noch einer weiteren Optimierung, da bisherige Ansätze nicht erfolgreich waren. In ersten Versuchen starben primäre kortikale Neurone auf TRP-Substraten nach einigen Tagen ab, auch wenn sie wie die iN ausgesät und kultiviert wurden. Die Gründe dafür sind unklar. Primäre Neurone sind allerdings bekannt dafür, dass sie sehr sensibel für die Kultivierungsbedingungen sind (Allen, 2006; Millet and Gillette, 2012a).

Generell reagieren verschiedene Zelltypen sehr unterschiedlich auf bestimmte Oberflächeneigenschaften von Substraten, auf denen sie kultiviert werden (Gordon et al., 2013; Kleinfeld et al., 1988; Uhlig et al., 2014). Aus diesem Grund muss die Kultivierung neuer Zelltypen auf den mikrostrukturierten TRP-Substraten stets geprüft und gegebenenfalls adaptiert bzw. optimiert werden, was sich nachteilig auf die Verbreitung der Methode auswirken kann. Allerdings gilt dies zum Beispiel auch für die weit verbreitete Methode zur Herstellung von Kulturen mit Mikroinseln für einzelne autaptische Neurone (Allen, 2006). Die Beschichtung mit PEG-basierten Substanzen für die Herstellung von protein- und zellabweisenden Oberflächen ist sehr weit verbreitet, sodass der zugrundeliegende Mechanismus als Zelltypen-unabhängig erklärt werden könnte. So wurden PEG-basierte Oberflächenstrukturierungen auch für verschiedene neuronale Zelltypen verwendet, darunter embryonale und adulte hippocampale Neurone, kortikale Neurone, und PC12-Zellen (Dermutz et al., 2014; Edagawa et al., 2012; Edwards et al., 2013; Staii et al., 2011). Da der zellabweisende Zustand des in dieser Arbeit verwendeten TRPs ebenfalls auf den Eigenschaften von PEG basiert, sollte dieser Mechanismus bei dem vorgestellten Protokoll also auf die meisten Zelltypen, inklusive primäre Neurone übertragbar sein. Die *Adhäsion* von verschiedenen Zelltypen hingegen ist von Oberflächenrezeptoren der Zellen wie z.B. verschiedenen Integrinrezeptoren abhängig. Daher werden für verschiedene Zelltypen häufig auch verschiedene Beschichtungen verwendet (Gordon et al., 2013). Für primäre hippocampale oder kortikale Neurone werden häufig, auch bei strukturierten Oberflächen, einfache oder kombinierte Beschichtungen mit PLL, Kollagen und Laminin verwendet (Edagawa et al., 2012; Vogt et al., 2003). Auch Aminosilane wurden für die Adhäsion verschiedener primärer Neurone erfolgreich verwendet (Edwards et al., 2013; Kleinfeld et al., 1988). Viele der Methoden mit Oberflächenstrukturierungen zur Kontrolle neuronaler Netzwerk-Geometrien wurden mit primären Neuronen vorgestellt, und eine Übertragung auf andere Zelltypen wurde in diesen Publikationen meist nicht thematisiert. Lediglich Kleinfeld et al. berichteten bezüglich der strukturierten Oberflächen von unterschiedlichem Verhalten von Rückenmarks-Neuronen und zerebralen Neuronen, sowie Neuronen aus unterschiedlich alten Tieren. Edwards et al. übertrugen ihr System zur Zell-Strukturierung von embryonalen auf adulte Neurone, gingen jedoch nicht näher auf Adaptionen des Protokolls ein und nutzten für beide Zelltypen eine Aminosilan-basierte Beschichtung für die Zelladhäsion. Edagawa et al. hingegen etablierten ihr System zur Steuerung des Neuritenwachstums mit der PC12-Zelllinie und übertrugen es

ansatzweise auf ein primäres kortikales Neuron, stellten jedoch Unterschiede bezüglich der Geometrien fest: im Gegensatz zu PC12-Zellen migrierte das primäre Neuron auch in den 5 µm breiten Laminin-beschichteten Pfad, der für das Neuritenwachstum bestimmt war.

Für die Übertragung des hier entwickelten Protokolls auf sensible Zelltypen wie primäre Neurone könnte also, zusätzlich zur Einbindung von Gliazellen, die Beschichtung der TRP-freien Bereiche mit PLL und / oder EZM-Proteinen getestet werden. Allerdings führt die Inkubation der TRP-Substrate mit hohen Proteinlösungen ($> 1 \mu\text{g} / \text{ml}$) auch bei Temperaturen unterhalb der LCST zu einem Funktionsverlust des TRPs (Uhlig, 2014), weshalb eine Lösung für eine selektive Beschichtung der TRP-freien Glasbereiche erforderlich wäre. Hierfür könnte das Mikrokontaktdruckverfahren getestet werden, oder der Einsatz von selektiver Oberflächen-Chemie, wie der schon angesprochenen Silanisierung von Glas.

Zusammenfassend ist die Übertragung des in dieser Arbeit entwickelten Protokolls zwar nicht für alle Zelltypen ohne weitere Adaptionen möglich ist, aber für zwei verschiedenen Zelltypen, nämlich den SH-SY5Y-Zellen und den iN wurde die Anwendung schon gezeigt. Humane iN besitzen darüber hinaus als neuronales Zellkulturmodell ein hohes Potential für die Zukunft der Neurowissenschaften.

6.3.2 Dimensionen der Mikrostrukturen zur Kontrolle neuronaler Zellen

Über die Dimensionen der Mikrostrukturen kann die Form neuronaler Zellen und neuronaler Netzwerke kontrolliert werden (Feinerman et al., 2008; Tomba et al., 2014). Die Mikrostrukturen bestanden in dieser Arbeit, wie auch bei den meisten Oberflächenstrukturen zur Kontrolle neuronaler Netzwerke aus Feldern zur Adhäsion der Zellkörper und schmalen Pfaden zum Leiten des Neuritenwachstums. Prinzipiell sind für die TRP-Substrate dank der Strukturierungsmethode über Gold fast alle Dimensionen für die Mikrostrukturen realisierbar, inklusive extremer Verhältnisse der Strukturgrößen (sehr kleine Strukturen neben sehr großen Strukturen) und Aspektverhältnisse der Strukturen (Tiefe zu Breite). Dies ist ein Vorteil dieser Methode gegenüber Oberflächenstrukturen, die auf der Mikrokontaktdruck-Technik basieren (Hardelauf et al., 2011; Xia and Whitesides, 1998).

Größe der Adhäsionsfelder für Zellkörper

Für detaillierte Untersuchungen an einzelnen Zellkompartimenten oder zur Analyse der Antwort einzelner Zellen auf einen definierten Stimulus sind geringe Zelldichten bzw. einzelne definiert vernetzte Zellen oder kleine Zellcluster erstrebenswert. Die TRP-freien Adhäsionsfelder der in dieser Arbeit konzipierten Mikrostrukturen sollten demnach so groß sein, dass sie die Adhäsion von nur wenigen Zellen oder einzelnen Zellen zulassen, aber auch mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit besiedelt werden. Sowohl im Design 1 als auch im Design 2 wurden Adhäsionsfelder mit einer Kantenlänge von 50 µm hergestellt. Nach 4 Tagen bei 33 °C wurden durchschnittlich 6,0 SH-SY5Y Zellen pro Feld gezählt, wobei die Zellzahl zwischen 1 und 20 schwankte. Für die induzierten Neurone wurden durchschnittlich etwa 2,4 Zellen pro Feld gezählt, mit Schwankungen zwischen 1 und 5 Zellen. Generell werden für die Adhäsion einzelner Zellen häufig

Felder mit einem Durchmesser von 10–30 μm verwendet (Suzuki et al., 2005; Tomba et al., 2014; Vogt et al., 2005; Yamamoto et al., 2012), wohingegen in größeren Feldern eher mehr als eine Zelle zu finden sind (Dermutz et al., 2014).

Die Größe der neuronalen Zellkörper kann zwischen 5 und 20 μm variieren (Khan and Newaz, 2010), abhängig vom Zelltyp und weiteren Faktoren wie zum Beispiel der Adhäsionsstärke auf der Oberfläche (Corey et al., 2010). Die Zellkörper von SH-SY5Y-Zellen haben eine durchschnittliche Länge von 10 μm (Dwane et al., 2013). In Felder mit einer Kantenlänge von 50 μm passen theoretisch also um die 25 Zellen hinein. Die tatsächliche Belegung hängt jedoch nicht nur von der Größe der adhäsiven Felder, sondern auch von der Zelldichte beim Aussäen sowie – zumindest in diesem Protokoll – von der Stärke der Adhäsion und dem Spülen der Substrate ab (Dermutz et al., 2014).

Für eine Belegung mit einzelnen Zellen könnten zukünftig also sowohl die Größe der Adhäsionsfelder, als auch die Zelldichte beim Aussäen und das Abspülen nicht-adhärenter Zellen einen Tag nach dem Aussäen optimiert werden. Allerdings muss bei vereinzelt Zellen noch stärker auf die Viabilität der Zellen geachtet werden, da geringe Zelldichten in diesem Kontext stets kritisch sind (Dermutz et al., 2014; Kaech and Banker, 2006; Millet et al., 2007).

Abstände der Adhäsionsfelder zur Kontrolle der Vernetzung

Zur Kontrolle der Vernetzung zwischen neuronalen Zellen in den Adhäsionsfeldern sollten die schaltbaren Bereiche dazwischen so gewählt werden, dass sie im zellattraktiven Zustand der TRP-Oberfläche durch Neuriten oder Zellen überbrückt werden können, im zellabweisenden Zustand jedoch nicht. Für die TRP-Substrate nach Design 1 wurde ein Abstand von 200 μm zwischen den Adhäsionsfeldern gewählt. Über diesen Abstand konnte das Auswachsen und Überbrücken durch Neuriten und Zellen durch Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand erfolgreich kontrolliert werden (siehe Abb. 5-5).

Andere Abstände sind ebenfalls denkbar, jedoch ergibt sich für einen optimalen Abstand ein gewisses Fenster: Je kleiner der Abstand ist, desto größer ist die Gefahr, dass der Bereich auch im zellabweisenden Zustand überbrückt wird. So zeigten Letourneau und Hammerback schon 1986, dass Filopodien von Neuronen des Spinalganglions (Huhn) 50 μm breite Spalte mit geringem Adhäsionsvermögen überbrücken können (Hammarback and Letourneau, 1986). Sogar die Überbrückung von 70 μm breiten PEG-beschichteten, d.h. zellabweisenden Bereichen durch Neuriten (von kortikalen Neuronen aus der Maus) wurde berichtet, sofern diesen vorab ein kurzer adhäsiver Pfad geboten wurde (Staii et al., 2011). Der Abstand sollte allerdings auch nicht wesentlich größer sein, als die übliche Neuritenlänge des jeweiligen Zelltyps (, wobei diese auch von der Zelldichte und Leitstrukturen abhängt (Yang et al., 2005)). Weiterhin sollte beachtet werden, dass Neurone ohne Kontakt zu anderen Neuronen ab einer bestimmten Neuritenlänge absterben können; bei hippokampalen Neuronen zum Beispiel bei über 150 μm Neuritenlänge (Ikegaya et al., 2000). Für all diese Betrachtungen gilt allerdings auch, dass die Adhäsion und das Wachstum von Neuriten und Zellen abhängig vom Zelltyp sind, sodass eine Übertragung der Ergebnisse zwischen verschiedenen Zelltypen schwierig sein kann.

Im Design 2 wurde der Gesamtabstand von 200 μm zwischen den Adhäsionsfeldern beibehalten, wobei der TRP-freie Pfad für die Neuriten 150 μm lang war, sodass ein TRP-beschichteter Spalt von nur 50 μm Breite blieb. Obwohl für solche Abstände eine Überbrückung durch Zellen und Zellfortsätze in der Literatur gezeigt wurde (siehe oben), konnte ein signifikanter Unterschied beim Überbrücken des TRP-Spalt durch das Schalten des TRPs in den zellattraktiven Zustand gezeigt werden (Abb. 5-6 G). Allerdings wurden die TRP-Spalte auch im zellabweisenden Zustand gelegentlich durch Neuriten überbrückt, weshalb in Zukunft ein breiterer TRP-Spalt anvisiert werden sollte.

Neuritenwachstum entlang der schmalen Pfade

Die Pfade für Neuriten in Design 2 sollten das Auswachsen der Neuriten in eine bestimmte Richtung lenken, und im optimalen Fall auch eine Spezifikation der Neuriten zu Axonen induzieren, analog zu den Ergebnissen von diversen Polarisationsstudien (Stenger et al., 1998; Tomba et al., 2014; Yamamoto et al., 2012). Tatsächlich wuchsen die Neuriten vorwiegend entlang dieser Pfade (und nicht etwa auf die TRP-Beschichtung), und das Auswachsen von Neuriten und Zellen in Richtung des benachbarten Adhäsionsfeldes geschah – zumindest in den ersten Stunden nach der Temperaturerhöhung – vor allem über den schmalen TRP-Spalt. Allerdings migrierten auch häufig Zellkörper entlang der Pfade, – sowohl bei Versuchen mit SH-SY5Y-Zellen als auch mit Astrozyten und iN.

Um Zellkörper aufgrund der Größe auszuschließen, empfiehlt sich eine Breite von 1 bis 5 μm (Hardelauf et al., 2011; Stenger et al., 1998; Yamamoto et al., 2012). Hardelauf et al. zeigten explizit für SH-SY5Y-Zellen, dass diese mit ihren Zellkörpern auf adhäsiven Linien mit einer Breite von mehr als 3 μm adhärten und fanden für die Selektivität von Neuriten bei 2 μm Linienbreite ein Optimum (Hardelauf et al., 2011). Strukturbreiten von 2 bis maximal 5 μm waren auch für die Pfade in Design 2 angestrebt, jedoch mit den vorhandenen Mitteln der Fotolithografie technisch bis dahin nicht realisierbar. Praktisch waren die Pfade für die Neuriten schließlich 7–9 μm breit, und somit auch breit genug für die Adhäsion und Migration von Zellkörpern. Dies erschwert die Kontrolle der Polarisierung der Neurone in den Strukturen. Mit einer Länge von 150 μm kann für schmalere Pfade jedoch theoretisch stark davon ausgegangen werden, dass Neuriten in diesen Strukturen vorwiegend zu Axonen werden. Eine induzierte Polarisierung wurde sogar mit 60 μm langen Pfaden gezeigt (Tomba et al., 2014).

Die Herstellung schmalere Pfade (2–5 μm) für die Neuriten sollte also ein nächster Schritt zur Optimierung des vorgestellten Protokolls sein. Für kleinere Strukturbreiten (< 5 μm) in der Goldoberfläche müssten die fotolithografischen Technologien optimiert werden, zum Beispiel durch Verwendung von Plasmaätzverfahren anstelle von nasschemischen Ätzverfahren. Letztendlich sollten diese Strukturbreiten jedoch kein Problem darstellen, sind doch in der Halbleiterindustrie dank verbesserter Technik hinsichtlich des Auflösungsvermögens heutzutage Strukturgrößen von etwa 20 nm möglich (Seisyan, 2011).

6.4 Mikroheizung für lokales Schalten des TRPs

Da mit dem bisherigen Protokoll die gesamte TRP-Beschichtung durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur (Inkubationsschrank) zellattraktiv geschaltet wurde, wuchsen Zellen und Neuriten langfristig in alle Richtungen aus den Adhäsionsfeldern hinaus. Für eine Begrenzung des Auswachsens auf kleinere Bereiche, wie den TRP-Spalt lag daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Lösung durch lokales Schalten der TRP-Beschichtung mittels lokaler Beheizung der Substrate im Fokus. Dafür wurde eine Mikroheizung zur Integration unterhalb der TRP-Substrate entwickelt. Durch lokales Schalten des TRP-Spaltes könnte die örtliche Kontrolle der neuronalen Verbindung verbessert werden.

6.4.1 Entwicklung der Mikroheizung mit scharfen Temperaturgradienten

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Methodenpaket aus Temperaturmessmethode und Simulationsmodellen konnten wichtige Einflussfaktoren auf die Temperaturprofile untersucht und die Mikroheizung auf Basis dieser Ergebnisse optimiert werden. Durch diese Optimierung konnten scharfe Temperaturgradienten (Temperaturabfall von ca. $35\text{ °C} / \text{mm}$) und damit eine akzeptable Packungsdichte von Heizelektroden (156 bzw. 40 pro cm^2 für Design 2 bzw. 1) erreicht werden.

Wichtige Einflussfaktoren auf das Temperaturprofil sind demnach der prozentuale Leistungsverlust an der Heizelektrode sowie die Wärmeabfuhr vom Substrat (siehe Kapitel 5.2.2). Der Leistungsverlust konnte durch Optimierung der Geometrie (breitere und dickere elektrische Zuleitungen) sowie durch Optimierung des Materials (Gold für die Zuleitungen und ITO für die Heizelektroden) auf die Heizelektrode fokussiert werden (80 – 94 % theoretischer prozentualer Leistungsverlust im finalen Design der Mikroelektrodenchips). Für andere Anwendungen könnte dieser Wert zum Beispiel durch weitere Optimierung der Schichtdicken oder der Geometrie (breitere Zuleitungen) wahrscheinlich sogar noch erhöht werden, womit wiederum schärfere Temperaturgradienten erzielt werden könnten. Schärfere Temperaturgradienten würden eine noch dichtere Packung der Mikroelektroden erlauben, welche wiederum eine stärkere Parallelisierung von Reaktionsorten ermöglichen würde.

Auf Joulescher Erwärmung basierende Heizmethoden mit ähnlichen Zielen und Anwendungsformaten (d.h. lokale Erwärmung über dem Heizwiderstand im Vergleich zu der auf Umgebungstemperatur befindlichen Nachbarschaft) sind in der Literatur schwer zu finden, und in den meisten Ansätzen werden die lokalen Temperaturprofile im Sinne dieser Arbeit kaum thematisiert. Dadurch ist ein Vergleich der gewonnenen Ergebnisse schwierig. In einigen Studien kann von thermografischen Bildern oder Temperaturprofilen darauf geschlossen werden, dass bei Temperaturerhöhungen von 62 – 75 °C oberhalb der Heizwiderstände die Temperatur neben der Elektrode mit einem Gradienten von etwa 100 – $600\text{ °C} / \text{mm}$ abfällt (Ginet et al., 2011; Rinklin et al., 2015; Yang et al., 2004). Mit einer geringeren Temperaturerhöhung wie der in dieser Arbeit vorgestellten Erhöhung von 4 – 5 °C ist die Studie von Shu et al. besser vergleichbar, da hier ebenfalls auf 37 °C geheizt wurde (Shu et al., 2005). Von dem dort gezeigten, normalisierten Temperaturprofil kann auf einen Temperaturabfall von $72\text{ °C} / \text{mm}$ geschlossen werden. Der scharfe Temperaturgradient wurde in dieser Studie durch

thermisch isolierte Heizwiderstände erzielt (d.h. mit Vakuumkammern unterhalb der Heizung), welche wiederum durch eine Rückseitenätzung des Substrats realisiert wurden. Solch eine thermische Isolierung, bzw. örtliche Stauung der Wärme am Heizwiderstand durch lokale Verdünnung des Substrats ist eine sehr elegante Lösung. Jedoch ist mit dieser Methode auch eine komplizierte Prozessierung sowie eine gewisse Instabilität des Substrats verbunden.

Scharfe Temperaturgradienten könnten zudem durch eine starke Wärmeabfuhr vor allem an der Chipunterseite, zum Beispiel durch erzwungene Konvektion, erreicht werden. Nicht beheizte Bereiche könnten die Wärme, die von benachbarten Mikroelektroden ausgeht, im Fließgleichgewicht bei hoher Wärmeabfuhr besser abgeben. Zu diesem Aspekt wird auch im Bereich der Computerchip-Entwicklung vielfach geforscht (Zaretabar et al., 2018). Hier, wie auch zum Beispiel in Thermocyclern für PCR-Anwendungen, kommen klassischerweise Kühlkörper, wie Kühlrippen und Ventilatoren zum Einsatz (Yang et al., 2002). Diese könnten auch in dem in dieser Arbeit entwickelten Kontaktboard integriert werden. Für die hier geplante Anwendung muss jedoch stets die optische Transparenz zur Beobachtung der Zellen in Zellkulturexperimenten gewährleistet werden, und zwar vor allem dort, wo auch eine möglichst gute Wärmeabfuhr am sinnvollsten wäre, was die Integration von Kühlkörpern erschwert.

6.4.2 Aufheiz- und Abkühlungszeiten

Eine rasche Temperaturkontrolle durch kurze Aufheiz- und Abkühlungszeiten ist vor allem für Anwendungen wie die Analyse bzw. Durchführung von chemischen Reaktionen von Interesse (Beispiel PCR, (Yang et al., 2004)). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufheizzeit stark von der Wärmekapazität und vom Chipdesign abhängt. Mit dem optimierten Mikroelektrodenchipdesign wurde eine Aufheizzeit von etwa 2 Minuten erreicht (Daten nicht gezeigt). Dies mag für die oben genannten Anwendungen relativ langsam sein, – für die hier geplanten Zellkulturexperimente ist dies jedoch ein absolut akzeptabler Zeitrahmen, da die Reaktion der Zellen auf das Schalten der TRP-Beschichtung aufgrund von Reorganisationsprozessen im Zytoskelett einen sehr viel größeren Zeitrahmen umfasst (ca. 15 Minuten, abhängig von der Temperatur; (Okano et al., 1995; Uhlig et al., 2014)).

6.4.3 Eigenschaften der Temperaturmessmethode

Für die Analyse der Temperaturgradienten wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Temperaturmessmethode etabliert. Diese Methode ermöglicht oberflächennahe Temperaturmessungen im Trockenen und im Flüssigen mit einer hohen örtlichen und zeitlichen Auflösung. Nach bestem Wissen ist das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Temperaturmessung das bisher erste und einzige, welches eine hohe Praktikabilität und hohe Flexibilität mit einer leistungsfähigen Temperaturmessung im Trockenen und im Flüssigen vereint. Dies sind wichtige Eigenschaften für Wissenschaftler und Entwickler von Lab-On-Chip-Plattformen, die temperatur-sensitive biologische oder bioanalytische Prozesse verfolgen.

Praktikabilität der Temperaturmessmethode

Die hier etablierte fluoreszenzbasierte Methode zur Thermometrie basiert auf einem kommerziell erhältlichen RhB-haltigem Sol-Gel, und ist relativ einfach und günstig. Die Sol-Gel-Filme mit einer Dicke von etwa 1 μm sind leicht auf unterschiedlichen Oberflächen wie ITO, Glas und Gold mit einem Rotationsbeschichter und Drehgeschwindigkeiten von etwa 6000 rpm zu applizieren, wobei die Oberflächen möglichst planar sein sollten um homogene Schichten zu erreichen. Es könnten aber auch andere Beschichtungsmethoden verwendet werden, wie z.B. Tauchbeschichtung, Sprühen oder Mikrokontaktdruck, was auch für nicht planare Oberflächen funktionieren dürfte. Das Sol-Gel basiert auf Siliziumdioxid, wobei das Rhodamin typischerweise in den Hohlräumen des Siliziumoxid-Gitters eingebettet ist (Duong and Rhee, 2007). Diese Sol-Gel-Filme sind nach dem Härten durch Hitze sehr robust, können lange gelagert werden und lassen sich mindestens mit Ethanol und Wasser spülen. Auf der anderen Seite lassen sie sich nach dem Aushärten kaum wieder von den Oberflächen lösen, was in einigen Fällen eine Wiederverwendung oder Modifikation der beschichteten Oberflächen für weitere Anwendungen behindern kann. Für manche Anwendungen bzw. Proben können die hohen Temperaturen von 160–180 °C zum Aushärten problematisch sein. Für manche Anwendungen könnte jedoch auch eine Verlängerung der Aushärtungszeit bei Raumtemperatur genügen (Duong and Rhee, 2007).

Temperaturauflösung und laterale Auflösung

Das hier etablierte Thermometrie-Protokoll zeichnet sich durch eine hohe laterale Auflösung im unteren μm -Bereich und eine hohe Temperaturauflösung von weniger als 1 °C aus (siehe Abb. 5-19). Zwar wurde in anderen RhB-basierten Temperaturmessmethoden nicht im Detail auf die Temperaturauflösung oder auf die laterale Auflösung eingegangen, jedoch ist anhand der dort gezeigten Daten zu entnehmen, dass die Temperaturauflösung eher im Bereich von 2–5 °C liegt (Akiyama et al., 2009; Elibol et al., 2009; Ginet et al., 2011).

Durch höhere Belichtungszeiten, Beleuchtungseinstellungen oder Objektive mit höherer Vergrößerung könnte das Rausch-zu-Signal-Verhältnis noch verbessert werden, und damit auch die Temperaturauflösung und / oder örtliche Auflösung. Häufig wird in der Literatur bei Messungen mit RhB das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes als Problem diskutiert (Elibol et al., 2009; Löw et al., 2008). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Beleuchtungsbedingungen war dies jedoch vernachlässigbar gering (Abb. 6-1). Ein Grund für das gegenüber anderen Berichten geringe Photobleaching könnte die Tatsache sein, dass das RhB in der Sol-Gel-Schicht relativ gut geschützt ist vor dem Einfluss von Sauerstoff, welches stark zum Photobleaching beiträgt (Dubois et al., 1996).

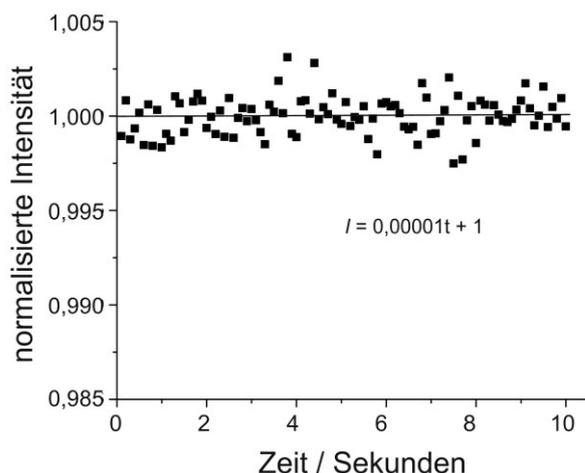


Abb. 6-1 Photobleaching von RhB in Sol-Gel-Schichten. Ein Sol-Gel-beschichtetes Substrat wurde mit identischen Mikroskop-Einstellungen belichtet wie für Temperaturmessungen im Trockenem. Alle 100 ms wurde ein Bild aufgenommen und die Bilder wurden auf die initiale Fluoreszenzintensität normalisiert. Während der gesamten Belichtungszeit von 10 s wurde nahezu kein Photobleaching beobachtet. Trotzdem wurde die Belichtungszeit in den Experimenten so gering wie möglich gehalten (d.h. innerhalb der 10 s), um Fehler durch Photobleaching zu vermeiden.

Temperaturmessungen im Flüssigen

Für die Messungen im Trockenem und im Flüssigen wurden jeweils Kalibrierungsgleichungen erstellt, welche mit Literaturwerten bezüglich des Abfalls der Fluoreszenzquantenausbeute mit der Temperatur vergleichbar waren (Ross et al., 2001; Samy et al., 2008). Der Kalibrierungsfaktor im Flüssigen, d.h. in diesem Falle PBS, ist etwas höher als im Trockenem, das bedeutet, die Fluoreszenzquantenausbeute fällt mit steigender Temperatur im Flüssigen stärker ab als im Trockenem. In Stabilitätsmessungen wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität im Flüssigen langsam mit der Zeit abnimmt (siehe Abb. 5-12 D). Dies könnte durch einen Austritt von RhB-Molekülen ins Lösungsmittel (PBS) oder einen Abbau der Sol-Gel-Schicht verursacht worden sein. Nach 145 Minuten war die Fluoreszenzintensität bei 99,9 % des Ausgangswertes. Verglichen mit der Dauer einer Kalibrierung könnte diese Intensitätsabnahme der Grund für den Unterschied der beiden Kalibrierungsgleichungen sein.

Langzeitmessungen der Temperatur im Flüssigen werden durch diese Intensitätsabnahme der Fluoreszenz natürlich eingeschränkt. Allerdings kann der Abfall in den ersten 145 Minuten als akzeptabel erachtet werden, wenn man bedenkt, dass dies einer theoretischen Temperaturänderung von 0,2 °C entsprechen würde. Für die Abschätzung der Temperatur über längere Zeiträume könnten Messungen für den Zeitraum von 145 Minuten mit Simulationen abgeglichen, und mit Hilfe der Simulation extrapoliert werden. Bei hitzebeständigen Substraten könnte der RhB-Austritt aus der Sol-Gel-Schicht bzw. ihr Abbau möglicherweise auch durch höhere Temperaturen (z.B. 180 oder 200 °C) oder längere Zeiten zum Aushärten des Sol-Gels und einer damit verbundenen Porenschließung verbessert werden. Weiterhin wäre eine kovalente Kopplung zwischen den RhB-Molekülen und dem Siliziumoxid durch bestimmte RhB-Derivate denkbar (z.B. mit einer Ethoxy Silan Gruppe, (Ohishi, 2004)).

Schließlich ist die Möglichkeit zur Temperaturmessung im Flüssigen ein wichtiger Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Temperaturmessmethoden, welche gleichzeitig eine kontinuierliche Messung über größere Flächen erlauben. Im Gegensatz zu anderen Methoden, die ebenfalls auf einer Immobilisierung von RhB auf der Oberfläche zum Beispiel durch Streptavidin-Biotin-Interaktionen bzw. Esterbindungen basieren (Akiyama et al., 2009; Elibol et al., 2009; Ginet et al., 2011) und damit Messungen im Flüssigen erlauben, beinhaltet die Sol-Gel-basierte Methode keine substratabhängige Oberflächen-Chemie.

Korrelation mit numerisch simulierten Temperaturprofilen

Die Aussagekraft der hier vorgestellten Temperaturmessmethode wird durch die Korrelation der gemessenen Temperaturprofile mit numerisch simulierten Temperaturprofilen unterstrichen (siehe Kapitel 5.2.1). Abweichungen zwischen experimentellen und numerisch simulierten Temperaturprofilbreiten lagen dabei bei maximal 10 %. Eine solche Diskrepanz ist jedoch nicht unüblich und kann viele Gründe haben (Löw et al., 2008). Diese Gründe können z.B. bei Ungenauigkeiten bei experimentellen Messungen sowie in den Modellparametern liegen.

Experimentell könnte ein Grund zum Beispiel eine fehlerhafte Kalibrierungsgleichung sein, welche in der Folge bei der Kalkulation der Temperaturdifferenz aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten zu fehlerhaften Werten führt. Fehler in der Kalibrierungsgleichung können wiederum durch eine Ungenauigkeit der Angabe der absoluten Umgebungstemperatur in der Klimakammer beim aktiven Heizen oder passiven Kühlen begründet werden. Diese Umgebungstemperaturen wurden mit Sensoren gemessen, welche in den Datenblättern eine Toleranz von 1,5 K für das Thermoelement bzw. 0,3 K für das Pt100 aufweisen. Solche Ungenauigkeiten könnten die deutlich erkennbare Streuung der Daten um die angepasste Linearfunktion erklären, da solch ein Rauschen in anderen Fluoreszenzintensitäts-Messungen (Stabilitätstest, Temperaturmessungen) nicht beobachtet wurde. Eine erneute Ermittlung der Kalibrierungsgleichung mit besser kontrollierten Umgebungstemperaturen könnte daher sinnvoll sein.

Gründe für die Diskrepanz zwischen experimentell gemessenen und numerisch simulierten Temperaturen könnten aber auch unzureichende Einstellungsparameter im Modell sein, wie zum Beispiel abweichende Randbedingungen (Wärmeabfuhr) oder nicht der Realität entsprechende thermodynamische Eigenschaften (Wärmekapazität, Wärmeleitfähigkeit usw.).

Prinzipiell stimmten die experimentellen und simulierten Daten jedoch gut überein und gemeinsam stellen die Temperaturmessmethode und die Simulationsmodelle ein starkes Methodenpaket für die Entwicklung und Optimierung von Mikroheizelektroden dar.

7 Fazit

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind ein wichtiger – und der bisher erste – Machbarkeitsnachweis, der zeigt, dass das Auswachsen neuronaler Zellen und deren Neuriten mit mikrostrukturierten TRP-Beschichtungen auf der Ebene von wenigen oder einzelnen Zellen dynamisch kontrolliert werden kann. Für die Herstellung der mikrostrukturierten, thermoresponsiven Zellkultursubstrate und die Kultivierung neuronaler Zellen auf diesen Substraten wurden Protokolle entwickelt, mit denen eine flexible Änderung der Oberflächeneigenschaften für die dynamische Kontrolle der Formation neuronaler Verbindungen *in vitro* auf einfache Weise möglich ist. Dabei wird gleichzeitig die Zugänglichkeit für Untersuchungsmethoden wie Immunocytochemie oder der Patch-Clamp-Technik gewährleistet. Die Mikrostrukturierung der TRP-Beschichtung mittels Goldstrukturierung wurde hier erstmalig gezeigt und ermöglicht die Realisierung von Mikrostrukturen verschiedenster Dimensionen. Die Substrate sind zellkompatibel, wie Kultivierung und Untersuchungen neuronaler Zellen der Zelllinie SH-SY5Y und humaner iN zeigten. Als Erweiterung der Methode und zur verbesserten räumlichen Kontrolle des Auswachsens der Zellen aus den Mikrostrukturen wurde im Rahmen dieser Arbeit außerdem ein Mikroheizchip zur lokalen Heizung der Oberfläche entwickelt, sowie eine Chipumgebung zur Kultivierung der Zellen auf den Chips bei gleichzeitigem elektrischen Anschluss. Das in diesem Zusammenhang entwickelte Methodenpaket aus Temperaturmessmethode und Simulationsmodellen war zur Optimierung der Mikroelektroden äußerst wertvoll und kann auch in Zukunft der Entwicklung und Optimierung ähnlicher Anwendungen dienen. Ebenso ist die entwickelte Mikroheizung für andere Zwecke, wie zum Beispiel mikrofluidische Anwendungen, in denen eine lokal begrenzte Temperaturkontrolle erforderlich ist, nutzbar.

Der hier etablierte methodische Ansatz stellt eine solide Grundlage für weiterführende Assays zur kontrollierten Formation neuronaler Verbindungen *in vitro* dar. Mit einer robusten Passivierung der Mikroelektroden, dem Aufbringen einer mikrostrukturierten TRP-Beschichtung, und schließlich dem Schalten begrenzter TRP-Bereiche sollte in naher Zukunft auch die Kontrolle der Richtung der neuronalen Verbindungen möglich werden. Eine richtungsweisende Signaltransduktion könnte dann mit elektrophysiologischen Methoden wie der Dualen Patch-Clamp-Methode oder Echtzeit-Färbungen mit spannungsabhängigen Farbstoffen oder Ca^{2+} -Indikatoren nachgewiesen werden. Zukünftig könnten damit wichtige neuronale Prozesse wie die neuronale Informationsverarbeitung oder auch Neuropathologien wie Alzheimer im Detail und an humanen Zellen erforscht werden. Eine Weiterentwicklung des Protokolls ist insbesondere mit den humanen iN äußerst erstrebenswert, da diese Zellen ein gewaltiges Potential für die Erforschung von humanen neurologischen Erkrankungen besitzen, *in vivo*-Modelle mit geordneten neuronalen Netzwerken jedoch nicht oder schwer zugänglich sind. Mit besseren Zellkulturmodellen basierend auf humanen Neuronen könnte schließlich auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen verbessert, sowie Tierversuche reduziert werden.

8 Literaturverzeichnis

Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., and Hallbeck, M. (2010). An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 20, 1069–1082.

Aigouy, L., Tessier, G., Mortier, M., and Charlot, B. (2005). Scanning thermal imaging of microelectronic circuits with a fluorescent nanoprobe. *Appl. Phys. Lett.* 87, 184105.

Akiyama, S., Cheng, Y.T., Fattaccioli, J., Takama, N., Low, P., Bergaud, C., and Kim, B.J. (2009). Surface-Temperature Control of Silicon Nanowires in Dry and Liquid Conditions. In *IEEE 22nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2009. MEMS 2009*, pp. 567–570.

Albers, J., and Offenhäusser, A. (2016). Signal Propagation between Neuronal Populations Controlled by Micropatterning. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4.

Albright, T.D., Jessell, T.M., Kandel, E.R., and Posner, M.I. (2000). Neural Science: A Century of Progress and the Mysteries that Remain. *Cell* 100, 1–55.

Allen, T.G.J. (2006). Preparation and maintenance of single-cell micro-island cultures of basal forebrain neurons. *Nat. Protoc.* 1, 2543–2550.

Andersen, P., and Moser, E.I. (1995). Brain temperature and hippocampal function. *Hippocampus* 5, 491–498.

Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984a). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4, 1944–1953.

Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984b). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.* 4, 1954–1965.

Behm, L.V.J., Schlenker, I., Petrusch, M., Jorde, F., Godino, N., Pfisterer, F., Duschl, C., and Kirschbaum, M. (2018). A simple approach for the precise measurement of surface temperature distributions on the microscale under dry and liquid conditions based on thin Rhodamine B films. *Sens. Actuators B Chem.* 255, 2023–2031.

Bianco-Peled, H., and Gryc, S. (2004). Binding of Amino Acids to “Smart” Sorbents: Where Does Hydrophobicity Come into Play? *Langmuir* 20, 169–174.

Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res.* 33, 2643–2652.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49, 57–61.

Bökel, C., and Brown, N.H. (2002). Integrins in Development: Moving on, Responding to, and Sticking to the Extracellular Matrix. *Dev. Cell* 3, 311–321.

- Branch, D.W., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., and Leckband, D.E. (2001). Long-term stability of grafted polyethylene glycol surfaces for use with microstamped substrates in neuronal cell culture. *Biomaterials* 22, 1035–1047.
- Brewer, G.J., Boehler, M.D., Leondopulos, S., Pan, L., Alagapan, S., DeMarse, T.B., and Wheeler, B.C. (2013). Toward a self-wired active reconstruction of the hippocampal trisynaptic loop: DG-CA3. *Front. Neural Circuits* 7.
- Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* 315, 314–318.
- Campenot, R.B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4516–4519.
- Casey, K.G., and Quitevis, E.L. (1988). Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols. *J. Phys. Chem.* 92, 6590–6594.
- Chauhan, V.M., Hopper, R.H., Ali, S.Z., King, E.M., Udrea, F., Oxley, C.H., and Aylott, J.W. (2014). Thermo-optical characterization of fluorescent rhodamine B based temperature-sensitive nanosensors using a CMOS MEMS micro-hotplate. *Sens. Actuators B Chem.* 192, 126–133.
- Cheng, X., Wang, Y., Hanein, Y., Böhringer, K.F., and Ratner, B.D. (2004). Novel cell patterning using microheater-controlled thermoresponsive plasma films. *J. Biomed. Mater. Res. A* 70A, 159–168.
- Cheng, X., Yegan Erdem, E., Takeuchi, S., Fujita, H., Ratner, B.D., and Böhringer, K.F. (2010). Infrared light induced patterning of proteins on ppNIPAM thermoresponsive thin films: a “protein laser printer.” *Lab. Chip* 10, 1079.
- Childs, P.R.N., Greenwood, J.R., and Long, C.A. (2000). Review of temperature measurement. *Rev. Sci. Instrum.* 71, 2959–2978.
- Corey, J.M., Gertz, C.C., Sutton, T.J., Chen, Q., Mycek, K.B., Wang, B.-S., Martin, A.A., Johnson, S.L., and Feldman, E.L. (2010). Patterning N-type and S-type Neuroblastoma Cells with Pluronic F108 and ECM Proteins. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93, 673–686.
- Cullen, D.K., Tang-Schomer, M.D., Struzyna, L.A., Patel, A.R., Johnson, V.E., Wolf, J.A., and Smith, D.H. (2012). Microtissue Engineered Constructs with Living Axons for Targeted Nervous System Reconstruction. *Tissue Eng. Part A* 18, 2280–2289.
- Czöndör, K., Garcia, M., Argento, A., Constals, A., Breillat, C., Tessier, B., and Thoumine, O. (2013). Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nat. Commun.* 4, 2252.
- Darhuber, A.A., Valentino, J.P., and Troian, S.M. (2010). Planar digital nanoliter dispensing system based on thermocapillary actuation. *Lab. Chip* 10, 1061.
- Darvishian, A., Shiari, B., Cho, J.Y., Nagourney, T., and Najafi, K. (2014). Investigation of Thermoelastic Loss Mechanism in Shell Resonators. In ASME 2014 International Mechanical Engineering Congress and Exposition, (Montreal, Quebec, Canada), p. V010T13A062.

- Deisseroth, K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat. Neurosci.* *18*, 1213–1225.
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., et al. (2014). β -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun.* *2*, 145.
- DeMarse, T.B., Pan, L., Alagapan, S., Brewer, G.J., and Wheeler, B.C. (2016). Feed-Forward Propagation of Temporal and Rate Information between Cortical Populations during Coherent Activation in Engineered In Vitro Networks. *Front. Neural Circuits* *10*.
- Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance. *Neuron* *40*, 209–227.
- Dermutz, H., Grüter, R.R., Truong, A.M., Demkó, L., Vörös, J., and Zambelli, T. (2014). Local Polymer Replacement for Neuron Patterning and in Situ Neurite Guidance. *Langmuir* *30*, 7037–7046.
- Dinh, N.-D., Chiang, Y.-Y., Hardelauf, H., Waide, S., Janasek, D., and West, J. (2014). Preparation of Neuronal Co-cultures with Single Cell Precision. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Doleski, S., Yao, L., Pandit, A., and Elvira, C. (2010). NGF release from thermo-responsive collagen-polyNIPAAm polymer networks supports neuronal cell growth and differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A* *94*, 457–465.
- Dotti, C., Sullivan, C., and Banker, G. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* *8*, 1454–1468.
- Dow, L.E. (2015). Modeling disease in vivo with CRISPR/Cas9. *Trends Mol. Med.* *21*, 609–621.
- Dubois, A., Canva, M., Brun, A., Chaput, F., and Boilot, J.P. (1996). Photostability of dye molecules trapped in solid matrices. *Appl. Opt.* *35*, 3193–3199.
- Duong, H.D., and Rhee, J.I. (2007). Exploitation of thermo-effect of rhodamine B entrapped in sol-gel matrix and silica gel for temperature detection. *Sens. Actuators B Chem.* *124*, 18–23.
- Dwane, S., Durack, E., and Kiely, P.A. (2013). Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Res. Notes* *6*, 366.
- Edagawa, Y., Nakanishi, J., Yamaguchi, K., and Takeda, N. (2012). Spatiotemporally controlled navigation of neurite outgrowth in sequential steps on the dynamically photopatternable surface. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *99*, 20–26.
- Edwards, D., Stancescu, M., Molnar, P., and Hickman, J.J. (2013). Two Cell Circuits of Oriented Adult Hippocampal Neurons on Self-Assembled Monolayers for Use in the Study of Neuronal Communication in a Defined System. *ACS Chem. Neurosci.* *4*, 1174–1182.
- Elibol, O.H., Reddy, B., Nair, P.R., Dorvel, B., Butler, F., Ahsan, Z., Bergstrom, D.E., Alam, M.A., and Bashir, R. (2009). Localized Heating on Silicon Field Effect Transistors: Device Fabrication and Temperature Measurements in Fluid. *Lab. Chip* *9*, 2789–2795.

- Ellenbroek, B., and Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis. Model. Mech.* *9*, 1079–1087.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., and Comella, J.X. (2000). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *J. Neurochem.* *75*, 991–1003.
- Enderlein, J. (2000). A Theoretical Investigation of Single-Molecule Fluorescence Detection on Thin Metallic Layers. *Biophys. J.* *78*, 2151–2158.
- Erickson, J., Tooker, A., Tai, Y.-C., and Pine, J. (2008). Caged Neuron MEA: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *J. Neurosci. Methods* *175*, 1–16.
- Esch, T., Lemmon, V., and Banker, G. (1999). Local Presentation of Substrate Molecules Directs Axon Specification by Cultured Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* *19*, 6417–6426.
- Farrukh, A., Zhao, S., Paez, J.I., Kavyanifar, A., Salierno, M., Cavalié, A., and Del Campo, A. (2018). In Situ, Light-Guided Axon Growth on Biomaterials via Photoactivatable Laminin Peptidomimetic IK(HANBP)VAV. *ACS Appl. Mater. Interfaces*.
- Faßbender, F., Schmitt, G., Schöning, M.J., Lüth, H., Buß, G., and Schultze, J.-W. (2000). Optimization of passivation layers for corrosion protection of silicon-based microelectrode arrays. *Sens. Actuators B Chem.* *68*, 128–133.
- le Feber, J., Postma, W., de Weerd, E., Weusthof, M., and Rutten, W.L.C. (2015). Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays. *Front. Neurosci.* *9*.
- Feinerman, O., Rotem, A., and Moses, E. (2008). Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures. *Nat. Phys.* *4*, 967–973.
- Fischer, L.M., Tenje, M., Heiskanen, A.R., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., Émneus, J., Jakobsen, M.H., and Boisen, A. (2009). Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectron. Eng.* *86*, 1282–1285.
- Furshpan, E.J., MacLeish, P.R., O’Lague, P.H., and Potter, D.D. (1976). Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *73*, 4225–4229.
- Gabi, M., Larmagnac, A., Schulte, P., and Vörös, J. (2010). Electrically controlling cell adhesion, growth and migration. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *79*, 365–371.
- Gerthsen, C. und Meschede D. (2015). *Gerthsen Physik*, 25. Auflage. Berlin- Heidelberg: Springer Spektrum.
- Ginet, P., Montagne, K., Akiyama, S., Rajabpour, A., Taniguchi, A., Fujii, T., Sakai, Y., Kim, B., Fourmy, D., and Volz, S. (2011). Towards single cell heat shock response by accurate control on thermal confinement with an on-chip microwire electrode. *Lab. Chip* *11*, 1513.

Gladkov, A., Pigareva, Y., Kutyina, D., Kolpakov, V., Bukatin, A., Mukhina, I., Kazantsev, V., and Pimashkin, A. (2017). Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. *Sci. Rep.* 7, 15625.

Gombotz, W.R., Wang, G.H., Horbett, T.A., and Hoffman, A.S. (1991). Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 1547–1562.

Gordon, J., Amini, S., and White, M.K. (2013). General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1078, 1–8.

Graf, J., Ogle, R.C., Robey, F.A., Sasaki, M., Martin, G.R., Yamada, Y., and Kleinman, H.K. (1987). A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds to 67000 laminin receptor. *Biochemistry* 26, 6896–6900.

Gross, G.W. (1979). Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 26, 273–279.

Gstraunthaler, G., and Lindl, T. (2013). *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7.Auflage. Springer Spektrum.

Gui, L., and Ren, C.L. (2008). Temperature measurement in microfluidic chips using photobleaching of a fluorescent thin film. *Appl. Phys. Lett.* 92, 024102.

Guijt, R.M., Dodge, A., van Dedem, G.W.K., de Rooij, N.F., and Verpoorte, E. (2003). Chemical and physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices. *Lab. Chip* 3, 1.

Hammarback, J.A., and Letourneau, P.C. (1986). Neurite extension across regions of low cell-substratum adhesivity: Implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding. *Dev. Biol.* 117, 655–662.

Han, S., Kim, C., and Kwon, D. (1997). Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol. *Polymer* 38, 317–323.

Hardelauf, H., Sissaiske, J., Ali Taghipour-Anvari, A., Jacob, P., Drabiniok, E., Marggraf, U., Frimat, J.-P., G. Hengstler, J., Neyer, A., Thriel, C. van, et al. (2011). High fidelity neuronal networks formed by plasma masking with a bilayer membrane: analysis of neurodegenerative and neuroprotective processes. *Lab. Chip* 11, 2763–2771.

Hasan, M., Berdichevsky, Y., Hasan, M.F., and Berdichevsky, Y. (2016). Neural Circuits on a Chip. *Micromachines* 7, 157.

Hersel, U., Dahmen, C., and Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385–4415.

Honegger, T., Scott, M.A., Yanik, M.F., and Voldman, J. (2013). Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks. *Lab. Chip* 13, 589–598.

Hsieh, T.-M., Luo, C.-H., Huang, F.-C., Wang, J.-H., Chien, L.-J., and Lee, G.-B. (2008). Enhancement of thermal uniformity for a microthermal cycler and its application for polymerase chain reaction. *Sens. Actuators B Chem.* 130, 848–856.

Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 305, 86–98.

- Hyung Lee, J. (2018). Optogenetic FMRI and the Investigation of Global Brain Circuit Mechanisms. *Biophys. J.* *114*, 401a.
- Ikegaya, Y., Itsukaichi-Nishida, Y., Ishihara, M., Tanaka, D., and Matsuki, N. (2000). Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 μm . *Neuroscience* *97*, 215–217.
- Incropera F.P., Lavine A.S., Bergman T.L., DeWitt D.P. (2011) *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*. 7th edition, John Wiley & Sons, Hoboken.
- Issadore, D., Humphry, K.J., Brown, K.A., Sandberg, L., Weitz, D., and Westervelt, R.M. (2009). Microwave Dielectric Heating of Drops in Microfluidic Devices†. *Lab. Chip* *9*, 1701–1706.
- Jaccard, N., Griffin, L.D., Keser, A., Macown, R.J., Super, A., Veraitch, F.S., and Szita, N. (2014). Automated Method for the Rapid and Precise Estimation of Adherent Cell Culture Characteristics from Phase Contrast Microscopy Images. *Biotechnol. Bioeng.* *111*, 504–517.
- Jeon, S.I., Lee, J.H., Andrade, J.D., and De Gennes, P.G. (1991). Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* *142*, 149–158.
- Jiang, H., and Rao, Y. (2005). Axon formation: fate versus growth. *Nat. Neurosci.* *8*, 544–546.
- Jiao, Z., Nguyen, N.-T., Huang, X., and Ang, Y.Z. (2007). Reciprocating thermocapillary plug motion in an externally heated capillary. *Microfluid. Nanofluidics* *3*, 39–46.
- John H. Lienhard IV and John H. Lienhard V (2008). *A Heat Transfer Textbook*, 3rd edition. Cambridge, Mass: Phlogiston Press.
- Jucker, M., Kleinman, H.K., and Ingram, D.K. (1991). Fetal rat septal cells adhere to and extend processes on basement membrane, laminin, and a synthetic peptide from the laminin A chain sequence. *J. Neurosci. Res.* *28*, 507–517.
- Jung, W., Kim, Y.W., Yim, D., and Yoo, J.Y. (2011). Microscale surface thermometry using SU8/Rhodamine-B thin layer. *Sens. Actuators Phys.* *171*, 228–232.
- Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* *1*, 2406–2415.
- Kanagasabapathi, T.T., Massobrio, P., Barone, R.A., Tedesco, M., Sergio Martinoia, Wadman, W.J., and Decré, M.M.J. (2012). Functional connectivity and dynamics of cortical–thalamic networks co-cultured in a dual compartment device. *J. Neural Eng.* *9*, 036010.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., and Hudspeth, A.J. (2012). *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill Education Ltd.
- Kawabe, H., Mitkovski, M., Kaeser, P.S., Hirrlinger, J., Opazo, F., Nestvogel, D., Kalla, S., Fejtova, A., Verrier, S.E., Bungers, S.R., et al. (2017). ELKS1 localizes the synaptic vesicle priming protein bMunc13-2 to a specific subset of active zones. *J. Cell Biol.* *216*, 1143–1161.

- Kessel, S., Schmidt, S., Müller, R., Wischerhoff, E., Laschewsky, A., Lutz, J.-F., Uhlig, K., Lankenau, A., Duschl, C., and Fery, A. (2010). Thermoresponsive PEG-based polymer layers: surface characterization with AFM force measurements. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 26, 3462–3467.
- Khan, M.R.R., and Kang, S.-W. (2016). Highly Sensitive Temperature Sensors Based on Fiber-Optic PWM and Capacitance Variation Using Thermochromic Sensing Membrane. *Sensors* 16, 1064.
- Khan, S., and Newaz, G. (2010). A comprehensive review of surface modification for neural cell adhesion and patterning. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A, 1209–1224.
- Kleinfeld, D., Kahler, K., and Hockberger, P. (1988). Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *J. Neurosci.* 8, 4098–4120.
- Kovalevich, J., and Langford, D. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1078, 9–21.
- Kuball, M., Pomeroy, J.W., Rajasingam, S., Sarua, A., Uren, M.J., Martin, T., Lell, A., and Härle, V. (2005). High spatial resolution micro-Raman temperature measurements of nitride devices (FETs and light emitters). *Phys. Status Solidi A* 202, 824–831.
- Kubin, R.F., and Fletcher, A.N. (1982). Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J. Lumin.* 27, 455–462.
- Lao, A.I.K., Lee, T.M.H., Hsing, I.-M., and Ip, N.Y. (2000). Precise temperature control of microfluidic chamber for gas and liquid phase reactions. *Sens. Actuators Phys.* 84, 11–17.
- Lei, W.-L., Xing, S.-G., Deng, C.-Y., Ju, X.-C., Jiang, X.-Y., and Luo, Z.-G. (2012). Laminin/ β 1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res.* 22, 954–972.
- Letourneau, P.C. (1975a). Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Dev. Biol.* 44, 77–91.
- Letourneau, P.C. (1975b). Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44, 92–101.
- Lom, B., Healy, K.E., and Hockberger, P.E. (1993). A versatile technique for patterning biomolecules onto glass coverslips. *J. Neurosci. Methods* 50, 385–397.
- Lou, J., Finegan, T.M., Mohsen, P., Hatton, T.A., and Laibinis, P.E. (2011). Fluorescence-Based Thermometry: Principles and Applications. *Rev. Anal. Chem.* 18, 235–284.
- Löw, P., Kim, B., Takama, N., and Bergaud, C. (2008). High-Spatial-Resolution Surface-Temperature Mapping Using Fluorescent Thermometry. *Small* 4, 908–914.
- Lutz, J.-F., Weichenhan, K., Akdemir, Ö., and Hoth, A. (2007). About the Phase Transitions in Aqueous Solutions of Thermoresponsive Copolymers and Hydrogels Based on 2-(2-methoxyethoxy)ethyl Methacrylate and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate. *Macromolecules* 40, 2503–2508.

- Maher, M., Pine, J., Wright, J., and Tai, Y.-C. (1999). The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *J. Neurosci. Methods* *87*, 45–56.
- Mano, J.F. (2008). Stimuli-Responsive Polymeric Systems for Biomedical Applications. *Adv. Eng. Mater.* *10*, 515–527.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Matsuzawa, M., Potember, R.S., Stenger, D.A., and Krauthamer, V. (1993). Containment and growth of neuroblastoma cells on chemically patterned substrates. *J. Neurosci. Methods* *50*, 253–260.
- Meberg, P.J., and Miller, M.W. (2003). Culturing hippocampal and cortical neurons. *Methods Cell Biol.* *71*, 111–127.
- Mertoglu, M., Garnier, S., Laschewsky, A., Skrabania, K., and Storsberg, J. (2005). Stimuli responsive amphiphilic block copolymers for aqueous media synthesised via reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation (RAFT). *Polymer* *46*, 7726–7740.
- Merz, M., and Fromherz, P. (2005). Silicon Chip Interfaced with a Geometrically Defined Net of Snail Neurons. *Adv. Funct. Mater.* *15*, 739–744.
- Millet, L.J., and Gillette, M.U. (2012a). Over a Century of Neuron Culture: From the Hanging Drop to Microfluidic Devices. *Yale J. Biol. Med.* *85*, 501–521.
- Millet, L.J., and Gillette, M.U. (2012b). New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci.* *35*, 752–761.
- Millet, L.J., Stewart, M.E., Sweedler, J.V., Nuzzo, R.G., and Gillette, M.U. (2007). Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities. *Lab. Chip* *7*, 987.
- Miralles, V., Huerre, A., Malloggi, F., Jullien, M.-C., Miralles, V., Huerre, A., Malloggi, F., and Jullien, M.-C. (2013). A Review of Heating and Temperature Control in Microfluidic Systems: Techniques and Applications. *Diagnostics* *3*, 33–67.
- Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* *4*, E83–E90.
- Moran, M.T., Carroll, W.M., Selezneva, I., Gorelov, A., and Rochev, Y. (2007). Cell growth and detachment from protein-coated PNIPAAm-based copolymers. *J. Biomed. Mater. Res. A* *81A*, 870–876.
- Moreau, D., Lefort, C., Burke, R., Leveque, P., and O'Connor, R.P. (2015). Rhodamine B as an optical thermometer in cells focally exposed to infrared laser light or nanosecond pulsed electric fields. *Biomed. Opt. Express* *6*, 4105–4117.
- Morin, F., Nishimura, N., Griscom, L., LePioufle, B., Fujita, H., Takamura, Y., and Tamiya, E. (2006). Constraining the connectivity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays with microfluidic techniques: A step towards neuron-based functional chips. *Biosens. Bioelectron.* *21*, 1093–1100.

- Moser, E.I., and Andersen, P. (1994). Conserved spatial learning in cooled rats in spite of slowing of dentate field potentials. *J. Neurosci.* *14*, 4458–4466.
- Nagase, K., Yamato, M., Kanazawa, H., and Okano, T. (2018). Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials* *153*, 27–48.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* *260*, 799–802.
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., et al. (2004). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* *351*, 1187–1196.
- Ohishi, T. (2004). Preparation and Properties of Sol-Gel Thin Film Containing Rhodamine B Derivative with Ethoxy Silano Group on Organic Substrate and its Application to Surface-Treatment Thin Film for Display. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* *32*, 281–285.
- Ohki, T., Yamato, M., Murakami, D., Takagi, R., Yang, J., Namiki, H., Okano, T., and Takasaki, K. (2006). Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* *55*, 1704–1710.
- Ohta, A.T., Jamshidi, A., Valley, J.K., Hsu, H.-Y., and Wu, M.C. (2007). Optically actuated thermocapillary movement of gas bubbles on an absorbing substrate. *Appl. Phys. Lett.* *91*, 074103.
- Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., and Sakurai, Y. (1995). Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* *16*, 297–303.
- Onganer, Y., and Quitevis, E.L. (1992). Effect of solvent on nonradiative processes in xanthene dyes: pyronin B in alcohols and alcohol-water mixtures. *J. Phys. Chem.* *96*, 7996–8001.
- Pan, L., Alagapan, S., Franca, E., Brewer, G.J., and Wheeler, B.C. (2011). Propagation of action potential activity in a predefined microtunnel neural network. *J. Neural Eng.* *8*, 046031.
- Pan, L., Alagapan, S., Franca, E., Leondopulos, S.S., DeMarse, T.B., Brewer, G.J., and Wheeler, B.C. (2015). An in vitro method to manipulate the direction and functional strength between neural populations. *Front. Neural Circuits* *9*.
- Park, J.W., Vahidi, B., Taylor, A.M., Rhee, S.W., and Jeon, N.L. (2006). Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nat. Protoc.* *1*, 2128–2136.
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab. Chip* *11*, 3663.
- Pfisterer, F. (2017). Untersuchungen zur Temperaturentbreitung auf einer mit Mikroelektroden beheizten Biochipoberfläche. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin

- Pine, J. (1980). Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. Neurosci. Methods* **2**, 19–31.
- Pomeroy, J.W., Kuball, M., Wallis, D.J., Keir, A.M., Hilton, K.P., Balmer, R.S., Uren, M.J., Martin, T., and Heard, P.J. (2005). Thermal mapping of defects in AlGaNGaN heterostructure field-effect transistors using micro-Raman spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 103508.
- Raimondo, J.V., Heinemann, U., de Curtis, M., Goodkin, H.P., Dulla, C.G., Janigro, D., Ikeda, A., Lin, C.-C.K., Jiruska, P., Galanopoulou, A.S., et al. (2017). Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK1-WG4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE. *Epilepsia* **58**, 40–52.
- Renault, R., Sukenik, N., Descroix, S., Malaquin, L., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., Bottani, S., Monceau, P., Moses, E., and Vignes, M. (2015). Combining Microfluidics, Optogenetics and Calcium Imaging to Study Neuronal Communication In Vitro. *PLoS ONE* **10**.
- Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., and Villard, C. (2016). Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab. Chip* **16**, 2188–2191.
- Rinklin, P., Afanasenkau, D., Wiegand, S., Offenhäusser, A., and Wolfrum, B. (2015). Inducing microscopic thermal lesions for the dissection of functional cell networks on a chip. *Lab. Chip* **15**, 237–243.
- Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., and Perry, C.C. (2007). Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1263–1277.
- Robertus, J., Browne, W.R., and Feringa, B.L. (2010). Dynamic control over cell adhesive properties using molecular-based surface engineering strategies. *Chem Soc Rev* **39**, 354–378.
- Ron, H., Matlis, S., and Rubinstein, I. (1998). Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 2. Gold Surface Oxidative Pretreatment, Monolayer Properties, and Depression Formation. *Langmuir* **14**, 1116–1121.
- Ross, D., Gaitan, M., and Locascio, L.E. (2001). Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye. *Anal. Chem.* **73**, 4117–4123.
- Ross, R.A., Spengler, B.A., and Biedler, J.L. (1983). Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 741–747.
- Rossi, C., Scheid, E., and Estève, D. (1997). Theoretical and experimental study of silicon micromachined microheater with dielectric stacked membranes. *Sens. Actuators Phys.* **63**, 183–189.
- Roth, S., Bugnicourt, G., Bisbal, M., Gory-Fauré, S., Brocard, J., and Villard, C. (2012). Neuronal Architectures with Axo-dendritic Polarity above Silicon Nanowires. *Small* **8**, 671–675.

- Roxworthy, B.J., Bhuiya, A.M., Vanka, S.P., and Jr, K.C.T. (2014). Understanding and controlling plasmon-induced convection. *Nat. Commun.* 5, 3173.
- Roy, D., Brooks, W.L.A., and Sumerlin, B.S. (2013). New directions in thermoresponsive polymers. *Chem. Soc. Rev.* 42, 7214.
- Sakakibara, J., Hishida, K., and Maeda, M. (1993). Measurements of thermally stratified pipe flow using image-processing techniques. *Exp. Fluids* 16, 82–96.
- Samy, R., Glawdel, T., and Ren, C.L. (2008). Method for microfluidic whole-chip temperature measurement using thin-film poly(dimethylsiloxane)/rhodamine B. *Anal. Chem.* 80, 369–375.
- Saneinejad, S., and Shoichet, M.S. (1998). Patterned glass surfaces direct cell adhesion and process outgrowth of primary neurons of the central nervous system. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 13–19.
- Santillo, S., Moriello, A.S., and Maio, V.D. (2014). Electrophysiological variability in the SH-SY5Y cellular line. *Gen. Physiol. Biophys.* 33, 121–129.
- Sawa, Y., Miyagawa, S., Sakaguchi, T., Fujita, T., Matsuyama, A., Saito, A., Shimizu, T., and Okano, T. (2012). Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg. Today* 42, 181–184.
- Scott, M.A., Wissner-Gross, Z.D., and Yanik, M.F. (2012). Ultra-Rapid Laser Protein Micropatterning: Screening For Directed Polarization of Single Neurons. *Lab. Chip* 12, 2265–2276.
- Seisyan, R.P. (2011). Nanolithography in microelectronics: A review. *Tech. Phys.* 56, 1061–1073.
- Sekine, H., Shimizu, T., Sakaguchi, K., Dobashi, I., Wada, M., Yamato, M., Kobayashi, E., Umezumi, M., and Okano, T. (2013). In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat. Commun.* 4, 1399.
- Selva, B., Mary, P., and Jullien, M.-C. (2010). Integration of a uniform and rapid heating source into microfluidic systems. *Microfluid. Nanofluidics* 8, 755–765.
- Shah, J.J., Sundaresan, S.G., Geist, J., Reyes, D.R., Booth, J.C., Rao, M.V., and Gaitan, M. (2007). Microwave dielectric heating of fluids in an integrated microfluidic device. *J. Micromechanics Microengineering* 17, 2224–2230.
- Shanks, N., Greek, R., and Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philos. Ethics Humanit. Med.* PEHM 4, 2.
- Shaw, G., Banker, G.A., and Weber, K. (1985). An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur. J. Cell Biol.* 39, 205–216.
- Shi, L., and Majumdar, A. (2001). RECENT DEVELOPMENTS IN MICRO AND NANOSCALE THERMOMETRY. *Microscale Thermophys. Eng.* 5, 251–265.

- Shibasaki, K., Suzuki, M., Mizuno, A., and Tominaga, M. (2007). Effects of Body Temperature on Neural Activity in the Hippocampus: Regulation of Resting Membrane Potentials by Transient Receptor Potential Vanilloid 4. *J. Neurosci.* 27, 1566–1575.
- Shu, W., Everett, W.N., Zhang, Q.X., Liu, M.H., Trigg, A., Ma, Y., Spearing, S.M., Wang, S., Sue, H.-, and Moran, P.M. (2005). Microheated substrates for patterning cells and controlling development. *J. Microelectromechanical Syst.* 14, 924–934.
- Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G.P., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (1994). Engineering cell shape and function. *Science* 264, 696–698.
- Soleilhac, A., Girod, M., Dugourd, P., Burdin, B., Parvole, J., Dugas, P.-Y., Bayard, F., Lacôte, E., Bourgeat-Lami, E., and Antoine, R. (2016). Temperature Response of Rhodamine B-Doped Latex Particles. From Solution to Single Particles. *Langmuir* 32, 4052–4058.
- Spira, M.E., and Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat. Nanotechnol.* 8, 83–94.
- Staii, C., Viesselmann, C., Ballweg, J., Williams, J.C., Dent, E.W., Coppersmith, S.N., and Eriksson, M.A. (2011). Distance Dependence of Neuronal Growth on Nanopatterned Gold Surfaces. *Langmuir* 27, 233–239.
- Stenger, D.A., Hickman, J.J., Bateman, K.E., Ravenscroft, M.S., Ma, W., Pancrazio, J.J., Shaffer, K., Schaffner, A.E., Cribbs, D.H., and Cotman, C.W. (1998). Microlithographic determination of axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Methods* 82, 167–173.
- Suzuki, I., Sugio, Y., Moriguchi, H., Jimbo, Y., and Yasuda, K. (2004). Modification of a neuronal network direction using stepwise photo-thermal etching of an agarose architecture. *J. Nanobiotechnology* 2, 7.
- Suzuki, I., Sugio, Y., Jimbo, Y., and Yasuda, K. (2005). Stepwise pattern modification of neuronal network in photo-thermally-etched agarose architecture on multi-electrode array chip for individual-cell-based electrophysiological measurement. *Lab. Chip* 5, 241.
- Tahirovic, S., and Bradke, F. (2009). Neuronal Polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Takahashi, H., Shimizu, T., Nakayama, M., Yamato, M., and Okano, T. (2015). Anisotropic Cellular Network Formation in Engineered Muscle Tissue through the Self-Organization of Neurons and Endothelial Cells. *Adv. Healthc. Mater.* 4, 356–360.
- Takahashi, H., Itoga, K., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T. (2016). Human Neural Tissue Construct Fabrication Based on Scaffold-Free Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 1931–1938.
- Taylor, A.M., Rhee, S.W., Tu, C.H., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L. (2003). Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 19, 1551–1556.
- Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599–605.

Thomas, C.A., Springer, P.A., Loeb, G.E., Berwald-Netter, Y., and Okun, L.M. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* **74**, 61–66.

Tomba, C., Braïni, C., Wu, B., Gov, N.S., and Villard, C. (2014). Tuning the adhesive geometry of neurons: length and polarity control. *Soft Matter* **10**, 2381.

Tsuda, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., Nakao, A., Sakurai, Y., Umezu, M., and Okano, T. (2005). The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets. *Biomaterials* **26**, 1885–1893.

Uhlig, K. (2014). Untersuchungen PEG-basierter thermo-responsiver Polymeroberflächen zur Steuerung der Zelladhäsion. Dissertation Universität Potsdam.

Uhlig, K., Wischerhoff, E., Lutz, J.-F., Laschewsky, A., Jaeger, M.S., Lankenau, A., and Duschl, C. (2010). Monitoring cell detachment on PEG-based thermoresponsive surfaces using TIRF microscopy. *Soft Matter* **6**, 4262.

Uhlig, K., Boysen, B., Lankenau, A., Jaeger, M., Wischerhoff, E., Lutz, J.-F., Laschewsky, A., and Duschl, C. (2012). On the influence of the architecture of poly(ethylene glycol)-based thermoresponsive polymers on cell adhesion. *Biomicrofluidics* **6**.

Uhlig, K., Boerner, H.G., Wischerhoff, E., Lutz, J.-F., Jaeger, M.S., Laschewsky, A., and Duschl, C. (2014). On the Interaction of Adherent Cells with Thermoresponsive Polymer Coatings. *Polymers* **6**, 1164–1177.

Uhlig, K., Wegener, T., He, J., Zeiser, M., Bookhold, J., Dewald, I., Godino, N., Jaeger, M., Hellweg, T., Fery, A., et al. (2016). Patterned Thermoresponsive Microgel Coatings for Noninvasive Processing of Adherent Cells. *Biomacromolecules* **17**, 1110–1116.

Vasilev, K., Knoll, W., and Kreiter, M. (2004). Fluorescence intensities of chromophores in front of a thin metal film. *J. Chem. Phys.* **120**, 3439–3445.

Velve Casquillas, G., Fu, C., Le Berre, M., Cramer, J., Meance, S., Plecis, A., Baigl, D., Greffet, J.-J., Chen, Y., Piel, M., et al. (2011). Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging. *Lab Chip* **11**, 484–489.

Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F., and Stuermer, C.A.O. (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp. Brain Res.* **81**.

Vogt, A.K., Lauer, L., Knoll, W., and Offenhäusser, A. (2003). Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1562–1568.

Vogt, A.K., Stefani, F.D., Best, A., Nelles, G., Yasuda, A., Knoll, W., and Offenhäusser, A. (2004). Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity. *J. Neurosci. Methods* **134**, 191–198.

Vogt, A.K., Wrobel, G., Meyer, W., Knoll, W., and Offenhäusser, A. (2005). Synaptic plasticity in micropatterned neuronal networks. *Biomaterials* **26**, 2549–2557.

Vollmer, M., and Möllmann, K.-P. (2017). *Infrared Thermal Imaging: Fundamentals, Research and Applications*. 2nd edition. John Wiley & Sons.

- Wang, J.-H., Chien, L.-J., Hsieh, T.-M., Luo, C.-H., Chou, W.-P., Chen, P.-H., Chen, P.-J., Lee, D.-S., and Lee, G.-B. (2009). A miniaturized quantitative polymerase chain reaction system for DNA amplification and detection. *Sens. Actuators B Chem.* *141*, 329–337.
- Wang, X., Wolfbeis, O.S., and Meier, R.J. (2013). Luminescent probes and sensors for temperature. *Chem. Soc. Rev.* *42*, 7834.
- Wheeler, B.C., and Brewer, G.J. (2010). Designing Neural Networks in Culture. *Proc. IEEE Inst. Electr. Electron. Eng.* *98*, 398–406.
- Wischerhoff, E., Uhlig, K., Lankenau, A., Börner, H.G., Laschewsky, A., Duschl, C., and Lutz, J.-F. (2008). Controlled Cell Adhesion on PEG-Based Switchable Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* *47*, 5666–5668.
- Withers, G.S., James, C.D., Kingman, C.E., Craighead, H.G., and Banker, G.A. (2006). Effects of substrate geometry on growth cone behavior and axon branching. *J. Neurobiol.* *66*, 1183–1194.
- Wood, J.G., Mirra, S.S., Pollock, N.J., and Binder, L.I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 4040–4043.
- Wu, D., Bacaj, T., Morishita, W., Goswami, D., Arendt, K.L., Xu, W., Chen, L., Malenka, R.C., and Südhof, T.C. (2017). Postsynaptic Synaptotagmins Mediate AMPA Receptor Exocytosis During LTP. *Nature* *544*, 316–321.
- Wu, J., Cao, W., Wen, W., Chang, D.C., and Sheng, P. (2009). Polydimethylsiloxane microfluidic chip with integrated microheater and thermal sensor. *Biomicrofluidics* *3*.
- Wyart, C., Ybert, C., Bourdieu, L., Herr, C., Prinz, C., and Chatenay, D. (2002). Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *J. Neurosci. Methods* *117*, 123–131.
- Xia, Y., and Whitesides, G.M. (1998). Soft Lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* *28*, 153–184.
- Xue, Y., Li, X., Li, H., and Zhang, W. (2014). Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *Nat. Commun.* *5*, 4348.
- Yamada, Y., and Kleinman, H.K. (1992). Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 819–823.
- Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., and Sakurai, Y. (1990). Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* *11*, 571–576.
- Yamamoto, H., Okano, K., Demura, T., Hosokawa, Y., Masuhara, H., Tanii, T., and Nakamura, S. (2011). In-situ guidance of individual neuronal processes by wet femtosecond-laser processing of self-assembled monolayers. *Appl. Phys. Lett.* *99*, 163701.
- Yamamoto, H., Demura, T., Morita, M., Banker, G.A., Tanii, T., and Nakamura, S. (2012). Differential neurite outgrowth is required for axon specification by cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* *123*, 904–910.

- Yamamoto, H., Matsumura, R., Takaoki, H., Katsurabayashi, S., Hirano-Iwata, A., and Niwano, M. (2016). Unidirectional signal propagation in primary neurons micropatterned at a single-cell resolution. *Appl. Phys. Lett.* *109*.
- Yang, H., Choi, C.A., Chung, K.H., Jun, C.-H., and Kim, Y.T. (2004). An Independent, Temperature-Controllable Microelectrode Array. *Anal. Chem.* *76*, 1537–1543.
- Yang, I.H., Co, C.C., and Ho, C.-C. (2005). Alteration of human neuroblastoma cell morphology and neurite extension with micropatterns. *Biomaterials* *26*, 6599–6609.
- Yang, J., Liu, Y., Rauch, C.B., Stevens, R.L., Liu, R.H., Lenigk, R., and Grodzinski, P. (2002). High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors. *Lab. Chip* *2*, 179–187.
- Yang, N., Ng, Y.H., Pang, Z.P., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2011). Induced Neuronal (iN) Cells: How to Make and Define a Neuron. *Cell Stem Cell* *9*, 517–525.
- Yavin, E., and Yavin, Z. (1974). Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J. Cell Biol.* *62*, 540–546.
- Yin, Z., Zhang, J., Jiang, L.-P., and Zhu, J.-J. (2009). Thermosensitive Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide) and Release of Incorporated Hemoglobin. *J. Phys. Chem. C* *113*, 16104–16109.
- Yuan, M., Zhan, S., Zhou, X., Liu, Y., Feng, L., Lin, Y., Zhang, Z., and Hu, J. (2008). A Method for Removing Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* *24*, 8707–8710.
- Zaretabar, M., Asadian, H., and Ganji, D.D. (2018). Numerical simulation of heat sink cooling in the mainboard chip of a computer with temperature dependent thermal conductivity. *Appl. Therm. Eng.* *130*, 1450–1459.
- Zeck, G., and Fromherz, P. (2001). Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10457–10462.
- Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., et al. (2013). Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron* *78*, 785–798.

9 Anhang

Quantifizierung der Zellzahl in den Adhäsionsfeldern

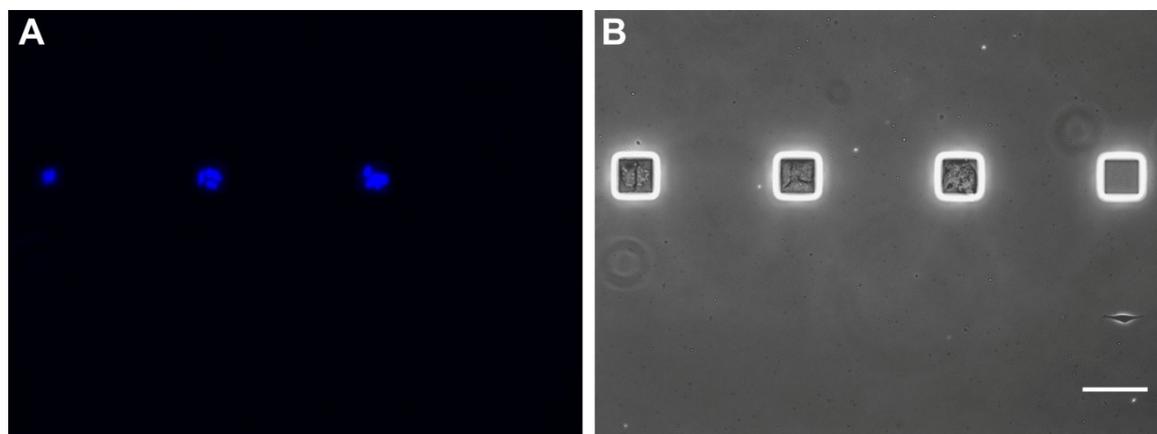


Abb. 9-1 Quantifizierung der durchschnittlichen Zahl an Zellen in den Adhäsionsfeldern. Zellen wurden auf die thermoresponsiven Zellkultursubstrate nach Design 2 ausgesät und für 5 Tage bei 33 °C kultiviert. (A) Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit NucBlue gefärbt und die Anzahl an Zellen in den Feldern manuell gezählt. (B) Diese Zellzahl wurde durch die Anzahl an besetzten Adhäsionsfeldern in dem jeweiligen Bild geteilt. Aus der Evaluierung von 18 Bildern ergab sich eine durchschnittliche Zellzahl von 6,0 Zellen pro Adhäsionsfeld. Maßbalken, 100 µm.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1 Frühe Beispiele der chemischen Oberflächenmodifikation für die Eingrenzung neuronaler Zellen in Kultur.....	9
Abb. 3-2 Strukturierte Zellkultursubstrate zur Untersuchung der Polarisierung.	10
Abb. 3-3 Mikrofluidische Zellkulturkammern zur Richtungskontrolle der neuronalen Verbindungen.	11
Abb. 3-4 Direktionale Signaltransmission zwischen einzelnen strukturierten primären Neuronen.....	13
Abb. 4-1 Strukturformel des verwendeten TRPs.....	24
Abb. 4-2 Phasenkontrastbilder von SH-SY5Y-Zellen während der Differenzierung.....	27
Abb. 4-3 Beispielbild aus einer Zählung von Zellen mit Neuriten.	30
Abb. 5-1 Schematische Darstellung und Konzept der mikrostrukturierten thermoresponsiven Substrate.	37
Abb. 5-2 Funktionalität der TRP-Beschichtung vor und nach der Strukturierung von Gold.	38
Abb. 5-3 Besiedlung der TRP-Substrate.....	38
Abb. 5-4 Eingrenzung der Zellen auf TRP-freie Bereiche bei 33 °C und Vergleich der Morphologie von SH-SY5Y-Zellen bei 33 °C und 37 °C.....	39
Abb. 5-5 Begrenzung und induziertes Auswachsen von neuronalen Zellen mit PEG- und TRP-beschichteten Substraten (Design 1).....	41
Abb. 5-6 Dynamisch kontrolliertes Auswachsen der Neuriten und Formation kleiner neuronaler Schaltkreise auf Substraten (Design 2).....	43

Abb. 5-7 Färbung des neuronalen Markers β 3-Tubulin auf den TRP-Substraten.	44
Abb. 5-8 Kontrolliertes Auswachsen von humanen iN auf TRP-Substraten.....	45
Abb. 5-9 Elektrophysiologische Ableitungen der iN auf den TRP-Substraten.	46
Abb. 5-10 Temperaturabhängigkeit der RhB-Fluoreszenzintensität im Trockenen und Flüssigen.....	47
Abb. 5-11 Schematische Darstellung der ITO-Mikroheizelektroden.....	48
Abb. 5-12 Temperaturmessung im Trockenen und im Flüssigen.....	49
Abb. 5-13 Zeitabhängige Temperaturmessungen im Sub-Sekunden- und Stunden- Bereich.....	50
Abb. 5-14 Dicke der Sol-Gel-Schicht und Einfluss auf die Temperaturobreitung.	52
Abb. 5-15 Konzept des lokalen Schaltens des TRPs mit Heizwiderständen.....	53
Abb. 5-16 Anteil des Leistungsverlusts an der Heizelektrode und Einfluss auf die Breite des Temperaturprofils.	53
Abb. 5-17 Einfluss der Wärmeabfuhr auf die Temperaturprofile.	55
Abb. 5-18 Design und Schichtaufbau der Mikroheizchips.....	57
Abb. 5-19 Experimentell gemessene Temperaturverteilung auf den Mikroheizchips.	59
Abb. 5-20 Funktionalität der TRP-Beschichtung bei Wiederverwendung der Goldoberflächen.....	60
Abb. 5-21 Funktionalität der TRP-Beschichtung bei Anwendung verschiedener Reinigungsprotokolle.....	61
Abb. 5-22 Kontaktboard aus PMMA mit Mikroheizchips und Flüssigkeitskammer.....	62
Abb. 5-23 Kammer für Zellkultivierung auf elektrisch angeschlossenen Mikroheizchips.	63
Abb. 5-24 Verlauf der Zelladhäsion neuronaler SH-SY5Y-Zellen auf TRP-Schichten, bei welchen die Peptide YIGSR und RGD koadsorbiert wurden.....	64
Abb. 5-25 Adhäsion und Morphologie von SH-SY5Y-Zellen auf unterschiedlich modifizierten TRP-Beschichtungen.	66
Abb. 5-26 Expression des neuronalen Markers β 3-Tubulin in SH-SY5Y-Zellen auf TRP- Oberflächen und Kontrolloberflächen.	67
Abb. 6-1 Photobleaching von RhB in Sol-Gel-Schichten.	83
Abb. 9-1 Quantifizierung der durchschnittlichen Zahl an Zellen in den Adhäsionsfeldern.	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Hellmanex-Reinigungsprotokoll.....	22
Tabelle 2 Thermophysikalische Eigenschaften der Materialien im Simulationsmodell ...	35
Tabelle 3 Schichtdicken und Funktion der verschiedenen Schichten der Mikroheizchips	57

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomkraftmikroskop (Englisch: atomic force microscope)
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FN	Fibronectin
FKS	Fötale Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IGVAV	Peptidmotiv (Isoleucin-Glycin-Valin-Alanin-Valin)
iN	Induzierte Neurone
ITO	indium tin oxide (Englisch für Indiumzinnoxid)
LN	Laminin
LCST	Lower Critical Solution Temperature (Englisch für Phasenübergangstemperatur)
MEA	Multielektroden-Arrays
MEO2MA	2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylat
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic currents (Englisch für spontane erregende postsynaptische Ströme)
NBA	Neurobasalmedium A
OEG	Oligo(ethylenglycol)
OEGMA	Oligo(ethylenglycol) methacrylat
PBS	phosphate buffered saline (Englisch für Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)
PSA	pressure sensitive adhesive (Englisch für drucksensitive Klebefolie)
RA	retinoic acid (Englisch für Retinsäure)
RGD	Peptidmotiv (Arginin-Glycin-Asparaginsäure)
RhB	Rhodamin B
RT	Raumtemperatur
TRP	Thermoresponsives Polymer
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
2D	Zwei-dimensional
3D	Drei-dimensional

Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel

Behm, L.V.J., Schlenther, I., Petrausch, M., Jorde, F., Godino, N., Pfisterer, F., Duschl, C., and Kirschbaum, M. (2018). A simple approach for the precise measurement of surface temperature distributions on the microscale under dry and liquid conditions based on thin Rhodamine B films. *Sens. Actuators B Chem.* 255, 2023–2031.

Behm L.V.J., Gerike S., Grauel M.K., Uhlig K., Pfisterer F., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M. (2019). Micropatterned thermoresponsive cell culture substrates for dynamically controlling neurite outgrowth and neuronal connectivity in vitro. *ACS Applied Bio Materials* 2, 2853-2861.

Lang, A., Volkamer, A., **Behm, L.**, Röblitz, S., Ehrig, R., Schneider, M., Geris, L., Wichard, J., Buttgereit, F. (2018). *In silico* methods - Computational alternatives to animal testing. *Altex* 35, 124-126.

Konferenzbeiträge (Poster und Vorträge)

Behm L., Gerike S., Pfisterer F., Wysotzki P., Uhlig K., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M.: Micropatterned thermoresponsive cell culture substrate for the temporally and spatially controlled formation of oriented neuronal networks; Federation of European Neuroscience Societies 11th Forum of Neurosciences, FENS 2018, Berlin, Deutschland

Behm L.V.J., Gerike S., Pfisterer F., Wysotzki P., Uhlig K., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M.: Spatio-temporal control of neuronal network formation with micropatterned thermoresponsive cell culture substrates. MEA Meeting 2018 | 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, Deutschland

Behm L., Gerike S., Pfisterer F., Wysotzki P., Uhlig K., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M.: Microstructured thermoresponsive cell culture substrates for the controlled formation of oriented neuronal networks in vitro. European Congresses on Alternatives to Animal Testing, EUSAAT 2018, Linz, Österreich

Behm L., Duschl C. and Kirschbaum M.: Microheated thermoresponsive cell culture substrate for spatiotemporal control of cell growth. European Congresses on Alternatives to Animal Testing, EUSAAT 2015, Linz, Österreich

Behm L., Duschl C. and Kirschbaum M.: Development of a microdevice for controlling synapse orientation between patterned neuronal cells. Berlin Brain Days 2013, International Graduate School "Berlin School of Mind and Brain", Berlin, Deutschland

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die mich bei meiner Fertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mentor Dr. Michael Kirschbaum bedanken: für die Möglichkeit für meine Doktorarbeit an diesem Thema und in seiner jungen und dynamischen Arbeitsgruppe zu arbeiten und vor allem für die Geduld, Offenheit und Hilfsbereitschaft bei allen meinen Fragen und die immer freundliche und inhaltlich exzellente Betreuung bei der Entwicklung der Arbeit. Die Freiheit, die er mir bei der Gestaltung und Durchführung der Forschung – auch mit Rücksicht auf meine Familie – gegeben hat, sind mir von großer Bedeutung.

Ein großer Dank richtet sich auch an meine Betreuer Professor Frank Bier und Professor Roland Lauster für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit am Fraunhofer IZI-BB und im Rahmen der BSRT zu promovieren, sowie für die regelmäßigen Betreuungsgespräche.

Meinem Abteilungsleiter Dr. Claus Duschl möchte ich für die allseitige Unterstützung und Beratung ganz ausdrücklich danken. Die vielen kritischen und konstruktiven Ratschläge in den wöchentlichen Meetings, aber auch die Unterstützung in organisatorischen Belangen waren überaus wertvoll für mich. Auch der gesamten Arbeitsgruppe und Abteilung danke ich für die fruchtbaren Gespräche und Mithilfen bei inhaltlichen und vor allem technischen Fragen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Katja Uhlig für ihre Hilfe bei Fragen zu den TRP, Beate Morgenstern bei Fragen zur Zellkultur und Dr. Neus Godino bei verschiedenen technischen Fragen. Außerdem danke ich Dr. Katharina Grauel für die gemeinsamen Experimente, die mir sehr viel Spaß gemacht haben, und für ihren großartigen Einsatz dabei. Auch bei Philipp Wysotzki und Dr. Werner Baumann von der Universität Rostock möchte ich mich für die gemeinsame Projektarbeit bedanken.

Ich danke den Studenten Ilka Schlenther, Maik Petrausch, Felix Pfisterer, und ganz besonders Susanna Gerike, die ich im Rahmen meiner Arbeit betreute und kennenlernte, für die ergiebige und angenehme Zusammenarbeit. Weiterhin danke ich allen anderen Kollegen am Institut, und insbesondere Christian Gürnth-Marschner, die mir behilflich waren und eine so freundliche Atmosphäre durch Küchengespräche, Beachvolleyball- und Fußballnachmittage oder Betriebsfeste geschaffen haben.

Zuletzt aber hätte ich diese Promotion – zumal mit Kind – ohne meine Familie nicht geschafft. Vor allem meinem Mann Maximilian Schmidt und meiner Mutter Anneliese Behm bin ich unendlich dankbar für die liebevolle und geduldige Unterstützung auf allen Seiten, wie auch meinem Sohn August, der mir so viel Lebensfreude gibt. Meinen Vater, dem ich Ehrgeiz und Disziplin zu verdanken glaube, habe ich immer wieder in Gedanken befragt und gedankt und die Vorstellung, dass er stolz auf mich wäre, hat mir sehr geholfen.