

Analyse von Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen auf neuartigen, magnetisch strukturierten Substraten

Dissertation
zur Erlangung des Grades des

Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II
– Physik und Mechatronik –
der Universität des Saarlandes

von
Dipl. Phys.
Juliane Loichen
geb. Ißle

Saarbrücken
2008

Tag des Kolloquiums: 11.07.2008

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Andreas Schütze

Mitglieder des Prüfungsausschusses:

Erster Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. Uwe Hartmann
Zweiter Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. Albrecht Ott
Dritter Gutachter:	Frau Univ.-Prof. Dr. Christiane Ziegler
Vorsitzender:	Herr Univ.-Prof. Dr. Dr. Karsten Kruse
Wissenschaftlicher Mitarbeiter:	Herr Dr. Andreas Tschöpe



Kurzfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein System zu entwickeln, mittels dessen Zellen in kontrollierbarer Weise über Wechselwirkungen mit strukturierten Oberflächen beeinflussbar sind. Das neu entwickelte System beinhaltet den Vorteil der *in-vitro*-Strukturveränderung durch den Einsatz extern erzeugter Magnetfelder.

Die Vorgehensweise besteht darin, biokompatible Magnetitpartikel der Größenordnung 200nm biologisch zu funktionalisieren und über externe Magnetfelder in Strukturen auf Substraten anzuordnen. Bei Versuchen die Anordnung der Teilchen auf Oberflächen durch rein externe Magnetfelder zu kontrollieren, trat das Problem der Endozytose auf, so dass eine festere Anbindung der Teilchen an das Substrat nötig war.

Yttrium-Eisen-Granatfilme konnten wegen ihrer spezifischen, mittels externer Felder variabler Domänenstruktur als geeignetes Substrat zur Partikelimmobilisierung eingesetzt werden. Die Tatsache, dass die Partikel Änderungen der Domänenkonfiguration folgen, ermöglicht die *in-vitro*-Strukturveränderung des Substrats. Die Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung wurde im Rahmen der Magnetostatik theoretisch behandelt.

Zusätzlich konnten Methoden entwickelt werden, die eine örtlich kontrollierte Deposition der Partikel unterschiedlicher Geometrie im Bereich von $10\mu\text{m} - 50\mu\text{m}$ erlauben. Die Entwicklung einer computergesteuerten Klimakammer mit einer Spulenvorrichtung zur Erzeugung magnetischer Felder erlaubt zudem das dynamische Studieren der Zellen über mehrere Tage hinweg. Unter bestimmten Struktureinflüssen zeigen die Zellen anisotropes Wachstum. Zur Untersuchung dieses speziellen Verhaltens auf unterschiedlichen Strukturen, sowohl auf statischen als auch auf dynamischen, wurden Experimente durchgeführt und im Hinblick auf gezielte Zellkontaktierung ausgewertet. Verschiedene Aspekte der Zelladhäsion werden diskutiert, um das Zellverhalten theoretisch erklären zu können, so dass letztlich Aussagen über Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen, die durch die Substratstruktur bestimmt werden, getroffen werden.

Abstract

The main goal of the present work was the development of a setup which allows for controlled influencing of cells via surface-cell-interaction. The major advantage of the developed system is that structural changes by means of external magnetic fields are possible *in vitro*.

The principle consists in the biofunctionalization of biocompatible magnetite nanoparticles of a diameter of $200nm$ and their specific arrangement on substrates under the influence of external fields. The problem of endocytosis occurred in experiments, where the particle arrangement on the substrate was solely controlled by an external magnetic field. Thus a stronger immobilization of the particles on the substrate is needed.

The specific and in external magnetic fields highly variable domain structure of magnetic yttrium-iron garnet films allows for appropriate particle immobilization. The immobilized particles follow the changing domains because of their magnetic interaction with the field gradients at the domain walls. This opens the possibility of *in vitro* structural modifications of the substrate. The particle-surface interaction is treated on a magnetostatic level theoretically.

Additional methods which enable a spatially controlable particle deposition in areas of different geometries in the range of $10\mu m - 50\mu m$ which is comparable to the size of cells, were developed. The construction of a computer-controlled climate chamber with a coil system for a magnetic environment and a video setup permits insight into the cell behavior over several days. Depending on specific structural influences, the cells show anisotropic growth. Investigations on this particular cell behavior on static as well as on dynamic substrates have been performed and analyzed with respect to controlled contacting of cells. Different aspects of cell adhesion are explored for theoretically explaining the cell behavior on diverse substrate structures. Conclusions about cell-surface-interactions caused by the substrate structures are drawn.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Magnetismus	4
2.1.1	Energieminimierung	4
2.1.2	Bildung von Domänen und Domänenwände	9
2.1.3	Magnetisches Verhalten von Kleinstteilchen	11
2.2	Zellmechanik	13
2.2.1	Endozytose	13
2.2.2	Adhäsion	15
3	Experimenteller Ansatz	18
3.1	Materialien	18
3.1.1	Granatfilme	18
3.1.2	Magnetische Teilchen	23
3.2	Spezielle Verfahren	27
3.2.1	Magnetische Kraftmikroskopie	27
3.2.2	Magnetometrie	33
3.2.3	Faradaymikroskopie	36
3.3	Präparation	40
3.3.1	Zellkultur	40
3.3.2	Partikelfunktionalisierung	40
3.3.3	Histologische und immunchemische Färbungen	42
3.3.4	Stempeltechniken	45
4	Ergebnisse und Diskussion der Substratentwicklung	51
4.1	Aufbau Faradaymikroskop	51
4.1.1	Magnetooptik	52
4.1.2	Kulturkammer	53
4.1.3	Magnetfelderzeugung und Steuerung	55
4.2	Substrat	57

4.2.1	Globale Eigenschaften	57
4.2.2	Domänen	61
4.3	Partikel	64
4.3.1	Morphologie	64
4.3.2	Magnetisches Verhalten	66
4.3.3	Funktionalisierung	73
4.4	Immobilisation der Partikel	75
4.4.1	Verwendung magnetischer Granatfilme als Substrat	75
4.4.2	Charakterisierung der magnetischen Wechselwirkung	76
4.4.3	Laterale Mobilität trotz Immobilisierung	89
4.5	Substratstrukturierung	91
4.5.1	Spezifische Eigenschaften geeigneter Stempel	92
4.5.2	Mikrofluidischer Ansatz	93
4.5.3	Stempeltechnik	96
4.5.4	Allgemeine Betrachtungen	98
5	Ergebnisse und Diskussion unterschiedlichen Zellverhaltens	102
5.1	Wechselwirkung von Zellen mit magnetischen Partikeln	102
5.1.1	Endozytose	103
5.1.2	Transportmechanismen der Partikelaufnahme	107
5.2	Wechselwirkung von Zellen mit dem Substrat	114
5.2.1	Biokompatibilität	115
5.2.2	Anisotropes Zellwachstum	122
5.2.3	Zelladhäsion in Bezug auf anisotropes Wachstum	129
6	Zusammenfassung und Ausblick	149
	Danksagung	152
	Publikationen	153
	Literaturverzeichnis	154

Kapitel 1

Einleitung

Die gesamte Arbeit entstand im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten CellPROM-Projektes, das innerhalb der vergangenen vier Jahre Erkenntnisse im Bereich der Stammzellforschung gewinnen konnte. Während einerseits technische Aspekte der Einzelzellkontrolle im Fokus standen, war die Erforschung nanostrukturierter, biokompatibler Materialien zur Beeinflussung nicht vollständig differenzierter Zellen, ein weiterer Forschungsschwerpunkt.

Mit zunehmendem Interesse wird in dem Bereich des „Tissue Engineering“ geforscht [1]. Die Leitidee dahinter birgt den Wunsch, in Zukunft in der Lage zu sein, Krankheiten von Lebewesen dadurch zu heilen, dass gesundes Gewebe außerhalb des Gesamtorganismus hergestellt wird und anschließend gezielt zur Heilung wieder in den Körper eingebracht wird. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung stellt die Stammzellforschung dar. Dabei wird versucht, Zellen, die weitestgehend ohne besondere Spezialisierung bezüglich ihrer Funktion vorliegen, mittels äußerer Einflüsse zu differenzieren, das heißt sie zu einem bestimmten Verhalten zu bringen, sei es die Expression verschiedener Proteine oder ein gezieltes Zusammenspiel mit Nachbarzellen. Diese äußeren Einflüsse bestehen in der Regel in der Zugabe biochemisch aktiver Substanzen zum Kulturmedium. Verschiedene Signalkaskaden werden in der Zelle ausgelöst. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder die Zelle nimmt den Stoff auf und dieser wird im Inneren der Zelle aktiv, indem er mit anderen Stoffen reagiert oder ein reiner Kontakt zur Zellmembran ohne Internalisierung reicht aus, um über Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in der Zelle eine Signalkaskade hervorzurufen.

Generell will man alternative Wege besitzen, die gezieltere Beeinflussung einzelner Zellen zu ermöglichen. Dazu ist es nötig Kontrolle darüber zu erhalten, zu welchem Zeitpunkt eine Zelle in welcher Konzentration oder Stärke ein Signal erhält. Die Idee, die gute Kombinationsmöglichkeiten mit Einzelzellkontrolle verspricht, ist die Nutzung biofunktionalisierter Substrate, gepaart mit anderen denkbaren Einflüssen, wie Topographie- oder Strukturinformationen. Das bedeutet, dass Substrate entwickelt werden sollen, die Signale enthalten, die im Kontakt zu einer Zelle diese differenzieren, ohne aktiv in den Stoffwechselkreislauf aufgenommen werden zu müssen. Dieser Ansatz beinhaltet den Vorteil, dass sehr genau zu kontrollieren ist, wie und wann welche Zelle die nötigen Informationen erhält. Neben dem biologischen Teil des Projektes, der sich mit der Identifikation von Differenzierungsfaktoren und deren Auswirkungen auf verschiedene Stammzellen beschäftigt, entstand die vorliegende Arbeit im eher technischen Bereich. Dort sollten

unter anderem Substrate entwickelt werden, deren Strukturen und biochemische Eigenschaften der Zellkontrolle dienen. Eine Herausforderung besteht dabei sicherlich in der ausschließlichen Verwendung biokompatibler Substanzen. Um Einflüsse der topographischen Strukturierung auf Zellen zu studieren, ist es nötig Methoden zu besitzen, die Substratmodifikationen im Mikrobis Nanometerbereich erlauben, da dieses die Größenskala einzelner Zellen oder interessanter Proteine darstellt. Seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass Oberflächeneigenschaften extreme Auswirkungen auf den Zustand von lebenden Zellen besitzen können [2]. Diese gezielt zu nutzen, gepaart mit der Verwendung immobilisierter, biochemischer Signale auf biokompatiblen Substraten, die die Kontaktierung weniger bis einzelner Zellen gewährleistet, birgt neue, extrem vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Innerhalb dieses Kontextes befindet sich die vorliegende Arbeit. Die Idee, die entwickelt und verfolgt wurde, beinhaltet die Biofunktionalisierung von Magnetitnanopartikeln, die auf magnetischen Substraten mittels magnetischer Wechselwirkung in kontrollierbaren Strukturen unterschiedlicher Geometrie angebunden werden und anschließend die Beeinflussung und geometrische Veränderung der Struktur *in vitro* mittels externer Felder, in Abhängigkeit des gewünschten Zellverhaltens. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die gezielte Untersuchung der Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen und deren theoretische Interpretation.

Als Trägermaterial der biochemischen Information bieten sich magnetische Kleinstpartikel aus Magnetit an. Dieses Eisenoxid ist seit langem für seine hohe Biokompatibilität bekannt und wird bereits medizinisch eingesetzt. Durch das magnetische Verhalten kleinster Kristallite im Größenbereich einiger Nanometer, existiert die Möglichkeit, auf die Teilchen in magnetischen, inhomogenen Feldern Kräfte auszuüben und sie örtlich zu lokalisieren. In der Krebstherapie werden beispielsweise zwei Ansätze verfolgt. Einerseits sollen die Partikel, die über reaktive Oberflächengruppen kovalent gekoppelte Medikamente tragen, am Tumorherd lokalisiert werden und dort spezifisch mit den Krebszellen reagieren und diese abtöten. Andererseits kann in diesen Kleinstteilchen mittels hochfrequenter elektromagnetischer Wellen im kHz - MHz -Bereich thermische Energie erzeugt werden, mit der krankhafte Zellen nach Lokalisierung der Teilchen gezielt durch Erhitzung auf ungefähr $45^{\circ}C$ getötet werden. Dieses Verfahren ist allgemein bekannt als Hyperthermie [3, 4]. Eine Besonderheit dieses magnetischen Substrats besteht in dem Vorkommen biogener Formen, das bedeutet, es ist nicht nur unschädlich, sondern wird in manchen Tieren und Einzellern über Biomineralisation hergestellt [5]. Dabei hat Magnetit Anteil an der aktiven Navigation verschiedener Lebewesen mit Hilfe des Erdmagnetfelds [6]. Gerade wegen ihrer weitverbreiteten Anwendung und der bekannten Biokompatibilität bot es sich an, diese Partikel auch im Zusammenhang mit der Substratstrukturierung zu erforschen. Sie verbinden idealer Weise magnetisches Verhalten mit hoher chemischer Modifikationsmöglichkeit in Nanometergröße.

Magnetische Granatfilme (YIG, Yttrium Iron Garnets) sowie im Allgemeinen magnetische Ionenkristalle, wurden in den 60er und 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts unter anderem wegen ihrer magnetischen Eigenschaften und potentiellen Anwendung als Speicher und

Datenträger erforscht, die in μm -Strukturen Bits speichern können [7]. Die Gruppe der Seltene-Erden-Granate wurde 1953 wegen ihres ferrimagnetischen Verhaltens entdeckt [8]. Als allerdings Massenspeicher durch die sich schnell entwickelnde Halbleiterindustrie den Vorrang erlangten, wurde die Entwicklung und Untersuchung der Granatfilme bezüglich dieser Anwendung eingestellt, so dass sie heute einen exotischen Status in der Wissenschaft besitzen. So werden sie zum Beispiel noch in der Supraleitung eingesetzt [9]. Auf Grund der Fähigkeit ihre magnetische Struktur extrem flexibel äußeren Magnetfeldern anpassen zu können, dienen sie dazu, magnetische Flussverteilungen sichtbar zu machen [10, 11]. Eine andere Anwendung finden sie momentan in der Entwicklung neuer, effektiverer Mikrowellenleiter und werden unter Ausnutzung der gyromagnetischen Resonanz im Mikrowellenbereich als frequenzbestimmende Bauteile eingesetzt [12, 13]. In der vorliegenden Arbeit dienen die einige μm dicken, magnetischen Schichten als Trägermaterial zur Immobilisierung der Nanopartikel. Dabei wird ausgenutzt, dass spezielle Kristallzusammensetzungen eine atomar glatte Oberfläche liefern und zudem eine senkrechte Magnetisierung aufweisen. Der Einsatz magnetischer Granatfilme in biologischen Versuchen ist bis heute nicht in der Literatur erwähnt, außer in den mit dieser Arbeit zusammenhängenden Veröffentlichungen [14–16]. Die Granatfilme zeichnen aus, dass sie nicht zytotoxisch wirken und im Hinblick auf Zellkultur biokompatibel sind. Dies macht sie in diesem Zusammenhang in ihrer Anwendung erst interessant, da es viele potentielle magnetische Materialien gibt, die der Anbindung magnetischer Partikel dienen könnten, diese aber aus toxischen Bestandteilen wie Chrom, Nickel oder Kobalt bestehen.

In diesem Kontext werden neu entwickelte Methoden vorgestellt, mit denen die Nanopartikel in bestimmten Strukturen auf die Filme aufgebracht werden können. Damit lassen sich gezielt Einflüsse der Partikel, des Substrats und spezieller Strukturen auf die Zell-Oberflächen-Wechselwirkung studieren.

Die vorliegende Arbeit ist auf Grund des Projektumfelds sehr interdisziplinär. Während einerseits die neu entwickelte Idee der *in-vitro*-Strukturveränderung und der dazu notwendigen präparatorischen Schritte im Vordergrund steht, so sind andererseits mindestens ebenso wichtige Erkenntnisse in der Erforschung und Beschreibung der Zell-Oberflächen-Wechselwirkung und der darauf basierenden Anwendungsmöglichkeiten des entwickelten Systems zu finden. Da diese Schrift einem möglichst breiten Leserkreis sowohl die Substratentwicklung als auch die Anwendung verdeutlichen soll und zudem als Teil des Projektabschlussberichtes dient, wird explizit Wert darauf gelegt, dass neben den Ergebnissen und Beschreibungen der entwickelten Methodik genügend grundlegende Sachverhalte erläutert werden, die dem interdisziplinären Charakter gerecht werden.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Magnetismus

Ein Großteil der vorliegenden Arbeit basiert auf dem Phänomen des Magnetismus. Um die Strukturbildung der magnetischen Ordnung in den verwendeten Materialien zu verstehen, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die Aspekte gegeben werden, die für bestimmte magnetische Eigenschaften und Konfigurationen bestimmend sind.

2.1.1 Energieminimierung

Es gibt mehrere verschiedene Prinzipien, die bei der Berechnung einer magnetischen Struktur berücksichtigt werden müssen. Diesem Problem kann man sich über die makroskopische Theorie der Domänenbildung einerseits oder über die Theorie des Mikromagnetismus, der die mikromagnetischen Gleichungen zu Grunde liegen, andererseits nähern. Beide gehen vom Prinzip der Energieminimierung aus [17].

Dabei hat sich gezeigt, dass sich die Freie Energie eines magnetischen Systems aus folgenden Anteilen zusammensetzt:

Austauschwechselwirkung

Eine der ersten Ideen, sich der Wechselwirkung magnetischer Teilchen zu nähern, wäre die klassische Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu betrachten. Zwei magnetische Dipole mit den Momenten \mathbf{m}_1 und \mathbf{m}_2 mit Abstand r besitzen die Energie E_D [18]

$$E_D = \frac{\mu_0}{4\pi r^3}(\mathbf{m}_1 \cdot \mathbf{m}_2 - \frac{3}{r^2}(\mathbf{m}_1 \cdot \mathbf{r})(\mathbf{m}_2 \cdot \mathbf{r})). \quad (2.1)$$

Betrachtet man allerdings die damit erzielbaren Energien, kommt man bei zwei angenommenen magnetischen Momenten von jeweils $1\mu_B$ im Abstand von 1\AA im Bereich von $10^{-23}J$. Im Vergleich zur thermischen Energie entspricht dieses gerade $1K$, so dass dieser Effekt bei Raumtemperatur niemals das beobachtete ferromagnetische Verhalten von Materie erklären kann [19]. Durch quantenmechanische Betrachtungen hingegen lassen sich einige magnetische Effekte beschreiben.

Quantenmechanische Austauschwechselwirkung ergibt sich durch reine elektrostatische Wechselwirkung (Coulombwechselwirkung) zweier Atome oder Spins, gepaart mit der Forderung nach Gültigkeit des Pauliprinzips. Elektrostatische Wechselwirkung beruht darauf, dass gleichartige Ladungen Energie benötigen, wenn sie sich nähern. Das Pauliprinzip besagt, dass sich die Gesamtwellenfunktion zweier Teilchen, die sich aus der Ortswellenfunktion und der Spinwellenfunktion zusammensetzt, antisymmetrisch bei Vertauschung verhalten muss, wenn es sich um Elektronen handelt (Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen) [20]. Die Ortswellenfunktion eines Singulettzustandes ist symmetrisch, so dass zwei Elektronen, die sich beide in diesem Zustand befinden, antisymmetrische Spinwellenfunktionen besitzen, also antiparallel koppeln. Umgekehrt verhält es sich beim Triplettzustand, da dieser eine antisymmetrische Ortswellenfunktion besitzt. Vergleicht man nun die beiden Energien der verschiedenen Zustände, erhält man das Austauschintegral J zu

$$J = \frac{1}{2}(E_S - E_T) = \frac{1}{2} \left(\int \psi_S^* \hat{H} \psi_S d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 - \int \psi_T^* \hat{H} \psi_T d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \right), \quad (2.2)$$

wobei E_S und E_T die Eigenwerte des Hamiltonoperators \hat{H} , der ausschließlich elektrostatische Wechselwirkungen enthält, sind und ψ_T , ψ_S die Wellenfunktionen der Triplett- bzw. Singulettzustände mit zugehörigen Ortsvektoren \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 darstellen. Dieses motiviert den Hamiltonoperator des Heisenbergmodells [19]

$$\hat{H}_{Spin} = - \sum_{ij} J_{ij} \hat{\mathbf{S}}_i \cdot \hat{\mathbf{S}}_j, \quad (2.3)$$

wobei $\hat{\mathbf{S}}_i$ und $\hat{\mathbf{S}}_j$ die Spinvektoroperatoren sind, und über mehrere Atomrümpfe mit Spin S summiert wird und für jeden Summanden das Austauschintegral unterschiedliche Werte annehmen kann. Das Vorzeichen des Austauschintegrals bestimmt die bevorzugte Ausrichtung der Spins. Positive Werte des Austauschintegrals führen zur energetischen Bevorzugung des Triplettzustandes, also der parallelen Spinausrichtung, negative zur Bevorzugung der antiparallelen Orientierung. Um diese Formulierung anwenden zu können, muss sicher gestellt sein, dass die magnetischen Atomrümpfe soweit voneinander entfernt sind, dass der Überlapp ihrer Wellenfunktionen sehr klein ist und damit nur Produkte von Paaren von Spinvektoroperatoren berücksichtigt werden müssen.

Der eben beschriebene Austausch wird auch direkter Austausch genannt. Zudem gibt es noch die Möglichkeit des Superaustauschs zweier magnetischer Atomrümpfe über einen dazwischen liegenden unmagnetischen Rumpf (abgeschlossene Elektronenschalen). Dieser Mechanismus basiert darauf, dass die elektronischen Ladungsverteilungen der beiden magnetischen Atomrümpfe zwar nicht selbst, aber die Ladungsverteilungen des dazwischenliegenden nichtmagnetischen Rumpfes überlappen. Dadurch kommt es erneut zur Kopplung auf Grund des Pauliprinzips. Genaueres

wird in Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben.

Weitere Formen der Austauschwechselwirkung findet man in [20] als sogenannter Itineranter Austausch und Indirekter Austausch.

Magnetische Anisotropie

Während der eben beschriebene Mechanismus in Materialien isotrop ist, da es nur auf die Ausrichtung der Spins untereinander ankommt, nicht aber auf die räumliche Ausrichtung selbst, tritt sogenannte magnetische Anisotropie als Folge von räumlicher Abhängigkeit der Magnetisierung auf. So hängt die Energie eines magnetischen Materials von der Richtung der Magnetisierung in Bezug auf die strukturellen Achsen des Materials ab. Hauptsächlich ist diese energetische Betrachtung durch die Spin-Bahn-Wechselwirkungen der einzelnen Atome bestimmt. Unterschieden wird prinzipiell zwischen der Kristallanisotropie, die auftritt, sobald sich Atome zu einem Kristall zusammenfügen und der induzierten Anisotropie, die auf Grund von Abweichungen von der idealen Kristallstruktur entsteht [17]. Rein von der Kristallstruktur her, können kubische, uniaxiale oder orthorhombische Anisotropien auftreten. Die prinzipielle Ursache der Anisotropie ist mittels der sogenannten Kristallfeld-Theorie erklärbar [19, 21]. Sobald ein örtlich lokalisiertes Kristallfeld, das in Wechselwirkung mit einem Atom tritt, von geringer Symmetrie ist und die Elektronen, die für die Bindungen des Atoms zum umgebenden Gitter zuständig sind, eine asymmetrische Ladungsverteilung (kein kugelförmiges Orbital, so dass $L_z \neq 0$, mit L_z als Drehimpuls entlang der z -Achse) besitzen, wechselwirken die Atomorbitale anisotrop mit dem umgebenden Kristallfeld [21]. Dies bedeutet, dass sobald das Atomorbital sphärisch ist, kann es jede Orientierung im Kristallfeld annehmen bzw. soweit keine Kopplung zwischen dem Spin und dem Bahnmoment existiert, kann der Spin jede beliebige Richtung einnehmen. Andererseits, falls die Orbitale einen resultierenden Drehimpuls entlang der z -Achse aufweisen, sind nur einige Orientierungen der Spins energetisch günstig, was je nach Ausrichtung zu unterschiedlichen Energiebeträgen führt. Die z -Achse ist bei dieser Betrachtung definiert über die magnetische Quantenzahl, die die räumliche Orientierung des Orbitals angibt. Kubische Anisotropien sind in erster Ordnung quadratisch von der Magnetisierung abhängig, so dass oft höhere Terme vernachlässigt werden [17]. Die sogenannte Anisotropiekonstante K ist die Konstante, die multipliziert mit den Richtungskosinus der Magnetisierungsrichtung die Anisotropieenergie ergibt. Uniaxiale und kubische Anisotropiekonstanten werden speziell später am verwendeten Material in den Abschnitten 3.1.1.2 und 3.1.2.2 aufgeführt. Anisotropien auf Grund von Kristalldefekten werden nicht weiter betrachtet.

Formanisotropie ist auf Dipol-Dipol-Wechselwirkung magnetischer Momente zurückzuführen und gewinnt an Bedeutung, sofern der betrachtete Kristall in seiner Form von der idealen Kristallstruktur abweicht. Diese Effekte werden allerdings häufig nicht als Bestandteil der magnetischen Anisotropie gesehen, sondern eher innerhalb der weiter unten aufgeführten Streufeldtheorie.

Anisotropiebeiträge führen dazu, dass im Material einige Orientierungen der Magnetisierung günstiger sind, als andere. So erhält man in Kristallen magnetische Vorzugsachsen, sogenannte

„easy axes“ beziehungsweise Achsen, die energetisch ungünstiger sind, wenn die Magnetisierung entlang dieser Achsen liegen soll, sogenannte „hard axes“. Die Anisotropieenergie beschreibt gerade die Energie, die nötig ist, um die Magnetisierung in anderen Richtungen als entlang der Vorzugsachse zu orientieren.

Äußere Felder

Von äußeren Feldern \mathbf{H}_{ext} gehen Energien aus, die den ersten Teil der sogenannten magnetischen Feldenergie darstellen und auch Zeeman-Wechselwirkungen genannt werden. Mathematisch recht einfach zu beschreiben, ergibt sich diese Wechselwirkungsenergie E_{ext} zu [17]

$$E_{ext} = -M \int \mathbf{H}_{ext} \cdot \mathbf{m} dV, \quad (2.4)$$

wobei M den Betrag der Magnetisierung und \mathbf{m} die Magnetisierungsrichtung darstellt. Für homogene Felder hängt diese Energie nur von der globalen beziehungsweise resultierenden Gesamtmagnetisierung und nicht von der intrinsischen Struktur des Materials ab.

Streifeld

Die Streufeldenergie beschreibt den Einfluss von magnetischen Feldern, die vom magnetischen Körper selbst ausgehen. Die Maxwellgleichung, die die Quellen- und Senkenfreiheit von \mathbf{B} fordert,

$$\nabla \mathbf{B} = \mu_0 \nabla (\mathbf{H} + \mathbf{M}) = 0, \quad (2.5)$$

ergibt, dass eine Probe mit bestimmter Magnetisierung ein magnetisches Feld H , das sogenannte Streufeld, an ihrer Oberfläche hervorruft, so dass für die innere und äußere Komponente pro Grenzfläche in unmittelbarer Nähe der Oberfläche gilt

$$H_i = -\frac{M}{2}, \quad H_a = \frac{M}{2}. \quad (2.6)$$

Abbildung 2.1 stellt schematisch das Auftreten solcher magnetischer Felder dar. Für die dargestellte, in y Richtung unendlich ausgedehnte Probe mit zwei Grenzflächen, ergibt sich für das Streufeld an der Oberfläche also gerade

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_i &= \mathbf{H}_{i,1} + \mathbf{H}_{i,2} = -\frac{\mathbf{M}}{2} - \frac{\mathbf{M}}{2} = -\mathbf{M} \\ \mathbf{H}_a &= \mathbf{H}_{a,1} + \mathbf{H}_{a,2} = \frac{\mathbf{M}}{2} + \frac{\mathbf{M}}{2} = \mathbf{M}. \end{aligned} \quad (2.7)$$

Allgemeiner, kann man $\mathbf{H} = -\hat{N}\mathbf{M}$ schreiben, wenn die Magnetisierung nicht senkrecht zur

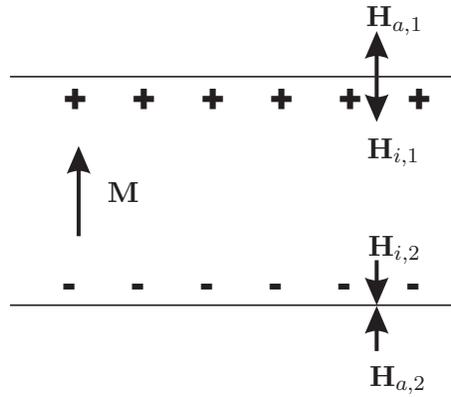


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Auftretens von Streufeldern. Die Probenmagnetisierung ruft magnetische Felder an Substratgrenzflächen auf Grund „magnetischer Ladungen“ hervor.

Oberfläche steht, wobei \hat{N} den sogenannten Entmagnetisierungsfaktor [22] darstellt, der ein Tensor in Abhängigkeit von der Probenform ist. Sind die Oberflächen glatt und \mathbf{M} senkrecht zur Oberfläche, ist $\hat{N} = \hat{1} = 1$. Für eine Kugel ergibt sich ebenfalls ein Skalar $N = \frac{1}{3}$ für alle drei orthogonalen Achsen. Für ein Ellipsoid ist \hat{N} ein Diagonaltensor, für alle anderen Geometrien lässt sich \hat{N} näherungsweise berechnen oder messen [21].

Die Streufeldenergie E_S , oder auch magnetostatische Energie oder Dipol-Energie genannt, ergibt sich zu [19]

$$E_S = -\frac{\mu_0}{2} \int \mathbf{M} \cdot \mathbf{H} dV. \quad (2.8)$$

Magnetoelastische und magnetostruktive Effekte

Zwischen Magnetisierungsrichtung eines magnetischen Materials und mechanischer Deformation besteht eine Kopplung, welche von der Orientierung der Magnetisierungsrichtung in Bezug zu den Kristallachsen abhängig ist. Dieser Zusammenhang wird als magnetoelastischer Effekt zusammengefasst.

Magnetoelastische Energie hat ihre Ursache, wie auch die Anisotropie, in der Wechselwirkung des Kristallfeldes und der Spin-Bahn Kopplung, sie ist der spannungs- und druckabhängige Anteil der Anisotropie [21].

Ein Körper, der magnetischen Wechselwirkungen unterliegt, kann sich verformen, da dieses unter Umständen weniger elastische Energie kostet, als Anisotropieenergie im nichtdeformierten Zustand. So kann sich zum Beispiel ein kubischer Kristall deformieren, sobald er unter seine Curietemperatur sinkt und ist dann im magnetisierten Zustand kein perfekter Kubus mehr. Magnetostruktion bezeichnet das Verhalten von magnetischen Körpern, sich unter Einwirkungen äußerer Felder zu verformen. Als Volumen-Magnetostruktion ist ein Effekt benannt, der darauf be-

ruht, dass sich die Gitterkonstanten des Materials auf Grund induzierter Magnetisierung ändern können. Umgekehrt können mechanische Spannungen den Magnetisierungsprozess magnetischer Proben beeinflussen, so dass beispielsweise ein kubisches Material zu uniaxial anisotrop verändert wird. Dieser Effekt wird dann als ein inverser magnetoelastischer Effekt bezeichnet.

Im Allgemeinen lassen sich die Einflüsse magnetischer Wechselwirkung innerhalb eines Körpers mittels eines asymmetrischen Tensors \hat{p} beschreiben [17], dessen symmetrischer Anteil der Tensor der elastischen Spannung und der asymmetrische Teil ein Rotationstensor ist. Normalerweise sind gerade in ferromagnetischen Materialien, die im vorliegenden Fall behandelt werden, die Effekte sehr klein, so dass, wenn überhaupt, nur die erste Ordnung physikalische Relevanz hat. Man kann nun so vorgehen, dass man die Beiträge zur Freien Energie in Abhängigkeit von \hat{p} darstellt. Elemente nullter Ordnung bestimmen die Energie des nichtdeformierten Körpers, die erste Ordnung beinhaltet die magnetoelastische Wechselwirkung, die zweite Ordnung beschreibt elastische Effekte, die Magnetostriktion, die in der Regel von der Magnetisierungsrichtung unabhängig sind, sofern Körper nicht unter extremer Spannung stehen.

Alle Anteile der Freien Energie eines magnetischen Körpers können von Verformungen abhängig sein und tragen daher zur magnetoelastischen Energie bei. In den meisten Materialien spielt dabei die kristalline Anisotropie die Hauptrolle, neben weiteren Einflüssen der Streufeldenergie, die ebenfalls zu Deformationen führen kann. Rotationen eines Körpers in äußeren Feldern haben aufgrund der Änderung des Winkels zwischen magnetischer Vorzugsrichtung und Magnetisierung ebenfalls Auswirkungen auf die Anisotropieenergie, welche in üblichen Materialien und Magnetfeldern vernachlässigbar sind.

Der einzig wichtige Effekt der Magnetoelastik ist auf die Kristallanisotropie zurückzuführen, die anisotrope Magnetostriktion. Dieser Effekt ist quadratisch in der Magnetisierung und spielt bei technischen Anwendungen eine Rolle, beispielsweise kann damit das Rauschen in Transformatoren erklärt werden. Weiteres findet man in [17, 19–21].

2.1.2 Bildung von Domänen und Domänenwände

In einem ferromagnetischen Material, dessen Austauschintegral positiv ist, das bedeutet bevorzugt parallele Spinorientierung, würde man erwarten, dass das Material immer in Sättigungsmagnetisierung vorliegt. Aufgrund der Minimierung der Freien Energie, die sich aus den oben genannten Anteilen zusammensetzt, bilden sich jedoch in einem magnetischen Material unterschiedliche Bereichsstrukturen, innerhalb derer die magnetischen Momente gleichgerichtet sind, aus, die im Allgemeinen unterschiedliche Magnetisierungsrichtungen besitzen, sogenannte Domänen [17, 20]. Einzelne Domänen unterschiedlicher Magnetisierung sind durch Domänenwände getrennt, Gebiete in denen sich die Magnetisierung der einen Domäne schrittweise der anderen anpasst. Innerhalb eines Materials können sich Domänen so anordnen, dass die resultierende, globale Magnetisierung verschwindet, so wie im Fall des später beschriebenen Substrats. Mit der Existenz von Domänen lässt sich ebenfalls erklären, weshalb ferromagnetisches Material bereits

bei vergleichsweise geringen äußeren Feldern seine Sättigungsmagnetisierung erreicht. Dies ist damit zu erklären, dass die magnetischen Momente bereits in unterschiedlichen Bereichen ausgerichtet sind, das Feld also keine Energie mehr aufbringen muss, um Momente in eine Richtung zu bewegen. Es reicht aus, Domänenwände zu verschieben, was bis auf Kristalldefekte keine Energie kostet [19].

Die Erzeugung von Domänenwänden hingegen kostet Austausch- und Anisotropieenergie, da dann einige Momente nicht in Richtung der magnetischen Vorzugsrichtung und untereinander nicht mehr parallel angeordnet sein können.

Die Minimierung der Domänenwandenergie und die der Streufeldenergie sind konkurrierende Prozesse, so dass es doch zur Ausbildung von Domänen kommt. Sogenannte geschlossene Domänenstrukturen (beispielsweise 90° zwischen einzelnen Domänen in kubischen Materialien) minimieren die Streufeldenergie [20], kosten allerdings Anisotropieenergie zur Bildung der Domänenwände und der Domänen, deren Magnetisierung nicht entlang der magnetischen Vorzugsachsen orientiert ist. Zusätzlich tritt elastische Energie auf Grund der 90° -Orientierung auf [19]. In der vorliegenden Arbeit werden Materialien verwendet, deren Domänen antiparallel gerichtet und durch sogenannte 180° -Bloch-Wände [23] getrennt sind (im Gegensatz zu einer möglichen Néel-Wand, in der die Magnetisierung in einer Ebene gedreht wird). Eine Bloch-Wand wird dadurch charakterisiert, dass sie parallel zur Ebene der Magnetisierung zweier Domänen verläuft. Das bedeutet, dass sich an den Rändern der Wand im Inneren des Materials keine magnetischen Ladungen befinden, da die Magnetisierungskomponente senkrecht zur Wand auf beiden Seiten der Wand gleich ist, gemäß Abschnitt 2.1.1. Dreht sich nun die Magnetisierung innerhalb der Wand parallel zu den Rändern, gibt es in der Wand, abgesehen von Oberflächengebieten, ebenfalls keine magnetischen Ladungen. Somit kosten solche Bloch-Wände keine Streufeldenergie innerhalb des Materials. Die Dicke δ einer Domänenwand lässt sich auf Grund einfacher geometrischer Überlegungen abschätzen zu [17, 19]

$$\delta = \pi \sqrt{\frac{A}{K}}, \quad (2.9)$$

wobei K die Anisotropiekonstante und A die Austauschkonstante ist, die sich mittels des Austauschintegrals aus Gleichung 2.2 für einen kubischen Kristall zu

$$A = 2JS^2 \frac{z}{a} \quad (2.10)$$

berechnet. a ist die mittlere Distanz eines Spins zum nächsten Nachbarn, z ist die Anzahl der nächsten Nachbarn, für ein bcc-Gitter ist $z = 2$, für ein fcc-Gitter ist $z = 4$.

Prinzipiell ist innerhalb einer Wand die Austauschwechselwirkung genauso groß wie die Anisotropieenergie. Bei hohen Anisotropien, ist das Material bestrebt, möglichst dünne Wände zu formen, auf Kosten hoher Austauschenergie. So sind verschiedenste Domänenkonfigurationen und Wände ein Resultat der Energieminimierung vieler beteiligter Prozesse.

2.1.3 Magnetisches Verhalten von Kleinstteilchen

Betrachtet man immer kleinere Ansammlungen eines Stoffes, kann man ab gewissen Grenzen nicht mehr unbedingt davon ausgehen, dass die makroskopischen Gesetzmäßigkeiten gelten. Gerade bei magnetischen Materialien stößt man im Nanometerbereich auf ganz spezielles Verhalten, das näher erläutert werden muss.

Ferromagnetisches Material kann sich paramagnetisch, ferromagnetisch, beziehungsweise ferrimagnetisch oder superparamagnetisch verhalten. Welcher Zustand sich einstellt, hängt beispielsweise von der Temperatur ab. Wenn alle magnetischen Momente in einem Stoff auf Grund hoher Temperatur, also hoher kinetischer Energie, ungeordnet vorliegen, zeigt der Stoff oberhalb seiner Curietemperatur T_C paramagnetisches Verhalten. Unterhalb dieser Temperatur, bei der die Energie der magnetischen Momente von Anisotropie und Austauschwechselwirkung dominiert wird, die kinetische Energie diese Einflüsse also nicht mehr übertreffen kann, befindet sich der Stoff im ferro- oder ferrimagnetischen Zustand und zeigt Bereiche mit einer gerichteten Magnetisierung. Die elementaren Momente beeinflussen sich also gegenseitig, was zu einer Fernordnung führt. Nun soll davon ausgegangen werden, dass sich ein Teilchen weit unterhalb von T_C befindet. Erneut gibt es verschiedene, mögliche Zustände, die nun kritisch vom Radius beziehungsweise vom Volumen abhängen. Geht man von einem Multidomänenpartikel (MD-Partikel) aus, wird sich bei Verringerung des Volumens irgendwann ein Eindomänenpartikel (SD-Partikel) bilden. In erster Näherung kann man davon ausgehen, dass ein Partikel, das einen geringeren Radius r_c als die Breite einer Domänenwand $r_c < \delta$ besitzt, keinen MD-Zustand erreichen kann. Bei genauerer Betrachtung muss man allerdings die Energien betrachten, ab denen es günstiger ist, ein höheres Streufeld zu generieren, anstatt eine Domänenwand aufrecht zu erhalten. Den genauen Radius anzugeben ist schwierig, man muss eher von einem Übergangsbereich ausgehen. Ist die Anisotropie groß genug, die Magnetisierung entlang der Vorzugsachse zu halten, kann man davon ausgehen, dass das SD-Partikel wirklich eine Magnetisierungsrichtung hat. Möglich ist auch der Zustand, dass die Magnetisierung entlang der Vorzugsachse ausgerichtet ist, die in der Mitte des Partikels vorliegt, allerdings zu den Rändern hin in immer stärkerem Maße parallel zur Oberfläche angeordnet ist. Dieses spart Streufeldenergie, kostet allerdings hohe Austauschenergie. Für die hier verwendeten Materialien wird sich später zeigen, dass die Betrachtung dieses Umstandes nicht weiter von Bedeutung ist, so dass zur genaueren Behandlung auf [19] verwiesen wird. Bei noch weiterer Verringerung des Radius stellt sich ein SD-Zustand ein, der aus nur einem Bereich konstanter Magnetisierung besteht, da irgendwann die auftretende Streufeldenergie signifikant kleiner wird, als dies die Bildung einer Wand mit sich bringen würde. Die Magnetisierung liegt dann oft parallel oder antiparallel zu einer bestimmten Richtung, die durch verschiedenste Anisotropien geprägt wird, beispielsweise durch magnetokristalline Anisotropie oder Formanisotropie [19, 21]. Die Energiedichte eines solchen Partikels enthält neben eventuell kubischen Anteilen, die auf die Kristallanisotropie zurückzuführen sind, im Allgemeinen einen uniaxialen Beitrag $K_{eff} \sin^2 \theta$, der durch die Anisotropiekonstante K_{eff} gekennzeichnet ist und

θ ist der Winkel zwischen Magnetisierung und magnetischer Vorzugsachse [24]. Diese effektive Anisotropiekonstante beinhaltet alle möglichen Ursprünge, die eine Energiebarriere innerhalb des Partikels haben kann, beispielsweise Formanisotropie oder Wachstumsanisotropie. Die Energie dieses Partikels ist genau dann minimiert, wenn die Magnetisierungsrichtung entlang $\theta = 0$ oder $\theta = \pi$ zeigt.

Das Stoner-Wohlfarth-Model besagt, dass in einem kleinen Eindomänenpartikel die Energie aus Anteilen der Anisotropieenergie und aus Wechselwirkung mit einem äußeren Feld besteht [21]. Da keine Domänenwände existieren, müssen nur kohärente Veränderungen der Magnetisierungsrichtung innerhalb einer Domäne beachtet werden, wenn ein äußeres Feld anliegt. Eine grundlegende Form der Energie E eines Eindomänenpartikels der Magnetisierung $M = M_S$ (Sättigungsmagnetisierung) im äußeren Feld H , das den Winkel θ in Bezug zur Anisotropieachse aufweist, und die Magnetisierung des Partikels wiederum den Winkel ϕ mit dem Feld einschließt, ergibt sich dann zu [19]

$$E = K_{eff} \sin^2(\theta - \phi) - \mu_0 H M_S \cos \phi. \quad (2.11)$$

Bei erneuter Verringerung des Radius wird man auf eine Grenze stoßen, ab der thermische Energie ausreicht, die magnetischen Momente zwischen den zwei stabilen Orientierungen zu wechseln. Die remanente Magnetisierung ist nicht länger entlang der Richtung, die die Anisotropie vorgibt, ausgerichtet, wenn

$$K_{eff} V < \alpha \cdot k_B T. \quad (2.12)$$

Der Vorfaktor α kommt daher, dass es erneut einen Übergangsbereich gibt, in dem man sagt, dass sich die Magnetisierung des Partikels stabil verhält. Eine spezifische Größe ist dabei die Néelsche Relaxationszeit [25, 26]

$$\tau_N = \tau_0 \exp \frac{K_{eff} V}{k_B T}, \quad (2.13)$$

wobei τ_0 eine Relaxationszeit ist und α ergibt sich somit zu $\ln(\tau_N/\tau_0)$. τ_0 ist keine material-unabhängige Konstante, sondern wurde auf Grund von Messungen und Kalkulationen in einem Bereich von $10^{-8} - 10^{-11} s$ als typischer Wert festgelegt [24, 27–30]. Die physikalische Ursache dieser Relaxationszeit liegt darin, dass die magnetischen Momente eines Materials nur endlich schnell auf Magnetfelder reagieren, die, abgesehen von externen Feldern, auch durch benachbarte magnetische Momente hervorgerufen werden. Dieses dynamische Verhalten wird mittels der sogenannten Landau-Lifshitz-Gleichung beschrieben, wobei sich τ_0 als Kehrwert des gyromagnetischen Verhältnisses ergibt, wenn man von idealen Materialien ohne Energieverluste durch

Wirbelströme oder ähnlichem ausgeht [17]. Da der Übergang eines Teilchens zum Superparamagnetismus ohnehin fließend ist, kann $\tau_0 = 10^{-9}s$ als realistischer Wert für Magnetit beim Übergang zum Superparamagnetismus angenommen werden [27, 28, 31, 32].

τ_N gibt an, wie lange ein magnetisches Moment eines Partikels im Mittel auf Grund der vorgegebenen Energien und Temperatur zum Richtungswechsel benötigt. Dabei kann diese Zeit einerseits eine im Experiment zu erfassende Größe sein [33, 34] oder eine Art Messzeit andererseits, in der beobachtet wird, ob sich die Magnetisierung der Partikel während dieser Zeit ändert oder eher durch die vorherrschende Anisotropie stabilisiert wird. Dabei ist klar, dass mit längerer Messzeit der Temperaturbereich für den Übergang zum superparamagnetischen Verhalten zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird. Die Dauer der Magnetisierungsmessungen, die in vorliegender Arbeit durchgeführt wurden und ausgewertet werden sollen, liegen im Bereich von $1s - 10^{-4}s$ [31]. Gemessene Relaxationszeiten werden für Kleinstpartikel im Bereich weniger Nanometer bei superparamagnetischem Verhalten mit minimal $10^{-8}s - 10^{-9}s$ angegeben, theoretisch berechnete Werte mit $10^{-7}s$ [34].

Basierend auf diesen Annahmen, die sich auf große Zeitintervalle beziehen, lässt sich nun eine kritische Temperatur T_{block} , die sogenannte Blockingtemperatur, in Abhängigkeit eines konstanten Volumens oder ein kritischer Radius r_{krit} in Abhängigkeit konstanter Temperatur angeben, ab dem ein Partikel superparamagnetisches Verhalten zeigt. Dabei ist das Volumen des Partikels $V = \frac{4}{3}\pi r_{krit}^3$, so dass

$$r_{krit} = \sqrt[3]{\frac{3 \ln(\tau_N/\tau_0) k_B T_{block}}{4\pi K_{eff}}} . \quad (2.14)$$

Diese Formel dient später dazu, bei verschiedenen Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen das magnetische Verhalten von Kleinstteilchen im Voraus abschätzen zu können.

2.2 Zellmechanik

Lebende Zellen sind sehr komplexe Gebilde, die bis heute nicht komplett in ihrer Funktionsweise auf molekularer Ebene verstanden sind. Eine Vielzahl an Proteinen wird in der Zelle benötigt, um aktive Vorgänge wie Bewegung, Energieherstellung, Teilung etc. zu steuern [35]. In hiesigem Zusammenhang sind einerseits Transportmechanismen innerhalb der Zelle zur Aufnahme extrazellulärer Stoffe mittels Endozytose wichtig. Andererseits sind Vorgänge, die mit Adhäsion und Zelltopographie in Zusammenhang stehen, von Interesse.

2.2.1 Endozytose

Endozytose ist der Oberbegriff zur aktiven Aufnahme extrazellulärer Bestandteile und zu deren Transport zu Verdauungsenzymen in der Zelle. Dabei werden unterschiedliche Vesikel als

„Transportbehälter“ verwendet, in die je nach Zelltyp Stoffe bis zu $1\mu\text{m}$ Durchmesser eingebracht werden. Endozytose kann generell kontinuierlich stattfinden, was Pinozytose genannt wird, oder durch Signale ausgelöst werden und dann als Phagozytose beschrieben wird. Phagozytose liegt häufig vor, wenn große Partikel aufgenommen werden sollen, die über 250nm durchmessen. Pinozytose dient eher der permanenten Aufnahme löslicher Stoffe von unter 100nm . Die genannten Grenzen sind dabei als Tendenz zu verstehen, nicht als Absolutwerte [35]. Der gesamte Transportweg, wie er in der vorliegenden Arbeit anhand der Internalisierung magnetischer Partikel beobachtet und später innerhalb der Ergebnisse diskutiert wird, gliedert sich prinzipiell in zwei Teile. Der erste Vorgang besteht in der Aufnahme des Stoffes, der zweite Teil im intrazellulären Transport bis an das Zellkompartiment, wo die Substanz weiter verarbeitet wird.

Zuerst wird die Plasmamembran, die jede Zelle umgibt, in einem hoch dynamischen Prozess eingestülpt und abgeschnürt. Die häufigsten Transporthüllen im später diskutierten Zusammenhang sind zum einen die clathrin-beschichteten Vesikel, zum anderen Caveolae. Der Übersichtlichkeit halber, wird auf die Beschreibung anderer Mechanismen verzichtet, wobei Weiteres in [35] gefunden werden kann. Neben dem Clathrin enthält das Clathrinvesikel einen Multiproteinkomplex, der Adaptin genannt wird. Dieser dient dazu, die Clathrine mit der Membran zu verbinden und die „Fracht“ mittels spezifischer Rezeptoren zu binden. Die Clathrinvesikel werden an speziellen Orten der Plasmamembran durch Andocken bestimmter Proteine gebildet [36]. Die Synthese der Vesikel nimmt ungefähr eine Minute in Anspruch, wobei Untersuchungen an Fibroblasten zeigten, dass pro Minute durchschnittlich 2500 Vesikel die Zellmembran verlassen. Dies bedeutet, dass nach anderthalb Stunden der Fibroblast einmal seine gesamte Zellmembran ausgetauscht hat. Damit dies durchführbar ist, existiert die eben genannte Zweiteilung des Transportwegs, so dass sobald sich die Substanz in der Zelle befindet (in den frühen Endosomen), die Proteine und sonstige Bestandteile der äußeren Zellmembran vom Vesikel abgelöst werden und durch Exozytose zur Zelloberfläche zurückkehren [35]. Der weitaus weniger gut verstandene Mechanismus bedient sich der Caveolae, die wahrscheinlich aus Zellmembranteilen abgeschnürt werden, die besonders viel Cholesterin und Glykosphingolipide enthalten. Dabei werden die Vesikel nicht weiter mit Proteinen oder ähnlichen Stoffen beschichtet. Der Hauptbestandteil der abgeschnürten Vesikel besteht aus dem Transmembranprotein Caveolin [37]. Im Unterschied zu den Clathrinvesikeln, werden die Caveolae auf Grund der Eigenschaften ihrer Lipidzusammensetzung eingestülpt und nicht durch den Aufbau spezieller Proteinhüllen (wie das Andocken von Clathrinen an die Zellmembran), die dann beispielsweise mittels Dynamin abgeschnürt werden.

Der weitere Transport der Vesikel, die über den clathrin-abhängigen Weg internalisiert wurden, wird dann von Mikrotubuli ins Innere der Zelle, zum späten Endosom und den Lysosomen, vorgenommen [35, 38, 39]. Diese Transportfilamente entstehen durch permanente Synthese von Tubulindimeren aus Monomeren. Sie sind ungefähr 25nm durchmessende Röhren und dienen neben dem Stofftransport auch der Zellteilung. Dazu sind sie am Zentrosom in der Nähe des Zellkerns zusammengefasst und erstrecken sich in Richtung der äußeren Zellmembran. Zur Zell-

teilung zerfallen und polymerisieren sie neu, um die Chromosomen auf die beiden entstehenden Tochterzellen zu verteilen. Beim Stofftransport transportiert das Motorprotein Dynein selbst Partikel, die wesentlich größer als der Durchmesser der Mikrotubuli sind, in Richtung Zellinneres, indem es an den Filamenten entlangwandert [40]. Im Gegensatz dazu stellt der Transport über Internalisation der Caveolae eine Möglichkeit für die Zelle dar, den Weg der Stoffaufnahme über den lysosomalen Weg zu umgehen. Hierbei werden die Mikrotubuli nicht benötigt, da diese nur Wege vom frühen ins späte Endosom übernehmen. Es wird angenommen, dass die Stoffe, die durch Caveolaetransport aufgenommen werden, direkt ins Zytosol oder durch Fusion ins Endoplasmatische Retikulum übergehen [39].

Weitere Einzelheiten bezüglich des intrazellulären Stofftransports werden später im Zusammenhang mit den experimentellen Ergebnissen diskutiert.

2.2.2 Adhäsion

Viele der im Säugetier und Menschen vorkommenden Zellen sind sogenannte „adhärente Zellen“. Sie besitzen die Möglichkeit mit umgebendem Gewebe (oder in Kultur mit dem Gefäß) mechanischen Kontakt herzustellen. Eine Voraussetzung ist hierfür, dass die Zelle ein Zytoskelett besitzt, das dynamisch durch fortwährenden Auf- und Abbau von Zytoskelettfilamenten, wie Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, der Zelle Stabilität bei gleichzeitig hoher Beweglichkeit gewährleistet [35, 40]. Neben der aktiven Fortbewegung dienen sie der internen Organisation verschiedener Kompartimente. Die Mikrofilamente, deren Hauptbestandteil das Protein Aktin ist, besitzen einen Durchmesser von $6 - 10\text{nm}$, die Intermediärfilamente $7 - 11\text{nm}$ und die bereits oben erwähnten Mikrotubuli 25nm . Um auf einer Oberfläche zu adhären oder *in vitro* den Kontakt zu benachbartem Gewebe herzustellen, benötigen die Zellen Kontaktflächen. Im Zell-Zell-Kontakt kommen dabei vor allem Intermediärfilamente zum Tragen [40], die der Zelle Reißfestigkeit garantieren, was hier allerdings nicht weiter betrachtet werden soll. Im Zusammenhang mit den durchgeführten Experimenten ist es eher von Interesse, genauer die Mechanismen der Adhäsion zu untersuchen, die durch reine Zell-Oberflächenkontakte zu Stande kommt. Gerade diese Kontakte sind entscheidend für die Form der Zelle. Erst wenn Kontakte aufgebaut werden können, ist es der Zelle möglich, ihre Kugelform zu verlassen und sich auszubreiten.

Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen lassen sich in drei Schritte unterteilen. 1. Kommt eine Oberfläche oder ein Substrat in Verbindung mit Zellen, die sich in einem Medium befinden, wird sie innerhalb einiger Sekunden mit Proteinen bedeckt [41]. Damit können Zellen, wenn sie eine Oberfläche berühren, nur auf modifizierte Strukturen reagieren, was bei der Interpretation des Zellverhaltens beachtet werden muss. Die Proteinschicht stellt die extrazelluläre Matrix dar (ECM), die je nach Beschaffenheit Einfluss auf das weitere Zellverhalten hat [42–44]. Die Bestandteile, durch die die ECM aufgebaut wird, stammen von den Zellen selbst. Aus dem Zellplasma heraus werden über verschiedene Transportwege nicht nur Proteine, sondern auch Faktoren ausgesondert, die das weitere Zellverhalten bestimmen und teilweise der Zellkommunikation dienen

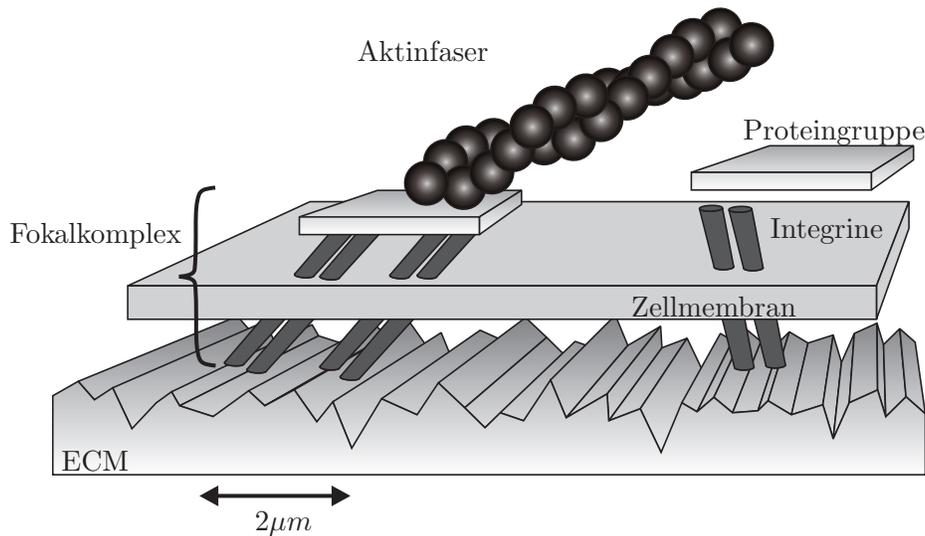


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Fokalkontaktes. Transmembranproteine bilden Kontakt zur extrazellulären Matrix (ECM). Durch Andocken eines Proteinkomplexes verschiedener Proteine wird Aktinsynthese ermöglicht. Die Zelle beginnt durch Myosinkontraktionen eine Kraft am Fokalkontakt aufzubauen.

[45]. 2. Um den Kontakt zur Oberfläche herzustellen, muss eine Zelle Adhäsionspunkte ausbilden, die eine Verbindung zwischen der äußeren Zellmembran und der ECM herstellen. Dieser Vorgang wird als Adhäsion bezeichnet [46]. 3. Eine adhärenente Zelle kann auf Grund der Substrateigenschaften unterschiedliche weitere Entwicklungen durchlaufen. Der drastischste Einfluss kann der programmierte Zelltod (Apoptose) oder Absterben sein. Andererseits kann die Zelle überleben und sich teilen, sie kann sich durch ihre Adhäsion fortbewegen, sich differenzieren und beginnen, aktive Prozesse, wie Proteinsynthese, durchzuführen oder letztlich in inaktivem Zustand verbleiben. Wie genau sie sich verhält, kommt auf die Beschaffenheit des Substrats und auf die biochemische Umgebung an [41].

In vorliegendem Kontext ist es wichtig, den Mechanismus der Adhäsion genauer zu studieren, da die Form einer Zelle entscheidend davon abhängt, wie und wo sie ihre Adhäsionspunkte aufbaut [45]. Adhäsive Wechselwirkung kann als ein „Sensor“ der Zelle gegenüber ihrer Umgebung angesehen werden [47]. Durch den Aufbau der Adhäsionspunkte werden im Zellkörper Signalkaskaden ausgelöst, die im Zellkern eine Veränderung der Genexpression hervorrufen können [45]. Somit können Adhäsionspunkte, die Fokalkontakte genannt werden, ein wichtiger Bestandteil der Regulierung intrazellulärer Prozesse sein. Einigen Strukturen innerhalb der Fokalkontakte wird eine aktive Sensorfunktion zugeschrieben. Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Aufbau eines Fokalkontaktes [48, 49]. Es sind flache, elongierte Strukturen, die an den Enden von Aktinfilamenten zu finden sind. Bis heute ist nicht bekannt, welche einzelnen Moleküle daran beteiligt sind, die Aktinfasern anzubinden. Sicher ist, dass weit mehr als 50 Moleküle benötigt werden, um eine komplexe Proteingruppe zu bilden, die in Kontakt mit den Fasern tritt [50]. Beachtenswert ist dabei die Komplexität der einzelnen beteiligten Proteine, die eine Multidomänenstruktur be-

sitzen. Beispielsweise kann Vinculin mit mindestens zehn weiteren Proteinen des Fokalkontaktes Verbindungen knüpfen, darunter Tensin, Paxillin, Vinexin, um einige Beispiele zu nennen. Die genannten Bestandteile sind bekannterweise Komponenten verschiedener Signalübertragungswege, so dass die Vermutung naheliegt, dass Fokalkontakte der Zelle als multiple und extrem sensitive Sensoren dienen [48]. Ein Fokalkontakt entsteht an den Enden eines sogenannten Lamellipodiums, die die adhärente Zelle vom Körper weg bildet, um sich fortzubewegen, sofern sie erfolgreich in der Bildung des Kontaktes ist. Dazu benötigt sie einen Fokalkomplex, der sich bildet, indem die eben genannte Proteingruppe an aktivierte $\alpha V\beta 3$ -Integrine anbindet [51]. Integrine sind Transmembranproteine [51, 52], was bedeutet, dass sie die eigentlichen Schnittstellen zwischen Substrat beziehungsweise ECM und Zellinnerem darstellen und als Rezeptoren ebenso Bestandteile biochemischer Signalwege sind [53, 54]. Der Fokalkomplex wird zum Fokalkontakt, indem die Aktinpolymerisation durch ein kleines, der Rho-Familie zugehöriges Protein, Rac, stimuliert wird. Sobald die Aktinfilamente angebunden sind, ermöglicht der Kontakt durch Aktin-Myosin-Kontraktion Kräfte aufzubauen, die einerseits der Zelle Stabilität verleihen, andererseits ein Fortbewegen und erneutes Ausbilden von Lamellipodien ermöglichen [48, 49].

Die Breite des Fokalkomplexes beträgt im extrazellulären Raum $500\text{nm} - 1\mu\text{m}$ und besitzt zusammen mit den Aktinfilamenten als Fokalkontakt eine eindimensionale Ausdehnung von bis zu $10\mu\text{m}$ [49]. Die genaue Größe des Kontaktes hängt von der Beanspruchung ab. Benötigt eine Zelle einen Kontakt oder sogar den Komplex nicht mehr, werden die zugehörigen Bestandteile depolymerisiert und wieder vom Ort wegtransportiert. Umgekehrt kann ein Komplex vergrößert werden, sofern es die mechanische Beanspruchung erfordert [46]. Messungen an Zellen, die keiner äußeren Kraft entgegenwirken mussten, zeigten, dass durchschnittlich ein Druck von $5,5 \cdot 10^3 \text{Pa}$ beziehungsweise $5,5 \text{nN}/\mu\text{m}^2$ der auf der Membran herrscht. Setzt man voraus, dass die Integrine innerhalb eines Fokalkomplexes dicht gepackt sind, bedeutet das, dass pro Integrin eine Kraft von einigen $p\text{N}$ existiert [55]. Durch weitere Versuche, in denen äußere Kräfte auf die Zellen ausgeübt wurden, konnte festgestellt werden, dass die Bindungen von Integrinen in den intrazellulären Raum maximal $100p\text{N}$ aushalten. Wie viele Fokalkomplexe eine Zelle nun besitzt, hängt, wie bereits erwähnt, vom Grad der Adhäsion ab und kann je nach verwendetem Substrat und Zelltyp variieren. Werte zwischen 0,001% [41] bis 1% [55] Anteil von Fokalkomplexen an der Zelloberfläche werden diskutiert.

Zuletzt sei erwähnt, dass die Fokalkontakte als aktive „Mechanosensoren“ angesehen werden [56]. Eine gewisse Spannung innerhalb einer Zelle ist je nach Gewebezugehörigkeit unabdingbar. Eine Zelle ist daher bestrebt, mittels ihrer Kontakte zu Nachbarn im gleichen Gewebe oder zu Strukturen außerhalb ihres Gewebes Kräfte aufzubauen, die Zusammenhalt und Reißfestigkeit garantieren. Als Konsequenz dieser Tatsache muss der Aufbau von Kräften energetisch sparsam und zeitlich effektiv geschehen. Aus diesem Grund haben strukturelle Unterschiede der Oberflächen, mit denen eine Zelle in Kontakt kommt, direkte Auswirkungen auf Form und Wachstum.

Kapitel 3

Experimenteller Ansatz

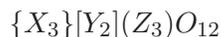
3.1 Materialien

Das in der vorliegenden Arbeit behandelte System besteht hauptsächlich aus zwei miteinander agierenden Substanzen. Einerseits fungieren magnetische Filme, hier Granatschichten, als Trägersubstrat, auf welches andererseits magnetische Kleinstteilchen aufgebracht werden. Im Folgenden sollen nun die charakteristischen Eigenschaften beider Systeme genannt und diskutiert werden.

3.1.1 Granatfilme

3.1.1.1 Aufbau

Der Granat ist im Allgemeinen eine spezielle Definition in der Kristallogie für ein kubisches Kristallsystem, dessen Elementarzelle aus Oktaedern, Tetraedern und deformierten Dodekaedern aufgebaut ist. Generell nennt man Strukturen der Zusammensetzung



oxidische Granate [57]. X, Y, und Z stehen für unterschiedliche Kationen. Dabei wird mittels der Klammerung der Koordination der einzelnen Kationen Rechnung getragen. $\{\}$ bedeutet 8-fache Sauerstoffkoordination, $[\]$ steht für 6-fache und $(\)$ für 4-fache Koordination. Eine große Gruppe stellen die Silikatgranate dar, bei denen $(Z) = (Si)$ ist. Für die Positionen $\{X\}$ und $[Y]$ kommen viele Ionen in Frage: Für die 8-fach koordinierten Ionen, beispielsweise Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} oder Mn^{2+} , für die 6-fach koordinierten Ionen, Al^{3+} , Fe^{3+} , Ti^{3+} , V^{3+} , Cr^{3+} und andere [57–59]. Im Folgenden soll nur die Beschaffenheit des siliziumfreien, magnetischen Yttrium-Eisen-Granats (YIG) wegen seines magnetischen Verhaltens behandelt werden, der in äquivalenter Struktur zusammengesetzt ist. Ein möglicher Herstellungsprozess ist das einkristalline Aufwachsen einer Schicht genannter Zusammensetzung auf einem ebenfalls siliziumfreien (111) Gadolinium-Gallium-Granat (GGG) der chemischen Zusammensetzung $Gd_3Ga_5O_{12}$ mittels isothermer Flüssigphasenepitaxie [60]¹. Dabei werden die einzelnen Elemente, die aufwachsen

¹Die verwendeten Granatfilme wurden freundlicher Weise von der AG Prof. Dr. T. Johansen, Department of Physics, University of Oslo, Norwegen, zur Verfügung gestellt.

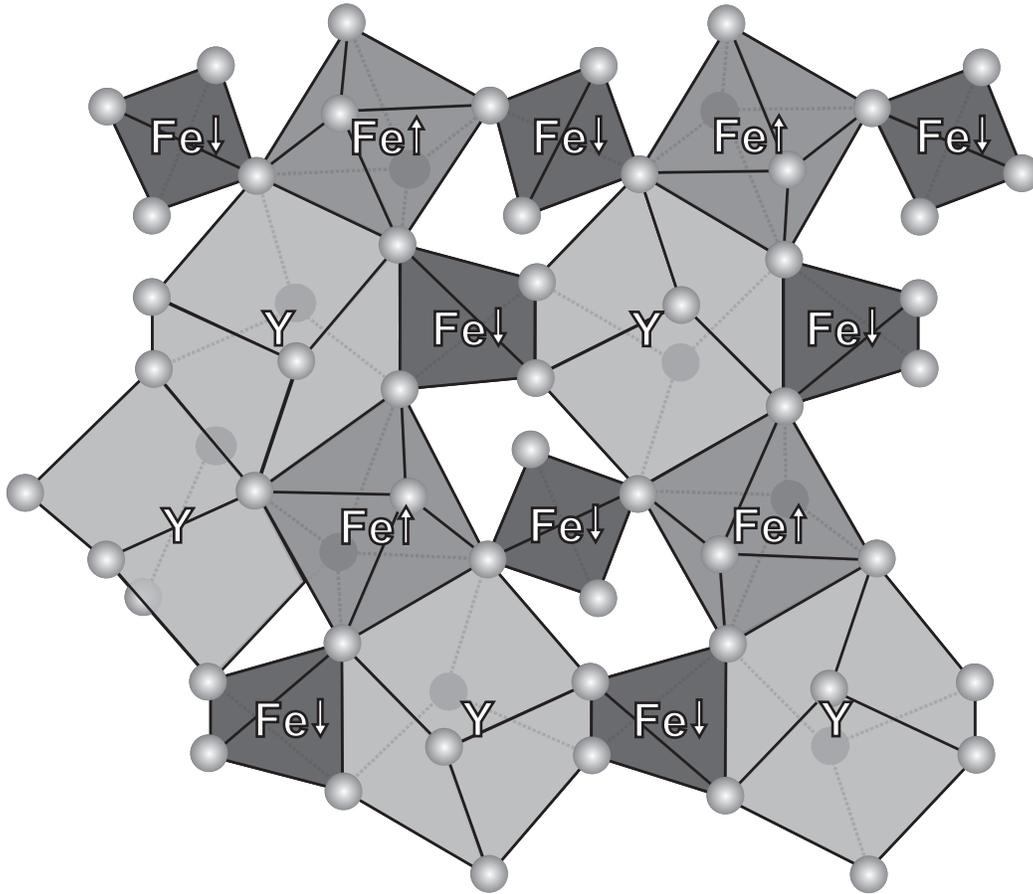
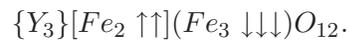


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der kubischen Granatstruktur. Die O^{2-} -Ionen bilden Tetraeder, Oktaeder und Dodekaeder, in deren Zentren Y^{3+} - oder Fe^{3+} - oder Fe^{2+} -Ionen sitzen, jeweils vermerkt durch die Elementzeichen. Die Pfeile stehen für den Spinzustand des gerade betrachteten Fe^{3+} -Ions. Das Dodekaeder, in dessen Mitte sich ein Y^{3+} -Ionen befindet, ist im Gegensatz zu einem Würfel verzerrt (pseudokubische Symmetrie) [57].

sollen, geschmolzen. Zu einer bestimmten Anzahl gelöster Atome gehört eine bestimmte Gleichgewichtstemperatur, die mit zunehmender Atomkonzentration steigt. Sinkt diese Temperatur nun durch Zugabe eines Trägersubstrats, so stellt sich das neue Gleichgewicht durch Aufwachsen einer Schicht und somit Entfernen von Atomen aus der Schmelze, erneut ein. Die chemische Zusammensetzung der zu behandelnden Stoffgruppe ist $Y_3Fe_5O_{12}$. Etwas instruktiver ist die Nomenklatur [57]



Das Eisen ist dreiwertig, Fe^{3+} , genauso das Yttrium Y^{3+} , Sauerstoff ist zweiwertig, O^{2-} . Granat kristallisiert kubisch, wobei eine Elementarzelle aus 8 Untereinheiten der genannten Form besteht [59]. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

In den Zentren der vom Sauerstoff gebildeten Tetraeder befinden sich die Fe^{3+} -Ionen an der

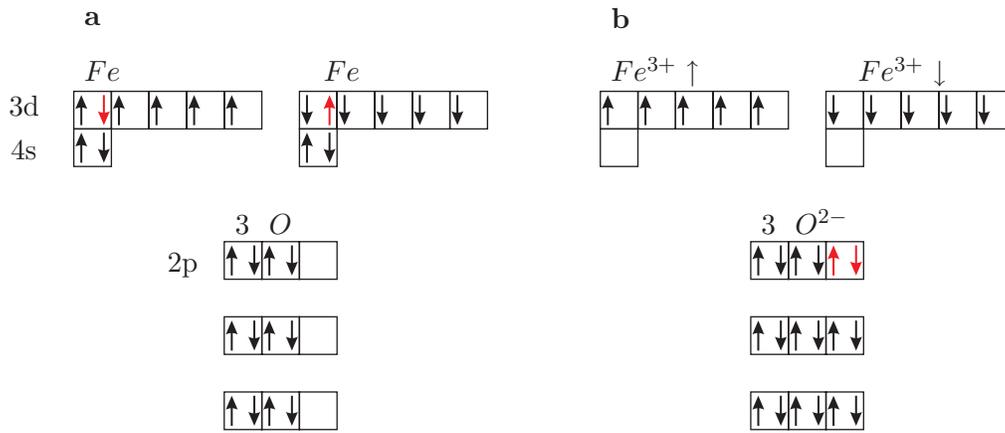


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Superaustausches. a) Elektronenkonfigurationen des elementaren Eisens Fe und des Sauerstoffs O . b) Elektronenkonfiguration im Granatgitter. Die Elektronen, die an ein O^{2-} -Ion abgegeben wurden, müssen nach dem Pauliprinzip antiparallel gerichtet sein.

Wyckoffposition 24d, umgeben von 4 O^{2-} -Ionen beziehungsweise in den Zentren der Oktaeder, an den Wyckoffpositionen 16a, umgeben von 6 O^{2-} -Ionen. Das dreiwertige Y^{3+} liegt im Zentrum eines verzerrten Dodekaeders, an den Wyckoffpositionen 24c, umgeben von 8 O^{2-} -Ionen [58, 61, 62]. Die Tetraeder sind über Ecken mit den Oktaedern verknüpft, jedes Tetraeder nur mit Oktaedern und umgekehrt. In der Kristallogie wird die Elementarzelle der Granatstruktur in die Raumgruppe $Ia\bar{3}d$ der Klasse der hexakisoktaedrischen Kristalle $\frac{4}{m}\bar{3}\frac{2}{m}$ eingeteilt [57, 58, 63], oder nach alter Schoenflies-Notation in die Raumgruppe O_h^{10} [59, 64].

3.1.1.2 Magnetische Eigenschaften

Das ferrimagnetische Verhalten des YIG lässt sich leicht durch die Kristallstruktur erklären. Die magnetischen Momente der beiden Fe^{3+} -Ionen sind auf Grund einer starken Superaustauschwechselwirkung [62] durch ein O^{2-} -Ion antiparallel, was in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt ist. Bei elementarem Fe sind die 3d-Energieniveaus teilweise, das 4s-Niveau vollständig mit Elektronen besetzt. Der Sauerstoff besitzt teilweise gefüllte 2p-Niveaus. Im Granatgitter liegen die O^{2-} -Ionen mit vollständig besetzter p-Schale vor, die Fe^{3+} -Ionen mit einfach besetzten d-Niveaus. Der daraus resultierende Elektronentransfer fordert nach dem Pauli-Prinzip, dass die Elektronen in den doppelt besetzten Unterniveaus der 2p-Schale antiparallel gerichtet sind. Dies ist nur zu gewährleisten, wenn die Elektronen zweier benachbarter Fe^{3+} -Ionen, die durch ein O^{2-} -Ion gekoppelt sind, ursprünglich auch schon antiparallel waren [21]. In einer Elementarzelle, die aus 8 Formeleinheiten besteht, befinden sich die Ionen ohne Beschränkung der Allgemeinheit in folgenden Anteilen

$$Y : Fe \uparrow : Fe \downarrow \Leftrightarrow 24 : 16 : 24. \quad (3.1)$$

Die Yttrium-Eisen-Wechselwirkung ist sehr viel geringer als die Eisen-Eisen-Wechselwirkung [59], so dass der Unterschied in der Anzahl der verschiedenen Eisenionen zu einer resultierenden ferrimagnetischen Ordnung führt, mit einer Curietemperatur von ungefähr $T_C = 550K$ [61]. Diese hängt linear von der Anzahl der im Material vorhandenen $Fe^{3+}-O^{2-}-Fe^{3+}$ Bindungen pro Einheitszelle ab, wobei die verbundenen Fe^{3+} -Ionen auf unterschiedlichen Gitterebenen liegen müssen [65].

Die Anwendung der Granate als Trägermaterial magnetischer Partikel fordert desweiteren, dass die Domänen im Film senkrecht zur Oberfläche orientiert sind. Das heißt, magnetische Uniaxialität ist Voraussetzung zur Anbindung magnetischen Materials an der Oberfläche. Die im vorliegenden Fall zu beachtenden Anisotropiebeiträge, die zum Magnetismus beitragen, bestehen aus Spannungs-, Kristall- und Wachstumsanisotropie [66], siehe auch Abschnitt 2.1.2. Spannungsanisotropie ist in den beschriebenen YIG sehr gering. Sie hat ihren Ursprung in unterschiedlichen Gitterkonstanten unterschiedlicher Kristalle. Wächst eine einkristalline Schicht auf einem anderen einkristallinen Material auf, so entstehen an der Grenzfläche mechanische Spannungen und magnetostruktive Effekte, die zu uniaxialer Anisotropie führen, wenn die Gitterkonstanten nicht übereinstimmen. Die zugehörige Anisotropiekonstante ist proportional zum Verhältnis des Unterschieds der Gitterkonstanten zu der Substratgitterkonstanten $\Delta a/a_0$. Ein GGG besitzt ein $a_0 = 12,383\text{\AA}$, das zusammen mit der Gitterkonstanten eines YIG, $a = 12,376\text{\AA}$, zu einem Verhältnis $\Delta a/a_0 = 5,65^{-4}$ führt, was sehr gering ist im Vergleich zu anderen Schichtsystemen, wo das Verhältnis nicht selten 2% beträgt, und somit nicht zu einflussreichen Effekten führen kann [66]. Desweiteren herrscht in einem Granatfilm auf Grund der kubischen Struktur kubische Kristallanisotropie der Form [23]

$$E_k = K'_k(\alpha_1^2\alpha_2^2 + \alpha_2^2\alpha_3^2 + \alpha_3^2\alpha_1^2) + K''_k(\alpha_1^2\alpha_2^2\alpha_3^2) + \dots \quad (3.2)$$

Hierbei ist E_k die Anisotropieenergie, die benötigt wird, um die Magnetisierungsrichtung aus der Richtung der „easy-axis“ in die Richtung der „hard-axis“ zu drehen. K'_k und K''_k sind die kubischen Anisotropiekonstanten und die α_i sind die Richtungskosinus bezogen auf die kubischen Achsen $\langle 100 \rangle$.

Für Granatfilme kann $K''_k = 0$ gesetzt, beziehungsweise vernachlässigt werden [66]. An Gleichung (3.2) ist erkennbar, dass im Falle $K''_k = 0$ und $K'_k < 0$ die geringsten Energien entlang der $\langle 111 \rangle$ -Achsen erreicht werden, die dann die leichten Achsen darstellen. Die magnetisch ungünstigsten Achsen sind dementsprechend die $\langle 100 \rangle$ -Achsen. Durch diese kubische Anisotropie wird das magnetische Verhalten in der Schicht bestimmt (in-plane) [67–69]. Für YIG ergeben sich Werte für K'_k im Bereich von $-5 \cdot 10^2 \frac{J}{m^3}$ bei Raumtemperatur [66, 69].

Ein Ferrimagnet kubischer Symmetrie muss also neben einer kubischen Komponente auch eine uniaxiale Anisotropie besitzen, will man die Filme wie oben genannt verwenden. Die Freie Energie

der uniaxialen Anisotropie kann formuliert werden als [19, 21]

$$E_u = K'_u \sin^2 \theta + K''_u \sin^4 \theta \dots \quad (3.3)$$

K'_u und K''_u sind die uniaxialen Anisotropiekonstanten, θ der Polarwinkel der Magnetisierung. Es reicht in der Regel aus, nur die quadratischen Terme und somit K'_u zu beachten. Der Wachstumsanisotropie bedient man sich, um eine uniaxiale Anisotropie im kubischen Kristall zu erhalten. Bei der Herstellung im Wachstumsprozess werden dabei einige der Y^{3+} -Ionen auf den Dodekaederplätzen beispielsweise durch dreiwertiges Bi^{3+} ersetzt [68, 70, 71]. Durch das Ersetzen der Ionen entsteht eine neue Gitterkonstante, die zu veränderter Spannungsanisotropie führt. Allerdings kann bei Ersetzten nur jedes sechsten Y^{3+} -Ions der Einfluss der Spannungsanisotropie gegenüber der Wachstumsanisotropie vernachlässigt werden [71]. Die Bi^{3+} -Ionen rufen einen uniaxialen Beitrag der Freien Energie der benachbarten Fe^{3+} -Ionen auf den Oktaeder- und Tetraederplätzen hervor. Die Bi^{3+} -Ionen verändern die lokale Symmetrie des Kristallfeldes (Deformation auf Grund des großen Ionenradius), die elektronische Struktur der benachbarten Sauerstoffionen und führen zu einer Zunahme der Superaustauschwechselwirkung [70]. K'_u ergibt sich im vorliegenden Fall von $Y_{2,5}Bi_{0,5}Fe_5O_{12}$ (111) zu $6 \cdot 10^3 \frac{J}{m^3}$ und liegt somit eine Größenordnung über der kubischen Anisotropie [70, 71].

Um magnetooptische Effekte, wie sie in Abschnitt 3.2.3 betrachtet werden, zu verstärken, bietet es sich an, einige der Eisenionen auf hauptsächlich tetraedrischen 24d-Positionen, zu ersetzen [60–62]. In der vorliegenden Arbeit wurden magnetische Granatfilme der Komposition $Y_{2,5}Bi_{0,5}Fe_{5-\delta}Ga_{\delta}O_{12}$ ($\delta = 0.5 - 1$) und der Dicke $4\mu m - 7\mu m$ verwendet. Typische Domänenbreiten liegen somit im Bereich $2\mu m - 5\mu m$ mit senkrechter Magnetisierung. Da der magnetische Film um die $5\mu m$ dick ist, spricht man im magnetischen Sinne von einem dicken Film. Der Übergang von dünnem zu dickem Film wird bestimmt durch die Grenze des Néel-Blochwand-Übergangs, der sich im Bereich einiger hundert nm befindet [17]. Der Granatfilm besitzt eine starke senkrechte Anisotropie, was dazu führt, dass sich senkrechte, antiparallele Domänen ausbilden, die wiederum durch Domänenwände voneinander getrennt werden. Da es sich um 180° -Wände handelt und ein dicker Film vorliegt, sind die Domänenwände reine Blochwände [72, 73]. Ein großer Vorteil der senkrecht magnetisierten Granatfilme besteht darin, dass die Domänenstruktur sehr variabel ist und sie sich über externe Magnetfelder leicht einstellen lässt. In Abbildung 3.3 sind schematisch die 4 metastabilen Grundzustände gezeigt, die sich dadurch auszeichnen, dass sie ohne äußeres Magnetfeld stabil sind, wenn sie erst einmal generiert wurden. Die sogenannte Labyrinth- oder „Maze-“ Struktur in Abbildung 3.3 (a) entspricht dem stabilsten Zustand, der nur durch gezielt angewendete magnetische Behandlung in einen der weiteren Zustände in Abbildung 3.3 (b-d) überführt werden kann, in den „Bubble-“ Zustand, den Streifenzustand oder den gemischten Zustand [17]. Befindet sich der Granat in einem der letzten drei Zustände, kann man zum Ausgangszustand zurückkehren, in dem man den Granat senkrecht zu seiner Anisotropie durch ein äußeres Magnetfeld sättigt und dieses Feld ohne weiteres Feld wieder abschaltet. Alternativ

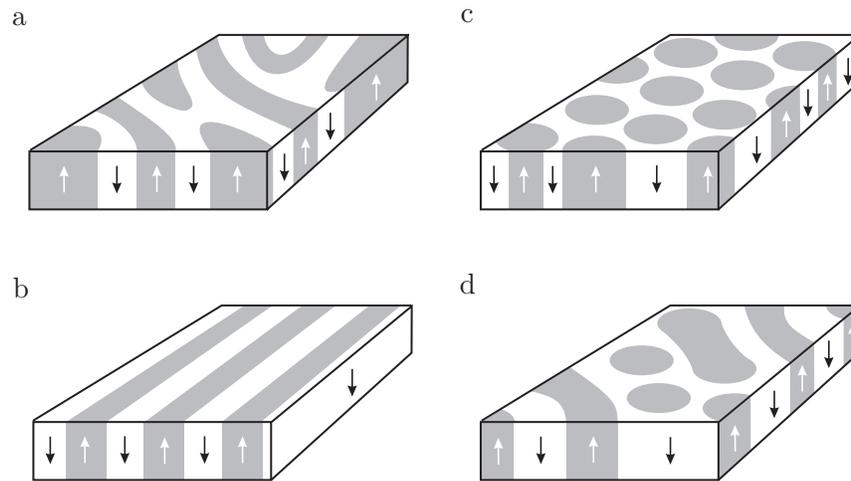


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der möglichen magnetischen Konfigurationen eines Granatfilms. a) Labyrinth-Struktur. b) Streifendomänen. c) Bubblestruktur. d) Mischzustand. Die Pfeile stehen für die Magnetisierungsrichtung.

dazu kann man den Granatfilm bis zu paramagnetischem Verhalten heizen und anschließend wieder abkühlen, was auch zu der Labyrinthstruktur führt. Die Stabilität und Struktur, wie Größe und Form der einzelnen Domänen, wird bestimmt durch das Verhältnis der Austauschwechselwirkung, Streufeldenergie und Anisotropieenergie. Auf Grund der Streufeldenergie ist es ungünstig, große Domänen (oder gar nur eine) zu erzeugen. Die Austauschwechselwirkung bevorzugt hingegen Zustände mit kleinen Winkeln zwischen den einzelnen magnetischen Momenten. Die Anisotropieenergie fordert möglichst geringe Abweichungen in der Ausrichtung der magnetischen Momente im Bezug zur leichten Achse [17, 19]. Einzelheiten der Transformationen von einem Zustand in den anderen werden in Abschnitt 4.2.2 mittels der aufgebauten Apparatur geklärt.

3.1.2 Magnetische Teilchen

3.1.2.1 Aufbau

Die verwendeten magnetischen Teilchen bestehen aus einer Einheit mehrerer ungefähr 10nm großer Magnetitkristalle, die durch eine biokompatible Matrix zusammengehalten werden. Damit keine Verwechslung auftritt, seien die folgenden Begriffe festgelegt:

- **Einzelteilchen, Einzelpartikel, Einzelbead, Kristallit** für die 10nm durchmessenden Magnetiteinkristalle.
- **Nanopartikel, Nanobead, Bead, Partikel** für das Konglomerat mehrerer 10nm Magnetiteinkristalle, das durch eine Matrix zusammengehalten wird und im Größenbereich von 200nm liegt.

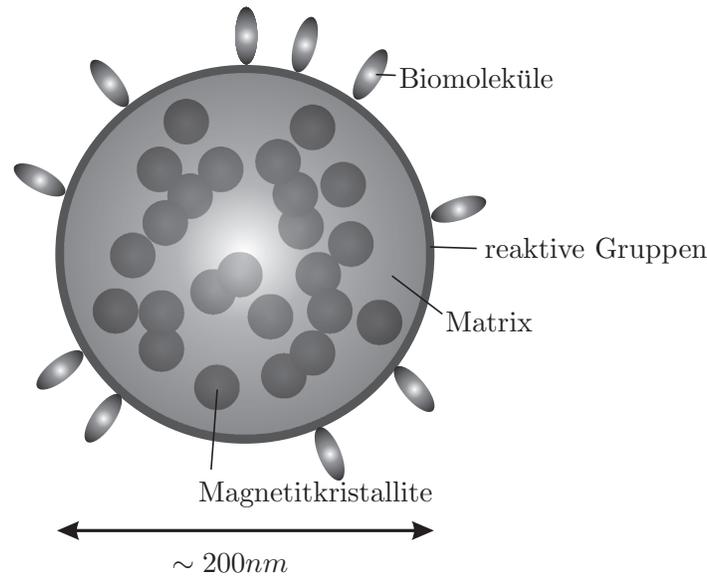


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung eines 200nm Magnetitpartikels. Dieser ist aus $10 - 12\text{nm}$ durchmessenden Magnetitkristalliten aufgebaut, die durch eine biokompatible Matrix, meist Polysaccharid, in einer Einheit gehalten werden. An die äußeren reaktiven Gruppen können Biomoleküle gekoppelt werden.

Es wurden für die vorliegende Arbeit Nanopartikel verschiedener Hersteller getestet, darunter welche der Firmen micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Deutschland und chemicell GmbH, Berlin, Deutschland. Da die Partikel hauptsächlich in klinischer Forschung auf Grund ihrer Biokompatibilität eingesetzt werden, spielt das magnetische Verhalten oft keine übergeordnete Rolle und dient nur zur besseren Handhabung (magnetische Separation in Lösung oder Beeinflussung über Gradientenfelder). Von den Herstellern war es deshalb nicht möglich, verlässliche Aussagen über magnetisches Verhalten zu bekommen, so dass sich die vorliegende Arbeit zu einem Teil mit der magnetischen Charakterisierung befasst, siehe Abschnitt 4.3.2. Für die magnetischen Untersuchungen wurden die Partikel „fluidMAG-ara“ von chemicell und teilweise „nanomag-D“ von micromod verwendet. Für das gekoppelte System aus Granat, Nanopartikeln und Zellen wurden fluidMAG-ara verwendet, da diese vom Hersteller autoklaviert und somit steril geliefert wurden. Weitere Untersuchungen zur Funktionalisierung der Partikel wurden an den fluidMAG-ara, screenMAG/G und SiMAG-cyanuric, ebenfalls chemicell GmbH durchgeführt, da diese passende, reaktive Endgruppen zur kovalenten Anbindung von Proteinen besitzen.

Abbildung 3.4 zeigt den schematischen Aufbau eines magnetischen Partikels. Dabei befinden sich ca. 10nm durchmessende magnetische Einkristalle in einer biokompatiblen Matrix, die weitere Agglomeration verhindert. Diese Matrix kann reaktive Endgruppen tragen, so dass Proteine, Wachstumsfaktoren oder andere Biomoleküle kovalent angebonden werden können. Es wurden Partikel verschiedener Größen verwendet, alle im Bereich von 50nm bis 500nm .

Laut Hersteller haben die hier zum Einsatz gekommenen Partikel alle die Eigenschaft superparamagnetisch zu sein. Dabei bestehen die **nanomag-D** aus nicht weiter spezifizierten Magnetitpartikeln, die $75 - 80\text{vol.}\%$ des Partikels einnehmen und durch eine Dextranmatrix verbunden

werden. Die Dextranhülle kann wahlweise reaktive Gruppen beinhalten, hier wurden, wenn nicht anders erwähnt, einfache Carboxylendungen verwendet. Das Gesamtpartikel soll einen mittleren Durchmesser von 250nm besitzen. Die Partikelkonzentration in der Stammlösung beträgt 10mg/ml , wobei die Teilchenanzahl $\sim 4,9 \cdot 10^{13}/\text{g}$ ist. Die Dichte der Partikel beträgt $\sim 2,5\text{g/cm}^3$. Die **fluidMAG-ara** bestehen aus Magnetitkristalliten in einer Polysaccharidmatrix mit einer Carboxylendgruppe (negativ geladene polymere Arabinsäure, ein Derivat aus gummi arabicum). Ein Partikel soll durchschnittlich 200nm groß sein. Als grobe Orientierung wird der Wert der Partikelanzahl mit $\sim 2,2 \cdot 10^{14}/\text{g}$ Partikeln angegeben, bei einer Dichte von $\sim 1,25\text{g/cm}^3$, bei einer Konzentration von 25mg/ml . Der Volumenanteil Magnetit in einem Bead beträgt 80%. Die zur kovalenten Kopplung von Biomolekülen verwendeten **SiMAG-Cyanuric** bestehen aus einem Maghemitkern, der von einer Siliziumdioxidschicht umhüllt ist. Die reaktive Endgruppe besteht aus einem chlorierten 1,3,5-Triazin. Diese Partikel wurden nicht wegen ihrer magnetischen Eigenschaften verwendet, sondern wegen des inerten Verhaltens von SiO_2 während der chemischen Reaktionen mit Proteinen und Antikörpern. Der durchschnittliche Durchmesser ist etwas größer und liegt bei $\sim 500\text{nm}$, die magnetischen Eigenschaften sind ebenfalls als superparamagnetisch angegeben.

Die chemische Formel von Magnetit ist Fe_3O_4 oder will man den Oxidationsstufen des Eisens Rechnung tragen $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4$. Gewöhnlich kristallisiert ein Molekül der Zusammensetzung AB_2O_4 als sogenannter Spinell [64]. Dabei bilden die Sauerstoffionen eine kubisch flächenzentrierte Kugelpackung (Schichtfolge ABCABC). Jedes Ion hat 12 Nachbarn, 6 in der eigenen Ebene, 3 von den jeweils anschließenden Ebenen. Pro Elementarzelle bilden die Ionen so 64 Tetraeder und 32 Oktaeder. Die *A*-Ionen besetzen davon 8 Sauerstoff-Tetraederlücken und bilden so für sich gesehen ein Diamantgitter. Die *B*-Ionen befinden sich auf 16 der möglichen Oktaederlücken [21]. Es entstehen pro Sauerstoffatom eine Bindung zu einem *A*-Ion und drei zu einem *B*-Ion. Magnetit kristallisiert allerdings als sogenannter inverser Spinell, bei dem die Tetraederplätze von dreiwertigen Ionen besetzt werden, und wird, um dies deutlich zu machen, oft notiert als $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$. Die verbleibenden dreiwertigen Ionen besetzen statistisch zusammen mit den zweiwertigen Ionen jeweils zur Hälfte die Oktaederplätze. Pro Einheitszelle kristallisieren also 32 Sauerstoffionen, 16 dreiwertige und 8 zweiwertige Eisenionen. Der Zusatz „invers“ kommt daher, dass zu Beginn die Meinung vertreten wurde, dass die Besetzung der Tetraeder- bzw. Oktaederplätze ausschließlich von der Valenz abhängig ist, so dass divalente Ionen eher vierfach koordiniert sind, trivalente sechsfach. Im vorliegenden Fall sind allerdings die vierfach koordinierten Tetraederplätze mit trivalenten Eisenionen besetzt. Zu erklären ist diese Tatsache mit dem wesentlich geringeren Durchmesser des Fe^{3+} -Ions, das sich im Gegensatz zum Fe^{2+} -Ion, auf die kleineren Tetraederplätze begibt [64]. Magnetit wird eingeordnet in dieselbe Punktgruppe $\frac{4}{m}\bar{3}\frac{2}{m}$ wie Granat, und in die Raumgruppe $Fd\bar{3}m$, oder nach Schoenflies O_h^7 .

Maghemit entsteht durch Reduktion von Magnetit und besitzt die chemische Zusammensetzung Fe_2O_3 . Es kristallisiert ebenfalls kubisch. Die O^{2-} -Ionen sitzen auf denselben Positionen

wie in der beschriebenen Spinellstruktur des Magnetits, die Fe^{3+} -Ionen sind allerdings statistisch auf die verbleibenden Tetraeder- und Oktaederplätze verteilt [64].

3.1.2.2 Magnetische Eigenschaften

Magnetit ist von seiner Kristallstruktur her ferrimagnetisch und zeigt eine spontane Magnetisierung. Das kommt daher, dass sowohl die Ionen der tetraedrischen als auch die der oktaedrischen Plätze ferromagnetisch gekoppelt sind. Beide Untergitter sind jedoch antiparallel, über Superaustausch über ein intermittierendes O^{2-} -Ion, zueinander angeordnet, entsprechend der Kopplung im Granatfilm, siehe Abbildung 3.2. Da das Gitter der Oktaederplätze allerdings doppelt so viele Ionen aufweist wie das der Tetraederplätze, resultiert eine ferrimagnetische Gesamtordnung. Die magnetische Vorzugsrichtung ist entlang der [111] Achsen, die „hard-axes“ entlang [100] [27, 74]. Die Curietemperatur liegt bei $850K$ [75]. Da Magnetit kubisch kristallisiert, sind die kubischen Anisotropiekonstanten von Bedeutung, gemäß Gleichung (3.2). Dabei gibt es eine Besonderheit zu beachten. Bei Raumtemperatur ergibt sich $K'_k = -1,35 \cdot 10^4 J/m^3$ und $K''_k = -0,44 \cdot 10^4 J/m^3$ [21, 76]. Wird die Temperatur erniedrigt, durchläuft Magnetit bei $T_V \sim 120K$ einen Verweyübergang. Dabei ändert sich die erste Anisotropiekonstante zu positiven Werten bis $\sim 1 \cdot 10^4 J/m^3$, was mit einer Änderung der magnetischen Vorzugsrichtung zu $\langle 100 \rangle$ einhergeht. Der physikalische Hintergrund des Übergangs ist noch nicht vollständig aufgeklärt [77, 78], dennoch gibt es eine wahrscheinliche Erklärung: Oberhalb von T_V sind die Fe^{3+} - und Fe^{2+} -Ionen zwar zu gleichen Anteilen, aber zufällig verteilt, da die einzelnen \downarrow -Elektronen der Fe^{2+} -Ionen, wie sie auch in Abbildung 3.2 gezeigt sind, auf allen Oktaederplätzen gleiche Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzen. Dies kommt daher, dass sowohl in Fe^{2+} - als auch Fe^{3+} -Ionen $3d^5 \uparrow$ -Atomrümpfe vorhanden sind und die Elektronen mit einer Fluktuationszeit von $10^{-12}s$ die Rümpfe wechseln [74]. Dies erklärt auch die hohe Leitfähigkeit von Magnetit [75]. Fällt nun die Temperatur unter T_V , findet ein Phasenübergang statt, begleitet von einem starken Anstieg des elektrischen Widerstands, auf Grund der Formierung einer symmetrischen Anordnung der Fe^{3+} Ionen entlang der $\langle 110 \rangle$ Richtungen innerhalb der Oktaederplätze [74], was letztlich zu uniaxialer Anisotropie führt. Dieser Übergang muss beachtet werden, wenn über die magnetischen Eigenschaften des Magnetits auf Grund verschiedener Messungen diskutiert wird.

Die magnetischen Eigenschaften des Magnetits werden, abgesehen vom Verweyübergang, empfindlich von der Temperatur und der Teilchengröße bestimmt. Denkbar sind paramagnetisches, ferrimagnetisches oder superparamagnetisches Verhalten, siehe auch Abschnitt 2.1. Paramagnetisches Verhalten tritt in Magnetit nur über der Curietemperatur auf, ist also im vorliegenden Fall nicht weiter zu beachten, da die Experimente bei 37° oder niedrigeren Temperaturen durchgeführt wurden.

Wichtig ist die prinzipielle Frage, wann ein Magnetitteilchen eine oder mehrere magnetische Domänen ausbildet, was von der Relation zwischen Streufeldenergie und Domänenwandenergie abhängt, wie bereits in Abschnitt 2.1.3 ausführlich diskutiert wurde. Für Magnetit im Speziellen

wurde herausgefunden, dass sich der Übergang bei kubischen Teilchen theoretisch bei einer Teilchengröße der Kantenlänge 76nm und experimentell bei 50nm bei Raumtemperatur befindet [27]. Ist ein Teilchen kleiner, besitzt es keine Domänenwand mehr. Oberhalb dieser Grenze besteht in dem Teilchen eine 180° Wand, die einen großen Teil des Volumens einnimmt. Daher verhalten sich solche Teilchen magnetisch eher wie MD-Partikel, basierend auf der Tatsache, dass es keine zwei Bereiche antiparalleler Magnetisierung gibt, deren Ausdehnungen die Domänenwand übertreffen.

Ob nun superparamagnetisches Verhalten auftritt, wird anhand der Messungen zu den strukturellen Eigenschaften später im Einzelfall diskutiert.

3.2 Spezielle Verfahren

Neben den üblichen Methoden wie Licht-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie, fanden einige speziellere Methoden Anwendung. Da magnetische Strukturen oder Eigenschaften nicht mittels Lichtmikroskopie sichtbar sind, wurden speziell auf dem Gebiet des Magnetismus Methoden entwickelt, um Aussagen über die Wechselwirkung der einzelnen magnetischen Systeme untereinander treffen zu können. Mittels der magnetischen Kraftmikroskopie können topographische kombiniert mit magnetischen Eigenschaften (Streufelder) untersucht werden. Die Magnetometrie liefert globale Daten, wie beispielsweise Sättigungsmagnetisierung und Koerzitivfeldstärke. Die Faradaymikroskopie als modifizierte Durchlichtmikroskopie dient zur Untersuchung der intrinsischen Magnetisierungsstruktur.

3.2.1 Magnetische Kraftmikroskopie

Die magnetische Kraftmikroskopie (MFM) wurde als Folgeentwicklung der atomaren Kraftmikroskopie (AFM) entwickelt. Das Prinzip beruht darauf, eine Probe mit einer kleinen Sonde in Kontakt zu bringen und dabei die orts- und distanzabhängigen Wechselwirkungskräfte zu detektieren. Einen Überblick über die spezielle Methodik und über die Messmodi der AFM wird beispielsweise in [79, 80] gegeben. Hier wird nur auf die spezielle Anwendung der MFM und die zugehörigen Messmodi eingegangen.

3.2.1.1 Aufbau und Funktionsweise

Als Sonde dient eine Blattfeder (Cantilever), die in den Größenordnungen einer Länge von $100\mu\text{m}$, einer Breite von $10\mu\text{m}$ und einer Höhe von $2\mu\text{m}$ liegt. Am Ende dieser Feder ist eine meist pyramidenförmige Spitze angebracht, deren Radius möglichst gering ist und im Bereich weniger nm liegt. Die Höhe dieser Spitze beträgt ungefähr $3\mu\text{m}$. Diese spezielle Sonde besteht normalerweise aus SiO_2 und wird durch Lithographiemethoden hergestellt. Für eine Messung wird die Spitze durch Annäherung in z -Richtung, senkrecht zur Oberfläche, in Kontakt mit der Probe gebracht und kann anschließend im nm -Bereich über drei Piezoelemente exakt gesteuert und über die Probe gerastert werden. Auftretende Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze führen

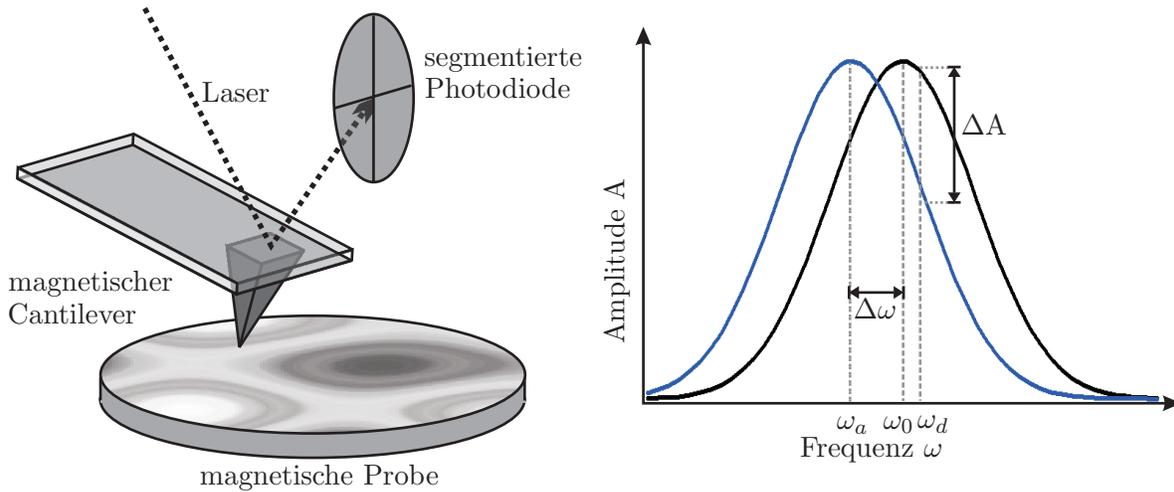


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Tapping-Modus oder der magnetischen Kraftmikroskopie.

zur Auslenkung des Cantilevers. Über einen Rückkopplungsmechanismus, der diese Auslenkung detektiert, kann der Abstand zwischen Probe und Spitze konstant gehalten werden. Ein Laserstrahl, der über der Spitze fokussiert wird und nach Reflexion auf eine segmentierte Photodiode trifft, dient der Abstandsmessung zwischen Spitze und Probe, wie in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt ist. Über die auftreffenden Intensitäten in den einzelnen Bereichen der Diode, wird die genaue Auslenkung beziehungsweise Amplitude des Cantilevers registriert. Eine andere Methode bedient sich der Interferenz zwischen einem ausgegebenen und dem nach einer bestimmten Weglänge reflektierten Laserstrahl. Über die Piezoelemente kann dann der Abstand zwischen Probe und Cantilever wieder so reguliert werden, dass der Ausgangszustand, also eine zu Anfang angegebene Kraft oder Amplitude, erreicht wird. Die dazu benötigte Spannung wird als Signal ausgegeben und korreliert direkt mit der gemessenen Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze und kann normalerweise als Topographie der Probe interpretiert werden.

Im Falle der MFM wird das Mikroskop einerseits im sogenannten Tapping-Modus, andererseits im sogenannten Lift-Modus betrieben. In beiden Fällen wird die Blattfeder in Schwingung nahe ihrer Resonanzfrequenz ω_0 versetzt,

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}, \quad (3.4)$$

mit der Federkonstanten k und der Masse m . Typische Federkonstanten liegen bei $0,5 \frac{N}{m} - 2 \frac{N}{m}$. Existiert zusätzlich eine Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche in Form einer Kraft, so führt dies zu einer Änderung der effektiven Federkonstanten k_{eff} der Spitze gemäß

$$k_{eff} = k - \partial_z F_z, \quad (3.5)$$

so dass zur ursprünglichen Federkonstanten die Kraftänderung in der z -Richtung addiert wird. Dadurch ändert sich die Resonanzfrequenz zu

$$\omega_a = \sqrt{\frac{k - \partial_z F_z}{m}} = \omega_0 \sqrt{\left(1 - \frac{\partial_z F_z}{k}\right)}. \quad (3.6)$$

So führt eine beispielsweise attraktive Kraft zu einer weicheren Federkonstante k_{eff} und damit zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz. Die gesamte Resonanzkurve verschiebt sich zu niedrigeren Frequenzen. Der Arbeitspunkt wird nun so gewählt, dass die Feder bei ω_d an einer steilen Flanke der Resonanzkurve angeregt wird, wie in Abbildung 3.5 gezeigt, so dass kleinste Veränderungen in der Federkonstante zu großen detektierbaren Veränderungen führen. Die Rückkopplung regelt nun den Abstand zwischen Probe und Spitze, so dass die Amplitudenveränderung im Vergleich zur Amplitude der freien Schwingung immer gleich, das heißt der wirkende Kraftgradient konstant bleibt.

Zu Beginn wird eine Linie im Tapping-Modus gerastert. Die detektierten Signale kommen von den repulsiven, kurzreichweitigen Wechselwirkungen zwischen den vordersten Spitzenatomen und den ersten Atomen/Molekülen der Oberfläche. Das so erhaltene Topographiebild dient nun dazu, eine weitere Messung im Lift-Modus in größerem Abstand, im Bereich von $50\text{nm} - 100\text{nm}$ durchzuführen. Nun ist keine Rückkopplung mehr vorhanden und die Spitze wird entsprechend der zuvor aufgenommenen Topographie bewegt. Im größeren Abstand zur Probe überwiegen vor allem die magnetischen Kräfte und führen zu Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe. Diese resultieren erneut in einer Verschiebung der Resonanzkurve und des Phasenverhältnisses zwischen Erreger- und Antwortschwingung. Die Phasenverschiebung α lässt sich schreiben als [81]

$$\alpha = \arctan \frac{2\gamma\omega}{\omega^2 - \omega_d^2}, \quad (3.7)$$

wenn die Auslenkung der Feder im Vergleich zu ihrer Länge klein ist. Dabei steht γ für eine Konstante, die eventuelle Einflüsse des umgebenden Mediums berücksichtigt, ω für die Frequenz der Schwingung, ω_d für die Antriebsfrequenz. Ändert sich also die Resonanzfrequenz, ergibt das eine Änderung in der Phasendifferenz, die detektiert werden kann.

In den vorliegenden MFM-Messungen wurden Wechselwirkungen als Phasenverschiebungen registriert. Diese Methode ist sehr sensitiv, so dass Phasenverschiebungen zwischen Anregung und Schwingung des Cantilevers um 1° detektierbar sind [79].

3.2.1.2 Kräfte und deren Detektierbarkeit

Zwischen zwei Körpern herrschen verschiedene Kräfte, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Reichweite in Abhängigkeit der Distanz r beider Körper unterschiedlich stark gewichtet sind. Neben den im Tapping-Modus entscheidenden, sehr kurzreichweitigen, repulsiven Kräften, die

mit $\sim \frac{1}{r^{13}}$ abfallen, sind die sogenannten Van-der-Waals-Kräfte (VdW-Kräfte) von immenser Bedeutung. VdW-Kräfte sind meist negativ und fallen im Allgemeinen im nichtretardierten Fall mit $\frac{1}{r^7}$ ab, die retardierten Kräfte mit $\frac{1}{r^8}$ [82]. Im Falle, dass sich die Anordnung nicht im Vakuum befindet, können dünne Wasserfilme oder andere Flüssigkeiten zwischen den betrachteten Körpern zu attraktiven, repulsiven oder auch verschwindenden VdW-Kräften führen [82]. Die Reichweite und Distanzabhängigkeit dieser Kräfte lassen sich allerdings nicht pauschal angeben, da sie empfindlich von den Geometrien und Entfernungen der betrachteten Körper abhängen [83]. So ergibt sich beispielsweise für eine Kugel des Radius R , die an eine Oberfläche angenähert wird, eine Kraft F zu

$$F_{VdW} = -\frac{\tilde{H}R}{6r^2}, \quad (3.8)$$

wenn $R \gg r$, beziehungsweise wenn beide Körper nicht weiter als einige wenige Nanometer voneinander entfernt sind [83]. Dabei ist \tilde{H} die materialabhängige, nichtretardierte Hamakerkonstante. Der andere Grenzfall, bei dem sich die Kugel weit entfernt von der Oberfläche befindet, $R \ll r$, ergibt sich [82, 83]:

$$F_{VdW} = -\frac{\tilde{H}R^3}{6\pi r^4}, \quad (3.9)$$

so dass die VdW-Kräfte in größerem Abstand zur Oberfläche kurzreichweitiger sind, als in kleinem Abstand. Einen Ansatz, der etwas genauer die Geometrie der Spitze beinhaltet, findet man in [84]. Dort wird die Spitze als ein Kegel mit bestimmtem Öffnungswinkel und einer aufgesetzten, sphärischen Spitze parametrisiert. Die genaue Formel für die VdW-Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Spitze ergibt sich dann aber zu keinem reinen Potenzgesetz, sondern besteht aus wesentlich komplizierteren Termen, in Abhängigkeit vom Öffnungswinkel, von der Distanz und dem Radius der Spitze.

Wie später gezeigt wird, hat man die Möglichkeit, bei der MFM in größerem Abstand Spitze-Oberfläche die kurzreichweitigen repulsiven Kräfte und die VdW-Kräfte gegenüber den magnetischen Kräften zu trennen. Im oben beschriebenen Lift-Modus führen hauptsächlich die magnetischen Wechselwirkungen zu einem Kontrast im Phasenbild [79]. Während im Falle der ersten Messung, im Nahbereich der Probe, die starken, repulsiven Kräfte ausschlaggebend für die Topographieinformationen sind, bilden die magnetischen Kräfte die Grundlage der Kontrastentstehung in der darauffolgenden Messung, die in größerem Abstand durchgeführt wird.

Ein Problem der magnetischen Kraftmikroskopie ist, dass die Sonde die Probe (oder umgekehrt), stärker als bei anderen Messmethoden, beeinflussen kann. Diese Beeinflussung kann sehr stark werden, wenn sich, wie bei der MFM der Fall, beide Körper recht nahe kommen, so dass Ummagnetisierungseffekte auftreten, was eine theoretische Analyse der Daten fast unmöglich macht. Dies tritt auf, sobald das magnetische Streufeld H_S der Probe das Anisotropiefeld H_A der Spitze (oder umgekehrt) übersteigt. Man kann Grenzwerte definieren, für die eine allzu starke

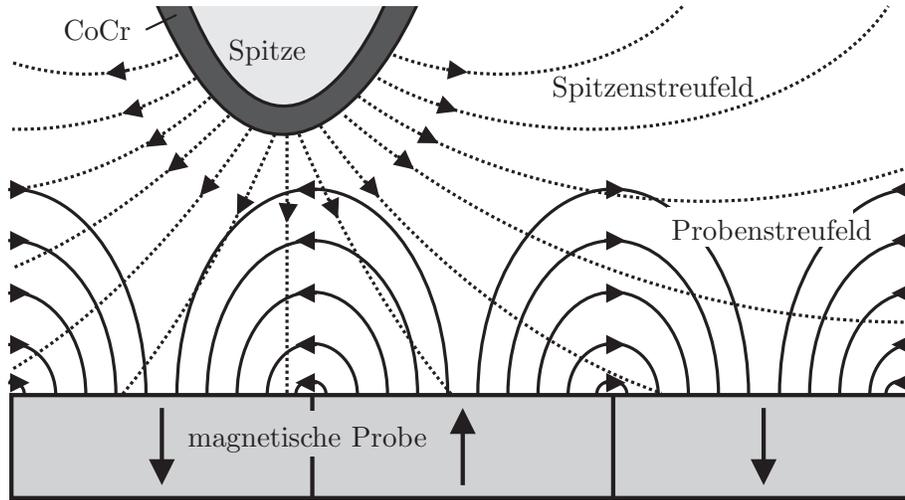


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen magnetischer Probe und magnetischer Spitze während einer MFM-Messung. Das magnetische Material des Spitzenüberzugs besteht beispielsweise aus Kobalt-Chrom. Detektierbar sind nur die Streufelder, die von der Probe ausgehen, nicht die magnetische Struktur an sich.

Beeinflussung ausgeschlossen werden kann:

$$\begin{aligned} H_S^{Spitze} &< H_A^{Probe} \\ H_S^{Probe} &< H_A^{Spitze}. \end{aligned} \quad (3.10)$$

In der unmittelbaren Oberfläche eines magnetischen Substrats ist das Streufeld beschreibbar durch

$$H_S = \frac{M_S}{2}, \quad (3.11)$$

mit der Sättigungsmagnetisierung M_S des Substrats. Somit ergibt sich die Abschätzung, die für nichtdestruktive MFM gelten muss, zu [85]

$$\frac{H_A^{Spitze}}{M_S^{Probe}} \geq 1 \text{ und } \frac{H_A^{Probe}}{M_S^{Spitze}} \geq 1. \quad (3.12)$$

Bei einer Messung wechselwirkt das Streufeld der Probe mit dem magnetischen Moment der Spitze, wie in Abbildung 3.6 gezeigt wird und erzeugt repulsive oder attraktive Kräfte gemäß

$$\mathbf{F} = \mu_0 \nabla (\mathbf{m} \cdot \mathbf{H}_S), \quad (3.13)$$

wenn \mathbf{m} das magnetische Moment ist, das sich aus der Summe der Dipolmomente ergibt, μ_0 die magnetische Permeabilität und H_S das Streufeld der Probe ist. Die Interpretation der gewonnen-

en Daten wird zusätzlich dadurch erschwert, dass es auf die Spitzenpräparation ankommt, wie die Spitze mit magnetischem Material beschichtet wird und wie die Domänenkonfiguration am Ende der Spitze ausfällt. Prinzipiell lässt sich sagen, dass die bevorzugte Richtung der Spitzenmagnetisierung auf Grund der herrschenden Formanisotropie in Richtung der Spitzenachse liegt. Dennoch bewegt man sich meistens zwischen zwei Grenzfällen, bei denen der eine die Annahme einer im Gegensatz zu den Dimensionen des Streufeldes kleinen Enddomäne beinhaltet. Diese Domäne wird rechnerisch als ein einzelner magnetischer Dipol mit Dipolmoment \mathbf{m} betrachtet, so dass sich die Kraft nach Gleichung (3.13) zu [79, 86]

$$\mathbf{F}^{Dipol} = \mu_0(\mathbf{m} \cdot \nabla)\mathbf{H}_S \quad (3.14)$$

ergibt, wenn davon ausgegangen wird, dass das Streufeld rotationsfrei ist. So wird in diesem Fall also die örtliche Variation des Streufelds gemessen. Der andere Grenzfall besteht in einer Domäne am Spitzenende die groß im Vergleich zu den Streufelddimensionen ist. Nun spielt nur der vordere Teil dieser Domäne bei der Wechselwirkung mit der Probe eine Rolle, was zu einer Monopolnäherung mit der magnetischen Ladung q führt [79, 86]. Dann ergibt sich für die Wechselwirkung

$$\mathbf{F}^{Monopol} = \mu_0 q \mathbf{H}_S, \quad (3.15)$$

so dass nun lediglich das Streufeld an sich zu einem Kontrast in der Messung führt. Eine Spitze ist also sensitiv auf den Streufeldgradienten der Probe, wenn sich das Streufeld über die Länge der Spitze nicht wesentlich ändert und sensitiv auf das Streufeld, wenn die Spitze viel größer als die Reichweite des Streufeldes ist. Genauere Analysen zu der Wechselwirkung magnetischer Spitzen mit magnetischen Oberflächen, findet man in [86].

Die minimal detektierbaren Kräfte liegen durch den Messprozess bei [79]

$$\partial_z F_{min} = \frac{1}{\delta} \left(\frac{4k\beta k_B T}{\omega_0 Q} \right)^{1/2}, \quad (3.16)$$

mit der thermischen Energie $k_B T$. δ ist der quadratische Mittelwert der Amplitude, Q die Güte und β die Bandbreite der Messung. Typische Werte liegen bei $10^{-4} - 10^{-5} N/m$ [79].

Abschließend lässt sich sagen, dass es in vielen Fällen sehr schwierig ist, quantitative Informationen durch MFM zu erhalten. Selbst bei qualitativen Ergebnissen muss man Vorsicht walten lassen, um nicht zu falschen Interpretationen zu gelangen, die auf destruktiver Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe basieren, beziehungsweise auf falschen Annahmen über die magnetischen Beschaffenheiten der Probe und Sonde gestützt sind. Selbst wenn diese Störfaktoren beherrscht werden, muss man sich der Einschränkung bewusst sein, dass nicht die intrinsische magnetische Struktur an sich untersucht werden kann, sondern nur das von ihr ausgehende Streufeld. Eine Herangehensweise an das Problem, findet man in [86].

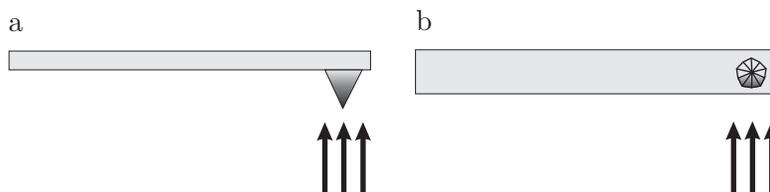


Abbildung 3.7: Beim Aufbringen von magnetischem Material wurde die Spitze einerseits a) senkrecht beschichtet, andererseits b) nur von einer Seite.

3.2.1.3 Spitzenpräparation

Um bestimmte Untersuchungen mittels AFM oder MFM durchzuführen, kann gelegentlich kein handelsüblicher Cantilever verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für reine Topographieuntersuchungen mittels AFM unmodifizierte Cantilever (μ masch, Wilsonville, USA) verwendet. Diese besaßen Resonanzfrequenzen im Bereich von 70kHz und Federkonstanten von $3,5\text{N/m}$ für Verwendung im Tapping-Modus, wie oben beschrieben. Für den Kontaktmodus, bei dem die Spitze nicht in Schwingung versetzt wird, sondern im konstanten Abstand über die Probe gerastert wird, wurden Spitzen im Bereich von 12kHz und $0,15\text{N/m}$ verwendet. Die Spitzen hatten einen effektiven Radius von $10\text{nm} - 20\text{nm}$.

Für MFM-Untersuchungen wurden Cantilever für den Tapping-Modus verwendet und anschließend mit einer magnetischen Schicht überzogen. Für verschiedene Proben müssen, angelehnt an Gleichung (3.12), verschiedene magnetische Eigenschaften der Spitze beachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden als magnetische Materialien zwecks Beschichtung der Spitzen Permalloy, $\text{Ni}_{81}\text{Fe}_{19}$, und eine Kobalt-Chrom-Legierung, $\text{Co}_{85}\text{Cr}_{15}$, verwendet. Zur besseren Haftung des magnetischen Materials wurden die obersten oxidierten SiO_2 -Schichten vom Cantilever mittels Ionenätzanlage entfernt. Anschließend wurde das magnetische Material durch einen Sputterprozess aufgebracht. Neben der senkrechten Beschichtung wurden Cantilever auch seitlich besputtert, wie in Abbildung 3.7 gezeigt.

Beim senkrechten Sputterprozess, beim dem die Beschichtungsrichtung entlang der Spitzenachse gewählt wurde, betrug die Dicke der magnetischen Schicht 30nm , in folgenden Diskussionen „Standard-CoCr-Cantilever“ genannt. Es wurde ausschließlich Kobalt-Chrom verwendet. Bei dem seitlichen Sputterprozess wurden Schichtdicken von 20nm aufgebracht, entweder Permalloy oder die Kobalt-Chrom-Legierung.

3.2.2 Magnetometrie

Zur Ergänzung der Technik der magnetischen Kraftmikroskopie bietet es sich an, weitere Methoden, denen die globalen Eigenschaften, wie Sättigungsmagnetisierung, Koerzitivfeldstärke etc. zugänglich sind, anzuwenden. Im Folgenden werden die prinzipiellen Funktionsweisen eines SQUIDs (Semiconductor Quantum Interference Device) und eines Vibrationsmagnetometers (Vibrating Sample Magnetometer, VSM) erläutert. Diese wurden dazu verwendet, die Granatfil-

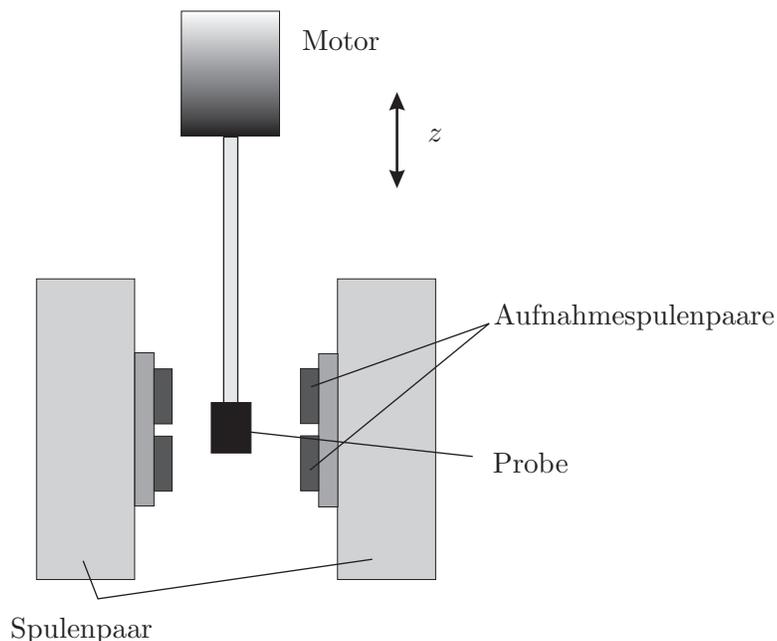


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Vibrationsmagnetometers.

me sowie die magnetischen Partikel in Bezug auf ihr magnetisches Verhalten zu charakterisieren.

3.2.2.1 Vibrationsmagnetometrie

Die Funktionsweise des Vibrationsmagnetometers² besteht darin, eine Probe mit magnetischem Moment m (induziert oder bereits vorhanden) periodisch in z -Richtung zu bewegen [87]. Durch die dadurch auftretenden magnetischen Flussänderungen, wird in Aufnahmespulen, die die Probe senkrecht zu z , wie in Abbildung 3.8 gezeigt, umgeben, eine zeitlich oszillierende Spannung U_{ind} induziert, der Form [88]

$$U_{ind} = cm \frac{dz}{dt}, \quad (3.17)$$

wobei c die intrinsische Kopplungskonstante darstellt, die von der Beschaffenheit der Spulen abhängt. Diese Spannung ist proportional zur Probenmagnetisierung und kann ausgelesen werden. Desweiteren befinden sich um die Anordnung herum weitere, größere Spulen, die es ermöglichen, die Probe zu magnetisieren. Es können Felder von bis zu $2T$ erreicht werden. Eine Hallsonde dient dazu, die angelegten Felder direkt zu kontrollieren. Sofern man die genaue Bewegungsfunktion der Probe kennt, kann somit direkt auf die Magnetisierung der Probe in Abhängigkeit eines äußeren Feldes geschlossen werden.

Der Vorteil dieses Geräts liegt darin, dass die Probe in einer festen Umgebung vibriert wird.

²Die Magnetometermessungen wurden in der AG Prof. Dr. Birringer, Universität des Saarlandes, mit Hilfe von Herrn S. Monz durchgeführt.

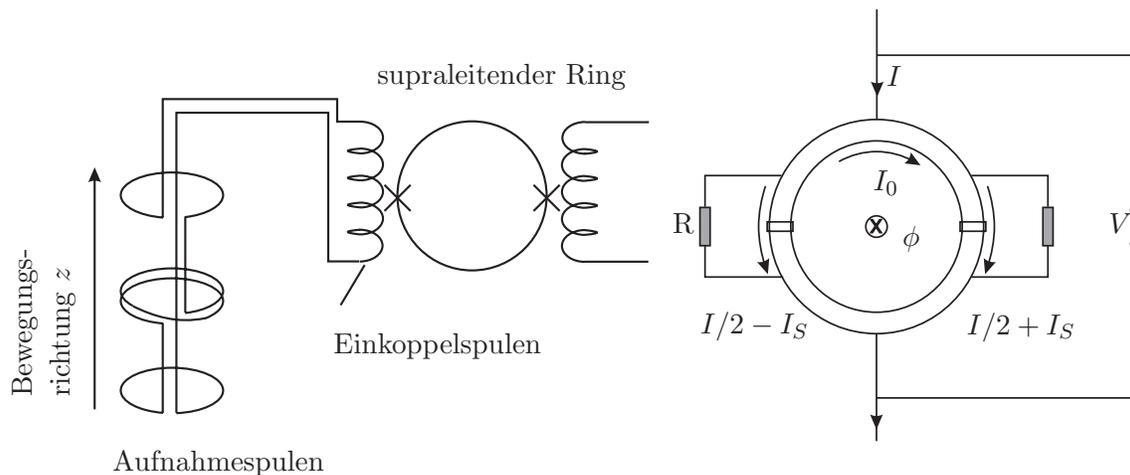


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines SQUIDs.

Im Gegensatz zu Geräten, bei denen Magnetfelder bei feststehender Probe variiert werden, spielen Feldinhomogenitäten oder Einflüsse durch induzierte Wirbelströme in der Probenumgebung (Ummantelung etc.) keine Rolle [87]. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei der Detektion magnetischer Momente von $10^{-5} Am^2$.

3.2.2.2 SQUID

Die Funktionsweise eines SQUIDs beruht darauf, dass magnetisches Material den örtlichen magnetischen Fluss ϕ ändert, sobald es bewegt wird. Bei dem verwendeten dc-SQUID³ wird die Flussänderung mittels eines Gradiometers zweiter Ordnung aufgenommen, das aus vier Leiter Schleifen besteht. Dabei sind die Äußeren den Inneren entgegengesetzt gewickelt, wie in Abbildung 3.9 gezeigt. Somit wird gewährleistet, dass magnetische Störungen, die von der Umgebung ausgehen, kompensiert werden. Das Gradiometer ist sensitiv auf die zweite örtliche Ableitung der magnetischen Flussdichte $\partial_z^2 B_z$ [89].

Eine Probe mit einer Magnetisierung ruft durch Bewegung eine Flussänderung hervor, die wiederum einen Strom in den Aufnahmespulen generiert. Dieser Strom erzeugt über Einkoppelspulen in einem supraleitenden Ring einen äußeren Fluss ϕ_a . Eine wichtige Voraussetzung ist, dass in einem supraleitenden Ring der magnetische Fluss quantisiert vorliegt [89, 90], das heißt, es können sich nur Vielfache des elementaren Flussquants $\phi_0 = h/2e = 2,07 \cdot 10^{-15} Vs$ darin befinden. h steht für das Plancksche Wirkungsquantum, e für die Elementarladung. Ändert sich der von außen eingespeiste Fluss in nichtganzzahligen Vielfachen des Flussquants, so generiert dieser einen Suprastrom I_S im Ring der zur Erhaltung der Flussquantisierung führt. Es existiert im gesamten Ring der Fluss

³Die Messungen wurden im SQUID der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ziemann, Universität Ulm, mit Hilfe von Herrn Dr. J. Eisenmenger durchgeführt.

$$\phi_{Ges} = n\phi_0 = \phi_a + LI_S, \quad (3.18)$$

wobei L der Induktivität des Rings entspricht. Der magnetfeldabhängige Strom I_S ist in einem normalen supraleitenden Ring schwer zu detektieren, weshalb im vorliegenden dc-SQUID zwei Josephsonkontakte [90] eingebaut sind, die als Tunnelbarrieren dienen und jeweils einen kritischen Strom I_0 besitzen [89]. Bei Betrieb des SQUIDs mit Gleichstrom, der höher als der maximale, kritische Strom $2I_0$ ist, fällt durch die Josephsonkontakte eine messbare, elektrische Spannung ab. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, entsteht ein Stromungleichgewicht an den beiden Kontakten, indem einmal der im Ring fließende Suprastrom I_S addiert, ein anderes mal subtrahiert wird, gemäß $I_1 = \frac{I}{2} + I_S$ und $I_2 = \frac{I}{2} - I_S$. In Abhängigkeit des kritischen Stroms I_0 wird der Ring an einem der Kontakte normalleitend, sobald $I_1 = \frac{I}{2} + I_S = I_0$. In diesem Moment kann ein Flussquant in den Ring eintreten, womit sich das Vorzeichen des im Ring fließenden Suprastroms ändert (fließt in die entgegengesetzte Richtung).

Sofern die Josephsonkontakte so gewählt werden, dass der kritische Strom gerade dann erreicht wird, wenn $LI_0 = \frac{\phi_0}{2}$ ergibt, werden Hystereseeffekte vermieden, da dann während der Flusserrhöhung innerhalb des Rings im Vergleich zur Flusserrniedrigung bei gleichen Werten ein Flussquant am ersten Kontakt eintreten beziehungsweise am zweiten Kontakt austreten kann [89]. Durch geeignete, empfindliche Ausleseverfahren können nun Flussänderungen, die kleiner als ein ganzes Flussquant sind, detektiert und in Messsignale umgewandelt werden.

3.2.3 Faradaymikroskopie

Bei der Faradaymikroskopie nutzt man den Effekt, dass die Polarisationssebene linear polarisierten Lichts, das eine magnetische Substanz durchläuft, in ihrer Richtung gedreht wird [17, 91].

Allgemein gilt für die dielektrische Verschiebungsdichte \mathbf{D} beim Auftreffen eines elektrischen Feldes \mathbf{E} auf Materie

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \hat{\epsilon} \mathbf{E}, \quad (3.19)$$

wobei $\hat{\epsilon}$ die dielektrische Funktion der Materie und ϵ_0 die Permittivität des Vakuums sind. Betrachtet man Medien, die magnetisch sind, beispielsweise Granatfilme, kann ϵ nicht als Skalar angesehen werden, da dann die elektrische Feldstärke \mathbf{E} und die elektrische Verschiebungsdichte \mathbf{D} nicht mehr gleich gerichtet sind [61]. ϵ muss nun als Tensor zweiter Stufe angesehen werden. Da in dieser Arbeit nur magnetisch uniaxiale, senkrecht zur Oberfläche magnetisierte Granatfilme untersucht wurden, beziehen sich folgende Rechnungen auf eine Magnetisierung, die ausschließ-

lich eine Komponente in z-Richtung aufweist. $\hat{\epsilon}$ kann somit angegeben werden [92]:

$$\hat{\epsilon} = \begin{pmatrix} \epsilon & i\epsilon Q & 0 \\ -i\epsilon Q & \epsilon & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon' \end{pmatrix}. \quad (3.20)$$

ϵ' ist hierbei die Dielektrizitätskonstante, die das Material im nichtmagnetisierten Zustand besitzt und Q ist der magnetooptische Koeffizient, der sich aus dem materialspezifischen Polarisations- und Leitfähigkeitstensor ableitet [92].

Betrachtet man desweiteren die Maxwellgleichungen zusammen mit den Fouriertransformationen vom Orts- in den Frequenzraum des Nablaoperators $\nabla \leftrightarrow ik$ und der partiellen Zeitableitung $\frac{\partial}{\partial t} \leftrightarrow -i\omega$, ergibt sich unter Verwendung der Definition des komplexen Brechungsindex $N = \frac{|k|}{k_0}$ und der Dispersionsrelation im Vakuum $k_0 = \frac{1}{c}\omega = \sqrt{\mu_0\epsilon_0}\omega$ die Wellengleichung für anisotrope Körper zu

$$N^2(\mathbf{E} - \mathbf{e}_k(\mathbf{E} \cdot \mathbf{e}_k)) = \hat{\epsilon}\mathbf{E}, \quad (3.21)$$

wobei \mathbf{e}_k der normierte Richtungvektor des Wellenvektors \mathbf{k} ist.

Betrachtet man ebene Wellen der Form $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - i\omega t)$ der Frequenz ω und der Ortskoordinate \mathbf{r} , deren Ausbreitungsrichtung parallel zur senkrechten Magnetisierung des Granatfilms verläuft, ergeben sich folgende Lösungen aus der oben genannten Wellengleichung:

$$N_{\pm}^2 = \epsilon \pm \epsilon Q, \quad (3.22)$$

$$E_y = \pm iE_x. \quad (3.23)$$

Gleichung (3.23) ergibt eine Phasenverschiebung von $\frac{\pi}{2}$ zwischen der x-Komponente und der y-Komponente, was gerade zu einer zirkular polarisierten Welle führt, entweder eine rechtszirkular polarisierte (+) oder eine linkszirkular polarisierte Welle (-).

Unter Ausnutzung der Identität $\mathbf{k} = \frac{N}{c}\omega$, wobei c die Lichtgeschwindigkeit darstellt, und Verwendung der Gleichung (3.22), ergibt sich schließlich die aus dem Medium austretende Welle zu

$$\mathbf{E}_{\pm} = \begin{pmatrix} E_x \\ E_x \exp i\frac{\pi}{2} \\ 0 \end{pmatrix} \exp\left(i\omega \left(\frac{z}{c}\Re(N_{\pm}) - t\right)\right) \exp\left(-\frac{\omega z}{c}\Im(N_{\pm})\right). \quad (3.24)$$

\Re und \Im stehen für Realteil beziehungsweise Imaginärteil.

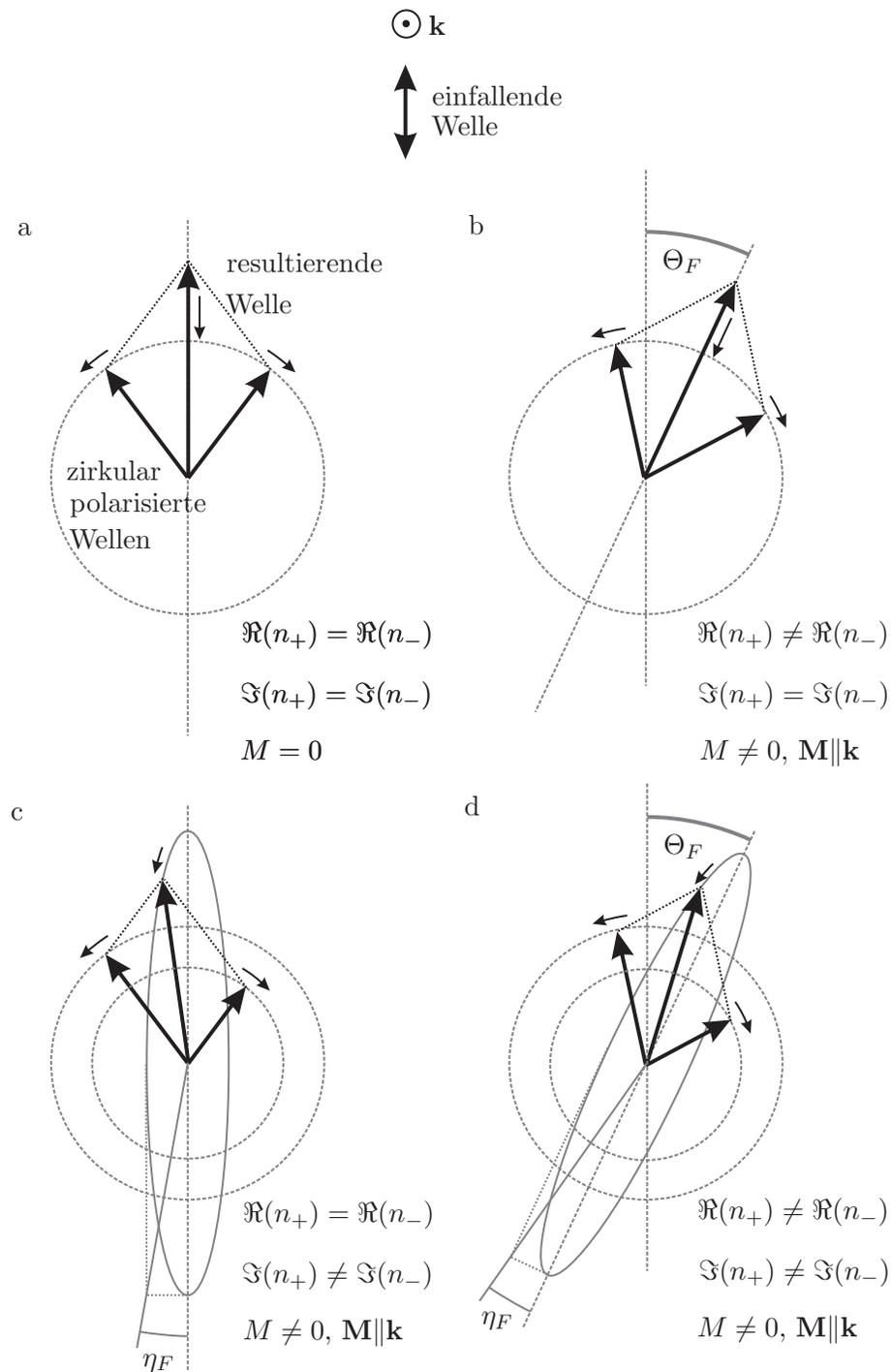


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Faradayeffektes. a) Schwingungsebene der resultierenden Welle ist ohne Substratmagnetisierung ($T > T_C$) äquivalent zur Schwingungsebene der einfallenden Welle. b) Bei vorhandener Magnetisierung besitzen die rechts- und linkszirkular polarisierten Wellen eine Phasendifferenz, so dass die Schwingungsebene der resultierenden Welle um den Faraday-Winkel Θ_F gedreht wird. c) Propagieren die zirkular polarisierten Wellen zu unterschiedlichen Anteilen, aber ohne Phasendifferenz, ist die resultierende Welle elliptisch mit der Elliptizität η_F polarisiert, wobei die Hauptachse in der Polarisationssebene der einfallenden Welle liegt. d) Im Allgemeinen propagieren die zirkular polarisierten Wellen zu unterschiedlichen Anteilen mit einer Phasendifferenz. Die Hauptachse der resultierenden, mit η_F elliptisch polarisierten Welle ist um den Faraday-Winkel Θ_F aus der Ebene der einfallenden Welle gedreht.

Linear polarisierte Wellen können mathematisch als zwei gegensinnig laufende, zirkular polarisierte Wellen beschrieben werden [18]. Umgekehrt können zwei zirkular polarisierte Wellen, wie sie Gleichung (3.24) darstellt, zu einer linear polarisierten Welle zusammengesetzt werden, sobald sie das Material verlassen, Abbildung 3.10 (a). Da die beiden zirkularen Wellen unterschiedliche Laufzeiten c/N_+ und c/N_- besitzen, ergibt sich eine Phasenverschiebung, die beim erneuten Zusammensetzen zu einer linear polarisierten Welle zu einer im Vergleich zur Ursprungswelle gedrehten Polarisationssebene führt, Abbildung 3.10 (b). Der Phasenunterschied $\Delta\phi$ beider zirkularer Wellen beträgt nun nach Vergleichen von \mathbf{E}_+ mit \mathbf{E}_-

$$\Delta\phi = \frac{\omega z}{c} \Re(N_+ - N_-), \quad (3.25)$$

wobei z die Länge des im Medium zurückgelegten Wegs ist. Der Rotationswinkel oder die Faradayrotation Θ_F ist folglich die Hälfte der Phasenverschiebung und somit

$$\Theta_F = \frac{\omega z}{2c} \Re(N_+ - N_-). \quad (3.26)$$

Sollten beide zirkular polarisierten Wellen unterschiedlich stark gedämpft werden, wie es im Allgemeinen der Fall ist, sind die Amplituden nach Verlassen des Materials unterschiedlich groß. So ergibt die Differenz der beiden Dämpfungsterme die Elliptizität

$$\eta_F = -\frac{\omega}{2c} \Im(N_+ - N_-) \quad (3.27)$$

des anschließend wieder kombinierten Lichts, Abbildung 3.10 (c). Im Allgemeinen ist der komplexe Brechungsindex \mathbf{N} unterschiedlich für beide zirkular polarisierten Wellen, sowohl im Imaginärteil als auch im Realteil, so dass sich beim Faradayeffekt für linear polarisiertes Licht beim Durchlaufen eines zur Ausbreitungsrichtung parallel magnetisierten Stoffes eine elliptische Polarisation ergibt, deren Hauptachse gegenüber der Schwingungsebene der einfallenden Welle gedreht ist, Abbildung 3.10 (d).

In nichtmagnetischen Materialien bei äußerem Magnetfeld ist der Faradayeffekt nicht sehr stark ausgeprägt. Bei einer Probendicke von 1cm erhält man eine Rotation von einigen Grad bei einer Feldstärke von $10^5\text{A/m} - 10^6\text{A/m}$. Bei ferromagnetischen Proben hingegen erreicht man Rotationen um $\sim 10^4 \frac{\circ}{\text{cm}} - 10^6 \frac{\circ}{\text{cm}}$ bei Stärken kleiner 10^5A/m für Wellenlängen im sichtbaren Bereich [61]. Schickt man linear polarisiertes Licht durch die Granatschicht, so hat der ausfallende, elliptisch polarisierte Strahl eine um Θ_F gedrehte Hauptachse. Bei umgekehrter Magnetisierung, wie dies in benachbarten Domänen der Fall ist, tritt der Effekt in die andere Richtung auf, so dass die Hauptachse des austretenden Strahls um $-\Theta_F$ gedreht ist. Eine geeignete Analysatorstellung (ebenfalls ein Folienpolarisator), zum Beispiel um $90^\circ + \Theta_F$ gegenüber des Polarisators, erlaubt nun weitestgehende Auslöschung des Lichts, das durch eine Domäne wandert, wobei Licht, das die antiparallele Magnetisierung durchläuft, zu größerem Teil den Analysator passieren kann. Somit ergibt sich ein Hell-Dunkel-Kontrast, der mit der Magnetisierungsrichtung korreliert.

3.3 Präparation

Um die durchgeführten Versuche reproduzierbar dokumentieren zu können, wurden einige Protokolle und Vorgehensweisen zusammengetragen, die die standardisierten Bedingungen beinhalten. Im Folgenden werden die erfolgreich angewendeten Protokolle und verwendeten Stoffe und Chemikalien sowie die verschiedenen Zelltypen, die zum Einsatz kamen, genannt.

3.3.1 Zellkultur

Zum Testen der einzelnen Systemkomponenten, wie magnetische Beads, Granatschichten etc., wurden etablierte Zelllinien verwendet, einerseits Fibroblasten und andererseits Osteoblasten. Beide Linien zeichnen sich durch robustes Wachstum, geringe Mediansanforderungen und dennoch hohe Reaktionsfähigkeit bezüglich sich verändernder Substrateigenschaften aus. Durch den hochdynamischen Auf- und Abbau des Zytoskeletts bietet sich den Zellen die Möglichkeit, sich gut an verschiedene Umgebungen zu adaptieren.

MG63-Osteoblasten

Die osteoblastenähnliche Zelllinie MG63 (ATCC, CRL-1427, England) aus humanem Osteosarkom, wurde, wenn nicht anders genannt, unter normalen Zellkulturbedingungen bei 37° und 5% CO_2 kultiviert. Als Medium wurde D-MEM High-Glucose (4,5g/l) unter Zugabe von 10% FBS (Foetal Bovine Serum, Standard Quality), 1% Penicillin/Streptomycin und 100mg/l Natrium Pyruvat verwendet. Alle Substanzen wurden von PAA Laboratories, Pasching, Österreich, bezogen.

L929-Fibroblasten

Fibroblasten aus der Maus L929 wurden in RPMI 1640 Ready Mix Medium mit L-Glutamin kultiviert, ebenfalls unter Standard Kulturbedingungen, wenn nicht anders genannt⁴. Auf weitere Zusätze, wie Antibiotika wurde verzichtet.

Wurden Zellen in der Klimakammer kultiviert, wurde zuvor 1-molare 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) angesetzt (PAA Laboratories) und im Verhältnis 1:40 dem Medium beigemischt. Dieses dient anstelle des 5%igen CO_2 der Mediumspufferung zum Schutz vor Übersäuerung.

3.3.2 Partikelfunktionalisierung

Die reaktiven Endgruppen der Partikel ermöglichen eine kovalente Kopplung biologisch wirksamer Moleküle an die Oberfläche der Partikel. Somit können ganz gezielt Areale biochemisch verändert werden, wenn die magnetischen Partikel nach der Funktionalisierung in kontrollierten Mustern an eine Substratoberfläche angebunden werden. Es werden zwei Methoden beschrieben,

⁴Die Zellen wurden freundlicher Weise vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

die sich als geeignet herausgestellt haben, stabile Kopplungen zwischen Biomolekül und Partikel zu erhalten.

Nach jedem Reaktionsschritt können die Partikel mittels eines Magneten separiert und von der Reaktionslösung getrennt werden. Anschließend vorsichtige Resuspension durch mehrmaliges Einziehen und Auslassen der Partikel in eine μl -Pipette trennt die einzelnen Teilchen wieder, so dass der nächste Schritt durchgeführt werden kann. Ungefähre Mengenangaben wurden den Informationen der Firma chemicell GmbH entnommen und entsprechend angepasst.

3.3.2.1 Carbodiimid-Methode

Bei der Carbodiimidmethode handelt es sich um eine Zwei-Stufen-Reaktion, bei der eine reaktive Carboxylgruppe COO^- zuerst aktiviert werden muss. Anschließend kann ein Biomolekül, welches eine Aminogruppe NH_2 aufweist, unter Abscheidung eines Harnstoffderivates angekoppelt werden. Dies dient zur spezifischeren Reaktion und weitestgehenden Verhinderung reiner Adsorption. Als Ausgangspartikel dienten die fluidMAG-ara. Das Protokoll dient der Funktionalisierung von $\sim 10\text{mg}$ Partikeln mit $\sim 50\mu\text{g}$ biologisch wirksamem Material (Protein, Wachstumsfaktoren).

- $3x$ waschen der Partikel in 3ml PBS (Phosphate Buffered Saline Solution, $\text{pH} = 7,4$).
- Resuspension in $0,25\text{ml}$ PBS.
- Ansetzen des Carbodiimids: 10mg 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in $0,25\text{ml}$ PBS lösen.
- Das Carbodiimid der Partikellösung hinzugeben und 15min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln reagieren lassen.
- $3x$ waschen der Partikel in 3ml PBS und resuspendieren in $0,25\text{ml}$ PBS.
- Lösen des biologisch wirksamen Materials (Protein) in 1ml PBS.
- Hinzugabe zu den Partikeln und 1h unter gelegentlichem Schütteln reagieren lassen.
- $3x$ waschen der Partikel und resuspendieren in Puffer (PBS, $0,1\%$ BSA (Bovine Serum Albumin), $0,05\%$ Natrium Azid).

In Abbildung 3.11 (a) ist die Reaktion in einzelnen Schritten schematisch dargestellt. Nach der Aktivierung der Carboxylgruppe des fluidMAG-ara Partikels wird das Biomolekül kovalent an die Partikelmatrix angebunden.

3.3.2.2 Autoreaktive Methode

Eine einfachere Methode besteht aus einer autoreaktiven Reaktion zwischen der Aminogruppe des Proteins beziehungsweise Wachstumsfaktors und der reaktiven Gruppen des magnetischen

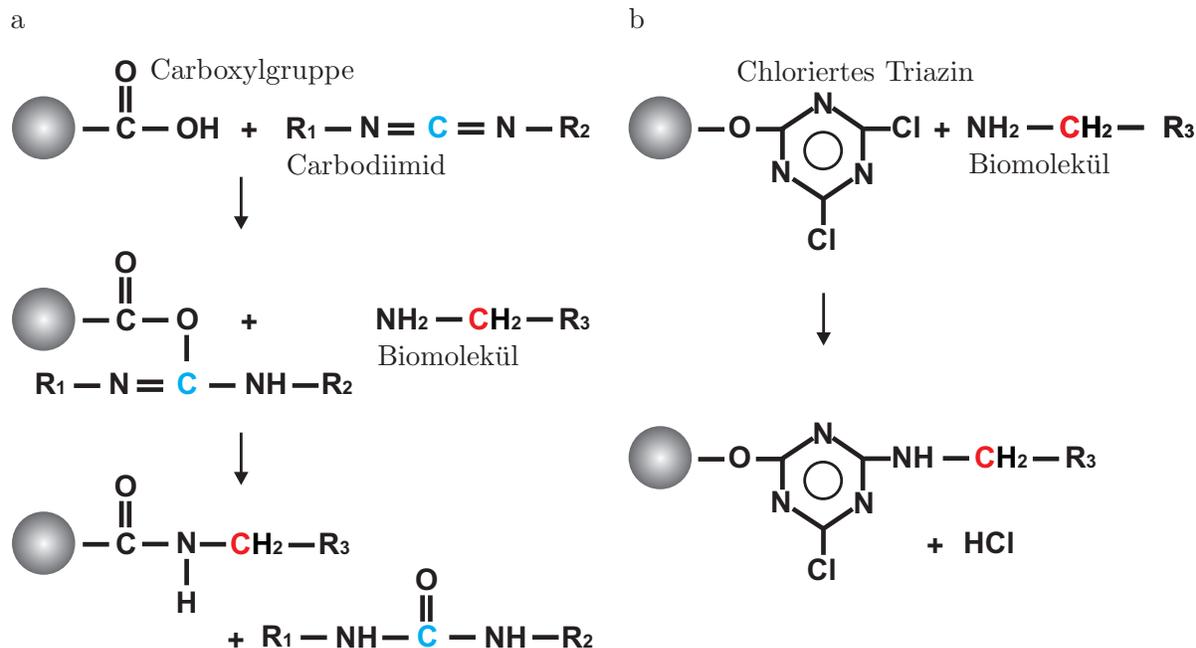


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der kovalenten Kopplung von biologisch aktiven Molekülen an magnetische Partikel mit reaktiven Gruppen. Die R_i stehen für an der Reaktion nicht beteiligte organische Teile der Moleküle. a) Carbodiimid wird zur Aktivierung der Carboxylgruppe verwendet. Anschließend reagiert die Aminogruppe des Biomoleküls mit der aktivierten Gruppe unter Entstehung eines Harnstoffderivates. b) Autoreaktive Verbindung des Biomoleküls mit dem 1,3,5-Triazin des Partikels unter Abspaltung von Salzsäure.

Partikels. Hierzu wurden die SiMAG-cyanuric mit einem chlorierten 1,3,5-Triazin verwendet. Das Protokoll bezieht sich auf die Funktionalisierung von 50mg Partikeln mit $50\mu\text{g}$ Protein.

- 3x Waschen der Partikel
- Resuspendieren der Partikel in $0,25\text{ml}$ PBS.
- Lösen des biologisch wirksamen Materials (Protein) in 1ml PBS.
- Hinzugabe zu den Partikeln und unter gelegentlichem Schütteln (Schüttelplatte) über Nacht reagieren lassen.
- Zugabe von Blocking-Puffer zur Inaktivierung überschüssiger Bestandteile, PBS, 2% BSA, 0,05% Natrium Azid.

Abbildung 3.11 (b) zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion, bei der die Aminogruppe direkt mit dem Triazin unter Abspaltung von Salzsäure reagiert.

3.3.3 Histologische und immunchemische Färbungen

Da einzelne Zellmonolagen im Lichtmikroskop nicht genügend Kontrast zwischen einzelnen Zellkompartimenten ausweisen, bietet es sich an, Färbemethoden anzuwenden. Dabei können einer-

seits einfache und schnell durchzuführende Standardmethoden der Zellpräparatfärbung angewendet werden, die zum schnellen Überblick über eine Probe führen und zuverlässig durchzuführen sind. Hierzu zählt die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die dazu dient, Zellen hauptsächlich im Phasenkontrastmikroskop klarer darzustellen, wobei eine farbliche Unterscheidung der Zellkerne vom Zytoplasma erfolgen soll. Andere, selektivere Färbungen, wie beispielsweise die immunchemische Tubulin- und Aktinmarkierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen sowie Kontrollfärbungen funktionalisierter Partikel, erweisen sich hingegen nicht als Standard.

3.3.3.1 Zellpräparatfärbung

Eine in der Histologie weit verbreitete Methode zur Anfärbung von Gewebedünnschnitten, ist die sogenannte Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Neben dieser Anwendung, bietet es sich ebenfalls an, Zellmonolayer anzufärben. Es handelt sich um eine progressive Färbemethode, was bedeutet, dass das Präparat so lange in der Farbstofflösung verbleibt, bis genügend Kontrast entstanden ist. Im Gegensatz zur regressiven Färbung, bei der das Gewebe überfärbt und anschließend überschüssiger Farbstoff gewegewaschen wird, ist der Grad der Färbung durch die Einwirkzeit kontrollierbar.

Hämatoxylin ist nicht der Farbstoff an sich, sondern muss zuerst durch Oxidation in Hämatein umgewandelt werden. Aus Hämatein wird dann eine positiv geladene Komplexverbindung von Metallionen durch Zugabe von Alaun hergestellt, ein sogenanntes Hämalaun. Diese Farbstoffe bieten sich an, um saure beziehungsweise basophile Bereiche und Verbindungen dunkelblau anzufärben. In der Zellkultur bestehen diese Bereiche vor allem aus Kernregionen, in denen Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorkommt. Unmittelbar nach der Färbung erscheint die Kernregion eher rötlich, was sich ändert, sobald die Probe unter Leitungswasser durch den höheren pH-Wert „gebläut“ wird, was auf die Indikatoreigenschaften der Schwermetallanteile des Alauns zurückzuführen ist.

Eosin ist ein synthetischer Farbstoff und wird in einer Gegenfärbung verwendet. Die reaktive Gruppe besteht aus einem COO^- -Molekül. Basische beziehungsweise acidophile Strukturen werden rot gefärbt, was bei Zellen vor allem Plasmaproteine betrifft. Nach der Färbung wird durch Anwendung einer Alkoholreihe, bestehend aus 70%, 80% und 99% Ethanol, die Probe differenziert, indem das Wasser aus den Zellen verdrängt wird, was zu der typischen Farbverteilung führt. Eine Übersicht über histologische Färbungen und genaue Erklärungen der einzelnen Schritte findet man in [93].

Verwendete Chemikalien

Eosin 3%ig und Hämatoxylin (Sigma-Aldrich), Rotihistokitt und Rotihistol (Carl Roth).

Ansetzen des Hämatoxylin nach Ehrlich

- 1g Hämatoxylin in 50ml reinem Alkohol lösen.

- 50ml destilliertes Wasser, 50ml Glycerin, 1,5g Kalialaun hinzufügen.
- 0,2g Kaliumjodat zur Reifung hinzusetzen.

Gebrauchsfertige Lösungen konnten ebenfalls über Sigma-Aldrich bezogen werden.

Färbung

- Eindeckungsmittel mittels Bad in Rotihistol entfernen (Schritt entfällt bei nicht eingedeckten Proben).
- Probe durch Alkoholreihe und destilliertes Wasser wässern.
- 10 – 30min in Hämatoxylin färben.
- 10min unter fließendem Leitungswasser bläuen.
- Waschen in destilliertem Wasser.
- 2 – 10min Gegenfärbung mit Eosin.
- Waschen unter fließendem Leitungswasser, bis gewünschte Färbung erreicht ist.
- Alkoholreihe zur Entwässerung, 70%, 80% und 99%.
- Eindecken und Konservierung mittels Roti Histokitt.

Die Schnitte werden unter einem Deckgläschen luftdicht verschlossen und bleiben so langzeitstabil.

3.3.3.2 Kontrollfärbung funktionalisierter Partikel

Die einzelnen Kopplungsschritte biologisch interessanter Moleküle (im vorliegenden Fall TGF β -1) wurden mittels immunchemischer Färbung nachgewiesen.

Verwendete Chemikalien

- 20mM Tris HCl, 150mM NaCl (TBS) pH 7,5
- 0,05% Tween 20 in TBS (TBS-T)
- 0,1% Bovine Serum Albumin (BSA) in TBS-T (BSA/TBS-T)
- 5% BSA in TBS-T (Blocking BSA/TBS-T)
- Primärantikörper Monoclonal Anti-TGF- β 1, Clone 9016.2
- Sekundärantikörper Anti-Mouse IgG FITC Conjugate (Anregung 495nm, Emission 525nm)

Alle Substanzen wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Färbung

- Waschen und Blocken der Partikel in *1ml* Blocking BSA/TBS-T für ca. *60min*.
- Primärantikörper *10µg/ml* in BSA/TBS-T lösen und auf die Probe aufbringen, *30min* unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubieren.
- *2x* Waschen der Partikel.
- Sekundärantikörper 1:15 in TBS-T verdünnen und bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln *30min* inkubieren.
- *1x* Waschen in TBS-T *15min*.
- *1x* Waschen in TBS *15min*.

Da die Fluoreszenz des FITC Farbstoffes nicht lange erhalten werden kann, wurden die Partikel, sofern sie angefärbt wurden, direkt im Versuch eingesetzt. So bestand nicht die Notwendigkeit, die Partikel in eine stabile Lagerungsflüssigkeit zu geben.

3.3.4 Stempeltechniken

Ein in heutiger Forschung angewendetes Prinzip zur Mikrostrukturierung weicher Substanzen auf harten Materialien ist das sogenannte Verfahren des „microcontact printing“ (μ CP). Hierbei wird eine Maske, typischerweise aus Silizium, die die gewünschte Struktur besitzt, abgeformt. Dieses geschieht mittels Herstellung eines elastischen Polymerstempels. Der Stempel dient schließlich dazu, eine Tinte (Polymere, Reagenzien, reaktive Chemikalien etc.) auf das zu strukturierende Substrat im gewünschten Muster zu übertragen. Eine detaillierte Übersicht gibt [94]. Andere Ansätze, sogenannte „soft molding“ Verfahren, basieren auf dem Prinzip, bereits auf der Oberfläche vorhandenes Material in bestimmten Strukturen zu verdrängen und somit Muster zu erhalten [94].

Anwendungen finden diese Methoden vor allem in der Zellforschung. Zum Einen besteht die Möglichkeit, biokompatible Substrate topografisch zu strukturieren und somit für die Zellkultur Mikro- bis Nanostrukturen zu erhalten [95]. Andererseits besteht die Möglichkeit durch das μ CP Oberflächen mit Proteinen oder anderen biologisch relevanten Stoffen zu strukturieren, indem das Protein oder bestimmte Reagenzien gestempelt werden und diese dann mit der Oberfläche eine kovalente Bindung eingehen [96–98].

In der vorliegenden Arbeit werden zwei neu entwickelte Methoden beschrieben, mittels derer es nun möglich ist, neben kleinen Molekülen auch Partikel, im Folgenden „Beads“ genannt, mikrostrukturiert aufzubringen.

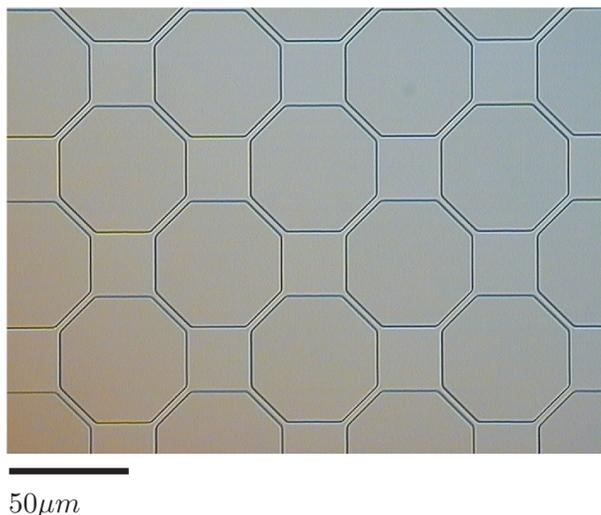


Abbildung 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Si-Masters. Mit freundlicher Genehmigung von AMO, Aachen, Deutschland.

Die verwendeten Vorlagen (Master) bestanden aus Silizium, mit einer $1,7\mu\text{m}$ dicken Schicht Siliziumdioxid. Beispielhaft ist ein Master mit einer Achteckstruktur in Abbildung 3.12 gezeigt. Die Struktur wurde mittels Photolithographie und anschließendem $1\mu\text{m}$ tiefem Ätzen aufgebracht. Zur Abformung des Masters wurde ein Kit aus einem Elastomer und einem Vernetzungsmittel verwendet (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning Corporation). Durch Aushärtung bei Temperaturen um 70°C und vorsichtigem Ablösen entstand der Stempel, der die negative Struktur des Masters besitzt. Der Stempel besteht dann aus einem weichen Polymer, Polydimethylsiloxan (PDMS) mit einem E-Modul von 2N/mm^2 [99]. Die Strukturformel ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Es stellte sich heraus, dass eine Beschichtung des Masters mit Hexamethyldisilazan (HMDS) zu verminderter Haftung des Polymers führte, und somit eine bessere sowie fehlerreduziertere Abformung ermöglicht wurde⁵. Normalerweise kommt diese Chemikalie in der Photolithographie zur Verbesserung der Haftung von Photolacken auf Halbleiteroberflächen zum Einsatz.

Da PDMS in reiner Form sehr weich ist, lässt es sich nicht vermeiden, dass unter Druck Verformungen des Stempels entstehen [100]. Die hier verwendeten Strukturen (siehe Abschnitt 4.5) hatten zu große Breiten a und Zwischenräume w (im Bereich $20\mu\text{m}$) im Vergleich zu ihrer Höhe h ($1\mu\text{m}$). Sobald der Stempel in Kontakt mit der Oberfläche kam, reichte sein Eigengewicht aus, um die Struktur, wie in Abbildung 3.13 gezeigt, kollabieren zu lassen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde sogenanntes „hard-PDMS“ (h-PDMS) verwendet [101]. Hierbei wird zuerst eine einige μm dicke Schicht auf den Master aufgebracht, die aus einem Komposit aufgebaut ist, basierend auf Polymeren, die über Vinyl- und Hydrosilanendgruppen vernetzt sind [99]. Die in [99] angegebene Vorgehensweise wurde etwas modifiziert (siehe unten). Anschließend wird die

⁵Freundlicherweise wurden die beschichteten Master von AMO, Gesellschaft für Angewandte Mikro- und Optoelektronik mbH Aachen, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

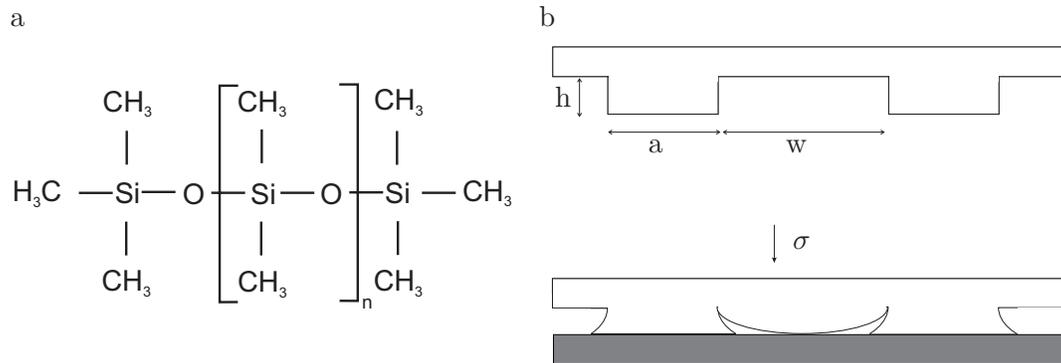


Abbildung 3.13: a) Strukturformeldarstellung des Poly(dimethylsiloxans). b) Schematische Darstellung der Verformung eines PDMS-Stempels unter Druck von oben.

h-PDMS-Schicht mit normalem PDMS überzogen. h-PDMS hat einen E-Modul von $9N/mm^2$ [99].

Stempelherstellung mittels h-PDMS

Verwendete Materialien

- Vinyl-PDMS-Vorpolymer VDT-731 (7 – 8% Vinylmethylsiloxane - Dimethylsiloxane Copolymer, Trimethylsiloxy Terminated, ABCR GmbH)
- Hydrosilan Vorpolymer HMS-301 (25-30 % Methylhydrosiloxane - Dimethylsiloxane Copolymer, Trimethylsiloxane Terminated, ABCR GmbH)
- Platin Katalysator SIP6831.2 (Platinum-divinyltetramethyldisiloxane complex in xylene, ABCR GmbH)
- Modulator (2,4,6,8-Tetramethyltetravinylcyclotetrasiloxan, Sigma)
- Elastomer und Vernetzungsmittel (PDMS Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning GmbH)

Herstellung

- Reinigung des Si-Masters im Ultraschallbad für 10min in Heptan, anschließend Trocknung durch Druckluft.
- 425mg VDT-731,
2, 25µl SIP6831.2,
12, 6µl 2,4,6,8-Tetramethyltetravinylcyclotetrasiloxan
vorsichtig mischen und
128µl HMS-301
dazugeben. Erneut mischen.

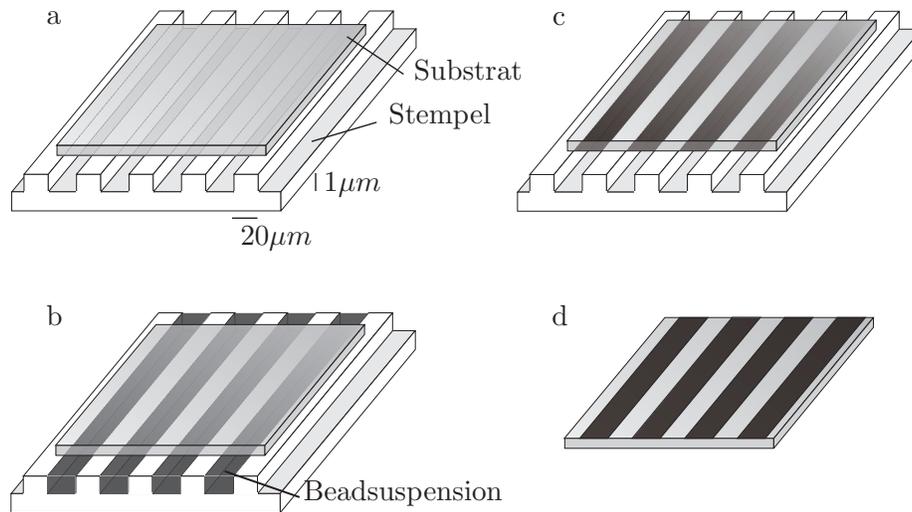


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des mikrofluidischen Ansatzes. a) Stempel wird in Kontakt mit der zu strukturierenden Oberfläche gebracht. b) Beadsuspension wird durch Kapillarkräfte unter den Stempel gezogen. c) Überschüssige Suspension wird abgezogen, anschließend Trocknungsprozess. d) Beads verbleiben an den Orten der negativen Aussparungen des Stempels.

- Zur Verdünnung und somit für geringere Schichtdicken $0,3\text{ml} - 0,5\text{ml}$ Ethanol oder Propanol hinzugeben.
- Gereinigten Master mittels Zentrifuge (Spin Coater) bei 5000rpm und 3s mit $100\mu\text{l}$ der angesetzten Lösung beschichten.
- 45min bei Raumtemperatur antrocknen (damit keine Risse entstehen), danach bei 60°C für 30min trocknen.
- Währenddessen 6g Elastomer und $0,6\text{g}$ Vernetzungsmittel pro Petrischale mit 5cm Durchmesser (Kit Sylgard 184) mischen.
- Master in Petrischale legen, auskühlen lassen und mit PDMS Sylgard 3mm dick überschichten.
- Entgasen der Polymermischung bei leichtem Unterdruck.
- Trocknungs- und Vernetzungsprozess bei 60°C und mindestens 60min .
- Vorsichtiges Entfernen des Wafers durch langsames Biegen des PDMS.
- Strukturierte Bereiche mit Skalpell von überschüssigem PDMS abtrennen und Master erneut in Heptan reinigen.

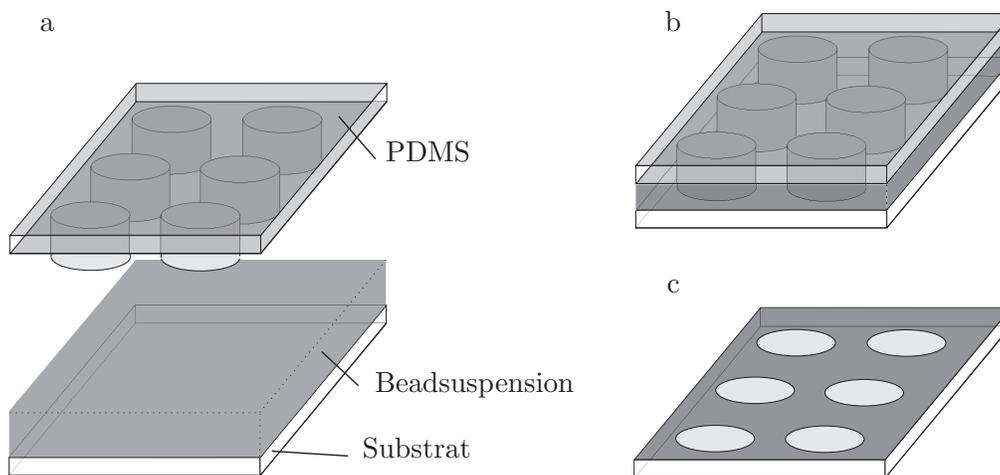


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des Stempelansatzes. a) Ein Tropfen der Beadlösung wird auf das Substrat aufgebracht. b) Durch kurzes Andrücken des Stempels auf das Substrat verbleibt die Beadsuspension in den Aussparungen des Stempels, der Überschuss wird verdrängt. c) Nach Trocknung wird der Stempel vom Substrat gelöst. Die positiven Strukturen des Stempels hinterlassen beadsfreie Bereiche.

Mikrofluidik-Ansatz

Der mikrofluidische Ansatz ist geeignet für sehr glatte Substrate, so dass gewährleistet werden kann, dass der Stempel einen guten Kontakt mit dem Substrat ausbildet. Die Struktur des Stempels muss so beschaffen sein, dass es für eine Flüssigkeit (hier Beadsuspension) möglich ist, durch die Struktur fließen und sich ausbreiten zu können. Insbesondere eignen sich hierfür lineare Strukturen.

- PDMS-Stempel in O_2 -Plasma hydrophilisieren. Die Plasmaintensität hängt davon ab, wie lange der Stempel hydrophil bleiben soll. Niedrige Intensitäten sowie kurze Dauer sind erstrebenswert, um die Stempelstruktur möglichst unbeschädigt zu lassen.
- Zu strukturierendes Substrat (hier Granatfilme) auf PDMS legen und leicht andrücken, damit ein uniformer Kontakt gewährleistet wird, siehe Abbildung 3.14 (a).
- Beadsuspension als Verdünnung 1:100 an die Kontaktgrenze zwischen Stempel und Substrat bringen. Kapillarkräfte ziehen die Flüssigkeit in die negativen Strukturen des Stempels, siehe Abbildung 3.14 (b).
- Überflüssige Suspension mit einer Pipette vom Rand entfernen.
- Trocknung für 60min bei $60^\circ C$, siehe Abbildung 3.14 (c).
- Entfernen des Substrats durch Verbiegen des Stempels. Die Beads verbleiben an den Orten, an denen die Aussparungen des Stempels waren, siehe Abbildung 3.14 (d).

Stempelverfahren

Eine weitere Methode, die in etwa einem sogenannten „soft molding“- Ansatz [95] ähnelt, dient dazu, auch Strukturen mit Nanopartikeln zu erhalten, die keine kontinuierliche Ausbreitung der Flüssigkeit erlauben.

- Ein Tropfen Beadsuspension wird auf das Substrat aufgebracht, so dass der Tropfen genügend groß ist, um den gesamten Bereich der Struktur zu benetzen, siehe Abbildung 3.15 (a).
- Ohne Wartezeit wird der Stempel durch leichtes Anpressen in engen Kontakt mit dem Substrat gebracht, siehe Abbildung 3.15 (b).
- Überschüssige Suspension wird mit einer Pipette entfernt.
- Trocknungsprozess für mindestens $60min$ bei $60^{\circ}C$, siehe Abbildung 3.15 (c).
- Entfernen des Substrats durch leichtes Verbiegen des Stempels.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion der Substratentwicklung

Im folgenden Kapitel wird das speziell entwickelte Gerät, das modifizierte Lichtmikroskop zur Langzeitzelluntersuchung, bezüglich der einzelnen Komponenten beschrieben. Anschließend wird auf die Eigenschaften sowohl des Substrats als auch der verwendeten Partikel eingegangen, bevor das komplette System, bestehend aus den auf dem Substrat immobilisierten Partikeln in steriler Umgebung, im Hinblick auf Eigenschaften magnetischer und biologischer Relevanz diskutiert wird.

4.1 Aufbau Faradaymikroskop

Ein bestehendes Durchlichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) wurde dahingehend modifiziert, dass einerseits Langzeitzelluntersuchungen möglich sind. Andererseits sollte auch die Möglichkeit geschaffen werden, magnetische, biokompatible Substrate mittels äußerer Magnetfelder strukturell beeinflussen zu können, möglichst mit direkter visueller Kontrolle. Um dies zu erreichen, wurde eine Klimakammer, die die physiologisch korrekten Bedingung für Zellkultur liefert, integriert. Zudem ermöglicht die Faradaymikroskopie direkten Zugang zur magnetischen Struktur eines Substrats. Eine Spule, die variabel justiert werden kann, liefert das benötigte äußere Feld. In Abbildung 4.1 ist eine Photographie eines aufgebauten Langzeitversuches zu sehen, während Abbildung 4.2 schematisch den Aufbau des Mikroskops zeigt.

Eine biologische Probe wird in die Klimakammer eingebracht, mittels der es möglich ist, eine sterile Umgebung kombiniert mit Temperaturkontrolle über längere Zeiträume zu gewährleisten. Die auf die Geometrie des Mikroskops abgestimmte Spule ermöglicht ein Anlegen externer Magnetfelder. Die Integration eines Polarisators und Analysators ermöglicht Faradaymikroskopie und somit eine Untersuchung der magnetischen Struktur des Substrats während der Zellkultur-experimente.

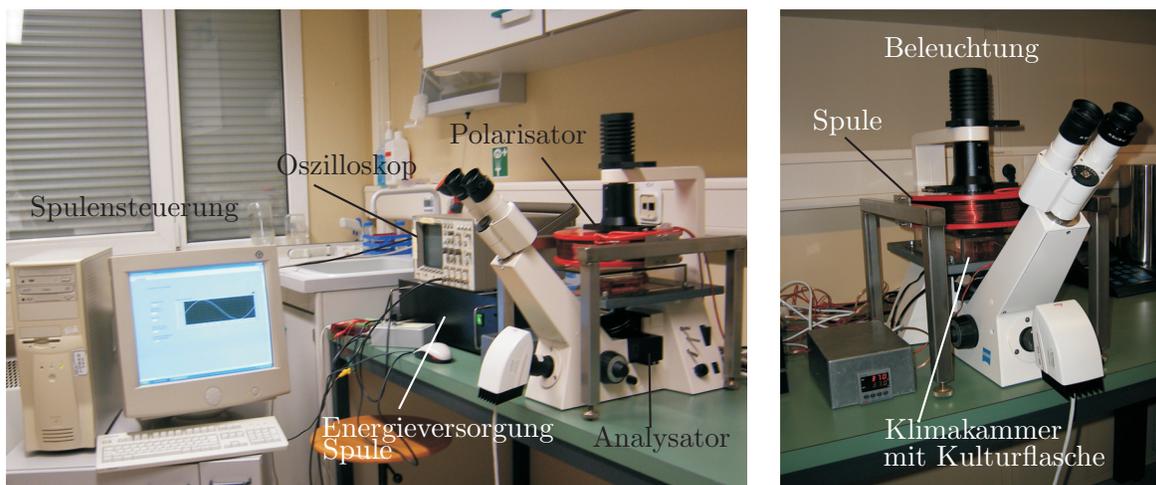


Abbildung 4.1: Fotografie eines laufenden Langzeitversuchs.

4.1.1 Magnetooptik

Ein Durchlichtmikroskop, wie es üblicherweise bei der Kultivierung von Zellen verwendet wird, wurde im Rahmen der Arbeit zu einem zusätzlichen Faradaymikroskop modifiziert. Dies ermöglicht die Untersuchung von lebenden Zellen auf magnetischen, durchsichtigen Materialien, wobei die magnetische Struktur sichtbar ist. Am Mikroskop wurden ein Analysator und Polarisator bestehend aus Folienpolarisatoren drehbar eingebaut. Die baugleichen Folien wurden vor und hinter die Probe im Strahlengang integriert. Der Polarisator stellt linear polarisiertes Licht her, das beim Durchtreten der magnetischen Granatfilme in Abhängigkeit von der Magnetisierung (parallel oder antiparallel zur Oberflächennormalen) in entgegengesetzten Richtungen gedreht und elliptisch polarisiert wird. Für einen Polarisationsfilter gilt das Gesetz von Malus

$$I = I_0 \cos^2 \phi, \quad (4.1)$$

wobei I_0 die Ausgangsintensität des einfallenden Strahls, I die Intensität des Strahls nach Durchlaufen des Polarisators und ϕ der Winkel zwischen der Schwingungsebene des einfallenden Strahls und der Ebene des Strahls nach dem Durchlaufen des Polarisators ist. Das bedeutet, dass Licht nach Durchlaufen eines Polarisators, oder im vorliegenden Fall Analysators, winkelabhängige Intensitäten aufweist. Bei optimaler Stellung von Analysator und Polarisator wird das polarisierte Licht einer Domänenart, beispielsweise der parallelen Magnetisierung, vollkommen durchgelassen, das Licht nach Durchlaufen der antiparallelen Domänenart wesentlich abgeschwächt. Dies erzeugt einen Hell-Dunkel-Kontrast. Abbildung 4.3 zeigt am Mikroskop erhaltene magnetooptische Aufnahmen, auf denen beispielhaft ein Zustand mit Bubbledomänen und Streifendomänen zu erkennen ist. Je nach Stellung des Analysators im Vergleich zum Polarisator sind Bereiche mit Magnetisierung parallel zur Oberflächennormalen hell, die anderen dunkel dargestellt, oder umgekehrt.

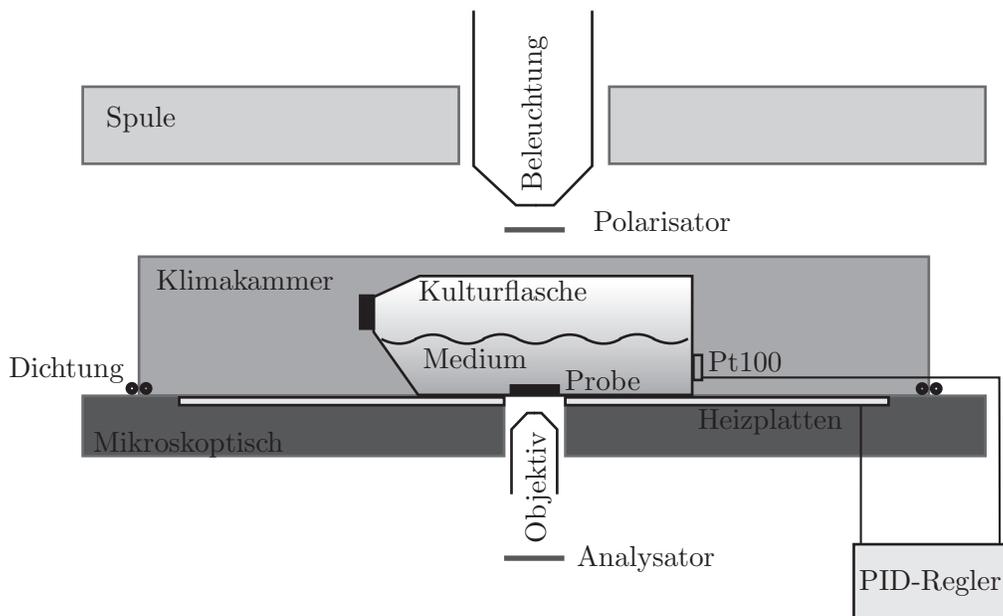


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des modifizierten Mikroskopaufbaus.

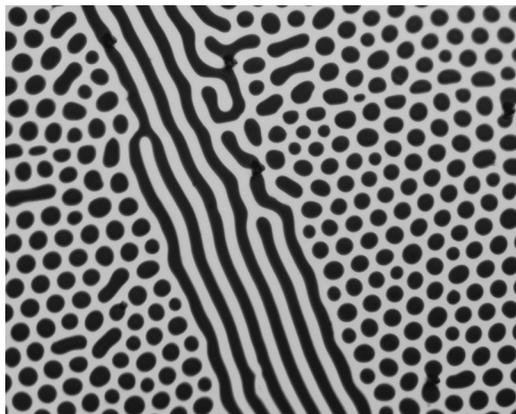
Die Kamerasoftware (DC 300F, Leica, Solms, Deutschland) erlaubt eine kontrastreiche Aufnahme der magnetischen Proben, so dass Probenstellen, die wenig Licht aufweisen, fast schwarz dargestellt werden, helle dagegen fast weiß. Eine weitere Bearbeitung der Bilder ist möglich, in dem die Kontrastverhältnisse verändert werden, so dass man wegen der hohen räumlichen Auflösung auf Grund der präzisen Magnetisierung, nahezu Schwarz-Weiß Bilder erhalten kann.

4.1.2 Kulturkammer

Sterilität ist die wichtigste Voraussetzung bei der Durchführung von Zellkulturexperimenten. Unter dieser Voraussetzung wurde die Kammer so konzipiert, dass die Zellen samt Kulturgefäß unter der Sterilbank eingebracht werden können. In Abbildung 4.4 ist die geschlossene Kammer zu sehen.

Dabei besteht der untere Teil aus einer 1,5cm-Polyvinylchloridplatte (PVC-Platte), die den üblichen Mikroskoptisch ersetzt. Die Aussparung für das Objektiv wurde auf ein Mindestmaß von 1,7cm Durchmesser reduziert, um Wärmeverluste der Kammer nach außen möglichst gering zu halten. Aus Gründen der Wärmeisolation wurde PVC gewählt, im Gegensatz zu den üblichen Metalltischen. PVC ist mittels Ethanol oder anderer in der Zellkultur verwendeten Mitteln, gut zu sterilisieren.

Als Heizung dienen Heizfolien, die aus wenigen μm dicken Leiterschleifen bestehen, die wiederum in Polyester eingeschweißt gegen Feuchtigkeit geschützt sind. Zwei Heizfolien mit einer Leistung von jeweils 12W, wurden zwischen zwei plane, 2mm dicke Kupferplatten gebracht, welche anschließend fest verschraubt wurden. Die Kupferplatten dienen dazu, das System gleichmäßiger



50 μm

Abbildung 4.3: Magnetooptische Aufnahme eines Granatfilms der Dicke $5\mu\text{m}$. Der Hell-Dunkel-Kontrast entsteht durch die magnetisierungsabhängige Rotation des die Probe durchlaufenden polarisierten Lichts.

zu heizen, indem Wärme durch Kupfer sehr gut geleitet und verteilt wird. Zudem entsteht ein Wärmereservoir, das es ermöglicht, kleinere Temperaturschwankungen, die der Regelprozess mit sich bringt, auszugleichen. Die Platten besitzen an gleicher Stelle wie der Trägertisch zur mikroskopischen Beobachtung eine Öffnung. Diese Aussparung, die damit direkt unterhalb der Probe ist, hat keine großen Einflüsse auf Wärmeverluste. Nach einer Aufwärmphase besitzt das in der Öffnung befindliche Objektiv ebenfalls eine gegenüber der Raumtemperatur höhere Temperatur. Desweiteren sind, wenn man von einer Kulturflasche ausgeht, nur rund 5% der Unterseite nicht in direktem Kontakt mit der Heizplatte, was durch das in der Flasche befindliche Medium (ungefähr 30ml) problemlos gepuffert wird. Die Temperatur innerhalb der Kammer wird konstant gehalten, in dem ein Pt100-Widerstand als Fühler fungiert und mittels eines Proportional-Integral-Differential-Reglers (PID) die Heizfolien in Rückkopplung betrieben werden. Mehrere Messreihen zeigten, dass die Anbringung des Widerstands von außen an die Kulturgefäßwand in der Höhe des darin befindlichen Mediumspiegels, genügend genaue Temperaturerfassung erlaubt. Abbildung 4.5 zeigt die prinzipielle Funktionsweise des Temperaturregelkreises.

Dabei wird der Widerstand mittels des PID-Reglers mit einer Abtastrate von 60min^{-1} gemessen. Im Temperaturbereich von 0°C - 60°C verhält sich der Widerstand linear zur Temperatur. Das Relais schaltet abhängig vom Wert des Pt100-Widerstands die Heizfolien, von denen eine ebenfalls in Abbildung 4.5 gezeigt ist. Temperaturwerte können im physiologisch sinnvollen Bereich zwischen 0°C - 60°C eingeregelt werden. Meist wurde die Temperatur auf 37°C konstant gehalten, was den Standardkulturbedingungen entspricht. Dabei wurde ein Regelverhalten erzielt, das maximal um $\pm 0,2^\circ\text{C}$ vom gewünschten Wert abwich. Bei Versuchen zur Endozytose wurde teilweise die Temperatur konstant auf 14°C gehalten, was in der Regelung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1^\circ\text{C}$ erzielt werden konnte.

Als abschließendes Element wurde ein durchsichtiger Plexiglasdeckel konzipiert, der einen luftdichten Innenraum gewährleistet. Der Deckel ist ebenfalls sterilisierbar und kann unter der Steril-

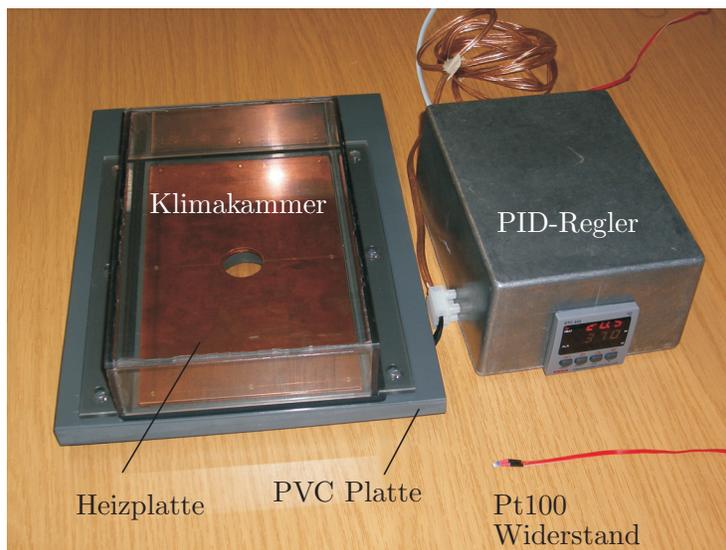


Abbildung 4.4: Kulturkammer, die es ermöglicht, Zellen unter sterilen Bedingungen und kontrollierter Temperatur über Tage zu kultivieren und zu beobachten.

bank nach Positionierung des Kulturgefäßes aufgebracht werden und über Abdichtungen luftdicht eingespannt werden. Die Transparenz des Deckels ermöglicht eine Beobachtung der Proben ohne weitere Aussparungen, die Defizite in der Temperaturregelung und Sterilität mit sich bringen würden. Die Höhe der Kammer beschränkt sich auf $4,7\text{cm}$, da die Spule und die Beleuchtungsvorrichtung keinen weiteren Raum zulassen. Standardkulturgefäße besitzen eine Höhe von $2 - 3\text{cm}$, so dass diesbezüglich keine Einschränkungen bestehen.

4.1.3 Magnetfelderzeugung und Steuerung

Um äußere Magnetfelder zu generieren, wurde in das Mikroskop eine Spule integriert. Die Anforderungen an die Spule bestanden hauptsächlich darin, am Probenort senkrechte und homogene Felder zu generieren. Aus Sterilitätsgründen war es nicht möglich, die Spule nahe im mm -Bereich an die Zellkultur zu bringen, so dass es sich anbot, vor der Herstellung die Abmessungen und Leistung der Spule mittels einer Finite-Elemente Methode zu simulieren [102], um Informationen über optimale Abmessungen und Distanzen zu erlangen.

Dabei wurden geometrische Begrenzungen, die durch das Mikroskop vorgegeben waren, berücksichtigt, so dass sich die maximale Höhe (Ausrichtung bezogen auf die Spulenorientierung, wie sie in Abbildung 4.1 gezeigt ist) auf 5cm beschränkt. Der Durchmesser beträgt außen 24cm , innen 8cm . Die Simulation bezieht sich auf eine Ringstromdichte von $1\text{A}/\text{mm}^2$. Die Spulenwicklungen wurden als Kupfer angenommen, die Spulenaufnahme als Polyester. Mit diesen Vorgaben kann die magnetische Induktion am Probenort auf 2mT abgeschätzt werden. Ein wichtiges Kriterium, die Feldhomogenität am Probenort, ist anhand des Graphen in Abbildung 4.6 zu sehen. Homogene Felder sind insofern notwendig, als dass die magnetische Struktur über das gesam-

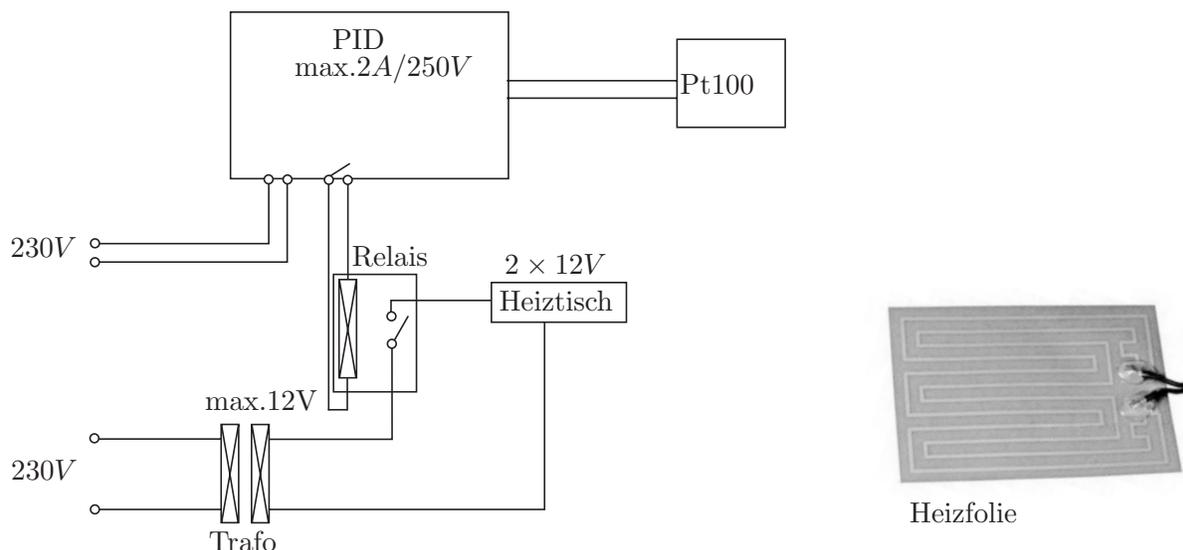


Abbildung 4.5: Schaltplan der Temperaturkontrolle der Klimakammer. Ein PID-Regler gibt die Strom- und Spannungsversorgung für die Heizfolien vor, die aus wenigen μm dicken eingeschweißten Leiterbahnen bestehen.

te Probenvolumen gleichmäßig beeinflusst werden soll. Aussagen über Zellverhalten können nur getroffen werden, wenn sicher gestellt ist, dass das gesamte biologische Material den gleichen Bedingungen unterliegt. Experimentell zeigte sich mittels einer Hallsonde, dass die Spule, die nach den obigen Vorgaben konzipiert wurde, bei einem Strom von 10A , den die Stromquelle maximal ausgeben kann, ein Feld von 20mT am Probenort generiert, was bei Weitem ausreicht, um die Granatfilme in Sättigung zu bringen.

Zur Energieversorgung der Spule wurde ein Netzgerät mit starkem Transformator konzipiert, da die Spule durch ihren Abstand zum Probenort und ihren großen Durchmesser eine hohe Leistung benötigt.

Die Spule kann durch zwei verschiedene Methoden gesteuert werden. Einerseits kann ein Funktionsgenerator angeschlossen werden, womit das System ohne externen Rechner auskommt. Andererseits war es wünschenswert, über einen Rechner den gesamten Ablauf eines Experiments über mehrere Tage beeinflussen und vorgeben zu können, so dass die Signalausgabe an einen Verstärker und anschließend an die Energieversorgung mittels einer Messkarte mit integriertem DA-Wandler (Labjack U12, Meilhaus Electronics GmbH, Puchheim, Deutschland) weitergegeben werden kann. Die Karte wird über ein LabView-Programm angesprochen, das so konzipiert wurde, dass in für die Versuche sinnvollen Zeiträumen, die Signalform- und Stärke entsprechend der Spuleneigenschaften vorgegeben werden können. Ein Nachteil der Messkarte besteht in der Beschränkung der Signalausgabe auf Frequenzen unter 10Hz . Bei Langzeitversuchen sind diese höheren Frequenzen aber ohnehin nicht von Interesse, da vor allem Veränderungen der magnetischen Substratstruktur im Bereich einiger mHz bis maximal 1Hz benötigt werden, da nur dann die magnetischen Partikel den Veränderungen folgen können, siehe auch Abschnitt 4.4.3.

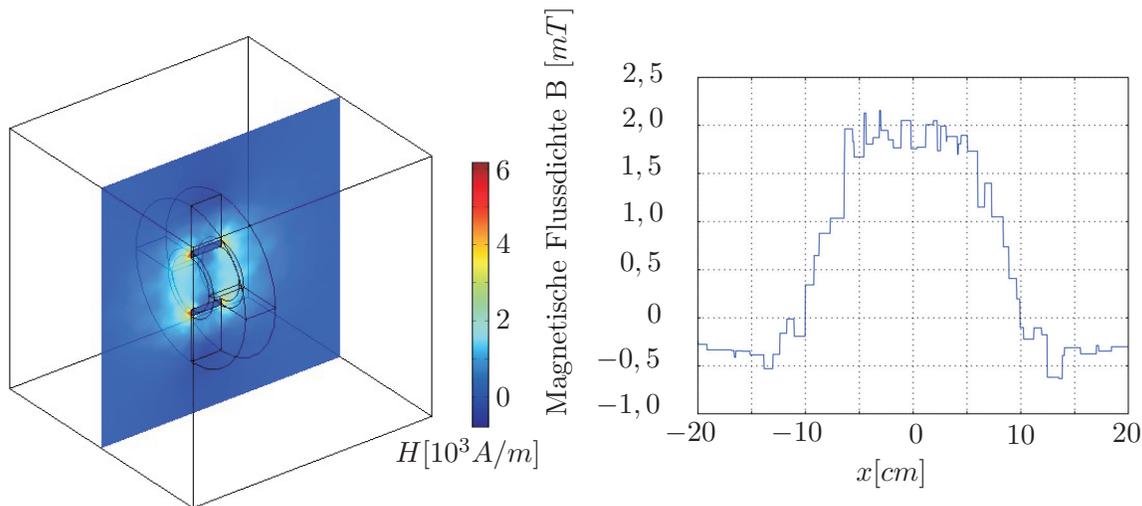


Abbildung 4.6: Simulation des Spulenaufbaus mittels Finite-Elemente-Methode. Im Abstand von 3cm ist anhand des Graphen zu erkennen, dass das Feld in einem Bereich mit 10cm Durchmesser homogen ist.

4.2 Substrat

Bei der Kultivierung von Zellen auf einem Material ist es unabdingbar, dass das Substrat nicht zytotoxisch ist, das heißt, es muss sicher gestellt sein, dass durch die Materialeigenschaften die Vitalität der Zellen nicht eingeschränkt ist. Magnetische Dünnschichten, die auf ein Trägersubstrat aufgebracht wurden, waren in den Untersuchungen einerseits toxisch, andererseits instabil unter Einfluss des Kulturmediums, was genauer in Abschnitt 5.2.1 diskutiert wird. Als magnetisches Substrat, das sich als stabil unter Einfluss des Kulturmediums gezeigt hat, wurden Granatfilme verwendet. Während in Abschnitt 3.1 allgemeine Eigenschaften genannt wurden, soll im Folgenden speziell die Struktur, wie sie in den Zellexperimenten hergestellt und modifiziert wurde, dargestellt werden. Desweiteren ist die magnetische Struktur dieser Filme durch äußere Felder extrem variabel gestaltbar, so dass sich aus diesen Gründen die Arbeit hauptsächlich auf dieses Material stützt und keine weiteren Substrate behandelt werden.

4.2.1 Globale Eigenschaften

In Abbildung 4.7 ist eine Bruchkante einer Granatprobe gezeigt. Mittels REM Untersuchung wird deutlich, dass die Dicke $5\mu\text{m} \pm 0,05\mu\text{m}$ beträgt. Durch das einkristalline Wachstum, besitzt der magnetische Granatfilm abgesehen von Defekten, eine atomar glatte Oberfläche. Dieser Fakt ist wichtig, um die Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen zu erklären.

Die magnetische Struktur des Films stellt sich, unabhängig von der speziellen Domänenkonfiguration, so ein, dass benachbarte Domänen antiparallel magnetisiert sind. Mit Anlegen eines äußeren, zur Oberfläche senkrechten Feldes, werden die Domänen, die parallel zum Feld liegen auf Kosten der antiparallelen in Abhängigkeit der Feldstärke vergrößert. Eine Hysteresemessung, die mittels eines VSM erhalten wurde, ist in Abbildung 4.8 gezeigt.

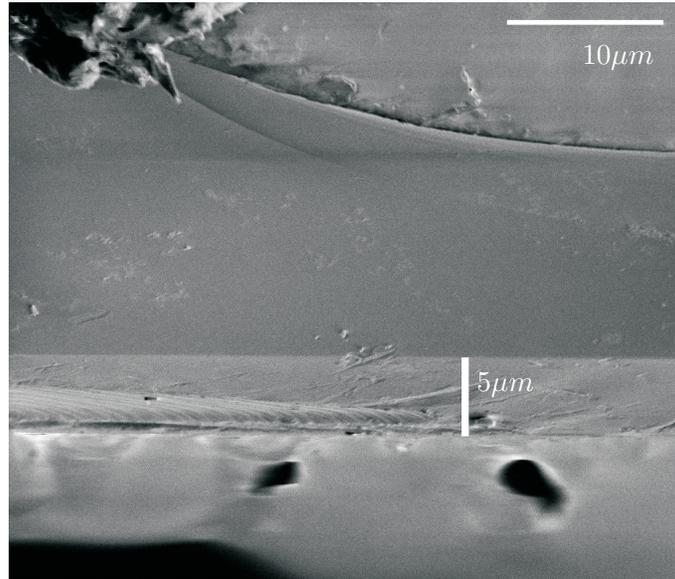


Abbildung 4.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts eines Granatfilms.

Dargestellt ist die Magnetisierung M in Abhängigkeit des magnetischen Feldes H , parallel zur Anisotropierichtung des Films. Das Signal, des paramagnetischen Trägersubstrats, das ein lineares, störendes Signal hervorruft, wurde bereits abgezogen, so dass die erhaltenen Werte rein auf die magnetische Schicht zurückzuführen sind. Um diese Korrektur durchzuführen, wurde im Bereich hoher Felder (bei denen der Film bereits in magnetischer Sättigung vorliegt) ein linearer Fit vorgenommen und die so erhaltenen Werte als Untergrund abgezogen, so dass sich die Magnetisierung, wie in der Abbildung zu sehen ist, ab einer Feldstärke von ungefähr $10^4 A/m$ konstant bei einem Sättigungswert von $1,5 \cdot 10^4 A/m \pm 0,1 A/m$ befindet. Dieser Wert ergibt sich, wenn die Rohdaten des VSM durch das Volumen des untersuchten Granatstücks dividiert werden. Das Volumen der Probe war $1,3 \cdot 10^{-10} m^3 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} m^3$, was sich durch die bekannte Dicke multipliziert mit der Oberfläche, die mit Hilfe eines Grafikprogramms vermessen wurde, ergibt. Der angegebene Fehler bezieht sich darauf, dass die Bruchkanten der Probe nicht exakt auswertbar sind, da im Lichtmikroskop nicht deutlich zu erkennen ist, wo die magnetische Schicht noch vorhanden ist [102]. Anhand der rot eingezeichneten Geraden, die eine lineare Regression um den Nullpunkt darstellen, kann eine Suszeptibilität von $\chi_{Granat} = 1,9 \pm 0,2$ angegeben werden. Die Koerzitivfeldstärke liegt bei $2 \cdot 10^2 A/m$. Entsprechend der Theorie in den Abschnitten 2.1.2 und 3.1.1.2 verläuft die Hysteresekurve mit steigender Feldstärke linear an, was auf reines Verschieben der Domänenwände zurückzuführen ist [103] und somit bis auf Verschiebungen über Kristalldefekte (Pinningzentren) keine Energie benötigt wird. Im Bereich des Erreichens der Sättigungsmagnetisierung treten Hystereseeffekte bei Verminderung der äußeren Feldstärke auf, was auf das Verschwinden beziehungsweise Wiederauftreten der Wände zurückzuführen ist. In einem gewissen Bereich, in dem die Wände nur verschoben werden, ist die Strukturveränderung des Substrats reversibel. Dieser Bereich kann ungefähr mit $\pm 0,5 \cdot 10^4 A/m$ angegeben werden. Die

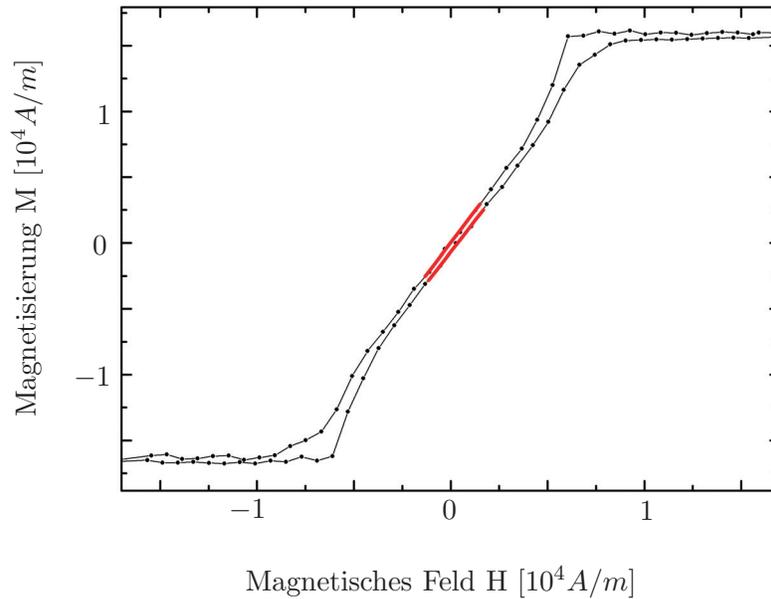


Abbildung 4.8: Hysteresekurve eines Granatfilms bei $293K$, gemessen im VSM.

Granatfilme sind weichmagnetisch, was an ihrer geringen Koerzitivität erkennbar ist. Deshalb kann ein Granatfilm nicht mit einem Cantilever üblichen magnetischen Moments mittels der MFM abgebildet werden.

In Abbildung 4.9 ist der Unterschied zwischen einer Spitze, die komplett mit CoCr besputtert wurde und einer seitlich beschichteten CoCr-Spitze gezeigt. Die Standard-Spitze tritt gemäß Gleichung 3.12 zu stark mit der magnetischen Struktur des Films in Wechselwirkung, was darin resultiert, dass die hellen Bereiche, also die Gebiete repulsiver Wechselwirkung, verkleinert dargestellt werden. Außerdem ist zu erkennen, dass die Spitze die magnetische Struktur irreversibel beeinflusst. Scheinbar „springt“ eine Domäne von einer Scanlinie zur nächsten um einige Nanometer in ihrer Position. Erst der seitlich beschichtete Cantilever ermöglicht ein fehlerfreies Abbilden der magnetischen Struktur. Das magnetische Moment ist nun gering genug, irreversible Veränderungen zu vermeiden. Die Auflösung ist allerdings bei den Spitzen niedriger magnetischer Momente eingeschränkt, was an den etwas verschwommenen Grenzgebieten zwischen benachbarten Domänen zu erkennen ist.

Im Hinblick auf weitere Anwendungen ist wichtig, dass sich die magnetischen Strukturen leicht beeinflussen lassen, zudem reversibel, da sie weichmagnetischen Charakter besitzen und sich in geringen äußeren Feldern nahezu ohne Hysterese verhalten. Dies erlaubt interessante Einsatzgebiete, wenn es darum geht, die Struktur über lange Zeitskalen einiger Tage kontrolliert zu verändern, was in Abbildung 4.10 verdeutlicht wird.

Die Abbildung zeigt eine Hysteresekurve, die unter Verwendung magnetooptischer Methoden

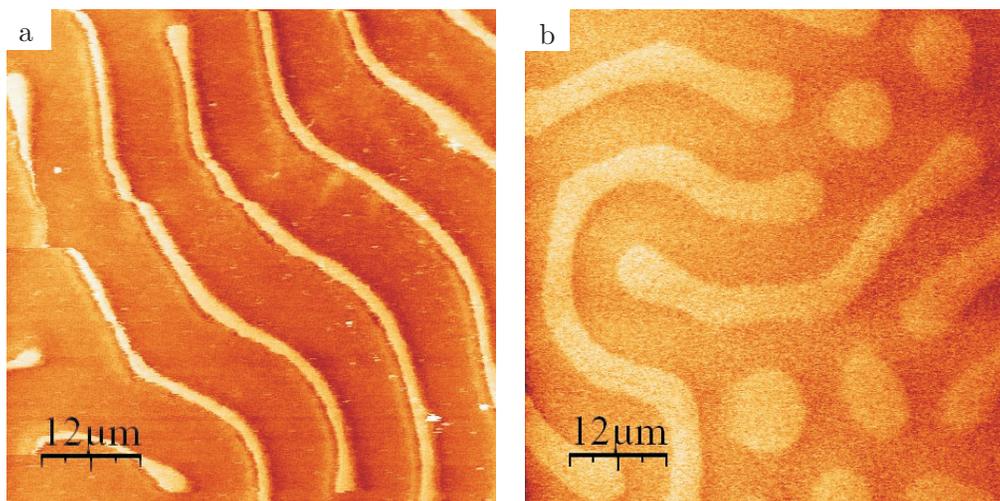


Abbildung 4.9: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Granatfilms. a) Phasenbild, aufgenommen mit einem Standard-CoCr-Cantilever. b) Phasenbild, aufgenommen mit einem seitlich mit CoCr beschichteten Cantilever (Low-Moment-Tip). Beide Abbildungen wurden in einem Spitze-Probe-Abstand von 150nm aufgenommen.

aufgenommen wurde. Als Startpunkt der Messung wurde ein Granatfilm, der in seinem natürlichen Zustand, dem Mäanderzustand vorliegt, gewählt. Sukzessive wurde ein äußeres Feld angelegt und zu jedem Messpunkt eine Aufnahme des momentanen Zustandes der Bereichsstruktur gemacht. Ein Messpunkt ergibt sich aus der mittels Hallsonde festgestellten äußeren Magnetfeldstärke und der Helligkeit eines einzelnen Bildes. Als Referenzwert für die Helligkeit wurde ein magnetischer Zustand ohne extern angelegtes Feld gewählt. Um den einzelnen Messpunkten quantitative Magnetisierungen zuordnen zu können, wurde der Wert der Sättigungsmagnetisierung $M_S = 1,5 \cdot 10^4 \text{A/m}$ aus den VSM-Daten übernommen. Dieses Beispiel soll verdeutlichen, dass in Bereichen, in denen fast keine Hysterese auftritt, Strukturveränderungen reversibel sind, indem eine Domänenart zu Ungunsten der anderen vergrößert wird. Ein Video, das mittels Faradayeffekt die Domänenveränderungen sichtbar macht, zeigt beispielhaft die zeitliche Veränderung eines Zustands, der teils aus Streifen- und teils aus Bubbledomänen besteht (\rightarrow BubblesFaraday [104]). Später wird dieser Effekt ein wichtiger Bestandteil der *in-vitro*-Strukturveränderungen, da dort über lange Zeiträume eine gewisse Reversibilität vorausgesetzt werden muss. Dass im gewählten Beispiel die Sättigungsmagnetisierung bei geringeren Feldern erreicht wird, als in den Magnetometermessungen, liegt daran, dass hier nur ein Ausschnitt der Probe zum Signal beiträgt, während an anderen Probenstellen, die nicht zur Messung beitragen, vor allem in Randbereichen noch Domänenwände vorhanden sind. Deutlich zu erkennen ist, dass die Domänen, die im Faradaykontrast dunkel erscheinen, bei Ansteigen der Feldstärke auf Kosten der Hellen kleiner werden, bis schließlich Domänenwände, die beide Bereichsstrukturen voneinander trennen, verschwinden und der Film die Sättigung erreicht. Mit negativen Feldern wiederholt sich dieser Prozess zugunsten der dunklen Bereiche. Auch hier sind die Hystereseeffekte deutlich erkennbar.

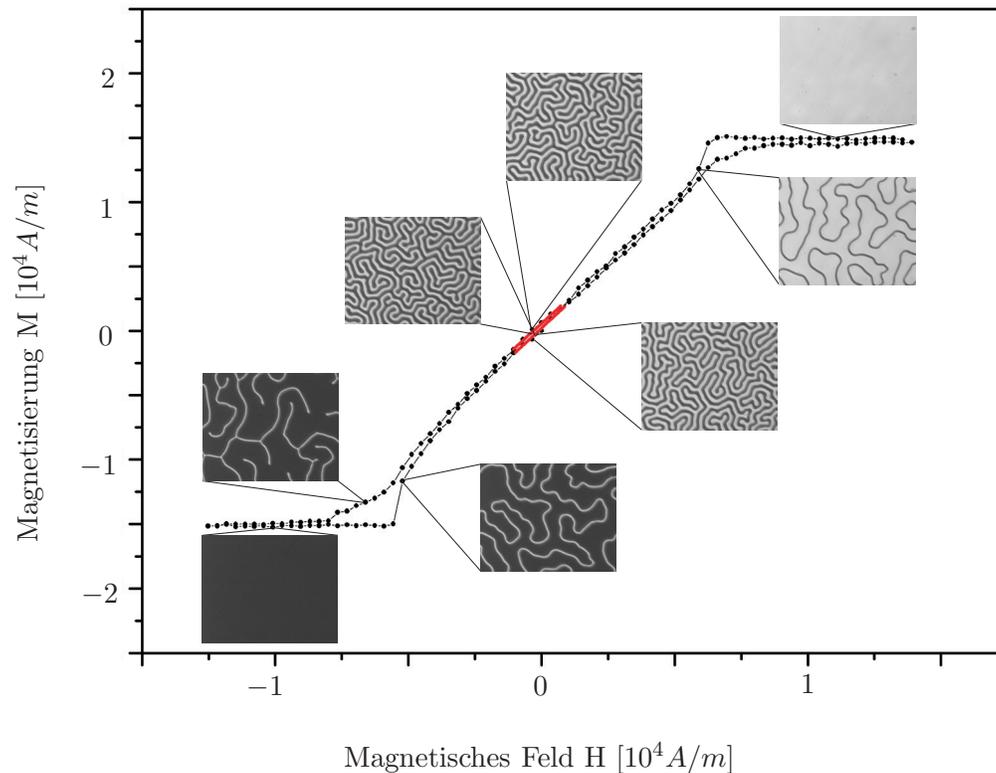


Abbildung 4.10: Hysteresekurve eines Granatfilms mittels Auswertung einzelner Faradayaufnahmen bezüglich ihrer Helligkeit. Einzelnen Datenwerten sind die zugehörigen mäanderförmigen Zustände zugeordnet.

4.2.2 Domänen

Geht man nun von eher globalen Eigenschaften hin zu lokalen, so eröffnen sich neue Methoden der magnetischen Strukturierung. Die verwendeten Granatfilme besitzen mehrere metastabile Domänenkonfigurationen. Das bedeutet, dass es mehrere Konfigurationen eines Films gibt, die ohne angelegtes äußeres Feld stabil sind und nur durch erneutes Anlegen eines Feldes verändert werden können, wie es bereits schematisch in Abbildung 3.3 gezeigt wurde.

In Abbildung 4.11 sind die vier metastabilen Zustände als Faradymikroskopaufnahmen gezeigt. Bei einem Film der Dicke $5\mu\text{m}$ betragen die Domänenbreiten der Labyrinthstruktur und der Streifen ungefähr $5\mu\text{m}$. Jeder gezeigte Zustand stellt ein energetisch lokales Minimum dar und kann in einen jeweils anderen transformiert werden. Dies kann durch reine magnetische Behandlung der Filme geschehen [17]. Nach Sättigung des Films senkrecht zur Anisotropierichtung und anschließendem Abschalten des Feldes, kann ein gemischter Zustand generiert werden, wie in Abbildung 4.11 (b) gezeigt. Der Zustand der Streifendomänen kann nach Sättigung des Films mittels eines äußeren Feldes, das mehrere Grad abweicht, parallel oder senkrecht zur Anisotropierichtung zu liegen, und anschließendem Abschalten erzielt werden. Dabei ist zu bemerken, dass

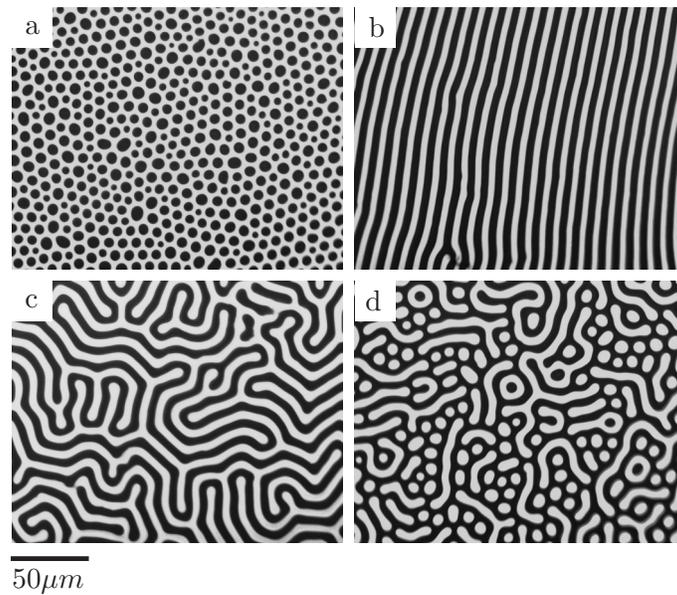


Abbildung 4.11: Magnetooptische Aufnahme der vier metastabilen Zustände eines Granatfilms der Dicke $5\mu\text{m}$. a) Bubbledomänen. b) Streifendomänen. c) Mäander- oder Labyrinthstruktur. d) Mischzustand.

eine Domänenart aus einer einzigen zusammenhängenden Domäne besteht, während die antiparallele Domänenart mehrere, voneinander getrennte Gebiete aufweist. Bubbledomänen können generiert werden, indem wie bei den Streifendomänen verfahren wird, allerdings in einem Winkel von 89° , also mit einer kleinen Abweichung in Bezug zur „hard-axis“. Hierbei tritt das Problem auf, dass der so generierte Zustand sehr instabil ist und kleinste Felder, parallel zur Anisotropierichtung die Bubbles in Mäander überführen. Um dieses Problem zu beheben, kann ein weiteres externes Feld von 1mT während der Erzeugung der Bubbles parallel zur Anisotropierichtung angelegt werden [17]. Während des weiteren Experiments darf dieses Feld allerdings nicht abgeschaltet werden, was die Methode recht unpraktikabel macht. Oft müssen Proben, sofern sie in der Zellkultur eingesetzt werden, transportiert werden. Insofern bieten sich andere Methoden der Strukturveränderung an.

Um in Zellkultur mit den Granatfilmen arbeiten zu können, war es notwendig, diese über eine Temperatur von 130°C zu erhitzen, um mögliche Keime abzutöten. Die Curietemperatur der verwendeten Filme liegt bei 150°C , so dass eine Erhitzung bis zu diesem Wert keinen technisch nennenswerten Unterschied gemacht hat. Mit Erreichen der Curietemperatur ergibt sich die Möglichkeit, während des Erkaltes des Films in die Bildung der magnetischen Bereichsstruktur einzugreifen. So können Streifendomänen erzeugt werden, indem der Film nach Überschreiten der Curietemperatur in kaltem Wasser abgekühlt wird. Das verwendete Wasser besaß eine Temperatur von 8°C - 12°C . Ähnliches gilt für die Bubbledomänen. Während des schnellen Abkühlens wird ein Feld mit Hilfe eines Permanentmagneten, dessen Stärke sehr viel kleiner als das Sättigungsfeld ist, senkrecht zur Anisotropierichtung angelegt. Diese Methode bietet im Gegensatz zu

dem oben beschriebenen Mechanismus den Vorteil, dass die Struktur nach Erkalten ohne weiteres Magnetfeld stabil bleibt. Das Substrat kann also transportiert werden. Das Abkühlen des Substrats im Wasserbad bietet zudem den Vorteil, dass Sterilitätsbedingungen leicht eingehalten werden können, indem das Wasser bereits steril ist oder ein Anteil Alkohol, vorzugsweise Ethanol, zugefügt wird.

Oft ist es nicht möglich, fehlerfreie Zustände, wie sie in Abbildung 4.11 gezeigt sind, auf dem ganzen Film zu generieren. Dies liegt beispielsweise an Kristalldefekten. Andererseits kann bei der gewählten Methode nicht sicher gestellt werden, dass ein homogenes äußeres Feld über den ganzen Film hinweg herrscht. Oft stellt sich ein gemischter Zustand oder teilweise ein Streifenmuster ein, an einer anderen Stelle des Films ein Bubblemuster. Dennoch ist es möglich, große Bereiche von einigen mm^2 homogen zu strukturieren, so dass Zellkulturexperimente in vernünftigem Rahmen durchführbar sind.

Jederzeit kann der Film durch senkrechte Sättigung in den mäanderförmigen Zustand zurückgeführt werden, egal in welchem Zustand sich der Film vorher befand. Die Sättigung ist mit der konzipierten Spule jederzeit *in vitro* erreichbar. Bubbledomänen sowie Streifenmuster müssen vor Experimentbeginn generiert werden und können dann, wenn Strukturhaltung gewährleistet sein soll, nur im oben genannten Bereich der reversiblen Hysteresekurve beeinflusst werden. Folglich gilt dies bis zu Feldstärken, ab denen Domänenwände zerstört werden (im vorliegenden Fall zwischen $6mT - 9mT$). Allerdings ist es möglich jeden metastabilen Zustand erneut zu erreichen, wenn man nur auf die Polarität und Verteilung der Domänen Wert legt. Das bedeutet, dass es nicht möglich ist, exakt dasselbe Muster noch einmal zu generieren, nachdem es einmal in einen anderen Zustand überführt wurde. Bezüglich der Ausdehnung und Anzahl der Domänen besteht allerdings immer Reversibilität.

Mit Hilfe der Phasentheorie [17] kann man die eben genannten Präparationsmethoden physikalisch behandeln. Dabei werden alle Domänen, die in die gleiche Richtung magnetisiert sind, als eine Phase angesehen. Die Muster bestehen also aus zwei Phasen, jeweils charakterisiert durch Volumenanteil und Magnetisierungsrichtung. Welche Phase nun in welcher Form nukleiert, hängt von der Minimierung der Freien Energie eines Domänenzustandes ab. Dabei ist es erstaunlich, dass es ausreicht, nur die relativen Volumenanteile der Phasen zu betrachten und Vernachlässigung der Austauschwechselwirkung und Wandenergie dennoch zu brauchbaren Ergebnissen führt. Die Streufeldenergie und magnetoelastische Energie werden nur global betrachtet, als Entmagnetisierungsenergie beziehungsweise globale, magnetoelastische Energie [17]. Mittels dieser starken Vereinfachungen ist es bereits möglich, die verschiedenen Nukleationsprozesse unter verschiedenen Bedingungen (äußere Felder in unterschiedlichen Orientierungen) zu erklären [105]. Alle beschriebenen Zustände besitzen nahezu gleiche Gleichgewichtsenergien, deren Unterschiede nur theoretisch erfasst werden können und experimentell kaum zugänglich sind [17]. Die Nukleation der Streifendomänen ist ein homogener Übergang zweiter Ordnung, während die Entstehungen der Bubbles und des gemischten Zustandes ein inhomogener Übergang erster Ordnung sind [105].

Bei der Methode der Erhitzung ist der paramagnetische Zustand des Films als äquivalent zum Zustand der Sättigung entlang einer Richtung zu sehen. Beim Abkühlen wird die Freie Energie der Struktur erniedrigt, bis sie genauso ein Minimum erreicht, wie bei der Erniedrigung eines äußeren Feldes. Die Nukleation verschiedener Domärentypen hängt dann im Fall des gemischten Zustands oder der Bubbles vom Vorhandensein eines schwachen Feldes in Richtung der *hard-axis*, beziehungsweise einer leichten Abweichung davon, ab. Dieses Feld ist dann ein konstanter Bestandteil der Freien Energie und gibt bei Energieverringern durch Abkühlen den vom Winkel abhängigen Nukleationsprozess vor.

4.3 Partikel

Als zentraler Bestandteil der strukturell veränderbaren Substrate, wurden die magnetischen Partikel eingehender untersucht. Nach Untersuchungen zur Morphologie der Partikel, die vor allem die Größenverhältnisse aufzeigen sollten, folgte die magnetische Charakterisierung. Da es sich bei den Partikeln um Kompositpartikel handelte, stellte sich vor allem die Frage nach superparamagnetischem Verhalten. Nach den verschiedenen Experimenten konnte magnetisch sowie strukturell kein nennenswerter Unterschied zwischen den in Abschnitt 3.1.2 genannten unterschiedlichen Partikeltypen ausgemacht werden [102], so dass der Kürze halber der Fokus auf die für biologische Experimente hauptsächlich verwendeten Teilchen gelegt wird.

4.3.1 Morphologie

Um Aufschluss darüber zu finden, wie die genaue Struktur der Partikel aussieht, wurden Untersuchungen an einzelnen Teilchen im Rasterelektronenmikroskop (REM) und Transmissionselektronenmikroskop (TEM) vorgenommen. Dazu wurden Partikel in starker Verdünnung einerseits auf einen leitenden Probenhalter, andererseits auf ein mit Graphit beschichtetes Kupfernetz gebracht. In Abbildung 4.12 sind exemplarisch Teilchen gezeigt. Die Hintergrundstruktur in Abbildung 4.12 (b) kommt von der Kohlenstoffstruktur des Netzes. Mit der REM-Aufnahme in Abbildung 4.12 (a) ist bereits zu erkennen, dass die Form des Partikels nicht sphärisch ist, sondern dass es sich bei dieser Annahme nur um eine Näherung handelt. Die einzelnen Kristallite sind von einer Matrix umgeben, die in der Aufnahme auch erkennbar scheint und so die Einzelteilchen nicht auszumachen sind. Allerdings sind die äußeren Kristallite doch offensichtlich nicht so gepackt, dass es einer dichtesten Kugelpackung ähneln würde. Dies kann auch mittels TEM-Aufnahmen bestätigt werden. Hier erzeugt die biokompatible Polysaccharid-Matrix keinen genügend hohen Kontrast, so dass die Einzelkristallite deutlich zu erkennen sind. Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass die Partikel eine durchschnittliche Größe von 200nm besitzen, wobei starke Variationen auftreten können, von meist etwas kleineren Partikeln bis hin zu 250nm Agglomeraten. Größere Partikel sind in der Regel nicht vorhanden. Es ist nicht eindeutig festzustellen, ob die Kristallite teilweise so dicht aneinander liegen, dass eine Kopplung prinzipiell möglich wäre. Ei-

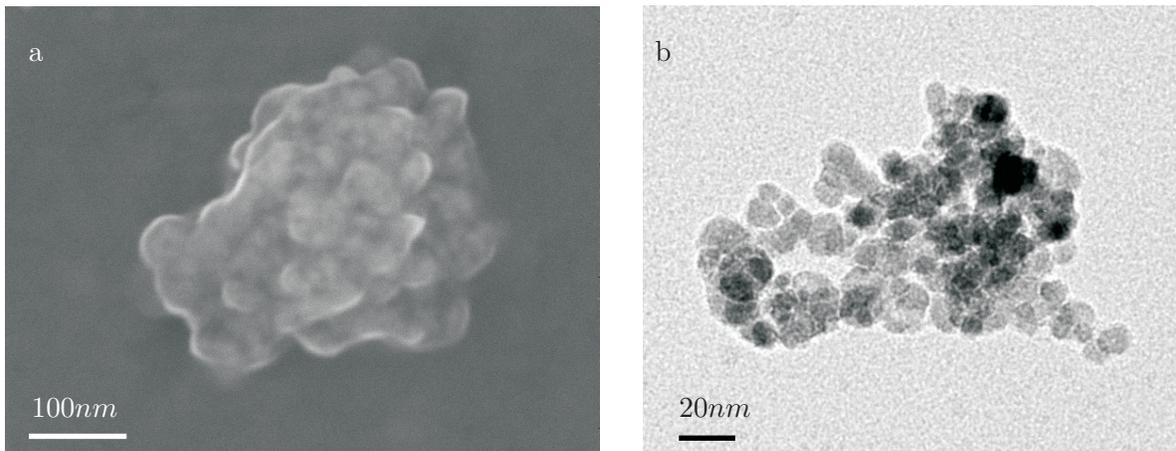


Abbildung 4.12: Aufnahmen von Naopartikeln. a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Partikels. b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme.

nerseits könnte die Kopplung in Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bestehen oder andererseits in Austauschwechselwirkung über etwaige Korngrenzen der Partikel untereinander, so dass andere Messmethoden herangezogen wurden.

Für weitere Rechnungen ist es wichtig zu wissen, wie groß die einzelnen Kristallite sind. Eine Auszählung ergab Abbildung 4.13, in der der Radius der Einzelteilchen gegen den Zählwert aufgetragen wurde. Dabei handelt es sich um die Partikel der Firma micromod. Aussagekräftige Werte wurden aus einem Fit, der als durchgezogene Kurve dargestellt ist, gewonnen. Als Basis wurde eine Normalverteilung angenommen. In manchen Arbeiten, die sich mit der Größenverteilung kleinster Partikel auseinander setzen, wird auch eine log-Normalverteilung als Basis gesehen. Dabei finden Prozesse statt, die ein Wachstum begünstigen, das nicht symmetrisch um den Erwartungswert stattfindet, sondern etwas größere Partikel wahrscheinlicher macht. Hier wurde allerdings eine normale Gaußverteilung angenommen [106], da kein Grund vorlag, dass eine Partikelgröße der anderen gegenüber bevorzugt werden könnte. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass durch den Herstellungsprozess intrinsisch vorhandene Abweichungen symmetrisch um den Mittelwert liegen. Die Grundlage der Kurve besteht in

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{(x - \mu_E)^2}{2\sigma^2}\right) dx, \quad (4.2)$$

wobei σ die Standardabweichung und μ_E der Erwartungswert sind. Dabei ergab sich, dass das Einzelpartikel einen mittleren Radius von $6nm$ mit einer maximalen Abweichung von $3nm$ aufweist, die Standardabweichung beträgt $0,9nm$. Für die Partikel der Firma chemicell wurden die gleichen Ergebnisse erzielt [102]. Um während des Herstellungsprozesses möglichst monodisperse Partikel zu erhalten, wurden laut Hersteller der wässrigen Lösung, in der die Synthese stattfand, Stabilisatoren, wie beispielsweise Polyvinylalkohol zugegeben [106]. Eindeutig kann festgehalten

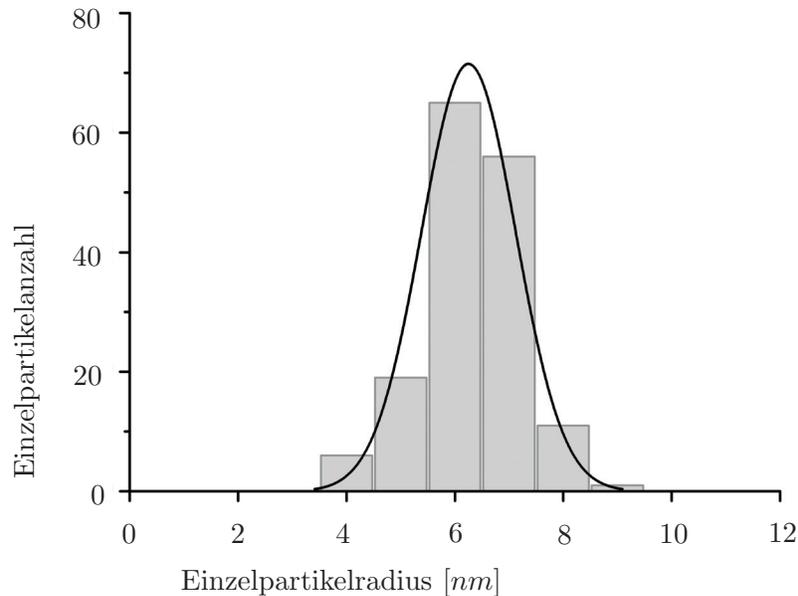


Abbildung 4.13: Größenverteilung der Einzelkristallite innerhalb eines Partikels.

werden, dass die Einzelteilchen unterhalb der Größe für ein MD-Teilchen liegen, deren Grenze wie in Abschnitt 3.1.2.2 bereits erwähnt, bei weitaus größeren Radien um 50nm zu finden ist.

4.3.2 Magnetisches Verhalten

Eine wichtige Aufgabe besteht darin, zu klären, ob die Gesamtpartikel superparamagnetisch sind, wenn sie in Zellkultur oder bei Raumtemperatur vorliegen.

Die Einzelkristallite besitzen kubische Anisotropie auf Grund ihrer Kristallstruktur. Für reine Sphären mitteln sich alle Beiträge der Formanisotropie heraus [24, 28, 29], wobei für Magnetit ohnehin kein Beitrag der kristallinen Anisotropie für perfekt kubische Kristallite existiert [107]. In Betracht gezogen werden sollten Geometrien, die stark von einer Symmetrie in mindestens drei Raumrichtungen abweichen. Für in einer Richtung elongierte Partikel spielt Formanisotropie eine Rolle, so dass diese dann die kristalline Anisotropie übertreffen kann [107, 108]. Aus den REM- und TEM-Aufnahmen der Gesamtpartikel ist zu erkennen, dass die Einzelpartikel zwar keine stark elongierte Form, die einem Ellipsoid ähnlich wäre, besitzen, dennoch gibt es teilweise unregelmäßig geformte Kristallite, die sicherlich uniaxiale Anisotropieanteile aufweisen.

Die folgenden theoretischen Betrachtungen beinhalten ideale Partikel, das bedeutet kubische Form und keine Kopplung untereinander. Bezieht man sich auf Gleichung (2.14), so wird der Übergang des ferro- oder ferrimagnetischen Zustands zu superparamagnetisch durch das Zusammenspiel von Anisotropieenergie und thermischer Energie festgelegt. Unterhalb der Verwey-Temperatur $T_V \sim 120\text{K}$ wechselt ein Magnetitfilm beziehungsweise Magnetit als Volumenmaterial das Vorzeichen der Anisotropiekonstante K'_k von negativ zu positiv und wird somit uniaxial,

wie in Abschnitt 3.1.2.2 erklärt ist. Allerdings tritt dieser Effekt bei kleinen Partikeln erst bei sehr viel geringeren Temperaturen auf. So zeigen Magnetitpartikel mit 150nm Durchmesser einen Übergang bei $T_V = 98\text{K}$, 50nm -Partikel erst bei 16K und 5nm große Teilchen zeigen keinen Übergang bis hinunter zu 5K [24]. Demnach wird für die vorliegenden verwendeten Proben dieser Effekt keine Rolle spielen, so dass das Verhalten der durchschnittlich 12nm großen Teilchen hauptsächlich von kubischer Kristallanisotropie bestimmt wird.

Bei der Berechnung der Blockingtemperatur wird die Anisotropiekonstante K_{eff} also durch die Energiebarriere geprägt, die die Magnetisierung eines Partikels beim Wechsel von einer magnetischen [111]-Vorzugsrichtung zu einer anderen überwinden muss. Zwischen zwei Vorzugsrichtungen muss die Magnetisierung einmal parallel zu einer [110] Richtung liegen. Die mit den verschiedenen Achsen verbundenen Energien e_K pro Volumeneinheit sind [27]

$$\begin{aligned} e_K[111] &= K'_1/3 \\ e_K[110] &= K'_1/4 \\ e_K[100] &= 0, \end{aligned} \quad (4.3)$$

so dass sich im oben beschriebenen Fall

$$e_K[110] - e_K[111] = \frac{|K'_1|}{12} = K_{eff} \quad (4.4)$$

als Energiebarriere ergibt. Der kritische Radius in Abhängigkeit der Blocking-Temperatur lässt sich nach Einsetzen in Gleichung (2.14) zu

$$r_{krit} = \sqrt[3]{\frac{9 \ln(\tau_N/\tau_0) k_B T_{block}}{\pi |K'_1|}} \quad (4.5)$$

$$= c_{1,2} \cdot \sqrt[3]{T_{block}} \quad (4.6)$$

berechnen, wobei $c_1 = 3,93 \frac{\text{nm}}{\sqrt[3]{K}}$ die Konstante darstellt, wenn man $\tau_N = 1\text{s}$ als Néelsche Relaxationszeit, beziehungsweise Messzeit, annimmt, $c_2 = 3,23 \frac{\text{nm}}{\sqrt[3]{K}}$ für $\tau_N = 10^{-4}\text{s}$, wie bereits im Abschnitt 2.1.3 erläutert. $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$ ist die Boltzmannkonstante und $K'_1 = -1,35 \cdot 10^4 \frac{\text{J}}{\text{m}^3}$ die bereits in Abschnitt 2.1.3 genannte kubische Anisotropiekonstante.

In Abbildung 4.14 ist für die zwei verschiedenen Relaxationszeiten der prinzipielle Verlauf des kritischen Radius gegen die Temperatur aufgetragen. Der graue Bereich gibt die zu betrachtenden Größen der Magnetitpartikel an, die die Strukturuntersuchungen in Abschnitt 4.3.1 ergeben haben. Unterhalb der gezeichneten Kurven verhält sich das Partikel superparamagnetisch, oberhalb eindomänig-ferromagnetisch. Die Kurven geben somit gerade den Bereich an, in dem die Blockingtemperatur definiert wird. Für ein bestimmtes Teilchen mit Radius r kann die Temperatur abgelesen werden, ab der es zum ferromagnetischen Zustand wechselt, da die Temperatur

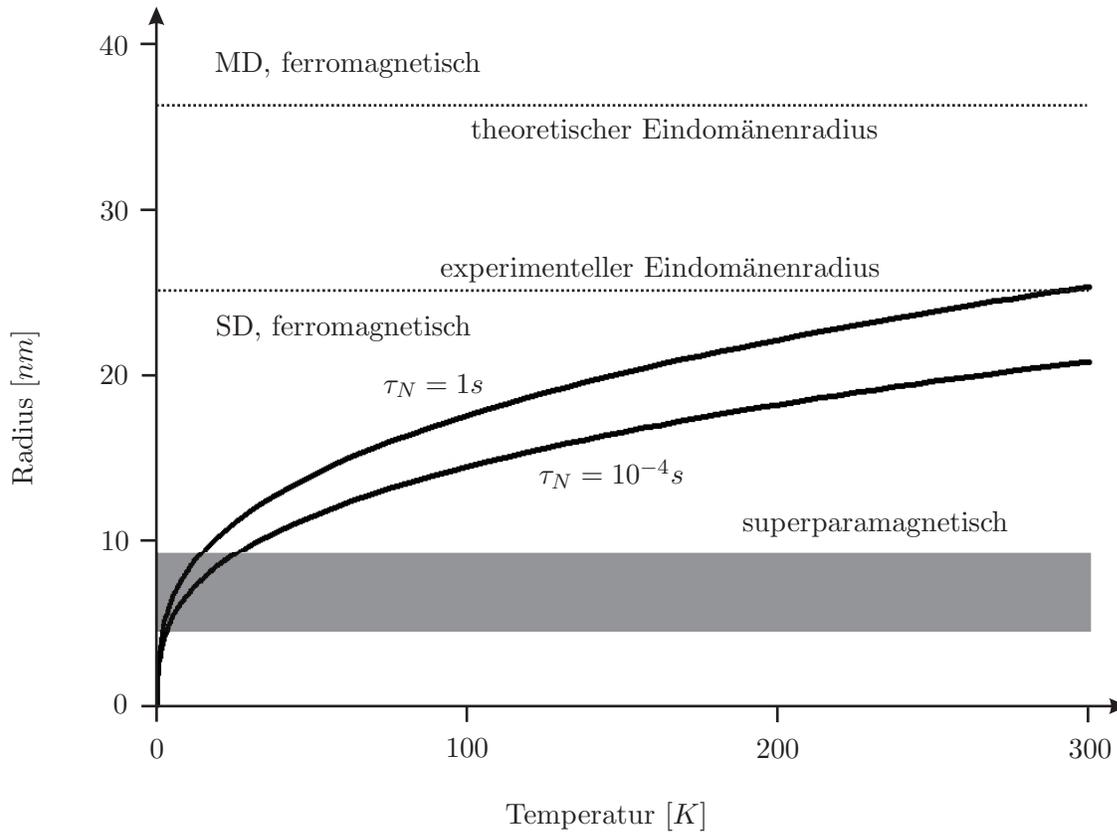


Abbildung 4.14: Darstellung der Abhängigkeit des kritischen Radius eines Partikels von der Blocking-Temperatur beim Übergang vom superparamagnetischen zum ferromagnetischen Zustand. Der graue Bereich entspricht den Radien, die für die Magnetit Einzelkristallite ermittelt wurden.

nicht mehr ausreicht, um die Anisotropieenergie zu überwinden. Zur Orientierung sind zusätzlich die experimentell zu 25nm und theoretisch zu 38nm bestimmten Partikelradien eingetragen [27], die den Übergang zwischen eindomänigen und mehrdomänigen Teilchen darstellen. Anhand der Kurven wird deutlich, dass ein Übergang zum Superparamagnetismus bis zu ungefähr 25K zu erwarten ist, wenn man von ungekoppelten Teilchen ausgeht.

Um Brownsche Relaxation zu verhindern, wurden die Partikel während der Messungen im SQUID in ihrer Trägerflüssigkeit Wasser eingefroren, indem die Temperatur immer unter dem Gefrierpunkt gehalten wurde. Brownsche Relaxation bedeutet im Gegensatz zur Néelschen, dass die magnetischen Momente der Partikel an deren Kristallachsen gebunden sind und äußere Felder die Partikel ausrichten, indem sich die ganzen Partikel räumlich drehen. In Abbildung 4.15 ist eine Magnetisierungskurve gezeigt, die das magnetische Verhalten einer Probe der Partikelstammlösung in äußeren Feldern darstellt. Aufgetragen sind dabei die Magnetisierung der Probe gegen das äußere Feld. Da das SQUID die Daten als absolute magnetische Momente ausgibt, ist eine Normierung erforderlich. Es war nicht möglich, Absolutwerte des Magnetitgehaltes in der Probenlösung festzustellen. Aus diesem Grund wurde die Darstellung der Messergebnisse auf die Sättigungsmagnetisierung der Probe normiert. Um die Unterschiede der Messungen bei

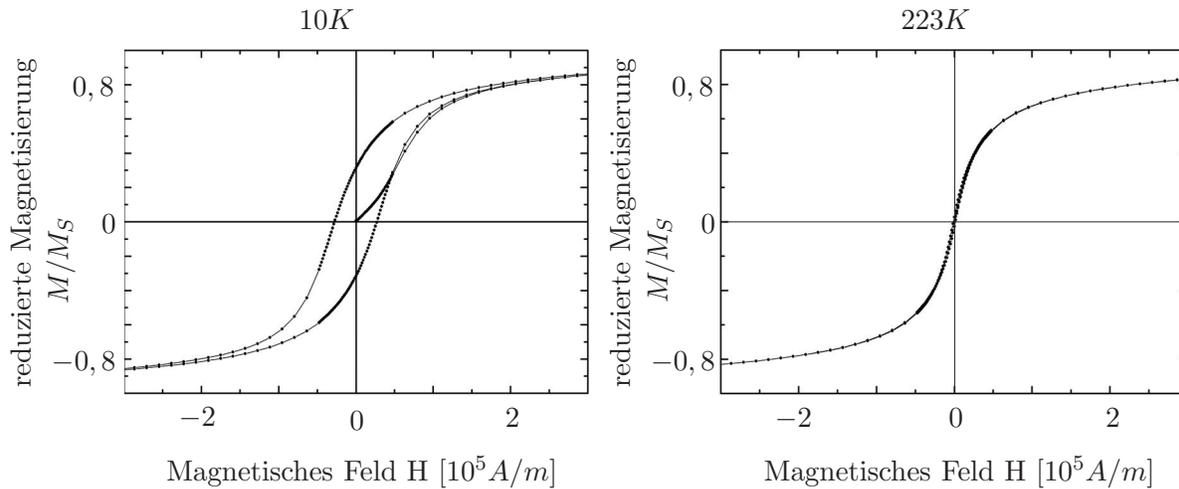


Abbildung 4.15: Magnetisierungsmessungen der magnetischen Partikel bei den Temperaturen $10K$ und $223K$ [109].

verschiedenen Temperaturen aufzuzeigen, wurde die Darstellung so gewählt, dass die interessanten Kurvenbereiche um den Nullpunkt herum vergleichbar sind. Deshalb sind in der Darstellung nur Teilbereiche sichtbar, die Sättigungsmagnetisierung wird erst bei um einen Faktor 10 höheren Feldern erreicht.

Deutlich ist erkennbar, dass bei der Messung, die bei $10K$ durchgeführt wurde, Hystereseeffekte auftreten. Die Neukurve, die man erhält, wenn man bei erstmaligem Anlegen eines äußeren Feldes das Verhalten der Probe aufzeichnet, beginnt wie erwartet im Nullpunkt, da selbst in gefrorenem Zustand die magnetischen Momente der Partikel zufällig verteilt sein sollten, sofern beim Einfrieren kein äußeres Feld anliegt. Trotz der Normierung können Aussagen über die Koerzitivfeldstärken und damit über Hystereseeigenschaften getroffen werden. Die Messungen zeigen Koerzitivfeldstärken von $H_C^{10K} = 2,69 \cdot 10^4 A/m$ und $H_C^{223K} = 1,1 \cdot 10^3 A/m$ [109]. Obwohl die Hysterese im Vergleich zur Messung bei $10K$ gering ist, ist sie auch bei der höheren Temperatur noch nicht ganz verschwunden. Sie ist allerdings um einen Faktor 25 kleiner. Die geringe Hysterese deutet daraufhin, dass trotz der hohen Temperatur noch eine Wechselwirkung der Momente untereinander existiert. Dass der Beitrag von noch nicht überwundenen Anisotropiebeiträgen stammt, ist gemäß der Vorüberlegungen ausgeschlossen. Aus den TEM-Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Einzelkristallite zum Teil sehr eng aneinander liegen, was zu nicht vernachlässigbaren Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Austauschwechselwirkungen [24] führt, so dass nicht mehr von vollständig entkoppelten Einzelteilchen ausgegangen werden kann. Eine ausschlaggebende Größe in der Ferrofluidforschung, die im Wesentlichen suspendierte Einzelpartikel behandelt, ist die Angabe der Konzentration der magnetischen Partikel. Es konnte festgestellt werden, dass extrem niedrige Konzentrationen von 2vol% bereits einen merklichen Anteil an Energiebeiträgen aufweisen, die auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurückzuführen sind [24].

In Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen, die zu Abbildung 4.14 geführt ha-

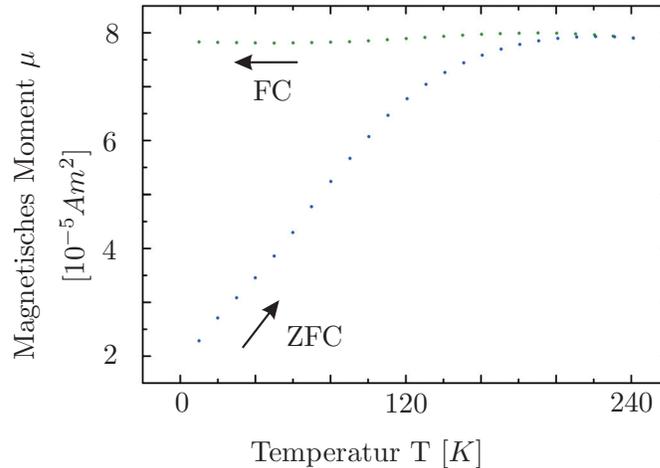


Abbildung 4.16: Blockingdiagramm der Partikelstammlösung zur Bestimmung der Blockingtemperatur. Es ist kein klarer Bereich erkennbar, in dem die Partikel vom ferrimagnetischen Zustand in den superparamagnetischen übergehen.

ben, kann man aber in Näherung sagen, dass die Partikel bei einer Temperatur zwischen $10K$ und $223K$ geblockt werden und ab einer bestimmten Temperatur die Energie nicht mehr genügt, die magnetischen Momente statistisch, abgesehen von Dipol-Dipol- und Austauschwechselwirkungen, zu verteilen. Um einen genaueren Überblick über diesen Temperaturbereich zu gewinnen, bietet es sich an, ein sogenanntes Blockingdiagramm der Teilchensuspension aufzunehmen [24, 32, 33, 106, 110]. Dabei wird eine magnetische Probe eingefroren und bis zu einer bestimmten Temperatur ohne ein äußeres Feld abgekühlt. Während des Erwärmens wird dann die Magnetisierung gemessen. Erneutes Abkühlen, unter Anlegen eines äußeren Feldes und erneutes Messen der Magnetisierung liefern den zweiten Teil des Blockingdiagramms. Abbildung 4.16 zeigt beispielhaft eine Messung, die von der Partikelstammlösung in einem Temperaturbereich von $10K$ bis $240K$ aufgenommen wurde und währenddessen ein Feld der Stärke $7,69 \cdot 10^3 A/m$ angelegt war. Die Funktionswerte wurden nicht normiert, sondern als absolute Werte aufgetragen. Die Pfeile geben an, wie die Probe erwärmt und anschließend wieder abgekühlt wurde. Der ZFC-Teil (zero field cooled) ist dabei so zu verstehen, dass anfänglich durch das Einfrieren ohne äußeres Feld, die magnetischen Momente der Partikel statistisch verteilt in allen Raumrichtungen vorliegen und dabei das während der Messung anliegende Feld nicht ausreicht, die Momente auszurichten. Erst mit steigender Temperatur steht den Momenten immer mehr Energie zur Verfügung, um sich frei zu bewegen und sich dementsprechend auszurichten. Somit steigt das gemessene magnetische Moment. Ab einer gewissen Temperatur, verhalten sich die Partikel dann superparamagnetisch. Die thermische Energie genügt, um statistische Bewegung zuzulassen, das magnetische Moment sinkt erneut. Das Maximum der Kurve stellt also die Blockingtemperatur dar. Im vorliegenden Fall kann nur ein Bereich von $180K - 220K$ angegeben werden [109]. Die dann anschließende FC-

Messung (field cooled) besagt, dass die magnetischen Momente mit fallender Temperatur erneut einfrieren, diesmal in der Richtung des anliegenden Feldes und nicht mehr statistisch verteilt. Der Punkt, an dem sich beide Kurven treffen, stellt den Punkt thermomagnetischer Irreversibilität dar, hier bei ungefähr $220K$. Oberhalb dieser Temperatur verhalten sich diese Teilchen wie paramagnetische Atome oder Moleküle. Ab diesem Punkt ist bei weiterem Abkühlen das magnetische Verhalten vom Vorhandensein des äußeren Feldes abhängig. Der Wert des äußeren Feldes während der Messung ist dabei willkürlich gewählt, $7,69 \cdot 10^3 A/m$ ($100Oe$) haben sich als ein praktikables Maß etabliert [110]. Zu beachten ist, dass die Blockingtemperatur von diesem Feld abhängt, da bei höheren Feldern mehr thermische Energie nötig ist, um magnetische Momente frei beweglich zu machen. Ginge man von einer Probe aus, die aus nichtkoppelnden Teilchen einer bestimmten Größe besteht, würde man ein scharfes Maximum der Kurve bei der Blockingtemperatur erwarten. Dass das Maximum verwaschen erscheint, liegt unter anderem an der Größenverteilung der Teilchen und somit an unterschiedlichen Beiträgen zur Anisotropieenergie, was in früheren Arbeiten bereits beobachtet wurde [110]. Da sich die Größenverteilung aber auf einige Nanometer beschränkt (Radius $6nm$, Standardabweichung $0,9nm$), ist es unwahrscheinlich, dass die Breite des Maximums, das sich über $40K$ erstreckt, nur auf diese Tatsache zurückzuführen ist. Zusammen mit der Tatsache, dass sich das Maximum bei viel höheren Temperaturen befindet, im Gegensatz zu den erwarteten $25K$, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die Einzelpartikel untereinander wechselwirken und zusätzliche Energie erforderlich wird, um den magnetischen Momenten freie Beweglichkeit zu erlauben. Die intrinsische Wechselwirkung dichter Ferrofluide ist immer noch Gegenstand aktueller Forschung, vor allem bezüglich der Berechnung dipolarer Wechselwirkungen [111, 112]. Dennoch kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei Raumtemperatur oder in Zellkultur, was nochmal eine $80K - 110K$ höhere Temperatur darstellt, die Partikel superparamagnetisches Verhalten aufweisen und selbst Dipol- oder Austauschkopplungen keinen nennenswerten Einfluss mehr haben, da die Hysterese im Gegensatz zum geblockten Zustand bereits bei $223K$ fast nicht mehr nachzuweisen ist.

Im Unterschied zu Abbildung 4.15 wurde in Abbildung 4.17 die reduzierte Magnetisierung gegen einen absoluten Wert ersetzt, um Aussagen über die Suszeptibilität der Probe treffen zu können, die später benötigt werden, um Kraftverhältnisse zwischen Partikel und Granatoberfläche betrachten zu können. Mit Vorsicht muss beachtet werden, dass unterschiedliche Temperaturen zu unterschiedlichem magnetischen Verhalten in äußeren Feldern führen [113], sowie Einflüsse der Magnetitkonzentration und sogar des umgebenden Mediums eine Rolle spielen [114]. Da die Magnetisierungskurven aus Abbildung 4.15 bei unterschiedlichen Temperaturen an derselben Probe vorgenommen wurden, lassen sich Rückschlüsse aus dem Vergleich der maximal gemessenen Momente μ_S ziehen. Dabei ergaben sich $\mu_S^{10K} = 50,4Am^2$ und $\mu_S^{223K} = 46,5Am^2$. Die Sättigungsmomente unterscheiden sich also um ungefähr 8%. Dieser Wert ist nicht gravierend genug, um den zuvor festgestellten Unterschied der beiden Koerzitivfeldstärken auf reine Skalierung zurückzuführen.

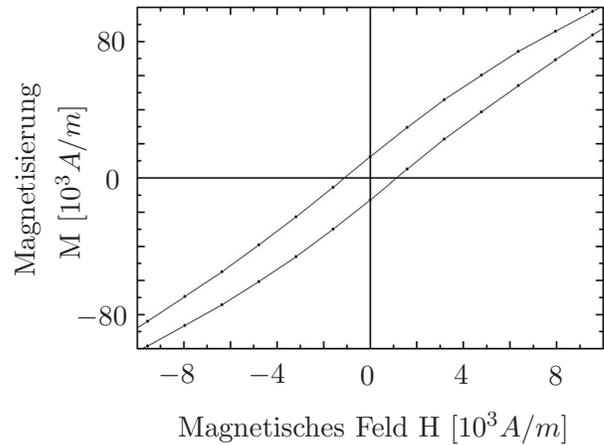


Abbildung 4.17: Magnetisierungsmessung der magnetischen Partikel bei der Temperatur $223K$. Gezeigt sind Werte um den Nullpunkt, durch die es möglich ist, mittels einer linearen Regression einen Wert für χ anzugeben. Die Magnetisierungswerte beziehen sich auf den Referenzwert der Magnetitsättigungsmagnetisierung.

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass sich für kleine Magnetitpartikel im Temperaturbereich $T_V < T < T_{Raum}$ in sehr guter Näherung als Sättigungsmagnetisierung derselbe Wert wie für Magnetitfilme ergibt, das heißt $M_S = 4,7 \cdot 10^5 A/m$ [115, 116]. Dabei wurden Magnetitteilchen verschiedener Größen von $10nm$ bis $1,5\mu m$ [24, 111, 117] experimentell untersucht, wobei der prozentuale Magnetitgehalt bei der Herstellung der Partikel abgeschätzt wurde und die Dichte ρ der Teilchen denselben Wert wie Magnetitfilme annimmt, das heißt $\rho = 5,3 \cdot 10^3 kg/m^3$ [115]. Das magnetische Signal der hier verwendeten Proben ist rein auf den magnetischen Kern der Partikel zurückzuführen. Die sonstigen Bestandteile der Suspension, wie Polysaccharide und Wasser verhalten sich diamagnetisch und besitzen Suszeptibilitäten um 10^{-6} [20]. Diese liegen somit etliche Größenordnungen unterhalb der der ferromagnetischen Stoffe. Mit diesem Sättigungswert ist es möglich, die zuvor durchgeführte Normierung auf das maximale Sättigungsmoment durch absolute Werte zu ersetzen. Aus dem Graph in Abbildung 4.17 kann nun für die Partikel die Suszeptibilität zu $\chi = 10,66$ errechnet werden, indem lineare Regressionen der beiden Kurventeile um den Nullpunkt herum für zunehmendes und abnehmendes äußeres Feld gemittelt werden. Dieser Wert befindet sich im Einklang mit der Literatur [111, 117–119]. Dabei muss beachtet werden, dass es sich keinesfalls um einen festen Wert handelt. Die Messungen hängen von vielen Parametern ab, die nicht in die Rechnungen miteinbezogen werden können, wie Partikelgröße und deren Verteilung, exakter prozentualer Anteil des magnetischen Materials, Wechselwirkungen der Teilchen etc. Als obere Schranke für Partikel in Suspension im $10nm - 200nm$ -Bereich lässt sich aber an Hand der Arbeiten eine Suszeptibilität von $\chi = 12$ festhalten, so dass folgende Berechnungen diesen Wert als absoluten Wert behandeln.

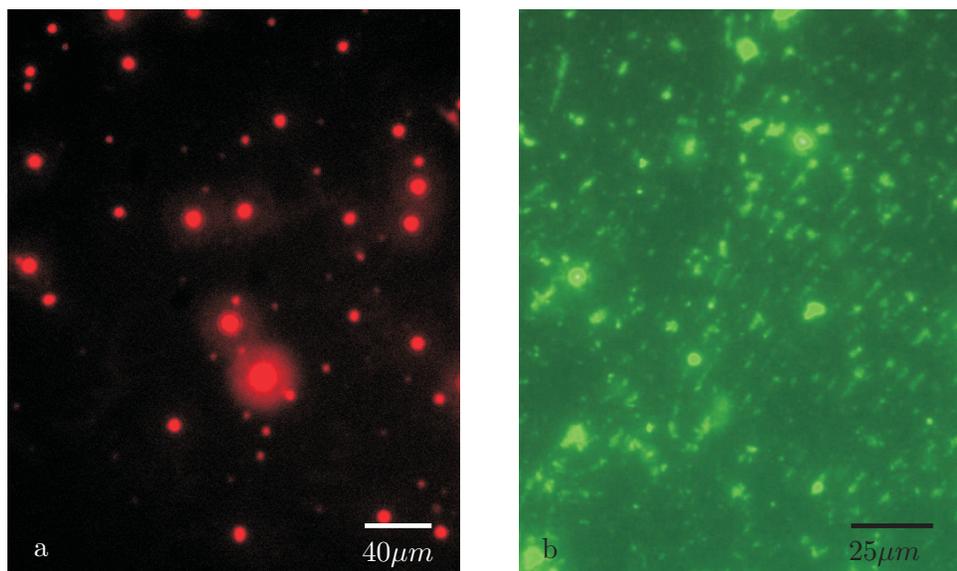


Abbildung 4.18: Funktionalisierung der magnetischen Partikel. a) Kovalentes Anbinden von Streptavidin- TexasRed an die reaktiven Carboxylgruppen der Polysaccharidhülle. b) Autoreaktive Kopplung von TGF β -1 an die Partikelhülle und anschließendes Färben mittels zweistufiger Antikörperreaktion.

4.3.3 Funktionalisierung

Magnetische Partikel sind mit unterschiedlichen reaktiven Endgruppen kommerziell erhältlich. Sollen Zellen über Oberflächen-Wechselwirkung beeinflusst oder gar differenziert werden, so bietet es sich an, die Substratoberfläche (bio-)chemisch zu verändern. Eine hier verwendete Methode besteht darin, die Partikel zu modifizieren und anschließend diese kontrolliert zu immobilisieren. Um eine lange Stabilität der Modifikation zu gewährleisten, sollte auf eine reine Adsorption der in Frage kommenden Moleküle an der Partikelmembran verzichtet werden. Eine kovalente Bindung zwischen Hülle und Molekül garantiert, dass die biologisch wirksamen Bestandteile nicht in Lösung übergehen, sobald sie in Kontakt mit dem Zellkulturmedium gelangen.

Ob eine Funktionalisierung auf Grund der geringen Größe der Partikel überhaupt möglich ist, wurde an Hand von Standardproteinen, die bereits fluoreszenzmarkiert erhältlich sind, getestet. Als gut charakterisiertes Protein gilt Streptavidin, das mit dem Protein Biotin zusammen als reaktives Paar der Untersuchung von dynamischem Proteinverhalten dient. Die in Abschnitt 3.3.2.1 beschriebene Carbodiimidmethode stellte sich als geeignet heraus, Streptavidin stabil kovalent anzubinden¹. Dabei wurde Streptavidin-TexasRed (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) mittels EDC, wie bereits beschrieben, aktiviert und anschließend an die mit COO^- -Gruppen versehenen magnetischen Partikel angebunden. TexasRed ist ein intensiv rot leuchtendes Derivat des Rhodamin. Um die Langzeitstabilität zu gewährleisten, wurden die funktionalisierten Partikel zwei Wochen lang mehreren Waschschritten in PBS unterzogen und anschließend wieder

¹Das spezifische Protokoll und die Untersuchungen zur Langzeitstabilität wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Pla-Roca, Nanobioengineering Laboratory, Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Barcelona Science Park entwickelt und durchgeführt.

in Puffer gelagert. Abbildung 4.18 (a) zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der Partikelsuspension. Im Gegensatz dazu zeigten Partikel, die keiner Aktivierung unterzogen wurden und nur mit Streptavidin in Verbindung gebracht wurden (Negativkontrolle), keine Fluoreszenzsignale mehr. Die reine Adsorption des Proteins an die Partikelhülle ist folglich wesentlich instabiler als die kovalente Kopplung.

Das Testen der Kopplungsmethode mittels Streptavidin wurde aus dem Grund durchgeführt, so dass keine zusätzliche Anfärbung mehr nötig war und die Stabilität im Fluoreszenzmikroskop direkt nachgewiesen werden konnte. TGF β -1 hingegen ist ein wesentlich kleineres Molekül und ist kommerziell nicht mit einem Farbstoff zu erhalten. Die Herstellung ist zudem aufwendiger und somit teurer, so dass es sich nicht anbietet, mit diesem Protein Vorversuche durchzuführen. Durch den Nachweis der Möglichkeit, Proteine kovalent an die Partikel anzubinden, wurde dann dieselbe Methode zur Funktionalisierung der Partikel mit TGF β -1 angewendet. Dieses Molekül ist sehr gut charakterisiert und dient vielen Zellen als Signalfaktor beziehungsweise Wachstumsfaktor. Dabei genügt es, wenn Transmembranproteine der Zelle mit TGF β -1 in Kontakt kommen, um eine Signalkaskade innerhalb der Zelle auszulösen [45, 120, 121]. Eine Internalisierung des Moleküls findet nicht statt. Aus diesem Grund wurde dieser Wachstumsfaktor verwendet. Dieser stellt ein gut charakterisiertes Molekül dar, das in dieser Arbeit dazu dient, die prinzipiellen Funktionsweisen des Systems aufzuzeigen.

Desweiteren stellte sich heraus, dass die autoreaktive Ankopplung von TGF β -1 an Triazin gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.3.2.2, auch eine Möglichkeit darstellt, Proteine kovalent an die Partikel zu koppeln, dabei aber wesentlich einfacher durchführbar ist. Um sicherzustellen, dass das TGF β -1, genau wie Streptavidin, stabil angebunden werden kann, wurde eine Färbung mit dem Farbstoff FITC gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.3.3.2 unternommen. Diese sehr zeitaufwendige Methode beinhaltet eine zweistufige Antikörperfärbung. Dabei besitzt der erste Antikörper (wahlweise Proteine aus der Maus) noch keinen Farbstoff und ist gegen TGF gerichtet. Der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper ist gegen den ersten gerichtet (im vorliegenden Fall gegen Maus) und reagiert nur mit dem ersten Antikörper kovalent. Unspezifische Bindungen lassen sich durch Waschstufen erneut lösen. Diese Methode wurde gewählt, um sicherzustellen, dass es zu keiner unspezifischen Bindung des Farbstoffs an die Partikelhülle kommt. Der Vorteil der zweistufigen Färbungen liegt in der hohen Selektivität, wenn auch auf Kosten stärkerer Signale.

Abbildung 4.18 (b) zeigt eine Probe, bei der TGF β -1-funktionalisierte Partikel an einen magnetischen Granatfilm angebunden wurden (die Musterbildung wird später im Detail aufgeführt). Erst nach Lagerung der Probe zur Gewährleistung der Langzeitstabilität, wurden die immobilisierten Partikel zweistufig angefärbt. Durch das Färbeprotokoll, das immer wieder Reaktionszeiten unter einem Deckgläschen unter Luftausschluss vorsieht, wurde die Strukturierung weitestgehend zerstört und die Partikel verschoben. An einigen Stellen ist jedoch noch eine linienförmige Anordnung der Teilchen zu erkennen. Das wichtige Resultat ist allerdings gut sichtbar.

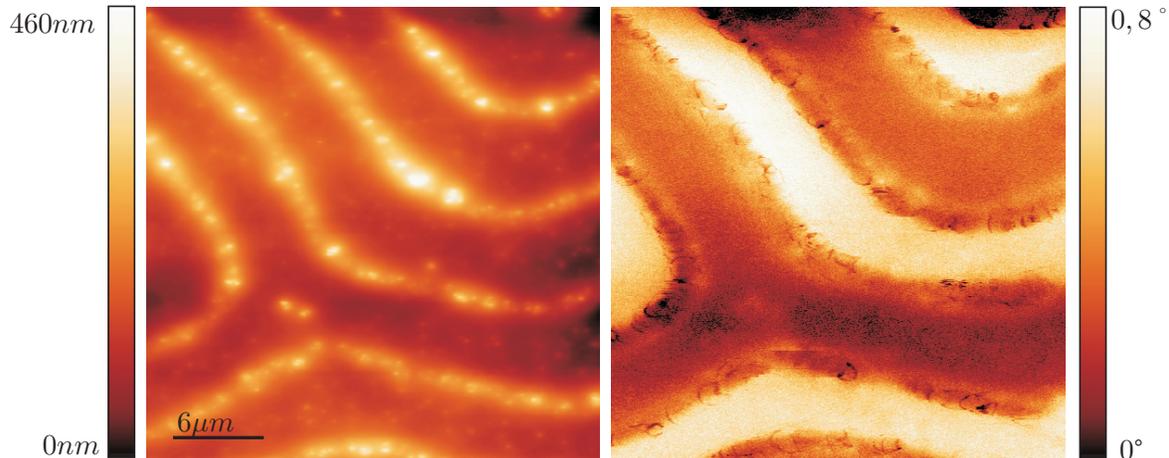


Abbildung 4.19: MFM-Aufnahmen eines mit Partikeln beschichteten Granats. Die Partikel lagern sich an den Domänenwänden an, was bereits an der Topographieaufnahme zu erkennen ist (links). Der Kontrast im Phasenbild (links) zeigt attraktive und repulsive Wechselwirkungen der Spitze mit Domänen unterschiedlicher Magnetisierung.

Ausschließlich die Partikel besitzen ein Fluoreszenzsignal, sie sind deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden. Dies beweist die spezifische Antikörperreaktion und die Stabilität der kovalenten Kopplung von TGF β -1 an die Partikel über für Zellexperimente genügend lange Zeiträume.

4.4 Immobilisation der Partikel

4.4.1 Verwendung magnetischer Granatfilme als Substrat

Nach Betrachtung der Einzelkomponenten magnetische Partikel und magnetische Granatschichten, soll im Folgenden auf das Zusammenspiel beider Materialien eingegangen werden. Mittels magnetischer Gradientenfelder können Kräfte auf die Partikel ausgeübt werden. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, besteht der Granatfilm aus Domänen, die an ihren Grenzflächen auf der Oberfläche Gradientenfelder hervorrufen. Diese ermöglichen ein kontrolliertes Anbinden der Partikel mittels magnetischer Wechselwirkung. Dazu werden die Granatfilme in wässriger Umgebung mit der Partikelsuspension in Verbindung gebracht. Die Partikel sinken auf die atomar glatte Oberfläche und werden in Mustern, die den Grenzgebieten zwischen benachbarten Domänen entsprechen, angelagert.

Abbildung 4.19 zeigt eine AFM- und MFM-Aufnahme einer beschichteten Probe. In der linken Topographieaufnahme sind die Partikel als Ketten zu erkennen, die sich in einem mittleren Abstand von ungefähr $5\mu\text{m}$ anordnen. Sie entsprechen der Mäanderstruktur des Granatfilms. Die MFM-Aufnahme der entsprechenden Probenstelle zeigt eindeutig, dass die Partikel gerade an den Grenzen zweier benachbarter Domänen immobilisiert werden. Der Hell-Dunkel-Kontrast der breiteren Bereiche resultiert aus der repulsiven, beziehungsweise attraktiven Wechselwirkung

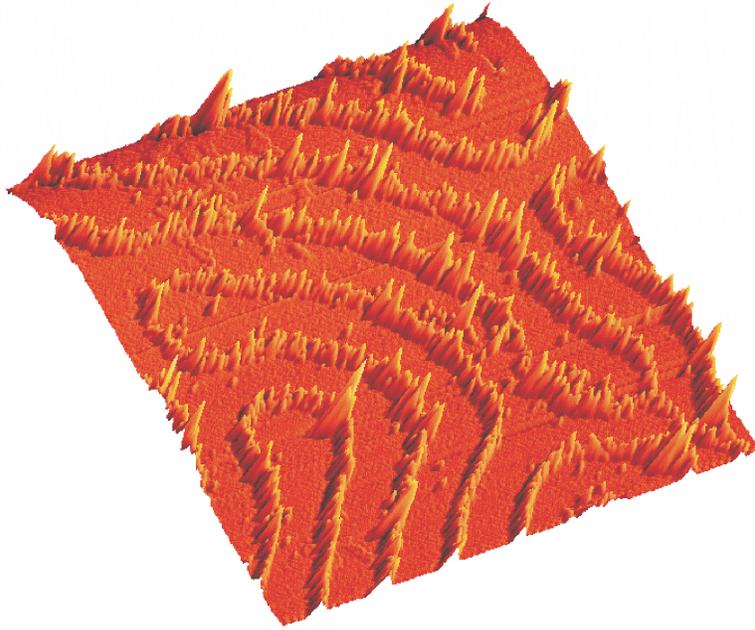


Abbildung 4.20: Dreidimensionale Darstellung einer AFM-Abbildung eines Granatfilms mit immobilisierten Partikeln. Der Bereich beträgt $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$, die Höhe maximal 400nm . Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt 200nm . Einzelne Peaks sind zu erkennen, was den Schluss zulässt, dass sich die Teilchen nebeneinander anstatt übereinander anordnen [15].

zwischen Streufeld des Films und der mittels *CoCr* beschichteten, magnetischen Spitze (Präparation siehe Abschnitt 3.2.1.3). Deutlich erkennbar ist, dass die Spitze die magnetische Struktur des Films während des Rasterns nicht stark beeinflusst. Im Gegensatz zu den Aufnahmen aus Abschnitt 4.2.2 wurde keine Spitze mit geringerem Moment benötigt [102]. Dies ist durch die Anwesenheit der Partikel zu erklären. Durch deren Wechselwirkung mit dem Substrat werden die Domänenwände während des Rasterns offensichtlich stabilisiert. Dass die dunklen Domänenbereiche im Gegensatz zu den helleren ausgedehnter erscheinen, liegt an den Partikeln. Sie rufen zusätzliche, attraktive Kräfte hervor.

Eine dreidimensionale Darstellung einer AFM-Messung eines Granatfilms, an dessen Domänenwände Partikel angelagert wurden, ist in Abbildung 4.20 zu sehen. Bei dieser Art der Darstellung lässt sich erkennen, dass die Partikel vorwiegend nebeneinander angeordnet sind, nicht übereinander [15], was im folgenden Abschnitt als wichtige Aussage in den Rechnungen verwendet wird.

4.4.2 Charakterisierung der magnetischen Wechselwirkung

Die Nanopartikel lassen sich an Domänenwände des Granats anbinden und, sofern sie in wässriger Umgebung bleiben, können sie den Domänenwänden folgen, wenn diese durch äußere Magnetfelder langsamer als $\sim 1\text{Hz}$ bewegt werden. Insbesondere hat sich im Zusammenspiel mit Zellen in Kultur gezeigt, dass die magnetische Wechselwirkung ausreicht, um die Partikel genügend fest

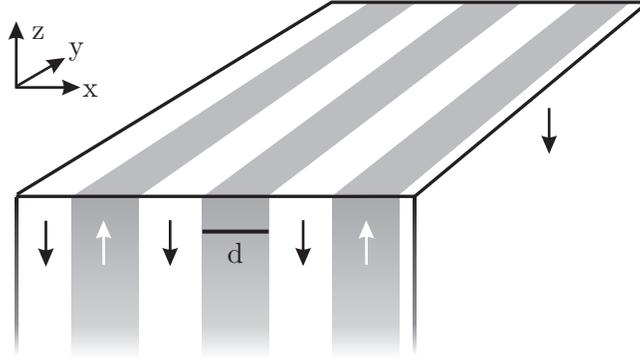


Abbildung 4.21: Zur Berechnung der magnetischen Wechselwirkung zwischen Partikel und Domänenwänden werden parallele Streifendomänen der Breite d unendlicher Tiefe und Länge angenommen.

an die Substratoberfläche anzubinden, so dass Endozytose verhindert wird. Es stellt sich die Frage, wie sich eine mit magnetischen Partikeln strukturierte Oberfläche von einer unstrukturierten Granatoberfläche physikalisch unterscheidet, wenn man die Zellreaktionen auf eine Strukturierung betrachtet, wie sie später in Abschnitt 5.2.2 erläutert werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, muss man abschätzen, wie fest ein Partikel an die Oberfläche auf Grund magnetischer Wechselwirkung angebonden ist.

Ausgehend von einer Streifendomänenkonfiguration, wie sie in Abbildung 4.21 gezeigt ist, die aus Streifen unendlicher Länge und Tiefe besteht, lässt sich die Streufeldverteilung an der Oberfläche des Granats angeben. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da hier Partikel der Größenordnung $200nm$, maximal $500nm$, betrachtet werden und im Vergleich dazu die Granatschichtdicke mit $5\mu m$ mehr als eine Größenordnung dicker ist.

Mit $\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{M} + \mathbf{H})$, ergibt sich unmittelbar an der Oberfläche der Domänen die Randbedingung

$$\begin{aligned} \mathbf{H} &= \frac{1}{2}\mathbf{M}, \quad z \rightarrow 0^+ \\ \mathbf{H} &= -\frac{1}{2}\mathbf{M}, \quad z \rightarrow 0^-. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Nimmt man weiter an, dass die Magnetisierung \mathbf{M} innerhalb einer Domäne nur eine z -Komponente besitzt, so lässt sich die Magnetisierung senkrecht zur y -Richtung in der x - z -Ebene durch die Fourierreihe eines Rechtecksignals mit der Amplitude $|\mathbf{M}|$ ausdrücken [23]:

$$M(x) = \frac{4M}{\pi} \left(\sin kx + \frac{\sin 3kx}{3} + \frac{\sin 5kx}{5} \dots \right), \quad (4.8)$$

wobei $k = \pi/d$ und d die Domänenbreite angibt, die ungefähr $5\mu m$ beträgt. Mit Gleichung (4.7) und der Gültigkeit der Maxwellgleichungen, ergibt sich für die Komponenten des Magnetfelds

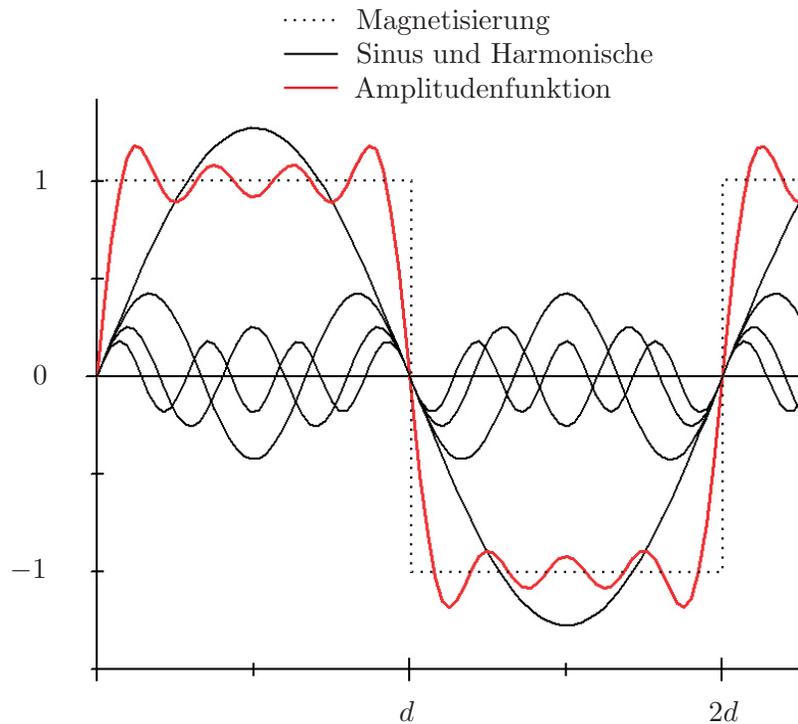


Abbildung 4.22: Die Magnetisierung des Granatfilms ist durch eine Fourierreihe, bestehend aus einer skalierten Sinusfunktion und deren höheren Harmonischen, beschreibbar. Die ersten vier Summanden der Reihe sind jeweils als schwarze Kurven dargestellt. Addiert ergeben sie die rote Kurve. Die Amplitudenfunktion ergibt als unendliche Reihe die Rechteckmagnetisierung.

oberhalb des magnetischen Granatfilms

$$H_z = \frac{2M}{\pi} \left(\exp(-kz) \sin kx + \exp(-3kz) \frac{\sin 3kx}{3} + \exp(-5kz) \frac{\sin 5kx}{5} + \dots \right) \quad (4.9)$$

$$H_x = -\frac{2M}{\pi} \left(\exp(-kz) \cos kx + \exp(-3kz) \frac{\cos 3kx}{3} + \exp(-5kz) \frac{\cos 5kx}{5} + \dots \right). \quad (4.10)$$

Das Potential eines magnetischen Moments \mathbf{m} , das in einem Magnetfeld \mathbf{H} einen magnetischen Fluss \mathbf{B} generiert, ist am geringsten, wenn beide parallel gerichtet sind, so dass

$$\phi = -\mathbf{B} \cdot \mathbf{H} \quad (4.11)$$

$$= -\mu_0 \mathbf{m} \cdot \mathbf{H} \quad (4.12)$$

Die verwendeten Partikel besitzen kein festes magnetisches Moment. Das magnetische Moment richtet sich nach dem umgebenden magnetischen Feld und ist mit diesem über das Teilchenvolumen V und die Suszeptibilität χ verknüpft [18]. Weiter unten wird erklärt, weshalb kein festes magnetisches Moment der Partikel angenommen wird. Somit ergibt sich das magnetische

Moment \mathbf{m} zu

$$\mathbf{m} = \frac{4}{3}\pi r^3 \chi \mathbf{H}, \quad (4.13)$$

mit r als Partikelradius, so dass

$$\phi = -\mu_0 \frac{4}{3}\pi r^3 \chi (\mathbf{H} \cdot \mathbf{H}) \quad (4.14)$$

Die Wechselwirkungskraft \mathbf{F} zwischen magnetischem Partikel und dem Feld der Domänen lässt sich wie folgt schreiben:

$$\mathbf{F} = -\nabla \phi \quad (4.15)$$

$$= \mu_0 \nabla (\mathbf{m} \cdot \mathbf{H}) \quad (4.16)$$

$$= \mu_0 V \chi \nabla (H^2), \quad (4.17)$$

mit V als Volumen des Partikels. Die Kraft lässt sich nun vereinfachen zu

$$\begin{aligned} \mathbf{F} &= \mu_0 V \chi \nabla (H_x^2 + H_z^2) \\ &= \mu_0 V \chi \begin{pmatrix} \partial_x (H_x^2 + H_z^2) \\ 0 \\ \partial_z (H_x^2 + H_z^2) \end{pmatrix} \\ &= \mu_0 V \chi \begin{pmatrix} 2H_x \partial_x H_x + 2H_z \partial_x H_z \\ 0 \\ 2H_x \partial_z H_x + 2H_z \partial_z H_z \end{pmatrix}. \end{aligned} \quad (4.18)$$

Um diesen Ausdruck weiter berechnen zu können, bietet es sich an, Gleichungen (4.9) und (4.10) als Summenreihen mit $k_n := (2n + 1)k$ darzustellen als

$$\begin{aligned} H_z &= \frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \exp[-(2n+1)kz] \sin[(2n+1)kx] \\ &= \frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \\ H_x &= -\frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \exp[-(2n+1)kz] \cos[(2n+1)kx] \\ &= -\frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \cos[k_n x]. \end{aligned} \quad (4.19)$$

Für die partiellen Ableitungen ergeben sich

$$\begin{aligned}
\partial_x H_z &= \frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} k \exp[-k_n z] \cos[k_n x] \\
\partial_z H_z &= \frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} -k \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \\
\partial_x H_x &= -\frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} -k \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \\
\partial_z H_x &= -\frac{2M}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} -k \exp[-k_n z] \cos[k_n x],
\end{aligned} \tag{4.20}$$

so dass die Komponenten der Kraft \mathbf{F} nun letztlich ohne weitere Ableitungen nach Einsetzen in Gleichung (4.18) geschrieben werden können als

$$\begin{aligned}
F_x &= \mu_0 V \chi \frac{8M^2}{\pi^2} \left[\sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \cos[k_n x] \right) \sum_{n=0}^{\infty} \left(-k \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \right) \right. \\
&\quad \left. + \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \right) \sum_{n=0}^{\infty} \left(k \exp[-k_n z] \cos[k_n x] \right) \right], \\
F_z &= \mu_0 V \chi \frac{8M^2}{\pi^2} \left[\sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \cos[k_n x] \right) \sum_{n=0}^{\infty} \left(-k \exp[-k_n z] \cos[k_n x] \right) \right. \\
&\quad \left. - \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2n+1} \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \right) \sum_{n=0}^{\infty} \left(k \exp[-k_n z] \sin[k_n x] \right) \right].
\end{aligned} \tag{4.21}$$

Um nun einen Absolutwert nennen zu können, werden endlich viele Terme summiert und numerisch berechnet. Die Partikel lagern sich an den Domänenwänden, also in Bereichen wechselnder Magnetisierung, an. Genau diese Stellen sind von Interesse, wenn man Kräfte, die Zellen aufbringen müssen, um Partikel zu bewegen, betrachtet. Wie man in Abbildung 4.22 sieht, stellt die Sinusfunktion als erster Term der Reihe schon eine Näherung dar. Allerdings wird die Kraft gerade im interessanten Bereich unterschätzt, wenn man die Reihe dort bereits abbricht, um unter Umständen analytisch weiter rechnen zu können. Da die Exponentialterme in der Summe aber eine starke Konvergenz aufweisen und ab einem bestimmten Summanden zwar noch einen von Null ungleichen Betrag aufweisen, in der Realität aber nicht mehr relevant sind, wird die Summe vom physikalischen Gesichtspunkt aus abgebrochen. Um eine Abschätzung zu treffen, bei welchem Summanden n_a die Reihe abgebrochen werden kann, soll die Bedingung $\exp(-k_n z) \leq 1\%$ erfüllt sein, so dass sich eine Bedingung für einen Summenabbruch ergibt:

$$n_a \leq \frac{-d \ln(0,01)}{2\pi z} - \frac{1}{2}. \tag{4.22}$$

Für ein Teilchen des Radius 100nm ergibt sich somit eine Summenreihe mit 40 Summanden, die

unbedingt benötigt werden, um eine Unterschätzung der Kraft zu verhindern. In den numerischen Rechnungen wurden 200 Summanden berücksichtigt, womit sichergestellt ist, dass weitere Summanden keinen physikalisch relevanten Beitrag mehr leisten würden.

In Abbildung 4.23 sind exemplarisch die Feldverteilung, die Kraftverteilung und das Potential gegeben. Zur Berechnung wurde verwendet, dass die Suszeptibilität $\chi = 12$ beträgt. Messwerte aus Abschnitt 4.3.2 für die Gesamtpartikel, die aus 10nm Kristalliten bestehen, und Literaturwerte für 10nm Magnetitpartikel [117] ergeben, dass dieser Wert als eine obere Schranke für die magnetische Suszeptibilität bei Raumtemperatur angenommen werden kann. Aus Abbildung 4.23 (a) ist zu entnehmen, dass die vom Granatfilm erzeugten Felder in der Größenordnung $10^3\text{A/m} - 10^4\text{A/m}$ liegen. Im Vergleich zu Abbildung 4.17 ergibt sich, dass sich bei diesen Feldstärken die Magnetisierung der Partikel linear zum Feld ändert und noch nicht gesättigt ist. Somit ist die Herangehensweise das magnetische Moment vom umgebenden Feld über χ linear abhängig zu machen, gerechtfertigt. Die Magnetisierung wurde der Hysteresekurve des Granatfilms aus Abschnitt 4.2.1 als $M_S = 1,5 \cdot 10^4\text{A/m}$ entnommen. Die Höhe z ist durch den Radius des Partikels festgelegt. Im Folgenden wird, wenn nicht anders erwähnt, der Begriff Domänenwand als der Übergang zwischen zwei unterschiedlichen Magnetisierungsbereichen genannt, obwohl angenommen wird, dass die Wand unendlich dünn ist.

Die Feldverteilung in Abbildung 4.23 (a), besitzt eine Form, wie man sie erwartet. Die z -Komponente des magnetischen Streufeldes hat annähernd eine Rechteckstruktur einer Periode doppelter Domänenbreite, die einen Nulldurchgang über einer Domänenwand besitzt. Das Magnetfeld zeigt in einer bestimmten Höhe also qualitativ das, was man bei realen Proben beobachtet, nämlich das Vorhandensein einer nicht-konstanten Magnetisierung an den Domänenrändern. Konsistent zur z -Komponente besitzt die x -Komponente in der Mitte einer Domäne einen Nulldurchgang, während diese ihr Maximum gerade über einer Wand erfährt. Da in der Berechnung vorgegeben wurde, dass es keine y -Komponente des Magnetfeldes gibt, hat ein sich umkehrendes Feld nur die Möglichkeit sich innerhalb der $x - z$ Ebene zu verändern. Beginnt man in der Mitte einer Domäne negativer Magnetisierung, besitzt das Feld dort eine maximale z -Komponente ohne eine weitere Komponente. Nähert man sich nun von rechts einem kontinuierlichen Übergang zu positiven Feldwerten, so nimmt die z -Komponente betragsmäßig ab, während die x -Komponente ansteigt. Das Feld „dreht“ sich also von einer reinen z -Komponente zu einer reinen x -Komponente. Am Übergang verschwindet die z -Komponente ganz, um anschließend weiter auf Kosten der x -Komponente anzusteigen. Vergleichbar ist dieser Wechsel mit dem einer Néelwand.

Ähnlich verhält es sich bei der Kraftverteilung, Abbildung 4.23 (b). Die z -Komponente ist überall attraktiv und besitzt keinen Nulldurchgang. Entsprechend der Aussage, dass sich das Feld über einer Domänenwand am stärksten ändert und die Kraft sich aus dem Gradienten ergibt, erreicht die Kraft zwischen Film und Teilchen im berechneten Fall über einer Wand ein Maximum von ungefähr $100pN$. Erwartungsgemäß besitzt die x -Komponente über einer Domänenwand einen Nulldurchgang, so dass Teilchen, die in diesen Teil gelangt sind, dort verbleiben. Befinden

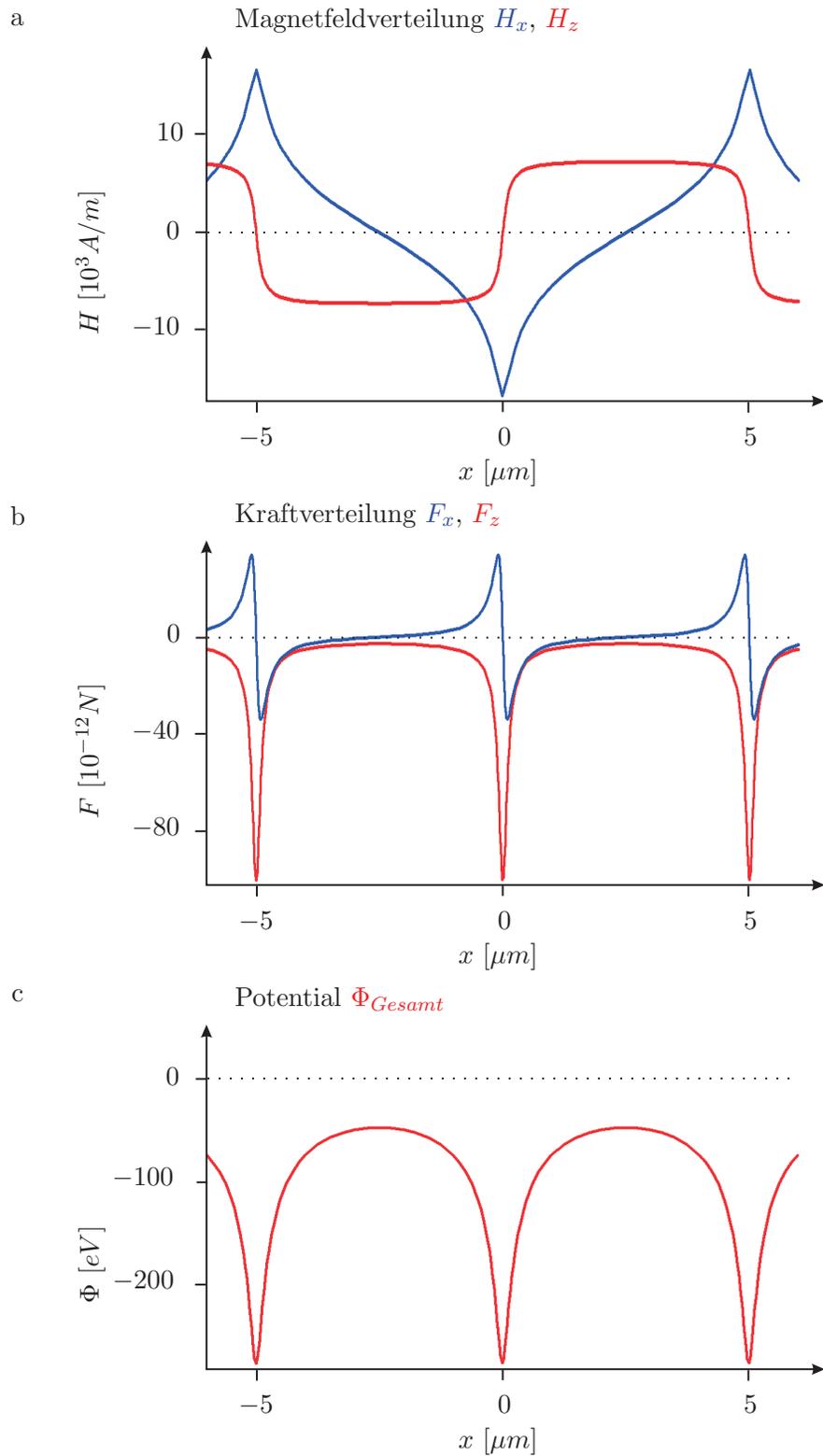


Abbildung 4.23: Numerisch berechnete a) Magnetfeld-, b) Kraft- und c) Energieverteilung. Exemplarisch wurden die Verhältnisse komponentenweise für ein magnetisches Partikel des Radius 100nm gegen den Ort auf der Granatoberfläche aufgetragen. Entsprechend des Entwicklungsansatzes befindet sich bei $x = 0$ eine Domänenwand. Die in x -Richtung maximal erreichbaren Kräfte liegen bei 33pN , die in z -Richtung bei 90pN . Die Energien, die sich ergeben, liegen drei Größenordnungen über der thermischen Energie, die in Zellkultur $26,7\text{meV}$ beträgt, über einer Domänenwand sogar vier Größenordnungen darüber [122].

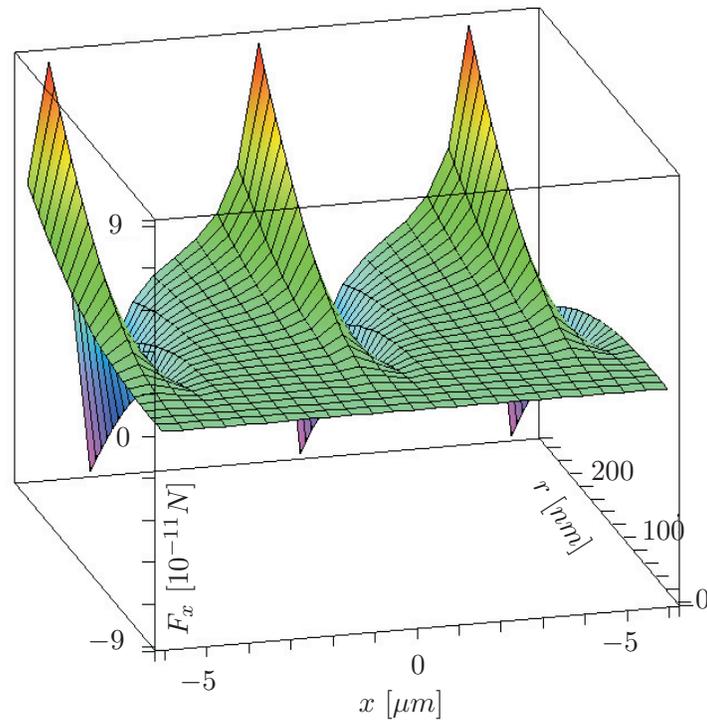
sie sich links einer Domänenwand, erfahren sie positive Kräfte in x -Richtung, was bedeutet, dass sie sich weiter nach rechts bewegen. Umgekehrt erfahren sie rechts einer Wand negative Kräfte, die sie in negative x -Richtung, also erneut auf eine Domänenwand hin, ziehen. Der Verlauf der Kurve ist um den Bereich der Domänenwand nahezu linear, so dass dort der Kraftverlauf dem eines harmonischen Oszillators entspricht. Ein labiles Gleichgewicht besteht auch in der Mitte einer Domäne, dort ist die herrschende Kraft in x -Richtung ebenfalls 0.

Experimentell ist allerdings zu beobachten, dass sich in diesem Bereich keine Partikel aufhalten, sofern die Partikelkonzentration eine Verteilung auf Grund magnetischer Kräfte zulässt. Dies ist damit zu erklären, dass die Teilchen, solange sie sich in Lösung befinden, sehr beweglich sind und erst nach einiger Zeit in Richtung der Granatoberfläche absinken. Die kleinste Abweichung von der Position der Domänenmitte, an der keine Kraft herrscht, führt zu einer attraktiven Wechselwirkung in Richtung einer Domänenwand. Schließlich gibt die Berechnung des Potentials in Abbildung 4.23 (c), die sich für ein Partikel ergibt, Aufschluss über die auftretenden Energien. Es ist direkt ersichtlich, dass keine Bereiche beachtet werden müssen, in denen die thermische Energie $k_B T$ eine Rolle spielen würde. Die niedrigsten Energien für ein Partikel von 100nm liegen im Bereich von 50eV , die höchsten bei 300eV an einer Domänenwand. Die thermische Energie ergibt sich in Zellkultur bei 37°C zu $26,7\text{meV}$, was um einen Faktor von 10^3 niedriger ist, über den Domänenwänden sogar ein Faktor 10^4 und somit jeder Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Systems vernachlässigt werden kann. Es ergibt sich auf der kompletten Breite einer Domäne ein attraktives Potential. Wird folglich ein magnetisches Partikel mit den genannten Eigenschaften über den Granatfilm gebracht, wird es, egal wo, zur Oberfläche hingezogen, da die z -Komponente des Feldes überall eine attraktive Wechselwirkung hervorruft. Um das Partikel von der Oberfläche zu lösen, muss Arbeit aufgewendet werden, selbst wenn es sich nicht im Bereich der Domänenwand befindet. Ist das Partikel auf dem Granat immobilisiert, reicht die thermische Energie nirgends aus, um das Partikel wieder in Lösung zu bringen [122].

Betrachtet man weiterhin die Radiusabhängigkeit der x -Komponente der Kraft oder des Potentials, zeigt sich ein überproportionaler Anstieg mit wachsendem r , was in Abbildung 4.24 zu erkennen ist. In Abbildung 4.24 (a) ist der Verlauf der x -Komponente der Kraft von $r = 0$ bis $r = 250\text{nm}$ aufgetragen, wobei Maximalwerte annähernd 100pN betragen. Als Summenabbruch ist $n_a = 350$ zu beachten, wenn man verlässliche Ergebnisse für ein Teilchen des Radius 10nm erhalten will. Eine ähnliche Darstellung zeigt Abbildung 4.24 (b), in der das Potential gegen den Ort in Abhängigkeit eines variierenden Radius von $r = 50\text{nm}$ bis $r = 250\text{nm}$, aufgetragen ist. Es sei explizit darauf hingewiesen, dass die Größenordnung der Darstellung keV ist.

Für die Anhäufung der Partikel an einer Domänenwand ist die x -Komponente der Kraft verantwortlich. Abbildung 4.25 zeigt einen Ausschnitt von F_x über einer Domänenwand. Die Maximalkraft liegt dort für ein Partikel des Radius 100nm bei 33pN . Die Hälfte dieses Maximalwertes wird bei einem Abstand von 300nm zur Domänenwand erreicht, der e -te Teil bei einem Abstand von 378nm . Dies bedeutet, dass die Halbwertsbreite, wenn man die Kraft betragsmäßig als einen

a



b

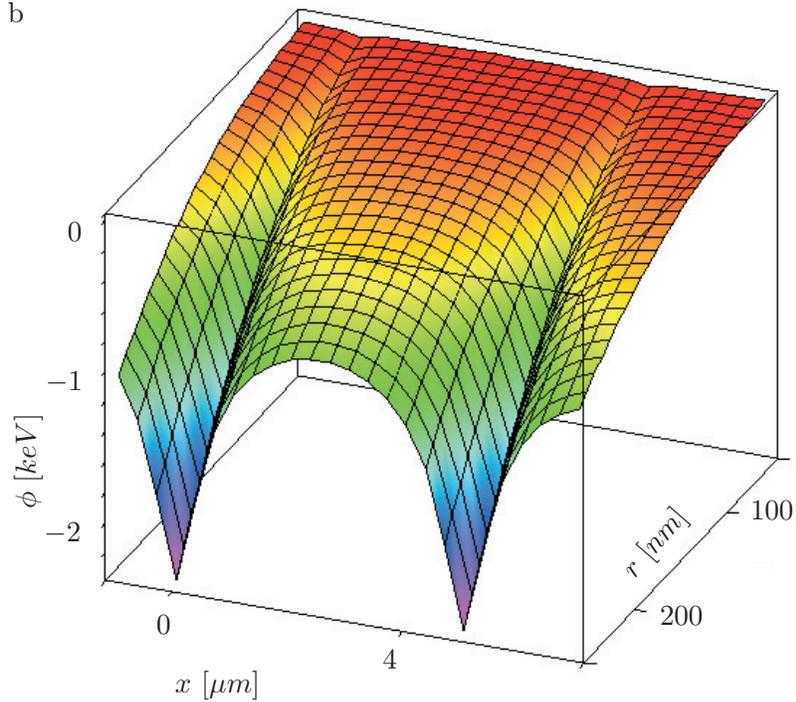


Abbildung 4.24: Numerisch berechnete Radiusabhängigkeit der Kraft und des Potentials. a) Die x-Komponente der Kraft ist gegen den Ort x und den Partikelradius r dargestellt, der in der Berechnung auch gleichzeitig die Höhe über der Domänenwand festlegt. b) Das Potential, das sich für einen Partikel über einer Domänenwand ergibt, ist gegen den Radius und den Ort aufgetragen.

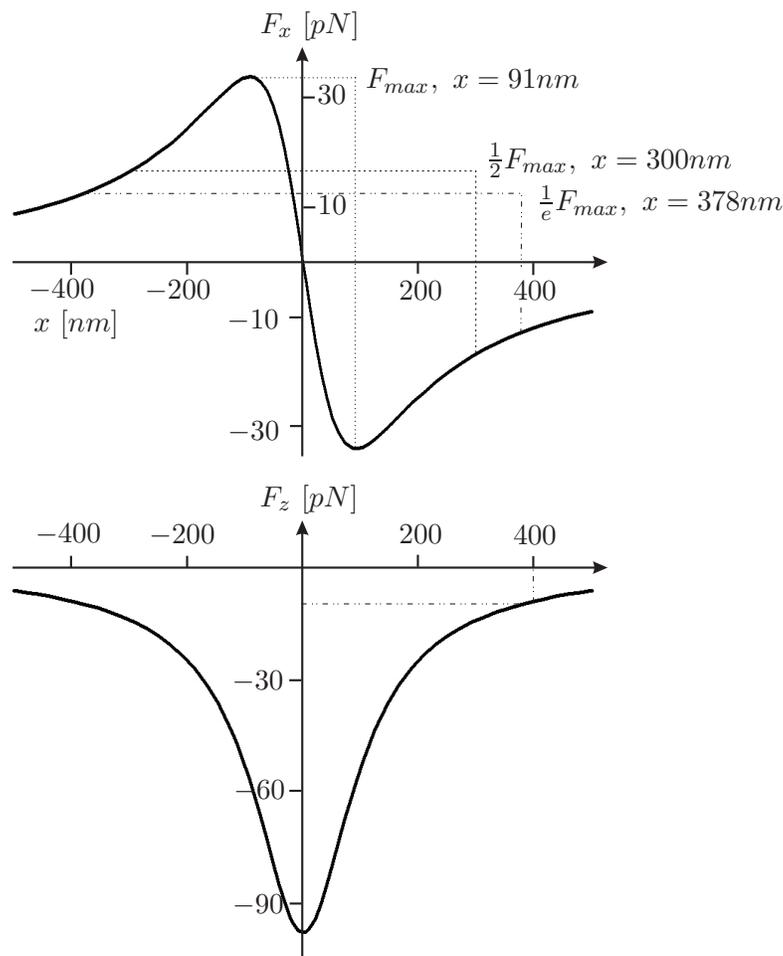


Abbildung 4.25: Die Kraft, die in der Nähe einer Domänenwand in x -Richtung herrscht, hat eine Halbwertsbreite von 600nm , beziehungsweise nimmt sie auf den e -ten Teil bei einer Breite von 756nm ab. Der Maximalwert der Kraft in z -Richtung beträgt über einer Domänenwand ungefähr 100pN und nimmt bei einer Entfernung von 400nm von der Domänenwand auf 13pN ab, was der experimentell bestimmten Beschichtungsbreite entspricht.

Peak betrachtet, bei 600nm und die Breite, bei der die Kraft auf $\frac{1}{e} F_{max}$ abgenommen hat, bei 756nm erreicht wird. Hat das Partikel genügend Zeit sich zu bewegen, ist die x -Komponente der Kraft dafür verantwortlich, das Partikel zur Domänenwand zu ziehen. Im Vergleich zu experimentell gewonnen Daten lassen sich nun einige Rückschlüsse ziehen.

Abbildung 4.26 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Granatfilms. Beads wurden durch Aufbringen der 1 : 100 verdünnten Stammlösung angelagert und anschließend zügig auf einer Heizplatte eingetrocknet. In der Lösung befanden sich mehr Teilchen, als sich an den Granat anlagern konnten. Die Trägerflüssigkeit verdunstet in einem immer kleiner werdenden Tropfen und hinterlässt einige Partikel an den Domänenwänden, bis der verbleibende Tropfen schließlich übersättigt ist und die verbleibenden Partikel in einer flächigen Ansammlung auf dem Film verbleiben (nicht gezeigt). Es ist zu erkennen, dass bei dieser Probe die Beschichtung der Domänenwände mit Beads nicht überall gleichmäßig ist. Es treten sowohl Leerstellen als auch Be-

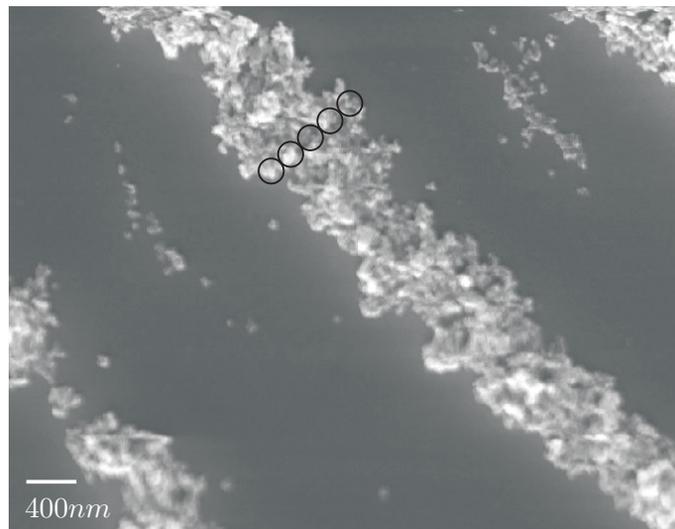


Abbildung 4.26: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines beschichteten Granats. Gezeigt ist eine Stelle, die verdeutlicht, dass nicht überall eine gleichmäßige Verteilung der magnetischen Partikel vorliegt. Durchschnittlich lässt sich aber angeben, dass 5 Teilchen nebeneinander auf einer Domänenwand Platz finden, wenn man von einem Teilchenradius von 100nm ausgeht, was mittels Kreisen exemplarisch gezeigt ist. In der Mitte der Domäne befinden sich einige Partikel in der Nähe des Nulldurchgangs von F_x .

reiche mit ganzen Agglomeraten auf. Dennoch zeigt sich, dass im Schnitt die Beschichtungsbreite $800 - 1000\text{nm}$ beträgt. Ein Grund hierfür ist in den Kräften zu finden, die beim Eintrocknen entstehen, wenn das überschüssige Wasser der Trägerflüssigkeit verdunstet und zu gering gebundene Teilchen mitzieht.

Bei einem Teilchenradius von 100nm ergibt das also im Schnitt fünf Teilchen, die nebeneinander Platz finden. Dies entspricht gerade einem Kraftabfall bis zum e -ten Teil der Maximalkraft in x -Richtung. Die eingezeichneten Kreise besitzen einen Durchmesser von 200nm und sollen exemplarisch die Größenverhältnisse zeigen. Da die Partikel aus Einzelkristalliten aufgebaut sind und nicht wirklich sphärisch erscheinen, lässt sich anhand der Abbildung keine Abgrenzung der Beads zueinander erkennen, was ein direktes Auszählen der angelagerten Teilchen unmöglich macht. Dass an der gezeigten Stelle genügend Partikel vorhanden waren, um sich entsprechend der Kraftverhältnisse anzulagern, wird daran erkenntlich, dass in der Mitte der Domäne einige Beads zu finden sind. Dort reicht die Kraft in x -Richtung, beziehungsweise die Zeit, nicht aus, um die Partikel zur Domänenwand hinzutreiben, sie verbleiben im labilen Gleichgewicht in der Domänenmitte. Diese Tatsache kann verhindert werden, in dem der Granatfilm langsamer bei Raumtemperatur getrocknet wird, oder, wie für die Zellkultur durchgeführt, gar nicht getrocknet, sondern mehrmals das umgebende Medium getauscht wird, um überschüssige Partikel zu entfernen.

Abbildung 4.27 bestätigt diese Aussage. Hier wurde eine Probe so beschichtet, dass die Anbindung der Partikel in einer mit Wasser gefüllten Petrischale vorgenommen wurde. Mit einer Pipette wurden um die $10\mu\text{l}$ Partikelstammlösung direkt über dem Granat in das Wasser ge-

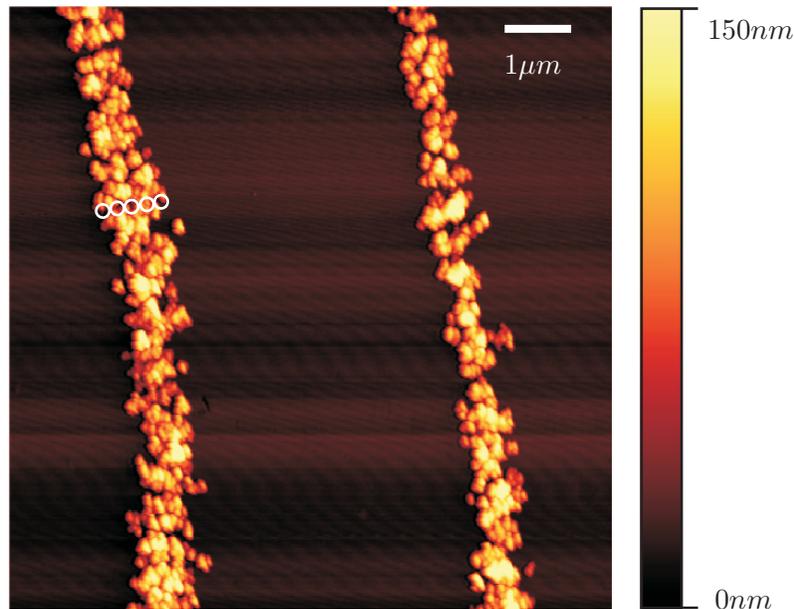


Abbildung 4.27: Die AFM-Aufnahme eines mit Partikeln beschichteten Granatfilms zeigt eine maximale Beschichtungsbreite von $1\mu m$. Die einzelnen weißen Kreise entsprechen einem Partikelradius von $100nm$, so wie er in den Berechnungen angenommen wurde.

geben. Nach einiger Zeit ist zu beobachten, dass die Partikel absinken und zur Ruhe kommen. Allerdings ist bis dahin keine Musterbildung erkennlich. Erst sobald der Granat mit einer Pinzette vorsichtig hin und her bewegt wird, schwimmen zu schwach angebundene Partikel ab und es verbleibt das typische Muster, wie es in der Abbildung zu sehen ist. Auch hier ist zu sehen, dass die maximale Beschichtungsbreite $1\mu m$ entspricht, was wiederum im Mittel fünf Teilchen entspricht, die exemplarisch als weiße Kreise in der Abbildung gezeigt sind. Im Gegensatz zu Abbildung 4.26 zeigt sich hier allerdings keine Beschichtung in der Domänenmitte, was auf den Präparationsmechanismus zurückzuführen ist. Den Partikeln wurde mehr Zeit in Lösung gelassen und durch Horizontalbewegungen mit der Pinzette wurden die nicht angebundene Partikel soweit bewegt, dass sie in den attraktiven Kraftbereich der Domänenwand gelangten, sofern dieser noch nicht ganz besetzt war. Ein vorsichtiges Entfernen des beschichteten Granats aus der wässrigen Umgebung trägt ebenfalls zur akkurateren Beschichtung bei, als dies der schnelle Trocknungsprozess aus Abbildung 4.26 gewährleisten kann.

Schließlich lässt sich sagen, dass Teilchen, die in x -Richtung mit ungefähr $12pN$ und in z -Richtung mit $13pN$, gezeigt in Abbildung 4.25, angebonden sind, was einer Gesamtkraft von $18pN$ entspricht, durch den Trocknungsprozess nicht abgelöst werden [122]. Alle Partikel, die schwächer angebonden sind, werden durch Reibungskräfte, die bei Bewegung in der Flüssigkeit auftreten, weggespült oder werden beim Trocknungsprozess vom verdunstenden Wasser mitgezogen.

Mit diesen Angaben kann man nun eine Abschätzung treffen, wie viele Teilchen benötigt wer-

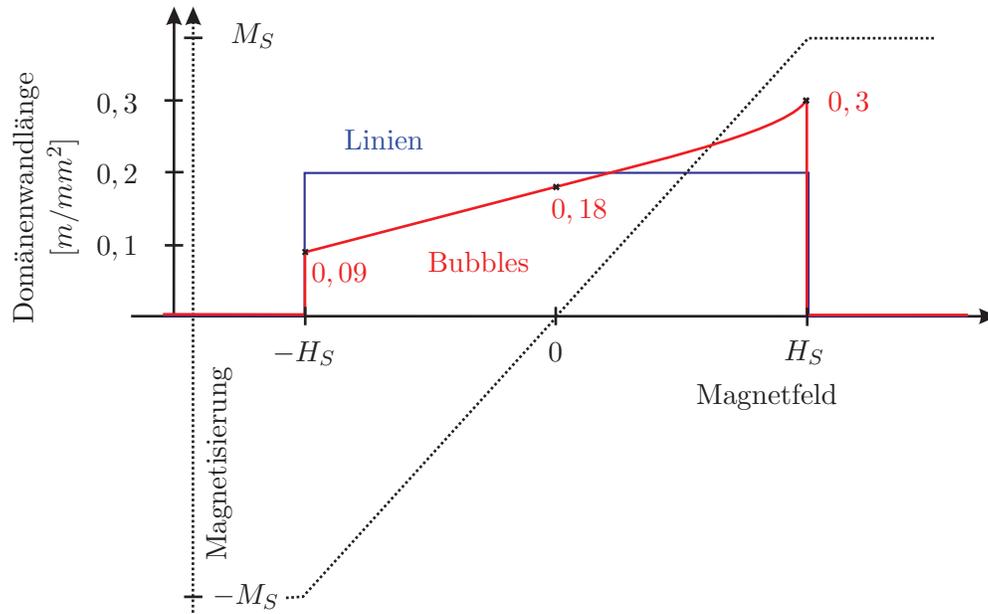


Abbildung 4.28: Darstellung der Domänenwandlänge in m/mm^2 in Abhängigkeit des äußeren Felds. Bei der Linienstruktur verändert sich die absolute Länge der Wände nicht, sofern der Granatfilm nicht in Sättigung ist. Die Bubblestruktur zeigt auf Grund der Abhängigkeit des Bubbledurchmessers vom äußeren Feld unterschiedliche Wandlängen. Nahe der „positiven“ Sättigungsmagnetisierung werden die Bubbledomänen zu hexagonalen Domänen.

den, um einen Granat so zu beschichten, dass alle Teilchen, gleichmäßige Verteilung angenommen, ohne Anhäufungen in z -Richtung angebunden sind. Auf einem $1mm^2$ -Stück Granat befinden sich, wenn man von Streifendomänen der Breite $5\mu m$ ausgeht, $2 \cdot 10^2$ Domänenwände. Jede Wand besitzt $2,5 \cdot 10^4$ Teilchen, was eine Gesamtanzahl von $5 \cdot 10^6 mm^{-2}$ Teilchen ergibt. Eine weitere, vage Aussage lässt sich treffen: Der Hersteller der verwendeten Nanobeads gibt eine Funktionalisierung von $\sim 850\mu mol$ auf $1,5 \cdot 10^{14}$ Teilchen an, was zu maximal $2,8 \cdot 10^{-11} mol$ kovalent gebundener Proteine auf dem oben beschriebenen $1mm^2$ Granatstück führt. Nimmt man an, dass eine Zelle nur mit der jeweils oberen Hälfte eines Beads in Kontakt kommt, ergibt sich, dass das Substrat in Zellkultur ein Träger von maximal $1,4 \cdot 10^{-11} mol/mm^2$ Proteinen sein kann.

Bei der Streifendomänenkonfiguration bleibt die Anzahl an Teilchen, unabhängig vom extern angelegten Feld konstant. Die Streifendomänen variieren zwar ihre Breite, die gesamte Domänenwandlänge bleibt allerdings konstant, wenn man äußere Felder, die kleiner sind als das Sättigungsfeld, anlegt. Davon ausgehend, dass keine Hysterese auftritt, verschwinden die Wände erst, wenn der Film in Sättigung übergeht. Für einen Film der Streifendomänenbreite $5\mu m$ ergibt sich eine Gesamtwandlänge von $0,2m/mm^2$. In Abbildung 4.28 ist ein Diagramm gezeigt, das die Domänenwandlänge in Abhängigkeit des äußeren Felds darstellt. Soll nun die Anzahl der fest angebondenen Partikel variiert werden, bietet es sich an, den Granat im Bubbledomänenzustand zu verwenden. Es wird angenommen, dass die Mittelpunkte der Bubbles in einem perfekten hexagonalen Muster angeordnet sind, so dass jedes Bubble gleich groß ist und immer sechs Nach-

barn hat. Der mittlere Abstand zweier Bubblezentren beträgt bei dem Granatfilm mit $5\mu\text{m}$ Schichtdicke $12\mu\text{m}$. Ein Koordinatensystem wird so definiert, dass die x -Richtung entlang einer Verbindungsachse zweier Mittelpunkte liegt. Somit erhält man in x -Richtung 83mm^{-1} Bubbles. Senkrecht dazu in y -Richtung erhält man durch die hexagonale Packung die nächste Bubblelinie im Abstand von $10,3\mu\text{m}$, so dass im Idealfall 8051mm^{-2} Bubbledomänen vorhanden sind.

Ohne äußeres Feld besitzen die Bubbles einen Umfang von $22,4\mu\text{m}$, wie beispielsweise in der Konfiguration, die in Abbildung 4.3 zu sehen ist. Der Umfang bezieht sich auf den Mittelwert der Durchmesser von jeweils 20 Bubbles. Insgesamt führt dies zu einer Domänenwandlänge von $0,18\text{m}/\text{mm}^2$. Wird nun antiparallel zur Bubblemagnetisierung ein äußeres Feld angelegt, verringert sich die Größe der Domänen auf einen kritischen Wert von $10,9\mu\text{m}$ Umfang, was zu einer Gesamtwandlänge von nur noch $0,09\text{m}/\text{mm}^2$ führt. Geht der Film bei weiterer Felderhöhung in Sättigung, werden die Bubbles zerstört. Umgekehrt kann die Domänenwandlänge vergrößert werden, indem ein Feld parallel zur Magnetisierung der Bubbles angelegt wird. Kurz vor Sättigung sind die Bubbles nicht mehr kreisförmig, sondern füllen den Film mit Sechsecken aus, wie in Abbildung 4.29 (d) gezeigt ist. Zur Berechnung wird angenommen, dass ein Sechseck Wände im Abstand von $5,5\mu\text{m}$ vom Zentrum besitzt, so dass zwischen zwei benachbarten Sechsecken die antiparallel magnetisierte Domäne noch $1\mu\text{m}$ breit ist. Damit erhält man einen Umfang der Sechsecke von $37,8\mu\text{m}$. Insgesamt führt dies zu einer Wandlänge von $0,3\text{m}/\text{mm}^2$. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 dargestellt. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass ab dem Übergang von kreisförmigen Bubbles zu Sechsecken die Wandfläche nicht mehr linear, sondern überproportional steigt. Dieser Bereich ist in der Abbildung nur schematisch dargestellt.

4.4.3 Laterale Mobilität trotz Immobilisierung

Da die Partikel steril in bidestilliertem Wasser geliefert werden, bietet es sich an, alle weiteren Schritte, beginnend bei der Deposition auf den Granatfilmen bis hin zur Verwendung funktionalisierter Partikel in Zellkultur, in wässriger, steriler Umgebung durchzuführen. Dies gewährleistet zudem, dass die Biofunktionalität nicht durch Trocknungsschritte beeinträchtigt wird.

Daraus ergeben sich einige interessante Anwendungen. Werden die Teilchen auf die Granatfilme aufgebracht und nur der Überschuss gewaschen, die Probe aber ohne Eintrocknung in ein externes Magnetfeld gebracht, besteht die Möglichkeit die Partikel kontrolliert bewegen zu können [16]. Die intrinsische magnetische Struktur kann, wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, durch äußere Magnetfelder geändert werden. Damit lassen sich auch die Domänenwände verschieben, an denen die Partikel angebunden sind. Werden die Wände nun langsamer als 1Hz bewegt, können die Teilchen diesem Vorgang folgen. Die Kraft, die von einer sich bewegenden Domänenwand ausgeht, genügt, um Reibungskräfte zwischen Partikeln und Granatoberfläche zu übertreffen, soweit die Partikel in flüssiger Umgebung sind. Dies ist in Abbildung 4.29 gezeigt. Die grünliche Einfärbung entspricht der Realfarbe im Mikroskop. Sie entsteht durch die gelblich-braune Färbung der magnetischen Schicht und das rötliche Kulturmedium. Der Granatfilm wurde

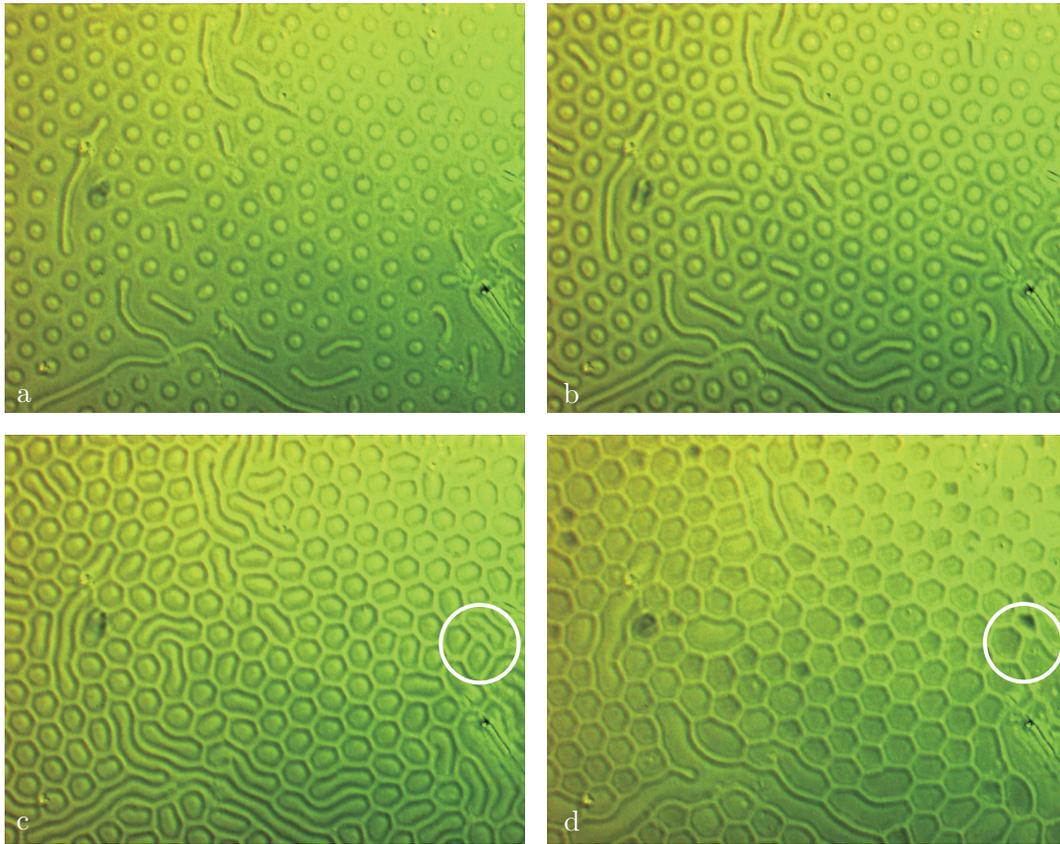


Abbildung 4.29: Die Domänenstruktur wurde mittels äußerer Felder verändert. Die Veränderungen von a)-d) wurden kontinuierlich innerhalb von 10s vollzogen. Die Bubbledomänen werden durch Anlegen eines äußeren Feldes parallel zu deren Magnetisierungsrichtung vergrößert. Die angeordneten magnetischen Partikel, die die schwarzen Gebiete bilden, können den Veränderungen folgen.

zuerst in einen Bubblezustand versetzt und anschließend Partikel in wässriger Umgebung (Kulturmedium) zugegeben. Gemäß Abschnitt 4.4.2 lagern sich die Partikel um die Bubbles an. Nach Anlegen eines äußeren Feldes antiparallel zur Magnetisierungsrichtung der Bubbles (was ohne Beschränkung der Allgemeinheit die positive Richtung sein soll), werden diese Domänen verkleinert. In Abbildung 4.29 (a) sind die Partikel auf Grund ihrer hohen Konzentration gut als dunkle Bereiche beziehungsweise Linien zu erkennen. Es sei darauf hingewiesen, dass keine Faradaymikroskopie vorliegt. Mit weiterer Abnahme des äußeren Feldes wachsen die Bubbledomänen wieder, Abbildung 4.29 (b). Bei Feldumkehr, nun in paralleler Richtung, wachsen die Domänen soweit, bis sie ihre runde Form verlieren und die Wände so angeordnet werden, dass die Domänen fünf- bzw. sechseckig werden, Abbildung 4.29 (c). Bei weiterer Abnahme ist in Abbildung 4.29 (d) der Zustand erreicht, bei dem die Bubbledomänen gerade soweit aufgebläht sind, dass Domänenwände anfangen zu verschwinden, was die eingezeichneten Kreise verdeutlichen sollen. Während in (c) noch 4 Domänen im gekennzeichneten Gebiet vorhanden waren, sind es in (d) nur noch drei. Der verbreiterte schwarze Bereich zeugt davon, dass sich dort Partikel befinden, die nicht mehr fest

angebunden sind und nur durch die Kraft in z -Richtung, also zur Oberfläche hin, genügend angebunden sind. Ab diesem Punkt ist der eben beschriebene Prozess nicht mehr reversibel. Werden zu starke Felder angelegt, durch die einzelne Wände verschwinden, kann nicht mehr gewährleistet werden, dass die Partikel an den Domänenwänden fest angebunden bleiben. Sobald eine Wand verschwindet, befinden sich die Partikel in der Überzahl, wenn man von ähnlicher Präparation wie eben gezeigt ausgeht. Das bedeutet, dass so viele Partikel während der Anbindung an das Substrat vorhanden waren, dass die maximal mögliche Zahl immobilisiert wurde und der Überschuss durch Mediumswechsel entfernt wurde. Daher kann also eine erneute Anbindung der Partikel, die durch das Verschwinden einer Domänenwand in die Lösung übergeben werden, nicht gewährleistet werden, wenn sich die Struktur des Substrates weiterhin verändert. Auch wenn eine Wand bei erneuter betragsmäßiger Erniedrigung des Feldes wieder erzeugt wird, wird die Struktur geometrisch verändert. Die Wand wird aller Wahrscheinlichkeit nach an anderer Stelle entstehen, als dort, wo sie vernichtet wurde. An dieser Stelle herrscht dann Partikelarmut, da nun die vorhandene Zahl der Partikel auf eine größere Wandlänge verteilt werden muss. Die einzelnen Teilabbildungen von Abbildung 4.29 wurden innerhalb 10s aufgenommen. Ein Video zeigt die genannten periodischen Veränderungen (\rightarrow Partikelmobilität [104]), wobei als Beispiel eine Sinusschwingung des Magnetfeldes gewählt wurde.

Als Resultat kann festgehalten werden, dass die intrinsische magnetische Struktur des Substrats in Zellkultur nur soweit geändert werden sollte, wie eine Domänenart auf Kosten der anderen vergrößert werden kann, ohne dabei Domänenwände zu vernichten. Periodische, äußere Felder und die hervorgerufenen Veränderungen in der magnetischen Struktur des Substrats, welche in Zellkultur interessant sind, machen nur Sinn, solange die äußeren Felder keine Domänenwände zerstören. Nur so kann eine periodische Veränderung der Beadstruktur gewährleistet werden, ohne lokale Konzentrationsunterschiede der Partikel hervorzurufen.

4.5 Substratstrukturierung

Sofern die magnetischen Partikel global über die Granatoberfläche verteilt werden, ergeben sich reichlich Möglichkeiten, Strukturveränderungen des Substrats in Zellkultur zu testen. Ein Vorteil besteht darin, auf der für Zellkultur üblichen Fläche von mindestens einem cm^2 eine geordnete Struktur herzustellen. Allerdings ist es damit nicht möglich, Zellen, die in Kontakt mit den Partikeln kommen und eventuell darauf reagieren, in direkten Vergleich zu Zellen zu setzen, die nur auf dem Substrat wachsen. Durch das Aufbringen der Partikel in Flüssigkeit verteilen sich diese homogen über den gesamten Film, ohne weitere Möglichkeit zur Einflussnahme auf Gebiete, die mit Partikeln beschichtet werden sollen. Um aber gerade die Möglichkeit zu besitzen, Zellen im direkten Vergleich mittels der Partikel gezielt zu kontaktieren oder nicht, mussten Methoden gefunden werden, die Teilchen in gezielt gewählten Bereichen magnetisch zu immobilisieren. Dabei sollte die hohe Reproduzierbarkeit und extrem gleichmäßige Beschichtung der Domänenwände

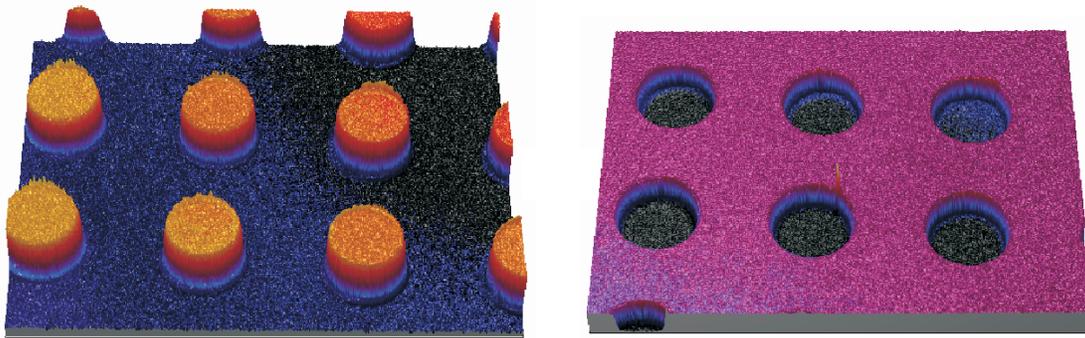


Abbildung 4.30: Interferometrische Aufnahme zweier unterschiedlicher Stempel. Während links die Kreise die positiven Strukturen darstellen, also die negativen des Siliziummasters, zeigt die rechte Abbildung negative Kreisscheiben, also war der Master positiv. Dargestellt sind $20\mu\text{m}$ -Kreisscheiben mit einem Abstand von $40\mu\text{m}$ von Mittelpunkt zu Mittelpunkt, die Tiefe beziehungsweise Höhe beträgt 400nm .

erhalten bleiben, die in Abschnitt 4.4.2 behandelt wurde.

Um dieses zu erreichen, wurden neue Methoden entwickelt, die ähnlich dem „microcontact printing“ (μCP) sind. Die Anwendungen des μCP in heutiger Forschung und die Vorgehensweisen des entwickelten Mikrofluidikansatzes und des Stempelprozesses wurden bereits in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Im Folgenden sollen die so hergestellten Strukturen erläutert werden, ohne auf einzelne Schritte der Entwicklung der Methoden einzugehen. Genauer findet man bereits veröffentlicht [14].

4.5.1 Spezifische Eigenschaften geeigneter Stempel

Abbildung 4.30 zeigt eine Interferometeraufnahme eines PDMS-Stempels zur Kontrolle der Abformung einer Siliziummaske, ohne größere Lufteinschlüsse oder fehlerhafte Stellen. Anhand der Abbildung soll auf die Begriffe „positive“ Struktur und „negative“ Struktur beziehungsweise „Aussparung“ eingegangen werden. Im Teil (a) besteht der Stempel aus positiven $20\mu\text{m}$ durchmessenden Kreisscheiben, im Teil (b) aus kreisförmigen Aussparungen oder kreisförmigen negativen Strukturen, ebenfalls $20\mu\text{m}$ breit. Die Tiefe beider Strukturen beträgt 400nm .

Bezogen auf die Beschichtung der Granatfilme in bestimmten Bereichen, sollte die Strukturierung so ausgelegt sein, dass Flächen im Bereich der Größenordnung einzelner Zellen beschichtet werden können. Das heißt, dass hauptsächlich Strukturgrößen von über $10\mu\text{m}$ angestrebt wurden, um eine klare Trennung zwischen Zellen mit und ohne Kontakt zur Partikelstruktur zu erhalten. Im Allgemeinen stellte sich heraus, dass bei Strukturen über $5\mu\text{m}$ normales PDMS zu weich ist, um den Stempel undeformiert zu lassen. Das Eigengewicht des Stempels reicht selbst bei Reduktion der Stempeldicke bis zu 2mm bei breiten Strukturen aus, um die negativen Aussparungen kollabieren zu lassen [100], siehe auch Abbildung 3.13. Wie bereits in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, bietet es sich an, die erste Schicht des Stempels aus h-PDMS herzustellen, ein Polymer, das ein 5-fach höheres Elastizitätsmodul als normales PDMS besitzt. Diese Schicht sollte nicht dicker als ein paar μm werden, da sonst die sehr hilfreichen, elastischen Eigenschaften des PDMS

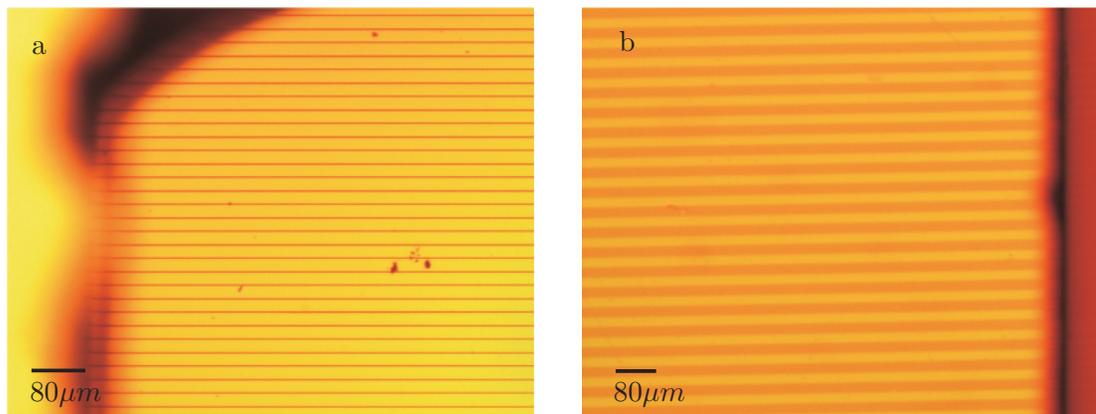


Abbildung 4.31: Lichtmikroskopische Aufnahme von Randbereichen von Stempeln, die in Kontakt mit der Granatoberfläche gebracht wurden. a) Herkömmlicher PDMS-Stempel. b) PDMS-Stempel mit einer wenige μm dicken Schicht h-PDMS. Deutlich ist zu erkennen, dass die Struktur links kollabiert ist, während die rechte Linien aufweist, die nicht im Kontakt mit der Granatoberfläche stehen.

verloren gehen, die beispielsweise beim Abformen des Siliziummasters und während des Kontaktierens der zu strukturierenden Oberflächen unabdingbar sind. Ein Beispiel der Notwendigkeit der Verwendung von h-PDMS zeigt Abbildung 4.31. Dabei sind Randbereiche eines Stempels im Lichtmikroskop gezeigt. Der Stempel besteht aus Linien, die $20\mu\text{m}$ breit sind und $40\mu\text{m}$ Abstand von Linienmitte zu Linienmitte aufweisen. Die gelbliche Farbe stammt von der Färbung des Granatfilms. In der ersten Abbildung 4.31 (a) besteht der Stempel aus herkömmlichem PDMS. Die negativen Strukturen, also die Zwischenräume zwischen einzelnen Linien sind fast vollständig kollabiert und befinden sich im Kontakt mit der Granatoberfläche. Wenn dies, wie hier gezeigt, bereits in den Randbereichen geschieht, ist eine Weiterverwendung zwecks Strukturierung nicht möglich. Im anderen Teil der Abbildung ist ein Stempel mit einem Granatfilm in Verbindung gebracht worden, dessen erste Schicht aus h-PDMS besteht. Der Unterschied, dass nun die Linien weiterhin in Kontakt mit der Granatoberfläche sind, die Zwischenräume aber einen Luftspalt beibehalten, ist deutlich zu erkennen. Letzteres ist durch den dunkleren Kontrast sichtbar.

4.5.2 Mikrofluidischer Ansatz

Die erste erfolgreiche Methode, Partikel in kontrollierten Gebieten anzulagern besteht darin, den Stempel in festen Kontakt mit dem Granatfilm zu bringen und die negativen Aussparungen des Stempels als Mikrofluidikkanäle zu benutzen, die sich durch Kapillarkräfte mit Partikelsuspension füllen [14]. Dabei hat sich herausgestellt, dass die atomar glatte Oberfläche der Granatfilme dabei sehr nützlich ist. Der PDMS-Stempel ist bereits nach wenigen Sekunden uniform überall in gutem Kontakt zur Oberfläche. Vorversuche mit Glas zeigten nicht annähernd diese Ergebnisse. Um das PDMS mit vergleichsweise rauem Glas in Verbindung zu bringen, war zusätzlicher, mechanischer Druck nötig, der die Struktur wiederum zum kollabieren brachte. In Abbildung 4.32 ist eine der einfachsten Strukturierungen gezeigt. Dabei bestand der Stempel aus reinem PDMS und

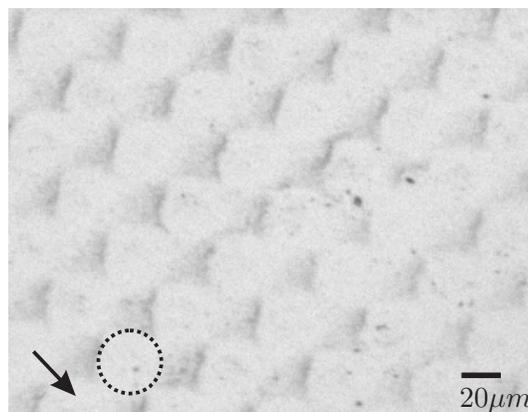


Abbildung 4.32: Mikrofluidikansatz mittels eines Stempels, der aus reinem PDMS hergestellt wurde und eine Kreisstruktur besaß. Der Pfeil zeigt die Fließrichtung der Partikelsuspension.

aus $20\mu\text{m}$ durchmessenden Kreisscheiben, so wie sie in der Interferometeraufnahme in Abbildung 4.30 bereits gezeigt wurden. Die positiven Scheiben wurden durch Umdrehen und Auflegen des Stempels mit dem Granat in Verbindung gebracht. Durch eine zuvor durchgeführte Behandlung des PDMS im reaktiven O_2 -Plasma wurde der Stempel hydrophilisiert. Die Partikelsuspension, die auf die Grenze zwischen Stempel und Substrat aufgebracht wurde, konnte sich in den Aussparungen des Stempels verteilen. Während des Trocknens, lagerten sich die Partikel nach einiger Zeit an der Oberfläche an. In diesem Fall ist keine weitere Substruktur auf Grund magnetischer Wechselwirkung zu erkennen, da die unmagnetische Seite, also nur das GGG-Substrat, verwendet wurde. Die Richtung, in der die Suspension unter den Stempel geflossen ist, ist gut erkennbar, da sich vor Engstellen mehr Partikel abgelagert haben, als direkt dahinter. Der Pfeil verdeutlicht zusätzlich die Fließrichtung. Vergleicht man die Interferometeraufnahme mit dem erhaltenen Muster, so ist erkennbar, dass die Stellen, die nach der Strukturierung ohne Partikel verbleiben, weitaus größer sind als $20\mu\text{m}$. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass sich unter dem Eigengewicht des Stempels die Kreisflächen ausgedehnt haben und dabei nur enge Stellen zwischen zwei Kreisen einen Durchflussweg für die Partikel gelassen haben. Der gestrichelte Kreis in der Abbildung zeigt beispielhaft ein Gebiet, das während des Strukturierens der Kontaktfläche einer positiven Kreisfläche entsprochen hat.

Eine komplexere und, wie später noch gezeigt wird, interessante Struktur für Zellkulturexperimente zeigt Abbildung 4.33. Hierbei wurde einerseits eine Strukturierung durch die bereits oben beschriebene Mikrofluidikmethode erzielt, indem die Partikelsuspension durch $20\mu\text{m}$ breite, lineare Strukturen geflossen ist, die wiederum durch $20\mu\text{m}$ breite Stege voneinander getrennt waren. Die Höhe der Stege betrug 800nm . Der Stempel bestand aus einer Schicht h-PDMS. Eine weitere Substruktur ist erkennbar, indem die magnetische Wechselwirkung zwischen Partikeln und Granat ausgenutzt wird. Der Film, der zur Strukturierung verwendet wurde, wies den natürlichen Zustand der Mäander auf. Die Partikel lagerten sich wie gewohnt an den Domänenwänden

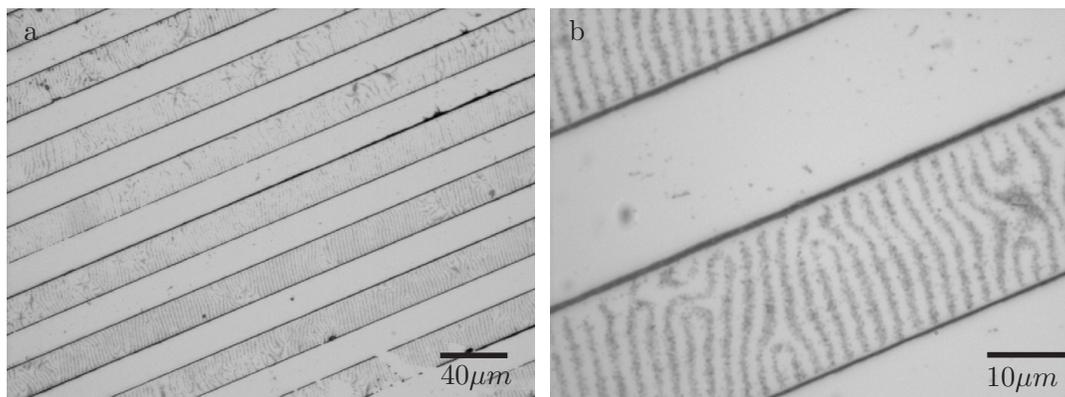


Abbildung 4.33: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Struktur, die in $20\mu\text{m}$ Abständen $20\mu\text{m}$ breit mit magnetischen Partikeln beschichtet ist. Die Substruktur besteht aus magnetischen Partikeln, die auf Domänenwänden abgelagert sind. Der Granatfilm befindet sich im magnetischen Zustand der Labyrinthstruktur. Die schwarzen Begrenzungslinien sind ein Artefakt zu hoher Partikelkonzentration [14].

an. Abbildung 4.33 (a) zeigt, dass die Strukturierung gleichmäßig über größere Flächen erfolgen kann, sofern durch die Anwendung des h-PDMS der Stempel nicht kollabiert und akkurat über die gesamte Stempellänge fehlerfrei mit dem Substrat einen Kontakt bildet. Abbildung 4.33 (b) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt, in dem die Substruktur der Partikel deutlich wird. Um im Lichtmikroskop einen guten Kontrast zu erzielen, wurde eine hohe Partikelkonzentration verwendet (1:10 Verdünnung der Stammlösung) und zusätzlich eine lange Wartezeit gewählt, bis die überschüssige Suspension wieder entfernt wurde. So wurde gewährleistet, dass sich möglichst viele Teilchen anlagern. In diesem Fall beträgt die Beschichtungsbreite mehr als die in Abschnitt 4.4.2 mit $1\mu\text{m}$ angegebenen Wert. Dies ist damit zu erklären, dass die Partikel eintrocknen konnten, ohne durch Bewegen oder Entfernen aus wässriger Umgebung oder ohne Kräfte, die ein verdunstender Wassertropfen mit sich bringt. Ein Artefakt, das ebenfalls durch die hohe Partikelkonzentration hervorgerufen wird, stellen die deutlich sichtbaren schwarzen Begrenzungslinien zwischen beschichteten und unbeschichteten Gebieten dar. Dieses sind Partikel, die sich an den Grenzen zwischen PDMS-Stempel und Granatfilm während des Trocknens auf Grund übersättigter Suspension abgelagert haben.

Abbildung 4.34 (a) beweist die reine Konzentrationsabhängigkeit dieser störenden Tatsache. Bei dieser Strukturierung wurde eine Verdünnung 1 : 100 der Stammlösung benutzt und zusätzlich die überschüssige Suspension bereits nach wenigen Sekunden entfernt. Somit wird ein Eintrocknen und damit Ablagern überschüssiger Partikel verhindert und es treten keine ungebundenen Partikel an den Begrenzungslinien auf. Abbildung 4.34 (b) zeigt eine Strukturierung, die mit einem gleichwertigen Stempel vorgenommen wurde. Der Unterschied besteht in der Substruktur. Der verwendete Granatfilm wurde zuvor, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, in den Bubblezustand versetzt, so dass die Partikel in Kreisen angeordnet immobilisiert wurden. Sofern man darauf achtet, dass die Strukturierung nicht in der Nähe stärkerer Magnetfelder durchgeführt wird, sind die Bubbledomänen stabil, so dass problemlos Temperaturen von 70°C zur

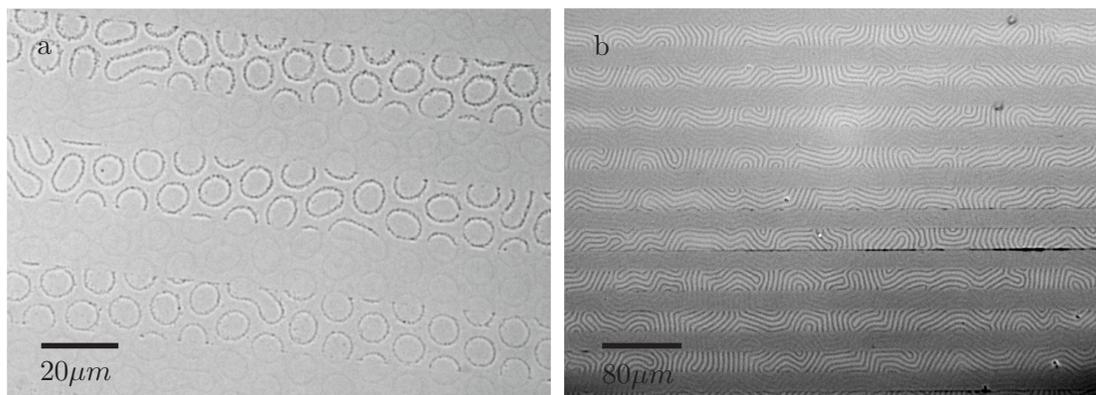


Abbildung 4.34: Strukturierung, die durch den mikrofluidischen Ansatz erhalten wurde. a) Linienstruktur, die mit einer niedrigen Partikelkonzentration erhalten wurde. Die schwarzen Begrenzungslinien zwischen Bereichen mit Partikeln und ohne sind nahezu ganz verschwunden. b) Die gleiche Linienstruktur, ebenfalls $20\mu\text{m}$ breit, diesmal auf einem Granat, der sich im Bubblezustand befindet.

Beschleunigung der Trocknung angewendet werden können.

4.5.3 Stempeltechnik

Im Gegensatz zum mikrofluidischen Ansatz benötigt die Stempeltechnik keine Strukturen, die durchgängige Kanäle bieten. Sie basiert auf dem Ansatz, die Partikelsuspension durch den Stempel zu verdrängen und nur in Aussparungen magnetische Teilchen zuzulassen. Dabei wird ein Tropfen der Partikelsuspension auf einen Granatfilm gegeben, wobei anschließend der Stempel zügig innerhalb einiger Sekunden auf den Film gepresst wird. Dabei ist zu beachten, dass der Druck nicht übermäßig groß wird, da dann ein Kollabieren der Strukturen droht. Wird der Stempel im Vorfeld in reaktivem O_2 -Plasma hydrophilisiert, genügt eine Höhe der Struktur von $400\text{nm} - 800\text{nm}$, um genügend Suspension aufzunehmen, dass sich Partikel dicht anlagern können, unter der Voraussetzung, dass hohe Konzentrationen verwendet werden. Der Rest der Suspension wird verdrängt und sollte direkt nach dem Anpressen des Stempels mit einer Pipette vollständig entfernt werden, um das Risiko des Abschwimmens der Stempels (Kontaktverlust) zu minimieren. Eine wichtige Eigenschaft des PDMS ist bei diesem Vorgehen, dass es Wasser nach einiger Zeit aufnimmt. Wird die Struktur so gewählt, dass die negativen Aussparungen auf einige μl Volumen beschränkt sind, kann der Stempel das überschüssige Wasser innerhalb einiger Stunden durch Quellung aufnehmen.

Abbildung 4.35 zeigt eine beispielhafte Struktur, die mit der Stempelmethode erhalten wurde. Der Stempel bestand, wie im rechten Teil der Abbildung gezeigt, aus Achtecken, die so angeordnet waren, dass zwischen zwei benachbarten Achtecken ein Steg der ungefähren Breite $2\mu\text{m}$ lag und zwischen vier Achtecken ein Quadrat übrig blieb. Durch Verdrängung der überschüssigen Suspension entstanden also Muster, die aus Achtecken bestanden, dazwischen Quadrate. Die Entfernung zweier paralleler Kanten eines Achtecks betrug $50\mu\text{m}$. Der Stempel wurde aus Stabilitätsgründen erneut mit einer h-PDMS-Schicht versehen. Die erkennbare Substruktur besteht

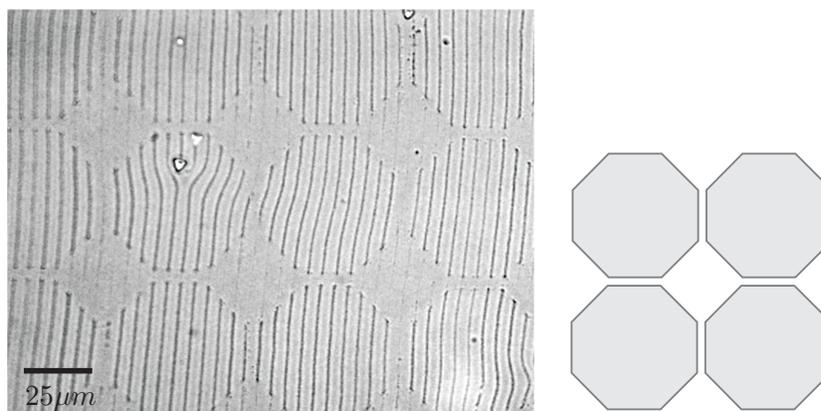


Abbildung 4.35: Struktur aus Achtecken, die durch die Stempelungsmethode erhalten wird. Rechts ist schematisch die Beschaffenheit des PDMS-Stempels abgebildet. Die grauen Bereiche stellen die Negativstruktur dar.

aus Linien, die bereits vor der Strukturierung durch die Überführung des Granatfilms in Streifenomänenkonfiguration festgelegt wurden. Analog zu den eben beschriebenen Bubbledomänen, ist diese Struktur ebenfalls während des Stempelprozesses stabil und wird durch die Methode nicht beeinflusst.

Die Präzision der Struktur in Bezug auf partikelfreie Bereiche hängt bei dieser Methode empfindlich von der Geschwindigkeit der Kontaktherstellung zwischen Stempel und Substrat ab. Ist die Zeitspanne zwischen Aufbringen der Partikel und dem Stempeln zu groß, lagern sich bereits einige Teilchen an und werden auf Grund der magnetischen Wechselwirkung so stark angebunden, dass das Stempelverfahren zwar die Flüssigkeit verdrängt, die Partikel allerdings an den Domänenwänden verbleiben. Es hat sich herausgestellt, dass die Zeitspanne idealerweise im Bereich von unter $10s$ bleibt, nach $30s$ werden die Strukturen unbrauchbar. In Abbildung 4.35 ist an einigen Stellen zu erkennen, dass einige wenige Partikel in der eigentlich teilchenfreien Zone verblieben sind. Dieser Effekt kann durch höhere Verdünnung der Stammlösung vermindert, jedoch nicht vermieden werden.

Entsprechend des mikrofluidischen Ansatzes bietet es sich bei dem Stempelverfahren ebenso an, die Stempel mit einer h-PDMS-Schicht zu überziehen. In Abbildung 4.36 wurde ein Stempel ohne diese harte Schicht verwendet. Dabei wurde die Partikelsuspension in die Zwischenräume der ursprünglich $20\mu m$ durchmessenden Kreise gedrängt. An dem schematisch eingezeichneten Kreis ist erkennbar, dass sich die Stempelstruktur allerdings etwas verbreitert hat. Der verwendete Granatfilm befand sich im magnetischen Labyrinthzustand. Die verwendete Suspension (Stammlösung) war so hoch konzentriert, dass sich Partikel auch neben den Domänenwänden ablagerten, wie zwischen den einzelnen Linien verschwommen zu erkennen ist. Auch in partikelfreien Bereichen sieht man vereinzelt magnetische Teilchen. Die hohe Konzentration wurde verwendet, um einen deutlichen Kontrast im Lichtmikroskop hervorzurufen.

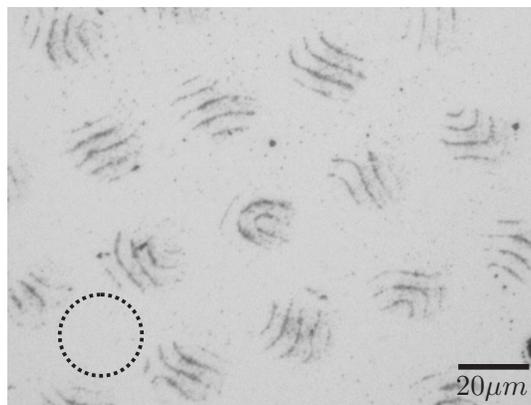


Abbildung 4.36: Struktur, die durch die Stempelmethode erhalten wurde. Der Stempel bestand aus normalem PDMS und wies $20\mu\text{m}$ -Kreise auf. Die Partikel verbleiben in den negativen Aussparungen des Stempels.

4.5.4 Allgemeine Betrachtungen

Es sollte sichergestellt sein, dass durch das Anwenden der Stempeltechnik oder der Mikrofluidikmethode das eigentliche Beschichten der Granatfilme mit derselben Teilchendichte und Präzision erfolgt, wie in Abschnitt 4.4.2. Dabei wurden AFM-Untersuchungen an verschiedenen Proben, die mit beiden Methoden hergestellt wurden und unterschiedliche Domänenkonfigurationen aufwiesen, durchgeführt. Abbildung 4.37 zeigt beispielhaft eine Struktur, die mittels eines Stempels $20\mu\text{m}$ breiter linearer Strukturen hergestellt wurde und zudem Bubbledomänen aufweist. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass auf Grund der atomaren Glattheit des Substrats der Stempel in gutem Kontakt verblieb. Neben den beschichteten $20\mu\text{m}$ sind keine magnetischen Partikel vorhanden. Klare Trennlinien zwischen partikelfreier und beschichteter Oberfläche sind zu erkennen. Dieses Resultat ist wichtig, da bei Zellen oft nicht die Menge eines Stoffes ein bestimmtes Verhalten auslöst, sondern kleinste Mengen dieselben Effekte haben (Auslösen von Signalkaskaden), wie höhere Konzentrationen. Somit kann sichergestellt sein, dass nach einer Strukturierung wirklich partikelfreie Bereiche existieren. Betrachtet man nun die Beschichtungsbreite einzelner Domänenwände, so fällt auf, dass sie sich in Übereinstimmung mit den Resultaten aus Abschnitt 4.4.2 befinden. Dort wurde herausgefunden, dass bei einer Präparation, bei der die Partikel in wässriger Umgebung an den magnetischen Film angelagert wurden, eine stabile Beschichtung der Breite $800\text{nm} - 1\mu\text{m}$ erreicht wurde. Das rechts neben dem Topographiebild befindliche Diagramm entpricht dem Höhenprofil der in Abbildung 4.37 eingezeichneten schwarzen Linie. Die Entfernung in lateraler Richtung zwischen zwei der eingezeichneten vier Markierungspunkte entspricht dem Tabellenwert, der sich im oberen Teil der Tabelle aus dem Kreuzungspunkt der entsprechenden Spalte und Reihe ergibt. Damit ist abzulesen, dass sich die Beschichtungsbreite im Fall zwischen Punkt 1 und Punkt 2 zu 879nm , zwischen Punkt 3 und Punkt 4 zu 960nm ergibt. Auch unter Beachtung der Tatsache, dass die AFM-Messung aus 512×512 Datenpunkten

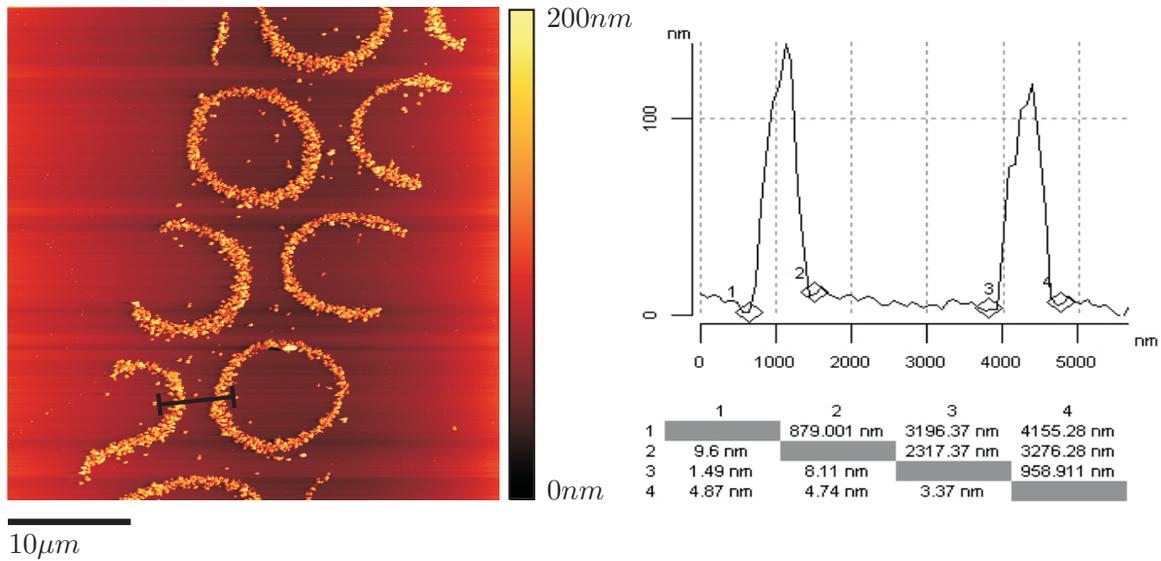


Abbildung 4.37: Topographieabbildung einer AFM-Aufnahme einer Partikelstruktur, bestehen aus $20\mu\text{m}$ breiten Streifen. Die schwarz eingezeichnete Linie entspricht dem Höhenprofil im rechten Teil. Die Partikel lagern sich nicht übereinander an und verbleiben in den durch den Stempel vorgegebenen negativen Strukturen.

besteht und daher Angaben, die Nanometergenauigkeit besitzen, außerhalb der Messgenauigkeit liegen, liegt die maximal stabile Beschichtungsbreite in vollständiger Übereinstimmung zu den Ergebnissen der globalen Teilchenbeschichtung.

Innerhalb des $20\mu\text{m}$ breiten Streifens in Abbildung 4.37 befinden sich einige Partikel frei auf dem Substrat, das heißt, nicht immobilisiert durch magnetische Kräfte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass innerhalb der Mikrofluidikkanäle ein Wegspülen der überschüssigen Partikel auf Grund der geringen Höhe oft nicht gelingt. Daher sollte eine Beschichtung, die mittels der Mikrofluidikmethode unternommen wird, mit eher geringen Partikelkonzentrationen durchgeführt werden. Längere Wartezeiten zwischen dem Aufbringen des Suspensionstropfens und dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit gewährleisten das Absinken und Anbinden der Partikel. Als Leitwert ergeben sich Konzentrationen von 1 : 10 – 1 : 100 im Bezug zur Stammlösung als geeignet. Nach dem Abziehen des Überschusses und einem Waschschrift, bei dem destilliertes Wasser durch die Kanäle gebracht wird, genügen bei dieser Methode kurze Trockenzeiten. Es kann dann davon ausgegangen werden, dass die noch vorhandenen Partikel fest immobilisiert sind und ein homogenes Beschichtungsmuster aufweisen. Die Struktur kann nicht mehr verwaschen. Anders verhält sich das bei der Stempelmethode. Da es hier nicht möglich ist, einen Waschschrift durchzuführen, muss man abwarten, zur Sicherheit mehrere Stunden, bis die Flüssigkeit in den Stempelaussparungen vom PDMS aufgenommen wurde. Erst nach vollständigem Abschluss dieses Prozesses sollte der Stempel entfernt werden. Andernfalls kommt es zu einer Verwaschung der Struktur, da sich einige Partikel noch in wässriger Umgebung befinden können und durch kleinste Bewegungen des Stempels in unbeschichtete Bereiche gelangen können.



10 μ m

Abbildung 4.38: Amplitudenaufnahme einer AFM-Messung an einem bereits benutzten Stempel. Nach Entfernen des Stempels von der Oberfläche verbleiben eingetrocknete Partikel in den Innenbereichen der Struktur und machen eine Wiederverwendung unmöglich.

Ein Nachteil beider Methoden, sofern es einen Trocknungsprozess gibt, ist die Zerstörung des Stempels. Ein verwendeter Stempel ist in Abbildung 4.38 zu erkennen. Die Amplitudenaufnahme einer AFM-Messung zeigt deutlich die eingetrockneten Partikel. Diese verstopfen teilweise die dünnen Kanäle, so dass an eine Wiederverwendung nicht zu denken ist. Zudem bleibt zu beachten, dass gequollenes PDMS zwar wieder trocknen kann und damit wieder in seine ursprüngliche Form zurückkehrt, dann jedoch feinste Risse in der Oberflächenstruktur aufweist.

Klare Angaben zu der zu verwendenden Partikelkonzentration sind schwer zu treffen, wie bereits in [14] diskutiert. Pro Strukturierung kann ein ungefährender Wert von $1 \cdot 10^8$ Partikeln angegeben werden, wenn man die Angaben der Hersteller, genannt in Abschnitt 3.1.2, und der verwendeten Volumina kombiniert. Durch die Waschschrte und die Entfernung der überschüssigen Suspension bei beiden Methoden lässt sich dieser Wert aber nicht halten, wenn man von der Anzahl der immobilisierten Partikel spricht. Einen viel stärkeren Einfluss haben in den Prozessen Wartezeiten zwischen Aufbringen und Entfernen der Suspension sowie der Einfluss und die Dimensionen der verwendeten Stempelstrukturen. Es lässt sich nicht angeben, wie die Beschichtungsbreite beispielsweise durch die Variation der Stempelstrukturhöhe uniform variiert werden kann. Sicher angegeben werden kann nur die maximale Beschichtungsbreite von 1μ m, die erreicht wird, wenn man sich an die Wartezeiten, die im Methodenteil angegeben wurden und die Konzentrationsangaben, die weiter oben besprochen wurden hält.

Abschließend kann zu den beiden Methoden festgehalten werden, dass sich die damit erzielbaren Strukturierungen als absolut akkurat erweisen und eine Vielzahl an Möglichkeiten bieten,

was Strukturveränderungen betrifft. Grenzen sind dabei nur durch das Vorhandensein eines geeigneten Siliziummasters gesetzt, dessen Produktion je nach Fläche und Struktur aufwendig ist. Ist dieser vorhanden, ist er nahezu unendlich oft verwendbar und die komplette weitere Methodik ist kosten- und zeiteffektiv und bedarf keiner weiteren aufwendigen Apparaturen, wie dies beispielsweise bei der Elektronenstrahlolithographie oder bei Laserinterferenzmethoden der Fall wäre. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit große Flächen von ungefähr 1cm^2 parallel strukturieren zu können, was unabdingbar für Zellkulturexperimente ist. Beide Methoden erlauben die Deposition von Flüssigkeiten in geometrisch kontrollierbaren Strukturen. Dies beinhaltet die Möglichkeit neben Suspensionen und der Abscheidung des Feststoffes, wie im vorliegenden Fall, auch Lösungen verschiedener Stoffe zu verwenden, die dann gezielt mit der Oberfläche in Kontakt gebracht werden können und beispielsweise der chemischen Strukturierung dienen.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion unterschiedlichen Zellverhaltens

Im Folgenden sollen Aspekte betrachtet werden, die Einflüsse auf das Zellverhalten in Bezug auf die bisher vorgestellten Materialien und Substrate haben.

5.1 Wechselwirkung von Zellen mit magnetischen Partikeln

Magnetit ist als vollständig biokompatibel bekannt und besitzt keinen messbaren Toxizitätsindex LD_{50} [123]. Die weiteren Bestandteile der verwendeten Partikel, wie beispielsweise Dextran oder andere Polysaccharide, gelten ebenfalls als biokompatibel [4, 106, 124].

Erste Ideen innerhalb des Projekts bestanden darin, Zellen mit Partikeln unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit wechselwirken zu lassen. Dabei wurden allerdings größere Partikel im μm -Bereich eher in Betracht gezogen, um eine ganze Zelle auf der Teilchenoberfläche anhaften zu lassen. Vor physikalischem Hintergrund entstand parallel dazu für die vorliegende Arbeit der Ansatz, wesentlich kleinere magnetische Partikel zu verwenden, die biofunktionalisiert werden können und anschließend über magnetische Felder kontrolliert mit Zellen auf glatten Oberflächen in Verbindung gebracht werden. In heutiger Forschung ist es üblich, spezielle Proteine oder Wachstumsfaktoren auf biokompatiblen Oberflächen durch Adsorption zu immobilisieren und somit Zellen modifizierte Oberflächen zur Verfügung zu stellen. Ein Nachteil dabei ist, dass die Oberflächen, so wie sie hergestellt wurden, in Zellkultur verbleiben, also strukturell nicht mehr verändert werden können. Selbst in zahlreichen Arbeiten über Untersuchungen von Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen unterschiedlichster Natur (topographische oder biochemische Strukturen) stehen die Eigenschaften der Oberflächen vor Beginn der Zellkultur fest. Sollen die Einflüsse anderer Topographien oder biochemischer Strukturen untersucht werden, müssen neue Substrate hergestellt werden.

Der Vorteil der Verwendung von magnetischen Partikeln als Träger der biochemischen Information, besteht nun darin, dass über externe Felder der Ort der Partikel variiert werden kann. Feldänderungen können jederzeit, also auch in Zellkultur, stattfinden, womit die Zellen dann örtlich und zeitlich variablen Oberflächeneigenschaften ausgesetzt sind.

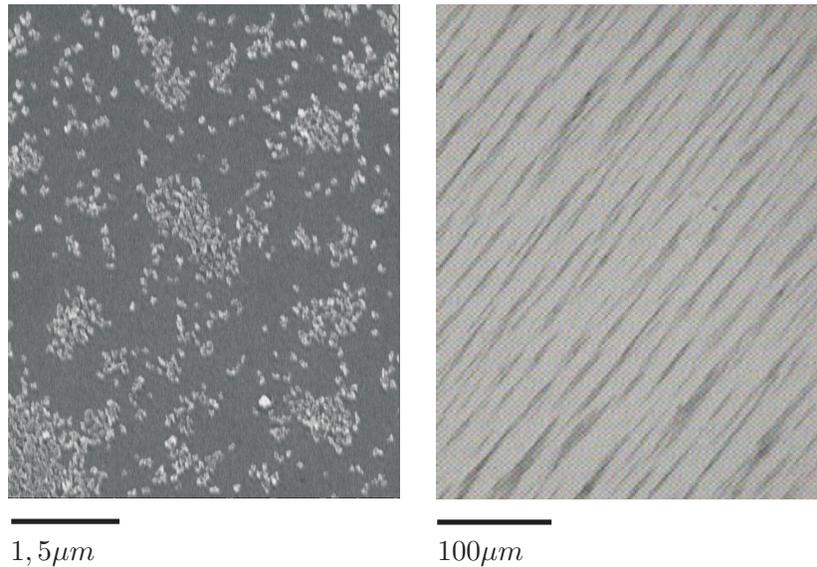


Abbildung 5.1: Mit magnetischen Partikeln können auf unterschiedlichen Substraten verschiedene Muster erhalten werden. a) Partikel durch Adsorption auf Glas aufgebracht. b) Die gleichen Partikel unter Einfluss eines äußeren Magnetfeldes.

5.1.1 Endozytose

Erste Ansätze dazu bestanden darin, die Partikel auf Glasoberflächen zu adsorbieren und durch Magnetfelder unterschiedliche Strukturen zu generieren. Um den Zellen möglichst reine biochemische Information zukommen zu lassen, wurden die Partikel möglichst klein gewählt. Wie bereits in Abschnitt 4.3 genannt, konnten Teilchen der Größe 200nm funktionalisiert werden. Auf Grund der Tatsache, dass der Kern der Teilchen aus mehreren Kristalliten besteht, die für sich gesehen superparamagnetisch sind, entstehen keine Teilchenagglomerate wegen magnetischer Wechselwirkung untereinander. Abbildung 5.1 (a) zeigt beispielsweise Partikel, die ohne äußeres magnetisches Feld auf Glas aufgebracht wurden. Dabei ist erkennbar, dass die Teilchen nicht übereinander angelagert werden. Entsprechend diesem Befund sollte nun davon ausgegangen werden, dass in Zellkultur über die Anzahl der Partikel Aussagen über die Konzentration der vorhandenen biochemischen Signale getroffen werden können. Abbildung 5.1 (b) zeigt die weitere Möglichkeit die Partikel, sofern sie sich in Lösung oder im Kulturmedium befinden, durch äußere Felder zur Strukturbildung zu verwenden. Die Partikel richten sich entlang der Feldlinien in Ketten aus. Durch die Verwendung rotierender Felder in der Ebene des Glassubstrates, lässt sich dieser Ansatz ausdehnen, wobei die Partikel dann in kürzeren Ketten angeordnet sind, die der Rotation folgen können. Auf weitere umfassende Strukturbildung, die durchaus durch das Anlegen komplizierterer äußerer Felder denkbar ist, soll nicht weiter eingegangen werden, da sich der Ansatz so in Zellkultur nicht weiter verfolgen lässt.

Abbildung 5.2 zeigt einen Versuch, bei dem Zellen auf adsorbierten Partikeln kultiviert wurden. Dabei wurden die Partikel auf eine Glasoberfläche aufgebracht und durch Trocknung immobili-

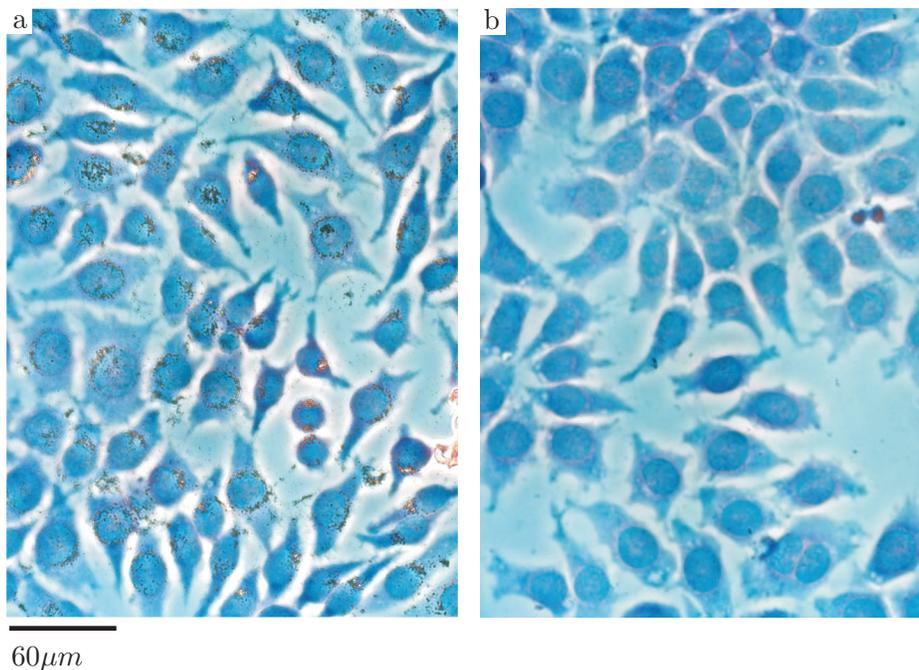


Abbildung 5.2: H&E-Färbung von L929-Fibroblasten. a) Nach Kultivierung der Zellen unter Zugabe magnetischer Beads ins Medium, sammeln sich Partikelagglomerate im Bereich des Zellkerns. Es ist nicht zu erkennen, ob sich die Partikel innerhalb der Zellen oder unter den Zellen befinden. b) Negativkontrolle; den Zellen wurden keine Partikel im Medium zugegeben. Sonstige Kultivierungsbedingungen waren identisch.

siert. Abbildung 5.2 (a) zeigt deutlich, dass die Partikel nicht mehr gleichverteilt auftreten, so wie dies in Abbildung 5.1 (a) der Fall war, sondern sich ganz klar an Zellkernen orientiert zusammenfinden. Sowohl die Zellen aus dem Versuch als auch die Kontrollzellen, die unter gleichen Bedingungen, nur ohne Zugabe der Partikel, kultiviert wurden, wurden des Kontrasts wegen einer H&E-Färbung unterzogen. Die Vorgehensweise wurde bereits in Abschnitt 3.3.3 detailliert beschrieben. Die Kernregionen der einzelnen Zellen sind erkennbar und offensichtlich befinden sich die Teilchen zumindest lateral in diesen Bereichen. Die häufig ringförmige Anordnung deutet ebenfalls darauf hin, dass die Partikel irgendwie in Richtung der Kernregionen gelangen. Dadurch, dass durch herkömmliche Lichtmikroskopie auf Grund der nicht vorhandenen Tiefenauflösung keine Aussage über den genauen Ort der Teilchen getroffen werden kann, mussten andere Methoden angewendet werden. Aus der Abbildung wird nicht deutlich, ob die Partikel abgeschwommen sind und bevorzugt an der Membran der Zellen angelagert werden, die Zelle die Partikel unter sich ansammelt oder als letzte Möglichkeit die Partikel sogar ins Zytoplasma aufnimmt. Selbst wenn magnetische Felder eingesetzt werden, um spezielle Strukturen in Zellkultur zu erhalten, zeigt sich keine Stabilität und die Strukturen werden genauso aufgelöst, wie dies bei reiner Adsorption der Fall ist.

Zellen wurden, wie oben genannt, präpariert und anschließend mittels einer Alkoholreihe fixiert. Abbildungen der Präparate im Elektronenmikroskop zeigten, dass sich die Partikel nicht auf der

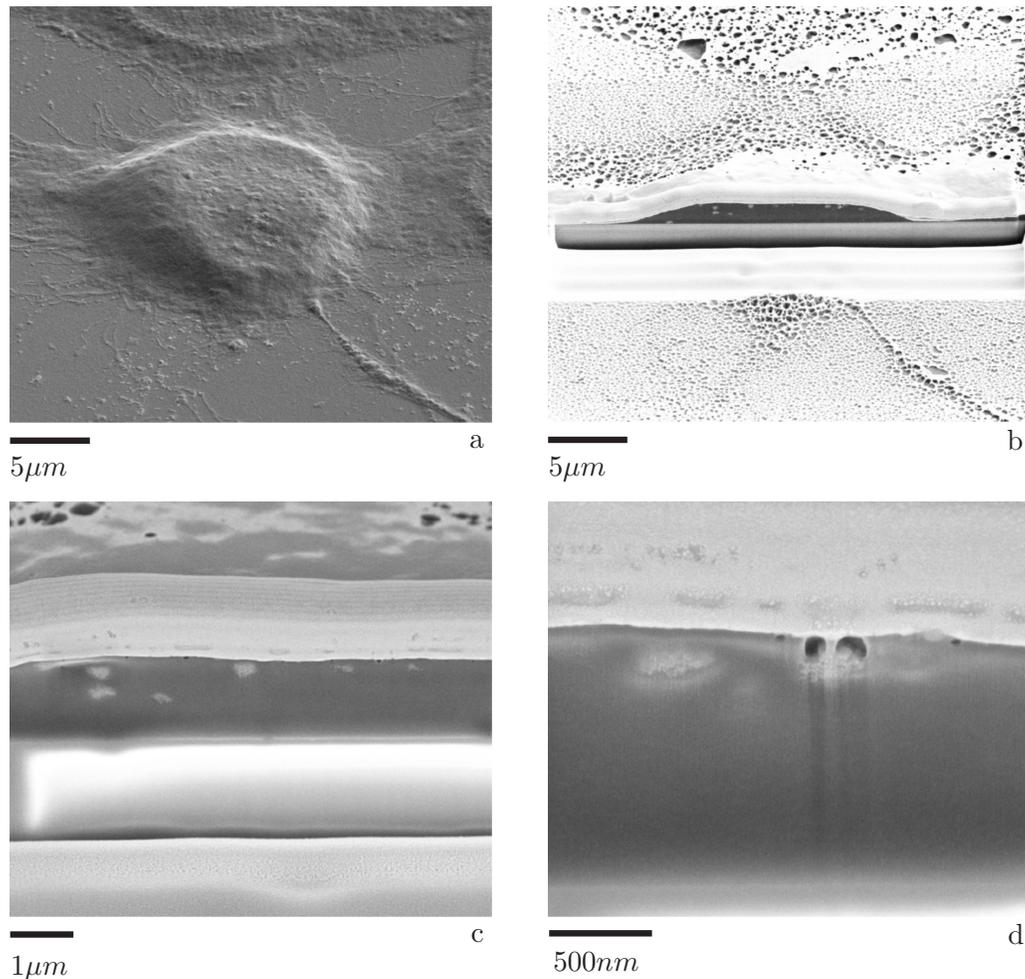


Abbildung 5.3: Querschnitt einer Zelle mittels eines fokussierten Ionenstrahls, elektronenmikroskopische Aufnahmen. Der Fibroblast hat Partikel aufgenommen, die zuvor auf die Substratoberfläche aufgebracht worden sind. a) Kultivierter Fibroblast auf einem Glassubstrat, auf dem die Partikel vor Kultur adsorbiert wurden. b) Querschnitt durch die mittlere Zellregion. c) und d) Vergrößerungen von b), die Partikel sind innerhalb des Zellplasmas deutlich erkennbar, das den dunklen Bereich des Querschnitts ausmacht.

Zellmembran befanden. Somit blieb die Möglichkeit der Partikelaufnahme und der Ansammlung unterhalb der Zellen. Um eine der beiden Möglichkeiten auszuschließen, wurden mittels eines fokussierten Ionenstrahls (Focused Ion Beam, FIB) Zellquerschnitte hergestellt. Prinzipiell beruht die Methode darauf, über ein Elektronenmikroskop die Probe untersuchen und interessante Stellen ausmachen zu können. Hat man eine Stelle auf einem Substrat, an der ein Querschnitt erfolgen soll, identifiziert, wird dort mittels des Ionenstrahls eine Schicht Platin abgelagert, bevor mit hochenergetischen Galliumionen Schicht für Schicht Material abgetragen wird. Der Prozess kann so gesteuert werden, dass der Ionenstrahl senkrechte Gräben in das Substrat ätzt. Danach ermöglicht das Elektronenmikroskop das Abbilden des Querschnitts. In Abbildung 5.3 ist ein solcher Prozess durchgeführt worden. L929-Fibroblasten wurden auf einem Glassubstrat kultiviert, auf dem magnetische Partikel zuvor adsorbiert wurden. Nach zwei Tagen in Zellkultur wurden

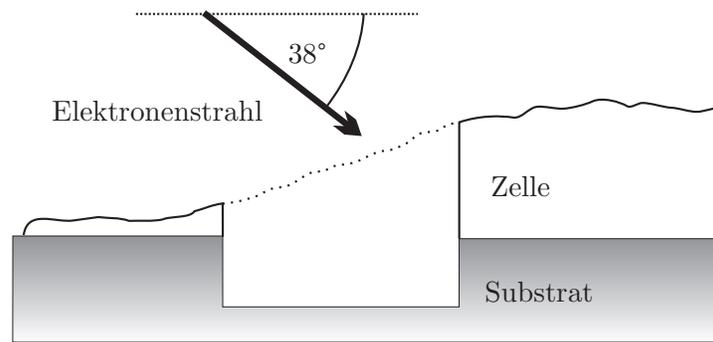


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Herstellung eines Querschnitts einer Zelle mittels FIB. Die anschließende Beobachtung im Elektronenmikroskop erfolgt unter einem Winkel von 38° .

die Zellen fixiert und mit 5nm Gold überzogen, um die Leitfähigkeit der Probe zu gewährleisten. Dies war notwendig, da sonst Elektronenbeschuss sofort zu Aufladungseffekten geführt hätte. Abbildung 5.3 (a) zeigt eine Zelle, die für einen anschließenden Schnitt ausgewählt wurde. Die magnetischen Teilchen sind neben dem Fibroblasten auf dem Substrat klar zu erkennen, wobei sich keine Teilchen derselben Größenordnung auf der Zelle befinden. Die Unregelmäßigkeiten auf den erhöhten Bereichen der Zelle besitzen andere Strukturen, die nicht der Partikelform ähneln und somit auf Zellkompartimente innerhalb des Kerns zurückzuführen sind. Wichtig dabei ist, dass die Zellmembran noch intakt ist. Dies lässt sich aus den klar erkennbaren Zellausläufern schlussfolgern, die noch ohne Unterbrechung mit der Zelle in Verbindung stehen. Die Zellmembran überzieht alle Zellbereiche homogen. Die schonende Fixierung mittels einer Alkoholreihe mit Ehanol wurde daher als geeignetste Methode herausgefunden.

Abbildung 5.3 (b) zeigt den Querschnitt derselben Zelle nach Durchführung des Ionenbeschusses. Zur Verdeutlichung, wie ein solcher Schnitt zu interpretieren ist, ist in Abbildung 5.4 schematisch gezeigt, welcher Teil der Zelle abgetragen wurde. Die Schemazeichnung versteht sich senkrecht zur Blickrichtung in Abbildung 5.3. Der Ionenstrahl hinterlässt einen Bereich, der senkrecht zur Substratoberfläche verläuft. Die gestrichelte Linie in Abbildung 5.4 stellt die vor dem Prozess dort vorhandene Zelle dar. Dieser Bereich wurde entfernt. Mittels des Elektronenstrahls, der die Blickrichtung darstellt, lässt sich anschließend ein Teil der inneren Zelle an der Abtragungskante betrachten. Somit können einzelne Bereiche in Abbildung 5.3 (b) besser verstanden werden. Vom unteren Bildrand begonnen, zeigt sich zuerst ein Teil der Zelle, der durch den Ionenstrahl nicht beeinflusst wurde, jedoch erhebliche strukturelle Veränderungen während des Abscheidens des Platins erfahren hat. Daher zeigt sich eine löchrige Struktur. Dennoch ist im Vergleich zu Abbildung 5.3 (a) ein größerer Zellausläufer klar zu identifizieren. Weiter nach oben schließt sich dann der Bereich an, in dem der Ionenstrahl ein Rechteck ausgeschnitten hat. Der unstrukturierte Bereich ist damit dem Glassubstrat zuzuordnen. Erst der dunklere Bereich zeigt die Schnittkante und somit die Kontaktregion der Zelle mit dem Substrat. Die deutlich erkennbare Hügelform resultiert aus der Verdickung des Zellkerns. Der dunkle Kontrast stammt vom Innern des Zellkerns. Darüber ist erneut der vom Ionenstrahl unbeeinflusste Zellteil zu sehen, der

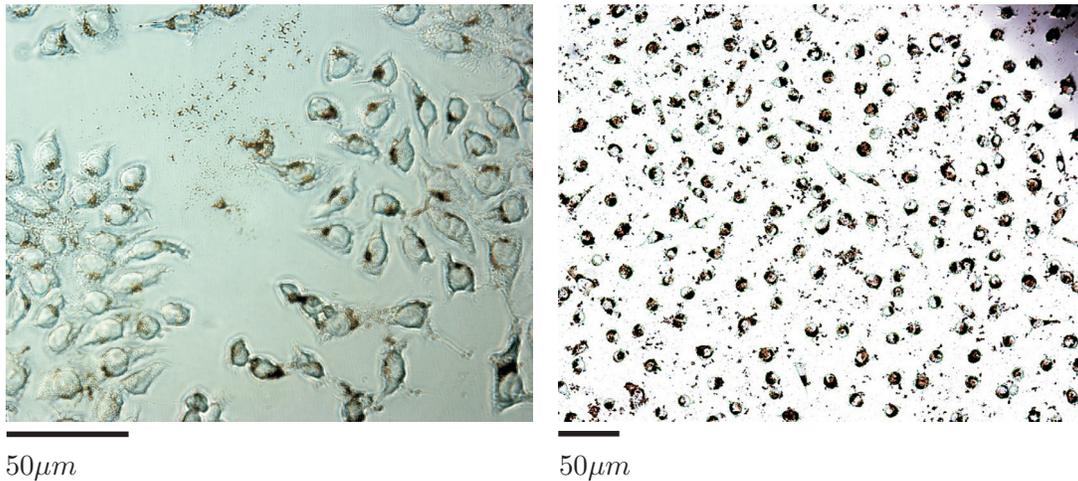


Abbildung 5.5: Partikelaufnahme durch L929-Fibroblasten. Die Teilchen sind 200nm groß. Nach drei Tagen in Zellkultur befinden sich bereits deutliche Anteile der Partikel innerhalb der Zellen und kaum noch Partikel außerhalb auf dem Substrat, links erkennbar. Bei weiterer Erhöhung der Partikelkonzentration erscheinen die Zellen rechts im gleichen Zeitraum sogar deutlich in ihrer Form verändert, bleiben jedoch vital.

nach hinten abfällt.

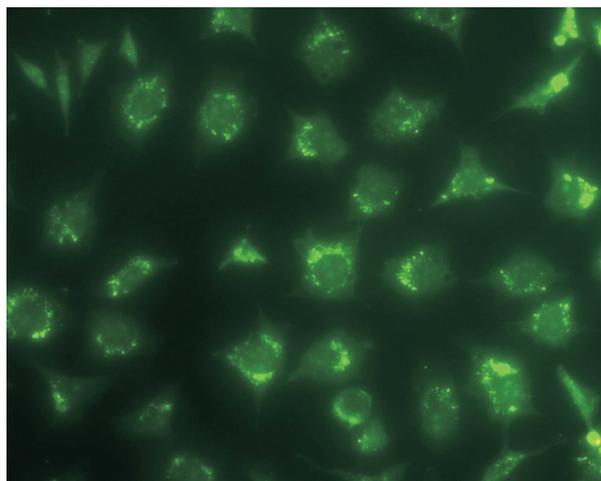
In Vergrößerung stellt Abbildung 5.3 (c) die Zellkernregion dar. Einzelne Zellkompartimente unterscheiden sich nicht im Kontrast des Elektronenstrahls. Innerhalb der Zelle sind allerdings Bereiche zu erkennen, die deutlich losgelöst vom Substrat auftreten. In vergleichenden Schnitten durch Zellen ohne Partikel wurden diese Kontraste nicht gefunden. Mittels Abbildung 5.3 (d) wird deutlich, dass es sich bei diesen Ansammlungen um Partikel handelt, die in der Größenordnung von 200nm liegen und Unterstrukturen aufweisen, die mit der Morphologie der Einzelkristallite übereinstimmen. Somit kann bestätigt werden, dass sich die Partikel innerhalb der Zellen aufhalten, zumal keine Partikel unterhalb der Zelle, also zwischen Substrat und Zellkörper ausgemacht werden können. Dass einzelne Teilchen verschwommen erscheinen, liegt daran, dass vor Durchführung des Schnitts nicht bestimmt werden kann, dass der Schnitt genau durch ein Partikel verläuft. Da die Methode sehr zeit- und kostenaufwendig ist, muss es dem Zufall überlassen werden, Partikel im Querschnitt zu erhalten. Ein Rastern über die Probe, bis ein Partikel genau getroffen wird, ist praktisch unmöglich. Im gezeigten Fall sind sie größtenteils noch von Zellplasma überdeckt. Um die Partikelaufnahme zu unterbinden, muss geklärt werden, wie der Transport in die Zelle stattfindet.

5.1.2 Transportmechanismen der Partikelaufnahme

Partikel, die in Größenordnungen von einigen μm liegen, werden von Zellen nicht aufgenommen [37]. Allerdings sollten die Partikel in der vorliegenden Arbeit so klein wie möglich sein, damit sie so wenig wie möglich topographische Informationen im Kontakt mit Zellen besitzen. Desweiteren stellte es sich als schwierig heraus, μm -Partikel stabil an Domänenwände anzulagern. Die Kräfte, die bei solch großen Partikeln wirken, sind zu gering, um während verschiedener Präparations-

schritte fest angebunden an den Domänenwänden zu verbleiben. Unter dieser Sichtweise wurden Teilchen der Größenordnung 200nm im Kontakt mit Zellen untersucht. Dabei kamen mehrere reaktive Endgruppen an den Teilchenoberflächen zum Einsatz: Carboxylgruppen, Aminogruppen, Triazine und Teilchen, die nicht beschichtet waren, sondern nur eine Polysaccharidmatrix aufwiesen. Sowohl die Fibroblasten als auch die Osteoblasten nehmen die Partikel auf. Auffallend ist dabei, dass es scheinbar in den Zellen keine Schranke gibt, ab der keine weiteren Partikel mehr in das Innere gelangen, so dass die Zelle ihre adhärenzte Form beibehalten kann. Abbildung 5.5 (a) zeigt L929-Fibroblasten, die nach drei Tagen in Zellkultur bei einer Partikelkonzentration von $35\mu\text{g}/\text{ml}$ bereits die meisten Teilchen aufgenommen haben. Nur noch wenige verbleiben auf dem Glassubstrat. Dabei ist die Konzentrationsangabe so zu verstehen, dass sich unter der Annahme vollständiger Sedimentation der Partikel $11\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in der Ebene der Zellen befinden. Die Zellen wurden in Kammern der Fläche $3,14\text{cm}^2$ (12-Well-Platte, Nunc, Roskilde, Dänemark) kultiviert, denen ein Volumen von 1ml Kulturmedium beigegeben wurde. Bei doppelter Partikelkonzentration erscheinen die Fibroblasten im gleichen Zeitraum deutlich abgekugelt und wie in Abbildung 5.5 (b) mit Teilchen so überladen, dass von der eigentlichen Zelle nicht mehr viel erkennbar ist. Dennoch verlieren die Zellen selbst nach Aufnahme immenser Teilchenmengen nicht vollständig den Kontakt zur Substratoberfläche und verbleiben vital, so dass nach einer Unterkultivierung durch Zellteilungen die Partikel in den einzelnen Zellen wieder weniger werden. Die vorhandene Menge in der Mutterzelle wird gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und nach mehrmaligem Unterkultivieren sind faktisch keine Partikel im Lichtmikroskop mehr erkennbar.

Die Tatsache, dass Zellen verschiedene Teilchen aufnehmen, ist nicht unbekannt. Endozytose ist ein Effekt, der im medizinischen Bereich ausgenutzt wird, um bestimmte Stoffe gezielt in Zellen einzuschleusen. Methoden, die sich hinter Schlüsselworten wie „Gene Delivery“ oder „Drug Delivery“ verbergen, nutzen gerade die Aufnahme von Stoffen in biologisches Gewebe aus. Dabei wird an magnetische Partikel biologisch interessantes Material gekoppelt, beispielsweise genetische Information [125] oder Arzneistoffe [106, 123]. *In vitro* werden die magnetischen Eigenschaften ausgenutzt, indem durch angelegte Gradientenfelder die Partikelaufnahme beschleunigt wird [125]. *In vivo* werden äußere Felder dazu benutzt, um nach Injektion der Nanopartikel diese am gewünschten Ort zu fokussieren [123]. Eine weitere, artverwandte Anwendung, besteht darin, Krebs zu bekämpfen. Dabei wird ausgenutzt, dass magnetische Teilchen unterhalb ihrer Curie-temperatur durch hochfrequente elektromagnetische Felder erwärmt werden können. Sind sie in Tumorzellen lokalisiert, stellt diese Methode eine Möglichkeit dar, unerwünschtes Gewebe durch Hitzeeinwirkung zum Absterben zu bringen. Dabei werden äußere Felder und Partikelgrößen so gewählt, dass die zur Erwärmung benötigten Frequenzen oberhalb kritischer Werte für neuromuskuläre Reaktionen und unterhalb dem Bereich zur Erwärmung gesunden Gewebes liegen. Die verwendeten Temperaturen liegen dabei im Bereich $45^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$ bei einer Anregungsfrequenz von $0,1 - 1\text{MHz}$ [123]. Diese Methode ist als Hyperthermie bekannt [4, 106, 126]. Ein weiteres, großes Anwendungsgebiet magnetischer Kleinstpartikel besteht in der Markierung bestimmter Gewebe.



50 μ m

Abbildung 5.6: L929-Fibroblasten mit fluoreszenzmarkierten Teilchen. Nach 48h in Zellkultur befinden sich quasi keine Partikel mehr auf dem Substrat, sondern sind um die Zellkerne herum verteilt.

Durch die Injektion und Ansammlung in bestimmten Organen (erreichbar durch äußere Felder oder antikörperspezifischen Transport) können Signale in der Magnetresonanztomographie um ein Vielfaches verstärkt werden, in dem die magnetischen Teilchen typische Relaxationszeiten der Gewebeprotonen beeinflussen [123, 126].

Alle Methoden benutzen das gleiche Material: Magnetit- oder Maghemitpartikel (Fe_3O_4 beziehungsweise Fe_2O_3) unter 50nm Durchmesser. Dabei handelt es sich nicht wie in der vorliegenden Arbeit um Teilchen, die aus mehreren Kristalliten zusammengesetzt sind, sondern um die Einzelkristallite an sich. Durch ihr superparamagnetisches Verhalten wird verhindert, dass sich Agglomerate bilden und nach Abschalten eines äußeren Feldes diese nicht mehr abgebaut werden können. Partikel im Bereich 10nm – 20nm besitzen den Vorteil, dass sie mittels des Blutkreislaufs an die gewünschten Gewebestellen transportiert werden. Anschließend können sie ungehindert zwischen Zellen diffundieren und sich nach Injektion innerhalb weniger Sekunden gleichmäßig im Gewebe verteilen. Diese Möglichkeit besitzen Partikel von über 50nm nicht und stellen erhöhte Thromboserisiken dar [123]. Aus diesem Grund sind bisher Partikel der Größe 200nm im Bezug auf Wechselwirkung mit Zellen weitestgehend nicht untersucht.

Um die Aufnahme funktionalisierter Partikel zu untersuchen, wurden sowohl den MG63 als auch den L929 screenMAG/G zugegeben. Diese Teilchen waren mit einem Farbstoff der Adsorptionswellenlänge 502nm und Emissionswellenlänge 525nm, versehen, der sich nicht mit Zellrezeptoren direkt verbindet. Abbildung 5.6 zeigt L929-Fibroblasten, die nach 48h in Kultur bei einer Partikelkonzentration von 70 μ g/ml nahezu alle Teilchen aufgenommen haben. Es sind keine Partikel mehr auf der Substratoberfläche erkennbar. Folglich kann die Aussage getroffen werden, dass auch funktionalisierte, 200nm durchmessende Teilchen von Zellen aufgenommen werden, ohne dass dazu bestimmte Membranrezeptoren angesprochen werden müssen. Eine reine Beschichtung

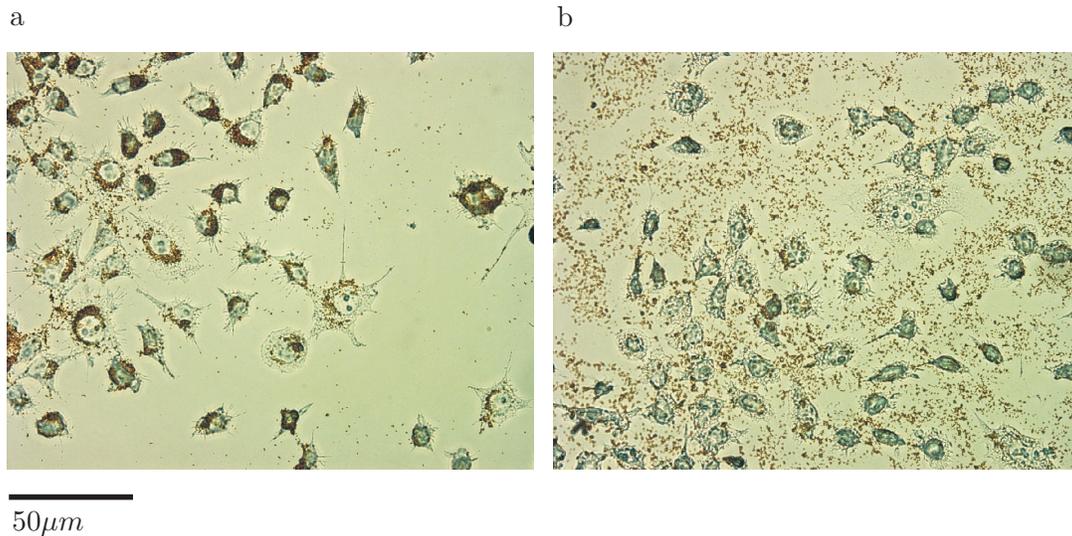


Abbildung 5.7: Temperaturabhängige Teilchenaufnahme durch L929-Fibroblasten. a) 37°C und b) 15°C nach 24h in Kultur bei einer Partikelkonzentration von $35\mu\text{g}/\text{ml}$.

mit unspezifischen Proteinen genügt folglich nicht, die Endozytose zu verhindern.

Denkbar ist, dass die Partikel durch rein diffusive Prozesse aufgenommen werden. Eine Methode dies herauszufinden, ist die Unterdrückung energieabhängiger Mechanismen der Zelle (unter Verbrauch von ATP), wie in [127] vorgeschlagen. Die Klimakammer, die für die vorliegende Arbeit entwickelt wurde, erlaubt es, verschiedene Temperaturen vorzugeben. Sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten wurden bei 7°C , 15°C und 37°C kultiviert. Als Partikel wurden SiMAG-cyanuric verwendet, da sie sehr gut im Lichtmikroskop sichtbar sind, wenn sie von den Zellen um den Kern angesammelt werden. MG63 nehmen die Partikel langsamer auf als L929, dennoch ist nach 24h in Kultur kein Unterschied mehr bezüglich der Menge zu erkennen.

Es zeigte sich, dass, obwohl in der Literatur ein etabliertes Verfahren [37, 127], die Abkühlung auf 7°C morphologische Unterschiede in den verwendeten Zellen hervorruft. Ein verstärktes Ablösen tritt vor allem bei den Osteoblasten auf. Generell sind die Zellen nach 24h in Kultur abgekugelt. Außerdem findet keine Zellteilung mehr statt. Bei 15°C können keine Unterschiede zur Kontrollkultur ausgemacht werden. Abbildung 5.7 zeigt einen Versuch an L929-Fibroblasten. Nach Aussaat von $5 \cdot 10^4$ Zellen standen 24h zur Adhäsion zur Verfügung, bevor Partikel der Konzentration $35\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 15°C und zur Kontrolle bei 37°C zugegeben wurden. Es ist deutlich erkennbar, dass bei 37°C alle Partikel aufgenommen worden sind und praktisch keine mehr auf dem Glassubstrat vorhanden sind, wie in Abbildung 5.7 (a) zu erkennen ist. Die Zellen zeigen deutlich, dass die Partikel hauptsächlich in der Kernregion angesammelt wurden. Abbildung 5.7 zeigt hingegen, dass die niedrigere Temperatur von 15°C die Partikelaufnahme vollständig unterdrückt. Die Zellen sind vital und teilen sich. Allerdings sind energieabhängige Transportmechanismen gemäß [127] unterdrückt, wozu gerade die in Abschnitt 2.2 beschriebenen, aktiven Transportwege der Clathrin- und der Caveolaevesikel gehören. Ein rein diffusiver Prozess kann

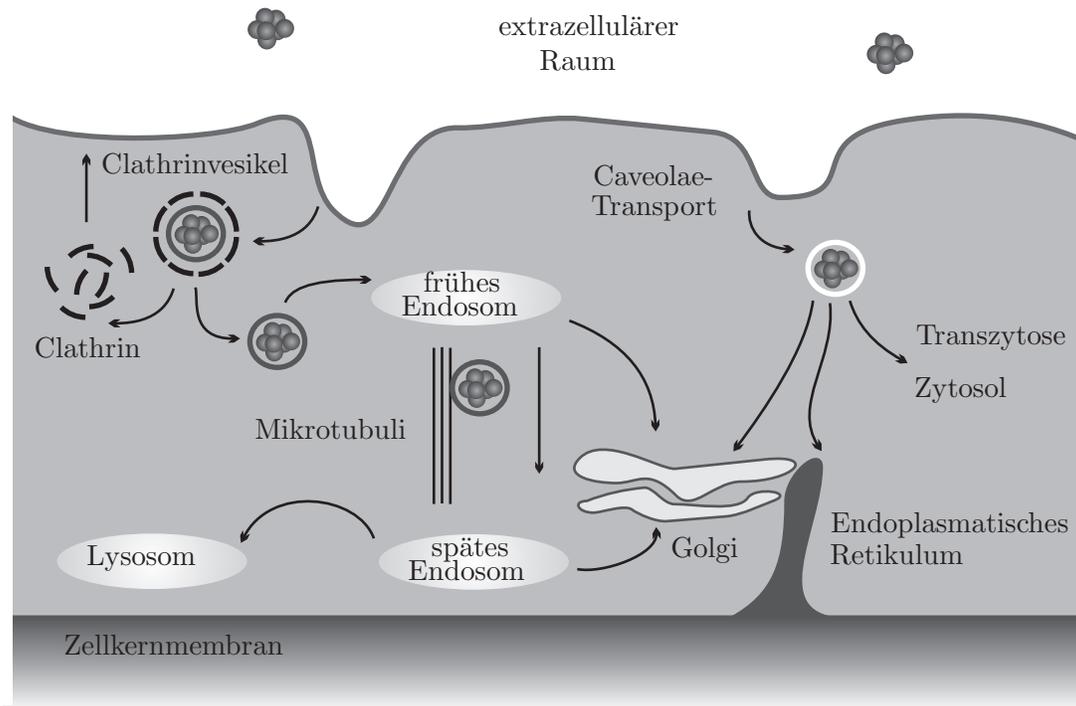


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der Transportwege einer Zelle. Gezeigt sind nur der clathrin-abhängige und der caveolae-vermittelte Transport.

ausgeschlossen werden. Die Zellmembran verändert sich bezüglich ihrer Viskosität ebenfalls bei niedrigen Temperaturen, allerdings ist dieser Prozess erst bei Temperaturen um 4°C von Bedeutung [37, 127].

In Abschnitt 2.2 wurden bereits zwei Mechanismen vorgestellt, die aktuell als die Haupttransportwege von lebenden Zellen diskutiert werden. Der clathrin-abhängige Mechanismus internalisiert dabei Stoffe von der Zellmembran zu den frühen Endosomen, über die Mikrotubuli zu den späten Endosomen und ins Lysosom [35]. Der Weg über die Caveolae ist für Ansätze des gezielten Drug Delivery interessant, da die Stoffe nicht mehr ins Lysosom gelangen, wo sie normalerweise zersetzt werden. Der Weg scheint ein direkter ins Zellinnere zu sein. Die drei weiteren bisher bekannten Arten der Endozytose, die Phagozytose, die Makropinozytose und der weder clathrin- noch caveolae-abhängige Weg sind für die verwendeten Partikel und Zellen nicht von Interesse [37, 38]. Deshalb sollen im Folgenden die beiden aktiven Transportwege weiter untersucht werden. Beide sind energieabhängig und somit nach den beschriebenen Versuchen als wahrscheinliche Methode hinter der Partikelinternalisierung zu sehen.

Abbildung 5.8 zeigt schematisch den Ablauf beider Transportwege. Dabei ist wichtig, dass die Ziele der Stoffe innerhalb der Zelle größtenteils unterschiedlich sind. Das Clathrinvesikel, das sofort nach Abschnürung das Clathrin verliert, welches wieder zur Membran zurücktransportiert wird, gelangt in Teile des frühen Endosoms. Eine wichtige Tatsache für weitere Untersuchungen ist dabei, dass diese Zellkompartimente in der Zellperipherie angesiedelt sind. Der Weitertrans-

port, der über sogenannte multivesikuläre Vesikel geschieht, ist bisher noch nicht ganz verstanden [35, 39]. Sicher ist aber, dass daran entscheidend Mikrotubuli-Filamente beteiligt sind [35, 128]. Diese bringen die Stoffe zu den späten Endosomen, die größtenteils im Innern der Zelle in der Nähe der Kernregion liegen. Letztlich werden diese Kompartimente zu Lysosomen, wo die Stoffe zerlegt werden, soweit dies möglich ist. Im Gegensatz zu diesem Weg, bilden sich aus der Zellmembran in Gegenden hoher Cholesterin- und Glycosphingolipidkonzentration die Caveolae, die kein Clathrin benötigen, sondern als Hauptbestandteil Caveolin. Der weitere intrazelluläre Weg unterscheidet sich von denen der anderen Transportmechanismen. Er führt ohne Stützfilamente, wie die Mikrotubuli, von der Membran direkt ins Zellinnere. Die Vesikel werden nicht in den Lysosomen abgebaut. Man geht davon aus, dass eine direkte Freisetzung ins Zytosol möglich ist, zusätzlich zur Verschmelzung mit Golgivesikeln oder dem Endoplasmatischen Retikulum bis hin zur Transzytose, dem Transport durch die Zelle hindurch [35, 37–39]. Diese Zellkompartimente sind innerhalb des gesamten Zellkörpers zu finden.

Auf diesen Betrachtungen basierend, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Um zwischen dem clathrin-abhängigen Mechanismus und dem Caveolaetransport unterscheiden zu können, wurde der Aufbau der Mikrotubuli gehemmt. Somit wird die Partikelaufnahme an sich nicht unterdrückt, wohl aber der Weitertransport zu den späten Endosomen, sollte es sich um den clathrin-abhängigen Weg handeln, der von der Zelle bevorzugt wird. Die magnetischen Teilchen sollten sich folglich nach Hemmung der Mikrotubuli in der Zellperipherie aufhalten. Colchizin (VWR International, Darmstadt, Deutschland) wirkt mittels Depolymerisation der Tubulinfilamente und verhindert somit einen Weitertransport der Anteile des frühen Endosoms zum späten Endosom [129]. Dabei wirkt es in gewissem Maße als Zellgift, da einerseits die teilweise lebensnotwendige Stoffaufnahme verhindert wird, desweiteren verminderte Zellteilung stattfindet. Es zeigte sich, dass Konzentrationen von über $1\mu\text{g/ml}$ Colchizin zu starke Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen nach 24h Kultur haben, um noch aussagekräftiges Zellverhalten zu erhalten. Die Lebendzellzahl nahm zu stark ab. Versuche, die unter Einwirkung dieses Stoffs durchgeführt wurden, beschränken sich daher auf Zeitspannen von 6h und auf Konzentrationen von $0,5\mu\text{g/ml}$.

Abbildung 5.9 zeigt sowohl L929-Fibroblasten als auch MG63-Osteoblasten. In den Abbildungen 5.9 (a) und (b) sind L929 und MG63 zu sehen, die unter Zugabe von Colchizin nach 6h in Kultur zwar lebende Zellen zeigen, allerdings scheint die Zellteilung nicht mehr möglich zu sein. Vor allem die Fibroblasten zeigen auffällige Veränderungen an ihrer Morphologie. Den Zellen scheint es teilweise nicht mehr möglich zu sein, eine Teilung zu vollziehen oder sich kontrolliert fortzubewegen, was an den Zellkernen sichtbar wird, die sich ganz untypisch in der Zellperipherie aufhalten. Die MG63 zeigen ähnliche Symptome, nur etwas abgeschwächer. Dennoch sind die Zellen vital und betreiben aktive Bewegungen, weshalb innerhalb des gleichen zeitlichen Rahmens zusätzlich zum Colchizin magnetische Partikel der Konzentration $35\mu\text{g/ml}$ beziehungsweise $11\mu\text{g/cm}^2$ zugegeben wurden. Um sicherzustellen, dass bei Partikelzugabe das Colchizin die Mikrotubuli bereits depolymerisiert hat, wurde es bereits 10min vor Versuchsbeginn auf die seit

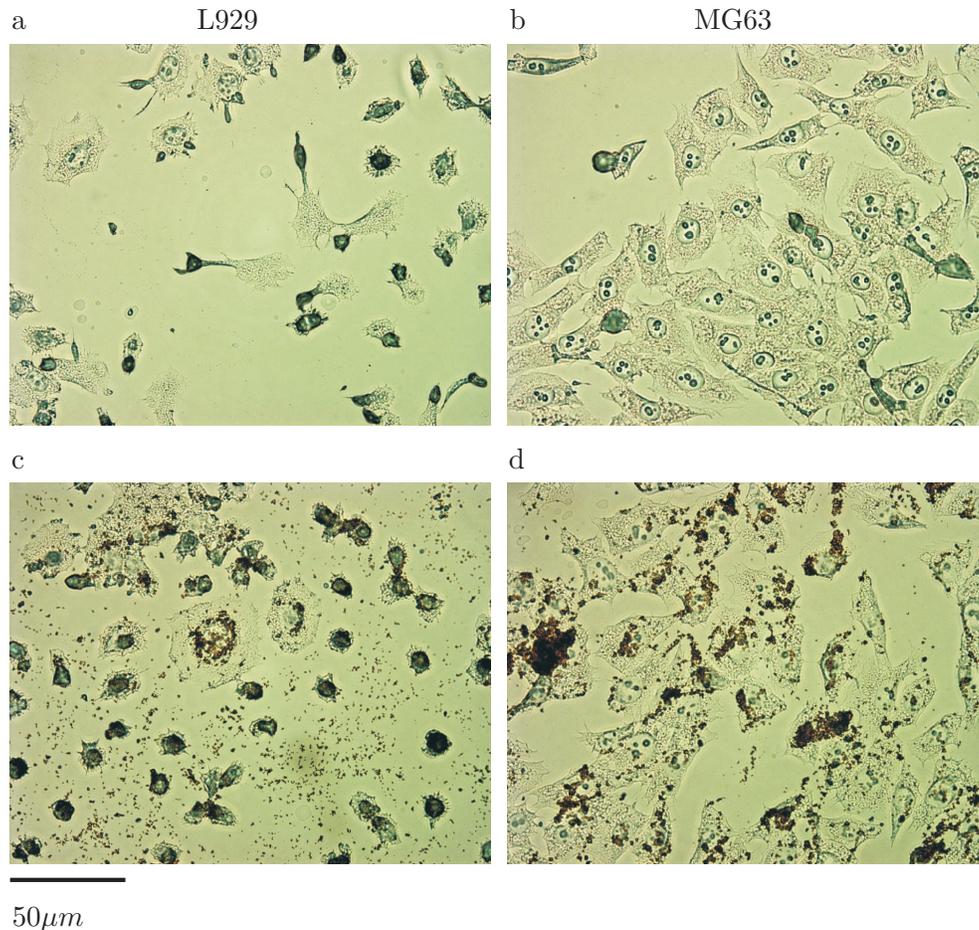


Abbildung 5.9: Colchizin depolymerisiert die Mikrotubuli. a) L929 und b) MG63 nach Colchizineinwirkung über 6h. c) L929 und d) MG63 zusätzlich mit magnetischen Partikeln. Die Teilchen werden trotz der Unterdrückung des intrazellulären Transports mittels Mikrotubuli in der Nähe des Zellkerns angesammelt. Dies spricht für die Beteiligung der caveolae-vermittelten Stoffaufnahme.

24h ausgesähten Zellen gegeben. Trotz der nicht mehr vorhandenen Mikrotubuli, nehmen beide Zelltypen die Partikel weiterhin auf, wie in Abbildung 5.9 (c) und (d) zu sehen ist. Deutlich wird, dass sich bereits nach 6h die Partikel nicht mehr in der Peripherie aufhalten, sondern teilweise bis zu den Zellkernen vorgedrungen sind. Erste Zellen zeigen das bereits typische Abkugeln bei zu hoher intrazellulärer Teilchenkonzentration.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sogar die relativ großen Partikel von 200nm mittels Caveolaetransport in die Zelle gelangen können, da sie nicht in den frühen Endosomen verbleiben. Somit wird deutlich, dass nicht nur die gut erforschten Magnetiteinzelteilchen von geringerer Größe mittels beider Wege aufgenommen werden [127]. Neben dem bekannten Weg der clathrin-abhängigen Endozytose [36] spielt folglich auch der Cavealaetransport eine entscheidende Rolle, der erst in den letzten Jahren als relevant diskutiert wird, um große Komplexe in Zellen einzuschleusen [37]. Dabei wurden Untersuchungen an biokompatiblen, fluoreszenz-

markierten, aber nichtmagnetischen Kugeln im Bereich von 50nm bis $1\mu\text{m}$ durchgeführt. Es zeigte sich, dass Partikel, die über 500nm Durchmesser besitzen, vor allem durch den Clathrintransport inhibiert werden. Nach Unterdrückung der Mikrotubulopolymerisation verbleiben die großen Partikel ausschließlich in der Peripherie der Zelle. Überraschend konnte hingegen festgestellt werden, dass kleine Partikel hauptsächlich durch die caveolae-vermittelte Aufnahme in die Zelle gelangen. Dies deckt sich mit den hier beschriebenen Versuchen, obwohl beim Einsatz von 500nm -Magnetitpartikeln keine anderen Ergebnisse erzielt wurden. Allerdings ist dieser Befund auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Größenangabe des Herstellers eine obere Schranke darstellt, die Teilchen aber im Mittel wesentlich kleiner sind. Die hier verwendeten großen Partikel, die in Versuchen, wie in anderen Kapiteln beschrieben, nicht weiter betrachtet wurden, zeigten einen mittleren Durchmesser von 400nm , wie mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen deutlich wurde. Desweiteren ist nicht auszuschließen, dass die großen Partikel außerhalb der Zellen verbleiben und nur kleinere aufgenommen werden, wenn Colchizin angewendet wird. Da der Caveolaweg nicht zum lysosomalen Abbau führt und Transzytose nicht der vorherrschende Mechanismus ist (Teilchen verbleiben in der Zelle), wurden die Teilchen folglich direkt ins Zytosol übergeben oder an den Golgiapparat geliefert und tauchen somit auch im Innern der Zelle auf.

Es ergibt sich in diesem Bereich eine weite Fülle an Anwendungsmöglichkeiten. Es konnte gezeigt werden, dass superparamagnetische Partikel (bis auf in diesem Sinne vernachlässigbar schwache Kopplung der Einzelteilchen) der Größenordnung 250nm über einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen werden. Im Vergleich zur Literatur kann der Magnetismus als Auslöser dieser Aufnahme ausgeschlossen werden, zumal sich für die Zellen in den Versuchen kein resultierendes magnetisches Moment der Teilchen, aufgrund des superparamagnetischen Verhaltens, ergab. Bisher gibt es allerdings keine festen Aussagen darüber, was die Zellen dazu veranlasst, mittels energieabhängiger Mechanismen Teilchen aufzunehmen, die nicht mit Stimulanzien versehen sind. Verwendet wurden in den beschriebenen Versuchen sowie in der zitierten Literatur inerte Teilchen, ohne besondere Signalfaktoren. Selbstverständlich kann die Aufnahme verschiedener Partikel durch Anbinden unterschiedlichster Liganden stimuliert werden [130], was hier aber nicht als Ziel gesetzt wurde.

5.2 Wechselwirkung von Zellen mit dem Substrat

Wenn die magnetischen Teilchen von Zellen aufgenommen werden, dienen sie nicht mehr der Strukturbildung. Ziel war es, ein System zu konstruieren, mit dem über Oberflächenwechselwirkung Zellen kontaktiert werden können. Die Partikel wurden dieser Grundidee entsprechend nicht dazu verwendet, Biomoleküle in Zellen einzuschleusen, sondern durch magnetische Wechselwirkung mit dem Substrat die Möglichkeit der *in-vitro*-Strukturveränderung zu besitzen. Um folglich den Effekt der Endozytose zu unterdrücken, mussten neue Konzepte entwickelt werden, die Partikel stark genug an das Substrat anzubinden. Jede chemische Ankopplung an das Sub-

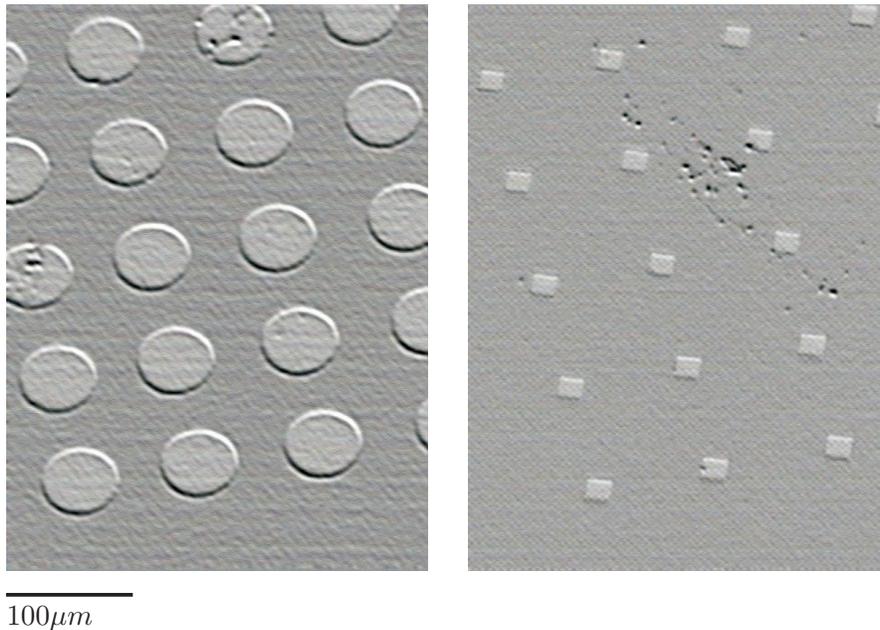


Abbildung 5.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer strukturierte Permalloyschicht auf Glas. Mittels Elektronenstrahlolithographie entstanden $50\mu\text{m}$ durchmessende Kreise und $10\mu\text{m}$ Quadrate.

strat würde weitere Mobilität der Teilchen ausschließen und variable Strukturbildung unmöglich machen. Durch die Verwendung von Oberflächen, die ihrerseits auch magnetisch sind und starke inhomogene Streufelder aufweisen, konnten dieses Ziel erreicht werden [131].

5.2.1 Biokompatibilität

Der Ansatz, die Partikel chemisch an die Oberfläche anzubinden, hatte gegenüber der direkten chemischen Strukturierung der Substrate, beispielsweise durch μCP , keinen offensichtlichen Vorteil. In erster Linie sollte keine topographische Information entstehen, sondern möglichst eine gut kontrollierbare, biochemische Struktur. Der Magnetismus der Teilchen sollte genau dafür verwendet werden, von außen über weitere magnetische Felder Strukturen generieren zu können und zwar universell. Das bedeutet, dass der Schritt, für jede neue Struktur neue chemische Verfahren entwickeln zu müssen, entfallen sollte. Zukünftige Koppelmechanismen sollten nur der Biofunktionalisierung der Partikel dienen. Danach sollte über magnetische Beeinflussung der funktionalisierten Teilchen eine Vielzahl an Strukturen entstehen, ohne weiterhin auf chemische Strukturierungsverfahren angewiesen zu sein. Um genau dieses Ziel weiter zu verfolgen, die hohe Variabilität des Systems zu erhalten, sollten die Teilchen an magnetische Substrate angebunden werden, so dass weiterhin äußere Felder der strukturellen Veränderung dienen konnten.

Als Grundstruktur sollten dabei magnetische Dünnschichten auf Glas dienen. In Abbildung 5.10 sind beispielhaft Quadrate und Kreise gezeigt, die durch ihre spezifische Domänenstruktur und der daraus resultierenden Streufelder in der Lage sein sollten, magnetische Partikel anzubinden. Durch Verwendung der Elektronenstrahlolithographie ließen sich somit akkurat geometrische

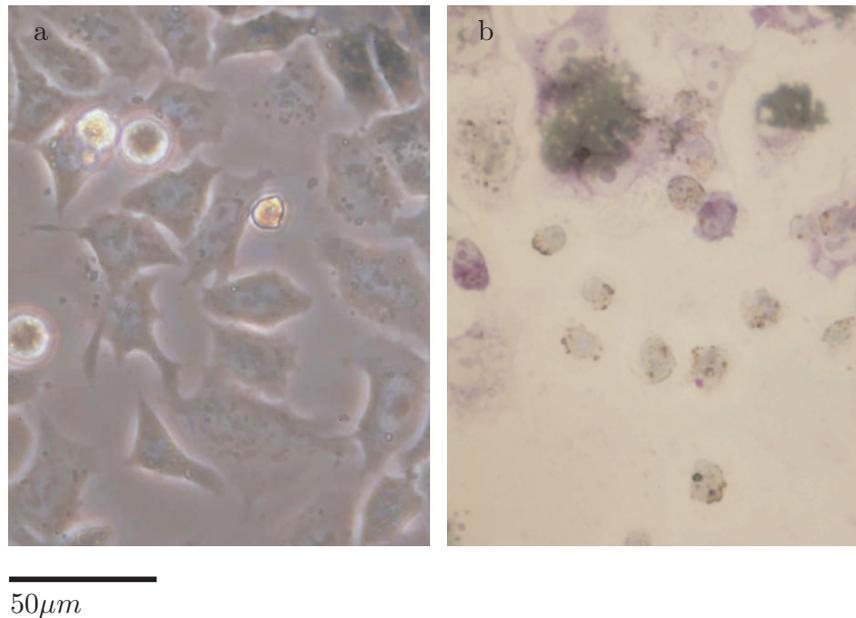


Abbildung 5.11: Lichtmikroskopische Aufnahme a) vom Wachstum von HuTu-Zellen auf Glas mit einer Permalloyschicht. b) Nach bereits zwei Tagen in Zellkultur löst sich das Permalloy auf und reagiert toxisch mit den Zellen.

Strukturen magnetischen Materials, hier Permalloy, auf einem Substrat herstellen.

Das größte Problem dieses Ansatzes entsteht durch die toxische Wirkung der normalerweise verwendeten magnetischen Substanzen. Vor allem Schwermetalle wie Nickel oder Chrom reagieren mit dem Erbgut der Zellen und wirken innerhalb kürzester Zeit und kleiner Konzentration abtötend [132]. Um diese Tatsache zu umgehen, wurden viele Versuche unternommen, magnetische Schichten vor der Berührung mit Kulturmedium zu schützen. Dieses geschah durch zwei Ansätze: Einerseits sollte das magnetische Substrat außerhalb des Kulturgefäßes platziert werden und zweitens sollte ein dünner biokompatibler Film zwischen Zellen und magnetische Schicht gebracht werden. Beide Ansätze konnten nicht realisiert werden. Wurden beispielsweise außerhalb der Kulturkammer handelsübliche Permanentmagnete verwendet, verlor man die Möglichkeit der Strukturierung im μm -Bereich. Magnetische Dünnschichten, die interessante, kleine Bereichsstrukturen aufweisen, konnten außerhalb des Gefäßes ebenfalls nicht verwendet werden, da die Magnetfelder, die von den Domänen ausgehen, keine sehr hohe Reichweite besitzen. Kulturgefäße sind üblicher Weise um 1mm dick, was zu viel für eine Anbindung magnetischen Materials in dieser Entfernung darstellt. Das weitere Vorgehen zielte darauf ab, magnetische Dünnschichten, die auf Glas aufgesputtert wurden, direkt in Zellkultur einzusetzen, damit der Abstand der magnetischen Domänen zu den Partikeln möglichst gering war. Als Schichten wurde 30nm – 100nm Kobalt-Chrom oder Permalloy benutzt. Abbildung 5.11 zeigt einen 40nm Permalloyfilm, der in Zellkultur gebracht wurde. Die Biokompatibilität wurde an HuTu80-Zellen getestet¹. Deutlich ist

¹Die Versuche wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ulrich Rauch, AG Enterisches Nervensystem, FB Informatik & Mikrosystemtechnik, Fachhochschule Kaiserslautern, durchgeführt.



50 μm

Abbildung 5.12: Lichtmikroskopische Aufnahme von L929-Fibroblasten nach drei Tagen Zellkultur auf einem Granatfilm. Die Zellen sind bereits über konfluentes Wachstum hinaus und bilden Multischichten. Die grünliche Farbe ist auf die Farbe der magnetischen Schicht zurückzuführen.

sichtbar, dass die Zellen anfänglich zwar adhäreren, nach 48h allerdings kaum mehr vital sind. Die magnetische Schicht hat sich größtenteils aufgelöst und im Medium verteilt. Die Zellen sind bis auf wenige Ausnahmen abgekugelt. Weitere Unterkultivierungen zeigten keine Proliferation mehr, die Zellen konnten nicht mehr vermehrt werden. Versuche zu Schutzschichten scheiterten ebenfalls daran, dass der Langzeiteinfluss des Kulturmediums die Stabilität der Schichten angriff. Poly-Methylmetacrylat (PMMA) und PDMS-Schichten konnten nicht so aufgebracht werden, dass sie dicht gegen die magnetische Schicht abschlossen. Das Problem stellten in allen Versuchen die seitlichen Ränder der Substrate dar. Weiterhin waren die Quelleigenschaften der genannten Materialien von Nachteil. Nach 24h unter Einwirkung des Kulturmediums besaßen die Schichten keine glatte Oberfläche mehr und lösten sich von der Seite aus vom Substrat ab. Mit der Verwendung von harten Lacken, die unter dem Einfluss von Wasser nicht quellen, sollte dieses Problem behoben werden. Allerdings zeigten sie sich als ebenso toxisch wie die magnetischen Dünnschichten.

Als letztendlich geeignet zeigten sich die Granatfilme, die in vorangegangenen Kapiteln bereits ausführlich behandelt wurden. Die Oberflächen sind unter Einflüssen des Kulturmediums stabil. Zellen können über Tage auf ihnen kultiviert werden, ohne Auswirkungen auf die Zellproliferation. So kann zumindest ausgeschlossen werden, dass diese Substrate zytotoxisch sind, was von der Zusammensetzung $Y_{2,5}Bi_{0,5}Fe_{5-\delta}Ga_{\delta}O_{12}$ ($\delta = 0.5 - 1$) her nicht direkt zu erwarten ist. Durch ihre Transparenz im sichtbaren Bereich und ihrer atomar glatten Oberfläche eignen sie sich sehr gut zur Durchführung von Zellkulturexperimenten. Die Stabilität bei hohen Temperaturen ermöglicht eine einfache Sterilisierung und Wiederverwendung. In Abbildung 5.12 ist ein Granatfilm der Dicke $5\mu\text{m}$ gezeigt, der drei Tage in Zellkultur verbracht wurde. Die L929 sind bereits über

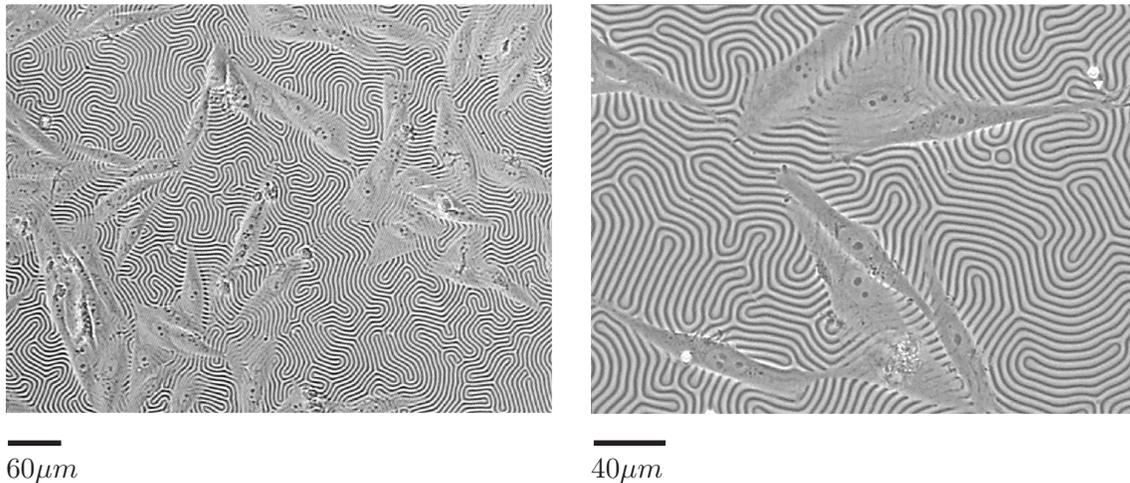


Abbildung 5.13: MG63-Osteoblasten auf mit Partikeln beschichtetem Granatfilm, der die Labyrinthstruktur aufweist. Nach drei Tagen Zellkultur war konfluentes Wachstum erreicht. Rechts ist zu erkennen, dass die Zellen keine Partikel aufgenommen haben. Die magnetischen Kräfte zwischen Substrat und Partikeln reichen aus, um Endozytose zu verhindern.

das konfluente Wachstum hinaus und bilden deutlich mehrschichtiges Wachstum. Daher sind einzelne Zellen nicht besonders gut zu erkennen, durch großflächige Zell-Zell-Kontakte werden keine Ausläufer mehr gebildet. Ebenso zeigt eine Videoaufnahme, dass die Fibroblasten auf dem Granatfilm adhären und sich teilen (\rightarrow Biokompatibel [104]). Die Zeitrafferaufnahme zeigt eine Zeitspanne von $1h13min$. Ein äußeres Feld der Frequenz $10Hz$ wurde beispielhaft angelegt. Die Stärke des Felds war so gewählt, dass es die Hälfte des Sättigungsfeldes betrug.

Die magnetische Struktur der Filme hat keinen merklichen Einfluss auf das Zellwachstum. Generell zeigten sich die getesteten Zelllinien MG63 und L929 auf den unterschiedlichsten Domänenstrukturen als nicht durch den Magnetismus beeinflussbar. Für die vorliegende Arbeit ist dies positiv, da die Stärke des entwickelten Systems in der kontrollierten Kontaktierung der Zellen liegt. Dies soll durch topographische und biochemische Strukturbildung gewährleistet werden. Werden die Zellen in ihrem Verhalten nicht durch die magnetische Struktur beeinflusst, erleichtert dies erheblich die Interpretation und Vorhersage zellulärer Abläufe. Auf der Oberfläche der Granatfilme herrschen Feldstärken im Bereich von $1,5 \cdot 10^4 A/m$, beziehungsweise unter Vernachlässigung weiterer Materialeinflüsse eine Flussdichte von $1,8 \cdot 10^{-2} T$. Im Gegensatz zum Erdmagnetfeld ist dies ein 360fach höherer Wert. Bereits bei deutlich niedrigeren Feldern wird in der Literatur über Einflüsse auf Zellen und Lebewesen berichtet [133, 134]. Allerdings fallen die Felder oberhalb des Granatfilms mit wachsender Entfernung schnell ab, so dass die Feldstärke im Abstand von $100nm$ bereits um die Hälfte abgenommen hat, wie dies bereits in Abschnitt 4.4.2 ausführlich erläutert wurde. Die Zelldicke beträgt einige μm , so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Großteil der Zelle kein Magnetfeld spürt.

Der nächste Schritt, der das System erst interessant macht, beinhaltet das Immobilisieren von Nanopartikeln auf den Domänenwänden des magnetischen Substrats. Die Partikel sind der eigent-

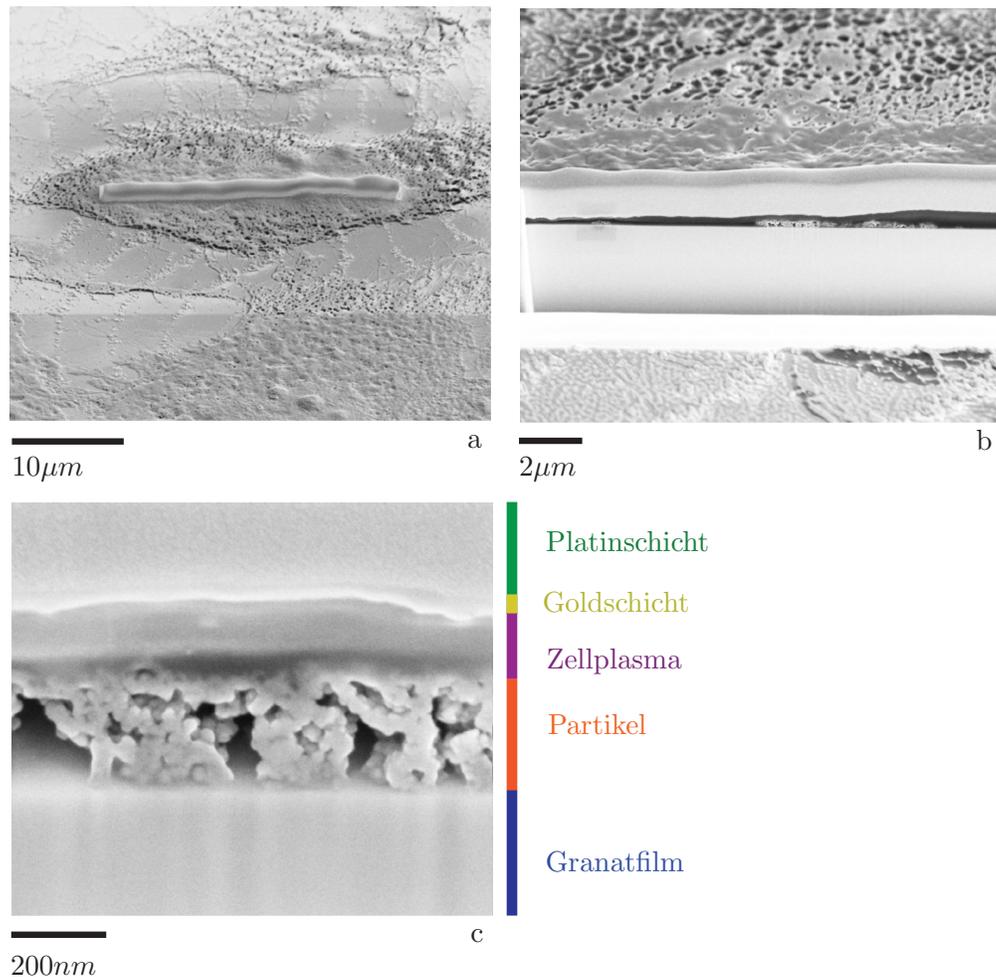


Abbildung 5.14: Querschnitt eines L929-Fibroblasten, der auf einem Granatfilm kultiviert wurde. a) An den Domänenwänden wurden magnetische Teilchen immobilisiert. Der Streifen ist Platin, das aufgetragen wurde, um eine glatte Schnittfläche zu erhalten. b) und c) Die Partikel werden nicht mehr von der Zelle internalisiert. Sie verbleiben auf dem Substrat ohne von der Zellmembran umschlossen zu werden.

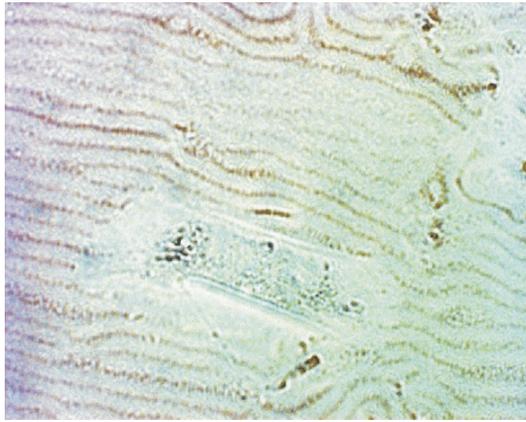
liche Träger der biologisch interessanten Information und dienen der für die Zelle bemerkbaren Strukturbildung. In Abbildung 5.13 sind Osteoblasten gezeigt, die auf einem mit Partikeln beschichteten Granatfilm kultiviert wurden. Die Domänenstruktur ist labyrinthartig. Dabei wurden auf dem Granat maximal viele unfunktionalisierte Partikel angebunden, was einer Beschichtungsbreite von $1\mu m$ entspricht, wie in Abschnitt 4.4.2 berechnet und experimentell bestätigt wurde. Nach drei Tagen war Konfluenz der Zellen erreicht, ohne dass eine sichtbare Änderung der Zellmorphologie stattgefunden hat. Innerhalb der Zellen, Osteoblasten wie Fibroblasten, waren keine magnetischen Partikel mehr zu erkennen. Während die Zellen die Partikel ohne magnetische Wechselwirkung innerhalb von $6h$ aufnehmen konnten, schien es hier so, dass selbst nach Tagen keine Partikel in den Zellen zu finden waren.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden erneut Querschnitte von Zellen gemacht, die diesmal auf beschichteten Granatfilmen wuchsen. Abbildung 5.14 zeigt beispielhaft eine Untersu-

chung mittels des FIB an einem L929-Fibroblasten. Dazu wurden die Zellen äquivalent zu den Versuchsbedingungen in Abschnitt 5.1 präpariert. In Abbildung 5.14 (a) ist die Zelle zu sehen, von der der Querschnitt gemacht wurde. Die Zellsubstanz ist bereits in den peripheren Regionen angegriffen, was durch die löchrige Struktur erkennbar ist. Die Ursache dafür ist die prozessbedingte Platinabscheidung, die einen glatten Schnitt ermöglichen soll. Der Streifen auf der Zelle ist das Platin. Ebenfalls sind die Partikelstrukturen zu erkennen. Sie verlaufen, wie erwartet, im $5\mu\text{m}$ -Abstand zueinander unter der Zelle im Labyrinthmuster. Abbildung 5.14 (b) macht deutlich, dass die Partikelstruktur durch die Zelle nicht zerstört wird. Im Querschnitt sind zwei Domänenwandbereiche mit angelagerten Teilchen erkennbar, wobei eine Wand gerade einen Knick im Bereich des Querschnitts macht, was im Vergleich mit der voranstehenden Abbildung verifiziert werden kann. Die Partikel sind von der Anzahl her sehr konzentriert im untersuchten Gebiet, befinden sich aber auf der Granatoberfläche und sind nicht wie im vorangegangenen Kapitel im Zellkörper verteilt [131]. Diese Tatsache lässt sich noch eindeutiger anhand Abbildung 5.14 (c) zeigen. Zur Orientierung befinden sich farbkodiert die Zuordnungen der einzelnen Schnittregionen zu den verschiedenen Kompartimenten neben der Abbildung. Die Zellmembran kann sich dort nicht mehr um die Partikel stülpen und diese aufnehmen. Der Kontakt zwischen den Teilchen und der Granatoberfläche ist durch die magnetische Wechselwirkung so verstärkt, dass sie selbst nach Tagen in Zellkultur haften bleiben. Die einzelnen Partikel sind im Querschnitt gut erkennbar, da zwischen zwei Nachbarpartikeln bei der Deposition Lücken entstanden sind. Der Durchmesser der einzelnen Partikel liegt bei ungefähr 200nm , so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie durch verschiedenste Prozessschritte nicht zerstört wurden.

Die in Abschnitt 4.4.2 berechnete Kraft im pN -Bereich zwischen Partikel und Oberfläche, die Maximalwerte von $100pN$ aufweist, genügt, um den Endozytosevorgang zu verhindern. Damit ist erreicht, dass Zellen mittels dieses Systems über reine Oberflächen-Wechselwirkung kontaktiert werden können.

Weiterhin sollten äußere magnetische Felder Substratveränderungen erlauben, so dass Zellen mit verschiedenen Geometrien oder Strukturen während der Kultur konfrontiert werden können. Um herauszufinden, wie sich Teilchenbewegungen im Hinblick auf Endozytose auswirken oder ob Strukturveränderungen prinzipiell Auswirkungen auf das Zellverhalten haben, wurden Versuche unterschiedlich schneller Feldveränderungen durchgeführt. Die Frequenzen reichten dabei von $0,1\text{mHz}$ - 1Hz . Die Stärke des Feldes wurde so gewählt, dass die Veränderungen reversibel blieben. Domänenwände sollten möglichst nicht zerstört werden, damit keine magnetisch ungebundenen Partikel ins Kulturmedium gelangen konnten. Abbildung 5.15 zeigt eine L929-Fibroblastenzelle in einem Langzeitversuch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Experimentbeginn. Dabei wurden die Zellen auf Granatfilmen kultiviert, die mit Partikeln beschichtet waren. Die Beschichtung wurde in wässriger Umgebung ohne Trocknungsschritte durchgeführt, so dass die Partikel im Kulturmedium Domänenveränderungen des Substrats folgen konnten. Die Variation des äußeren Feldes hatte eine Frequenz von $0,1\text{mHz}$ beziehungsweise eine Periode von $2\text{h } 46\text{min } 40\text{s}$, wobei



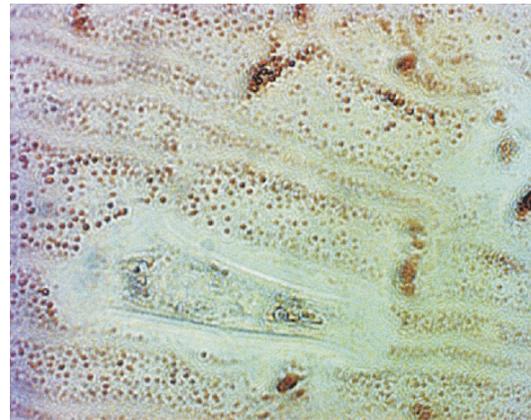
14h



15h



16h30min



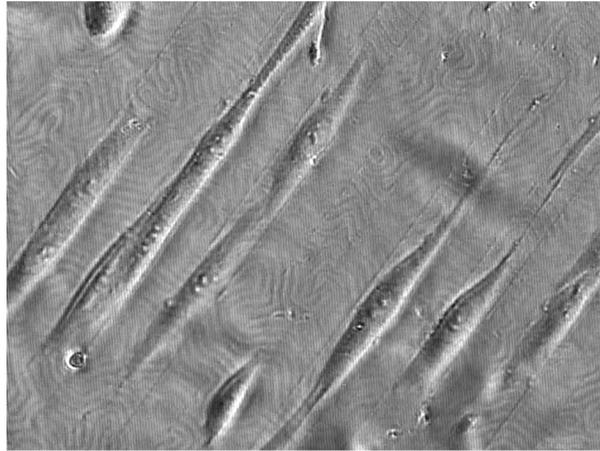
18h20min



50 μ m

Abbildung 5.15: Langzeitversuch an L929-Fibroblasten. Die Zellen wurden in der Klimakammer auf einem beschichteten Granatfilm kultiviert, dessen magnetische Struktur mit $0,1\text{mHz}$ durch ein äußeres Feld der maximalen Amplitude 7mT mit Sinusverlauf variiert wurde. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Strukturen. Selbst wenn die Partikel bewegt werden, reicht die magnetische Wechselwirkung zwischen Substrat und Teilchen aus, um Endozytose zu verhindern.

die maximale Amplitude am Probenort 7mT betrug. Die Dauer des Versuchs wurde auf 24h angesetzt. Diese Zeitspanne ist lange genug, um einen Vergleich zwischen den Endozytoseversuchen in Abschnitt 5.1 und den beweglichen Partikel zu ziehen. Die Abbildung nach $18\text{h } 20\text{min}$ zeigt die Zelle zu einem Zeitpunkt maximalen äußeren Feldes. Dabei ist erkennbar, dass die angelegte Feldstärke bereits einige Domänenwände zerstört hat und die Partikel größere Ansammlungen bilden. Die Partikel sind mit dem Verschwinden einiger Wände teilweise nicht mehr stark angebunden. Dies ist allerdings ein reversibler Prozess, die Teilchen agglomerieren nicht vollständig. Das ist in den drei anderen Abbildungen, die eine gleichmäßige Beschichtung zeigen und erst nach mehrmaligem, periodischem Durchlaufen der Feldveränderung entstanden sind, erkennbar. Die Zelle hat während der Versuchszeit keine Partikel aufgenommen, so dass selbst bei zeitlicher Veränderung des Substrats über die Reversibilitätsgrenze hinaus (die magnetische Struktur ist



60 μm

Abbildung 5.16: MG63-Osteoblast auf einem Granat, der Linien alternierend mit und ohne Partikel der Breite 20 μm aufweist. Die Zellen zeigen ein gerichtetes Wachstum entlang der Linien.

von Abbildung zu Abbildung unterschiedlich) die magnetische Immobilisierung ausreicht, um Endozytose zu verhindern.

Neben der Labyrinthstruktur wurden auch zeitliche Veränderungen anderer metastabiler Zustände untersucht. In keinem Fall konnte beobachtet werden, dass die Zellmorphologie oder das Wachstum extrem verändert wurden.

5.2.2 Anisotropes Zellwachstum

Zusätzlich zur Strukturierung, die durch die magnetische Domänenkonfiguration vorgegeben wird, erhält man, wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben, eine weitere Überstruktur, wenn man mittels des mikrofluidischen Ansatzes und der Stempeltechnik Partikel in unterschiedlichen Gebieten kontrolliert deponieren kann. Werden die Granatfilme, sofern sie Überstrukturen unterschiedlicher Geometrie und Ausdehnungen von 20 μm – 50 μm aufweisen, in Zellkultur überführt, zeigen sich überraschende Effekte.

Eine lineare Struktur, die beispielsweise alternierend mit und ohne Partikel 20 μm breite Streifen aufweist, ruft in Zellkultur gerichtetes Wachstum hervor. Dabei sind sowohl Osteoblasten als auch Fibroblasten nicht mehr fähig, ihre eher scheibenförmige Morphologie beizubehalten. In Abbildung 5.16 sieht man Osteoblasten, die deutlich elongiert sind und eine Wachstumsachse aufweisen. Senkrecht zu dieser Achse entsprechen die Zellbreiten maximal der Ausdehnung der Kernregion. Die Struktur wurde mit wenigen Partikeln hergestellt, so dass im Lichtmikroskop die Teilchen keinen erkennbaren Kontrast liefern. Die sichtbare Labyrinthstruktur kommt von magnetooptischen Effekten und entspricht der Domänenkonfiguration des Granatfilms. Auffällig ist der regelmäßige Abstand der Zellen, den sie seitlich zueinander eingeklemmt haben. Die bewachsenen Bereiche sind genauso breit wie die freien, beide 20 μm .

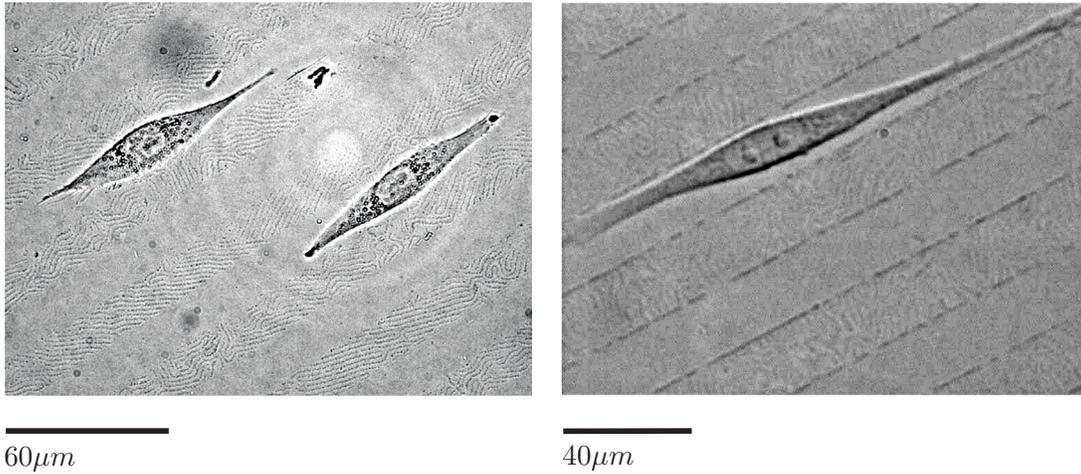


Abbildung 5.17: Auf einem Granatfilm kultivierte MG63-Osteoblasten. Der Film wurde in $20\mu\text{m}$ breiten Linienbereichen mit Partikeln mittels der Mikrofluidikmethode beschichtet, der Abstand einzelner Linien beträgt ebenfalls $20\mu\text{m}$. Die Zellen vermeiden den Kontakt zu den Partikelbereichen vollständig.

Die Zellen haben die Bereiche mit den Partikeln vermieden, wie in Abbildung 5.17 erkennbar ist. Für diese lichtmikroskopische Aufnahme ohne Faradayeffekt wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen fixiert und somit die Kontrastverhältnisse verbessert. Hier ist deutlich die Partikelstruktur erkennbar. Die Bereiche der partikelfreien Zonen werden zum Wachstum genutzt, während die anderen die einzelnen Zellen voneinander trennen. Im rechten Teil sind die Veränderungen der Zellmorphologie noch stärker. Die Zelle behält nicht einmal die kugelförmige Kernregion bei, sondern elongiert so stark, dass die Breite der Ausläufer unter $5\mu\text{m}$ liegt und der Kern entlang der Achse doppelt so lang wie breit ist. Die Gesamtzelllänge beträgt über $160\mu\text{m}$, was fast dreimal soviel wie unter Normalbedingungen ist. Um so stark ihre Form zu ändern, muss die Zelle entlang dieser Achse Kräfte aufbauen. Dies ist möglich, indem sie auf dem Substrat Fokalkontakte herstellt und mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbindet. Durch Kontraktion entsteht dann Spannung, so dass die Zelle weiter adhären kann. Wie bereits beschrieben, findet dieser Prozess des Auf- und Abbaus der Fokalkontakte hochdynamisch statt und läuft ungerichtet ab. Nachdem eine Zelle Lamellipodien gebildet hat, wird sie, falls sie auf dem Untergrund haften kann, in den Randregionen dieser Ausläufer neue Kontakte synthetisieren, während sie nicht mehr benutzte abbaut. Dieser Ablauf dient der Fortbewegung und der Kontaktaufnahme zu anderen Zellen, was die Stabilität eines Gewebes erfordert. Im vorliegenden Fall versucht die Zelle allerdings nicht mehr in alle Richtungen Lamellipodien auszubilden, um möglichst flächig zu adhären, sondern beschränkt sich darauf, das gesamte Zytoskelett entlang der Strukturierungsachse anzubringen. Dabei scheint es so, als solle jeder Kontakt zu den Partikeln vermieden werden.

Sofern allerdings doch einmal Zell-Zell-Kontakte hergestellt werden und die Zellen dann Zugspannung mit Hilfe ihrer Nachbarn aufbauen können, verlieren sie wieder ihr gerichtetes Wachstum, wie in Abbildung 5.18 erkennbar ist. Während noch verhältnismäßig wenige Zellen in einem

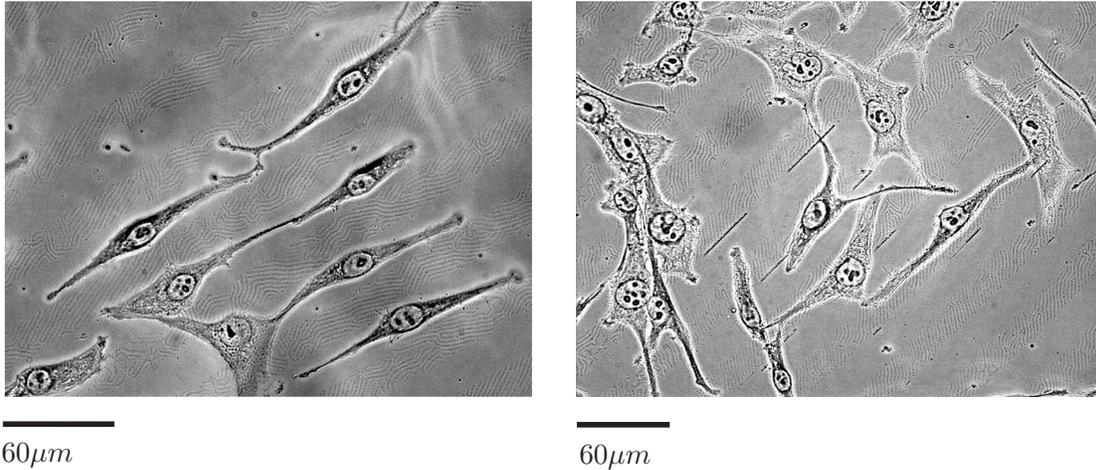


Abbildung 5.18: MG63-Osteoblasten auf einem Granatfilm kultiviert. Der Film wurde in $20\mu\text{m}$ breiten Linienbereichen mit Partikeln mittels der Mikrofluidikmethode beschichtet. Der Abstand einzelner Linien beträgt ebenfalls $20\mu\text{m}$. Die Zellen meiden die Partikel vollständig, sofern sie noch keinen Kontakt zu einer benachbarten Zelle gefunden haben. Zell-Zell-Kontakte ermöglichen den Osteoblasten wieder ungerichtetes Wachstum.

Bereich zu finden sind, zeigt sich anisotropes Wachstum. Im unteren Teil der linken Abbildung ist allerdings bereits eine Zelle zu erkennen, die in Kontakt mit zwei oder drei Nachbarn steht, die nicht auf einer Linie hintereinander, sondern in verschiedenen Bereichen nebeneinander gewachsen sind. Die Verbindungszelle zeigt ganz deutlich eine flächigere Struktur zusammen mit einem runden Zellkern. In der rechten Abbildung sind mehrere Zellen erkennbar, die alle untereinander in Kontakt stehen und auf der gleichen Struktur kultiviert wurden, wie in den oben beschriebenen Fällen. Hier ist kein anisotropes Wachstum mehr zu erkennen. Sowohl bei den MG63 als auch bei den L929, ist der Effekt des elongierten Wachstums mit zunehmender Zellzahl und Zell-Zell-Kontakten zu vernachlässigen.

Es scheint ein wichtiges Kriterium zu sein, dass Fokalkontakte, sofern es keine Zell-Zell-Kontakte gibt, von Zellen dort hergestellt werden, wo keine Partikel vorhanden sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Partikel die Zelle nicht davon abhalten, zu adhären. In Abbildung 5.13 oder in Abbildung 5.19 besteht keine Wahl zwischen unstrukturiertem und strukturiertem Bereich. Der gesamte magnetische Film wurde homogen mit Partikeln beschichtet. In Abbildung 5.19 besitzt der Granatfilm Bubble-Domänenstruktur. Die Zellen zeigen kein gerichtetes Wachstum und erscheinen breiter, was auch im vorangegangenen Kapitel anhand der Labyrinthstruktur beobachtet werden konnte. Das System, bestehend aus magnetischem Film und Partikeln, scheint also keine besonderen Einflüsse zu besitzen, die auf eventuell chemische Unverträglichkeit, zu hohe Rauigkeit oder andere Einflüsse, die aus dem Zusammenspiel beider Komponenten zurückzuführen sind. In der Vergrößerung eines Ausschnitts in Abbildung 5.19, der im rechten Teil dargestellt ist, ist deutlich erkennbar, dass Regionen, die Fokalkontakte besitzen (Aktinbündel, die an Fokalkontakte andocken sind sichtbar), über Partikeln liegen. Die Teilchen an sich oder deren Topographie verhindern folglich nicht die Adhäsion. Mehr noch: Auf

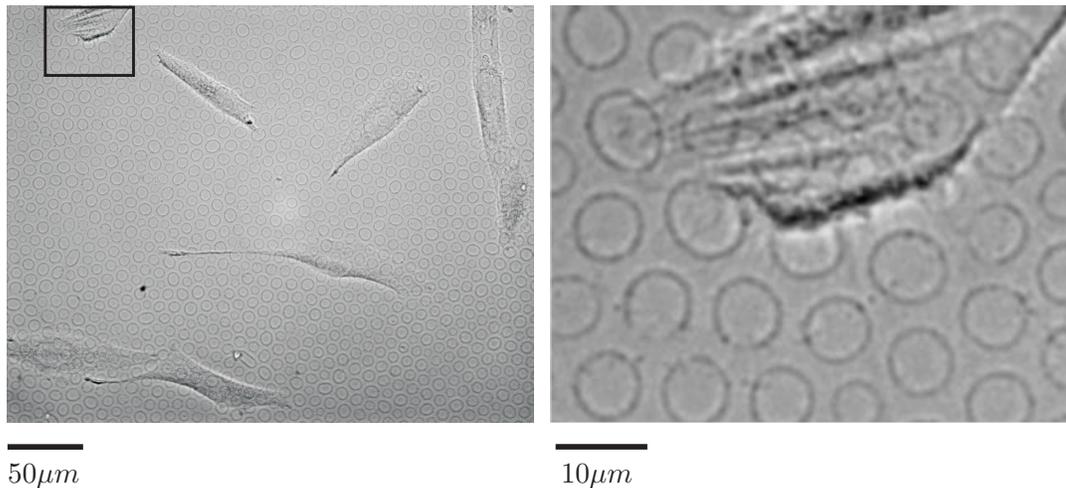


Abbildung 5.19: MG63-Osteoblasten auf einem mit Partikeln beschichteten Granatfilm, der Bubbledomänenstruktur aufweist. Die Zellen wachsen ungerichtet. Der schwarz umrahmte Bereich ist rechts vergrößert dargestellt. Dort sind Teile des Zytoskeletts deutlich erkennbar. Die Zelle bildet über Bereichen mit Partikeln Fokalkontakte.

den homogen beschichteten Filmen konnte kein Wachstums- oder Proliferationsunterschied im Gegensatz zu Kontrollkulturen ausgemacht werden.

Wird nun aber ein Granatfilm verwendet, der lineare Domänenstruktur besitzt, so beobachtet man das gleiche anisotrope Wachstum wie auf den $20\mu\text{m}$ Linien, wie in Abbildung 5.20 zu sehen ist. Die Zellen erscheinen zwar nicht ganz so dünn geformt, wie es bei der $20\mu\text{m}$ -Struktur der Fall ist. Dort wachsen die Zellen explizit innerhalb der Grenzen des partikelfreien Bereichs. Hier besteht diese laterale Einschränkung nicht, so dass die Kernregionen weniger verformt werden. Allerdings sind die Zellen deutlich lang gestreckt und wachsen parallel zu den Domänenwänden. Auch hier konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Zellzahl die Ausrichtung einzelner Zellen verschwand, sobald Zell-Zell-Kontakte vorhanden waren.

Um der Frage nachzugehen, ob vielleicht die Ausrichtung entlang einer Achse für Zellen im Gegensatz zum ungerichteten Wachstum Vorteile bietet, wurden die Strukturen der Achtecke untersucht. Dabei wurden Partikel mittels des Stempelverfahrens in Gebieten aufgebracht, die die Geometrie gleichmäßiger Achtecke besaßen. Die Breite einer Struktur betrug $50\mu\text{m}$. Eine genauere Beschreibung findet man in Abschnitt 4.5.3. In Abbildung 5.21 sind beispielhaft MG63-Osteoblasten gezeigt, die nach einem Tag in Kultur noch nicht genügend dicht gewachsen sind, um Zell-Zell-Kontakte zu formieren. Man erkennt, dass eine Ausrichtung der Zellen vorliegt [14]. Diesmal handelt es sich allerdings nicht ausschließlich um Wachstum entlang einer Achse, sondern sie zeigen zusätzlich eine typische Dreiecksform. Um solch ausgeprägte Formen zu erreichen, müssen die Zellen erneut in den „Ecken der Dreiecke“ Fokalkontakte bilden und entlang der „Dreieckseiten“ Aktinfasern bündeln, die zum Kraftaufbau zwischen den Verankerungspunkten dienen. Speziellere Untersuchungen zur Beschaffenheit des Zytoskeletts bei solch dreiecksförmigem Wachstum findet man beispielsweise in [42, 44]. Bei diesen Arbeiten wird deutlich, dass Aktin gerade an freien Kanten von Zellen benötigt wird, um die Stabilität des Zellkörpers zu

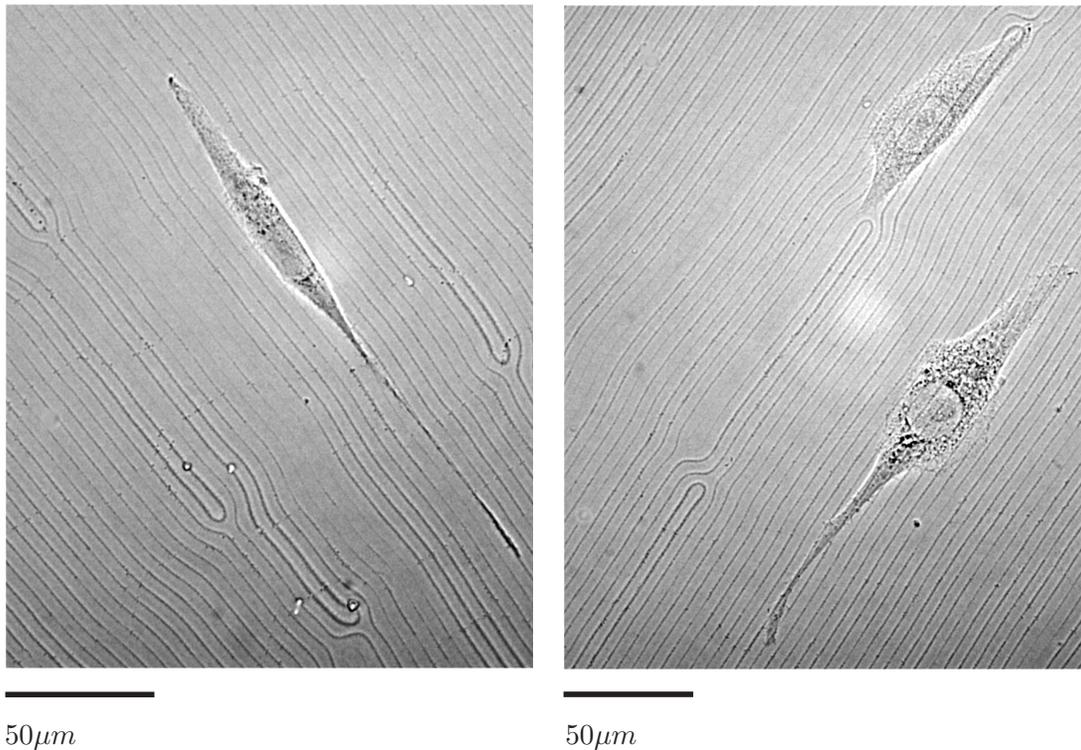
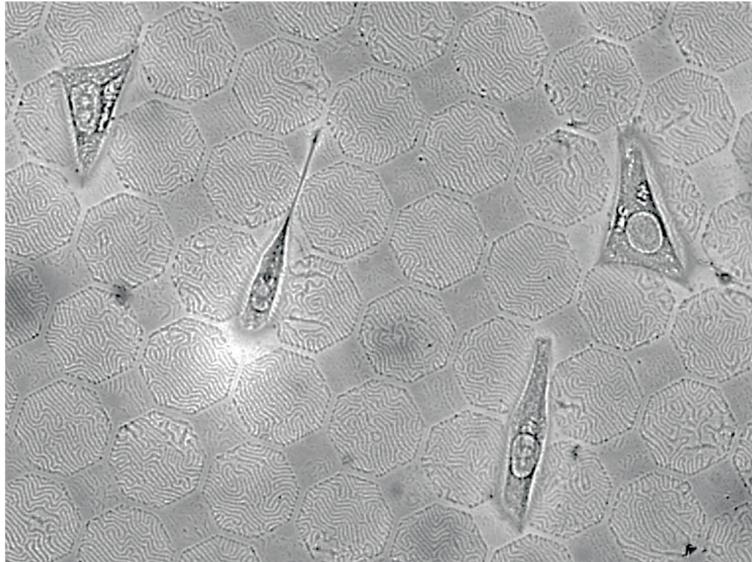


Abbildung 5.20: MG63-Osteoblasten auf einem Granatfilm, der lineare Streifendomänen aufweist, wobei die Domänenwände mit magnetischen Partikeln beschichtet wurden. Die Zellen wachsen anisotrop, parallel zu den Domänen.

gewährleisten. Die Zellen, die nicht in der Dreieckstruktur gewachsen sind, zeigen erneut deutlich, dass sie, wenn möglich, den Kontakt zu den Partikeln vermeiden, wenn sie Fokalkontakte ausbilden wollen. Die quadratischen Strukturen zwischen vier einzelnen Achtecken erlauben größere Flächen zum Anhaften, wie das bei den $2\mu\text{m}$ breiten Aussparungen zwischen zwei benachbarten Achtecken der Fall ist. Genau in diesen Bereichen scheinen die Zellen auch ihre Kontakte zum magnetischen Film herzustellen. Um eine Kraft aufzubauen, werden dann weitere Kontakte in benachbarten oder übernächsten, partikelfreien Quadraten gebildet.

Die Hauptaussage dieses Versuchs besteht sicherlich darin, dass die Zellen keinesfalls die Gebiete mit immobilisierten Teilchen meiden. In Abbildung 5.21 ist deutlich erkennbar, dass sowohl bei den Zellen, die linear gewachsen sind, als auch bei denen mit Dreiecksform, der Zellkörper große Teile der Partikelfläche überdeckt. Nur zum Anhaften und Ausbilden von Fokalkontakten wählen die Zellen Bereiche ohne Teilchen, sofern sie die Möglichkeit zur Wahl haben [131].

Durch Langzeitbeobachtungen konnten Effekte des anisotropen Wachstums auch während der Zellteilung ausgemacht werden. Abbildung 5.22 besteht aus Aufnahmen aus zwei Langzeitvideos (\rightarrow ZellteilungStrukturiert und \rightarrow ZellteilungUnstrukturiert [104]). Dabei beträgt die Abspielrate 10s^{-1} , wobei jeweils alle 20s ein Bild aufgenommen wurde. Der im Folgenden erläuterte Effekt ist anhand der Videos sehr viel deutlicher erkennbar, da es um dynamisches Verhalten



60 μ m

Abbildung 5.21: MG63-Osteoblasten auf einer auf einem Granatfilm gestempelten Achteckstruktur. Die Zellen zeigen gerichtetes Wachstum. Einerseits existieren lineare Ausrichtungen, andererseits dreieckige Zellformen.

geht. In Abbildung 5.22 (a) bis (d) sind Osteoblasten gezeigt, die sich auf einem Granatfilm mit immobilisierten Partikeln befinden. Einer der Osteoblasten kugelt sich im Teil (b) ab, um sich in (c) zu teilen. In Teil (d) sind bereits zwei verschiedene Zellkerne erkennbar und die Tochterzellen beginnen direkt mit der Ausbildung neuer Lamellipodien, um Informationen über die Umgebung zu erhalten und erneut zu adhären. Abbildung 5.22 (e) bis (h) zeigen hingegen einen Osteoblasten auf einer linearen 20 μ m breiten Struktur, wie sie oben besprochen wurde. Wie bereits bekannt, wächst die Zelle entlang der Strukturierungsachse, zu sehen in Teil (e). In Vorbereitung zur Zellteilung kugelt sie sich ab, behält allerdings den Kontakt zur Oberfläche in Form eines „Ausläufers“ entlang der zuvor eingenommenen Wachstumsrichtung bei. Der Osteoblast in den oberen Abbildungsteilen (a) bis (d) behält keine Verbindung mehr zum Substrat, sondern löst sich kugelförmig von der Oberfläche. Vor allem in der Videoaufnahme sowie andeutungsweise in Teil (g), ist erkennbar, dass die Zellteilung bei weitem nicht so geregelt und effizient abläuft wie in Teil (a) bis (d). Während eine Tochterzelle die Verankerung der Mutterzelle benutzt, wird die zweite nach oben getrieben. Sie verliert zwar nicht den Kontakt, benötigt aber geraume Zeit, um sich wieder auf dem Substrat auszubreiten. Der gesamte Zellkörper zeigt während des Vorgangs immer wieder Auswüchse, die unter Umständen dazu dienen, den Kontakt zum Substrat wieder herzustellen, lange Zeit erfolglos. Von der Teilung bis zu den ersten Anzeichen der Adhäsion vergehen 46min. Im Vergleich dazu benötigt die Zelle auf dem unstrukturierten Granat nur 13min bis beide Tochterzellen wieder adhären sind. In Teil (h) ist schwach erkennbar, dass eine Zelle ein Lamellipodium über den Partikeln ausgebildet hat. Durch die extrem dünne Beschaffenheit ist es allerdings schlecht erkennbar. Im Film wird deutlich, dass immer wieder von beiden Zellen

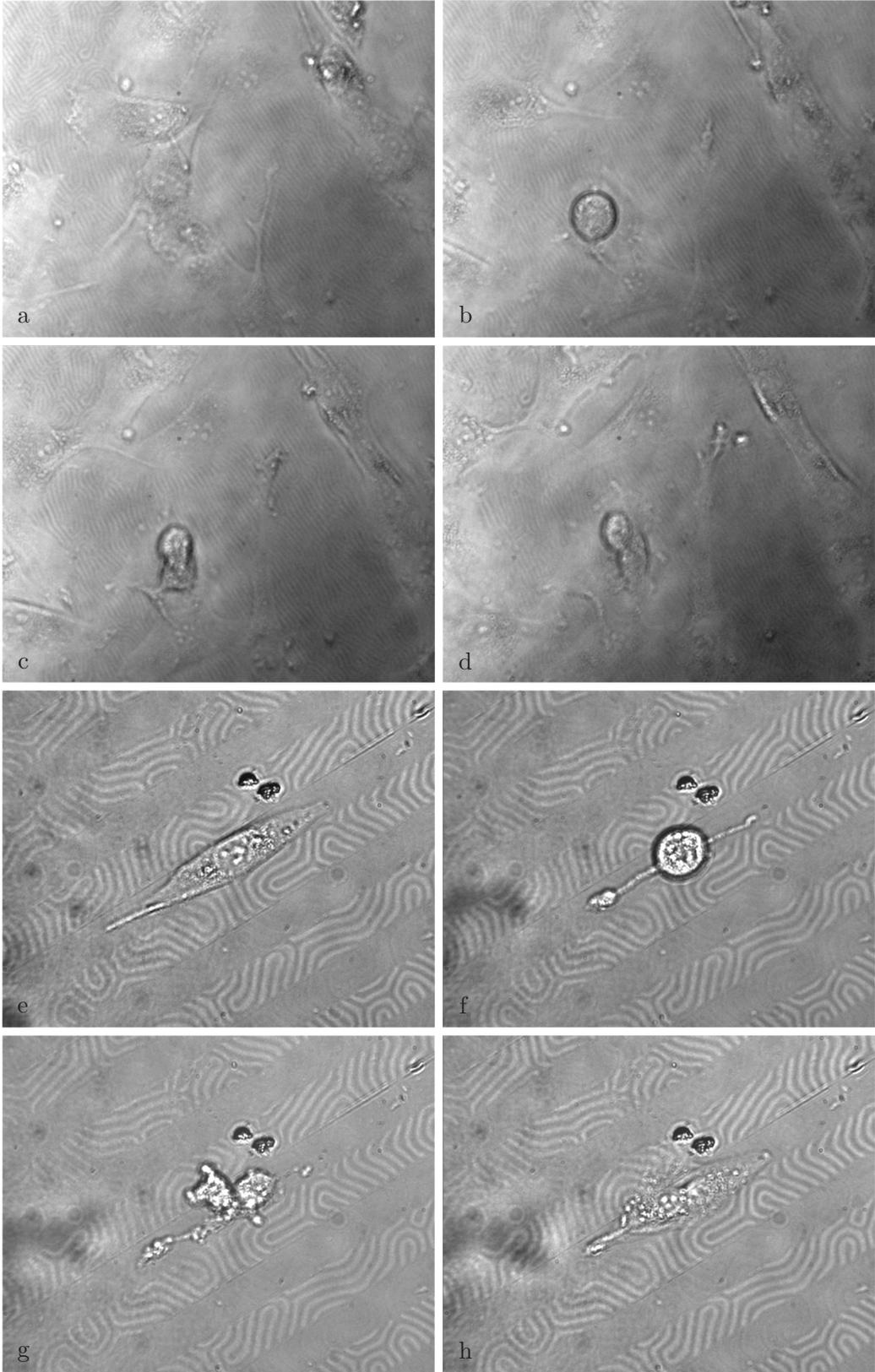


Abbildung 5.22: MG63-Osteoblasten bei der Zellteilung. a) bis d) Granatfilm mit Partikeln ohne Strukturierung. e) bis h) Lineare 20µm-Struktur aus immobilisierten Partikeln.

Ausläufer ausgehen, die auf Grund der hohen Beweglichkeit gut sichtbar sind. Dies geschieht bereits von Zeit zu Zeit bei der Mutterzelle in Teil (e). Die Zellen, sowohl Mutterzelle als auch Tochterzellen, sind als Ganzes betrachtet recht unbeweglich und verbleiben mit dem Hauptanteil ihrer Körper auf den unbeschichteten Linien. Die Lamellipodien sind hingegen extrem schnell auf- und wieder abgebaute Strukturen. Es werden ständig neue Ausstülpungen der Membran vorgenommen, deren Lebenszeit ungefähr $2min$ beträgt. Offensichtlich gelingt es der Zelle nicht, in diesen Bereichen Fokalkontakte auszubilden oder es ist aus verschiedenen Gründen ungünstiger als auf dem glatten Substrat. Dieser Aspekt soll im folgenden Kapitel diskutiert werden. Längere Beobachtungen zeigten, dass schließlich alle Tochterzellen überlebten und wieder Zellteilungen vollzogen.

5.2.3 Zelladhäsion in Bezug auf anisotropes Wachstum

Um die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Beobachtungen zu erklären, kann man sich darauf beschränken, die Adhäsionsfähigkeiten einer Zelle unter Ausschluss biochemischer Prozesse, die auf Grund von Signalstoffen im umgebenden Medium stattfinden, zu betrachten, da die Biokompatibilität der verwendeten Einzelkomponenten und deren Kombination nachgewiesen werden konnte. Dass sich die Beobachtungen des anisotropen Wachstums auf Adhäsionsmechanismen beschränken, ist ebenfalls zweifelsfrei klar. Wie und wo die Zelle Kontakte zum Substrat aufbauen kann, also adhärert, ist für die Zellform bestimmend, die auf unterschiedlichen Oberflächen unterschiedlich ausprägt sein kann, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde. Einflüsse elektrischer oder magnetischer Felder oder anderer Umgebungsparameter können ausgeschlossen werden, da die Versuche immer unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Anisotropes Wachstum trat nur in Fällen auf, in denen die Substrateigenschaften verändert wurden.

5.2.3.1 Allgemeine Betrachtungen zur Zelladhäsion

Dass viele der in Lebewesen vorkommenden Zellen adhäreren, ist eine seit langem bekannte Tatsache. Dennoch konnten die Mechanismen, die auf molekularer Ebene stattfinden, bisher nicht vollständig aufgeklärt werden [41, 56]. In gegenwärtiger Forschung wird Zelladhäsion stark diskutiert. In den letzten zehn Jahren wurden mehr als 43.000 Artikel in diesem Gebiet veröffentlicht². Zunehmend werden die unterschiedlichsten Ansätze physikalisch behandelt, um für die vielfältigen Beobachtungen entsprechende Mechanismen zur Erklärung zu finden.

Die ersten theoretischen Modelle, die versuchten, den Begriff „Zelladhäsion“ mathematisch zu fassen, liegen fast 30 Jahre zurück und bezogen sich auf die Anwendung bekannter physikalischer Prinzipien. Erst nach und nach wurden in die Theorien einzelne Zellbestandteile, wie Aktinfasern oder Integrinmoleküle mit einbezogen. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über historische und aktuell diskutierte Ansätze gegeben werden.

²Abfrage der Datenbanken von PubMed, www.pubmed.gov.

- Die ersten theoretischen Betrachtungen beinhalten die Definition der Adhäsionsenergiedichte γ als die mechanische Arbeit, die benötigt wird, um eine Flächeneinheit der adhärenen Zelloberfläche vom Substrat zu lösen. Dabei werden die beiden Flächen, die der Zelle und die des Substrats, als mittels gleicher Federn verbunden, angesehen. Die Federn repräsentieren die Adhäsionsmoleküle. Die aufgewendete Energie wird dabei in der Deformation der Zellmembran gespeichert [56]. Basis der mathematischen Beschreibung bildet die Young-Gleichung

$$\gamma = \sigma(1 - \cos \theta), \quad (5.1)$$

wobei σ die Oberflächenspannung der Zellmembran und θ der Winkel zwischen der von außen angelegten Zugspannung und der Kontaktfläche ist. σ liegt dabei in Größenordnungen von $fJ/\mu m^2$ [135].

- Im weiteren Verlauf der Forschung wurde zunehmend klar, dass die Einbindung von Informationen über spezielle Adhäsionsdomänen in einer Zellmembran nicht zu umgehen ist. Dabei wird berücksichtigt, dass Zellen bei gegenseitiger Annäherung oder Annäherung an eine Oberfläche elektrostatische oder sterische Abstoßung erfahren. Dies ist einerseits auf negative Membranladungen, andererseits auf das Vorhandensein einer Hülle aus langkettigen Polymeren um die Membran zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wird die adhäsive Wechselwirkung durch spezifische Bindungen bestimmt [136]. Die Adhäsionsenergiedichte γ kann nun in Abhängigkeit der Anzahl der am Adhäsionsprozess beteiligten Bindungen pro Fläche aufgefasst werden als

$$\gamma = \frac{n}{A} k_B T, \quad (5.2)$$

wobei n die Anzahl der am Adhäsionsprozess beteiligten Moleküle angibt, und A die Kontaktfläche (entsprechend zu obigem Modell $[A] = \mu m^2$) darstellt. $k_B T$ entspricht der thermischen Energie. Die Gleichung ist ein Analogon zur inneren Energie eines idealen Gases, bei dem jedes Molekül drei translatorische Freiheitsgrade besitzt und jeder die Hälfte der thermischen Energie trägt. Im genannten Adhäsionssystem ergibt sich aus dem dreidimensionalen Volumen eine zweidimensionale Fläche, wobei die Adhäsionsmoleküle nun nur noch die lateralen Freiheitsgrade besitzen. Mittels dieses Modells erhält man allerdings Adhäsionsenergien, welche weit unter den experimentell bestimmten, die weiter unten angegeben werden, liegen. Dies liegt daran, dass in diesem Modell nur die chemischen Potentiale beachtet sind, nicht aber die erst später experimentell bestimmten Bindungsenergien der beteiligten Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, die energetisch den Hauptteil der Adhäsion darstellen [135].

- Unter Miteinbeziehung der Theorie der Reaktionskinetik, angewendet auf Rezeptor-Ligand-

Wechselwirkungen, konnten erste globale Aussagen zu den Energien, die bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen, getroffen werden. Die Dimension der Bindungstasche liegt bei $1nm$, die des Bindungsmoleküls bei $10nm$. Bei solch kleinen Strukturen spielt die thermische Energie eine große Rolle. Man kann die für die Adhäsion zuständigen Kompartimente als in konstanter Brownscher Bewegung sehen, was neben translatorischen Freiheitsgraden auch Schwingungs-, Richtungs- und Konformationsfreiheitsgrade unter Ausnutzung des Schlüssel-Schloss-Prinzips der Adhäsionsdomänen miteinbezieht [135].

- Allgemein kann man erwarten, dass die weitverbreitete DLVO-Theorie auch auf Zellen anwendbar ist. Diese Theorie behandelt ursprünglich die Wechselwirkung von Kolloidteilchen, wenn sie sich einer Oberfläche in Lösung nähern. Die energetischen Verhältnisse werden dabei mittels der Freien Enthalpie (Gibbssche Energie) berechnet, die sich aus (normalerweise attraktiven) VdW-Kräften und repulsiven, elektrostatischen Kräften zwischen geladenem Teilchen und geladener Oberfläche, ergeben. In physiologisch relevanten Systemen betrachtet man gerade die Annäherung einer Zelle, deren Membran negative Ladungen trägt [136], an eine Oberfläche, die ebenfalls negative Ladungen trägt [137]. Durch das umgebende Kulturmedium, das als Elektrolyt aufgefasst wird, entstehen an der Oberfläche der Zelle und des Substrats elektrische Doppelschichten, die sich bei Annäherung auf Grund von Coulombwechselwirkung abstoßen [138]. Die Freie Enthalpie kann nun mittels der DLVO-Theorie zumindest qualitativ für das System Zelle-Oberfläche in Abhängigkeit der Distanz beider Körper berechnet werden und zeigt einen Kurvenverlauf, der typischerweise zwei Minima besitzt. Das erste Minimum existiert bei direktem Kontakt der Körper und wird als irreversibler Adhäsionsbereich bezeichnet [138], in dem kurzreichweitige Kräfte dominieren. Das zweite Minimum befindet sich im Abstand von $5nm - 20nm$ und ist weitaus weniger stark ausgeprägt als das erste. Somit ist dieser Bereich den reversiblen Adhäsionsprozessen zuzuordnen [138]. Ein Energiegewinn bei Annäherung beider Körper kann ausgehend von der Annahme, dass die Grenzfläche Substrat/Umgebungsmedium (SU) durch die Grenzflächen Zelle/Substrat (ZS) und Zelle/Umgebungsmedium (ZU) ersetzt werden kann, berechnet werden. Adhäsion ist nur möglich, wenn die Änderung der Freien Enthalpie des Gesamtsystems ΔG negative Werte annimmt, so dass

$$\Delta G = G_{ZS} - G_{ZU} - G_{SU} < 0 \quad (5.3)$$

ist [138]. Bei direktem Kontakt von Zelle und Oberfläche kann dies nun unter Verwendung der Oberflächenspannungen zwischen Zelle, Substrat und umgebendem Medium interpretiert werden [41, 137] als

$$\gamma_{ZS} < \gamma_{ZU} + \gamma_{SU}, \quad (5.4)$$

wie in Abbildung 5.23 dargestellt ist.

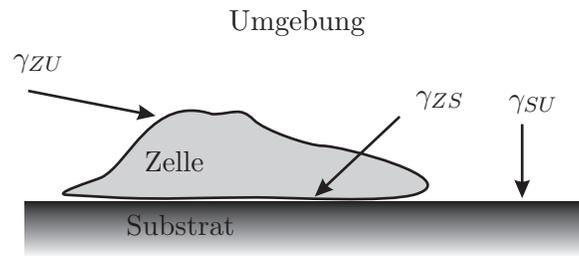


Abbildung 5.23: Schematische Darstellung der Oberflächenenergien γ , die an der Zelladhäsion beteiligt sind.

Experimente zeigten zwar, dass das Verhältnis von Oberflächenenergien tatsächlich die Zelladhäsion beeinflussen kann. Dazu wurden Oberflächen, bevor sie in Kontakt zu Zellen gebracht wurden, mit Wasser-Dimethylsulfoxid (DMSO)-Gemischen unterschiedlicher Konzentration (was unterschiedliche Oberflächenenergien zur Folge hat) beschichtet. Dabei zeigte sich, dass Erythrozyten auf Oberflächen stärker adhären, wenn die Umgebung-Substrat-Oberflächenenergie γ_{SU} unter $64,6 \text{ mJ/m}^2$ liegt, und umgekehrt Adhäsion unterbunden wird, wenn die Umgebung-Substrat-Energie deutlich über diesem Wert liegt [41]. Allerdings war bisher der Nachweis nicht möglich, dass quantitative Voraussagen zu den Adhäsionseigenschaften von Zellen, die auf der Basis wechselwirkender Oberflächen vorausgesagt werden, getroffen werden können [41]. Die Probleme liegen dabei in der Membranstruktur, die auf der Skala einiger Nanometer nicht mehr als flach anzusehen ist. Um die DLVO-Theorie konsequent anwenden zu können, müssen die Oberflächen homogen geladen sein, was bei einer Zelle nicht der Fall ist. Es existieren Bereiche unterschiedlicher Ausdehnung und Länge, die zusätzlich Moleküle mit teilweise geladenen Kopfgruppen enthalten. Als Konsequenz dieser schlecht bestimmbarer Struktur auf Nanometerebene ist es schwierig bis gar unmöglich eine Hamakerkonstante für Zellen anzugeben, die für die Bestimmung der VdW-Kräfte unabdingbar ist [41].

- Ein bis heute angewendetes Modell besteht darin, das Zytoskelett in die mathematische Beschreibung mit aufzunehmen. Diese Theorie wird „Cellular Tensegrity“ genannt [139, 140], was von „tensional integrity“ abgeleitet ist und soviel bedeutet wie Integrität durch Spannung [56]. Im Gegensatz zu den oben genannten Modellen, wird die Adhäsion als ein Vorgang verstanden, der aus der Veränderung und Verlagerung zellulärer Strukturen resultiert. Die Zelle benötigt eine Art intrinsische Spannung oder Vorspannung, um überhaupt lebensfähig zu sein. Dies ist so zu verstehen, dass das Zytoskelett aus teilweise inkompressiblen Anteilen und Verbindungselementen besteht. Dieses Prinzip wird oft in moderner Architektur verwendet, wobei die Elemente selbst untereinander eine Spannung aufbauen, die das Gesamtgebilde stabilisiert. Die Tatsache, dass innerhalb einer Zelle unabhängig davon, ob sie abgekugelt oder adhären ist, immer eine äquivalente Menge an Mikrofilamenten beziehungsweise Aktin vorliegt, deutet darauf hin, dass diese Teile des Zytoskeletts als ver-

bindende Anteile zu sehen sind, die äußeren Spannungen standhalten und als Verbindung zwischen einzelnen inkompressiblen Teilen, den Mikrotubuli, fungieren. Schließlich kommt den Intermediärfilamenten als Teil des Zytoskeletts die Rolle zu, die inneren Kompartimente zu stabilisieren, damit trotz äußerer Einwirkungen beispielsweise die Kernregion nicht deformiert wird. Sofern sich die Zelle in Suspension befindet, zeigt sie eine Kugelform, was den Grundzustand des Systems aus den drei Untereinheiten bildet. Adhäsion ist dann als eine Verankerung der Stabilitätselemente und der darauffolgenden Umorganisation der verbleibenden Elemente zu sehen, um die nötige innere Spannung aufrechtzuerhalten. Dieses Modell kommt der Zellbeschreibung im Hinblick auf Adhäsionsverhalten sehr nahe. Es erklärt, dass sich sämtliche adhärenz Zellen recht ähnlich verhalten, wenn sie auf gleichen Substraten kultiviert werden und sich abkugeln, wenn die Verankerungen zur extrazellulären Matrix enzymatisch gelöst werden. Ebenso erklärt es das weiter unten beschriebene Verhalten der anisotropen Ausrichtung, wenn elastische Substrate, auf denen sich Zellen befinden, gedehnt werden und somit äußere mechanische Kräfte wirken [139, 140].

Was bei diesen Ansätzen nicht berücksichtigt wird, ist das anisotrope Wachstumsverhalten, das Zellen auf manchen Substraten unter bestimmten Kulturbedingungen zeigen, obwohl keine direkten äußeren Krafteinflüsse herrschen. Bei den verwendeten strukturierten Granatfilmen bedeutet das, dass nicht alle Bindungen zwischen Substrat und Adhäsionsmolekülen der Zellmembran energetisch gleich günstig sind und gleichmäßig ausgebildet werden. Anisotropes Wachstum ist eine Folge von örtlich unterschiedlich ausgebildeten Fokalkontakten [46]. Man kommt nicht umhin, die globale Betrachtung der Zelle als physikalische Einheit zu verlassen und die Struktur einzelner Zellteile im Nanometerbereich in die Betrachtungen mit einzubeziehen.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Beeinflussung der Zelladhäsion mittels unterschiedlicher Substrate gegeben werden, die in aktueller Forschung diskutiert wird. Angesichts der Fülle unterschiedlichster Veröffentlichungen kann hier kein vollständiger Überblick gegeben werden, vielmehr beschränkt sich die Auflistung auf Ergebnisse, die in direktem Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen stehen oder zur anschließenden Diskussion herangezogen werden.

Außer Frage steht mittlerweile die Tatsache, dass bei der Zelladhäsion Integrinmoleküle die tragende Rolle spielen. Sie werden zweifelsfrei als Bindeglied zwischen der extrazellulären Matrix und den inneren Kompartimenten, wie Aktinfilamenten oder anderen Teilen des Zytoskeletts, angesehen. Die Integrine befinden sich innerhalb der Zellmembran und werden je nach Bedarf mit Aktinfilamenten verbunden, über die dann mittels Aktin-Myosin-Kontraktionen Kraft beziehungsweise Spannung erzeugt wird [54, 141, 142]. Ob die Integrine dabei als direkte sogenannte Mechanosensoren fungieren, die mechanische Eigenschaften des Substrats „messen“ und das Verbinden mit Aktinen veranlassen oder mechanische Informationen über das Substrat nur indirekt weiterleiten, ist hingegen noch umstritten [48, 55, 56]. Weiter in Frage kommende Mechanosensoren sind beispielsweise Deformationen der Zellmembran oder sensitive Ionenkanäle. Dennoch

wird die weitere Diskussion nur die Ausbildung der Fokalkontakte und die damit verbundenen Integrinfunktionen behandeln, da nicht die Erklärung des Signalwegs entscheidend ist, sondern herauszufinden, warum sich unter manchen Umständen Fokalkontakte erst gar nicht etablieren.

Dass die intrinsische Struktur der Zellmembran und der darin enthaltenen Integrine, eine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten hat, konnte experimentell nachgewiesen werden. Es wurde erkannt, dass die Zelladhäsion durch die Variation des Abstandes möglicher Adhäsionspunkte beeinflusst werden kann [143, 144]. Folglich spielt die Anordnung der Adhäsionspunkte, die in bestimmten Grenzen von der Zelle beeinflusst werden kann, eine tragende Rolle. Es wurden beispielsweise Goldpartikel der Größe $8nm$ mit Molekülen beschichtet, die eine definierte Länge besaßen und mit den Goldpartikeln Mizellen bildeten. Der Kern der Mizellen besteht aus den Goldnanoteilchen, die Moleküle bilden die Hülle. Durch Selbstorganisation wurden diese Mizellen dann auf Glassubstrate aufgebracht, wobei die Moleküle als Abstandhalter von Mizelle zu Mizelle fungierten. Nach Entfernen der Abstandsmoleküle wurde ein gleichmäßiges Muster erreicht, das einen mittleren Abstand der Goldpartikel von entweder $58nm$ oder $108nm$ aufwies. Die Goldpartikel wurden so funktionalisiert, dass Zellen nur auf ihnen haften konnten, jedoch nicht auf dem umliegenden Substrat. Drastische Veränderungen der Zelladhäsion konnten ausgemacht werden. Während die $58nm$ -Struktur weitestgehend akzeptiert wurde, zeigte sich auf der $108nm$ -Struktur wesentlich schlechtere Adhäsion. Die Zellen lösten sich nach anfänglicher Adhäsion wieder ab [144]. Dies deutet darauf hin, dass Zellen sensitiv darauf reagieren, in welchem Abstand sie Integrinkomplexe in der Membran und darauf aufbauende Fokalkontakte ausbauen können. Da die $8nm$ durchmessenden Goldpartikel nur das Anheften eines einzelnen Integrinmoleküls erlauben, lassen sich somit Aussagen treffen, die sich auf einzelne Fokaladhäsionspunkte beziehen [144]. Dies beinhaltet den Vorteil, dass die Zelle keine Möglichkeit hat, auf ihre Umgebung mit der Ausbildung von großen Fokalkomplexen zu reagieren, die viele Integrinmoleküle aufweisen und sich somit anders verhalten. Eine Erklärung auf biochemischer Ebene unter Einbeziehung zellulärer Abläufe ist bis heute noch nicht gefunden [144].

Generell ist in diesem Zusammenhang interessant, dass das Wachstum und die Größe der Fokalkontakte davon abhängt, wie sehr sie benötigt werden [46, 145]. Die Zelle transportiert Proteine an die Stellen, die für einen Kraftaufbau erforderlich sind, um dort aus Fokalkomplexen Fokalkontakte durch Anbinden von Aktin herzustellen. Gegebenenfalls werden die ersten Fokalkontakte, je nachdem wie stark sie benötigt werden, vergrößert. In Richtung der anliegenden Kräfte am Fokalkontakt werden neue Proteine lokalisiert [145]. Ist eine Umgebung für die Zelle ungünstig, um einen Kontakt zu bilden, wird der Fokalkomplex wieder abgebaut. Dabei ist für die weitere Diskussion wichtig, dass der Aufbau eines Fokalkomplexes an sich Energie freisetzt. Die Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Integrinmolekülen, die $600k_B T$ freisetzt, ist als Schlüssel-Schloss-Prinzip zu sehen [142]. Energetisch ungünstig ist für eine Zelle erst das Anbinden von Aktinfilamenten und deren Kontraktion zwecks Kraftaufbau. Somit ist zu verstehen, dass in einer lebenden Zelle permanent hunderte von Fokalkomplexen existieren, aber nur im

geeigneten Fall wirklich zu Fokalkontakten ausgebildet werden. Den Integrinen kommt dabei die Rolle von Sensoren der Zelle für ihre Umwelt zu.

Aus der Literatur ist anisotropes Wachstum seit Jahrzehnten bekannt, lange vor den ersten Entwicklungen der Mikrostrukturierung. Der Begriff „Contact Guidance“, etwa Leiten durch Kontakt, steht für die Beeinflussbarkeit des Wachstums lebender Zellen durch reinen Kontakt mit strukturierten Substraten [146]. Die Versuche, die zu dem Begriff führten, wurden dabei auf Fibrinfasern, die unter mechanische Spannung gesetzt wurden, durchgeführt [147]. Mittlerweile ist allgemein bekannt, dass Zellen auf diverse Strukturen mit anisotropem Wachstum reagieren können. Dabei kann die Beschaffenheit der Struktur unterschiedlicher Natur sein. Die drei großen Bereiche, die unabhängig voneinander zu betrachten wären, sind: **Topographie**, **chemische Strukturierung** und **mechanische Eigenschaften** [148].

Unter Umständen kann argumentiert werden, dass die einzelnen Faktoren nicht immer strikt zu trennen sind. Durch die topographische Strukturierung des Substrats können beispielsweise in unterschiedlichen Bereichen unterschiedliche chemische Informationen entstehen. So kann durch die Anwendung von Plasmaätzen oder Laserstrukturierung das Material an bestimmten Stellen ungewollt modifiziert werden. In solchen Fällen bot es sich an, bestimmte Versuche mit identischen Strukturen, aber unterschiedlichen Substraten durchzuführen. Dabei stellte sich heraus, dass verschiedene Zelltypen extrem einheitlich auf gleiche topographische Gegebenheiten auf verschiedenen Substraten reagieren. Desweiteren ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass Proteine der extrazellulären Matrix in Abhängigkeit des Substrats mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten an scharfen Kanten adsorbieren. Die oft einheitlichen Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Topographie des Substrats nach Strukturierung eine übergeordnete Rolle im Vergleich zu örtlichen Materialveränderungen spielt, sofern keine gewollte, chemische Strukturierung stattgefunden hat [1, 149]. Andere Versuche, die chemische Strukturierung senkrecht zur topographischen nutzten, um herauszufinden, welche Einflüsse die stärkeren sind, zeigten, dass ab einer Tiefe von ungefähr 500nm , die topographische Information den weitaus größeren Einfluss auf anisotropes Zellwachstum besitzt [149]. Selbstverständlich ist dies nur als Richtwert zu sehen und kann je nach Zelltyp und verwendeter chemischer Information variieren. Umgekehrt kann man davon ausgehen, dass bei chemischer Strukturierung die topographischen Kanten, die Moleküle im Nanometerbereich nach Adsorption auf bestimmten Flächen hervorrufen, nicht für Zellverhalten ausschlaggebend sind. Um dies zu bestätigen, wurden Versuche unternommen, in denen Biomoleküle, die die Zelladhäsion fördern, auf Oberflächen in geometrisch kontrollierten Bereichen aufgebracht wurden und die freien Flächen anschließend mit Molekülen gleicher Größe, ohne Einfluss auf die Adhäsion, aufgefüllt wurden [2]. Die Zellen verhielten sich auf beiden Substraten komplett äquivalent. Das bedeutet, dass nicht die Topographie der adsorbierten Moleküle, also die „Kanten“ der Beschichtungsregion, ausschlaggebend für anisotropes Wachstum sind. Mechanische Eigenschaften sind in der Regel, wenn nicht explizit anders präpariert, global zu betrachten. Eine Strukturierung im Mikrometer- oder Nanometerbereich hat auf Größen wie

Elastizitäts- oder Schermodul keine Auswirkungen. Somit sind in den meisten Fällen die Beobachtungen auf Grund von Oberflächenmodifikationen genau einem der drei Bereiche zuzuordnen.

Im Folgenden sollen die wichtigsten experimentellen Befunde bezüglich Zellreaktionen auf Strukturen, nach den eben genannten Bereichen geordnet, aufgeführt werden und in direkten Zusammenhang mit dem in Abschnitt 5.2.2 dargestellten Zellverhalten gebracht werden. Letztlich werden die wichtigsten Ergebnisse im Hinblick auf die verwendeten Granatfilme theoretisch diskutiert. Eine wichtige Erkenntnis im Vergleich der durchgeführten Versuche besteht darin, dass es sowohl für die Fibroblasten als auch für die Osteoblasten keine strukturelle Information der verwendeten Substrate gibt, die ihnen das Adhären auf Bereichen mit Partikeln unmöglich macht. Wäre dem so, müsste ein Unterschied in der Proliferation oder dem Wachstum im Vergleich zu Kontrollzellen aufgetreten sein, wenn die Kultivierung auf Granatfilmen stattfand, die isotrop mit magnetischen Partikeln beschichtet waren. Dort verhielten sich die Zellen aber normal und zeigten flächige Adhäsion. Eine Erklärung kann folglich nur darin bestehen, Faktoren zu identifizieren, auf Grund derer die Adhäsion der Zelle begünstigt beziehungsweise erschwert wird, die auf Unterschieden zwischen den beschichteten Bereichen und dem glatten Granat basieren.

5.2.3.2 Chemisch strukturierte Oberflächen

Chemische Strukturierung ist vor allem unter der Tatsache interessant, dass bei Kontakt einer künstlichen Oberfläche mit proteinhaltigen Lösungen innerhalb weniger Sekunden die Oberfläche durch Proteinadsorption modifiziert wird. Die anschließende Adhäsion von Zellen ist teilweise auch Antwort auf genau diese Modifikationen. Eine Zelle reagiert in erster Linie auf die extrazelluläre Matrix [150]. Der Ansatz, schon im Voraus durch biochemische Strukturierung die Adsorption bestimmter Stoffe zu fördern oder zu verhindern und somit direkten Einfluss auf die Adhäsion der Zellen zu erlangen, ist daher vielversprechend. So werden beispielsweise selbstorganisierte Monolagen zum kontrollierten Anbinden wachstumsfördernder Proteine verwendet [150]. Umgekehrt werden Substanzen wie Poly-Ethylenglycol (PEG) [144] dazu verwendet, die Adsorption weiterer Stoffe an die Oberfläche zu verhindern. Somit können auch Zellen in diesen Bereichen nicht mehr adhären, da dazu das Vorhandensein der extrazellulären Matrix unabdingbar ist. Die geometrische Anordnung dieser in ihrer Funktion gegenläufigen Substanzen machen eine chemische Strukturierung interessant. Damit kann erreicht werden, dass Zellen, stärker als durch rein topographische Einflüsse, gewünschte Formen annehmen, an denen dann weiteres Verhalten studiert wird. Das geometrisch kontrollierte Aufbringen chemischer Substanzen wird sehr häufig durch die Anwendung des Mikrokontaktstempels durchgeführt [1, 94, 151, 152]. Andere Methoden, die aus der topographischen Strukturierung bekannt sind, wie beispielsweise Photoimmobilisation, das bedeutet die gezielte strukturierte, chemische Veränderung einer reaktiven Substanz durch Belichtung mit zwischengeschalteter Maske, werden ebenfalls angewendet [153]. Dadurch, dass manche chemische Stoffe extreme Auswirkungen auf das Verhalten der Zellen haben, sind der unnatürlichen Beeinflussung bis hin zum Erreichen des Zelltods prak-

tisch keine Grenzen gesetzt. So ist es nicht verwunderlich, dass es möglich ist, Zellen zu hundert Prozent Wahrscheinlichkeit entlang linearer Strukturen auszurichten oder sie auf anders geformte Gebiete zu beschränken [150]. Durch die Anwendung reiner topographischer Informationen können derartige Ergebnisse nicht zu solch hohen Wahrscheinlichkeiten erzielt werden. Eine Zelle kann flexibel auf Topographien reagieren, nicht aber auf zellfeindliche oder proteinabweisende Stoffe. Das hat zur Folge, dass durch chemische Strukturierung extrem geordnete Strukturen von lebenden Zellen auf Oberflächen erreicht werden können, mittels derer man gezielt einzelne Zellen untersuchen kann. Wird adhären Zellen die Möglichkeit genommen, sich vollständig auszubreiten, reagieren sie nach einiger Zeit mit Apoptose. Durch das Aufbringen von Proteinen der extrazellulären Matrix auf ein Substrat in immer kleiner werdenden Strukturen zeigte sich, dass die Apoptosewahrscheinlichkeit mit Verkleinerung der Fläche anstieg [154]. Damit eine Zelle überhaupt überlebt und proliferiert, muss ihr zwecks Adhäsion eine gewisse Fläche zur Verfügung stehen. Relativ neue Errungenschaften zeigen eine Kontrolle über Zellverhalten in dem Maße, dass einzelne Zellen auf Buchstaben der Größe $50\mu\text{m}$, die aus gestempeltem Fibronectin, dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix bestehen, adhäreren und sich der Form derart anpassen, dass die Fokalkontakte alle auf den Buchstabenbereichen liegen [42–44]. Im umliegenden Gebiet wurde Zelladhäsion durch Beschichtung mit PEG verhindert. Dabei wurden nicht nur die Zellformen und die damit verbundene lokale Aktinsynthese verändert, sondern ganze Zellabläufe und die Organisation einzelner Kompartimente beeinflusst. Beispielsweise wird die Achse der Zellteilung durch die geometrische Form der Adhäsionsgebiete festgelegt [42]. Chemische Strukturen kleinerer Ausdehnung haben ebenfalls die Fähigkeit, Zellen extrem zu beeinflussen. So zwingen beispielsweise Punkte der Größe $1\mu\text{m}^2$ aus verschiedenen, in bestimmten Abständen angebrachten, Adhäsionsproteinen, Zellen zu rechteckigem oder kreuzförmigem Wachstum [155]. Der Einsatz asymmetrischer Geometrien bei der Strukturierung mittels Mikrokontaktstempels, wie beispielsweise Tropfen oder Dreiecke mit langen Seiten, hat die Auswirkung, dass nicht nur die Form, sondern auch die Bewegungsrichtung der Zellen beeinflusst werden kann [156].

Die Hauptaussage besteht darin, dass Zellen vor allem dann reagieren, wenn sie in Kontakt mit Substanzen kommen, die in den direkten Zellzyklus eingreifen oder Anhaften und Adhäsion unmöglich machen. Sind die Zellen einmal in Kontakt mit der chemischen Struktur, ändert sich ihr Verhalten nicht mehr stark, entweder sie adaptieren die Gegebenheiten oder sterben ab. Zellteilungen sind nur in den Gebieten möglich, die dieses auch erlauben. Im Vergleich dazu ist das vorgestellte System aus Partikeln und Granat gänzlich ohne gebietsbeschränkte chemische Information. Alle Komponenten sind nicht zytotoxisch. Die Partikel selbst sind sogar vollständig biokompatibel, was mit dem Einsatz großflächig beschichteter Granate in Kultur gezeigt werden konnte. Dennoch wachsen die Zellen, sofern sie es sich aussuchen können, in Kontaktvermeidung zu den Teilchen. Zur Strukturherstellung wurden unfunktionalisierte Partikel verwendet. Als Lösungsmittel während der Stempelverfahren diente ausschließlich Wasser, was physiologisch keine hemmende Wirkung auf das Ausbilden der extrazellulären Matrix besitzt. Ebenso konnte

mit AFM-Methoden nachgewiesen werden, dass keine nennenswerten Rückstände von PDMS auf dem Substrat verbleiben. Gerade die hohe Elastizität und das rückstandslose Entfernen des PDMS von glatten Substraten macht den vielfältigen Einsatz von PDMS in biologischen Fragestellungen erst möglich. Schlussfolgernd kommt eine chemische Information als Erklärungsansatz nicht in Frage.

5.2.3.3 Topographische Strukturen

In den meisten Fällen wird in Zellkultur Glas als Substrat verwendet, das eine Rauigkeit von bis zu $50nm$ aufweist. Im Hinblick auf systematische Untersuchungen der Einflüsse ungeordneter Strukturen, also rauer Substrate, wurde bisher wenig Quantitatives unternommen. Man steht vor dem Problem, die Rauigkeit reproduzierbar zu definieren. Größen wie Höhe, Gradient und Korrelationslängen sind schwierig anzugeben, sofern sie das Material universell beschreiben sollen. Qualitativ ist in heutiger Implantattechnologie aber klar, dass raue Substrate (im Nanometerbereich) das Zellwachstum fördern [2]. Dies bezieht sich vor allem auf die Funktion der Zellen. Es wird ausgenutzt, dass beispielsweise Osteoblasten die Produktion von Osteocalzin auf rauen Substraten steigern und die Enzymaktivitäten innerhalb ganzer Zellschichten erhöht werden [157]. Genauere Aussagen lassen sich treffen, wenn man sich auf geordnete Strukturen bezieht. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass die gezielte Nanostrukturierung verschiedener Materialien in aktueller Implantatforschung eingesetzt wird, um die Proliferation von Gewebezellen zu verbessern und somit die Zeit zu verringern, die Zellen benötigen, um ein artifizielles Element im Lebewesen zu integrieren [158].

Es existieren mit moderner Technik viele Möglichkeiten, Substrate topographisch zu strukturieren. Als Beispiele seien Prozesse wie Elektronenstrahlolithographie [149], Photolithographie [2, 153, 159], Laserinterferenzmethoden [160–163], Mikrokontaktstempeln und Verformungsmethoden (Soft Molding) [94, 151, 154, 155], Selbstorganisationsprozesse [164] und Ionenätzen [149] genannt.

Punktförmige oder säulenartige Strukturen mit Durchmessern einiger μm zeigen den Effekt, dass sich Zellen zwar prinzipiell ungerichtet verhalten, also in allen Richtungen wachsen, allerdings tendieren sie eher zu spindelförmigem Wachstum entlang einer Achse [160]. Ungerichtete, eindimensionale Strukturen, die durch Selbstorganisation von Polymeren hergestellt werden und einen mittleren Durchmesser von unter $100nm$ und eine Höhe einiger Nanometer besitzen, hindern Fibroblasten daran, vollständig zu adhären und stören somit die Proliferation und weiteres Wachstum [146, 164].

Die am häufigsten untersuchte Struktur ist zweifelsfrei die der linearen Gräben oder Erhöhungen [2, 149, 159, 163]. Die unterschiedlichsten Materialien, wie Silizium, PDMS, Glas, Gold, Titan und andere [2] wurden strukturiert und in Kontakt mit vielen Zelltypen, die für Adhäsion bekannt sind, getestet, beispielsweise mit Epithelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Leukozyten, Macrophagen und Neuronen [2]. Dabei stellte sich heraus, dass die Reaktionen der Zellen,

sich linear an diesen Strukturen zu orientieren, nicht vom Substrat abhängen, sondern vielmehr vom Aspektverhältnis zwischen Erhöhung und Abstand einzelner Strukturelemente. Von Epithelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten ist bekannt, dass sie auf Höhen größer $70nm$ reagieren [159], Makrophagen sogar auf Strukturen von $44nm$ [2]. Dieses sind gerade Größenordnungen von großen Molekülen. Allerdings ist bis heute nicht klar, wie sich das Aspektverhältnis von Strukturbreite zu Höhe genau auf das Zellverhalten auswirkt [165]. Interessant ist die Betrachtung der Abstände einzelner Linien. Sobald die Entfernung zweier Strukturelemente unter die charakteristische Breite der bereits linear elongierten Zelle fällt, werden die negativen Linien beziehungsweise Aussparungen von den Zellen überspannt. Das bedeutet, dass an den Kanten der positiven Linien Fokalkontakte gebildet werden und dass das synthetisierte Aktinfilament eine Brücke zwischen zwei Kanten herstellt [2]. Sind die Strukturbreiten allerdings größer, wurde festgestellt, dass Zellen vor allem auf den Kanten wachsen. Sie adhäreren also nicht auf einer ebenen Fläche, wie sie das entweder vollständig auf einer Linie oder vollständig in einem Graben zwischen zwei Linien tun könnten [1, 2, 149, 153]. Kleinere lineare Strukturen unter $10\mu m$ Breite und Abstand bis hin zu kleinsten Gräben im Bereich einiger $100nm$ bringen Zellen zu anisotropem Wachstum in Richtung der Längsachse der Struktur. Die Zellen befinden sich dann immer in Spindelform [153, 159–162].

Im Bezug zu den vorgestellten linearen Strukturen auf den Granatfilmen, die mit $20\mu m$ breiter als eine Zelle sind, bestehen gravierende Unterschiede zu den genannten Ergebnissen anderer Gruppen. Die Topographie, die eine Zelle im Kontakt mit den linearen Partikelbereichen vorfindet, lässt sich zwar prinzipiell mit denen vergleichen, die aus einem homogenen Material bestehen und beispielsweise durch Lithographiemethoden mit unterschiedlichen Höhen und Tiefen aufgebracht wurden. Gerade wenn während der Anwendung des mikrofluidischen Ansatzes auf Grund von Partikelüberschuss am Übergang von negativer zu positiver Struktur oder, anders gesagt, an den Kanten des Kontaktbereiches zwischen PDMS und Granatfilm Agglomeration entsteht, lässt sich dies topographisch als Kante interpretieren, die eine Höhe einiger $100nm$ besitzt. Zum Vergleich sei nochmal auf Abbildung 4.33 hingewiesen. Allerdings zeigen Zellen auch bei Nichtvorhandensein dieser Agglomerationen lineare Ausrichtung. Wenn weniger Partikel verwendet wurden, kann der Übergang zwischen Bereichen mit Teilchen und teilchenfreien Gebieten nicht als Kante interpretiert werden. Die topographische Information beschränkt sich dann auf das Vorhandensein einiger Partikel im Abstand von mindestens $5\mu m$, in der Regel sogar mehr, wie beispielsweise deutlich in der AFM-Aufnahme in Abbildung 4.37 einer linearen Struktur mit Bubbledomänen sichtbar ist. Auf keinen Fall kann dort von einer Kante gesprochen werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass als Ursache des anisotropen Wachstums die Topographie nicht in Betracht kommt, ist, dass die Zellen in der Mitte der unbeschichteten Bereiche wachsen. Keine der untersuchten Zellen wuchs in Gebieten mit Partikeln, was der Fall sein müsste, wenn die relevante Information in den Kanten der linearen Strukturierung zu finden wäre. Im Vergleich zu den häufig gemachten Beobachtungen, laut denen Zellen auf Kanten wachsen, also gerade Diskontinuitäten

in der Struktur bevorzugen, ist dies hier gerade nicht der Fall. Dazu kommt die Tatsache, dass das Wachstum der Zellen auf den Achteckstrukturen neben linearem auch zu dreiecksförmigem Wachstum führt. Dabei wächst die Zelle aber nicht entlang vermeintlicher Kanten, sondern mit dem Großteil des Körpers über die Struktur. Dass die Zelle also den topographischen Übergang von einem zum anderen Bereich bemerkt, kann ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Topographieeffekt könnte daher kommen, dass die Partikelstruktur eine gewisse Rauigkeit darstellt und die Zelle das glatte Substrat bezüglich der Adhäsion bevorzugt. Dies steht dabei nicht im Gegensatz dazu, dass raue Substrate in der Implantattechnologie eingesetzt werden, um die höhere Toleranz künstlicher Materialien im Körper zu erzielen. Bei dieser Anwendung zielt die Rauigkeit auf die höhere Aktivität der Zellen ab [157]. Einige Theorien beziehen sich darauf, dass im Speziellen die Adhäsion je nach Rauigkeit des Substrats unterschiedlich viel Energie benötigt. Somit lässt sich festhalten, dass sich topographische Informationen im vorgestellten System nicht auf die Geometrie (Linien, Achteck, etc.) der gestempelten Strukturen beziehen, sondern die immobilisierten Partikel, obwohl sie sehr klein sind, eine Rauigkeit der Oberfläche darstellen.

Es bietet sich an, eine grobe Abschätzung zu treffen, welche Energien für eine Zelle nötig sind, um sich im Gegensatz zu Wachstum auf glattem Substrat an eine Rauigkeit anzupassen. Generell muss eine Zelle Energie aufwenden, wenn sie aus dem abgekugelten Zustand in den adhärenen wechselt. Damit die Integrinmoleküle an die extrazelluläre Matrix angreifen können, muss die Membran lokal im Bereich einiger Nanometer verbogen werden. Dies liegt daran, dass die Membran auf ihrer gesamten äußeren Schicht Abstandsmoleküle besitzt, deren Entfernung zur Kopfgruppe der Integrinrezeptoren ungefähr $10nm$ beträgt [166]. Die Zelle benötigt die Abstandshalter, um im Kontaktfall zu anderen Zellen durch eine sterische Abstoßung beider Zellen eine zu starke Adhäsion zu vermeiden und kontrollierte Anbindung oder erneutes Ablösen zu ermöglichen [167]. Die Energie E , die eine adhärenente Zelle im Gegensatz zur abgekugelten benötigt, lässt sich ausdrücken als [166, 168]

$$E = \frac{1}{2}\kappa \oint \Delta h(x,y)^2 dA + \sigma \Delta O - w c_{RL} A, \quad (5.5)$$

wobei die beiden letzten Terme erstens die Energie darstellen, die durch die Vergrößerung der Zelloberfläche ΔO der Oberflächenspannung σ aufgebracht werden muss und zweitens dem Energiegewinn Rechnung tragen, der durch die Ausbildung spezifischer Rezeptor-Ligand-Bindungen erreicht wird, bei denen pro Bindung der feste Betrag w beigesteuert wird. c_{RL} gibt die Konzentration der Bindungspaare auf der Kontaktfläche A an. Der erste Term beschreibt in Integralform die Energie, die nötig ist, um eine Membran h vom flachem Zustand in einen gekrümmten zu überführen. κ ist dabei die breitenbezogene Biegesteifigkeit (bending rigidity) der Membran [169] und Δh die Krümmung der Membran. Für eine Zellmembran ist $\kappa \simeq 25k_B T$ [167, 169]. Die Effekte, die mit der angegebenen Gleichung im Zusammenhang mit Zelladhäsion beschrieben werden,

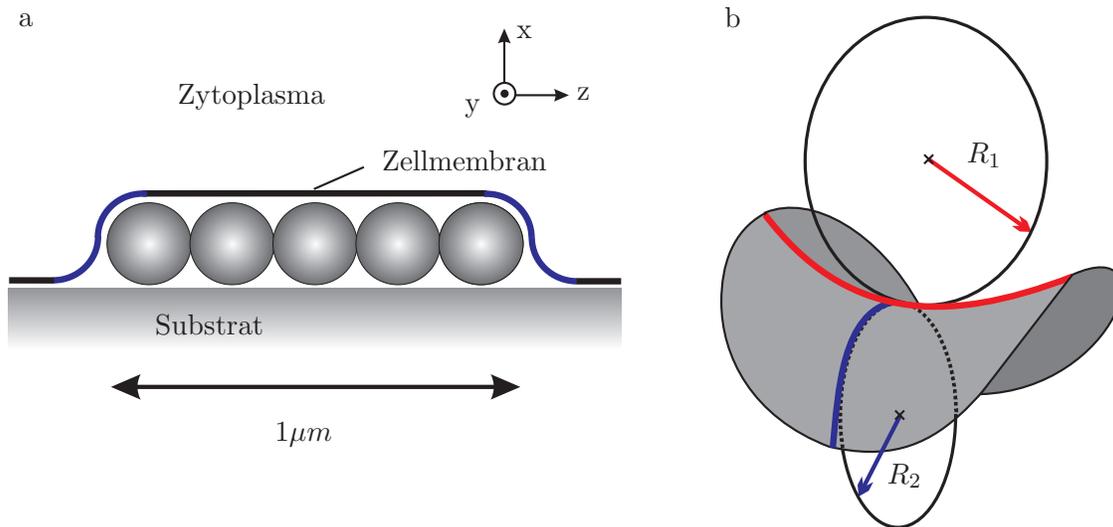


Abbildung 5.24: a) Die Zelle muss den blau dargestellten Bereich verbiegen, um in maximalen Kontakt zur Oberfläche zu gelangen, wenn sie über magnetische Partikel wächst. Die Membranstärke von 4nm kann im Vergleich zu den sonstigen Dimensionen vernachlässigt werden. b) Darstellung der Radien R_1 und R_2 zur Berechnung der Gleichgewichtsenergie einer verbogenen Membran.

haben in Größenordnungen einiger $10\text{nm} - 100\text{nm}$ Relevanz.

Will man nun das anisotrope Adhäsionsverhalten der Zellen auf den mit Linien strukturierten Substraten erklären, muss man sich nicht dafür interessieren wie die Energieverhältnisse einer adhärenen Zelle aussehen. Es genügt, die Unterschiede zwischen dem atomar glatten Substrat und den Bereichen mit den Partikeln zu untersuchen. Das bedeutet, dass die beiden letzten Terme zur Berechnung einer Energiedifferenz nicht weiter berücksichtigt werden müssen. Sie spielen keine Rolle, wenn die Zelle bereits einmal adhärert ist, da man unabhängig vom Substrat erst einmal von einer gleichen Anzahl an Bindungsstellen ausgeht und ebenso von einer gleichbleibenden Adhäsionsfläche.

Die Aufwendung von Deformationsenergie ΔE bei Wachstum über die Partikel ist im Weiteren entscheidend. Wenn man die Krümmung einer beliebigen Fläche betrachtet, so kann der Energieaufwand mittels des Hookschen Gesetzes, das eine proportionale Beziehung zwischen Spannung und Dehnung beinhaltet, wenn die Membrandicke (4nm) viel kleiner als der Krümmungsradius ist, berechnet werden:

$$\Delta E = \frac{1}{2}\kappa \oint \Delta h(x,y)^2 dA = \frac{1}{2}\kappa \oint (\partial_x^2 h + \partial_y^2 h)^2 dA = \frac{1}{2}\kappa \oint \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 dA. \quad (5.6)$$

Dabei sind R_1 und R_2 die prinzipiellen Krümmungsradien der Membran [168, 170, 171]. In Abbildung 5.24 (b) sind diese schematisch dargestellt. Die Struktur, die die Partikel bilden, ist ein Vorteil bei der Berechnung des Integrals. Im Gegensatz zu reiner Rauigkeit stellen sie ein geordnetes Muster bekannter Höhe auf den Domänenwänden dar. In Abbildung 5.24 (a) ist der

Sachverhalt schematisch dargestellt. Die magnetischen Partikel werden als Kugeln des Durchmessers $200nm$ angesehen. Die Deformationen, die an der Zellmembran nötig sind, beschränken sich auf die äußeren Konturen der mit Partikeln beschichteten Bereiche, wie in der Schemazeichnung blau dargestellt ist. Dabei spielt es keine Rolle wie breit die Beschichtung der Partikel ist, relevant sind nur die äußeren Bereiche. Vergleicht man nun beide Abbildungsteile (a) und (b), so ist ersichtlich, dass die Zelle in y -Richtung keine Deformation vornehmen muss. Sie wird als flach angesehen und damit wird R_1 unendlich groß. Der Radius R_2 stellt dabei gerade den Teilchenradius dar und kann somit mit $100nm$ angegeben werden. Wie anhand des blau eingezeichneten Membranbereiches erkennbar ist, ergibt sich pro Partikel ein Oberflächenelement, das der Fläche eines Zylinders des Radius $R_2 = 100nm$ und der Höhe $y = 200nm$ entspricht, wenn man die Energie für gerade eine Partikelbreite berechnen will, so dass

$$\Delta E = \frac{1}{2}\kappa \oint \left(\frac{1}{R_2}\right)^2 dA = \frac{1}{2R_2}\kappa 2\pi y \simeq 160k_B T. \quad (5.7)$$

Wenn man nun den gesamten Energiebedarf einer Zelle grob abschätzen will, den sie aufbringen muss, um mit ihrem gesamten Körper auf den Partikeln zu wachsen, im Gegensatz zum glatten Granat, entsteht die Frage nach der gesamten Krümmungsfläche. Bisher wurde die Energie berechnet, die sich für ein Wachstum über einen Partikel ergibt. Ein Mittelwert für die Fläche einer Zelle, die in direktem Kontakt zum Substrat steht, wird mit $800\mu m^2$ angenommen, was einer Breite von $20\mu m$ und einer Länge von $40\mu m$ entspricht. Diese Fläche bedeutet, dass sich auf einem Granat, der Einfachheit wegen, linearer Streifendomänenstruktur, 4 Beschichtungsgebiete (Domänenwände) im Abstand von $5\mu m$ der Länge $40\mu m$ befinden, beziehungsweise 200 Partikel in Längsrichtung, wenn komplette Beschichtung vorausgesetzt wird. Damit ergibt sich ein Energieaufwand von $1,28 \cdot 10^5 k_B T$, den eine adhärenzte Zelle aufbringen muss, wenn sie in Bereichen mit immobilisierten Partikeln wachsen will [131].

Um ein Gefühl zu besitzen, wie diese Energie im Gegensatz zu anderen Prozessen auf zellulärer Ebene zu sehen ist, bietet es sich an, einen Vergleich zum Hauptenergieträger in physiologischen Prozessen anzustellen. Bei der Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) wird eine Energie von $32,3kJ/mol$ freigesetzt, was pro ATP-Molekül $12,9k_B T$ entspricht. Um die oben genannte Energie von $1,28 \cdot 10^5 k_B T$ herzustellen, muss die Zelle folglich ungefähr 10^4 Moleküle ATP synthetisieren, was je nach Verbrennungsweg die Zersetzung von mindestens 10^3 Zuckermolekülen voraussetzt [172].

Diese Energiebilanz macht deutlich, dass es für Zellen günstiger ist, die Partikelbereiche zu vermeiden, sofern die Möglichkeit dazu besteht. Die obige Rechnung kann also prinzipiell die Beobachtungen erklären, dass Zellen auf Granaten mit $20\mu m$ breiten Linien gerichtet wachsen. Selbst das dreieckförmige Wachstum auf den Achteckstrukturen lässt sich dadurch erklären, dass die Hauptkontakte zum Substrat auf den unbeschichteten Gebieten liegen und die Zelle auf den Bereichen mit Partikeln, die sie teilweise überspannt, nur freie Membranbereiche besitzt, deren

Integrität durch das Aktinskelett gegeben ist und nicht durch Fokalkontakte [44]. Die freien Bereiche müssen sich nicht so stark den Konturen der Partikel anpassen, da es nicht essentiell ist, dass die Zellmembran den direkten Kontakt bildet.

Was sich nicht so offensichtlich erklären lässt, ist das Verhalten auf beschichteten Granatfilmen, die lineare Domänenstrukturen aufweisen, sonst aber unstrukturiert sind, in Abbildung 5.20 gezeigt. Dort wurde ebenfalls ein extrem anisotropes Verhalten festgestellt. In obiger Rechnung ist allerdings kein Richtungsvorzug beachtet, der erklären könnte, warum Wachstum entlang der Partikelbereiche bevorzugt werden könnte. Nach der vorgestellten Energiebilanz sollte es zu der Konfiguration keinen Unterschied machen, in der Zellen beispielsweise senkrecht zu den Domänen wachsen, da es nur auf die Anzahl der Partikel, beziehungsweise die „Länge“ der beschichteten, von der Zelle überspannten Gebiete ankommt.

5.2.3.4 Mechanische Eigenschaften der Substrate

Im Bereich der systematischen Erforschung der Einflüsse mechanischer Eigenschaften von Substraten auf Zellen, wurde bisher recht wenig untersucht. Während bereits viele mögliche, biokompatible Substrate gefunden wurden, sucht man erst seit wenigen Jahren nach Materialien, deren mechanische Eigenschaften im Hinblick auf Zellwachstum verändert werden können. Als die vielversprechendsten zählen Polyacrylamid (PAAM) und PDMS, sowie Alginat- und Agarosegele [148]. Die Vorteile dieser Substanzen bestehen darin, dass ihre Steifigkeit über die Anzahl an Quervernetzungen kontrolliert werden kann. Am weitesten verbreitet ist PAAM auf Grund seiner extrem reproduzierbaren Handhabung. Die Steifigkeit lässt sich strikt durch das Verhältnis Quervernetzer:Monomer erhalten. Der Elastizitätsmodul liegt bei $150\text{Pa} - 40\text{kPa}$. Außerdem bietet es den Vorteil, die Oberfläche chemisch modifizieren zu können, beispielsweise mit unterschiedlichen Estern, die mit den Aminogruppen der Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind, reagieren [148]. Im Gegensatz dazu ist PDMS etwas schwieriger zu handhaben, was darauf zurückzuführen ist, dass es chemisch inert und hydrophob ist und selbst nach Oberflächenaktivierung mittels Sauerstoffplasma nur kurze Zeit Proteinadsorption erlaubt. Eine weitere wichtige Methode beinhaltet die Herstellung von Substraten mit Steifigkeitsgradienten. Dazu eignet sich die Photopolymerisation von Acrylamid. Dabei dient UV-Licht der Polymerisation und zwischengeschaltete Masken unterschiedlicher Transparenz führen zu mehr oder weniger langkettigen Molekülen [148].

Auf den unterschiedlichen Substraten zeigt sich anhand vieler Experimente ein überraschend einheitliches Bild. Unabhängig von der chemischen Modifikation der Oberflächen, lässt sich das Zellverhalten einfach zusammenfassen: **Zellen bewegen sich in Richtung von oder verbleiben auf Gebieten höchster Steifigkeit** [56, 148, 173, 174]. Diese Tatsache nennt man Durotaxis [173]. So zeigen adhärente Zellen auf Oberflächen mit Steifigkeitsgradienten eine zielgerichtete Migration, bis sie die Stelle geringster Elastizität erreicht haben. Im direkten Vergleich von Substanzen konstanter Elastizität wurde beobachtet, dass Zellen auf härteren Substraten am Besten adhären [175], während sie sich auf weicheren weniger bis gar nicht ausbreiten, aller-

dings eine höhere Beweglichkeit aufweisen [56, 148, 173]. Extrem weiche Substrate verhindern die Adhäsion und führen zu Apoptose [148]. Der Vollständigkeit halber sei noch genannt, dass Zellen in äquivalenter Form auf Dehnungen des Substrats reagieren. Werden elastische Materialien, auf denen sich ungerichtet wachsende Zellen befinden, in einer Richtung auseinandergezogen, reagiert die Zelle so, dass sie ihre Körperlängsachse in Richtung der Dehnung dreht und sich dann weniger bewegt [173].

Um diese Beobachtungen physikalisch zu erklären und sie in Zusammenhang mit den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Experimenten zu diskutieren, werden noch einige Fakten über die Beschaffenheit der Fokalkontakte benötigt. Um eine Stabilität im Gewebe zu erhalten, muss jede einzelne Zelle im Kontakt zu Nachbarn oder zum Substrat (benachbartes Gewebe, Knochen etc.) eine gewisse Zugspannung aufbauen. Im Lebewesen spielen vorhandene Spannungen im Körper immer eine wichtige Rolle. Durch sie wird eine kontrollierte Bewegung, Muskelkontraktionen, Stabilität des Skeletts unter Einwirkung äußerer Kräfte überhaupt erst möglich [1]. Kann eine Zelle ihre Adhäsion nicht durchführen, begeht sie den programmierten Zelltod [142, 164]. Es ist nicht möglich, einen absoluten Wert der Spannung anzugeben, da der Kraftaufbau von sehr vielen unterschiedlichen Faktoren abhängt. Experimentell wurde nachgewiesen, dass es einer Zelle möglich ist, eine Kraft im Bereich einiger nN auszuüben [54, 176] und im Umkehrschluss einer Kraft im nN -Bereich standzuhalten [1, 55], wenn einige Fokalkontakte daran beteiligt sind. Diese Daten wurden beispielsweise erhalten, indem Zellen auf Substraten kultiviert wurden, die Säulen bekannter Elastizität aufwiesen. Die Länge und der Abstand der Säulen verhinderten, dass die Zellen das Substrat berührten. Adhäsionspunkte konnten nur an den Köpfen der Säulen gebildet werden [176]. Weitere Untersuchungen fanden auf elastischen Substraten statt, die mit Punkten in gleichen Abständen strukturiert waren. Übt eine Zelle auf einem solchen Substrat eine Kraft aus, so kann durch Messen der Abstandsveränderung zwischen einzelnen Markierungspunkten einerseits die Kraft bestimmt und andererseits lokalisiert werden [54, 55]. Daraus resultiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Fläche A eines gebildeten Fokalkontaktes und der mit ihm verbundenen Kraft F : $A \approx 1\mu m^2 + F \cdot 0,2\mu m^2/nN$, woraus sich auf die Fläche normiert der bereits in Abschnitt 2.2 genannte maximale Wert von $5,5 \pm 2nN/\mu m^2$ ergibt [177]. Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass mit der Annahme einer dichtesten Packung der Integrinmoleküle innerhalb eines Fokalkontaktes (Abstand Integrin-Integrin $\sim 20nm$, maximal $76nm$ [142]), ein Integrinmolekül einer Kraft von einigen pN standhält [54, 55]. Ein experimentell bestimmter Wert für die mittlere Ausdehnung eines Fokalkontaktes beträgt $5,5 \pm 2,9\mu m^2$ auf unstrukturierten Substraten [141]. Der Fokalkomplex, der noch nicht mit Aktinfasern verbunden ist und somit noch keine zellinterne Kraft aufgebaut hat, besitzt eine Fläche von weniger als $1\mu m^2$ [142]. Bei der kleinsten, beteiligten Einheit angefangen, bei dem Myosin-II-Protein, das für die Kontraktilität der Aktinfasern zuständig ist, liegt die maximale Kraft, die aufgebaut werden kann, bei $4 - 5pN$ [176]. Die Kraft, die ein Protein der extrazellulären Matrix, beispielsweise Fibronectin, im Zusammenschluss mit Integrin aushält, bevor die Verbindung reißt, liegt bei $30 - 100pN$ [55].

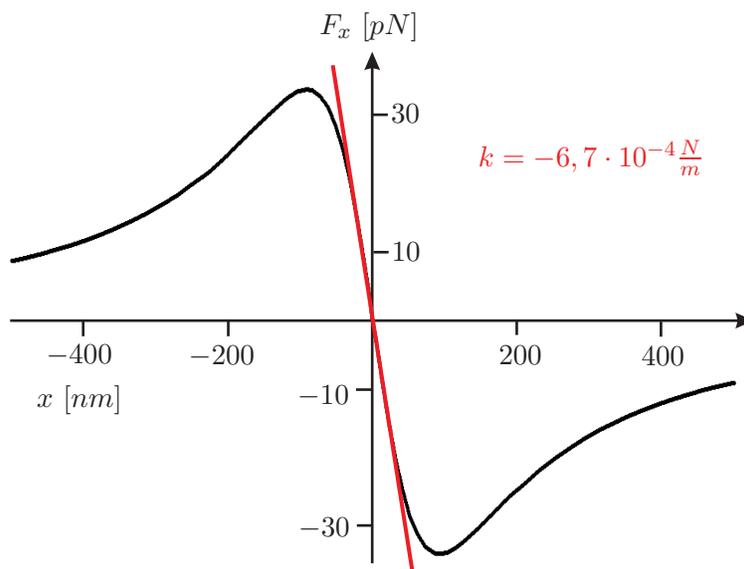


Abbildung 5.25: Die Kraft, die in der Nähe einer Domänenwand in x -Richtung herrscht, kann im Bereich von etwa 50nm Entfernung zur Domänenwand linear angenähert werden. Dabei besitzt die Gerade die Steigung $-k = 6,7 \cdot 10^{-4} \frac{N}{m}$.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zelle zur aktiven Untersuchung der Umgebung (Mechanosensorik) pro Integrinmolekül zwischen 5pN und 10pN Kraft aufwendet [55, 177].

Was aus den genannten Zahlen deutlich wird, ist, dass die Kräfte, die lokal von einer Zelle ausgehen, genau in dem Bereich liegen, der der Kraft mit welcher die Partikel an die Domänenwände angebunden sind, entspricht. In Abschnitt 4.4.2 wurde das Potential, das ein Teilchen unter Einfluss der magnetischen Struktur bemerkt, berechnet, siehe Abbildung 4.23. Um sich bewegen zu können und eine interne Spannung aufzubauen, sucht eine Zelle in ihrer Umgebung ständig nach Verankerungspunkten. Dass ein Fokalkomplex, bevor er zum stabilen Fokalkontakt ausgebaut wird, eine Fläche von etwas weniger als $1\mu\text{m}^2$ besitzt, bedeutet, dass er mit hoher Wahrscheinlichkeit in Kontakt zu den Partikeln kommt, wenn die Zelle in Bereichen des beschichteten Substrats wächst. Deshalb soll die Situation, in der eine Zelle eine Verankerung auf einem Partikel ausbildet, das sich im Potential der Domänenwand befindet, genauer betrachtet werden. Da die Zelle in den Randbereichen sehr dünn ist (im Bereich einiger 100nm) und die Aktinfilamente, die mit dem Fokalkomplex verbunden werden, eine Länge von $10\mu\text{m}$ besitzen können, ist die Annahme gerechtfertigt, dass die Zelle nur in lateraler Richtung ziehen kann, unter Vernachlässigung einer Kraftkomponente in z -Richtung. Weiterhin haften pro Partikel anfänglich nur wenige, unter Umständen sogar nur ein Integrinmolekül an.

In Abbildung 5.25 ist nochmal der Verlauf der Kraft, wie sie in x -Richtung auf einen Partikel wirkt, in Anlehnung an Abbildung 4.25 dargestellt. Im unmittelbaren Bereich des Nulldurchgangs befindet sich das Partikel in einem harmonischen Potential. Es kann eine Gerade der Steigung

$|k| = 6,7 \cdot 10^{-4} \frac{N}{m}$ angegeben werden, die im Zusammenhang $F = -k \cdot x$ gerade als Federkonstante interpretiert wird. Somit kann das Partikel als Feder gesehen werden, die innerhalb einer Auslenkung von $\pm 50nm$ in ihrem elastischen Bereich liegt. Unabhängig von der genauen Anzahl der beteiligten Integrimoleküle wird die Zelle versuchen, eine Kraft aufzubauen. Dabei wird ein gerade entstandener Fokalkontakt anfänglich mit einer Kraft von maximal $10pN$ belastet [55, 177]. Diese Kraft genügt der Zelle, um über Proteinteilfaltungen und Signalwege Informationen über das umliegende Substrat zu sammeln. Unabhängig von intrazellulären, energieaufwändigen Prozessen der Aktinpolymerisation, kostet es zusätzlich Energie, wenn die Zelle gerade auf einem Partikel anhaften will. Sie muss die Arbeit W

$$W = \frac{1}{2} k x^2 = \frac{1}{2k} F^2 \simeq 18 k_B T \quad (5.8)$$

verrichten, um $10pN$ Kraft aufzubauen. Zu dieser Energie kommen zusätzliche Aufwendungen dazu, da die Zelle mehr Aktin polymerisieren und wieder abbauen muss, um das Partikel einige nm von der Domänenwand zu entfernen. Beim Aufbau einer Kraft von $10pN$ an einem Partikel, kann dieser nach Gleichung (5.8) um $15nm$ lateral bewegt werden.

Verlässt man nun die Voraussetzung, dass sich nur ein Partikel auf der Domänenwand befindet, und betrachtet den anderen Grenzfall, dass die Zelle am äußeren Teilchen ihren Fokalkontakt bilden will, so ist anhand Abbildung 5.25 ersichtlich, dass es nicht möglich sein wird, eine Kraft aufzubauen, die für einen stabilen Fokalkontakt ausreicht. Die Teilchen sind in den äußeren Regionen so schwach angebunden, dass sie theoretisch von der Zelle entfernt werden könnten.

Yttrium-Eisen-Granat besitzt einen Elastizitätsmodul von $200GPa$ [178]. Die Zelle besitzt mit ihrer Fähigkeit Kräfte im nN -Bereich aufzubauen, somit keine Möglichkeit, Substratveränderungen in Form von Verbiegung, Stauchung oder Ähnlichem am magnetischen Film hervorzurufen. Das Substrat erscheint in diesem Zusammenhang als absolut fest und unflexibel. Dies bedeutet wiederum, dass die Zelle keinerlei Arbeit leisten muss, um eine Kraft zu etablieren, abgesehen von internen Vorgängen, wie dem Aufbau des Zytoskeletts und der Formierung des Fokalkomplexes.

Im Vergleich beider Substratregionen ist es folglich für die Zelle energetisch ungünstig, einen Fokalkontakt auf einem Partikel zu etablieren, um senkrecht zur Domänenwand eine Kraft aufzubauen [131]. Natürlich wird sie auch Fokalkomplexe in Regionen zwischen einzelnen Domänenwänden errichten. Genausowenig wird sie immer in die Richtung ziehen, in der das Partikel frei ist und nicht von anderen Teilchen durch Reibungskräfte an der Bewegung gehindert wird. Da das Entstehen der Fokalkomplexe aber ein extrem schneller und dynamischer Vorgang ist, der nur einige Sekunden beansprucht und zahlreich stattfindet, wird es die Zelle im Schnitt mehr Energie kosten, genügend Fokalkontakte in geeigneter Richtung und an passender Stelle aufzubauen, um eine hohe Adhäsion in Bereichen, in denen sich alle $5\mu m$ Strukturen aus Partikeln befinden, zu erlangen.

Um prinzipiell zu verdeutlichen, weshalb eine Zelle auf die Strukturen, bestehend sowohl aus Li-

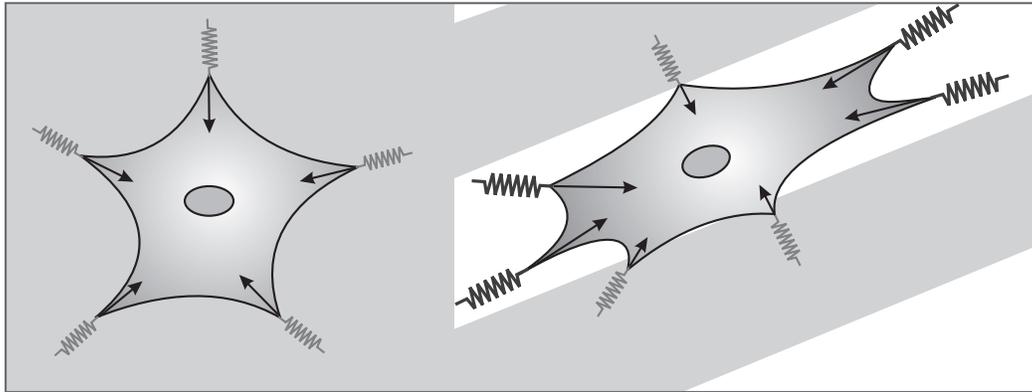


Abbildung 5.26: Darstellung der Zellreaktionen auf elastisches Material. Während das isotrope Material ungerichtetes Wachstum bewirkt, ist es auf den Strukturen für eine Zelle energetisch günstiger, im Bereich der partikelfreien Zonen (weiß) zu bleiben. Bei gleicher Energieaufwendung an jedem Fokalkontakt, kommt es zum anisotropen Wachstum.

nien als auch aus Achtecken, mit anisotropem Wachstum reagiert, kann man umgekehrt vorgehen. Angenommen alle Fokalkontakte werden mit der gleichen Energie versorgt, die zur Kraftausübung benutzt wird [179], dann erreicht die Zelle mittels der Kontakte auf den beweglichen Partikeln, eine weitaus geringere Kraft, als auf dem reinen Granat. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 5.26 schematisch dargestellt. Während eine Zelle auf dem homogenen Bereich, der grau dargestellt ist, wächst, kann sie mit vorhandener Energie isotrop über den Zellkörper verteilt und richtungsunabhängig Kraft aufbauen, die innerhalb der Zelle zu Stabilität führt. Auf dem beispielsweise linear strukturierten Film, entsteht bei gleicher Energie ein Ungleichgewicht der aufgebauten Kräfte, was anisotropes Wachstum zur Folge hat. Auf dem praktisch unendlich festen Granat kann die Zelle maximale Kraft aufbauen, während in Bereichen der Partikel wesentlich kleinere Kräfte entstehen. Dieses führt dazu, dass sich die Zelle anisotrop der Geometrie der Struktur anpasst, da gerade dort, wo hohe Kraft aufgebaut wird, viel Aktin polymerisiert wird, was die Organisation anderer Zellkompartimente mit sich zieht. Das Zytoskelett entsteht folglich anisotrop.

Im Gegensatz zu sehr weichen Materialien, die es keiner Zelle erlauben zu adhären, konnte hier zweifelsfrei gezeigt werden, dass, wenn nötig, ein vollständig adhärenter Status erreicht wird, beispielsweise anhand Abbildung 5.19. Offensichtlich ist es den Zellen möglich, wenn ihnen nicht die Wahl nach energetisch günstigeren Konfigurationen offen steht, nach einer gewissen Zeit ideale Verankerungspunkte zu finden, entweder zwischen einzelnen Domänenwänden oder parallel zu einer Wand, so dass weitere Partikel das Fortbewegen des Teilchens, das zur Adhäsion genutzt wird, verhindern. Das letzte Argument erklärt nun auch das bisher unklare Ergebnis des anisotropen Wachstums auf Granaten, die lineare Domänenstruktur besitzen, sonst aber unstrukturiert sind, wie in Abbildung 5.20 gezeigt. Die Erklärung dieses Verhaltens konnte die oben behandelte Theorie der elastischen Deformation der Zellmembran nicht leisten. Dieser Ansatz liefert eine Erklärung. Würden die Zellen senkrecht zu den mit Partikeln beschichteten linearen Domänen wachsen, würde es unverhältnismäßig oft geschehen, dass die Teilchen gar

keine Adhäsion und somit keinen Kraftaufbau erlauben, da sie lateral bewegt werden können. Senkrecht zur Domänenwand sind die Teilchen beweglich, da es nur wenige bis keine weiteren Partikel als nächste Nachbarn gibt. Das parallele Wachstum liefert hingegen die Möglichkeit, ausschließlich auf „festem Substrat“ zu wachsen. Nahezu alle Partikel können zur Adhäsion genutzt werden, da Nachbarteilchen entlang der Domänenwand eine Beweglichkeit nicht ermöglichen. Dies gewährleistet die beschriebene Beschichtungsmethode, die mit hoher Präzision Partikel in immer gleich breiten Bereichen an die Domänenwände ablagert. Es existieren zwar keine magnetischen Kräfte entlang der Wand (in y -Richtung, wie in Abbildung 4.21 schematisch dargestellt). Allerdings sorgen Reibungskräfte unter der Annahme vollständig beschichteter Domänenwände für die Unbeweglichkeit einzelner Partikel in y -Richtung, da zur Bewegung eines Partikels alle anderen Teilchen, die sich auf der Domänenwand befinden, ebenfalls bewegt werden müssten.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass sich die Zellen auf immobilisierten Partikeln auf Granatfilmen adhärent verhalten können. Energetisch günstiger ist jedoch der glatte, magnetische Film. Die Energie, die durch lokale Membrandeformationen oder um das elastische Verhalten der Partikel auszugleichen, aufgebracht werden muss, ist für Zellen offensichtlich nicht zu hoch, da sie einerseits auf homogen beschichteten Substraten wachsen, andererseits, sobald sie Zell-Zell-Kontakte besitzen, wie in Abbildung 5.18 gezeigt, ebenfalls in Bereichen mit Partikeln adhäreren.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden Materialien und Methoden beschrieben, wie mittels magnetischer Substrate und darauf immobilisierter, magnetischer Teilchen Zellen über Oberflächenwechselwirkung kontaktiert werden können. Das neuartige an der Methode ist einerseits die Möglichkeit der *in-vitro*-Strukturveränderung und andererseits die gezielte Beeinflussung von Zellen mittels geometrisch gut definierten Bereichen, die biofunktionalisiert werden können.

Als Materialien dienen dazu Magnetitpartikel, die, bis auf wenige Ausnahmen, die explizit erwähnt wurden, einen Durchmesser von $\sim 200nm$ besitzen. Das Magnetit liegt in den Teilchen in Form von $\sim 12nm$ durchmessenden Kristalliten vor. Magnetische Untersuchungen zeigten, dass sich die Teilchen bei Raumtemperatur oder in Zellkultur nahezu superparamagnetisch verhalten. Die geringe Hysterese, die in Magnetisierungskurven oberhalb der Blockingtemperatur immer noch auftritt, ist auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Austauschwechselwirkung der Kristallite zurückzuführen. Magnetit verhält sich biokompatibel, ebenso die unterschiedlichen Hüllenmaterialien, die die Kristallite zusammenhalten, wie beispielsweise Polysaccharide. An das Hüllenmaterial können biologisch aktive Moleküle, beispielsweise Wachstumsfaktoren angebunden werden.

Werden diese Partikel auf Glas adsorbiert oder nur dem Kulturmedium beigegeben, werden sie von Zellen internalisiert, was in vorliegender Arbeit im Sinne der Erforschung von Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen verhindert werden sollte. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Partikel hauptsächlich über die caveolae-vermittelte Endozytose aufgenommen werden.

Um diesen aktiven Transportprozess zu unterbinden, sollte das magnetische Material über magnetische Wechselwirkungen mit einem Trägersubstrat fester angebunden werden. Dazu eignen sich schließlich Granatfilme. Diese durch Flüssigphasenepitaxie hergestellten, atomar glatten Dünnschichten sind besonders wegen ihren speziellen magnetischen Eigenschaften interessant. Verwendet wurden ausschließlich senkrecht magnetisierte Filme, die an ihrer Oberfläche Streufelder besitzen, um die Partikel mit einer Kraft von bis zu $100pN$ anzubinden, was numerisch berechnet wurde. Diese Streufelder treten gerade über Domänenwänden auf, also in Bereichen, in denen sich die Magnetisierung benachbarter Domänen um 180° dreht. Die intrinsische Domänenstruktur und damit die Lage der Domänenwände lässt sich durch äußere Magnetfelder stark beeinflussen. So können beispielsweise neben linearen Streifendomänen auch kreisförmige oder

labyrinthartige Strukturen erzeugt werden oder bereits generierte Domänen in ihrer Ausdehnung verändert werden. Diese Beeinflussbarkeit der magnetischen Struktur beinhaltet die Möglichkeit, die Partikelanzahl auf einem Granatfilm zu steuern. In Abhängigkeit des äußeren Felds kann die Domänenwandlänge pro Flächeneinheit variiert werden, so dass unterschiedlich viele Partikel angebunden werden können. Es wurde gezeigt, dass entsprechend der Präparationsmethode im Schnitt fünf Partikel nebeneinander auf einer Wand so fest angebunden werden, dass sie unter normalen Kulturbedingungen nicht mehr abgelöst werden. Partikel, die in wässriger Umgebung auf den magnetischen Film aufgebracht werden, können zeitlich und örtlich der Variation der Domänenkonfiguration folgen, was die Kombination von Granatfilm und magnetischen Teilchen für Zellkultur interessant macht. Die Granatfilme zeigten sich im Bezug auf Zellkultur ebenfalls als biokompatibel.

Zusätzlich zu der homogenen Deposition der Partikel auf dem gesamten magnetischen Material, wurden Methoden entwickelt, die geometrisch und örtlich kontrollierte Partikeldeposition ermöglichen. Mittels eines Stempel- und eines Mikrofluidikansatzes werden Partikel in geometrisch gut definierten Bereichen (beispielsweise in Achteckform) von $10\mu\text{m} - 50\mu\text{m}$ an Domänenwände angebunden. Somit können Bereiche auf einem Granatfilm hergestellt werden, auf denen Partikel magnetisch angebunden werden und andere Bereiche, die partikelfrei sind.

Um nun die mit Partikeln beschichteten Granatfilme in Zellkultur einzusetzen, wurde eine Klimakammer samt Spulen, die die Erzeugung externer Magnetfelder erlauben, konzipiert und mit einem Lichtmikroskop kombiniert. Der computergesteuerte Aufbau erlaubt Zellbeobachtungen und Substratveränderungen über einige Tage. In Zellkultur zeigte sich, dass die magnetische Wechselwirkung zwischen den Partikel und den Domänenwänden stark genug ist, um Endozytose zu verhindern. Unter anderem konnte dies durch Zellquerschnitte mittels FIB gezeigt werden.

Desweiteren zeigte sich, dass Zellen, wenn sich die Möglichkeit bietet, in Bereichen ohne Partikel wachsen (durch Strukturierung mittels der Mikrofluidik- und Stempelmethode). Dies führt bei beispielsweise Linienstrukturen, die aus jeweils $20\mu\text{m}$ abwechselnd mit Partikeln beschichteten Bereichen und partikelfreien Regionen bestehen, zu anisotropem Wachstum entlang der partikelfreien Linien. Es wurde gezeigt, dass die Partikel an sich nicht gemieden werden. Wenn keine Auswahlmöglichkeit besteht, wachsen die Zellen innerhalb weniger Tage konfluent auf beschichteten Regionen. Die Verwendung verschiedener geometrischer Strukturen, vor allem der Achteckstruktur, lieferte den Beweis, dass das anisotrope Wachstum auf Faktoren zurückzuführen ist, die die Zelladhäsion beeinflussen. Beim Vergleich der Bereiche mit immobilisierten Partikeln mit partikelfreien Regionen stellen sich diesbezüglich maßgebliche Unterschiede heraus, die das Zellverhalten erklären. Damit Zelladhäsion mittels der Bildung von Fokalkomplexen und Fokalkontakten unter Verwendung von Integrinen ermöglicht werden kann, muss sich die Zellmembran der Oberfläche bis auf wenige Nanometer annähern. Soll nun ein Fokalkontakt auf einem Partikel ausgebildet werden, so kostet dies Energie, da die Zellmembran lokal verbogen werden muss. Es wurde durch die Berechnung des Gesamtenergiebedarfs zur Adhäsion auf Partikelbereichen

gezeigt, dass es energetisch merklich günstiger für eine Zelle ist, auf dem atomar glatten Granatfilm zu wachsen. Ein zweites Argument geht in eine ähnliche Richtung. Da die verwendeten Osteoblasten und Fibroblasten Zelltypen sind, deren Aufgabe unter anderem darin besteht, dem Gewebe Stabilität zu verleihen, adhären diese Zellen und bauen zu Nachbarzellen oder, falls nicht vorhanden, zu Substraten Kräfte im Bereich einiger $pN - nN$ auf. Um dies zu erreichen, werden Verankerungen zum Substrat gebildet und an diesen Verankerungen Kräfte ausgeübt. Durch die Berechnung des Potentials der Partikel auf den Domänenwänden, zeigte sich, dass eine Zelle durchaus in Größenordnungen Kräfte ausübt, die eine Beweglichkeit der Partikel zur Folge haben. Somit besitzen die Partikelgebiete im Vergleich zum Substrat eine gewisse Elastizität. Folglich benötigt eine Zelle mehr Energie, um eine bestimmte Kraft nach der Adhäsion auf einem Partikel aufzubringen. Im Umkehrschluss erklärt dies das anisotrope Wachstum der Zellen, wenn man davon ausgeht, dass eine Zelle an allen Fokalkontakten die gleiche Energie aufwendet und die Kontakte, die dann nicht zum Kraftaufbau führen, wieder abbaut.

Durch die Möglichkeit der beschriebenen Substrate Zellen in bestimmte Richtungen und in bestimmten Formen wachsen zu lassen, gepaart mit der *in-vitro*-Strukturveränderung ergeben sich vielseitige Anwendungsgebiete zur weiteren Erforschung von Zellverhalten. In gegenwärtiger Zellforschung werden im speziellen mikro- und nanostrukturierte Substrate vor der Verwendung in Kultur hergestellt, ohne Möglichkeit der weiteren Einflussnahme oder Variation der Substrateigenschaften. Zukünftig kann das hier vorgestellte System dazu verwendet werden, durch die Beobachtung der lebenden und sich entwickelnden Zellen, auf Wachstumsveränderungen direkt mit Strukturveränderungen zu reagieren. Zeitlich und örtlich flexible, biochemische Bereiche können hergestellt werden, um Zellverhalten in zeitlichen Intervallen zu beeinflussen.

Außerdem kann das System der kontrollierten Differenzierung dienen. Dazu müssen Wachstumsfaktoren nun nicht mehr direkt an das Kultursubstrat angebunden werden, sondern eine Anbindung an magnetische Partikel genügt, um die unterschiedlichsten Strukturen herstellen zu können. Sofern bei Stammzellen Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren identifiziert werden können, die eine kovalente Kopplung ohne Verluste der biologischen Aktivität erlauben, kann das vorgestellte System dazu verwendet werden, gezielt nach den Einflüssen unterschiedlicher Konzentrationen der Faktoren auf das Zellverhalten zu forschen. Jenseits der Grundlagenforschung ist es denkbar, das System aus magnetischen Partikeln und Substrat in Prozesse zu integrieren, die in hohem Durchsatz Zellen kontrolliert differenzieren können. Denkbar ist dies in Geräten, wie sie innerhalb des CellPROM-Projektes ebenfalls konzipiert wurden.

Abschließend lässt sich sagen, dass neben neuen Einsichten bezüglich der Zelladhäsion die Entwicklung und Charakterisierung eines variablen Systems gezeigt wurde, was in Zukunft der weiteren Erforschung des Verhaltens von Stammzellen dienen kann. Unter Umständen ist es in ferner Zukunft mit diesem oder ähnlichen Ansätzen möglich, neue Erkenntnisse im Bereich des Tissue-Engineering zu erlangen, was ein großer Hoffnungsträger für zukünftige Therapieansätze in der heutigen Medizin darstellt.

Danksagung

Danke ...

...an Herrn Prof. Dr. U. Hartmann, für die dreijährige Betreuung der Arbeit und für viele Stunden fachlicher Diskussionen,

...an meine gesamte Arbeitsgruppe, speziell an Frau Dipl.-Biol. Kirsch, für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen,

...an Herrn Dipl.-Phys. M. Loichen, für eine erfolgreiche Zusammenarbeit und für die Mühe während seiner Diplomarbeit, die nicht zuletzt auch mir zu Gute kam,

...an die Gruppe des Laboratory of Nanobioengineering Research of the Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spanien. Spezieller Dank geht an Herrn Dr. M. Pla-Roca für die wertvollen Tipps im Umgang mit Stempeltechniken,

...an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. T. Johansen, Universität Oslo, Norwegen, für die Bereitstellung der Granatfilme,

...an Herrn Dr. J. Eisenmenger, AG Dr. Prof. Ziemann, Universität Ulm, für die Durchführung der SQUID-Messungen,

...an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Birringer, Universität des Saarlandes, für die Durchführung der VSM- und TEM-Messungen,

...an die Firma AMO, Gesellschaft für Angewandte Mikro- und Optoelektronik mbH Aachen, Deutschland, speziell an Herrn Bolten, Herrn Lerch, Herrn Moormann und Herrn Wahlbrink, für die Bereitstellung der Silizium-Master,

...an meine Familie und meine Freunde, die immer für mich da sind,

...und schließlich an meinen Freund, ohne ihn würde gar nichts funktionieren.

Die Arbeit wurde innerhalb des CellPROM Projektes (NMP4-CT-2004-500039) erstellt, das im 6ten Rahmenprogramm der Europäischen Union gefördert wurde.

Publikationen

Veröffentlichte Fachpublikationen

- J. Issle, M. Pla-Roca, E. Martinez and U. Hartmann, Patterning of magnetic beads on surfaces by PDMS stamps, *Langmuir*, 24 (2008) 888-893.
- J. Issle and U. Hartmann, Methode und Verfahren zur Realisierung räumlich-zeitlich modularer Substrate zur Zellkultivierung, *PCT patent application pending*, No. WO08014782 A2.
- J. Issle and U. Hartmann, Scanning force microscopy on spatially and temporally varying magnetic substrates for cell cultivation, *Journal of Physics: Conference Series*, 61 (2007) 487-491.
- J. Ißle and U. Hartmann, Untersuchung zum Einfluss von Magnetfeldern auf das Wachstum biologischer Zellen, *Magazin Forschung*, Vol. 1 (2006) 40-45.
- J. Ißle, Analyse des Einflusses schwacher, statischer oder niederfrequent wechselnder Magnetfelder auf Fibroblasten, *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, September 2004.
- J. Issle and U. Hartmann, *Effects of weak static or low frequency magnetic fields on human fibroblasts*, DPG Spring Meeting, Berlin, März 2005.
- J. Issle and U. Hartmann, *Application of ferrofluids to develop biocompatible micro-structured surfaces and characterization of cell-surface interactions by scanning probe microscopy*, BioNanoMat, Marl, November 2005.
- J. Issle and U. Hartmann, *Magnetic nanobeads used for the development of structured biocompatible surfaces to induce cell differentiation*, NanoTech, Montreux, November 2005.
- J. Issle and U. Hartmann, *Scanning force microscopy on spatially and temporally varying magnetic substrates for cell cultivation*, ICN+T, Basel, Juli 2006.
- J. Issle, M. Loichen, U. Hartmann, *Spatially and temporally varying magnetic, biocompatible substrates for induction of cell differentiation*, DPG Spring Meeting, Regensburg, März 2007.
- M. Loichen, J. Issle, U. Hartmann, *Magnetic properties of biofunctional dextrane-magnetite composite particles*, DPG Spring Meeting, Regensburg, März 2007.
- J. Issle, U. Hartmann, *Addressing cells via immobilized magnetite particles on magnetically variable substrates*, DPG Spring Meeting, Berlin, Februar 2008.

Tagungsbeiträge

- J. Issle and U. Hartmann, *Application of functionalized magnetic beads to produce structured surfaces for contacting living cells*, 6th Ferrofluid-Workshop, Saarbrücken, Juli 2005 (Auszeichnung „Bestes Poster“).

Literaturverzeichnis

- [1] A. CURTIS and M. RIEHLE. Tissue engineering: the biophysical background. *Phys. Med. Biol.*, **46**, R47-R65 (2001).
- [2] A. CURTIS and C. WILKINSON. Topographical control of cells. *Biomaterials*, **18** (24), 1573-1583 (1997).
- [3] R. HERGT, W. ANDRÄ, C. G. D'AMBLY, I. HILGER, W. A. KAISER, U. RICHTER and H. G. SCHMIDT. Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. *IEEE Trans. Magn.*, **34** (5), 3745-3754 (1998).
- [4] M. KETTERING, J. WINTER, M. ZEISBERGER, S. BREMER-STRECK, H. OEHRING, C. BERGEMANN, C. ALEXIOU, R. HERGT, K. J. HALBHUBER, W. A. KAISER and I. HILGER. Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumor cells: an in vitro study. *Nanotechnology*, **18**, 175101 1-9 (2007).
- [5] J. L. KIRSCHVINK, A. KOBAYASHI-KIRSCHVINK, J. C. DIAZ-RICCI and S. J. KIRSCHVINK. Magnetite in human tissues: A mechanism for the biological effects of weak ELF magnetic fields. *Biol. Suppl.*, **1**, 101-113 (1992).
- [6] J. L. KIRSCHVINK and J. L. GOULD. Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *BioSystems*, **13**, 182-201 (1981).
- [7] J. W. NIELSEN. Magnetic bubble materials. *Ann. Rev. Mater. Sci.*, **9**, 87-121 (1979).
- [8] W. V. SMITH, J. OVERMEYER and B. A. CALHOUN. Microwave resonance in gadolinium-iron garnet crystals. *IBM Journal*, **3** (2), 153-162 (1959).
- [9] M. R. KOBLISCHKA and R. J. WIJNGAARDEN. Magneto-optical investigations of superconductors. *Supercond. Sci. Technol.*, **8**, 199-213 (1995).
- [10] M. KLANK, O. HAGEDORN, M. SHAMONIN and H. DOETSCH. Sensitive magneto-optical sensors for visualization of magnetic fields using garnet films of specific orientations. *J. Appl. Phys.*, **92** (11), 6484-6488 (2002).
- [11] C. HOLTHAUS, I. NISTOR, I. D. MAYERGOYZ and C. KRAFFT. Magnetic-field sensors based in iron garnets with in-plane magnetization. *J. Appl. Phys.*, **99**, 08B308, 1-3 (2006).
- [12] C. S. TSAI, Y. S. LIN, J. SU and S. R. CALCIU. High efficiency guided-wave magneto-optic Bragg cell modulator using nonuniform bias magnetic field. *Appl. Phys. Lett.*, **71** (25), 3715-3717 (1997).
- [13] C. S. TSAI and D. YOUNG. Wideband scanning of a guided-light beam and spectrum analysis using magnetostatic waves in an yttrium iron garnet-gadolinium gallium garnet waveguide. *Appl. Phys. Lett.*, **54** (3), 196-198 (1989).
- [14] J. ISSLE, M. PLA-ROCA, E. MARTINEZ and U. HARTMANN. Patterning of magnetic nanobeads on surfaces by PDMS stamps. *Langmuir*, **24**, 888-893 (2008).
- [15] J. ISSLE and U. HARTMANN. Scanning force microscopy on spatially and temporally varying magnetic substrates for cell cultivation. *J. Phys. Conf. S.*, **61**, 487-491 (2007).
- [16] J. ISSLE and U. HARTMANN. Methode und Verfahren zur Realisierung räumlich-zeitlich modulierter Substrate zur Zellkultivierung. *PCT patent application pending*, No. WO08014782 A2.

- [17] A. HUBERT and R. SCHÄFER. *Magnetic domains*, Springer, Berlin, Deutschland (1998).
- [18] J. D. JACKSON. *Klassische Elektrodynamik*, Walter de Gruyter, Berlin, Deutschland (2002) ed. 3.
- [19] S. BLUNDELL. *Magnetism in condensed matter*, Oxford University Press, New York, USA (2001).
- [20] N. W. ASHCROFT and N. D. MERMIN. *Festkörperphysik*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, Deutschland (2001).
- [21] R. C. O' HANDLEY. *Modern magnetic materials, principles and application*, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA (1999).
- [22] C. KITTEL. Theory of the structure of ferromagnetic domains in films and small particles. *Phys. Rev.*, **70** (11), 965-971 (1946).
- [23] C. KITTEL. Physical theory of ferromagnetic domains. *Rev. Mod. Phys.*, **21** (4), 541-583 (1949).
- [24] G. F. GOYA, T. S. BERQUO and F. C. FONSECA. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, **94** (5), 3520-3528 (2003).
- [25] S. N. KHANNA and S. LINDEROTH. Magnetic behavior of clusters of ferromagnetic transition metals. *Phys. Rev. Lett.*, **67**, 742-745 (1991).
- [26] S. MORUP and E. TRONC. Superparamagnetic relaxation of weakly interacting particles. *Phys. Rev. Lett.*, **72** (20), 3278-3281 (1994).
- [27] R. F. BUTLER and S. K. BANERJEE. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *J. Geophys. Res.*, **80** (29), 4049-4058 (1975).
- [28] C. P. BEAN and J. D. LIVINGSTON. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.*, **30** (4), 120S-129S (1959).
- [29] F. BODKER, S. MORUP and S. LINDEROTH. Surface effects in metallic iron nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, **72** (2), 282-285 (1994).
- [30] A. AHARONI. Relaxation time of superparamagnetic particles with cubic anisotropy. *Phys. Rev. B*, **7** (3), 1103-1107 (1973).
- [31] H. U. WORM. On the superparamagnetic-stable single domain transition for magnetite, and frequency dependence of susceptibility. *Geophys. J. Int.*, **133**, 201-206 (1998).
- [32] J. K. VASSILIOU, V. MEHROTRA, M. W. RUSSELL, E. P. GIANNELIS, R. D. MCMICHAEL, R. D. SHULL and R. F. ZIOLO. Magnetic and optical properties of Fe₂O₃ nanocrystals. *J. Appl. Phys.*, **73**(10), 5109-5116 (1993).
- [33] W. LUO, S. R. NAGEL, T. F. ROSENBAUM and R. E. ROSENSWEIG. Dipole interaction with random anisotropy in a frozen ferrofluid. *Phys. Rev. Lett.*, **67** (19), 2721-2724 (1991).
- [34] P. C. FANNIN and S. W. CHARLES. On the calculation of the Néel relaxation time in uniaxial single-domain ferromagnetic particles. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **27**, 185-188 (1994).
- [35] B. ALBERTS, D. BRAY and K. HOPKIN. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, Wiley-VSH, Weinheim, Deutschland (2005) ed. 3.
- [36] S. A. MOUSAVI, L. MALEROD and R. KJEKEN. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.*, **377**, 1-16 (2004).
- [37] J. REJMAN, V. OBERLE, I. S. ZUHORN and D. HOEKSTRA. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, **377**, 159-169 (2004).
- [38] S. HUTH, J. LAUSIER, S. W. GERSTING, C. RUDOLPH, C. PLANK, U. WELSCH and J. ROSEN-ECKER. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J. Gene Med.*, **6**, 923-936 (2004).
- [39] U. S. HUTH. *Zelluläre Aufnahme und intrazelluläres Schicksal von partikulären Drug Delivery Systemen*, Dissertation, Universität Freiburg, Deutschland (2005).
- [40] H. PLATTNER and J. HENTSCHEL. *Zellbiologie*, Thieme, Stuttgart, Deutschland (1986) ed. 3.
- [41] J. VITTE, M. BENOLIEL, A. PIERRES and P. BONGRAND. Is there a predictable relationship

- between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur. Cells Mater.*, **7**, 52-63 (2004).
- [42] M. THÉRY, V. RACINE, A. PÉPIN, M. PIEL, Y. CHEN, J. B. SIBARITA and M. BORNENS. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biol.*, **7** (10), 947-953 (2005).
- [43] M. THÉRY, A. PÉPIN, E. DRESSAIRE, Y. CHEN and M. BORNENS. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Mot. Cytoskeleton*, **63**, 341-355 (2006).
- [44] M. THÉRY, V. RACINE, M. PIEL, A. PÉPIN, A. DIMITROV, Y. CHEN and J. B. SIBARITA. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *PNAS*, **103** (52), 19771-19776 (2006).
- [45] Z. SCHWARTZ, C. H. LOHMANN, J. OEFFINGER, L. F. BONEWALD, D. D. DEAN and B. D. BOYAN. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv. Dent. Res.*, **13**, 38-47 (1999).
- [46] A. BESSER and S. SAFRAN. Force induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions. *Biophys. J.*, **90**, 3469-3484 (2006).
- [47] R. BRUINSMA, A. BEHRISCH and E. SACKMANN. Adhesive switching of membranes: experiment and theory. *Phys. Rev. E.*, **61** (4), 4253-4267 (2000).
- [48] B. GEIGER and A. BERSHADSKY. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 584-592 (2001).
- [49] D. RIVELINE, E. ZAMIR, N. Q. BALABAN, U. S. SCHWARZ, T. ISHIZAKI, S. NARUMIYA, Z. KAM, B. GEIGER and A. D. BERSHADSKY. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.*, **153**, 1175-1185 (2001).
- [50] E. ZAMIR and B. GEIGER. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.*, **114**, 3583-3590 (2001).
- [51] J. P. XIONG, T. STEHLE, B. DIEFENBACH, A. JOACHIMIAK, S. L. GOODMAN and M. A. ARNAOUT. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$. *Science*, **294**, 339-345 (2001).
- [52] R. O. HYNES. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25 (1992).
- [53] L. J. KORNBERG, H. S. EARP, C. E. TURNER, C. PROCKOP and R. L. JULIANO. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of β -1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8392-8396 (1991).
- [54] U. S. SCHWARZ, N. Q. BALABAN, D. RIVELINE, A. BERSHADSKY, B. GEIGER and S. A. SAFRAN. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. *Biophys. J.*, **83**, 1380-1394 (2002).
- [55] H. HUANG, R. D. KAMM and R. T. LEE. Cell mechanics and mechanotransduction: pathway, probes, and physiology. *Am. J. Cell Physiol.*, **287**, C1-C11 (2004).
- [56] C. ZHU, G. BAO and N. WANG. Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 189-226 (2000).
- [57] G. A. NOVAK and G. V. GIBBS. The crystal chemistry of the silicate garnets. *Am. Mineral.*, **56**, 791-825 (1971).
- [58] D. T. GRIFFEN, D. M. HATCH, W. R. PHILLIPS and S. KULAKSIZ. Crystal chemistry and symmetry of a birefringent tetragonal pyrospite₇₅-grandite₂₅ garnet. *Am. Mineral.*, **77**, 399-406 (1992).
- [59] E. ORLICH. *Absorptionsmessungen an Erbium-Aluminium-, Erbium-Gallium und Erbium-Eisen-Granat*, Dissertation, Fakultät für Mathematik und Physik, Technische Hochschule Darmstadt, Deutschland (1969).
- [60] L. E. HELSETH, A. G. SOLOVYEV, R. W. HANSEN, E. I. IL'YASHENKO, M. BAZILJEVICH and T.

- H. JOHANSEN. Faraday rotation and sensitivity of (100) bismuth-substituted ferrite garnet films. *Phys. Rev. B*, **66**, 064405 1-5 (2002).
- [61] K. SHINIGAVA. *Magneto-optics, Ed. S. Sugano and N. Kojima*, Springer, Berlin, Deutschland (2000).
- [62] D. TOMÁS, P. NOVÁK and H. STEPÁNKOVÁ. Hyperfine fields and superexchange in yttrium-iron garnet. *J. Magn. Magn. Mater.*, **140-144** (3), 2133-2134 (1995).
- [63] J. W. ANTHONY, R. A. BIDEAUX, K. W. BLADH and M. C. NICHOLS. *Handbook of Mineralogy*, Mineral Data Publishing, Tucson, Arizona, USA (1997), ed. 3.
- [64] W. KLEBER. *Einführung in die Kristallographie*, VEB Verlag Technik, Berlin, DDR (1963).
- [65] M. A. GILLES. *Ferromagnetic Materials, Ed. E. P. Wohlfahrt, vol. 2, ch. 1*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Niederlande (1980).
- [66] A. H. ESCHENFELDER. *Ferromagnetic Materials, Ed. E. P. Wohlfahrt, vol. 2, ch. 5*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Niederlande (1980).
- [67] P. M. VETOSHKO, V. B. VOLKOVY, V. N. ZALOGIN and A. Y. TOPOROV. Measuring low alternating magnetic fields by means of Bi-containing rare-earth ferrite-garnet films with planar anisotropy. *J. Appl. Phys.*, **70** (10), 6298-6300 (1991).
- [68] M. MCGLASHAN-POWELL, R. WOLFE, J. F. DILLON, JR. and V. J. FRATELLO. Magneto-optic waveguide hysteresis loops of planar magnetic garnet films. *J. Appl. Phys.*, **66** (7), 3342-3347 (1989).
- [69] M. SHAMONIN, T. BEUKER, P. ROSEN, M. KLANK, O. HAGEDORN and H. DOTSCH. Feasibility of magneto-optic flaw visualization using thin garnet films. *NDTE International*, **33**, 547-553 (2000).
- [70] P. HANSEN and K. WITTER. Growth-induced uniaxial anisotropy of bismuth-substituted iron-garnet films. *J. Appl. Phys.*, **58** (1), 454-459 (1985).
- [71] P. HANSEN, K. WITTER and W. TOLKSDORF. Magnetic and magneto-optic properties of bismuth- and aluminum-substituted iron garnet films. *J. Appl. Phys.*, **55** (4), 1052-1061 (1984).
- [72] A. L. OLSON, H. N. OREDSON and E. J. TOROK. Calculation of the structure of Néel, Bloch, and intermediate walls and the influence of their stray fields on bitter powder patterns. *J. Appl. Phys.*, **38** (3), 1349-1351 (1967).
- [73] E. J. TOROK, A. L. OLSON and H. N. OREDSON. Transition between Bloch and Néel walls. *J. Appl. Phys.*, **36** (4), 1394-1399 (1965).
- [74] J. M. D. COEY, I. V. SHVETS, R. WIESENDANGER and H. J. GÜNTHERODT. Charge freezing and surface anisotropy on magnetite (100). *J. Appl. Phys.*, **73** (10), 6742-6744 (1993).
- [75] R. M. CORNELL and U. SCHWERTMANN. *The iron oxides*, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland (2003).
- [76] M. MA, Y. WU, J. ZHOU, Y. SUN, Y. ZHANG and N. GU. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic fields. *J. Magn. Magn. Mater.*, **168**, 33-39 (2004).
- [77] A. HOSSEINPOUR and H. SADEGHI. Anisotropy variation with order-disorder transition in magnetite. *Phys. Stat. Sol. (b)*, **227** (2), 563-567 (2001).
- [78] H. T. JENG and G. Y. GUO. First-principles investigation of the structure and magnetocrystalline anisotropy in strained magnetite Fe₃O₄. *Phys. Rev. B*, **65**, 094429-1-094429-9 (2002).
- [79] R. WIESENDANGER. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy - Methods and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, England (1994).
- [80] S. N. MAGONOV and M.-H. WHANGBO. *Surface analysis with STM and AFM*, VCH, Weinheim, Deutschland (1996).
- [81] U. HARTMANN. Magnetic force microscopy. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **29**, 53-87 (1999).
- [82] J. N. ISRAELACHVILLI. *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, London, England (1992).

- [83] U. HARTMANN. *Scanning Tunneling Microscopy III, Ed. R. Wiesendanger and H. J. Güntherodt, ch. 12*, Springer, Heidelberg, Deutschland (1993).
- [84] C. ARGENTO and R. H. FRENCH. Parametric tip model and force-distance relation for Hamaker constant determination from atomic force microscopy. *J. Appl. Phys.*, **80** (11), 6081-6090 (1996).
- [85] U. HARTMANN. Magnetic force microscopy: Some remarks from the micromagnetic point of view. *J. Appl. Phys.*, **64** (3), 1561-1564 (1988).
- [86] H. J. HUG, B. STIEFEL, P. J. A. VAN SCHENDEL, A. MOSER, R. HOFER, S. MARTIN and H. J. GÜNTHERODT. Quantitative magnetic force microscopy on perpendicularly magnetized samples. *J. Appl. Phys.*, **83** (11), 5609-5620 (1998).
- [87] S. FONER. Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Rev. Sci. Instr.*, **30** (7), 548-557 (1959).
- [88] S. R. HOON. An inexpensive, sensitive vibrating sample magnetometer. *Eur. J. Phys.*, **4**, 61-67 (1983).
- [89] J. CLARKE. *SQUID sensors: fundamentals, fabrication and applications, NATO ASI Series E, Ed. H. Weinstock, vol. 329, ch. 1*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande (1996).
- [90] W. BUCKEL. *Supraleitung, Grundlagen und Anwendungen*, Physik Verlag, Weinheim, Deutschland (1984).
- [91] C. A. FOWLER and E. M. FRYER. Magnetic domains in thin films by the faraday effect. *Phys. Rev.*, **104**, 552-553 (1956).
- [92] P. N. ARGYRES. Theory of the faraday and kerr effects in ferromagnetics. *Phys. Rev.*, **97** (2), 334-345 (1955).
- [93] H. C. BURCK. *Histologische Technik*, Thieme, Stuttgart, Deutschland (2002).
- [94] Y. XIA and G. M. WHITESIDES. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 550-575 (1998).
- [95] Y. S. KIM, K. Y. SUH and H. H. LEE. Fabrication of three-dimensional microstructures by soft molding. *Appl. Phys. Lett.*, **79** (14), 2285-2287 (2001).
- [96] D. I. ROZKIEWICZ, Y. KRAAN, M. W. T. WERTEN, F. A. DE WOLF, V. SUBRAMANIAM, B. J. RAVOO and D. N. REINHOUDT. Covalent microcontact printing of proteins for cell patterning. *Chem. Eur. J.*, **12**, 6290-6297 (2006).
- [97] A. BERNARD, J. P. RENAULT, B. MICHEL, H. R. BOSSHARD and E. DELAMARCHE. Microcontact printing of proteins. *Adv. Mater.*, **12** (14), 1067-1070 (2000).
- [98] R. S. KANE, S. TAKAYAMA, E. OSTUNI, D. E. INGBER and G. M. WHITESIDES. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, **20**, 2363-2376 (1999).
- [99] T. W. ODOM, J. LOVE, D. B. WOLFE, K. E. PAUL and G. M. WHITESIDES. Improved pattern transfer in soft lithography using composite stamps. *Langmuir*, **18**, 5314-5320 (2002).
- [100] K. G. SHARP, G. S. BLACKMAN, N. J. GLASSMAKER, A. JAGOTA and C. Y. HUI. Effect of stamp deformation on the quality of microcontact printing: theory and experiment. *Langmuir*, **20**, 6430-6438 (2004).
- [101] H. KANG, J. LEE, J. PARK and H. H. LEE. An improved method of preparing composite poly(dimethylsiloxane) moulds. *Nanotechnology*, **17**, 197-200 (2006).
- [102] M. LOICHEN. *Charakterisierung von YBiFeGaO-Granatfilmen und magnetischen Magnetit-Komposit-Partikeln*, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Deutschland (2007).
- [103] C. KOOY and U. ENZ. Experimental and theoretical study of the domain configuration in thin layers of BaFe₁₂O₁₉. *Phil. Res. Repts.*, **15**, 7-29 (1960).
- [104] www.uni-saarland.de/fak7/hartmann/Issle/Filme.htm .

- [105] A. HUBERT, A. P. MALZEMOFF and J.C. DELUCA. Effect of cubic, tilted uniaxial, and orthorhombic anisotropies on homogeneous nucleation in a garnet bubble film. *J. Appl. Phys.*, **45**, 3562-3571 (1974).
- [106] A. H. LU, E. L. SALABAS and F. SCHÜTH. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1222-1244 (2007).
- [107] Ö. ÖTZDEMİR, D. J. DUNLOP and B. M. MOSKOWITZ. Changes in remanence, coercivity and domain state at low temperature in magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **194**, 343-358 (2002).
- [108] T. O. PAINE, L. I. MENDELSON and F. E. LUBORSKY. Effect of shape anisotropy on the coercive force of elongated single-magnetic-domain iron particles. *Phys. Rev.*, **100** (4), 1055-1059 (1955).
- [109] J. ISSLE, M. LOICHEN and U. HARTMANN. Magnetic properties of biocompatible multicore magnetite particles. *In Vorbereitung*.
- [110] R. D. AMBASHTA, S. M. YUSUF, M. D. MUKADAM, S. SINGH, P. K. WATTAL and D. BAHADUR. Physical and chemical properties of nanoscale magnetite-based solvent extractant. *J. Magn. Magn. Mater.*, **293**, 8-14 (2005).
- [111] A. O. IVANOV and O. B. KUZNETSOVA. Magnetic properties of dense ferrofluids: An influence of interparticle correlations. *Phys. Rev. B*, **64**, 041405.1-7 (2001).
- [112] B. HÜKE and M. LÜCKE. Magnetic properties of colloidal suspensions of interacting magnetic particles. *Rep. Prog. Phys.*, **67**, 1731-1768 (2004).
- [113] E. A. VIRDEN and K. OGRADY. The temperature dependence of magnetization in ferrofluids. *J. Appl. Phys.*, **99**, 08S106.1-3 (2006).
- [114] O. A. VALENZUELA, J. M. AQUINO, R. B. GALINDO, O. R. FERNANDEZ, P. C. FANNIN and A. T. GIANNITSIS. Synthesis and complex magnetic susceptibility characterization of magnetic fluids in different liquid carriers. *J. Appl. Phys.*, **97**, 10Q914.1-3 (2005).
- [115] F. HEIDER, A. ZITZELSBERGER and K. FABIAN. Magnetic susceptibility and remanent coercive force in grown magnetite crystals from 0.1 μ m to 6nm. *Phys. Earth Plan. Inter.*, **93**, 239-256 (1996).
- [116] J. D. WEI, I. KNITTEL, U. HARTMANN, Y. ZHOU, S. MURPHY, I. V. SHVETS and F. T. PARKER. Influence of the antiphase domain distribution on the magnetic structure of magnetite thin films. *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 122517-1 - 122517-3 (2006).
- [117] J. L. VIOTA, J. D. G. DURAN, F. GONZALEZ-CABALLERO and A. V. DELGADO. Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.*, **314**, 80-86 (2007).
- [118] C. P. HUNT, B. M. MOSKOWITZ and S. K. BANERJEE. Magnetic properties of rocks and minerals. *Rock physics and phase relations: a handbook of physical constants*, American Geophysical Union, USA (1995).
- [119] P. C. FANNIN, B. K. P. SCAIFE and S. W. CHARLES. An experimental study of the magnetic susceptibility of colloidal suspensions of magnetite as a function of particle volume fraction. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **23**, 1711-1714 (1990).
- [120] J. MASSAGUÉ and Y. G. CHEN. Controlling TGF- β signaling. *Genes & Dev.*, **14**, 627-644 (2000).
- [121] S. L. DALLAS, S. PARK-SNYDER, K. MIYAZONO, D. TWARDZIK, G. R. MUNDY and L. F. BONEWALD. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor β (TGF β) complexes in osteoblast-like cell lines. *J. Biol. Chem.*, **269** (9), 6815-6822 (1994).
- [122] J. ISSLE and U. HARTMANN. Magnetic immobilization of biochemically functionalized particles. *In Vorbereitung*.
- [123] C. C. BERRY and A. S. G. CURTIS. Functionalization of magnetite nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, R198-R206 (2003).
- [124] S. RUDERSHAUSEN, C. GRÜTTNER, M. FRANK, J. TELLER and F. WESTPHAL. Multifunctional superparamagnetic nanoparticles for life science applications. *Eur. Cells Mater.*, **3** (2), 81-83 (2002).

- [125] J. DOBSON. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Therapy*, **13**, 283-287 (2006).
- [126] A. ITO, M. SHINKAI, H. HONDA and T. KOBAYASHI. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, **100** (1), 1-11 (2005).
- [127] J. S. KIM, T. J. YOON, K. N. YU, M. S. NOH, M. WOO, B. G. KIM, K. H. LEE, B. H. SOHN, S. B. PARK, J. K. LEE and M. H. CHO. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J. Vet. Sci.*, **7** (4), 321-326 (2006).
- [128] S. HUTH. *Analyse des Mechanismus der zellulären Aufnahme und des Einflusses zytoplasmatischer Bestandteile auf die Dissoziation DNA-beladener Nanopartikel*, Dissertation, LMUniversität München (2005).
- [129] A. DURRBACH, D. LOUWARD and E. COUDRIER. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J. Cell Sci.*, **109**, 457-465 (1996).
- [130] J. WON, M. KIM, Y. W. YI, Y. H. KIM, N. JUNG and T. K. KIM. A magnetic nanoprobe technology for detecting molecular interactions in live cells. *Science*, **309**, 121-125 (2005).
- [131] J. ISSLE and U. HARTMANN. Interactions between cells and magnetic composite particles on magnetic substrates. *In Vorbereitung*.
- [132] M. R. GRIMSDOTTIR, A. HENSTENPETTERSEN and A. KULLMANN. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. *Eur. J. Orthod.*, **14**, 47-53 (1992).
- [133] F. T. HONG. Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. *BioSystems*, **36**, 187-229 (1995).
- [134] H. BERG. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. *Bioelec. Bioenerg.*, **48**, 355-360 (1999).
- [135] C. ZHU. Kinetics and mechanics of cell adhesion. *J. Biomech.*, **33**, 23-33 (2000).
- [136] G. I. BELL, M. DEMBO and P. BONGRAND. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.*, **45**, 1051-1064 (1984).
- [137] M. C. M. VAN LOOSDRECHT, J. LYKLEMA, W. NORDE and A. J. B. ZEHNDER. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.*, **17**, 1-15 (1989).
- [138] M. C. M. VAN LOOSDRECHT and A. J. B. ZEHNDER. Energetics of bacterial adhesion. *Experientia*, **46**, 817-822 (1990).
- [139] D. E. INGBER. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, **104** (3), 613-627 (1993).
- [140] D. E. INGBER. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell. Sci.*, **116**, 1397-1408 (2003).
- [141] M. ARNOLD, E. A. CAVALCANTI-ADAM, R. GLASS, J. BLÜMMEL, W. ECK, M. KANTLEHNER, H. KESSLER and J. P. SPATZ. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chem Phys Chem*, **5**, 383-388 (2004).
- [142] A. NICOLAS and S. A. SAFRAN. Limitation of cell adhesion by the elasticity of the extracellular matrix. *Biophys. J.*, **91**, 61-73 (2006).
- [143] J. P. SPATZ. *Nanobiotechnology*, Ed. C. M. Niemeyer and C. A. Mirkin, ch. 4, Wiley-VCH (2004).
- [144] E. A. CAVALCANTI-ADAM, T. VOLBERG, A. MICOULET, H. KESSLER, B. GEIGER and J. P. SPATZ. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.*, **92**, 2964-2974 (2007).
- [145] T. SHEMESH, B. GEIGER, A. D. BERSHADSKY and M. M. KOZLOV. Focal adhesions as mechanosensors: a physical mechanism. *PNAS*, **102** (35), 12383-12388 (2005).
- [146] M. J. DALBY, M. O. RIEHLE, D. S. SUTHERLAND, H. AGHELI and A. S. G. CURTIS. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts - methods and perspectives. *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 159-169 (2004).

- [147] P. WEISS and B. GARBER. Shape and movement of mesenchyme cells as functions of the physical structure of the medium. *PNAS*, **38** (3), 264-280 (1952).
- [148] J. Y. WONG, J. B. LEACH and X. Q. BROWN. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell-biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. *Surf. Sci.*, **570**, 119-133 (2004).
- [149] A. CURTIS and C. WILKINSON. New depth in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem. Soc. Symp.*, **65**, 15-26 (1999).
- [150] M. MRKSICH and G. M. WHITESIDES. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **25**, 55-78 (1996).
- [151] A. P. QUIST, E. PAVLOVIC and S. OSCARSSON. Recent advances in microcontact printing. *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 591-600 (2005).
- [152] J. HYUN, Y. ZHU, A. LIEBMANN-VINSON, T. P. BEEBE and A. CHILKOTI. Microstamping on an activated polymer surface: patterning biotin and streptavidin onto common polymeric biomaterials. *Langmuir*, **17**, 6358-6367 (2001).
- [153] R. BARBUCCI, S. LAMPONI, A. MAGNANI and D. PASQUI. Micropatterned surfaces for the control of endothelial cell behaviour. *Biomol. Eng.*, **19**, 161-170 (2002).
- [154] C. S. CHEN, M. MRKSICH, S. HUANG, G. M. WHITESIDES and D. E. INGBER. Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**, 1425-1428 (1997).
- [155] D. LEHNERT, B. WEHRLE-HALLER, C. DAVID, U. WEILAND, C. BALLESTREM, B. A. IMHOF and M. BASTMEYER. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J. Cell Sci.*, **117** (1), 41-52 (2004).
- [156] X. JIANG, D. A. BRUZEWICZ, A. P. WONG, M. PIEL and G. M. WHITESIDES. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *PNAS*, **102** (4), 975-978 (2005).
- [157] K. MUSTAFA, A. WENNERBERG, J. WROBLEWSKI, K. HULTENBY, B. S. LOPEZ and K. ARVIDSON. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin. Oral Impl. Res.*, **12**, 515-525 (2001).
- [158] M. SATO and T. J. WEBSTER. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert. Rev. Medical Devices*, **1** (1), 105-114 (2004).
- [159] A. I. TEIXEIRA, G. A. ABRAMS, P. J. BERTICS, C. J. MURPHY and P. F. NEALEY. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J. Cell Sci.*, **116** (10), 1881-1892 (2003).
- [160] F. YU, F. MÜCKLICH, P. LI, H. SHEN, S. MATHUR, C. M. LEHR and U. BAKOWSKY. In vitro cell response to a polymer surface micropatterned by laser interference lithography. *Biomacromolecules*, **6**, 1160-1167 (2005).
- [161] B. ZHU, Q. ZHANG, Q. LU, Y. XU, J. YIN, J. HU and Z. WANG. Nanotopographical guidance of C6 glioma cell alignment and oriented growth. *Biomaterials*, **25**, 4215-4223 (2004).
- [162] P. CLARK, P. CONNOLLY, A. S. G. CURTIS, J. A. T. DOW and C. D. W. WILKINSON. Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J. Cell Sci.*, **99**, 73-77 (1991).
- [163] P. LI, U. BAKOWSKY, F. YU, C. LOEHBACH, F. MÜCKLICH and C. M. LEHR. Laser ablation patterning by interference induces directional cell growth. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **2** (3), 138-145 (2003).
- [164] M. J. DALBY, S. CHILDS, M. O. RIEHLE, H. J. H. JOHNSTONE, S. AFFROSSMAN and A. S. G. CURTIS. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials*, **24**, 927-935 (2003).
- [165] R. KEMKEMER, S. JUNGBAUER, D. KAUFMANN and H. GRULER. Cell orientation by a microgrooved substrate can be predicted by auto-

- matic control theory. *Biophys. J.*, **90**, 4701-4711 (2006).
- [166] E. SACKMANN. Haftung für Zellen. *Physik Journal*, **5** (8), 27-34 (2006).
- [167] E. SACKMANN and R. F. BRUINSMA. Cell adhesion as wetting transition? *Chem Phys Chem*, **3**, 262-269 (2002).
- [168] O. Y. ZHONG-CAN and W. HELFRICH. Bending energy of vesicle membranes: General expressions for the first, second, and third variation of the shape energy and applications to spheres and cylinders. *Phys. Rev. A*, **39** (10), 5280-5288 (1989).
- [169] H. BERMUDEZ, D. A. HAMMER and D. E. DISCHER. Effect of bilayer thickness on membrane bending rigidity. *Langmuir*, **20**, 540-543 (2004).
- [170] R. LIPOWSKY. The conformation of membranes. *Nature*, **149**, 475-481 (1991).
- [171] S. SVETINA and B. ZEKS. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur. Biophys. J.*, **17**, 101-111 (1989).
- [172] H. G. SCHLEGEL. *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart, Deutschland (1992).
- [173] C. M. LO, H. B. WANG, M. DEMBO and Y. WANG. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.*, **79** (1), 144-152 (2000).
- [174] A. S. SCHWARZ and S. A. SAFRAN. Elastic interaction of cells. *Phys. Rev. Lett.*, **88** (4), 048102 1-4 (2002).
- [175] E. EVANS. *Handbook of physics and biological systems*, Ed. R. Lipowsky and E. Sackmann, vol. 1, ch. 15, Elsevier, Amsterdam, Niederlande (1994).
- [176] C. MOHRDIECK, A. WANNER, W. ROSS, A. ROTH, E. SACKMANN, J. P. SPATZ and E. ARZT. A theoretical description of elastic pillar substrates in biophysical environments. *Chem Phys Chem*, **6**, 1492-1498 (2005).
- [177] U. S. SCHWARZ, T. ERDMANN and I. B. BISCHOF. Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model. *BioSystems*, **83**, 225-232 (2006).
- [178] D. F. GIBBONS and V. G. CHIRBA. Acoustical loss and Youngs modulus of yttrium iron garnet. *Phys. Rev.*, **110**, 770-771 (1958).
- [179] I. B. BISCHOF and U. S. SCHWARZ. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *PNAS*, **100** (16), 9274-9279 (2003).