

# Sensorik, Aktorik und Stimulation vitaler Zellen unter Verwendung akustischer Oberflächenwellen

---

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität Augsburg



vorgelegt von

**Manuel Stefan Brugger**

Augsburg, März 2021



Erstgutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Brütting  
Drittgutachter: Prof. Dr. Rainer Burgkart

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2021



# Kurzdarstellung

Die Biowissenschaften und deren angrenzende Disziplinen entwickeln sich zu einer der wichtigsten und innovativsten Wissenschaftsgebieten im 21. Jahrhundert. Die Kombinationen von Ingenieur- und Naturwissenschaften, sowie Biologie und Medizin ermöglichen es, unser Verständnis für biologische Vorgänge wie zelluläre Interaktionen oder die Bildung komplexer Organismen zu erweitern und zu vertiefen. Prozesse und Methoden der Zelldetektion, -manipulation sowie -stimulation bilden hierbei eine wichtige Expertise dieses interdisziplinären Forschungsgebietes. Die vorliegende Arbeit widmet sich diesen Kernkompetenzen und erweitert das Spektrum der Forschungsmethoden durch die Verwendung akustischer Oberflächenwellen (engl. *surface acoustic waves*, SAW).

Gekennzeichnet durch eine oszillierende Auslenkung der Substratoberfläche, deren Amplitude in der Größenordnung *Nanometer* liegt, besitzt die akustische Oberflächenwelle ein breites Anwendungspotential. Abhängig von der Form der Substratauslenkung können nicht-invasive sensorische Applikationen oder aktorische Verfahren realisiert werden. Durch die Untersuchung der Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit biologischen Materialien werden im Rahmen von Lab-on-a-Chip-Systemen drei elementare Methoden der Biowissenschaften adressiert:

- Nicht-invasive Detektion und Charakterisierung von Zellkulturen und Überwachung der Kultivierungsbedingungen
- Bildung komplexer Zellverbände durch kontrollierte Aktorik und Manipulation einzelner Zellen
- Akzeleration des Zellwachstums durch aktive Stimulation im Hinblick auf eine unterstützte Wundheilung

Eine horizontal polarisierte SAW zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Grenzflächeneigenschaften bei einer nahezu verlustfreien Propagation aus. Diese als Scherwellen bezeichnete Wellenform erlaubt eine Überwachung des Zellwachstums und der Zellmigration *in vitro* in einem sogenannten Wound-Healing-Assay, in dem zwei konfluente Zellrasen in einen zellfreien Bereich migrieren. Die durch die Zellbelegung der sensorischen Oberfläche hervorgerufenen Veränderungen der viskoelastischen und dielektrischen Eigenschaften an der Grenzfläche verursachen eine messbare Erhöhung der Phasengeschwindigkeit der SAW. Die Phasenverschiebung als Messgröße weist eine deutliche Korrelation mit der Flächenbelegungsrate durch migrierende Zellen auf. Liegt ein konfluenter Zellrasen vor, so kann des Weiteren die Dynamik des Zellwachstums erfasst werden. Durch die anschließende Initiierung der Zellyse konnte eine Quantifizierung des Deadhänsionsprozesses abhängig von der Ursache erreicht werden. Neben der Messung des Zellwachstums können durch weitere SAW-Sensoren die Kultivierungsbedingungen wie der osmotische Druck des Nährmediums überwacht werden, um Rückschlüsse auf den Zustand der Zellkultur ziehen zu können. Auf Basis der experimentellen Ergebnisse konnte anhand einer theoretischen Betrachtung die Ursache der Phasenverschiebung auf die Änderung der dielektrischen Eigenschaften an der Grenzfläche zurückgeführt werden. Die Daten belegen erstmalig die vollumfängliche Charakterisierung des Zellwachstums und der Zellmigration ohne die Notwendigkeit optischer Systeme.

Durch die Verwendung einer Wellenmode mit einer vertikalen Auslenkung der Substratoberfläche, der sogenannten Rayleigh-Welle, kann mittels dynamischer akustischer Kraftfelder eine aktive Kontrolle über lebende Zellen erreicht werden. Somit ist eine mikrometeregenaue Positionierung in Suspension befindlicher Zellen durch in Ort und Zeit variable Stehwellenfelder möglich.

Hierbei wurden eingehend die physikalischen Eigenschaften des Systems der akustischen Pinzette laboriert und die Biokompatibilität verifiziert. Anhand von Mikropartikeln wurde die räumliche und zeitliche Dynamik des Kraftfeldes dargelegt und die Kraftfeldstärke bestimmt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte der durch die SAW bedingte Wärmeeintrag erfasst werden. Unter Berücksichtigung der optimalen Kultivierungsbedingungen nach der kontrollierten Zelladhäsion war eine anschließende Langzeitkultivierung von Neuroblastomzellen und deren Ausdifferenzierung zu neuronähnlichen Zellen im experimentellen Aufbau möglich. Durch die Identifizierung der Einflüsse der SAW auf das Zellwachstum konnten die Grenzen des anwendbaren Leistungsbereichs der SAW festgelegt und eine Beeinflussung der Zellproliferation festgestellt werden.

Schließlich wurde durch ein zweidimensionales Stehwellenfeld ein gerichtetes Wachstum neuronaler Fortsätze primärer Neuronen erzielt. Zur Generierung komplexer dreidimensionaler Strukturen konnte die Technologie der akustischen Oberflächenwellen mit Strukturproteinen wie Kollagen I kombiniert werden, um die Anwendungsgrenzen der akustischen Kraftfelder zu erweitern. Im Hinblick auf ein Zellwachstum unter physiologischen Rahmenbedingungen konnte durch die Kombination mit Hydrogelen zudem die Steifigkeit der Substratoberfläche für die Zellkultur-typischen Parameter adjustiert werden. Die Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll die Anwendbarkeit von SAW für die Schaffung künstlicher neuronaler Netzwerke, den sogenannten Brain-on-a-chip-Systemen.

Anhand der durch die Zellakustik hervorgerufene Beeinflussung der Zellen wurde ein verändertes Verhalten der Zellen festgestellt. Zellen, welche sich im Schallpfad einer akustischen Oberflächenwelle befinden, werden durch diese in ihrem Wachstum stimuliert. Dies führt zum letzten Teil dieser Arbeit, welcher sich mit der aktiven Stimulation von adhären Zellen in einem Wound-Healing-Assay beschäftigt. Nach der erfolgreichen Demonstration des erhöhten Zellwachstum von Osteosarcom-Zellen *in vitro* in einer künstlichen Wunde um bis zu 16 % gegenüber nicht-stimulierten internen Referenzen durch akustische Oberflächenwellen, konnten die Schlüsselparameter der Oberflächenwelle festgelegt werden. Hierbei stellte sich die Rayleigh-Mode in einem engen Intensitätsintervall nach Untersuchungen mit verschiedenen Wellenmoden und -längen, sowie unterschiedlichen Leistungen, als optimaler akustischer Stimulationsmechanismus heraus. Die SAW wurden auf weitere Zelltypen angewandt, wobei bei kollektiv migrierenden Epithelzellen eine signifikante Erhöhung der Zellmigration um bis zu 135 % festgestellt wurde. Durch den Ausschluss parasitärer Artefakte und durch die Messung verschiedener intrazellulärer Parameter wie reaktive Sauerstoffspezies und Proliferation wurde die Vibration, also die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle, als Ursache der erhöhten Zellmigration identifiziert.

Insbesondere im Hinblick auf die Schaffung künstlicher neuronaler Netzwerke auf einem Chip und die unterstützte Wundheilung *in vivo* liefern die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse und Erkenntnisse eindrucksvoll einen entscheidenden Beitrag für die zukünftige Forschung und Entwicklung künstlicher Gewebe und komplexer biologischer Strukturen in den Biowissenschaften.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1. Die Zelle . . . . .	5
2.1.1. Zelladhäsion . . . . .	5
2.1.2. Lokomotion . . . . .	7
2.1.3. Reaktive Sauerstoffspezies – Der zelluläre Stress . . . . .	8
2.1.4. Zellzyklus . . . . .	8
2.1.5. Zellkultur und Zelltypen . . . . .	11
2.2. Akustische Oberflächenwellen . . . . .	13
2.2.1. Akustische Wellenausbreitung auf einem Festkörper . . . . .	13
2.2.2. Anisotrope Materialien in der Akustik . . . . .	16
2.2.3. Wellenmoden . . . . .	18
2.2.4. Erzeugung akustischer Oberflächenwellen und deren Superposition . . . . .	20
2.3. Wechselwirkung akustischer Oberflächenwellen mit Materie . . . . .	24
2.3.1. Dämpfung akustischer Oberflächenwellen . . . . .	24
2.3.2. Sensorik mit Verzögerungsleitungen . . . . .	25
2.3.3. Acoustic streaming in Flüssigkeiten . . . . .	26
2.3.4. Mikropartikel im akustischen Kraftfeld . . . . .	28
<b>3. Akustische Sensorik</b>	<b>33</b>
3.1. Motivation und Stand der Technik . . . . .	34
3.2. Methoden und Materialien . . . . .	35
3.2.1. Der Sensorik-Chip . . . . .	36
3.2.2. Der experimentelle Aufbau und Datenakquisition . . . . .	36
3.2.3. Messverfahren . . . . .	38
3.2.4. Datenauswertung . . . . .	40
3.3. Sensorgestützte Überwachung des Zellwachstums . . . . .	42
3.3.1. Zellmigration in einem Wound-Healing-Assay . . . . .	42
3.3.2. Konfluente Zelldynamik . . . . .	46
3.3.3. Quantifizierung des Ablösungsprozesses . . . . .	48
3.3.4. Überwachung der Kultivierungsbedingungen . . . . .	49
3.4. Diskussion . . . . .	51
3.4.1. Mechanische Störung . . . . .	52
3.4.2. Akustoelektrische Interaktion . . . . .	52
3.5. Fazit und Ausblick . . . . .	56
<b>4. Generierung künstlicher neuronaler Netze – Aktorik mittels akustischer Oberflächenwellen</b>	<b>57</b>
4.1. Motivation und Stand der Technik . . . . .	58
4.2. Entwicklung eines Setups . . . . .	59
4.2.1. Anforderungen . . . . .	59
4.2.2. Das mikrofluidische System . . . . .	59

4.2.3.	Der Eigenbau-Multifunktionsgenerator . . . . .	64
4.2.4.	Versuchsvorbereitung . . . . .	65
4.3.	Charakterisierung des Versuchsaufbaus . . . . .	67
4.3.1.	Visualisierung des Stehwellenfeldes durch Raster-Kraft-Mikroskopie . . . . .	67
4.3.2.	Die akustische Pinzette . . . . .	69
4.3.3.	Temperaturinduzierte Effekte . . . . .	79
4.4.	Aktorik und Beeinflussung von Zellen durch akustische Oberflächenwellen . . . . .	82
4.4.1.	Differenzierung neuronaler Stammzellen . . . . .	82
4.4.2.	Strukturierte Zelladhäsion mit Langzeitkultivierung . . . . .	84
4.4.3.	Bestimmung des anwendbaren Leistungsbereichs . . . . .	87
4.4.4.	Proliferation . . . . .	91
4.4.5.	Beeinflussung des zellulären Wachstums durch eine akustische Potentiallandschaft . . . . .	94
4.4.6.	Gerichtetes Wachstum neuronaler Fortsätze . . . . .	97
4.4.7.	Schaffung physiologischer Randbedingungen . . . . .	98
4.4.8.	3D-Strukturierung im Stehwellenfeld . . . . .	100
4.4.9.	Positionierung aktiv beweglicher Einzeller . . . . .	102
4.5.	Ausblick . . . . .	106
<b>5.</b>	<b>Gesteigertes Zellwachstum durch den Einsatz akustischer Oberflächenwellen</b>	<b>109</b>
5.1.	Motivation und Stand der Technik . . . . .	109
5.2.	Methoden und Materialien . . . . .	112
5.2.1.	Experimenteller Aufbau . . . . .	112
5.2.2.	Abschätzung der Schallintensität . . . . .	113
5.2.3.	Charakterisierung des Flussprofils . . . . .	114
5.2.4.	Datenanalyse . . . . .	114
5.3.	SAW-unterstützte Wundheilung bei Osteosarkomzellen <i>in vitro</i> : Identifizierung der Schlüsselparameter . . . . .	117
5.4.	Ultraschallstimulierte kollektive Zellmigration im Rahmen der Wundheilung . . . . .	120
5.4.1.	Stimulation von Epithelzellen . . . . .	120
5.4.2.	Abschätzung der SAW-begleitenden Einflussgrößen auf das Zellwachstum . . . . .	123
5.5.	Mechanisch induzierte intrazelluläre Reaktion . . . . .	127
5.5.1.	Zellulärer Stress – Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) . . . . .	127
5.5.2.	Beeinflussung des Zellwachstums – Proliferation . . . . .	130
5.5.3.	Rolle der Membranproteasen . . . . .	134
5.6.	Diskussion . . . . .	136
5.7.	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	139
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>141</b>
<b>A.</b>	<b>Berechnung der Permittivität</b>	<b>145</b>
A.1.	Herleitung und Berechnung der Elektrolyt-Permittivität . . . . .	145
A.2.	Berechnung der Permittivität von Zellen . . . . .	147
<b>B.</b>	<b>Geräte</b>	<b>149</b>
B.1.	Multifunktionsgenerator . . . . .	149
B.1.1.	Aufbau . . . . .	149
B.1.2.	Bedienungsanleitung . . . . .	149
B.2.	Fluoreszenzmikroskop und Inkubationssysteme . . . . .	152
<b>C.</b>	<b>Messergebnisse</b>	<b>153</b>
C.1.	Trajektorien . . . . .	153

---

<b>D. Protokolle</b>	<b>155</b>
D.1. Reagenzien und Materialien . . . . .	155
D.2. Zellpassagierung und Zellgewinnung . . . . .	156
D.3. Kryokonservierung . . . . .	157
D.4. Zellkultur auftauen . . . . .	157
D.5. Dissektion . . . . .	158
D.6. SAW-Chip-Herstellung . . . . .	159
D.7. PDMS-Master-Herstellung . . . . .	161
D.8. Soft-Lithographie . . . . .	162
D.9. PA-Gel-Anfertigung . . . . .	163
<b>E. Abkürzungen</b>	<b>165</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>Danksagung</b>	<b>181</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>183</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Facettenreiche Anwendung akustischer Oberflächenwellen . . . . .	3
2.1. Phasen der Zellmigration . . . . .	7
2.2. Vergleich Apoptose Nekrose . . . . .	10
2.3. Winkelabhängige Phasengeschwindigkeit . . . . .	16
2.4. Slowness-Kurve von LiNbO <sub>3</sub> 128° rot Y-Cut . . . . .	17
2.5. Die Rayleigh-Welle . . . . .	19
2.6. Die Scherwelle . . . . .	19
2.7. Bauformen interdigitaler Schallwandler . . . . .	21
2.8. Superpositionierung gegenläufiger Wellen . . . . .	23
2.9. Zweidimensionales Stehwellenfeld . . . . .	23
2.10. Akustische Strömungen in Flüssigkeiten . . . . .	27
2.11. Akustische Kräfte auf Partikel in Flüssigkeiten . . . . .	29
3.1. Experimenteller Aufbau der SAW-Sensorik . . . . .	37
3.2. Progressive Zellmigration auf einem SAW-Sensor . . . . .	40
3.3. Erfassung der Rückflusdämpfung $S_{11}$ und der Transmission $S_{21}$ . . . . .	41
3.4. Zeitliche Entwicklung der Streuparameter . . . . .	43
3.5. Korrelation der Phasenänderung $\Delta\phi_{21}$ mit der Flächenänderung $F_{mig}$ . . . . .	44
3.6. Relativer Amplituden- $\Delta S$ und Phasenunterschied $\Delta\phi_{21}$ . . . . .	45
3.7. Zeitliche Entwicklung eines konfluenten Zellrasens nach dem kompletten Wundschluss . . . . .	46
3.8. Temporäre Entwicklung der Phase $\Delta\phi_{21}$ während der Zellkultivierung . . . . .	47
3.9. Zeitliche Entwicklung der Phase $\Delta\phi_{21}$ während der Ablösung . . . . .	48
3.10. Quantifizierung des Ablösungsprozesses . . . . .	49
3.11. Korrelation der Phasenverschiebung $\Delta\phi_{21}$ mit der Osmolalität $c_{osm}$ . . . . .	50
3.12. Theoretische Permittivität von Zellen in Abhängigkeit des Volumenverhältnisses $v$ . . . . .	54
4.1. SSAW-Chip zur Bildung eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes . . . . .	60
4.2. Mikrofluidischer Kanal des experimentellen Aufbaus . . . . .	62
4.3. Technische Darstellung des experimentellen Aufbaus . . . . .	63
4.4. Eigenbau-Multifunktionsgenerator . . . . .	65
4.5. Visualisierung des Stehwellenfeldes mittels AFM . . . . .	68
4.6. Auswertung der akustischen Kraft $F_r$ auf Mikroobjekte . . . . .	70
4.7. Strukturierung von Mikropartikeln durch ein akustisches Kraftfeld . . . . .	72
4.8. Auswertung der Strukturierungseffizienz durch FFT . . . . .	73
4.9. Bestimmung des Stehwellenfeldes eines <i>chirped</i> -IDTs . . . . .	75
4.10. Ausrichtung von Objekten bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen . . . . .	76
4.11. Dynamische laterale Positionierung von Objekten . . . . .	78
4.12. Temperaturbestimmung mittels RhoB . . . . .	81
4.13. Ausdifferenzierung von B35-Neuroblastomzellen . . . . .	84
4.14. Zelladhäsion von B35-Zellen in einem Stehwellenfeld . . . . .	85
4.15. Ausdifferenzierte B35-Zellen im mikrofluidischen System . . . . .	87
4.16. Automatische Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen durch ein MATLAB-Skript . . . . .	88

---

4.17. Bestimmung des letalen Leistungspegels . . . . .	90
4.18. Bestimmung der Inkubationszeit von B35-Zellen und Festlegung des Grenzwertes proliferierter Zellen . . . . .	92
4.19. Messung der Proliferation im experimentellen Aufbau . . . . .	93
4.20. Wachstum von B35-Zellen in einem Stehwellenfeld . . . . .	95
4.21. Ermittlung der Trajektorien der B35-Zellkultur in einem Stehwellenfeld . . . . .	96
4.22. Wachstum primärer Neuronen im Stehwellenfeld einer SSAW . . . . .	98
4.23. Kraft-Eindringkurve einer AFM-Messung in ein PA-Gel . . . . .	99
4.24. Effektiver E-Modul $E_{\text{eff}}$ eines PA-Gels . . . . .	100
4.25. Bildung und Strukturierung einer 3D-Zellkultur mittels Kollagen I . . . . .	102
4.26. Einzelnes Paramecium in einem mikrofluidischen Kanal . . . . .	103
4.27. Positionierung agiler Einzeller durch ein Stehwellenfeld . . . . .	104
4.28. Positionierung agiler Einzeller durch eine Kollagenstruktur . . . . .	106
5.1. Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Zellstimulation und der Datenauswertung	113
5.2. Auswertung eines Wound-Healing-Assays mit MDCK-II-Zellen . . . . .	116
5.3. Überlagerte Einzelaufnahmen eines Wundheilungsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten	116
5.4. SAW-stimuliertes Zellwachstum bei Variation der physikalischen Eigenschaften der SAW	119
5.5. Frequenzabhängige Streuparameter $S_{11}$ eines unbeladenen SAW-Chips . . . . .	121
5.6. SAW-stimuliertes Zellwachstum der ektodermalen Zelllinie MDCK-II . . . . .	122
5.7. Temperaturabhängigkeit des Nährmediums von der eingekoppelten Leistung . . . . .	124
5.8. Abschätzung des Einflusses der durch die <i>Leaky</i> -SAW induzierten Strömung . . . . .	126
5.9. Charakterisierung des SAW-induzierten Anstiegs intrazellulären ROS . . . . .	129
5.10. Bestimmung der durch SAW beeinflussten Zellproliferation . . . . .	133
5.11. Beeinflussung der SPPL3-Protease durch SAW in Zelllinien mit unterschiedlichen Expressionsverhalten . . . . .	135
A.1. Modelldarstellung einer eukaryotischen Zelle . . . . .	148
C.1. Beeinflussung der Trajektorien mit einer Eingangsleistung von $P_{\text{IN}} = 9$ dBm . . . . .	153
C.2. Beeinflussung der Trajektorien mit einer Eingangsleistung von $P_{\text{IN}} = 12$ dBm . . . . .	154

# Tabellenverzeichnis

2.1. Phasen der Zelladhäsion . . . . .	6
2.2. Materialeigenschaften piezoelektrischer Kristalle . . . . .	18
2.3. Abklinglänge akustischer Oberflächenwellen in Flüssigkeiten . . . . .	25
3.1. Filtergrenzen der Fouriertransformation . . . . .	38
4.1. Parameter der in den Experimenten verwendeten SSAW-Chips . . . . .	61
A.1. Auflistung der im Nährmedium enthaltenen anionischen Salze . . . . .	147
A.2. Berechnete Einzelwerte zur Ermittlung der Gesamtgleichstromleitfähigkeit $\sigma_{DC}$ . . . . .	147
A.3. Werte zur Berechnung der gesamten Zellpermittivität . . . . .	148
B.1. Kenndaten der Fluoreszenzfilter . . . . .	152



# 1. Einführung

Medizinische Implantate begleiten in der heutigen Zeit das alltägliche Leben vieler Menschen. Angefangen bei strukturellem Versagen aufgrund des Alterungsprozesses über Erkrankungen bis hin zu Verletzungen durch äußere Gewalteinwirkung bei Verkehrsunfällen, im Sport oder im alltäglichen Leben, bieten Implantate einen unterstützenden Genesungsprozess und eine gesteigerte Lebensqualität. So werden jährlich in deutschen Krankenhäusern nahezu 500 000 Endoprothesen, 138 000 Stents und 133 000 Herzschrittmacher implantiert<sup>1</sup>, und das mit steigender Tendenz [1].

Trotz der positiven Eigenschaften bestehen noch heute Implantat-assoziierte Risiken und Komplikationen, die zu einer langen Hospitalisation, mitunter verbunden mit erheblichem individuellen Leidensdruck bis hin zum Tode führen können. Die durch den steigenden Bedarf einhergehende quantitativ zunehmende Komplikationshäufigkeit ist weder ethisch, medizinisch noch finanziell durch die Belastung des öffentlichen Gesundheitsbudgets vertretbar [2].

Vor diesem Hintergrund werden in den Biowissenschaften und in der Biotechnologie Konzepte und Materialien zur besseren Patientenversorgung entwickelt, die nachhaltige Lösungen und einen effizienteren Heilungsprozess bei stetiger Minimierung etwaiger Komplikationen ermöglichen. So wurden bereits Endoprothesen entwickelt, deren Materialien durch Freisetzung entzündungshemmender Substanzen aktiv den Heilungsprozess fördern und eine Revision verhindern können [3, 4]. Doch nicht nur im Bereich der Osseointegration konnten bedeutende Fortschritte erzielt werden, sondern auch in der Neurochirurgie.

Weltweit erleiden jährlich ca. 250 000 - 500 000 Personen durch Unfälle akute Rückenmarksverletzungen [5]. Während das adulte periphere Nervensystem zwar die Kapazität der Regeneration besitzt, sind die Ergebnisse der Wiederherstellung bezüglich der sensorischen und motorischen Funktionen sehr individuell. Besonders die Reparatur des zentralen Nervensystems stellt eine noch größere Herausforderung dar, da Verletzungen meistens zu irreversiblen Funktionsverlusten führen. Multiple Hindernisse der Regeneration (Apoptose, Degeneration, Schwellungen) entstehen insbesondere dann, wenn die Abstände zwischen den beschädigten Nervenenden mehr als 1 cm betragen [6]. Als Goldstandard entwickelte sich in der Vergangenheit die Verwendung von Spenderorganen aus körpereigenem Gewebe (*Autotransplantate*), Fremdgewebe (*Allotransplantat*) oder tierischem Gewebe (*Xenotransplantat*). Die hierbei einhergehenden negativen Aspekte, wie beispielsweise den sensorischen Ausfall anderer Körperregionen aufgrund der invasiven Gewinnung, die limitierte Verfügbarkeit des Implantats, Abstoßungsreaktionen des Immunsystems oder dem Vorliegen einer irreparablen Schädigung, führten schließlich zur Entwicklung künstlicher Implantate [7].

So können die Implantate aus zylindrische Tuben (engl. *nerve guidance conduits*, NGC) bestehen, die die Enden beschädigter Nerven miteinander verbinden und die Regeneration durch geführtes Nervenwachstum über die Läsion hinweg unterstützen [8]. Elektrisch aktive implantierbare Geräte stellen zudem eine Schnittstelle zwischen Mensch und Maschine dar, die eine Wiederherstellung gestörter oder verlorener Körperfunktionen wie Sehen, Hören oder Motorik ermöglichen [9].

Für die Erforschung neuer und weiterentwickelter Implantattechnologien ist daher ein tiefgreifendes Verständnis über die Funktion des menschlichen Körpers und die einhergehenden biologischen Vorgänge essentiell. Um dies zu erreichen, etablierten sich in der Forschung verschiedene Modellsysteme: von Tierversuchen *in vivo* über Experimente an einzelnen Zellen in einer Zellkultur *in vitro* bietet die

---

<sup>1</sup>Stand: 2017

Forschung ein breites Portfolio. Insbesondere die *in vitro*-Untersuchungen etablierten sich aufgrund der leichter zu erfassenden Rahmenbedingungen, der niedrigeren Kosten und ethischer Überlegungen. Neue Materialien, Wirkstoffe oder Behandlungskonzepte für Implantate können so direkt an einzelnen Zelltypen untersucht werden. Die Untersuchung der Interaktionen multizellulärer Zellverbände, beispielsweise einem neuronalen Netzwerk bestehend aus primären Neuronen, liefern Einblicke in die Physiologie und Mechanismen des Nervensystems, um NGCs gezielter zu entwickeln.

Für die Bewerkstelligung der genannten Untersuchungen bilden Prozesse und Methoden der Zelldetektion, -manipulation sowie -stimulation eine wichtige Expertise dieses interdisziplinären Forschungsgebietes der Biowissenschaften. Die optische Mikroskopie, die *optische* und *magnetische* Pinzette, mikrofluidische Systeme in *Lab-on-a-chip*-Experimenten oder die statische Modifikation der Zellkulturoberflächen sind nur einige Beispiele des breiten Spektrums an zur Verfügung stehenden Methoden. Abhängig vom Anwendungsgebiet und vom Budget sind viele Verfahren und Methoden jedoch nur unter speziellen Voraussetzungen nutzbar, kostenintensiv und nur eingeschränkt für weitere Zwecke übertragbar.

Die vorliegende Arbeit macht sich das Konzept der akustischen Oberflächenwelle (engl. *surface acoustic wave*, SAW) zu Nutze, um die Kernkompetenzen der Biowissenschaften mit einer wohl etablierten und kosteneffizienten Technologie zu adressieren und zu erweitern. Die oszillierende Auslenkung einer Substratoberfläche besitzt das Potential, zugleich sensorische, aktorische und stimulierende Methoden zu adressieren (siehe *Abb. 1.1.*). Im Rahmen dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob durch SAW das Zellwachstum erfasst, einzelne Zellen manipuliert und sogar stimuliert werden können.

Um einen grundlegenden Überblick über die notwendigen biologischen und physikalischen Grundlagen zu schaffen, beschäftigt sich das zweite Kapitel mit der Biologie der Zelle und der Physik der akustischen Oberflächenwelle. Hierbei werden die Mechanismen der kleinsten Lebewesen von ihrer Entstehung durch die Zellteilung über deren intrazellulären Mechanismen und Interaktion mit der Umgebung bis hin zu ihrem Ableben erläutert. Die Vielfältigkeit des Lebens widerspiegelnd, werden alle in den Experimenten verwendeten Zelltypen und -gattungen sowie deren Ursprung kurz vorgestellt. Im Anschluss an die Beschreibung der akustischen Oberflächenwelle und deren Erzeugung erfolgt die Erläuterung der Interaktionen einer SAW mit Flüssigkeiten. Hierbei werden die durch Änderung der Oberflächenbeschaffenheit hervorgerufenen Einflüsse auf die SAW-Propagation, das *Acoustic Streaming* als auch die Bildung einer Potentiallandschaft mit der Möglichkeit der Objektmanipulation beleuchtet.

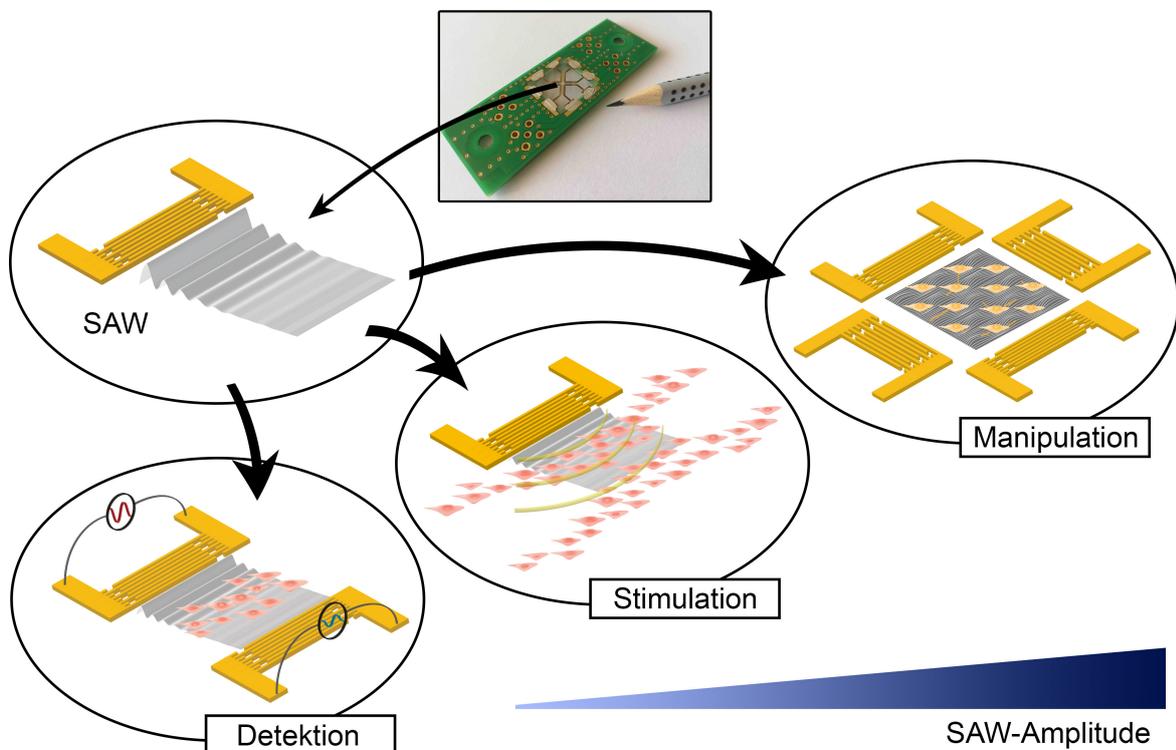
Die Biokompatibilität oder die zelluläre Reaktion auf Materialien und Substanzen neuer Implantatmaterialien können im Rahmen sogenannter Wound-Healing-Assays untersucht werden. Hierbei wird das Zellwachstum zweier aufeinander zulaufender Zellfronten üblicherweise durch optische Mikroskopie erfasst. Dies erfordert eine Transparenz der Materialien und kann nur *in vitro* angewendet werden. Im Hinblick auf eine zukünftige Integration dieser Technologie *in vivo*, beispielsweise zur überwachten Osseointegration eines Implantats, wird in Kapitel 3 eine SAW als Sensor für das Zellwachstum verwendet. Hierbei soll überprüft werden, ob durch SAW die Zellmigration, das Wachstum und das Absterben erfasst und quantifiziert werden können.

Da die Bildung künstlicher neuronaler Netzwerke in der Literatur stets durch statische Ansätze erfolgt und somit kein dynamischer Einfluss auf die Zellkultur möglich ist, soll durch die Verwendung eines zeitlich und räumlich dynamischen Kraftfeldes im vierten Kapitel diese Einschränkung überwunden werden. Nach einer eingehenden ausführlichen Charakterisierung der Potentiallandschaft werden durch die *akustische Pinzette* einzelne neuronale Zellen kontrolliert positioniert und anschließend manipuliert. Hierbei wird elaboriert, welche Auswirkungen das Kraftfeld auf das Zellwachstum besitzt und ob die Wachstumsrichtungen neuronaler Fortsätze durch ein Stehwellenfeld beeinflusst werden können. Abschließend wird die Integrationsfähigkeit der SAW-Technologie mit Hydrogelen und einer

extrazellulären Matrix zur Sicherstellung physiologischer Randbedingungen überprüft.

Für eine Verringerung Implantat-assoziiertes Komplikationen ist nicht nur die Prävention von Infektionen von höchstem Interesse, sondern auch die aktive Förderung einer beschleunigten Wundheilung nach einer invasiven Operation. In der Literatur konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch Ultraschallbehandlung oder elektrische Felder eine erhöhte Wundheilung und Knochenregeneration erreicht werden können [10, 11]. In vorangegangenen Arbeiten konnte erstmals erfolgreich demonstriert werden, dass SAW ebenfalls positive Einflüsse auf das Zellwachstum besitzen. Zur Feststellung der relevanten SAW-Parameter und der hierbei stattfindenden Stimulationsmechanismen beschäftigt sich das fünfte Kapitel mit der Beeinflussung des Zellwachstums in einem Wound-Healing-Assay durch SAW. Dies legt die Grundlage für eine aktiv unterstützte Wundheilung nach einer operativen Implantat-Versorgung.

Die in den nachfolgenden Experimenten verwendeten Geräte und Protokolle sowie die Eigenschaften der in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersets sind im Anhang detailliert beschrieben.



**Abbildung 1.1:** Darstellung des facettenreichen Anwendungsspektrums akustischer Oberflächenwellen in den Biowissenschaften. Die Technologie bietet das Potential, Kernkompetenzen wie die Detektion, Stimulation und Manipulation von lebenden Zellen eindrucksvoll zu adressieren.



## 2. Theoretische Grundlagen

Diese interdisziplinäre Arbeit bedient sich der Kompetenzen der Naturwissenschaften Physik und Biologie. Um einen Überblick über die wichtigsten Grundlagen zu erlangen, beschäftigt sich das folgende Kapitel mit dem wahrscheinlich wichtigsten Baustein des Lebens – der Zelle – und der Vielfältigkeit der Schallerzeugung und -ausbreitung.

### 2.1. Die Zelle

Die Zelle (lat. *cellula*, kleine Kammer, Zelle) – die kleinste lebensfähige Einheit – ist einzigartig in ihrem Aufbau und ihrer Funktion. Als abgrenzbares, eigenständiges und sich selbst erhaltendes System ist sie in der Lage sich selbständig zu vermehren, Nährstoffe aufzunehmen und durch Kooperation mit anderen Zellen einen größeren, noch komplexeren Organismus zu bilden. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden nun einleitend die Mechanismen und Interaktionen einer biologischen Zelle erläutert, ihre Diversität vorgestellt und ihre Verwendung im Labor beschrieben.

#### 2.1.1. Zelladhäsion

In der Morphogenese von Geweben, in der Immunabwehr oder bei der Benetzung und Fortbewegung auf Substraten spielt die Zelladhäsion eine zentrale Rolle. Zellen „kleben“ nicht einfach aneinander, um ein Gewebe zu formen, sondern sind vielmehr in unterschiedlichsten und hochspezialisierten Mustern angeordnet. Eine Vielzahl verschiedener Adhäsionsmechanismen sind verantwortlich für die Ausbildung von Verbindungen zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der extrazellulären Umgebung. Hierbei wird in der Adhäsion die Verbindung zwischen zwei Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) oder zwischen einer Zelle und einer extrazellulären Matrix (EZM) (Zell-EZM-Adhäsion) unterschieden. Im Folgenden wird die Zell-EZM-Adhäsion auf einem Substrat in den Fokus genommen. Der in diesem Zusammenhang ablaufende Mechanismus beruht auf einem komplizierten Zusammenspiel von durch Membranproteine vermittelten attraktiven spezifischen Kräften kurzer Reichweite (Schlüssel-Schloss-Prinzip), generischen Grenzflächenkräften und elastischen Spannungen.

Die biologische Benetzung eines Zellkörpers auf einem Substrat kann bei den meisten Zellen durch das Modell der Adhäsion einer weichen Schale (engl. *soft shell adhesion*) beschrieben werden [12] und erfolgt prinzipiell in drei Phasen (siehe *Tab. 2.1.*) [13]:

Die erste Anbindung der Zelle mit dem Substrat (Anfangsstadium), das Abflachen und Spreiten des Zellkörpers auf der Substratoberfläche und schließlich die Reorganisation und Verankerung des Zytoskeletts mit den sich bildenden fokalen Adhäsionspunkten.

Zu Beginn befindet sich die Zelle in einer Suspension und weist zumeist eine rundliche Form auf. Kommt die Zelle mit dem Substrat in Kontakt, so haftet diese in der ersten Phase durch unspezifische Wechselwirkungen (Gravitation, elektrostatische und Van-der-Waals (VdW)-Anziehung) an der Oberfläche an. Während der Anlagerung werden zudem erste spezifische Bindungen ausgebildet [14]. Eine spezifische Bindung entsteht durch die Kopplung von Zelladhäsions-Molekülen (ZAM) mit einem weiteren ZAM oder der EZM zu einem Rezeptor-Ligandenpaar nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Für die Zell-EZM-Adhäsion stellen die Integrine eine bedeutende Gruppe der ZAM dar, da sie die wichtigen fokalen Zelladhäsionspunkte vermitteln [15]. Die EZM hingegen ist ein Netzwerk aus strukturellen

Makromolekülen und besteht aus Proteoglykanen und Faserproteinen (z. B. Kollagen I).

Der Adhäsionsmechanismus ist hierbei abhängig von der Beschaffenheit und der Beschichtung der Substratoberfläche. Hierbei wird unterschieden in den Zellkontakt mit (1) physiologischen Adhäsionsmolekülen (z. B. Fibronektin), welche sich durch unspezifische Anlagerung aus dem mit Serum versetzten Nährmedium auf der Oberfläche des inerten Substrates ablageren, (2) einer elektrostatisch attraktiv geladenen Oberfläche beschichtet mit biologisch abbaubaren geladenen Polymeren (z. B. Poly-L-Lysin (PLL)) oder (3) spezifischen synthetischen Peptiden hergestellt aus Molekülen der EZM [16].

Abhängig vom Zelltyp beginnt die Zelle nach dem Substratkontakt weitere Makromoleküle zu sezernieren [17]. Die bei der Bildung der Rezeptor-Liganden-Paare freiwerdende Energie beträgt einige  $10 k_B T$  [18, 19]. Durch die Ausbildung weiterer spezifischer Bindungen spreitet die Zelle zunehmend, wodurch die Kontaktfläche erhöht und der Zellkörper abgeflacht wird. Die Phase II wird erreicht, sobald die Kontaktfläche der Zelle auf dem Substrat größer ist als die Projektionsfläche der ungespreiteten sphärischen Zelle. Durch die Spreitung werden die Ränder der Zellmembran allerdings stark gekrümmt. Die hierbei notwendige Deformationsenergie wird durch die verschiedenen attraktiven Wechselwirkungsenergien zur Verfügung gestellt. Im Prinzip spreitet eine Zelle solange auf dem Substrat, bis die erforderliche Deformationsenergie die frei werdende Adhäsionsenergie übersteigt [20].

Repulsive Kräfte wie die Helfrich Repulsion, entropische Undulationskräfte oder polymerinduzierte Kräfte durch Oberflächenmoleküle (z. B. Glykokalix) bewirken eine abstoßende Wirkung zur Substratoberfläche [21]. Durch die Balance der attraktiven und repulsiven Kräfte weist die Zelle üblicherweise einen Abstand von ca. 50 nm zur Substratoberfläche auf [22].

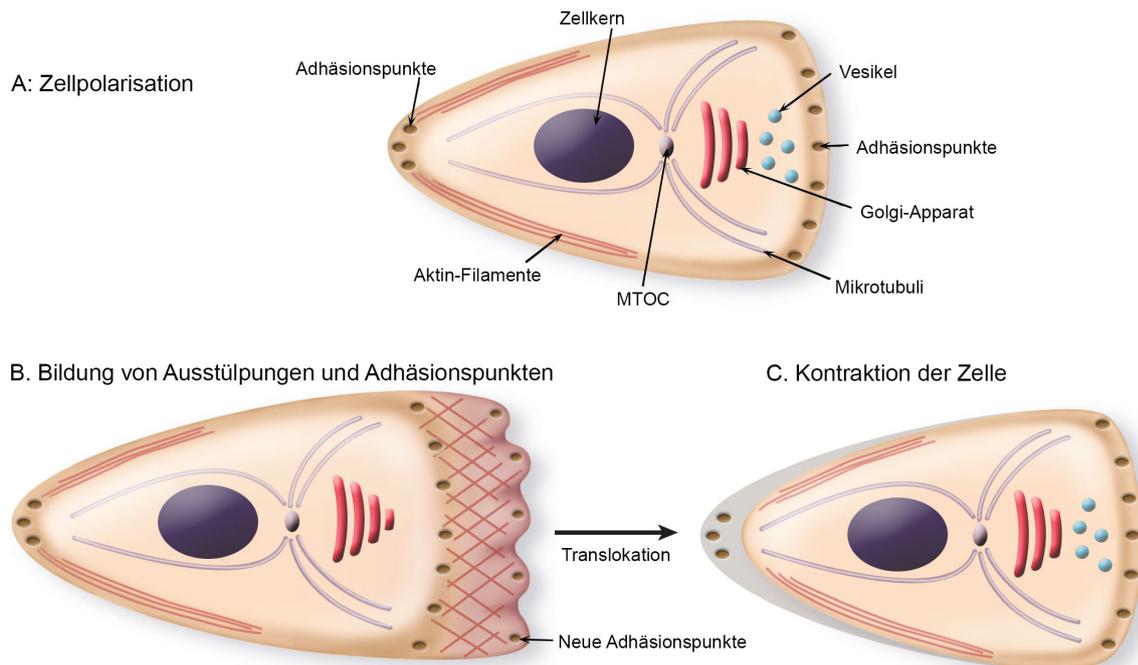
Phase der Zelladhäsion	Phase I	Phase II	Phase III
Schematische Darstellung der Zelladhäsion			
Transformation der Zellform	<p>Initialer Kontakt</p>	<p>Abflachung und Spreitung</p>	<p>Vollständige Spreitung und strukturelle Reorganisation</p>
Vermittlung der Zelladhäsion	Elektrostatische und VdW Anziehung	Integrin Bindung	Fokale Adhäsionspunkte
Adhäsionsphase	Sedimentierung	Zellhaftung	Zellspreitung und Stabilisierung

**Tabelle 2.1:**  
*Darstellung und Beschreibung der drei Phasen der Zelladhäsion auf einem Gewebe oder Substrat.*  
*(In Anlehnung an [13].)*

### 2.1.2. Lokomotion

Neben der Zelladhäsion ist die Zellmigration (lat. *migrare* „wandern“) eine wichtige Fähigkeit von Zellen. Die Art der Fortbewegung ist vom Zelltyp abhängig: *wellenförmig* (z. B. Ziliarkörper, Flagellarmotor), *muskular* (z. B. Muskelkontraktion), *amöboid* (z. B. Lymphozyten, Neutrophile) und *mesenchymal* (z. B. Stammzellen, Krebszellen). In der mesenchymalen Fortbewegung modifizieren die Zellen ihr Aktin-Zytoskelett, um ihre Position auf der Oberfläche durch Kriechen zu verändern [18]. Sowohl auf einer 2D- als auch auf einer 3D-EZM erfolgt die Migration durch zyklische Wiederholung der folgenden, wechselseitig voneinander abhängigen Schritte (vgl. *Abb. 2.1.*) [18, 23, 24]:

1. Zellpolarisierung und Ausbildung von F-Aktin-reichen Ausstülpungen (Filopodien, Lamellipodien) in die gewünschte Richtung durch Aktin-Polymerisation.
2. Stabilisierung dieses Pseudofüßchens durch Bildung von Zell-Matrix-Interaktionen (Adhäsion an die EZM) und fokalen Komplexen aus Integrinen, Zytoskelett- und Signalproteinen.
3. Rekrutierung von Oberflächenproteasen zu EZM-Kontakten, Aktivierung des Aktin-Myosin-Netzwerkes (fokale Proteolyse, d.h. Spaltung von Proteinen). Auflösung der hinteren fokalen Adhäsionsdomänen durch „Abschalten“ der Integrinbindungen.
4. Myosin-II-vermittelte Kontraktion der Zelle durch Interaktion mit dem Aktinzytoskelett.
5. Ablösung des hinteren Teils der Zelle vom Substrat und Einzug der Rückseite der Zelle. Verschiebung des Schwerpunktes um einige Mikrometer.



**Abbildung 2.1:**

*Mechanismen zur Zellmigration. (A) Zellpolarisierung durch verschiedene Proteine. Gerichteter Vesikeltransport zur Zellenfront mit Organisation von Mikrotubuli und Ausrichtung des Golgi-Apparates vor dem Zellkern. (B) Bei der Ausbildung der Pseudofüßchen beginnt die Migration. Durch Bildung fokaler Adhäsionspunkte aus Integrinen werden die Ausstülpungen stabilisiert. (C) Kontraktion der Zelle durch fokale Proteolyse, wodurch sich die Zelle am hinteren Ende ablöst. (Modifiziert aus [25]).*

Diese aktive Ortsveränderung (*Lokomotion*) kann in einer ungerichteten Spontanbewegung (*random migration*) oder bedingt durch äußere Einflüsse gerichteten Bewegung (*guided migration*) stattfinden. Eine gerichtete Bewegung kann über äußere Einflüsse und Gradienten in den Umgebungseigenschaften erreicht werden. Bedingt durch einen chemischen Gradienten (*Chemotaxis*), wie z. B. ein Konzentrationsgradient der Inhaltsstoffe (z. B. Peptid-Wachstumsfaktoren [26]), eine unterschiedliche Steifigkeit des bewachsenen Materials (*Durotaxis*) [27], ein elektrisches Feld (*Elektrotaxis*) [28] oder mechanische Scherkräfte (*Mechanotaxis*) [29], können die Ursachen einer gerichteten Bewegung sehr unterschiedlich sein.

### 2.1.3. Reaktive Sauerstoffspezies – Der zelluläre Stress

Freie Radikale – sie sind eine chemische Spezies mit einem ungepaarten Elektron in der Außenschale. Extrem instabil in ihrem chemischen Zustand können freie Radikale leicht mit anorganischen und organischen Chemikalien reagieren. Innerhalb einer Zelle beschädigen freie Radikale beispielsweise die Nukleinsäure, zelluläre Proteine oder Lipide. Durch die Reaktion mit weiteren Molekülen, welche sich wiederum leicht in Radikale umwandeln lassen, wird eine schädigende Kettenreaktion in der Zelle ausgelöst.

*Reactive oxygen species* – Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Art der aus Sauerstoff hervorgegangenen freien Radikale und nehmen eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus, aber auch in der Zellschädigung ein. ROS werden in der Physiologie der Zelle in geringen Mengen durch Redox-Reaktionen bei der mitochondrialen Atmung (Atmungskette) erzeugt. Zur Verringerung zellulärer Schädigungen besitzen Zellen mehrere antioxidative Mechanismen (enzymatische und nichtenzymatische Radikalfänger und Antioxidantien), um freie Radikale zu entfernen. So werden im Regelfall die kurzlebigen, toxischen Zwischenprodukte der Superoxid-Radikale ( $O_2\cdot^-$ ) unter anderem spontan oder unter Beteiligung des Enzyms Superoxid-Dismutase in Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt.  $H_2O_2$  ist stabiler als  $O_2\cdot^-$ , kann biologische Membranen durchdringen und somit die Zelle verlassen oder wird wiederum durch das Enzym *Catalase* in Wasser und Sauerstoff zerlegt. Ist die Produktion von ROS aufgrund äußerer Einflüsse erhöht oder ist das Reinigungssystem ineffektiv, so steigt die Konzentration der freien Radikale stark an und führt zu einer Schädigung aller zellulären und extrazellulären Makromoleküle. Dies resultiert in einen zellulären Zustand, welcher *oxidativer Stress* genannt wird [30]. Allerdings können ROS in der zellulären Signalkaskade auch als sekundärer Botenstoff fungieren und wichtige physiologische Prozesse beeinflussen [31].

### 2.1.4. Zellzyklus

Wie alles Leben auf dem Planeten ist auch für die Zelle die Lebensdauer durch ihre Entstehung und ihren Niedergang zeitlich begrenzt. Aus diesem Grund besitzt sie die Fähigkeit zu wachsen und sich zu vermehren. Ist ihr Lebensende erreicht oder unterliegt sie schadhafte äußeren Einflüssen (sog. *Noxen*), so geht eine Zelle zugrunde. Im Folgenden wird der Zyklus einer eukaryotischen Zelle beschrieben und dabei die Abläufe der Reproduktion und die Arten und Ursachen des Zelltodes beschrieben.

#### **Proliferation**

Zellproliferation ist durch das Zellwachstum und die Zellvermehrung gekennzeichnet. Proliferation leitet sich aus dem lateinischen *proles* – „Nachwuchs“, „Sprössling“ und *ferre* – „tragen“ ab und beschreibt den streng kontrollierten zyklischen Ablauf von Ereignissen, mit dem Ziel der identischen Verdopplung in zwei Tochterzellen. Der Zyklus kann in vier Stadien untergliedert werden: Beginnend mit der **G1-Phase** (engl. *gap*-Lücke) findet ein Zellwachstum und die RNA- und Proteinsynthese statt, welches 3-12 Stunden (h) beansprucht. In der darauffolgenden **S-Phase**, der Synthese-Phase, wird die DNA-Replikation, Zentriol-Teilung und die Synthese der Histone durchgeführt, was zu einer Verdoppelung des diploiden hin zu einem tetraploiden Chromosomensatz führt (Dauer: 8-12h).

Anschließend führt die Zelle in der **G2-Phase** eine Art Qualitätssicherung durch. Hierbei wird die Replikationsgenauigkeit überprüft und ggf. eine Fehlpaarungsreparatur innerhalb von 1.5-3 h durchgeführt. In der abschließenden **M-Phase**, der Mitose-Phase, werden die Chromatiden getrennt und auf zwei Tochterzellen aufgeteilt. Dies geschieht in 0.5-1 h. Abhängig vom Differenzierungsgrad, der Konzentration von Wachstumsfaktoren oder der Populationsdichte können Zellen in die **G0-Phase** eintreten (Quieszenz). In diesem ruhenden Zustand findet keine Zellteilung mehr statt, jedoch weiterhin ein normaler Zellmetabolismus [32].

Der Prozess der Zellproliferation wird u. a. durch eine Vielzahl verschiedener äußerer Umweltfaktoren beeinflusst und reguliert. Dies beinhaltet Faktoren wie die Nährstoffversorgung, Temperatur, pH und Sauerstoffversorgung oder die Stimulierung intrazellulärer Signalkaskaden durch Wachstumsfaktoren und Hormone. In multizellulären Eukaryoten liegt eine Balance zwischen positiven und negativen Steuermechanismen vor, die die Proliferationsrate kontrollieren. In einem Epithelgewebe ist die Zelladhäsion ein derartiger Mechanismus. Die dichte Zelladhäsion führt zu einer Reduktion der Proliferation aufgrund der Kontakthemmung. Durch den Verlust der Zelladhäsion, beispielsweise bedingt durch eine Läsion, nimmt die Proliferation im Rahmen der Wundheilung wieder zu.

Doch auch über intrazelluläre Kontrollmechanismen wird die Zellproliferation geregelt. Erleidet die DNA eine Schädigung während der G1-Phase, so verhindern intrazelluläre Steuerelemente eine weitere Zellteilung [33].

Der komplexe Mechanismus der Zellproliferation ist hingegen bei entarteten Zellen nicht mehr reguliert. Veränderungen in der Signalkaskade, bedingt durch Mutationen und/oder epigenetische Veränderungen, führen zu einer Unabhängigkeit von äußeren Stimulantien. Die Folge ist eine erhöhte Proliferation und eine Unterdrückung der Apoptose und von Tumor-Suppressor-Genen, sodass ein Fortbestehen und Wachstum des Tumorgewebes gesichert ist [34]. Dies führt schließlich zur unkontrollierten Zellteilung und somit der Bildung eines Tumorgewebes.

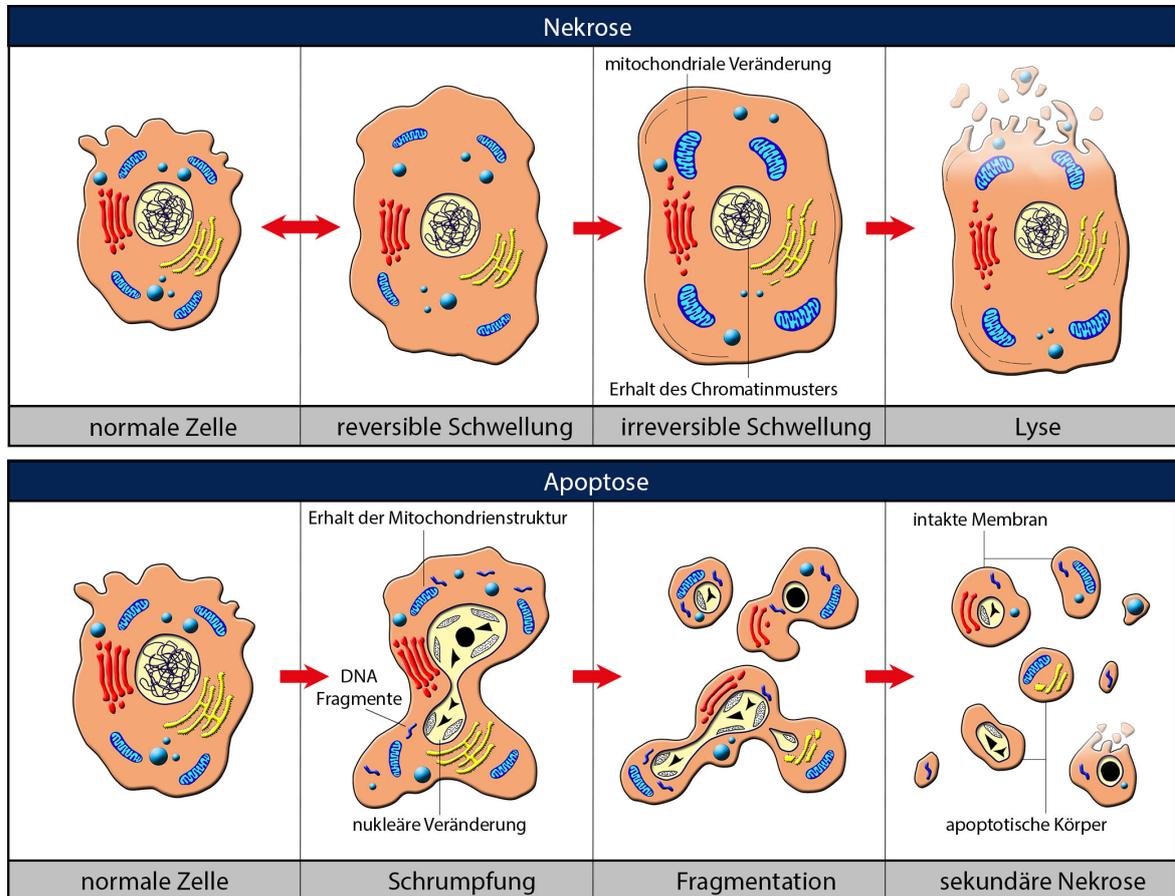
### Apoptose

Die Lebenszeit ist wie bei fast allen komplexen Organismen auch für eine Zelle zeitlich begrenzt. Das reguläre Ende des Lebenszyklus einer Zelle ist der kontrollierte Zelltod durch Apoptose, aus dem Griechischen: *apo* = *ab* oder *los* und *ptosis* = *Senkung* oder *Niedergang*. In der Apoptose werden Enzyme (sog. Caspasen) aktiviert, die zum Abbau der DNA und von nuklearen und zytoplasmatischen Proteinen führen. Während der anschließenden Zellfragmentierung verbleibt die Zellmembran intakt, wodurch kein intrazelluläres Medium austreten kann und somit keine Entzündung und Schädigung benachbarten Gewebes stattfindet. Die zurückbleibenden Membranvesikel, auch „apoptotische Körperchen“ genannt, werden anschließend durch Phagozyten (z. B. Makrophagen) phagozytiert. Dieser Vorgang ist aus physiologischer Sicht unerlässlich, denn so können Zellen die ihren Nutzen verloren haben, oder solche, die potenziell schädlich sind, aus einem Organismus sicher entfernt werden. Allerdings kann der programmierte Zelltod auch durch pathologische Ereignisse wie Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, UV-Strahlung oder Hitze aktiviert werden, sofern das Ausmaß der Schädigung eine Apoptose noch zulässt [30].

### Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose stets ein pathologischer Prozess. Bei dem passiven Vorgang der Nekrose werden die Zellen durch exogene Noxen so stark geschädigt, dass eine Reparatur der Schädigung oder ein kontrolliertes Absterben nicht mehr möglich ist. Meist gehen die Zellen aufgrund von äußeren Einflüssen wie Strahlung, Vergiftung oder mechanischer bzw. thermischer Schädigungen zugrunde. Bei der Nekrose findet keine Vesikelbildung, sondern eine völlige Zellyse statt. Durch den vollständigen Verlust der Membranintegrität werden die intrazellulären Bestandteile freigesetzt.

Dies führt zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe. Da in der Regel in Zellkulturen *in vitro* keine Phagozyten vorhanden sind, kann bei einem apoptotischen Zelltod ebenfalls ein nekrotischer Zelltod folgen (sekundäre Nekrose). Wird ein apoptotisches Körperchen nicht phagozytiert, so folgt dessen Lyse [30, 35].



**Abbildung 2.2:**

Schematische Darstellung des Zelltodes, welche je nach Ursache kontrolliert durch die Apoptose oder unkontrolliert durch die Nekrose stattfinden kann. Werden die apoptotischen Körperchen nach der Apoptose nicht phagozytiert, findet wie bei der Nekrose im Anschluss eine Lyse der Zellmembran statt. Das Zytoplasma wird hierbei extrazellulär freigesetzt. (In Anlehnung an [36]).

### 2.1.5. Zellkultur und Zelltypen

Komplexe Organismen wie der Mensch entwickeln sich während der Embryogenese aus drei Keimblättern. Das Endo- (inneres), Meso- (mittleres) und Ektoderm (äußeres Keimblatt) bilden die Grundlage für die weitere Entwicklung der Organe und der verschiedenen Strukturen im Organismus. Die hierbei entstehenden Zell- und Gewebetypen sind angepasst an ihre spezifischen Aufgabe und unterscheiden sich in ihrer Funktion, Aufbau, Lebenserwartung oder Abstammung.

Pflanzliche oder tierische Zellen können auch außerhalb eines Organismus in Zellkulturgläsern (*in vitro*) in speziellen Nährlösungen kultiviert werden. Diese sogenannten Zellkulturen werden anhand ihrer Eigenschaften und Herkunft unterschieden. Zellen, die direkt aus einem Spenderorgan durch Sezierung (engl. *Dissection*) entnommen wurden, werden als *Primäre Zellkultur* bezeichnet und weisen meist noch die volle metabolische Kapazität des Ursprungsorgans bzw. -gewebes auf. Die Teilungsfähigkeit von Zellen aus einer Primärkultur ist allerdings aufgrund des *Hayflick-Limits* zeitlich begrenzt (Seneszenz) wodurch die Zellkultur von limitierter Lebensdauer ist. Permanente, unbeschränkt teilungsfähige Zellkulturen entstehen durch spontane oder induzierte Zelltransformation. Diese unvergänglichen, käuflich erwerblichen *Zelllinien* weisen gleichbleibende Eigenschaften und eine konstante Zellteilungsrate auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit der geforderten Eigenschaften unterschiedlichste Zellen aus Primärkulturen und Zelllinien verwendet, welche nun im Folgenden kurz beschrieben werden.

#### Osteosarkom – SaOs-2

Entnommen aus einem primären Osteosarkom, weist die Zelllinie *sarcoma osteogenic – SaOs-2* (ECACC Cat.No.: 89050205) ähnliche Eigenschaften wie Osteoblasten auf. SaOs-2-Zellen sezernieren ebenfalls EZM-Proteine des Osteoids, welches als Grundgerüst des Knochens dient. Diese Zelllinie wird daher häufig in der Forschung für osteoblastische Modelle verwendet. Die leicht zu kultivierenden adhärennten Zellen wachsen in Monoschichten mit einer Generationszeit von 43 h [37]. Die mesodermale Zelllinie weist keine Polarität, jedoch eine hohe Motilität und schwache Zell-Zell-Kontakte (engl. Gap-junctions) auf [38]. Da es sich um ein Tumorgewebe handelt, ist die Lebensdauer der Zellkultur *in vitro* nicht limitiert.

#### Madin-Darby Canine Kidney – MDCK-II

Die Zelllinie *Madin-Darby Canine Kidney – MDCK-II* (ECACC Cat.No.: 00062107) wurde erstmals 1966 charakterisiert und wird seitdem für die Untersuchung der Entwicklung und der Funktion des Epithelgewebes in der Forschung intensiv verwendet. Sie weist eine deutliche apico-basolaterale Polarität, wohl definierte Zell-Zell-Kontakte und eine hohe Wachstumsrate auf [39]. Die im Kollektiv migrierenden Zellen eignen sich daher ideal für die Untersuchung des epithelialen Heilungsverlaufs.

#### Zervixkarzinom – HeLa

Die in der Grundlagenforschung weit verbreitete immortalisierte Zelllinie *HeLa* (ECACC Cat.No.: 93021013) entstammt einem Adenokarzinom der Zervix. Es handelt sich hierbei um eine leicht zu kultivierende, robuste, adhärennte und langzeitstabile permanente Zelllinie. Die Bezeichnung *HeLa* leitet sich aus den Anfangsbuchstaben des Namens der Zelldonorin *Henrietta Lacks* ab. Die 1951 während einer Biopsie entnommenen Zellen stellen die erste durch den Wissenschaftler George Otto Gey erfolgreich etablierte Zelllinie in der Geschichte dar. Die Epithelzellen sind ein wichtiges Modellsystem in der biomedizinischen Forschung, die bereits in mehr als 74.000 Publikationen<sup>1</sup> in PubMed erwähnt wurden [40].

---

<sup>1</sup>Stand 2013

### **Human Embryonic Kidney – HEK293 T-REx<sup>TM</sup>**

Die Zelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney) ist ein Transformationsprodukt einer humanen embryonalen Nierenzelle durch die Infektion des Adenovirus Typ 5. Durch die virale Transfektion wurden Teile des adenoviralen Genoms in das humane Chromosom 19 aufgenommen [41]. Die permanente, adhärenz in einer Monolage wachsende Zellkultur ist seither die in der Forschung am zweithäufigsten verwendete Zelllinie, da sie leicht zu handhaben ist, eine hohe Reproduktionsrate (Generationszeit ca. 24 h) und Tendenz zur erneuten Transfektion aufweist [42]. Die HEK293 T-REx<sup>TM</sup> (T-REx: Tetracycline-Regulated Expression) ist eine zur HEK293 modifizierte Zelllinie und erlaubt eine per Tetracyclin (hier Doxycyclin) regulierte Expression von spezifischen Genen [43].

### **Primäre Neuronen**

Die auf die Erregungsleitung und Erregungsübertragung spezialisierte Nervenzelle kommt in nahezu allen vielzelligen Tieren vor. Zusammen mit den Gliazellen (griech. *glia*, „Leim“) bilden Neuronen das Nervensystem. Typische Säugetier-Neuronen bestehen aus einem Zellkörper (Perikaryon), Dendriten und einem Axon [44]. Während meist aus einer Nervenzelle mehrere Dendriten wachsen, besitzt ein Neuron immer nur ein Axon. Die Länge der Dendriten liegt bei einigen hundert Mikrometern. Sie sind oft verzweigt und empfangen die Signale anderer Neuronen. Ein Axon hingegen kann bis zu mehrere Meter lang werden und dient der Signalübertragung von dieser zu anderen Zellen. Die Gesamtheit der Dendriten und des Axons wird als neuronale Auswüchse bezeichnet. Neuronen entwickeln sich aus den Neuroblasten. Während die neuronale Vorläuferzelle noch teilungsfähig ist, verliert das vollständig ausdifferenzierte Neuron seine Fähigkeit, eine Zellteilung durchzuführen [45]. Die Gewinnung von primären Neuronen erfolgt durch Dissektion aus einem Spenderorgan.

### **B35 - Neuroblastomzellen**

Die permanente neuronale Zelllinie B35 (ATCC CRL-2754<sup>TM</sup>) wurde 1974 von Schubert et al. aus einem Neuroblastom des zentralen Nervensystems einer BDIX Ratte entnommen und etabliert [46]. Der Entwicklungszustand einer unbehandelten B35-Zelllinie lässt sich als moderat vordifferenziert und multipotent beschreiben und entspricht somit dem frühen Entwicklungsstadium neuronalen Gewebes. In der Zellkultur wachsen B35-Zellen schwach anhaftend auf der Substratoberfläche, besitzen einen rundlichen Zellkörper (Perikaryon) und kurze Fortsätze. Durch die Zugabe von zyklischem Dibutyryl Adenosin-3,5-Monophosphat (DcAMP) oder durch die Kultivierung in Nährmedien mit niedrigem Serumgehalt wird eine reversible Ausdifferenzierung der Zellen angestoßen. Während der hierbei stattfindenden morphologischen Änderung der Zellform liegt ein ausgeprägtes Neuriten-Wachstum vor. Im ausdifferenzierten Zustand weisen B35-Zellen ein erregbares regeneratives Aktionspotential auf und exprimieren Enzyme für die Neurotransmitter-Freisetzung wie beispielsweise Acetylcholinesterase [47]. Nach Beendigung der Exposition mit DcAMP ist der Differenzierungsprozess rückläufig und die Zellen erreichen ihre ursprüngliche Form.

## 2.2. Akustische Oberflächenwellen

Akustische Oberflächenwellen sind aus der heutigen Technologie nicht mehr wegzudenken. Ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten reichen von Frequenzfiltern über Sensoren bis hin zu Manipulatoren und Aktoren kleinster Flüssigkeitsmengen und Partikel. Akustische Oberflächenwellen (engl. *surface acoustic waves*, SAWs) zeichnen sich dadurch aus, dass die hochfrequenten Schallwellen auf der Oberfläche eines Festkörpers lokalisiert sind [48]. Obwohl erstmalig 1885 durch den britischen Physiker *John William Strutt, 3. Baron zu Rayleigh* theoretisch beschrieben, kam es erst durch die Entwicklung der interdigitalen Schallwandler (engl. *interdigital transducers*, IDTs) durch *White* und *Voltmer* im Jahre 1965 zu einem breiten Interesse in der Forschung und Industrie. Auf Basis des inversen piezoelektrischen Effekts kann durch ein gepulstes periodisches Signal, angelegt an der ineinandergreifenden Fingerstruktur des IDTs, eine akustische Oberflächenwelle angeregt und mit einer etwas entfernten, identischen IDT-Struktur detektiert werden [49]. Abhängig vom piezoelektrischen Substrat, vom Kristallschnitt und der Ausbreitungsrichtung der akustischen Oberflächenwelle, können unterschiedlichste Wellenmoden angeregt werden. Für sensorische Anwendungen etablierte sich das Substrat Lithiumtantalat ( $\text{LiTaO}_3$  36° rot YX-Cut) für die Anregung einer horizontal polarisierten Scherwelle (SH) und das Substrat Lithiumniobat ( $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut) für aktorische und manipulative Anwendungen auf Basis der vertikalen Substratauslenkung der Rayleigh-Welle (RW). Die vorliegende Arbeit bedient sich der akustischen Oberflächenwellen als Werkzeug zur Detektion, Manipulation und Stimulation lebender Zellen. Abhängig von der Zielsetzung werden unterschiedliche Substrate, Kristallschnitte und Ausbreitungsrichtungen der SAW verwendet. Um einen Überblick über die Eigenschaften der SAW zu erlangen, handelt dieser Abschnitt von den theoretischen Grundlagen akustischer Oberflächenwellen, deren Erzeugung und Propagation, den verschiedenen Wellenmoden und den Kristalleigenschaften der verwendeten Substrate. Die im ersten Abschnitt verwendeten Gleichungen wurden den Quellen [50–53] entnommen.

### 2.2.1. Akustische Wellenausbreitung auf einem Festkörper

Die Beschreibung der Ausbreitung akustischer Oberflächenwellen in einem piezoelektrischen Substrat basiert auf der Kontinuumstheorie, da die Ausdehnung der dabei auftretenden Moden sich um einige Größenordnungen von den interatomaren Abständen unterscheidet. Hierbei wird ein Festkörper in infinitesimale Volumenelemente  $dV$  mit den Koordinaten  $\vec{x}$  zerlegt. Wirkt auf ein Volumenelement  $dV$  eine Kraft (Spannung), so kommt es zur Auslenkung um den Verschiebungsvektor  $\vec{u}$  zu den neuen Koordinaten  $\vec{x}' = \vec{x} + \vec{u}$ . Sofern es sich nicht um eine Translation handelt, ändern sich hierbei die Abstände benachbarter Volumenelemente. Dies bedeutet, dass  $\vec{u}(\vec{x})$  und  $\vec{u}(\vec{x} + d\vec{x})$  verschieden sein müssen. Die hierbei stattfindende Deformation des Volumenelements wird durch den symmetrischen Deformations- und Verzerrungstensor  $S_{kl}$  beschrieben:

$$S_{kl} = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial u_k}{\partial x_l} + \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \right). \quad (2.1)$$

Das Hook'sche Gesetz ermöglicht eine Verknüpfung des Deformationstensors  $S$  mit dem Spannungstensor  $T$ . Unter der Vernachlässigung höherer Ordnungen erhält man einen verallgemeinerten linearen Zusammenhang der durch Einwirkung einer Spannung elastischen Deformation eines Festkörpers:

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl}. \quad (2.2)$$

Mit diesem Ansatz kann die Newtonsche Bewegungsgleichung eines *nicht-piezoelektrischen* Festkörpers aufgestellt werden [54, S.16]:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \sum_{j=1}^3 \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j} \quad i, j = 1, 2, 3 \quad (2.3)$$

dabei bezeichnet  $\rho$  die Dichte des Materials.  $T_{ij}$  ist der Spannungstensor 2. Stufe und beschreibt die Druck- und Zugspannungskomponenten in den Diagonalelementen  $T_{ii}$ , sowie die Scherkräfte in den Elementen  $T_{ij, i \neq j}$ .

Die Bindungsverhältnisse werden durch den Elastizitätstensor  $c_{ijkl}$  widerspiegelt. Dieser Tensor 4. Stufe enthält normalerweise 81 Komponenten, lässt sich aufgrund der Symmetrie des Spannungs- und Deformationstensors, sowie über das Poynting-Theorem der Akustik jedoch auf 21 unabhängige Einträge reduzieren. Wird ein isotroper Festkörper betrachtet, so sind es nur noch zwei:  $c_{11} = 2\mu + \lambda$  und  $c_{44} = \mu$  mit den Lamé-Parametern  $\lambda$  und  $\mu$ .

Durch die Zerlegung von  $\vec{u}$  in einen transversalen, divergenzfreien Anteil  $\vec{u}_t (\nabla \cdot \vec{u}_t = 0)$  und einen longitudinalen, rotationsfreien Anteil  $\vec{u}_l (\nabla \times \vec{u}_l = 0)$  mit  $\vec{u} = \vec{u}_l + \vec{u}_t$  sowie durch die Verwendung des Hook'schen Gesetzes für isotrope Festkörper können folgende Wellengleichungen aufgestellt werden [55]:

$$\frac{\partial^2 \vec{u}_l}{\partial t^2} = c_l^2 \nabla^2 \vec{u}_l \quad \text{bzw.} \quad \frac{\partial^2 \vec{u}_t}{\partial t^2} = c_t^2 \nabla^2 \vec{u}_t \quad (2.4)$$

mit  $c_l$  und  $c_t$  der longitudinalen und transversalen Ausbreitungsgeschwindigkeit.

Die Differentialgleichungen Gl. 2.4 können über den Ansatz einer ebenen Welle gelöst werden, die sich in  $x_1$ -Richtung ausbreitet<sup>2</sup>:

$$u_i(x_1, t) = u_{i,0} e^{i(k_0 x_1 - \omega t)}. \quad (2.5)$$

Über die Dispersionsrelation  $\omega = c * k_0$  ergeben sich abhängig von der Dichte des Materials  $\rho$  und den entsprechenden Komponenten des Elastizitätstensors folgende Ausbreitungsgeschwindigkeiten:

$$c_l = \sqrt{\frac{c_{11}}{\rho}} = \sqrt{\frac{2\mu + \lambda}{\rho}}, \quad c_t = \sqrt{\frac{c_{44}}{\rho}} = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}. \quad (2.6)$$

Durch Verwendung der Lamé-Parameter  $\lambda$  und  $\mu$  wird ersichtlich, dass sich longitudinale Wellen schneller ausbreiten als transversale Wellen ( $\sqrt{2}c_l > c_t$ ).

Für ein piezoelektrisches Material muss das Hook'sche Gesetz um den Beitrag des elektrischen Feldes  $\vec{E}$  durch den piezoelektrischen Tensor  $p_{kij}$  erweitert werden. Bei einer gegebenen Verformung führt die hervorgerufene Ladungstrennung durch den piezoelektrischen Effekt zu einer Reduktion der mechanischen Spannung:

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} - p_{kij} E_k. \quad (2.7)$$

$p_{kij}$  beschreibt hierbei die Kopplung der mechanischen Spannung an das elektrische Feld. Durch die Deformation werden die permanenten Dipolmomente des Piezoelektrikums verschoben und es gilt für die dielektrische Verschiebung  $\vec{D}$ :

$$D_i = \epsilon_{ij} E_j + p_{ijk} S_{jk}. \quad (2.8)$$

mit dem dielektrischen Tensor  $\epsilon_{ij}$  und der elektrischen Feldstärke  $\vec{E}$ . Wird das elektrische Feld  $\vec{E}$  durch das elektrische Potential  $\Phi$  gemäß

$$E_i = -\nabla_i \Phi = -\frac{\partial \Phi}{\partial x_i} \quad (2.9)$$

---

<sup>2</sup>Hierbei stellt  $i = \sqrt{-1}$  die imaginäre Zahl dar.

beschrieben und das Material als quellenfreies Medium ( $\nabla \vec{D} = 0$ ) betrachtet (keine freien Ladungsträger), liefern das erweiterte Hook'sche Gesetz (Gl. 2.7) und der Deformationstensor  $S_{kl}$  (Gl. 2.1), eingesetzt in die Bewegungsgleichung 2.4, vier gekoppelte Wellengleichungen. Während die ersten drei Wellengleichungen die mechanische Auslenkung  $u_j$  mit

$$\rho \frac{\partial^2 u_j}{\partial t^2} - c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_i \partial x_l} - p_{kij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_k \partial x_i} = 0 \quad (2.10)$$

beschreiben, stellt die vierte Wellengleichung das Potential dar:

$$p_{ikl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_i \partial x_l} - \epsilon_{ij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_j \partial x_i} = 0. \quad (2.11)$$

Wird ein Festkörper ohne Grenzflächen betrachtet, sind die Lösungen der Wellengleichungen 2.10 und 2.11 akustische Volumenwellen (*bulk acoustic waves, BAW*). Sobald allerdings eine Grenzfläche zum Vakuum vorliegt, beispielsweise  $x_3 = 0$ , müssen zusätzliche Randbedingungen berücksichtigt werden. Durch das Verschwinden der Einträge des Spannungstensors  $T_{ij}$  auf allen Flächen der Volumenelemente  $dV$  in  $x_3$ -Richtung mit

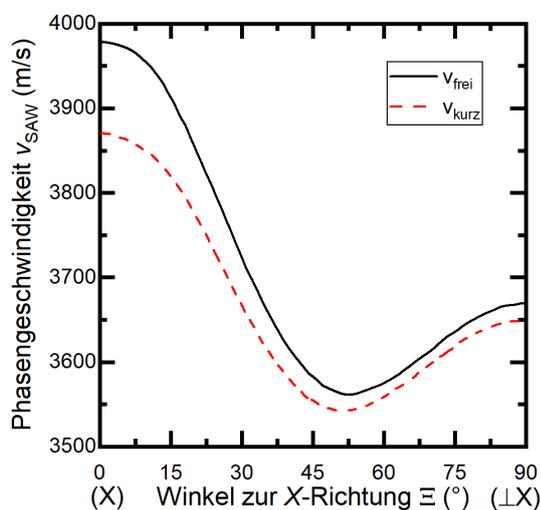
$$T_{31} = T_{32} = T_{33} = 0 \text{ für } x_3 = 0 \quad (2.12)$$

bilden sich neue Lösungen für die Wellengleichungen 2.10 und 2.11, die sogenannten akustischen Oberflächenwellen (engl. *surface acoustic waves, SAW*). Diese Wellen propagieren parallel zur Grenzfläche mit einer Phasengeschwindigkeit  $v_{SAW}$ . Konträr zur Dichtemodulation einer Volumenwelle, fällt die mechanische Auslenkung einer SAW und alle mit ihr verbundenen Größen exponentiell über die Größenordnung ihrer Wellenlänge in den Festkörper hinein ab. Die Energie der SAW ist somit weitgehend auf die Oberfläche beschränkt.

### 2.2.2. Anisotrope Materialien in der Akustik

Für die Anregung und Detektion elastischer Wellen sind piezoelektrische Materialien weit verbreitet. Da piezoelektrische Materialien naturgemäß anisotrop sind, hängen die Eigenschaften der elastischen Wellen stark von der Wahl der freien Kristalloberfläche, der Propagationsrichtung der akustischen Oberflächenwelle und den durch die Piezoelektrizität gegebenen Randbedingungen ab. Dies beeinflusst unter anderem die Form der Auslenkung, die Phasengeschwindigkeit (*Slowness*) und die Gruppengeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwelle.

Ist die Oberfläche eines piezoelektrischen Materials nichtleitend, so kommt es aufgrund der Piezoelektrizität zu einer Versteifung des Materials. Dies hat zur Folge, dass die Phasengeschwindigkeit  $v_{\text{SAW}} = v_{\text{frei}}$  für eine *freie* Oberfläche höher ist, als die Phasengeschwindigkeit  $v_{\text{SAW}} = v_{\text{kurz}}$  im nicht-piezoelektrischen (*kurzgeschlossen*) Fall. Der nicht-piezoelektrische Zustand wird erreicht, indem die Oberfläche durch eine dünne Metallschicht kurzgeschlossen wird. Je nach gewählter Ausbreitungsrichtung  $\vec{b}$  kann die Phasengeschwindigkeit der SAW verschieden sein, jedoch ist sie in der Hauptausbreitungsrichtung, der X-Richtung, am größten. Die Phasengeschwindigkeiten  $v_{\text{frei}}$  und  $v_{\text{kurz}}$  sind in Abhängigkeit des Winkels  $\Xi$  zwischen der X-Richtung und  $\vec{b}$  in *Abb. 2.3.* am Beispiel  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut dargestellt.



**Abbildung 2.3:**  
Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SAW auf  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut in Abhängigkeit der gewählten Ausbreitungsrichtung  $\Xi$  bei einer freien und kurzgeschlossenen Oberfläche. (Daten entnommen aus [56]).

$v_{\text{frei}}$  ist für alle Richtungen größer als  $v_{\text{kurz}}$  und nimmt in der Hauptausbreitungsrichtung X ein Maximum von  $v_{\text{frei}} = 3978 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  an [56]. Mit Hilfe der Phasengeschwindigkeiten  $v_{\text{frei}}$  und  $v_{\text{kurz}}$  lässt sich der elektromechanische Kopplungskoeffizient  $K_{\text{eff}}^2$  wie folgt berechnen:

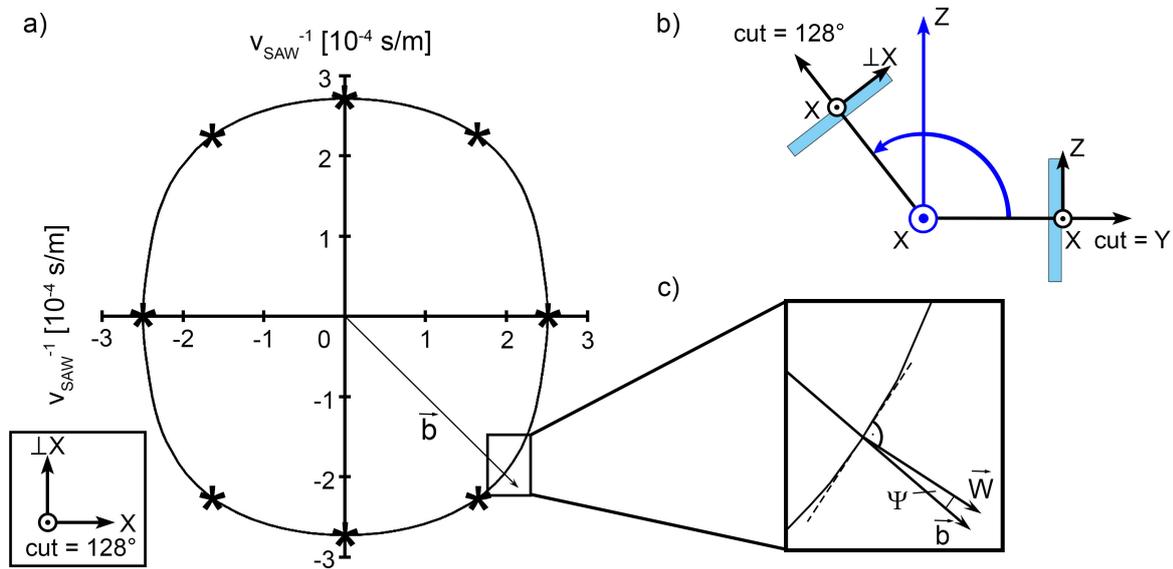
$$\frac{K_{\text{eff}}^2}{2} = \frac{v_{\text{frei}} - v_{\text{kurz}}}{v_{\text{frei}}}. \quad (2.13)$$

Dieser Koeffizient beschreibt die Effizienz der Wellenanregung durch ein elektrisches Feld.

Die Ausbreitungsrichtung  $\vec{b}$  einer Welle wird durch die Ausrichtung des anregenden Bauteils auf dem Substrat vorgegeben. Allerdings trifft dies nicht zwingend auf die Richtung des Energieflusses  $\vec{W}$  zu. Dieser kann zu  $\vec{b}$  verschieden sein und wird durch den Winkel  $\Psi$  (*Power-Flow-Angle*) dargestellt. Der Winkel  $\Psi$  kann in der sogenannten *Slowness-Kurve* durch Auftragen der gewählten Ausbreitungsrichtung  $\vec{b}$  und der Normalen der Slowness-Kurve am Schnittpunkt  $\vec{W}$  bestimmt werden. Diese in einem Polardiagramm dargestellte Kurve beschreibt die inverse Phasengeschwindigkeit  $1/v_{\text{frei}}$  aus *Abb. 2.3.* in Abhängigkeit der gewählten Ausbreitungsrichtung. In *Abb. 2.4.* ist die Slowness-Kurve

des piezoelektrischen Kristalls  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut dargestellt.

Liegt in dem Verlauf der Phasengeschwindigkeit ein Extrempunkt vor, so ist auch  $\Psi = 0$  und es wird eine reine Mode angeregt. Dies gilt im Fall von  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut für die X,  $\perp X$  und bei  $\Theta \approx 52^\circ$ . Die Ausbreitungsrichtungen, in denen reine Moden angeregt werden können, sind mit dem Symbol ( $\star$ ) markiert. Wird in den nicht markierten Richtungen eine SAW angeregt, so besteht diese aus einer Überlagerung verschiedener Moden [57].



**Abbildung 2.4:**

a) Slowness-Kurve für  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut. In X,  $\perp X$  und bei  $\Theta \approx 52^\circ$  können reine Moden angeregt werden und sind durch ( $\star$ ) markiert. b) Darstellung der Kristallschnittachse von  $\text{LiNbO}_3$   $128^\circ$  rot Y-Cut. c) Ausschnitt der Slownesskurve. Die Ausbreitungsrichtung  $\vec{b}$  ist abweichend von der Richtung des Energieflusses  $\vec{W}$  verschieden und wird durch den Power-Flow-Angle  $\Psi$  beschrieben. (In Anlehnung an [50]).

Die Substrate  $\text{LiNbO}_3$  und  $\text{LiTaO}_3$  und ihre verschiedenen Kristallschnitte zählen wahrscheinlich zu den populärsten Materialien für die SAW-Technologie. Die ferroelektrischen, durch das Czochralski-Verfahren gewachsenen, einkristallinen Werkstoffe weisen eine hohe dielektrische Konstante und ausgeprägte Piezoelektrizität auf. Durch die Wahl des Kristallschnittes kann unter anderem Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit  $v_{\text{SAW}}$ , den elektromechanischen Kopplungskoeffizienten  $K_{\text{eff}}^2$  und die erregbare Wellenmode genommen werden [58]. Abhängig von den geforderten Eigenschaften der akustischen Oberflächenwelle wurden in dieser Arbeit beide Substrate in unterschiedlichen Kristallschnitten verwendet. Die Materialeigenschaften und die erregbare Wellenmode in X-Richtung der kommerziell erwerblichen Kristallschnitte sind in Tab. 2.2. zusammengefasst. Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass die vorliegenden Daten nur für eine unbelegte, freie Substratoberfläche bei Raumtemperatur gelten und teilweise stark richtungsabhängig ( $\epsilon$ ,  $v$ , Wellenmode) sind.

Kristall	LiNbO <sub>3</sub>	LiNbO <sub>3</sub>	LiTaO <sub>3</sub>	LiTaO <sub>3</sub>
Kristallschnitt	128° rot Y-Cut	128° rot Y-Cut	36° rot X-Y-Cut	40° rot X-Y-Cut
$\vec{b}$	X	45°	X	X
Wellenmode	RW	RW / SH	SH	SH
$v$ [ $\frac{m}{s}$ ]	3989	3547	4150	4250 <sup>a</sup>
$\frac{K_{\text{eff}}^2}{2}$ [%]	5.22	1.95	4.7	-
$\rho$ [ $\frac{kg}{m^3}$ ]	4628	4628	7454	7454
$\epsilon_{11}, \epsilon_{33}$	85, 29	85, 29	51, 45	51, 45

**Tabelle 2.2:**

Materialeigenschaften der verwendeten anisotropen Substrate in ausgewählten Richtungen bei Raumtemperatur, frei und ohne Massenbelag. Daten wurden aus den Quellen [56, 59, 60] und [52, S.9] entnommen.

<sup>a</sup>Experimentell ermittelt.

### 2.2.3. Wellenmoden

Abhängig von dem verwendeten Material und dessen Randbedingungen können in Festkörpern verschiedene Oszillationsmoden erzeugt werden. Bei der akustischen Oberflächenwelle unterscheidet man zwischen zwei Lösungen: (i) Zum einen die Rayleigh-Mode, die eine Lösung in der Sagittalebene darstellt und durch ihre Ausbreitungsrichtung und Oberflächennormale definiert ist. (ii) Zum anderen die SH-Mode (*shear horizontal*, engl. Scherwelle), welche in der Oberfläche liegt und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung polarisiert ist. Wie bereits beschrieben, ist eine strikte Unterscheidung zwischen Rayleigh- und SH-Mode nur unter bestimmten Bedingungen auf einem Kristallschnitt möglich. Im Allgemeinen erhält man eine Überlagerung beider Moden [57].

Da in dieser Arbeit beide Wellenmoden Anwendung finden, werden diese Wellentypen kurz vorgestellt.

#### Rayleigh-Mode

Die reine Rayleigh-Mode kann auf der Substratoberfläche propagieren, wenn keine Kraft senkrecht zur Oberfläche des Festkörpers ( $T_{3j}|_{x_3=0}$ ) wirkt und sich das elektrische Feld entweder frei im Raum ausbreiten kann oder kurzgeschlossen ist [61]. Unter Berücksichtigung dieser Randbedingungen können die Wellengleichungen 2.10 und 2.11 für den isotropen Fall analytisch gelöst werden. Für  $x_3 \leq 0$  erhält man folgende Auslenkungen  $u_i$  [52]:

$$u_1 = A (e^{k\beta_1 x_3} - \gamma e^{k\beta_2 x_3}) e^{ik(x_1 - v_{\text{SAW}} t)} \quad (2.14)$$

$$u_2 = 0 \quad (2.15)$$

$$u_3 = -ik\beta_1 A (e^{k\beta_1 x_3} - \gamma^{-1} e^{k\beta_2 x_3}) e^{ik(x_1 - v_{\text{SAW}} t)} \quad (2.16)$$

mit  $\beta_1 = \sqrt{1 - \frac{v_{\text{SAW}}^2}{v_1^2}}$ ,  $\beta_2 = \sqrt{1 - \frac{v_{\text{SAW}}^2}{v_t^2}}$ ,  $\gamma = \sqrt{\beta_1 \beta_2}$ ,  $v_1 = \sqrt{\frac{C_{11}}{\rho}}$ ,  $v_t = \sqrt{\frac{C_{44}}{\rho}}$ , dem Wellenvektor  $\vec{k}$  und der Amplitude  $A$ . Die Geschwindigkeit  $v_{\text{SAW}}$  definiert sich durch

$$(\beta_2^2 + 1)^2 = 4\beta_1 \beta_2. \quad (2.17)$$

Die Rayleighwelle ist somit eine zweidimensionale Welle, die neben einem longitudinalen auch einen transversalen Anteil aufweist. Die Kombination dieser Anteile führt zu einer retrogeraden, elliptischen Oszillation der Oberflächenatome in der Sagittalebene (vgl. Abb. 2.5).

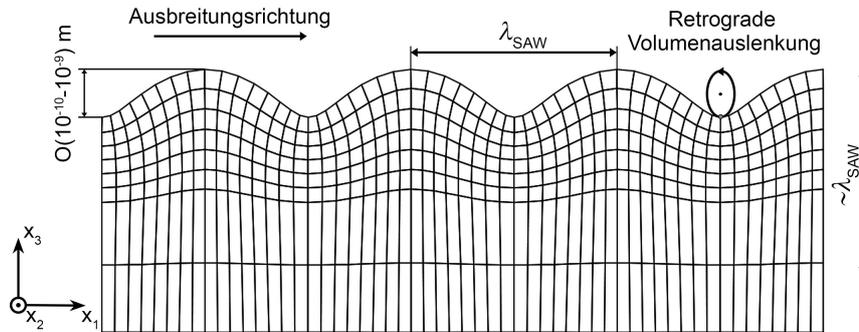
Für das mit der mechanischen Welle gekoppelte elektrische Potential  $\Phi$  für  $x_3 \leq 0$  gilt:

$$\Phi = \Phi_0 e^{kbx_3} e^{ik(x_1 - v_{\text{SAW}} t)} \quad (2.18)$$

mit der komplexen Zahl  $b$  mit  $\text{Re}(b) > 0$ . So folgt daraus für das elektrische Feld:

$$\vec{E} = -\vec{\nabla}\Phi = -k\Phi_0 e^{kbx_3} e^{ik(x_1 - v_{\text{SAW}}t)} \begin{pmatrix} i \\ 0 \\ b \end{pmatrix}. \quad (2.19)$$

Bei den typischen Wellenlängen von  $10\ \mu\text{m}$  bis  $100\ \mu\text{m}$  und einer Auslenkungen der Oberfläche von  $0,1\ \text{nm}$  bis  $1\ \text{nm}$  liegen die elektrischen Felder in Größenordnungen von  $10^6\ \frac{\text{V}}{\text{m}}$  bis  $10^7\ \frac{\text{V}}{\text{m}}$  vor.



**Abbildung 2.5:**

Darstellung der oszillierenden Bewegung der Volumenelemente einer in  $x_1$ -Richtung laufenden Oberflächenwelle. (In Anlehnung an [62]).

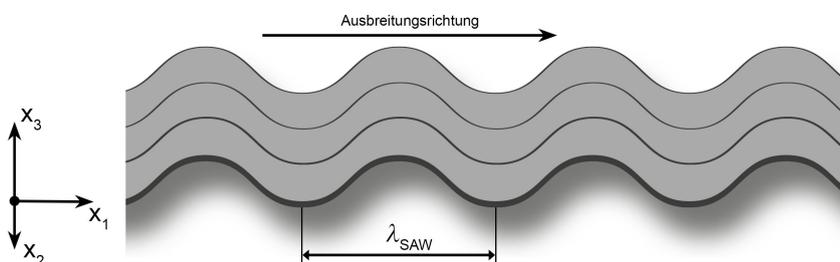
## SH-Welle

Die weitere typische Schwingungsmode in Festkörpern ist die Scherwelle (auch Transversalwelle genannt). Diese Mode ist eine horizontale Schwingungsmode, welche senkrecht zur Ausbreitungsrichtung polarisiert ist und eine vernachlässigbare  $x_3$ -Komponente besitzt. Sie besitzt somit keinen longitudinalen Anteil und ist eine reine transversale Mode (vgl. Abb. 2.6.). Die Scherwelle ist typischerweise eine Volumenwelle. Ist die akustische Energie an die Oberfläche gebunden und fällt das elektrische Feld exponentiell in das Volumen hinein ab, spricht man von einer sogenannten *Love-Welle*. Die Lösung der Wellengleichungen für  $x_3 \leq 0$  führt zu folgende Auslenkungen  $u_i$  ([52, 63]):

$$u_1 = A_1 e^{kx_3} e^{(kx_1 - \omega t)} \quad (2.20)$$

$$u_2 = A_2 e^{kx_3} e^{(kx_2 - \omega t)} \quad (2.21)$$

$$u_3 = 0. \quad (2.22)$$



**Abbildung 2.6:**

In  $x_1$ -Richtung propagierende Oberflächenwelle auf der  $x_1 - x_2$ -Ebene. Die Volumenelemente werden bei der horizontal polarisierten Scherwelle in  $x_2$ -Richtung ausgelenkt.

### 2.2.4. Erzeugung akustischer Oberflächenwellen und deren Superposition

In allen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die akustischen Oberflächenwellen mittels interdigitaler Schallwandler (IDTs) erzeugt. Als ein weit verbreitetes Instrument der SAW-Anregung finden sich in der Literatur detaillierte Beschreibungen. So sei an dieser Stelle auf folgende Dokumente verwiesen: *Surface Acoustic Wave Filters in Telecommunications* von David Morgan [64], *Acoustic Wave Sensors* von David S. Ballantine et al. [54], *Acoustic Waves: devices, imaging, and analog signal processing* von Gordon S. Kino [65] und *Surface Acoustic Wave Devices in Telecommunications* von Kenya Hashimoto [58]. Im Folgenden wird die Erzeugung akustischer Oberflächenwellen durch IDTs erklärt, die Bauteilberechnung beschrieben und die Entstehung zweidimensionaler Stehwellenfelder erläutert.

#### Interdigitale Schallwandler

Unterliegt ein piezoelektrisches Material einer elastischen Deformation, so entsteht ein makroskopisch messbares elektrisches Feld an den Grenzflächen des Materials. Der Ursprung dieses *direkten piezoelektrischen Effekts* liegt in der Verschiebung der Ladungsschwerpunkte und der hieraus resultierenden Ausbildung von Dipolen in dem verformten Material. Neben Einkristallen wie Quarz ( $\text{SiO}_2$ ),  $\text{LiNbO}_3$  oder  $\text{LiTaO}_3$  können nichtleitende ferroelektrische Materialien oder diverse Keramiken piezoelektrische Eigenschaften aufweisen.

Wird wiederum durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an den Grenzflächen des piezoelektrischen Materials die Oberfläche gestört, so kommt es aufgrund des *inversen piezoelektrischen Effekts* zu einer Verzerrung der Gitterstruktur. Diese Störung, in Form einer Gitterverzerrung, breitet sich vom Ort ihres Entstehens  $x_0$  mit der Schallgeschwindigkeit  $c$  des Materials aus.

Wird eine Wechselspannung mit der Frequenz  $f$  am Ort  $x_0$  angelegt, so wird eine periodische Störung  $T = \frac{1}{f}$  erzeugt, die nach einer Periode  $T$  eine Strecke von

$$p = \frac{c}{f} \tag{2.23}$$

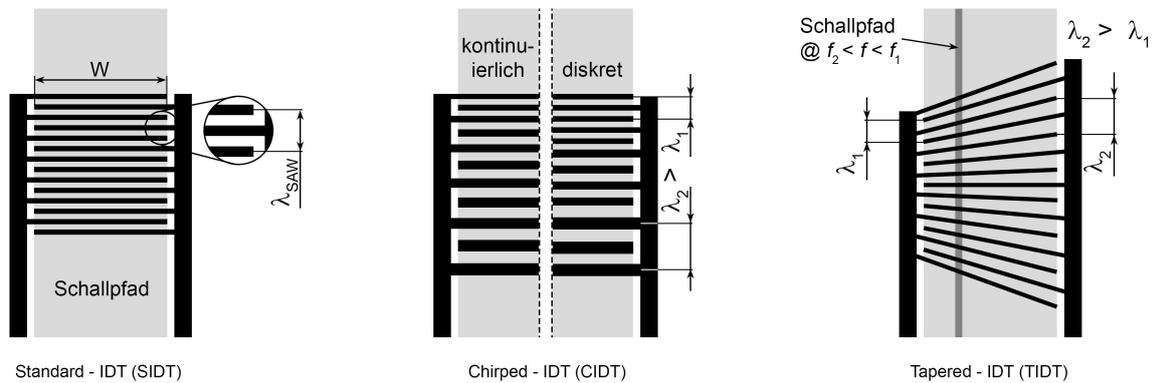
zurückgelegt hat. Durch eine erneute Anregung am Ort  $x_1 = x_0 + p$  zum Zeitpunkt  $t_n = nT$  mit  $n \in \mathbb{N}$  kann die hervorgerufene Gitterverzerrung verstärkt werden. Mit einer Elektrode, deren Kontakte sich auf den Positionen  $x_n = x_0 + np$  befinden, kann die Gitterverzerrung beliebig oft verstärkt werden. Diese sogenannten interdigitalen Schallwandler (IDTs) wurden erstmals von White und Voltmer 1965 [49] beschrieben und bestehen aus zwei kammartigen Strukturen (Elektroden), welche auf der Substratoberfläche aufgebracht werden und deren Finger ineinander greifen. Der periodische Fingerabstand  $p$  einer Elektrode definiert die Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}}$  der erregten SAW, während die Breite der Wellenfront durch die Länge der ineinander reichenden Finger, der sogenannten Apertur  $W$ , festgelegt ist. Für die Erzeugung einer SAW wird eine Elektrode auf Masse (*Ground*) gelegt und an die zweite Elektrode eine Wechselspannung (*HF*) mit der Frequenz  $f$  angelegt, die der Lösung der Gl. 2.23 in Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit  $c$  und dem periodischen Fingerabstand  $p$  entspricht. Die Phasengeschwindigkeit der SAW  $v_{\text{SAW}}$  ist die Schallgeschwindigkeit des Materials  $c$  und die Frequenz  $f$  entspricht der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$  der IDT-Struktur<sup>3</sup> und befindet sich hier im MHz-Regime.

Die Orientierung des IDTs auf der Substratoberfläche definiert des Weiteren die Ausbreitungsrichtung  $\vec{b}$  der SAW. Aufgrund der Symmetrie des Bauteils wird zu beiden Richtungen eine Oberflächenwelle angeregt. Dies führt vor allem in den mikrofluidischen und sensorischen Experimenten zu einem Verlust der eingekoppelten HF-Leistung, da die halbe Leistung ungenutzt verbleibt. Dies kann durch Reflektorstrukturen verhindert werden, da diese jedoch zusätzlichen Raum einnehmen und dieser nicht zur Verfügung stand, wurde in dieser Arbeit auf diese zusätzliche Komponente verzichtet. Zur effektiven

<sup>3</sup>Die Frequenz mit maximaler Leistungsaufnahme des IDTs kann von  $f$  verschieden sein.

Anregung von Oberflächenwellen können die Finger der IDT-Struktur noch weiter unterteilt werden. Diese IDT-Strukturen mit  $n$ -fach geteilten Fingern nennt man Split- $n$  IDT. In den nachfolgenden Experimenten werden allerdings nur Split-1 IDTs verwendet.

Die hier beschriebene IDT-Struktur mit konstantem Abstand und paralleler Ausrichtung der Finger wird als Standard-IDT (SIDT) bezeichnet. Abhängig von den Anforderungen existieren weitere Möglichkeiten der Wellenanregung durch unterschiedliche Strukturformen. So kann über *Tapered-IDTs* (TIDT) eine orts aufgelöste, über *Focused-IDTs* (FIDT) eine fokussierte und über *Chirped-IDTs* (CIDT) eine heterogene Anregung von SAWs erreicht werden. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Formen sei auf die oben genannte Literatur verwiesen, da mit Ausnahme einer speziellen Form des CIDTs<sup>4</sup> in Kap. 4.3.2. in dieser Arbeit nur SIDTs verschiedener Wellenlängen und Orientierungen verwendet wurden. Eine schematische Darstellung ausgewählter Strukturen ist in Abb. 2.7. abgebildet. Das gesamte Element, bestehend aus dem piezoelektrischem Material und der IDT-Struktur, wird im Folgenden als SAW-Chip bzw. SSAW-Chip bezeichnet.



**Abbildung 2.7:**

*Darstellung eines Standard-, Chirped- und Tapered-IDTs. Während bei einem SIDT nur eine Wellenlänge über die komplette Schallpfadbite angeregt werden kann, liegt bei einem CIDT und TIDT je nach Frequenz eine unterschiedliche Wellenlänge vor. Bei einem CIDT ist  $\lambda_{SAW}$  über die Schallpfadbite konstant, im Gegensatz zu einem TIDT, bei dem durch die Wahl der Frequenz die Position des Schallpfades für  $f$  mit  $f_2 \leq f \leq f_1$  festgelegt werden kann.*

## Impedanzanpassung und Leistung

In der Hochfrequenztechnik ist eine einheitliche Impedanz der Hochfrequenzbauteile essentiell. Sind die komplexen Widerstände  $Z_{el.,1}$ ,  $Z_{el.,2}$  der verwendeten Bauteile nicht aufeinander angepasst, so kommt es zur Reflexion des HF-Signals an der Schnittstelle zwischen beiden Bauteilen. Der Reflexionsfaktor  $R_{el.}$  beträgt dabei [66]

$$R_{el.} = \frac{Z_{el.,1} - Z_{el.,2}}{Z_{el.,1} + Z_{el.,2}}. \quad (2.24)$$

Die kommerziell in den Experimenten erwerbbar verwendeten HF-Komponenten und -Kabel besitzen eine standardisierte Impedanz von  $Z = 50 \Omega$ .

Da die Impedanz eines IDTs neben der Geometrie auch von dem Feldverlauf im piezoelektrischen Substrat abhängig ist, ist eine analytische Berechnung der Impedanz äußerst komplex. Eine Möglichkeit

<sup>4</sup>Der in dieser Arbeit verwendete CIDT besteht im Prinzip aus einer Aneinanderreihung verschiedener SIDTs unterschiedlicher Wellenlänge.

der Berechnung ist die sogenannte Quersfeldnäherung (engl. cross-field-model) [67]. Diese beschreibt den IDT mittels eines Ersatzschaltbildes, bestehend aus einer gemischten Schaltung aus ohmschen Widerständen und Kondensatoren und liefert relativ exakte Ergebnisse für SIDTs. Hierbei wird das elektrische Feld durch senkrecht laufende Feldlinien zwischen den Fingern angenähert. Die Impedanz eines IDTs  $Z_{\text{IDT}}$  bei der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$  kann durch Gl. 2.25 beschrieben werden:

$$Z_{\text{IDT}}(f_{\text{res}}) = \frac{1}{8K_{\text{eff}}^2(\Xi)f_{\text{res}}NC_t} \quad (2.25)$$

mit  $K_{\text{eff}}^2(\Xi)$  als richtungsabhängigen elektromechanischen Kopplungsfaktor (siehe Gl. 2.13) des piezoelektrischen Materials und  $N$  als Anzahl der Fingerpaare. Die Gesamtkapazität  $C_t$  ist abhängig von der Apertur  $A$  des IDTs und  $C_0$  der Kapazität eines Elektrodenpaars pro Längeneinheit:

$$C_t = C_0AN \quad (2.26)$$

Die Kapazität  $C_0$  lässt sich wiederum über das Metallisierungsverhältnis  $\xi$ , auch Tastverhältnis (Fingerbreite/Periode), des IDTs und der relativen Permittivität  $\epsilon_r$  des piezoelektrischen Substrates berechnen:

$$C_0 = (13.0\xi^2 + 2.16\xi + 4.74)(\epsilon + 1) \left[ \frac{\text{pF}}{\text{m}} \right] \quad (2.27)$$

Das Tastverhältnis der verwendeten IDTs ist stets  $\xi = 0.5$ . Eine detaillierte Beschreibung der Berechnung kann aus [64] und [58] entnommen werden.

Die angelegte HF-Leistung kann durch die Einheit „Milliwatt“ (mW) oder durch die logarithmische Einheit dBm ausgedrückt werden. Der Zusammenhang zwischen beiden Größen ist wie folgt definiert:

$$P(\text{dBm}) = 10 \log_{10} \frac{P(\text{W})}{1 \text{ mW}} \quad (2.28)$$

### Superpositionierung akustischer Oberflächenwellen

Durchlaufen zwei Wellenzüge mit gleicher Frequenz  $f = \frac{c}{\lambda_{\text{SAW}}}$  bzw. Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}}$  gegensätzlich dasselbe Raumgebiet, so entsteht durch Superpositionierung eine stehende Welle [68]. Das Ergebnis ist eine durch Interferenz erzeugte stehende Welle mit ortsfesten Bäuchen und Knoten (vgl. Abb. 2.8.). Im einfachsten Fall gleicher Amplituden entstehen ortsfeste Bäuche mit maximaler Amplitude und Knoten mit verschwindender Amplitude, deren Abstände eine halbe Wellenlänge betragen. Die resultierende Welle  $\phi_s$  lässt sich durch Addition der interferierenden Wellen unter Verwendung des Additionstheorems  $\sin(a) + \sin(b) = 2 \sin\left(\frac{a+b}{2}\right) \cos\left(\frac{a-b}{2}\right)$  berechnen.

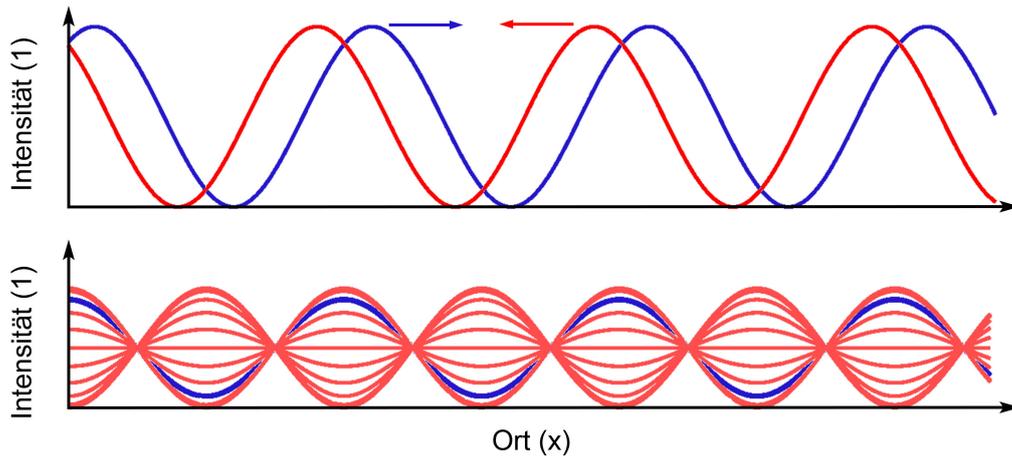
Propagieren zwei gegenläufige identische Wellen  $\phi_1$  und  $\phi_2$  in x-Richtung und weisen eine Phasenverschiebung von  $\delta = \frac{2\pi}{\lambda\Delta s}$  mit dem Gangunterschied  $\Delta s$  auf, so gilt für  $\phi_s$  [69]:

$$\phi_1(t, x) = A \sin(\omega t + kx) \quad (2.29)$$

$$\phi_2(t, x) = A \sin(\omega t - kx + \delta) \quad (2.30)$$

$$\phi_s(t, x) = \phi_1(t, x) + \phi_2(t, x) = 2A \sin\left(\omega t + \frac{\delta}{2}\right) \cos\left(kx - \frac{\delta}{2}\right) \quad (2.31)$$

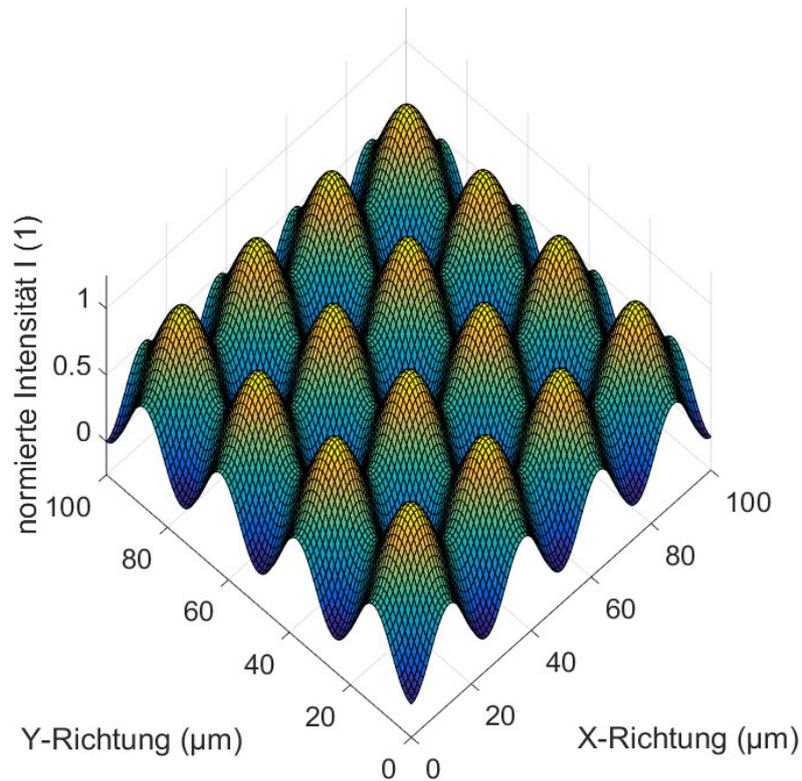
mit der Kreisfrequenz  $\omega$ , der Wellenzahl  $k = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda}$  und der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$ . Durch eine Änderung des Gangunterschiedes, beispielsweise beim eingekoppelten HF-Signal, kann eine Verschiebung des Stehwellenfeldes hervorgerufen werden.



**Abbildung 2.8:**

Entstehung einer Stehwelle durch Interferenz. Oben: links- und rechtslaufende Wellen zum Zeitpunkt  $t_1$ . Unten: Superposition der zwei Wellen. Die zum Zeitpunkt  $t_1$  vorliegende Welle ist farblich hervorgehoben. (In Anlehnung an [51]).

Durch eine weitere Überlagerung des Stehwellenfeldes in x-Richtung mit einer in y-Richtung gerichteten stehenden Welle kann ein zweidimensionales (2D) rasterförmiges Gitter aus Bäuchen und Knotenpunkten (vgl. Abb. 2.9.) generiert werden:



**Abbildung 2.9:**

Schematische Darstellung der normierten Intensität eines akustischen Stehwellenfeldes mit Bäuchen (Orte maximaler Amplitude) und Knoten (Orte minimaler Amplitude). (Entnommen aus [60]).

## 2.3. Wechselwirkung akustischer Oberflächenwellen mit Materie

Befindet sich im Schallpfad einer akustischen Oberflächenwelle ein Material, so findet eine Interaktion der Oberflächenwelle mit dem Material statt. Die Art und die Größenordnung der Interaktion ist hierbei abhängig von der gewählten Wellenmode und den Materialeigenschaften der Störung. In diesem Abschnitt soll nun ein Überblick über die physikalischen Grundlagen gegeben werden, die in den nachfolgenden Kapiteln Anwendung finden.

Während in *Kap. 3.* eine verlustarme Störung der Ausbreitung einer Oberflächenwelle für sensorische Anwendungen essentiell ist (vgl. *Kap. 2.3.2.*), soll in *Kap. 4.* die akustische Energie im Substrat durch Einkopplung in eine Flüssigkeit für die kontrollierte Manipulation von Objekten (vgl. *Kap. 2.3.4.*) verwendet werden. Abschließend werden in *Kap. 5.* die durch die Oberflächenwelle hervorgerufenen Stimulationsmechanismen auf eine Zellkultur untersucht.

Da hier die komplexen Grundlagen nur ausschnittsweise vorgestellt werden, wird an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen. Gute Zusammenstellungen und Übersichten von Theorie und Anwendung der Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Materie können z. B. in folgenden Schriftstücken gefunden werden: [70–74]. Des Weiteren werden die Grundgleichungen der Hydrodynamik (z. B. Kontinuitätsgleichung, Navier-Stokes-, Euler- und Bernoulli-Gleichung) als bekannt vorausgesetzt und können ggf. aus der Literatur entnommen werden: *Lehrbuch der Theoretischen Physik - VI Hydrodynamik* von *L.D. Landau* und *E.M. Lifschitz* [75].

### 2.3.1. Dämpfung akustischer Oberflächenwellen

Ist die Schichtdicke eines Materials (z. B. Wasser) im Schallpfad einer akustischen Oberflächenwelle gegenüber der Wellenlänge  $\lambda_{SAW}$  nicht mehr vernachlässigbar, so kommt es zu einer Dämpfung der Oberflächenwelle. Durch den Oberflächenbelag wird nicht nur die Geschwindigkeit  $v_{SAW}$  beeinflusst, sondern auch die Energie der Oberflächenwelle durch Wellenabstrahlung verringert. Die Einkopplung der akustischen Energie in das Oberflächenmedium ist dabei abhängig von den Bewegungskomponenten der Welle: Eine transversale Komponente normal zur Substratoberfläche erzeugt longitudinale akustische Wellen im Oberflächenmedium (out-of-plane Dämpfung  $\alpha_{op}$ ), während transversale und longitudinale Bewegungskomponenten durch die viskose Kopplung Scherwellen (in-plane Dämpfung  $\alpha_{ip}$ ) im Oberflächen-Medium erzeugen. Dieser Energieverlust kann nach [76] wie folgt beschrieben werden:

$$\alpha_{op} = \frac{\rho_F v_F}{\rho_{SAW} v_{SAW} \lambda_{SAW}} \quad (2.32)$$

$$\alpha_{ip} = \frac{\eta \rho_F}{4\pi \rho_{SAW}^2 v_{SAW}} \frac{1}{2} \lambda_{SAW}^{-\frac{3}{2}}. \quad (2.33)$$

$\rho_F$ ,  $v_F$  und  $\eta$  beschreiben die Dichte, Schallgeschwindigkeit und Viskosität der Flüssigkeit,  $\lambda_{SAW}$  die Wellenlänge der Oberflächenwelle sowie  $\rho_{SAW}$  und  $v_{SAW}$  die Dichte und Schallgeschwindigkeit des piezoelektrischen Materials. Die relevante Größe der 1/e-Abklinglänge ergibt sich aus dem Zusammenhang  $l^{Calc} = \alpha^{-1}$ .

Mit der Dichte  $\rho_F = 1 \text{ g/ml}$ , der Schallgeschwindigkeit  $c_F = 1480 \text{ m/s}$  und Viskosität  $\eta = 1 \text{ mPas}$  von Wasser ( $T = 20 \text{ °C}$ ) ergeben sich somit für ausgewählte Substrate und Ausbreitungsrichtungen  $\vec{b}$  folgende 1/e-Abklinglängen:

Substrat	$\vec{b}$	$l_{\text{op}}^{\text{Calc}}$ in $[1 \cdot \lambda_{\text{SAW}}]$	$l_{\text{ip}}^{\text{Calc}}$ in $[10^6 \cdot \lambda_{\text{SAW}}]$
LiNbO <sub>3</sub> 128° rot Y-Cut	X	12.5	1.03
LiNbO <sub>3</sub> 128° rot Y-Cut	45°	11.2	0.98
LiTaO <sub>3</sub> 36° rot YX-Cut	X	20.9	1.70

**Tabelle 2.3:**

1/e-Abklinglänge  $l^{\text{Calc}}$  akustischer Oberflächenwellen für ausgewählte Substrate und Richtungen durch Benetzung der Substratoberfläche mit einem Material.

Die 1/e-Abklinglänge  $l_{\text{ip}}$  kann wegen  $l_{\text{op}} \ll l_{\text{ip}}$  vernachlässigt werden. Dies ist besonders für Rayleigh-Welle relevant, da diese aufgrund der Substratauslenkung in z-Richtung durch die  $\alpha_{\text{op}}$ -Dämpfung innerhalb weniger Wellenlängen abklingt, wohingegen die Scherwelle nahezu unbeeinflusst über einen weiten Streckenabschnitt propagiert.

### 2.3.2. Sensorik mit Verzögerungsleitungen

Propagiert eine akustische Oberflächenwelle auf einer Substratoberfläche, deren Oberflächeneigenschaft durch Materialablagerung modifiziert wird, so erfährt die Welle eine Veränderung ihrer Ausbreitungseigenschaften. Durch die Interaktion der SAW mit einem auf der Oberfläche befindlichen Medium wird die Geschwindigkeit und/oder die Amplitude der SAW stark beeinflusst. Dieses Phänomen kann messtechnisch erfasst und ausgewertet werden und wird für die Realisierung und Anwendung sogenannter SAW-Sensoren verwendet. SAW-Sensoren sind prinzipiell gekennzeichnet durch die Fähigkeit eine akustischen Oberflächenwelle auf einem piezoelektrischen Substrat durch einen Send- und Empfangs-IDT zu erzeugen und zu detektieren. Über den Abstand der Mittelpunkte der IDT-Strukturen und somit der Laufstrecke  $l$  der SAW kann die absolute Größe der Beeinflussung eingestellt werden. Nach ihrer Erzeugung am Send-IDT wandert die Oberflächenwelle auf der Substratoberfläche und erreicht nach einer gewissen Zeit den Empfangs-IDT. Die hierbei auftretende Zeitverzögerung gibt der Laufstrecke des Bauteils ihren Namen: die Verzögerungsleitung (engl. *delay line*).

In sensorischen Anwendungen gilt grundsätzlich: Wellenmoden, bei denen die akustische Energiedichte nahe der Substratoberfläche konzentriert ist, sind für sensorische Applikationen besser geeignet. Je größer der Anteil der an der Sensoroberfläche gebundenen Energie ist, desto höher ist die Sensitivität gegenüber Veränderungen auf der Substratoberfläche [77]. Diese Anforderung erfüllen die drei am häufigsten verwendeten SAW-Sensoren und können in folgende Klassen untergliedert werden: *Rayleigh-SAW*-, *Lamb-Wave*- und *Love-Wave*-Sensoren. Alle drei Klassen besitzen unterschiedliche Vor- und Nachteile, besonders bezüglich der Dämpfung in Flüssigkeiten. Während *Rayleigh-SAW*- und *Lamb-Wave*-Sensoren eingeschränkt aufgrund ihrer Dämpfungseigenschaften hauptsächlich als Gas-Sensoren verwendet werden, etablierten sich *Love-Wave*-Sensoren als die sensitivsten akustischen Sensoren [78].

*Love-Wave*-Sensoren nutzen die SH-Mode, um Dämpfungsverluste zu minimieren und weisen eine solide Deckschicht als Wellenleiter auf der Oberfläche des piezoelektrischen Substrats auf. Besitzt der Wellenleiter eine niedrigere Schallgeschwindigkeit als das piezoelektrische Substrat wie bspw. SiO<sub>2</sub>, so koppelt die Scherwelle in die Führungsschicht (engl. *guiding-layer*) ein. Hierbei wird die akustische Energie an der Oberfläche konzentriert und somit die Sensitivität des Sensors als Funktion der Schichtdicke erhöht [79]. Typischerweise wird für *Love-Wave*-Sensoren das piezoelektrische Material LiTaO<sub>3</sub> 36° rot YX-Cut verwendet.

Allgemein lässt sich eine Oberflächenwelle  $\vec{u}(x,y,z,t)$ , die sich in  $x$ -Richtung ausbreitet, durch Gl. 2.34 darstellen:

$$\vec{u}(x,y,z,t) = \vec{u}_0(y,z)e^{i\omega t - \gamma x} \quad (2.34)$$

mit  $\gamma$  als komplexen Ausbreitungsfaktor einer Welle, welcher sich über die Dämpfungskonstante  $\alpha$  und der reellen Wellenzahl  $k$  beschreiben lässt:

$$\gamma = \alpha + ik = \alpha + i\frac{\omega}{c} \quad (2.35)$$

Erfährt die Oberfläche des Sensors eine Modifikation, so ändert sich der Ausbreitungsfaktor und es gilt bei konstanter Frequenz in  $k_0$ -normierter Form [80]:

$$\frac{\Delta\gamma}{k_0} = \frac{\Delta\alpha}{k_0} - i\frac{\Delta c}{c_0} \quad (2.36)$$

wobei  $k_0$  und  $c_0$  die Wellenzahl und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der ungestörten Wellen darstellen. Anhand von Gl. 2.36 wird ersichtlich, dass die in der Sensorik wichtigsten Parameter der Schallwelle die Amplitudendämpfung  $\Delta\alpha/k_0$  pro Wellenzug und die relative Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $\Delta c/c_0$  sind.

Im Allgemeinen gibt es eine Vielzahl diverser Einflüsse auf das SAW-Signal, die jeweils einen Beitrag zur Gesamtänderung des Signals liefern. Hierunter fallen Änderungen im Massenbelag  $m$ , der Dichte  $\rho$ , der Viskosität  $\eta$ , des Schermoduls  $G$ , der Leitfähigkeit  $\sigma$ , der Permittivität  $\epsilon$ , der Temperatur  $T$  und des Drucks  $p$ . Diese sind in Gl. 2.37 zusammengefasst [53]:

$$\frac{\gamma}{k_0} = \frac{1}{k_0} \left( \frac{\partial\gamma}{\partial m}\Delta m + \frac{\partial\gamma}{\partial\eta}\Delta\eta + \frac{\partial\gamma}{\partial\rho}\Delta\rho + \frac{\partial\gamma}{\partial G}\Delta G + \frac{\partial\gamma}{\partial T}\Delta T + \frac{\partial\gamma}{\partial p}\Delta p + \frac{\partial\gamma}{\partial\sigma}\Delta\sigma + \frac{\partial\gamma}{\partial\epsilon}\Delta\epsilon \right) \quad (2.37)$$

Wird der komplexe Ausbreitungsfaktor gemessen, so wird stets eine Überlagerung aller Einzelbeiträge erfasst. Die Beschreibung der relevanten Beiträge und deren Einflüsse auf die SAW-Propagation wird an geeigneter Stelle in Kap. 3.4. genauer erläutert. Als weiterführende Literatur werden folgende Arbeiten empfohlen: [53], [54], [77], [78], [81] und [82].

### 2.3.3. Acoustic streaming in Flüssigkeiten

Ein Volumenelement einer Flüssigkeit, durch die eine Schallwelle propagiert, kann durch Druck- und Geschwindigkeitsoszillationen beschrieben werden. Während in idealen Flüssigkeiten die mittlere Partikelauslenkung verschwindet, ist die pro Periode zurückgelegte Nettodistanz bei realen Flüssigkeiten bedingt durch die viskose Dämpfung ungleich Null. Dieser lokale akustische Effekt zweiter Ordnung äußert sich schließlich in der Formation einer globalen Strömung – des *acoustic streaming* – in viskosen Flüssigkeiten. Die Geschwindigkeit, Längenskala und Geometrie der Strömung ist hierbei abhängig von dessen Wellenlänge, die wirkenden Dämpfungsmechanismen, sowie von der Schichtdicke der Flüssigkeit [83].

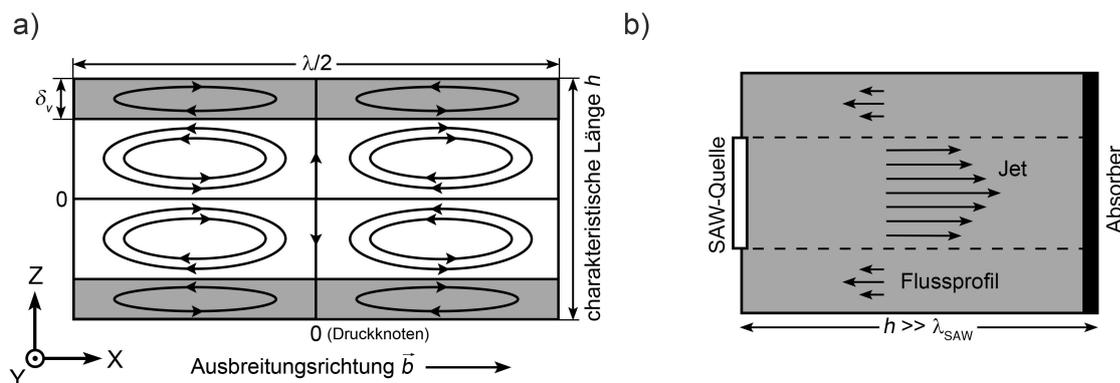
Unabhängig von der Schallquelle kann im Allgemeinen das Phänomen des *acoustic streaming* in zwei Kategorien untergliedert werden. Hierbei werden die Abmessungen des fluiden Systems  $h$  (z. B. die Schichtdicke) und die Wellenlänge der Schallwelle  $\lambda$  betrachtet. Ist die Schichtdicke  $h$  der Flüssigkeit im Vergleich zur Wellenlänge relativ hoch ( $h \gg \lambda$ ), so liegt die *Eckart*-Strömung vor. Die zweite Kategorie wird als *Rayleigh*-Strömung bezeichnet und tritt auf, wenn die Schichtdicke Werte gemäß  $\delta \ll h \ll \lambda$  einnimmt, wobei  $\delta_v = \sqrt{\frac{\mu}{\pi\rho f}}$  die viskose Eindringtiefe darstellt, mit  $\mu$  und  $\rho$  als dynamische Viskosität bzw. Dichte der Flüssigkeit und  $f$  als Frequenz der SAW [84].

### Rayleigh-Strömung

Bei der Rayleigh-Strömung ist die Flüssigkeitsbewegung auf die Grenzschicht der Flüssigkeit zum Festkörper hin konzentriert. Die Grenzschicht wird in eine innere und äußere Schicht untergliedert, wobei die Schichtdicke der inneren Schicht durch  $\delta_v$  definiert ist. Aufgrund der Randbedingungen kommt es zur Ausbildung entgegengesetzter rotierender Wirbel (Vortices) in den Schichten, die ein stabiles Kraftfeld erzeugen. Die gegensätzlichen Strömungen werden daher in eine Strömung der inneren Schicht, der *Schlichting-Strömung*, und die der äußeren Schicht, der *Rayleigh-Strömung* untergliedert. Typischerweise bildet sich entlang der Schallausbreitung jeweils auf der Distanz einer halben Wellenlänge ein Vortex-Antivortex-Paar aus. Wird die Schichtdicke im Vergleich zur Wellenlänge groß, so werden die Wirbel der Rayleigh-Strömung turbulent (siehe *Abb. 2.10. a*) [83].

### Eckart-Strömung

Die Eckart-Strömung, früher auch Quartz-Wind genannt, tritt auf, wenn die akustische Energie sich im Volumen der Flüssigkeit zerstreut. Während der Propagation einer akustischen Welle durch eine Flüssigkeit wird ein Teil der akustischen Energie durch die Flüssigkeit absorbiert. Die Absorptionsrate ist typischerweise proportional zum Quadrat der Frequenz. Durch die Dämpfung der Amplitude sinkt der akustische Druck mit steigendem Abstand zur Quelle. Der Energieverlust und der hierbei hervorgerufene Druckunterschied führt zu einem stetigem Impulsfluss und somit zu einem Flüssigkeitsstrahl im und in Richtung des akustischen Schallpfades. Liegt ein abgeschlossenes Volumen vor, so führt die Eckart-Strömung zu einer zirkularen Strömung in der gesamten Kammer (siehe *Abb. 2.10. b*) [85]. Die durch die Eckart-Strömung verursachte Kraft kann analytisch berechnet und die hierzu notwendigen Grundlagen können in [86] gefunden werden.



**Abbildung 2.10:**

*Akustische Strömung in Abhängigkeit der Schichtdicke  $h$ . a) Für kleine Schichten  $\delta \ll h \ll \lambda_{SAW}$  tritt die Rayleigh-Strömung mit lokalisierten gegenläufigen Wirbeln auf. b) Für Schichtdicken  $h \gg \lambda_{SAW}$  wird die Eckart-Strömung in Form eines Jets hervorgerufen. (In Anlehnung an [83, 84]).*

Trifft nun eine akustische Oberflächenwelle in der Rayleigh-Mode auf eine Flüssigkeit, so koppelt diese an der Grenzfläche durch Energietransfer als Schallwelle unter dem Rayleigh-Winkel in die Flüssigkeit ein und wird als *Leaky-SAW* bezeichnet. Da sich Scherwellen in Flüssigkeiten nicht ausbreiten können, werden SAW in der SH-Mode vernachlässigt. Der Winkel ist abhängig von der Schallgeschwindigkeit der Welle im Medium  $v_F$  und im Substrat  $v_S$ , auf der die SAW propagiert:

$$\Theta_R = \arcsin \frac{v_F}{v_S}. \quad (2.38)$$

Da die Schallgeschwindigkeit in Wasser und auf  $\text{LiNbO}_3$   $1480 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  bzw.  $3978 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  beträgt, folgt für den Winkel  $\Theta_R = 21.8^\circ$ . Die eingekoppelte longitudinale Schallwelle besitzt eine ebene Wellenfront, deren Amplitude exponentiell abnimmt und deren Ausbreitungsrichtung dem Rayleigh-Winkel folgt [87]. Im Fall des *acoustic streaming* durch eine *Leaky-SAW* ist keine explizite Trennung zwischen beiden Strömungsmechanismen möglich, vielmehr stellt sich eine Überlagerung der einzelnen Strömungen ein. Bei  $h < \lambda_{\text{SAW}}$  ist die Rayleigh-Strömung dominant, welche bei zunehmender Schichtdicke durch die Eckart-Strömung überlagert wird [88].

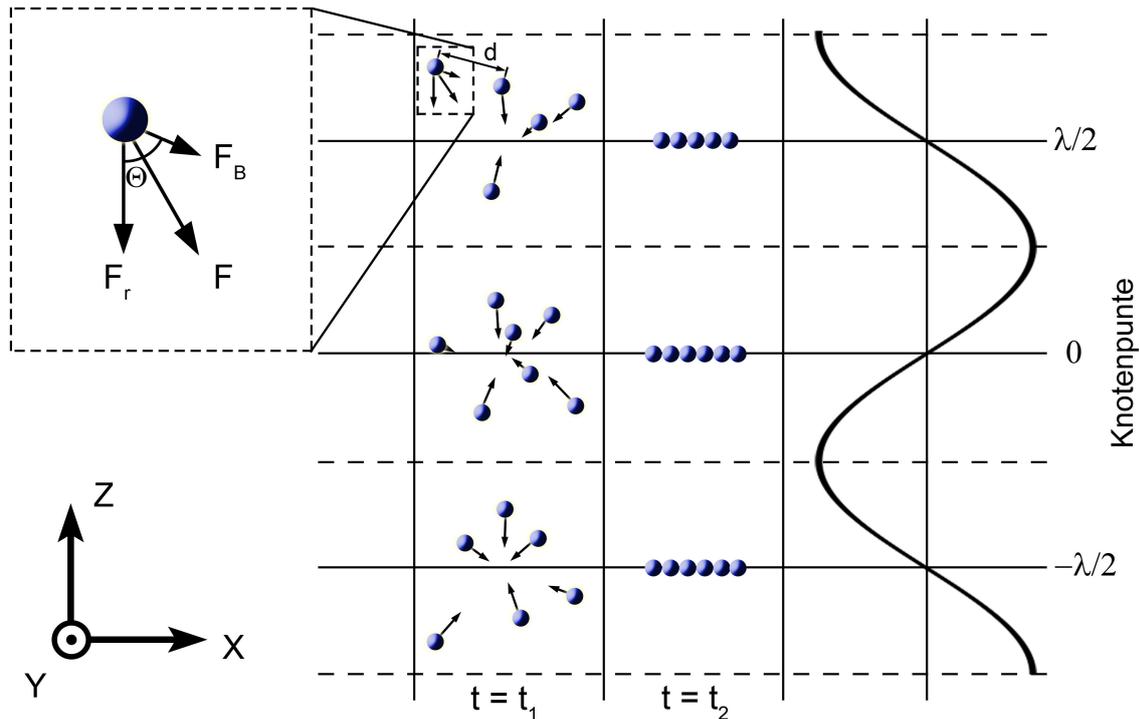
Weiterführende Informationen zu diesem Thema können aus folgenden Dokumenten entnommen werden: [83], [88] und [84].

### 2.3.4. Mikropartikel im akustischen Kraftfeld

Befindet sich ein sphärisches Objekt in einer Flüssigkeit, durch die eine Schallwelle propagiert, so wirken, abhängig von den Rahmenbedingungen, unterschiedliche Kräfte auf dieses ein. Während bei großen Schichtdicken die durch das *acoustic streaming* induzierten Scherkräfte überwiegen, kann durch die Verwendung mikrofluidischer Systeme und die damit einhergehende Reduzierung der Schichtdicke die Eckart-Strömung unterdrückt werden. Ist die Kanalhöhe im Vergleich zur Wellenlänge relativ gering ( $h \leq \lambda_{\text{SAW}}$ ), so überwiegt die akustische Kraft (engl. *acoustic radiation force*), mit deren Hilfe Objekte kontrolliert manipuliert werden können [89].

In der Literatur sind fundamentale Theorien der akustischen Kraft auf sphärische Objekte in einer Flüssigkeit unter anderem von *King* [90], *Yosioka* und *Kawasima* [91], *Gor'kov* [92] oder *Nyborg* [93] zu finden. Sie beschreiben die resultierende Bewegung von sphärischen Objekten in einem Schallwellenfeld in Abhängigkeit der akustischen Eigenschaften (Dichte, Schallgeschwindigkeit und Kompressibilität) und des Durchmessers  $D$  eines Teilchens im Verhältnis zur umgebenden Flüssigkeit. Diese Kräfte bewirken, dass sich die Objekte entlang des Potentialgefälles meist an den Knotenpunkten eines Stehwellenfeldes ansammeln. Die hierbei wirkenden Kräfte bilden sich aus der Kombination der *primären* und *sekundären* Kraft. Die primäre Kraft entsteht durch die Streuung der einfallenden Schallwelle an einem Objekt, während die sekundäre Kraft aus der Interaktion zwischen zwei Objekten resultiert (vgl. *Abb. 2.11.*).

Da in *Kap. 4.* diese Technologie für die Ausrichtung lebender Zellen auf einem Chip Anwendung findet, werden im Folgenden die auf die Zellen wirkenden Drücke und Kräfte erläutert. Die hierbei verwendeten Herleitungen orientieren sich an [60] und den Formulierungen von *Wiklund* [94, 95], *Gor'kov* [92], *Laurell* [96] und *Collins et al.* [97].


**Abbildung 2.11:**

Darstellung der durch akustische Kräfte hervorgerufenen Bewegung von Mikropartikeln in einem Stehwellenfeld zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei  $t_1$  wirkt die akustische Kraft erst seit kurzem, während  $t_2$  den Gleichgewichtszustand darstellt.  $F_r$  ist die durch Interaktion mit der Schallwelle entstehende primäre akustische Kraft und  $F_B$  die sekundäre akustische Kraft zwischen zwei benachbarten Mikropartikeln (Bjerknes-Kraft). (In Anlehnung an [96]).

### Akustischer Druck auf Mikropartikel

Propagiert eine longitudinale harmonische Druckwelle in  $z$ -Richtung durch eine Flüssigkeit, so kann der wirkende Druck  $p(z',t)$  in einem Volumenelement wie folgt beschrieben werden:

$$p(z',t) = p_0 + \rho_0 c_0 v_0 \sin(\omega t - kz'). \quad (2.39)$$

Hierbei ist  $p_0$  der statische Druck im Gleichgewicht einer ungestörten Flüssigkeit,  $v_0$  die Geschwindigkeit des Volumenelements,  $c_0$  die Schallgeschwindigkeit in der Flüssigkeit mit der Dichte  $\rho_0$ ,  $\omega$  die Kreisfrequenz und  $k = \omega/c$  die dazugehörige Wellenzahl. Die Koordinate  $z' = z + s(z',t)$  wird durch die Position des Volumenelements im ungestörten Zustand  $z$  und die Auslenkung  $s(z',t)$  beschrieben. Durch Substitution von  $z'$  durch  $z$  verschwindet das zeitliche Mittel für  $\sin(\omega t - kz')$  für eine ausreichend große Verschiebung  $s(z',t)$  durch die Integration über die Zeitdauer einer Periode nicht. Der zeitlich gemittelte Druck kann daher in zweiter Ordnung genähert werden [94]:

$$\langle p(z) \rangle = p_0 - \frac{1}{2} \rho_0 v_0^2. \quad (2.40)$$

Der zweite Term der Gleichung 2.40 beschreibt den akustischen Strahlungsdruck und ist äquivalent zum Term des Staudrucks in der Bernoulli-Gleichung:

$$\frac{1}{2} \rho_0 v^2 + p = c \quad (2.41)$$

wobei die Terme  $c$  den Gesamtdruck,  $p$  den hydrostatischen Druck und  $\frac{\rho}{2} v^2$  den Staudruck beschreiben. Der statische Druck  $p_0$  wird somit bei höheren Geschwindigkeitsamplituden des Volumenelements  $v_0$

einer fortschreitenden Welle verringert. Durch die Näherung von  $z'$

$$z' = z + s(z', t) \approx z + s(z, t) = z + \frac{v_0}{\omega} \sin(\omega t - kz) \quad (2.42)$$

und Einsetzen in die Gleichung 2.39, erhält man schließlich den Gesamtdruck im Volumenelement am Ort  $z$ :

$$p(z, t) = p_0 + \rho_0 c_0 v_0 \sin \left[ \omega t - k \left( z + \frac{v_0}{\omega} \sin(\omega t - kz) \right) \right]. \quad (2.43)$$

### Die primäre akustische Kraft

Wird eine Schallwelle an einem sphärischen Objekt mit dem Radius  $r$  gestreut, so gilt nach *Gor'kov* für das Objekt folgendes zeitlich gemitteltes Potential [92]:

$$U = V \left( f_1 E_{\text{pot}} - \frac{3}{2} f_2 E_{\text{kin}} \right). \quad (2.44)$$

Dabei ist  $V = 4\pi r^3/3$  das Volumen des Objekts,  $E_{\text{pot}}$  und  $E_{\text{kin}}$  die zeitlich gemittelte potentielle und kinetische Energiedichte:

$$E_{\text{pot}} = \frac{\langle p^2 \rangle}{2\rho_0 c_0^2} \quad (2.45)$$

$$E_{\text{kin}} = \frac{\rho_0 \langle v^2 \rangle}{2} \quad (2.46)$$

$c$  und  $\rho$  beschreiben die Schallgeschwindigkeit und Dichte des Objekts und  $c_0$  bzw.  $\rho_0$  die gleichbedeutenden Größen für das umgebende Medium.  $\langle p^2 \rangle$  bzw.  $\langle v^2 \rangle$  sind die zeitlich gemittelten Fluktuationen des Drucks bzw. der Geschwindigkeit. Durch die dimensionslosen Korrekturwerte  $f_1$  und  $f_2$  wird die Kompressibilität des sphärischen Objektes berücksichtigt:

$$f_1 = 1 - \frac{\rho_0 c_0^2}{\rho c^2} \quad (2.47)$$

$$f_2 = \frac{2(\rho - \rho_0)}{2\rho + \rho_0}. \quad (2.48)$$

Für ein inkompressibles, steifes Objekt gilt  $f_1 + f_2 = 1$ .

Gl. 2.44 gilt für ein sphärisches Objekt, wenn die Bedingungen

$$r \ll \lambda \quad (2.49)$$

$$r \gg s_0 \text{ (Max. Auslenkung des Volumenelements),} \quad (2.50)$$

erfüllt sind. Mit der Potentialfunktion  $\vec{F} = -\vec{\nabla}U$  kann die Kraft  $F$  und die Intensität  $I$  berechnet werden.

Im Fall eines plan-parallelen Resonators ist die durch das Stehwellenfeld erzeugte mittlere Fluktuation des Drucks  $\langle p^2 \rangle$  und der Geschwindigkeit  $\langle v^2 \rangle$  wie folgt definiert:

$$\langle p^2(x) \rangle = \frac{p_0^2}{2} \cos^2(kx) \quad (2.51)$$

$$\langle v^2(x) \rangle = \frac{p_0^2}{2\rho_0^2 c_0^2} \sin^2(kx) \quad (2.52)$$

mit der Amplitude des Drucks  $p_0$  und der Wellenzahl  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ .

Durch Resubstituieren der Energiedichten durch die Gleichungen 2.51 und 2.52 und der Kompressibilität

$\beta = \frac{1}{\rho c^2}$  ergibt sich folgender Ausdruck:

$$F_r(x) = - \left( \frac{\pi V p_0^2 \beta_0 \nu}{2c_0} \right) \Psi(\beta, \rho) \sin(2kx) \quad (2.53)$$

$$\Psi(\beta, \rho) = \frac{5\rho - 2\rho_0}{2\rho + \rho_0} - \frac{\beta}{\beta_0} \quad (2.54)$$

mit der Frequenz  $\nu = \frac{c_0}{\lambda}$  und der Kompressibilität  $\beta$  bzw.  $\beta_0$  des Objekts und von Wasser.

$\Psi$  ist der sogenannte *akustische Kontrastfaktor*. Je nach Konstellation der beteiligten Materialien kann es zu einem Vorzeichenwechsel von  $\Psi$  kommen, was dazu führt, dass sich die Objekte nicht an einem Knotenpunkt, sondern an einem Bauch sammeln. Die Kraft  $F_r$  ist proportional zur Intensität  $I = p_0^2/2\rho_0 c_0$ .

Durch den Druck (2.43) und die erzeugte Kraft (2.53) wandern Objekte entlang des maximalen Gradienten der Kraft in ein lokales Minimum und verbleiben dort (vgl. *Abb. 2.11.*). Die lokalen Minima stellen die Geschwindigkeitsbäuche dar, welche zugleich die Druckknoten der stehenden Welle sind, in denen die Kraft  $F_r(x)$  gerade Null ist.

### Die sekundäre akustische Kraft

Propagiert eine Schallwelle durch eine Suspension, so wird diese an einem in der Suspension befindlichen Objekt gestreut. Liegt in unmittelbarer Nähe zu dem streuenden Objekt ein weiteres Teilchen vor, so interagiert die gestreute Schallwelle ebenfalls mit diesem Teilchen. Dieser Effekt wurde 1909 von *Bjerknes* erstmals erwähnt und beschreibt die Kraft, die durch die Streuung einer Schallwelle zwischen zwei Objekten wirkt [98]. Diese sekundäre akustische Kraft wird in der Literatur meist als *Bjerknes-Kraft*  $F_B(x)$  bezeichnet.

Ist die akustische Wellenlänge  $\lambda$  viel größer als der Radius eines Teilchens  $r$  und dessen Abstand zu seinem benachbarten Teilchen  $d$ , kann  $F_B(x)$  nach der von *Weiser et al.* [99] vereinfachten Gleichung beschrieben werden:

$$F_B(x) = 4\pi r^6 \left[ \frac{(\rho - \rho_0)^2 (3 \cos^2 \Theta - 1)}{6\rho_0 d^4} \nu^2(x) - \frac{\omega^2 \rho_0 (\beta - \beta_0)^2}{9d^2} p^2(x) \right], \quad (2.55)$$

wobei  $d$  den Mittelpunktabstand zwischen den Sphären und  $\Theta$  den Winkel zwischen der Mittellinie der Sphären und der Propagationsrichtung der einfallenden Schallwelle darstellt. Das Vorzeichen von  $F_B(x)$  gibt an, ob es sich im Fall eines negativen Vorzeichens um eine attraktive Kraft oder bei einem positiven Vorzeichen um eine repulsive Kraft handelt. Der linke Term ist stark abhängig von der Amplitude der Geschwindigkeit eines Volumenelements  $v(x)$ , während der rechte Term von der Größenordnung des akustischen Drucks dominiert wird. Sind die Objekte in die Propagationsrichtung der Schallwelle ( $\Theta = 0^\circ$ ) ausgerichtet, so ist der geschwindigkeitsabhängige Term repulsiv, während er bei  $\Theta = 90^\circ$  attraktiv wirkt. Der druckabhängige Term hingegen wirkt unabhängig von der Orientierungsrichtung attraktiv. Bewegen sich die Objekte in einen Knotenpunkt, so verschwindet der druckabhängige Term. Zumeist ist die Gesamtwirkung von  $F_B$  attraktiv.

### Zweidimensionale Mikropartikelanordnung

In der Literatur wird die Nutzbarmachung der akustischen Kräfte für die kontrollierte Manipulation von Objekten als *Acoustic Tweezers* bezeichnet. Hierbei wird durch ein System aus gegenüberliegenden IDT-Strukturen ein wie in *Abb. 2.8.* gezeigtes Stehwellenfeld erzeugt, dessen zeitliche und räumliche Dynamik durch die Frequenz, Amplitude und Phase der SAW kontrolliert werden kann. Durch die Positionierung eines Kanals mit der Höhe  $h \leq \lambda$  oberhalb des Stehwellenfeldes kommt es aufgrund der herbeigeführten weiteren Grenzfläche in z-Richtung zu einer Reflexion der propagierenden Schallwelle. Der reflektierte Amplitudenanteil der Schallwelle wird über den Reflexionsfaktor  $r$  definiert und lässt

sich durch Gl. 2.56 berechnen [100]

$$r = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_1 + Z_2}. \quad (2.56)$$

$r$  ist hierbei abhängig von der akustischen Impedanz der verwendeten Materialien

$$Z = \rho c \quad (2.57)$$

mit  $\rho$  als Dichte und  $c$  als Schallgeschwindigkeit des Materials. Für die Berechnung der reflektierten Schallintensität gilt der Reflexionsgrad  $R$  mit  $R = r^2$ .

Die partielle Reflexion und die hiermit einhergehende Überlagerung der Schallwelle führt zu einer Ausbildung eines Stehwellenfeldes senkrecht zum Substrat. So werden Objekte in einem Mikrokanal durch das Stehwellenfeld und der dabei induzierten *acoustic radiation force* kontrolliert ausgerichtet. Ist der Durchmesser  $D$  der in der Suspension befindlichen Objekte gegenüber der akustischen Wellenlänge sehr klein ( $D \ll \lambda$ ), so lagern sich viele Objekte in einem einzelnen Knotenpunkt an.

Mit dem Ziel, eine einzelne Zelle pro akustischem Knotenpunkt (Eine Zelle pro Knotenpunkt - EZPK) zu erhalten, beschrieben *Collins et al.* 2015 das Verhalten von Mikropartikeln in einem akustischen 2D-Stehwellenfeld, deren Durchmesser  $D$  in der Größenordnung der Wellenlänge liegen ( $D \sim \lambda$ ) [97]. Während die primäre akustische Kraft  $F_r$  die Mikropartikel in die Knotenpunkte treibt (für  $\Psi > 0$ ), bewirkt die sekundäre Kraft  $F_B$  eine Agglomeration der Objekte. Während  $F_r$  nach Gl. 2.53 neben den Materialeigenschaften nur vom Abstand  $x$  des Objekts zum nächsten Knoten mit  $\sin(2kx)$  abhängig ist, nimmt die *Bjerknes*-Kraft  $F_B$  quadratisch mit zunehmendem Partikelabstand  $d$  ab. Des Weiteren liegt eine Proportionalität der primären und sekundären akustischen Kraft mit dem Objektradius vor. Während die primäre Kraft nur kubisch proportional zum Objektradius ist ( $F_R \propto r^3$ ), gilt für die sekundäre Kraft:  $F_B \propto r^6$ . Durch die räumliche Trennung können in einem schmalen Intervall die auf die Objekte wirkenden akustischen Kräfte  $F_r$  und  $F_B$  justiert werden, um eine EZPK-Ausrichtung zu erreichen. Aus geometrischen Überlegungen und unter Berücksichtigung der akustischen Kräfte ist für die sogenannte EZPK-Falle das richtige Verhältnis der akustischen Wellenlänge  $\lambda$  zu dem Objektdurchmesser  $D$  entscheidend. Ist die Wellenlänge gegenüber dem Objektdurchmesser zu groß ( $\lambda > 4D$ ), können sich mehr als ein Objekt in einer halben Wellenlänge anlagern. Ist die Wellenlänge hingegen zu klein ( $\lambda < 3D$ ), wird  $F_B$  dominant gegenüber  $F_r$ . Sich in der Nähe befindende Objekte agglomerieren, obwohl  $F_r$  weiterhin periodisch wäre. Obwohl eine analytische Berechnung von  $F_r$  und  $F_B$  nach Gl. 2.49 für den Grenzfall  $D \ll \lambda$  erfolgte, sollten die berechneten Kräfte  $F_r$  und  $F_B$  im Fall  $D \sim \lambda/3$  durch Gl. 2.53 und Gl. 2.55 angenähert werden können.

Unter Berücksichtigung dieser theoretischen Vorhersagen ist in dem Intervall  $3.0 < \lambda/D < 4.0$  die Kraft  $F_r$  dominant gegenüber  $F_B$  und bezüglich der geometrischen Überlegungen findet aufgrund der Ausdehnung der Objekte nur ein Teilchen in einem Knotenpunkt Platz.

In experimentellen Untersuchungen konnte allerdings bewiesen werden, dass die tatsächlichen Intervallgrenzen von den theoretischen Werten leicht abweichen können. Abhängig von der Kompressibilität ist im Fall steifer Objekte wie Polystyrolkugeln eine EZPK-Ausrichtung nur im Bereich  $3.2 < \lambda/D < 3.6$  möglich, was auf einen stärkeren Abfall von  $F_R$  mit steigendem Objektradius als bei  $F_B$  hindeutet. Im Gegensatz hierzu können biologische Objekte wie Zellen aufgrund der höheren Kompressibilität und somit kleinerem  $F_B$  in einem größeren Bereich  $2.5 < \lambda/D < 4.0$  ausgerichtet werden.

Neben der periodischen SAW-Strömung werden durch nichtlineare akustische Effekte Verwirbelungen hervorgerufen [86, 101, 102]. Dies macht eine Mindestgröße der Objekte notwendig. *Muller et al.* berechneten einen kritischen Objektdurchmesser, ab dem die Objektbewegung durch die primäre akustische Kraft dominiert wird [103]. Unterhalb dieses Grenzwertes wird die Bewegung durch den induzierten Strömungswiderstand bestimmt. Der hierbei berechnete kritische Durchmesser von  $\sim 200$  nm für Polystyrolkugeln ( $\rho_p = 1.030 \text{ kg m}^{-3}$ ,  $\beta_p = 3.3 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ ) in Wasser bei einer Frequenz von 100 Hz ist viel kleiner als der Objektdurchmesser der Teilchen, die in dieser Arbeit ausgerichtet werden.

### 3. Akustische Sensorik

Akustische Oberflächenwellen, im Englischen *surface acoustic waves* - SAW genannt, besitzen am Lehrstuhl für Experimentalphysik I der Universität Augsburg eine jahrzehntelange Tradition. Während dieser Zeit fanden diese „Erdbeben“ im *Nanometer*-Bereich eine breite Anwendung. Egal ob in mikrofluidischen Anwendungen für die Durchmischung kleinster Volumina oder in der Quantenoptik für die kontrollierte Manipulation von Quantenpunkten und photonischen Kavitäten, eröffnete die akustische Oberflächenwelle durch ihre Vielfältigkeit stets neue Möglichkeiten und Technologien. Besonders im Bereich der Sensorik konnte die SAW durch ihre hohe Sensitivität gegenüber kleinsten Änderungen in den Umgebungsbedingungen überzeugen. So konnte seit Neuestem beispielsweise durch die Kombination metallorganischer Gerüste (engl. *metal-organic frameworks* - MOF) mit SAW ein hoch sensitiver und spezifischer Gassensor für die Detektion verschiedener Gase wie CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He, NH<sub>3</sub> oder H<sub>2</sub>O entwickelt werden [104]. Doch nicht nur die Detektion von Gasen und Flüssigkeiten ist von höchstem Interesse, sondern auch die Observierung lebender Organismen. In der biologischen Physik und in den Biowissenschaften ist in Hinblick auf die Implantatforschung die Charakterisierung und Vermessung zellulärer Prozesse wie der Wundheilung oder der Zelladhäsion und -migration ein aktueller Forschungsbereich. Durch die Implementierung der SAW-Sensorik soll dieser Bereich durch ein weiteres Messverfahren erweitert werden. In der Vergangenheit konnte die SAW-Sensorik bereits erfolgreich zur Detektion von Lipid-Doppelschichten und der Agglomeration von Proteinen in diesen Schichten eingesetzt werden [51]. Für den Schritt von einem Modellsystem wie einer Lipid-Doppelschicht hin zur adäquaten Vermessung lebender Zellen stellen sich folgende Forschungsfragen:

- Kann durch SAW eine nicht-optische, nicht-invasive Observierung einer Zellkultur ermöglicht werden?
- Kann der Migrationsprozess adhärenter Zellen während der Wundheilung detektiert werden?
- Ist eine Erfassung des Zellwachstums in einem konfluenten Zellrasen möglich?
- Ist eine Quantifizierung des zellulären Ablöseprozesses durchführbar?
- Welche Veränderungen der Materialeigenschaften führen zu einem messbaren Unterschied in der SAW-Propagation?

Das folgende Kapitel widmet sich der Adressierung dieser spannenden Forschungsfragen. Nach der Schaffung eines Überblicks über den aktuellen Stand der Forschung und der bereits bestehenden Anwendung akustischer Oberflächenwellen in der biologischen Physik, wird das Zellwachstum in einem sogenannten Wound-Healing-Assay durch SAW überwacht und mit konventionellen Methoden verglichen. Anschließend wird die Besonderheit der SAW-Sensorik in der Quantifizierung des Ablösungsprozesses adhärenter Zellen herausgearbeitet. Abschließend wird auf Grundlage einer theoretischen Betrachtung die durch das Zellwachstum hervorgerufene Veränderung der SAW-Parameter eruiert. Dieses Kapitel basiert nun in weiten Teilen auf folgender Veröffentlichung:

M.S. Brugger, L.G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Shear-horizontal surface acoustic wave sensor for non-invasive monitoring of dynamic cell spreading and attachment in wound healing assays*, *Biosensors and Bioelectronics*, **173**, 112807, 2020. [105]<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Internet-Adresse zur Veröffentlichung:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566320307946>

### 3.1. Motivation und Stand der Technik

Die Mechanismen der Zelladhäsion und -migration spielen in multizellulären Organismen eine entscheidende Rolle. Zellen stehen in Kontakt zu benachbarten Zellen oder mit dem extrazellulären Gerüst, der extrazellulären Matrix (EZM). Das Studium dieser essentiellen zellulären Vorgänge ist vor allem in der Biotechnologie für die Entwicklung von Biomaterialien, künstlichen Geweben, Zellkulturen oder von Medikamenten von höchstem Interesse. Besonders im Bereich der Implantatforschung ist eine aussagekräftige Quantifizierung der Biokompatibilität und der zellulären Adhäsionskraft essentiell [106, 107].

Die bei der Zelladhäsion und -migration stattfindenden intrazellulären Prozesse, wie die Aktivierung von Signalwegen oder die Expression von Proteinen, müssen hierbei ohne Beeinflussung der Physiologie der Zelle vermessen werden [108]. Markierungsfreie, nicht-invasive Messmethoden bieten die Möglichkeit, zelluläre Prozesse störungsfrei zu observieren und adressieren somit diese Voraussetzung. Diese Sensorik kann prinzipiell in drei Messprinzipien untergliedert werden: die elektrische, optische und akustische Sensorik [54, 108–111].

Hierbei bieten akustische Sensoren auf Basis piezoelektrischer Materialien die einzigartige Möglichkeit, störungsfrei geringste Veränderungen unter anderem der Viskoelastizität, Permittivität oder der Masse in der Nähe der Sensoroberfläche zu detektieren [54, 108]. Die Klassen der akustischen Sensoren können in zwei unterschiedliche Funktionsprinzipien untergliedert werden: die akustischen Volumenwellen (engl. *bulk acoustic waves* - BAW) und die akustischen Oberflächenwellen (SAW).

Eine weit verbreitete Anwendung finden die auf BAW basierende Quarzkristall-Mikrowaage (engl. *Quartz Crystal Microbalance* - QCM). Diese besteht im Prinzip aus einer dünnen Quarzscheibe (AT-cut), welche zwischen zwei Elektroden angebracht ist. Aufgrund der piezoelektrischen Eigenschaft des Quarzes führt eine oszillierende Potentialdifferenz zwischen den Elektroden zu einer Scherverschiebung des Kristalls (engl. *Thickness Shear Mode* - TSM). Diese mechanische Oszillation ist äußerst sensitiv gegenüber jedweder Änderung auf der Quarzoberfläche. QCM sind daher besonders in der Lage, Adsorptionsprozesse an Grenzflächen (flüssig/fest - gasförmig/fest) zu überwachen. Massenablagerungen oder Veränderungen der Viskoelastizität im Medium können so durch Änderung der Resonanzfrequenz und der Einfügedämpfung detektiert werden. Der lineare Zusammenhang zwischen der durch Zelladhäsion belegten Fläche und der dadurch hervorgerufenen Resonanzverschiebung machen sie besonders für die Detektion biologischen Materials in einer Lösung bei Studien im Bereich der Zelladhäsion und -spreitung interessant [112–117]. Die typischen Resonanzfrequenzen eines QCM liegen hierbei in der Regel im Bereich von 10 bis 50 MHz.

Da die Sensitivität gegenüber Massenänderung mit steigender Frequenz zunimmt [118], jedoch die Dicke des piezoelektrischen Kristalls nicht beliebig reduziert werden kann, ohne die Haltbarkeit des Sensors signifikant zu beeinträchtigen, sind die Möglichkeiten der QCM limitiert.

Eine Lösung bilden SAW-Sensoren, welche akustische Oberflächenwellen zur Detektion von Veränderungen auf der Substratoberfläche verwenden. Im Gegensatz zu QCM-Sensoren erreichen auf SAW basierende akustische Sensoren deutlich höhere Arbeitsfrequenzen ( $\mathcal{O}(10^8 - 10^9 \text{ Hz})$ ). Sie sind neben der Sensitivität gegenüber Veränderungen der mechanischen Eigenschaften auf der Sensoroberfläche auch sensitiv gegenüber Veränderungen elektrischer Eigenschaften, wie der Permittivität oder der Leitfähigkeit. Mittels interdigitaler Schallwandler (engl. *interdigital Transducer* - IDT) wird eine elektrische Wechselspannung durch die elektromechanische Kopplung in ein akusto-elektrisches Signal auf einem piezoelektrischen Kristall transformiert – der akustischen Oberflächenwelle. Diese von dem Sende-IDT ausgesendete Welle propagiert an der Substratoberfläche und wird durch einen weiteren Empfänger-IDT detektiert. Der als „Verzögerungsleitung“ (VL) (engl. *delay line*) benannte Schallpfad der SAW sowie die Aperturen der IDTs beschreiben die sensitive Oberfläche. Massenablagerungen oder Veränderungen in den Materialeigenschaften auf der Sensoroberfläche führen zu Veränderungen der SAW-Parameter, wie beispielsweise der Frequenz, Phase oder Dämpfung. Abhängig von den zu messenden Parametern ist die Verzögerungsstrecke entweder frei oder durch eine leitfähige Metallschicht

kurzgeschlossen. Während bei der freien Oberfläche mechanische und elektrische Veränderungen an der Substratoberfläche detektiert werden, werden im kurzgeschlossenen Zustand nur mechanische Eigenschaften erfasst [119]. Erstmals erwähnt in den 1990er Jahren [120, 121], werden SAW-Sensoren vermehrt in gasförmigen und flüssigen Umgebungen angewendet, unter anderem im Bereich der (bio)chemischen Sensorik für *in situ*-Experimente zur Vermessung von biologischen Schichten und deren Materialeigenschaften. Abhängig vom Kristall und dessen Schnitt können unterschiedlichste Wellenformen angeregt werden. Hierzu zählen Rayleigh-Wellen, Scherwellen, Love- und Lambwellen. Aufgrund des drastischen Signalverlustes bei Rayleigh-Wellen für Frequenzen größer als 10 MHz, bedingt durch die *Leaky*-SAW werden für sensorische Anwendungen in Flüssigkeiten oberflächengeführte, horizontal polarisierte Transversalwellen (engl. *shear-horizontally polarised waves* - SH-Wellen) präferiert. Diese propagieren aufgrund der fehlenden vertikalen Auslenkung des Substrates mit minimalen Verlusten auf einem mit einer Flüssigkeit bedeckten Oberfläche [121]. Die Belegung der Sensoroberfläche mit einer biologischen Schicht, beispielsweise einem Zellrasen, führt zu einer starken Beeinflussung der Phasengeschwindigkeit und Amplitude einer akustischen Oberflächenwelle. Informationen über die Amplituden- und Phasenänderung des transmittierten Signals können so verwendet werden, um Rückschlüsse auf die Materialeigenschaften ziehen zu können [108]. Auf Grundlage dieser Technologie wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, wie die Untersuchung der Protein-Adsorption und -Interaktion als auch Lipid- und Polymeranalysen [78]. SAW-Sensoren wurden zudem im Bereich der Ablagerung, Adhäsion und Spreitung von Zellen [122, 123], Zell-Substrat-Interaktion [124], sowie Zell-basierter Biosensoren für die Detektion von Toxinen [125] verwendet.

In der Literatur finden sich jedoch keine Beiträge zur Untersuchung standardisierter Wound-Healing-Assays mittels akustischer Sensoren. Ein Wound-Healing-Assay ist die Beobachtung des dynamischen Prozesses der Wundheilung in einem konfluenten Zellrasen. Dieser findet üblicherweise mittels optischer Systeme statt. Dies erfordert ein Mikroskop und die Sicherstellung optimaler Zellkultivierungsbedingungen während der Datenaquisition. Des Weiteren sind insbesondere für die Durchlichtmikroskopie transparente Materialien essentiell. Diese Voraussetzungen limitieren jedoch die Anwendungsgebiete und Untersuchungsmethoden der Wound-Healing-Assays.

Dieses Kapitel beschäftigt sich nun mit der Anwendbarkeit akustischer Sensoren zur Untersuchung des dynamischen Prozesses eines Wound-Healing-Assays und des anschließenden Zellwachstums. Des Weiteren wird die Möglichkeit aufgezeigt, den Ablöseprozess von einer Substratoberfläche bedingt durch den Zelltod wie Apoptose oder Nekrose oder durch Zell-lyisierende Stoffe zu quantifizieren. Abschließend sollen die experimentell bestimmten Ergebnisse durch eine theoretische Betrachtung der Beeinflussung der akustischen Oberflächenwelle erklärt werden.

## 3.2. Methoden und Materialien

Für die Detektion adhärenter Zellen auf einer Substratoberfläche müssen Bedingungen geschaffen werden, sodass auf der einen Seite optimale Kultivierungsbedingungen für die Zellen vorliegen und auf der anderen Seite eine Möglichkeit zur Datenaquisition mittels optischer und elektrischer Verfahren zur Verfügung gestellt wird. Eingehend werden in diesem Kapitel der experimentelle Aufbau beschrieben und die Besonderheiten der verschiedenen Messverfahren vorgestellt. Die hierfür notwendigen Grundlagen können aus *Kap. 2.3.2.* entnommen werden. Für alle Experimente wurde die im *Kap. 2.1.5.* beschriebene Zellkultur der MDCK-II-Zellen verwendet. Die hierfür notwendigen Kultivierungsschritte können aus *Kap. D.2.* entnommen werden. Die MDCK-II-Zellen eignen sich durch ihre kollektive Migration besonders für die Gegenüberstellung der zellfreien Fläche mit der Veränderung des akustischen Signals. In den Herstellerbezeichnungen der einzelnen Reagenzien und Materialien werden hier und in den nachfolgenden Kapiteln für die Hauptzulieferer folgende Abkürzungen verwendet: SA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und TF (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

### 3.2.1. Der Sensorik-Chip

Der Kern des Experiments ist der SAW-Chip, welcher durch die Verwendung des piezoelektrischen Materials LiTaO<sub>3</sub> 36° rot YX-Cut (Ta) als Love-Wave-Sensor agiert. Das in der SAW-Sensorik notwendige IDT-Paar besteht aus zwei gegenüberliegenden IDTs, welche jeweils eine Periodizität von  $a = 20\ \mu\text{m}$ , eine Apertur von  $W = 500\ \mu\text{m}$  und 33 Fingerpaare aufweisen. Der Abstand zwischen den Mittelpunkten des Sende- und Empfangs-IDT beträgt  $l = 2\frac{1}{2}l_1 + l_2 = 1160\ \mu\text{m}$  mit  $l_1$  der Aperturlänge von  $l_1 = 660\ \mu\text{m}$  und dem IDT-Kantenabstand von  $l_2 = 500\ \mu\text{m}$ .  $l$  definiert somit die Verzögerungsleitung, engl. *delay line*. Aus Gründen der Darstellung wird im Folgenden die Strecke  $l_2$  als *Verzögerungsleitung* (VL) bzw. *Delayline* bezeichnet. Die Orientierung der IDTs ist entlang der Hauptausbreitungsrichtung des Kristalls (X-Richtung) ausgerichtet, wobei die Schallgeschwindigkeit  $v_{\text{Ta}} = 4150\ \text{m/s}$  beträgt. Die gewählte Periodizität und die Schallgeschwindigkeit führen zu einer theoretischen Resonanzfrequenz von  $f_{\text{res}} = v_{\text{Ta}}/a = 207\ \text{MHz}$ . Beim Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung mit  $f_{\text{res}}$  an eine IDT-Struktur wird eine horizontal polarisierte Oberflächenwelle in der SH-Mode mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = a$  angeregt. Diese propagiert entlang der VL zu der gegenüberliegenden IDT-Struktur und wird dort empfangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Zum Schutz der IDT-Strukturen gegen mechanische Beanspruchung und zur Sicherstellung einer hohen Biokompatibilität wird auf das Substrat eine  $h = 150\ \mu\text{m}$  dicke SiO<sub>2</sub>-Schicht aufgedampft. Diese Schicht fungiert ebenfalls als Wellenleiter und wandelt die Oberflächenwelle in eine Love-Welle um. Aufgrund der vergleichsweise dünnen Schicht ( $h \ll \lambda_{\text{SAW}}$ ) propagiert jedoch ein Großteil der akustischen Welle im Volumen des Substrates [126]. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit wird die akustische Oberflächenwelle im Folgenden als *SAW* bezeichnet.

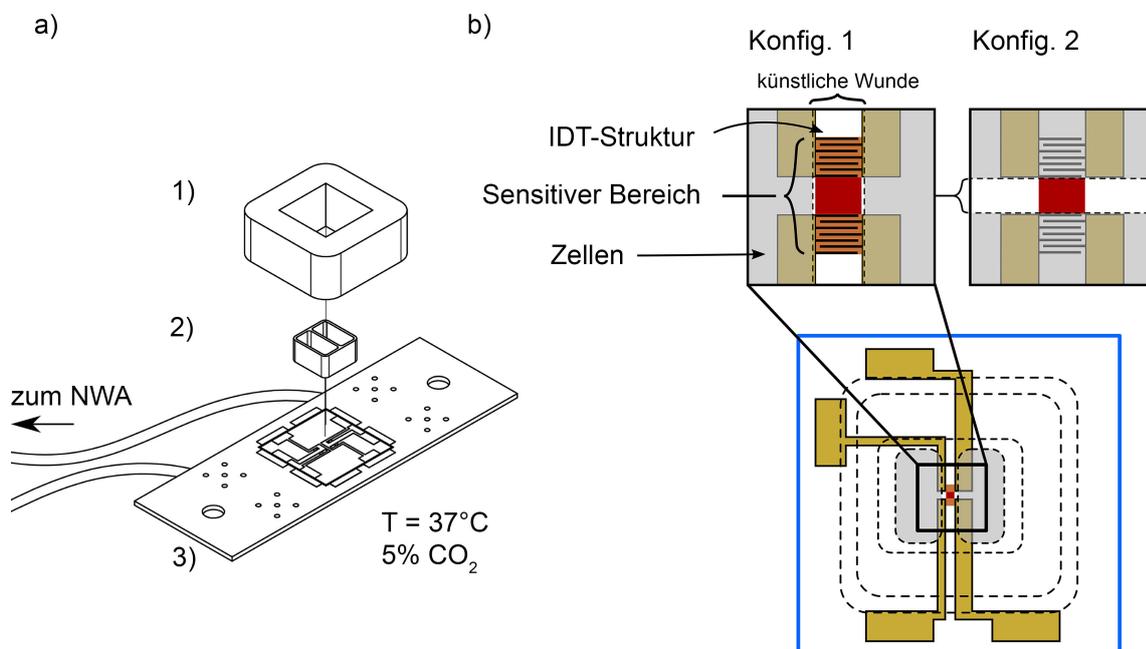
### 3.2.2. Der experimentelle Aufbau und Datenakquisition

Der experimentelle Aufbau besteht aus einem SAW-Chip, auf dessen Oberfläche adhärenente Zellen in einem konfluenten Zellrasen kultiviert werden und ein Wound-Healing-Assay durchgeführt wird. Der zugeführte zellfreie Bereich und dessen progressiver Verschluss durch Zellmigration und Zellwachstum wird mittels eines Mikroskops im sogenannten *Live Cell Imaging*<sup>2</sup> und eines Vektor-Networkanalyser (NWA) vermessen. Der Aufbau ist in *Abb. 3.1.* dargestellt.

Der zuvor beschriebene SAW-Chip wird in einer Leiterplatine mit Sekundenkleber fixiert und durch eine Silberleitpaste (Acheson Silver DAG 1415M, Acheson Industries Inc., MI, USA) mit der Leiterplatine kontaktiert (*Abb. 3.1. a) 3)*). Die Funktionsfähigkeit des SAW-Chips wird anschließend durch einen NWA überprüft und die Kenndaten ( $f_{\text{res}}$ ,  $S_{11}(f_{\text{res}})$ ) notiert. Als Behältnis für das Nährmedium, welches für die Zellkultivierung notwendig ist, wird eine Polydimethylsiloxane (PDMS)-Kammer (*Abb. 3.1. a) 1)*) mit einem Gesamtfassungsvermögen von ca. 3 ml auf dem SAW-Chip positioniert. Zur Vermeidung von Leckagen wird die Kontaktfläche zwischen PDMS und Leiterplatine mit einem hochviskosen, biokompatiblen Silikon-Fett (Baysilone Paste, GE Bayer Silicones, Deutschland) benetzt. Anschließend wird der Aufbau mittels einer 70/30-Ethanol/Wasser-Mischung gereinigt und mit feuchter Hitze bei  $T = 134\ \text{°C}$  sterilisiert. Wie aus der technischen Zeichnung in *Abb. 3.1. b)* ersichtlich, kann das sogenannte *Culture Insert* (CI) (*Abb. 3.1. a) 2)*) (ibidi, Martinsried, Deutschland) in zwei Orientierungen auf dem SAW-Chip positioniert werden. In der Konfiguration *K1* wird das CI so ausgerichtet, dass eine zellfreie Fläche nach dem Entfernen des CI auf den Aperturen der IDTs und auf der Delayline entsteht. In der Konfiguration *K2* ist die Orientierung des CI derart, dass nur die Fläche zwischen den IDTs (Delayline) von Zellen unbelegt ist. Im Anschluss wird das CI mit einer nach *Kap. D.2.* angefertigten MDCK-II-Zellsuspension befüllt und ein konfluenter Zellrasen gebildet. Hierzu werden in jede Kammer des CI 100  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension bestehend aus 80.000 Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  pipettiert. Nach der Zellablagerung und Substratadhäsion wird die PDMS-Kammer mit 1 ml frischem Nährmedium befüllt und für 24 h im Brutschrank (HERAcell 150 CO<sub>2</sub> Inkuba-

<sup>2</sup>*Live Cell Imaging* ist die Untersuchung lebender Zellen auf dem Mikroskop im Zeitraffer.

tor, TF) bei idealen Kultivierungsbedingungen ( $T = 37^\circ\text{C}$ , wassergesättigte Atmosphäre, 5%  $\text{CO}_2$  (v/v)) inkubiert. Nach der Bildung eines konfluenten Zellrasens wird das Nährmedium vollständig entfernt und das CI abgezogen. Für das Entfernen nicht adhärenter Zellen wird der Zellrasen dreimal mit 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) Lösung gewaschen und anschließend die PDMS-Kammer mit frischem Nährmedium befüllt. Durch das Entfernen des CI wird eine zellfreie Fläche auf der Delayline und, abhängig von der gewählten Konfiguration, auch auf den Aperturen geschaffen. Nach der Reinigung des Zellrasens wird im Anschluss der so präparierte Versuchsaufbau auf dem Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) positioniert. Zur Schaffung optimaler Kultivierungsbedingungen ( $T = 37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , wassergesättigte Atmosphäre) befindet sich der Versuchsaufbau während der Messung in einem Mikroskopinkubator (HT 200, ibidi, Martinsried, Deutschland) mit angeschlossenem Gas-Inkubationssystem (The Brick, Live Imaging Service, Basel, Schweiz). Beide IDT-Strukturen werden abschließend jeweils mit einer Koaxialleitung an einem Anschluss (*Tor*, engl. *Port*) des 2-Port Netzwerkanalysators (ZVL, Rhode & Schwarz GmbH, München, Deutschland) angeschlossen. Mittels einer Digitalkamera (Orca 5G, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, Deutschland) und einem 4x- bzw. 10x-Objektiv, werden alle fünf Minuten Phasenkontrastaufnahmen der zellfreien Fläche und des Zellrasens im sensitiven Bereich des akustischen Sensors erstellt. Die Messdauer beträgt typischerweise 40-70 h.



**Abbildung 3.1:**

a) Experimenteller Aufbau zur Detektion von Zellen mittels SAW-Sensorik. Mittels einer PDMS-Kammer (1) und eines CI (2) wird ein konfluenter Zellrasen mit einem Spalt im sensitiven Bereich auf einem SAW-Chip (3) generiert und bei idealen Bedingungen kultiviert. Während der Durchführung des Wound-Healing-Assays werden Amplitude und Phase der Streuparameter frequenz- und zeitabhängig durch einen NWA erfasst. b) Draufsicht des SAW-Chips mit den verschiedenen Positionierungsmöglichkeiten des CI. Konfiguration 1 (Konfig. 1) bildet einen Spalt auf den Aperturen der IDTs und in der VL, während in der Konfiguration 2 (Konfig. 2) nur die VL von Zellen unbesetzt ist. (Grafik entnommen aus [105]).

### 3.2.3. Messverfahren

#### Messung der Streuparameter

Wie in der Hochfrequenztechnik üblich, wird auch in der SAW-Sensorik für die vollständige Charakterisierung des Sensors ein Vektor-Netzwerkanalysator (NWA) verwendet. Hierbei wird die Frequenzantwort des Sensors über die Streuparameter  $S(f)$  in einem symmetrischen Frequenzbereich um die Resonanzfrequenz der IDT-Strukturen  $f_{\text{res}}$  erfasst. Die Eingangsreflexionsfaktoren  $S_{11}$  und  $S_{22}$  geben Auskunft über die Rückflussdämpfung beider IDTs und der Vorwärtstransmissionsfaktor  $S_{21}$  gibt Information über die Transmission zwischen beiden Strukturen in der Vorwärtsrichtung.

Die Leistung des Messsignals beträgt  $P = -10$  dBm und wird in einem Spektrum von  $f \in [f_{\text{res}}(t = 0) - 25 \text{ MHz}; f_{\text{res}}(t = 0) + 25 \text{ MHz}]$  erfasst. Zur Reduzierung störender Signale wie Übersprechen, Kantenreflexionen, mehrfach reflektierte Transmissionen oder Volumenwellen wird das in der Frequenzdomäne erfasste Messsignal durch Fouriertransformation in die Zeitdomäne transformiert und gefiltert. Abhängig von der Leitungslänge der Koaxialleitungen ( $l \approx 1.5 \text{ m}$ ) und der Wegstrecke der VL sind in der Tabelle 3.1 die gewählten Zeitbereichsfiltergrenzen aufgelistet. Durch diese Methode werden nur Signale berücksichtigt, die in dem definierten Zeitbereich erfasst werden. Durch anschließende Rücktransformation in den Frequenzbereich wird ein deutlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht. Über ein LabView-Skript (National Instruments, Austin, Texas, USA) werden die durch den NWA erfassten Daten der Amplitude der Streuparameter  $S(t)$  in dem definierten Spektrum ausgelesen und in einem Textdokument gespeichert. Die Auflösung des Spektrums beträgt 2001 Messpunkte. Die durch Zellmigration hervorgerufene Änderung der Resonanzfrequenz wird durch Bestimmung der globalen Extremwerte  $\frac{\partial S(t)}{\partial f} = 0$  der Amplitude (Minima für  $S_{11}$  und  $S_{22}$  bzw. Maxima für  $S_{21}$ ) in dem definierten Spektrum erfasst. In einem gesonderten Textdokument wird der Extremwert und die korrespondierende Frequenz  $f_{\text{res}}(t)$  zeitabhängig aufgetragen. Zusätzlich wird die Phase  $\phi(t)$  bei der Resonanzfrequenz zu Beginn der Messung  $f_{\text{res}}(t = 0)$  aufgetragen. Die Ausleserate über die komplette Messdauer beträgt für ein Wound-Healing-Assay 2.5 Minuten und für die Zellablösung 15 Sekunden.

	Start	Stop
$S_{11}$	-15 ns	200 ns
$S_{22}$	-15 ns	200 ns
$S_{21}$	165 ns	365 ns

**Tabelle 3.1:**  
Gewählte Zeitbereichsfiltergrenzen in der SAW-Sensorik.

#### Wound-Healing-Assay

Das sogenannte Wound-Healing-Assay bietet die Möglichkeit, die progressive Migration von Zellen zweier gegenüberliegender konfluenter Zellrasen in einen zellfreien Bereich zu observieren. Zur Schaffung identischer Startbedingungen wie Konfluenz, Zelldichte oder Breite des zellfreien Bereiches wird eine kommerziell erhältliche Silikonkammer verwendet. Dieses sogenannte *Culture Insert* (CI) ist eine zweigeteilte Silikonkammer mit einer adhäsiven Oberfläche, die in eine Zellkultur eingebracht werden kann. Die Breite des mittleren Stegs beträgt  $500 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$  und bildet nach dem Entfernen des CI eine künstliche „Wunde“ im konfluenten Zellrasen. Nach einer kurzen Verzögerung beginnen die Zellen an der Zellrasenkante in den neu geschaffenen zellfreien Bereich mit einer konstanten Geschwindigkeit zu migrieren [127]. Abhängig von der gewählten Konfiguration wird der zellfreie Bereich in unterschiedlichen Auflösungen erfasst. Aufgrund der numerischen Apertur kann mit einem 10x-Objektiv nur der Bereich der VL erfasst werden, was ausreichend für die K2-Konfiguration ist. Für die K1-Konfiguration muss daher ein 4x-Objektiv gewählt werden, dies hat allerdings eine niedrigere Auflösung zur Folge.

## Zellablösung

Neben der Observierung der Zellmigration in einen zellfreien Bereich soll die Ablösung adhärenter Zellen von der Substratoberfläche untersucht werden. Nach dem kompletten Wundschluss und der Bildung eines konfluenten Zellrasens wird die Zellkultur von der Substratoberfläche entfernt. Dies geschieht entweder über eine enzymatische Verdauung durch Trypsin oder Accutase oder durch Zugabe von Zell-lyisierenden Substanzen in das Nährmedium. Da Trypsin oder Accutase einen Austausch des Nährmediums durch die Lösung erfordert, kommt es im Messsignal des NWA bedingt durch Unterschiede ,u. a. in der Temperatur und Leitfähigkeit, zu starken Fluktuationen. Um dies zu minimieren werden stattdessen Zell-lyisierende Substanzen wie Triton X-100 ( $c = 0.05\%$ ) (T8787, SA) oder das Enzym-basierte Reinigungsmittel Terg-a-zyme<sup>®</sup> ( $c = 2.5\text{ g/l}$ ) (Z273287, SA) in das Nährmedium gegeben. Des Weiteren werden Zellen in die Apoptose durch Temperaturerhöhung ( $T > 42^\circ\text{C}$ ) der Zellkultur überführt.

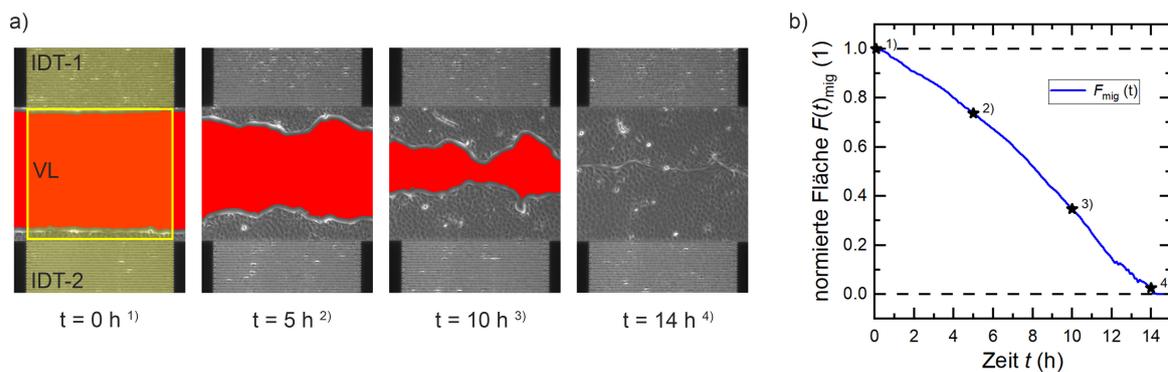
## Messung der Molalität

In der SAW-Sensorik unterliegt die Störung der propagierenden Oberflächenwelle verschiedenen Faktoren. Neben dem Massenbelag durch migrierende Zellen führt eine Änderung der Leitfähigkeit der SAW-Chip-bedeckenden Elektrolyt-Lösung ebenfalls zu einer Störung der SAW. Die elektrolytische Leitfähigkeit ist hierbei proportional zur Molalität  $c_{\text{Osm}}$  der Elektrolyt-Lösung. Das Nährmedium ist ebenfalls eine Elektrolyt-Lösung mit unter anderem dissoziierten  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$  - Ionen. Ein Verdampfen des Nährmediums führt zu einer Erhöhung der Ionenkonzentration und somit zu einer Änderung der Molalität. Dies geschieht im Mikroskopinkubator bei  $T = 37^\circ\text{C}$  mit deaktiviertem Gas-Inkubationssystem. Während sich das Volumen durch Evaporation verringert, wird zu bestimmten Zeitpunkten eine  $V = 50\mu\text{l}$  Probe entnommen und die Molalität  $c_{\text{Osm}}$  mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat3000, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland) bestimmt. Das entnommene Probenvolumen wird nach der Messung wieder zurückgeführt. Währenddessen werden die Streuparameter durch den NWA alle 2.5 Minuten aufgezeichnet.

### 3.2.4. Datenauswertung

#### Wound-Healing-Assay

Die hochauflösenden Phasenkontrastaufnahmen in *Abb. 3.2. a)* zeigen die progressive Zellmigration in den zellfreien Bereich zu verschiedenen Zeitpunkten in der K2-Konfiguration. In rot dargestellt ist die verbleibende zellfreie Fläche. Abhängig von der gewählten Konfiguration wird der zellfreie Bereich für K1 in die Sektionen *IDT-1* bzw. *IDT-2* für die Fläche auf der Apertur und *VL* für die Delayline eingeteilt. In der K2-Konfiguration wird der zellfreie Bereich des Schallpfades als *VL* bezeichnet. In der ersten Aufnahme ist der komplette sensoraktive Bereich gelb hinterlegt, wobei *VL* durch ein gelbes Rechteck gekennzeichnet ist. Stellvertretend für K1 sind in der Aufnahme Teilausschnitte der Apertur *IDT-1* bzw. *IDT-2* oberhalb und unterhalb von *VL* zusätzlich gekennzeichnet. Die Auswertung der zellfreien Fläche im Bereich der *VL* erfolgt halbautomatisch durch das modifizierte ImageJ-Macro *MRI-Wound-Healing tool*<sup>3</sup>. Hierbei wird der künstliche Spalt durch die Software detektiert und anschließend durch rote Pixel markiert. Irrtümlich erfasste oder ausgeschlossene Bereiche werden anschließend manuell korrigiert. Für den Bereich der Apertur erfolgt die Auswertung jedoch vollständig manuell, da aufgrund der Struktur keine verlässliche Software-unterstützte Kantendetektion möglich ist. Die ermittelten zellfreien Flächen  $F(t)$  werden auf den Ausgangswert zu Beginn der Messung  $F(0)$  normiert ( $F_{\text{mig}}(t) = F(t)/F(0)$ ). Die normierte Fläche  $F_{\text{mig}}(t)$  wird als Funktion der Zeit anschließend aufgetragen und ist in *Abb. 3.2. b)* dargestellt. Die nummerierten sternförmigen Symbole beschreiben die ermittelte zellfreie Fläche in den Mikroskopieaufnahmen in *Abb. 3.2. a)*.



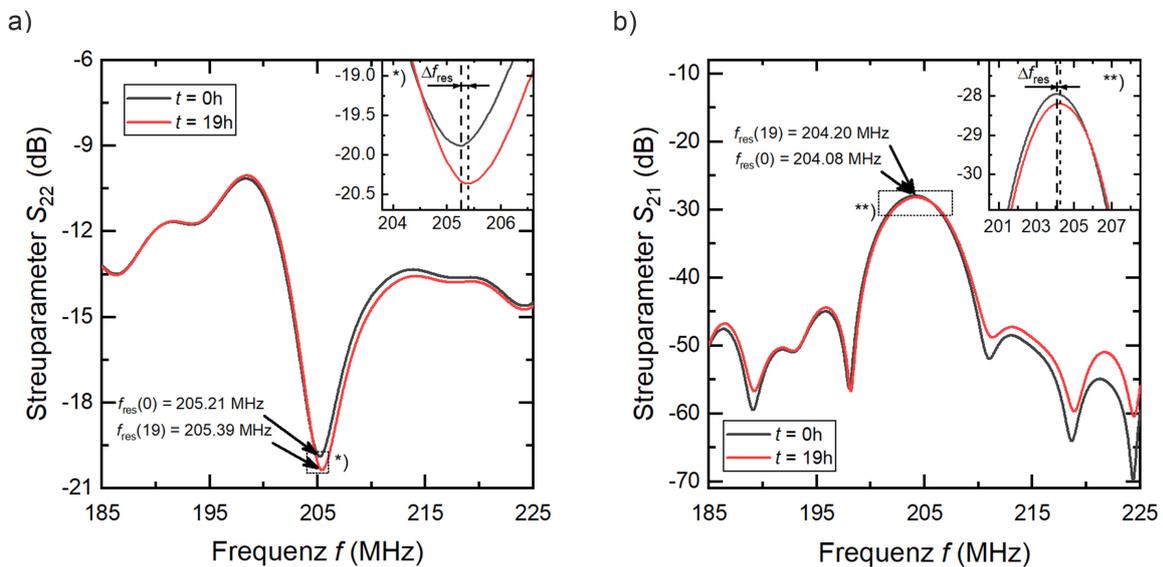
**Abbildung 3.2:**

a) Progressive Zellmigration adhärenter MDCK-II-Zellen in einem Wound-Healing-Assay auf einem SAW-Sensor in der K2-Konfiguration zu ausgewählten Zeitpunkten. Gelb hinterlegt ist die aktive Fläche des Sensors. Das gelbe Rechteck beschreibt die Verzögerungsleitung, während die Bereiche oberhalb und unterhalb der VL Teilausschnitte der Aperturen *IDT-1* und *IDT-2* zeigen. b) Normierte zellfreie Fläche der *VL* in Abhängigkeit der Zeit  $t$ . Hervorgehoben sind die ermittelten zellfreien Bereiche der Mikroskopieaufnahmen aus a).

<sup>3</sup>Internet-Adresse: [https://github.com/MontpellierRessourcesImagerie/imagej\\_macros\\_and\\_scripts/wiki/Wound-Healing-Tool](https://github.com/MontpellierRessourcesImagerie/imagej_macros_and_scripts/wiki/Wound-Healing-Tool)

## Auswertung der Streuparameter

Die durch den NWA ermittelten Daten beschreiben die zeitliche Entwicklung der Amplitude der Streuparameter  $S_{11}$ ,  $S_{22}$  und  $S_{21}$  und der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}(t)$  im Frequenzbereich  $S(f,t)$ . Neben der frequenzabhängigen Amplitude  $S$  wird auch die Phase der akustischen Oberflächenwelle  $\phi(t)$  erfasst. In *Abb. 3.3.* sind die Parameter einer beispielhaften Messung zum Zeitpunkt  $t = 0$  h und  $t = 19$  h dargestellt. Der Graph in *Abb. 3.3. a)* beschreibt den Verlauf der Rückflussdämpfung mit dem markanten Minimum der Amplitude  $S_{22}$  bei der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$ . Wie in der Abbildung ersichtlich ist, führen geringfügige Abweichungen von  $f_{\text{res}}$  zu vermeidbaren Fluktuationen der Amplitude  $S$ . Um die während der Messung stattfindende geringfügige Veränderung der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}(t)$ , bedingt u. a. durch die Zellmigration, zu kompensieren, werden im Folgenden für die Betrachtung der absoluten Amplitudenänderung  $\Delta S$  stets die ermittelten Extremwerte betrachtet. Neben der Rückflussdämpfung ist in *Abb. 3.3. b)* die frequenzabhängige Amplitude der Transmission  $S_{21}$  mit ihrem Maximum aufgetragen. Die Position  $f_{\text{max}}$  des Maximums ist unter anderem von den Resonanzfrequenzen  $f_{\text{res}}$  der IDT-Strukturen und dem Massenbelag der VL abhängig.  $f_{\text{max}}$  der maximalen Transmission bei  $t = 0$  h definiert die Messfrequenz für die Phase  $\phi(t, f_{\text{max}}(t = 0))$ . In den folgenden Messergebnissen wird stets der relative Unterschied  $\Delta S$  bzw.  $\Delta\phi$  angegeben, welcher sich aus dem Unterschied zwischen dem Messwert zum Zeitpunkt  $t$  und dem Wert zu Beginn der Messung bei  $t = 0$  h berechnet.



**Abbildung 3.3:**

Gemessene Rückflussdämpfung  $S_{22}$  (a) und Transmission  $S_{21}$  (b) einer beispielhaften Messung in der K1-Konfiguration zu Beginn der Messung ( $t = 0$  h) und nach dem kompletten Wundschluss ( $t = 19$  h) im gewählten Messspektrum. Wie an den Markierungen und in den Inset-Diagrammen (\*), (\*\*)) ersichtlich ist, findet durch die Zellmigration eine leichte Frequenzverschiebung um  $\Delta f$  statt. Zur Kompensation dieser Verschiebung werden bei der Datenauswertung die Extremwerte der Amplitude verwendet. Bei der Bestimmung der Phase  $\phi$  wird jedoch die Messfrequenz bei  $f_{\text{res}}(0)$  verwendet.

### 3.3. Sensorgestützte Überwachung des Zellwachstums

---

Die relative Phasenverschiebung  $\Delta\Phi_{21}$  des transmittierten SAW-Signals kann zur Untersuchung einer adhärennten Zellkultur verwendet werden.  $\Delta\Phi_{21}$  korreliert exakt mit der Flächenbelegung der Sensorfläche durch migrierende Zellen. Fluktuationen des Messsignals liefern eine Auskunft über das Wachstumsverhalten der Zellkultur und die Signalsteigung dient zur Quantifizierung des Ablösungsprozesses von Zellen unter Einwirkung von Noxen.

---

#### 3.3.1. Zellmigration in einem Wound-Healing-Assay

Mit dem SAW-Sensor wird das Zellwachstum auf dem SAW-Chip über eine große Zeitdauer von bis zu  $t = 70$  h überwacht. Da ein Wound-Healing-Assay mit MDCK-II-Zellen durchschnittlich weniger als 24 h für die komplette Flächenbelegung benötigt, kann aufgrund der hohen Messdauer die Messung in einen Zeitbereich der Wundheilung mit einem *offenen* Spalt und in einen Zeitbereich des konfluenten Zellrasens mit einem *geschlossenen* Spalt eingeteilt werden. Von besonderem Interesse ist insbesondere eine Änderung der Messparameter während des Migrationsvorganges.

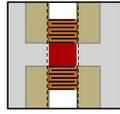
Für den direkten Vergleich und zur Schaffung eines Überblickes über den Verlauf der erfassten Parameter werden im Folgenden die Messergebnisse beider Konfigurationsmöglichkeiten K1 und K2 beschrieben. In *Abb. 3.4.* ist der Verlauf der Amplituden-  $\Delta S$  (*a, b*) und der Phasen-Änderung  $\Delta\phi$  (*c, d*) für zwei ausgewählte Beispiele über den kompletten Messzeitraum dargestellt. Die blauen Graphen beschreiben die normierte zeitabhängige zellfreie Fläche  $F_{\text{mig}}(t)$  im Bereich der VL (kompakt) und zusätzlich für K1 den Bereich der IDTs mit *IDT-1* (Striche) und *IDT-2* (Punkte). In K1 ist der Verlauf  $F_{\text{mig}}(t)$  stets für alle Flächen in einer Messung nahezu gleichmäßig. Durch  $F_{\text{mig}}(t)$  wird der Messzeitraum bis zum kompletten Wundschluss in den Bereich *offen* und *geschlossen* unterteilt. Der Bereich *offen* mit  $F_{\text{mig}}(t) > 0$  ist in den Graphen grau hinterlegt. Die zeitliche Entwicklung der Reflexion bezüglich Amplitude und Phase der IDTs ist in schwarz (*IDT-1*) bzw. grün (*IDT-2*) dargestellt und die Werte der Transmission in rot. Die hier dargestellten Daten sind stellvertretend für die zeitliche Entwicklung der Messparameter aller durchgeführten Experimente.

Für eine qualitative Rückführung auf die Änderung der zellfreien Fläche  $F_{\text{mig}}$  muss eine Korrelation der Streuparameter mit  $F_{\text{mig}}$  vorliegen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei K2 bezüglich der Reflexionsparameter der IDTs keine Änderung zu erwarten ist, da die Flächen *IDT-1* und *IDT-2* bereits mit Zellen belegt sind. Zum Zwecke der Vollständigkeit werden die Reflexionsparameter in K2 dennoch betrachtet. In K1 findet während der Zellmigration in *Abb. 3.4. a*) eine Abnahme der Reflexionsamplitude für beide IDT-Strukturen statt. Nach Erreichen der kompletten Flächenbelegung steigen die Werte jedoch wieder an. Bezüglich der Amplitude  $S_{21}$  ist keine konsistente Änderung erkennbar. Für die Phasenänderung  $\Delta\phi$  ist allerdings nur bei Transmission eine signifikante Änderung von  $\Delta\phi_{21}$  feststellbar (*Abb. 3.4. c*). Die Phase der Transmission erfährt eine maximale Verschiebung um  $\Delta\phi_{21} \approx 24.8^\circ$  exakt zum Zeitpunkt des Wundschlusses, während die reflektierte Phase der IDTs nahezu konstant bleibt. Während in K1 die Reflexionsamplitude  $S$  während der Zellmigration abnimmt, steigt diese konstant für K2 in *Abb. 3.4. b*) an. Die transmittierte Leistung  $S_{21}$  nimmt jedoch über den kompletten Messzeitraum stetig ab. Bei der Betrachtung der Phasenänderung  $\Delta\phi$  findet für alle gemessenen Kanäle nach einer anfänglich negativen Phasenverschiebung eine deutliche Zunahme der Phase bis zum Erreichen der Konfluenz des Zellrasens statt. Im *geschlossenen*, konfluenten Zustand ohne eine Änderung von  $F_{\text{mig}}$  nimmt die Phase wieder ab.

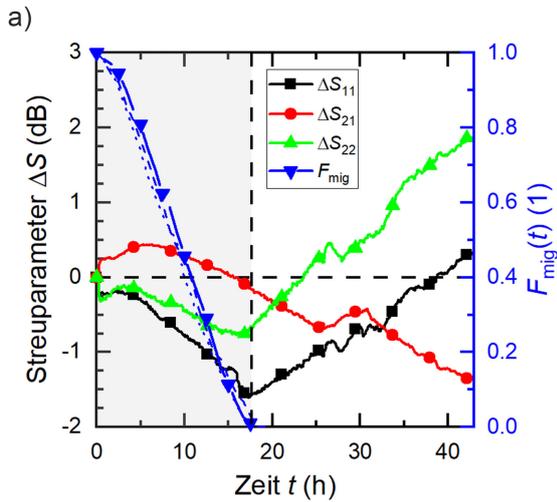
Um nun eine Korrelation zwischen einem Streuparameter und der zellfreien Fläche  $F_{\text{mig}}$  feststellen zu können, muss eine zur Flächenänderung äquivalente Änderung des Messsignals vorliegen und beim Erreichen der Konfluenz diese entweder für die weitere Messzeit konstant bleiben oder einen

Extremwert aufweisen. Diese notwendigen Bedingungen werden in dem vorgestellten Beispiel in der K1-Konfiguration von den Messparametern  $\Delta S_{11}$  und  $\Delta S_{22}$  sowie  $\Delta\phi_{21}$  und in K2 von  $\Delta S_{11}$  und  $\Delta\phi_{11}$ ,  $\Delta\phi_{22}$  und  $\Delta\phi_{21}$  erfüllt. Unter allen vorgestellten Parametern erreicht jedoch nur die Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  in beiden Konfigurationen die höchste Übereinstimmung mit  $F_{\text{mig}}$ .

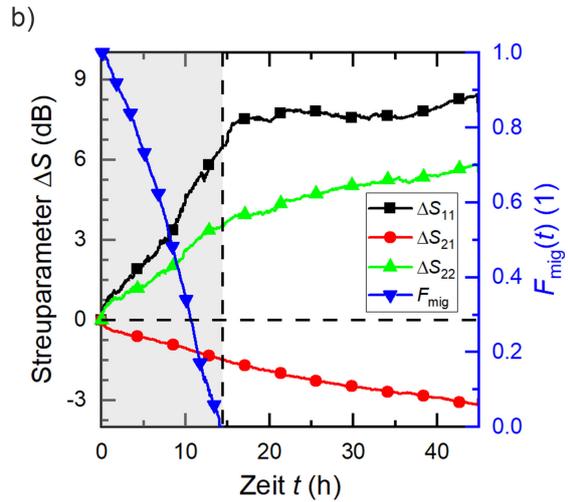
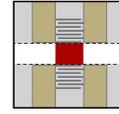
Konfiguration K1:



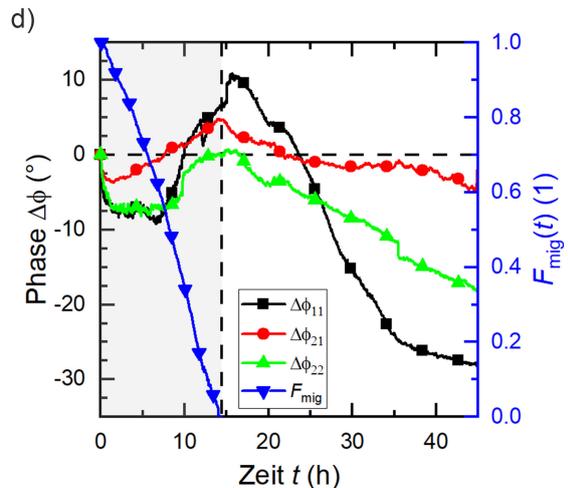
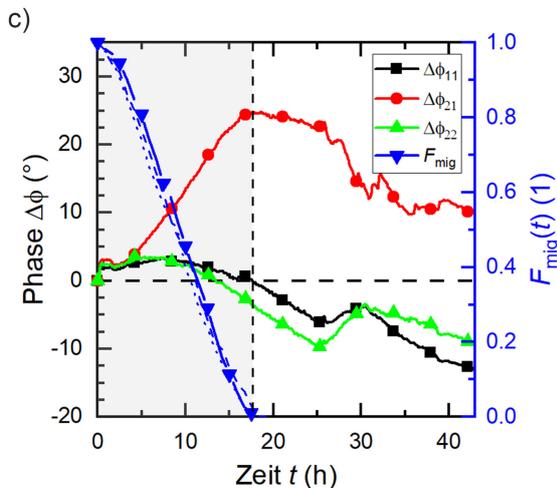
Amplitudenänderung



Konfiguration K2:



Phasenänderung

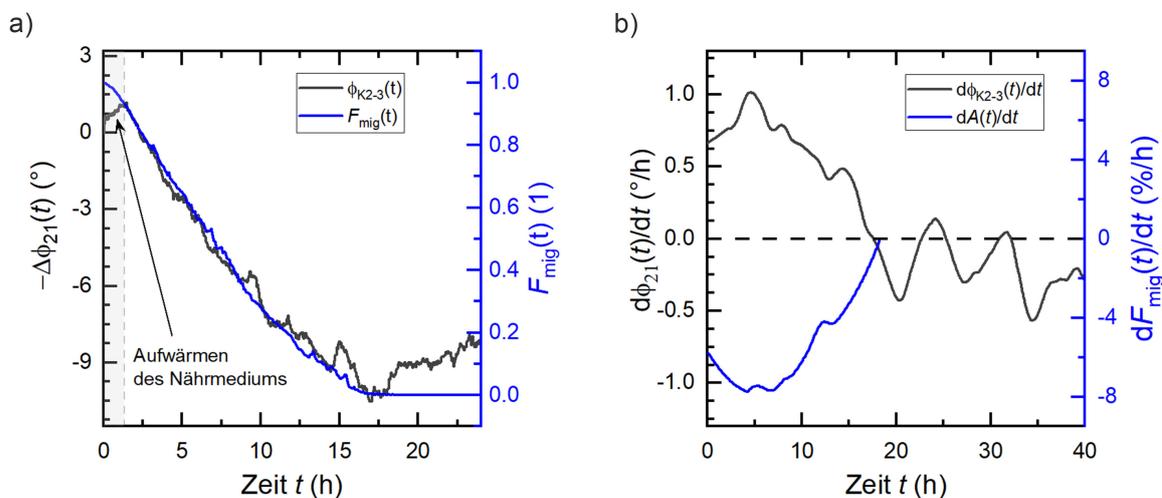


**Abbildung 3.4:**

Zeitliche Entwicklung der Streuparameter eines ausgewählten Experiments während (grau hinterlegt) und nach einem Wound-Healing-Assay. Dargestellt ist die Veränderung der Amplitude  $\Delta S$  (a, b)) und der Phase  $\Delta\phi$  (c, d)) für beide Konfigurationen K1 (links) und K2 (rechts). Ausgewählte Daten: K1-2, K2-2. (Daten entnommen aus [105]).

In Abb. 3.5 ist ein direkter Vergleich der zeitlichen Entwicklung der invertierten Phasenänderung  $\Delta\phi_{21}$  und der Flächenänderung  $F_{\text{mig}}$  dargestellt. Wie in Abb. 3.5. a) deutlich zu erkennen ist, folgt die Phase nach einem anfänglichen Anstieg anschließend exakt dem Verlauf von  $F_{\text{mig}}$ . Die maximale Phasenverschiebung wird bei  $F_{\text{mig}}=0$  erreicht und nimmt im weiteren Verlauf wieder ab. Die leichten Fluktuationen von  $\Delta\phi_{21}$  sind bedingt durch die hohe Sensitivität des Messaufbaus. Die kurzzeitige Zunahme der Phase bei  $0\text{ h} < t < 1\text{ h}$  beruht auf der Erwärmung des Nährmediums auf  $T = 37^\circ\text{C}$

nach Beginn des Experiments. Die Korrelation von  $\Delta\phi_{21}$  mit  $F_{\text{mig}}$  ist in besonderem Maße in der ersten Ableitung nach der Zeit sichtbar. Die absoluten Werte von  $\Delta\phi_{21}(t)$  und  $\dot{F}_{\text{mig}}(t)$  weisen einen identischen Verlauf auf und erreichen zeitgleich erstmalig ihren Nulldurchgang  $\Delta\phi_{21}(t) = \dot{F}_{\text{mig}}(t) = 0$ . Der Nulldurchgang beschreibt in diesem Fall den kompletten Wundschluss.

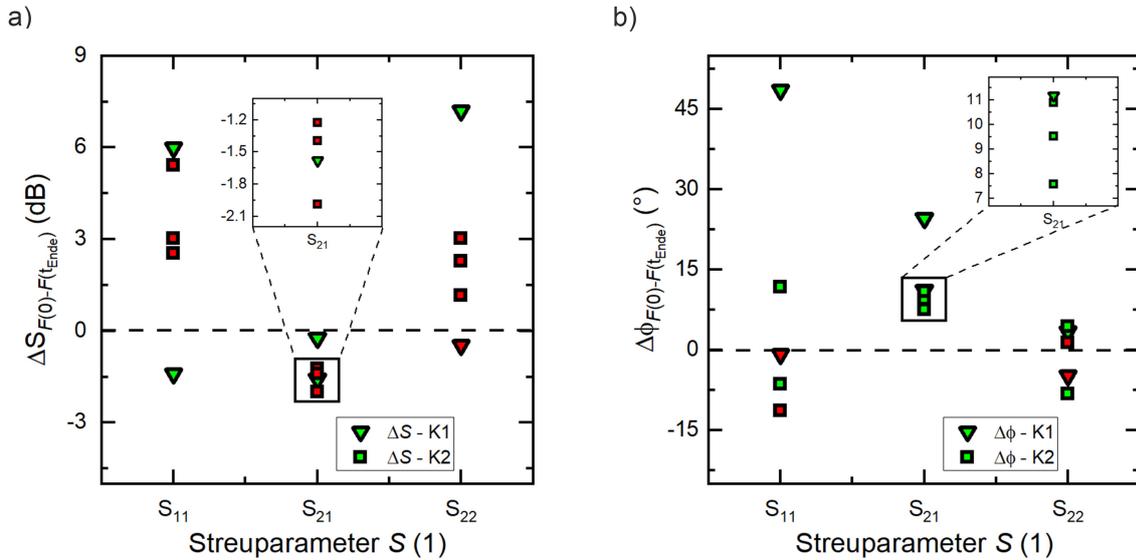


**Abbildung 3.5:**

Vergleich der Phasenänderung  $\Delta\phi_{21}$  mit der Flächenänderung  $F_{\text{mig}}$ . a) Der zeitliche Verlauf von  $\Delta\phi_{21}$  korreliert exakt mit der Flächenänderung  $F_{\text{mig}}$  während eines Wound-Healing-Assays. Nach Erreichen des Wundschlusses mit  $F_{\text{mig}} = 0$  nimmt die Phasenänderung wieder ab. b) Verlauf der zeitlichen Ableitung  $\dot{\Delta\phi}_{21}(t)$  und  $\dot{F}_{\text{mig}}(t)$ . Der erste Nulldurchgang beschreibt hier den Zeitpunkt des kompletten Wundschlusses. (Daten entnommen aus [105]).

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden für jede Konfiguration mehrere identische Messungen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu erlangen, ist in Abb. 3.6. die relative Änderung der Messparameter  $\Delta S$  (Abb. 3.6. a)) und  $\Delta\phi$  (Abb. 3.6. b)) zu Beginn der Messung bis zum Erreichen der Konfluenz bei  $F_{\text{mig}} = 0$  aufgetragen. Die innere Fläche der Symbole beschreibt, ob die notwendige Bedingung erfüllt wurde (grün), oder ob keine zu  $F_{\text{mig}}$  zurechenbare Änderung (rot) vorliegt. Hierbei ist zu beachten, dass eine Zunahme der Rückflussdämpfung zu einer Abnahme der Reflexionswerte der IDT-Strukturen führt, wohingegen die Transmission bei  $\Delta\phi > 0$  auf eine Zunahme der transmittierten Leistung hinweist.

Bei der Betrachtung der Amplitudenänderung  $\Delta S$  in Abb. 3.6. a) ist in besonderem Maße die Fluktuation der Rückflussdämpfungen  $\Delta S_{11}$  und  $\Delta S_{22}$  unabhängig von der gewählten Konfiguration erkennbar. Während in K2 stets die gemessene Rückflussdämpfung abnimmt, ist in K1 kein Trend zu beobachten. Nur bei  $\Delta S_{21}$  liegt eine geringe Streuung um  $\Delta\bar{S}_{21, K1} = -0.91 \text{ dB} \pm 0.95 \text{ dB}$  für K1 bzw.  $\Delta\bar{S}_{21, K2} = -1.54 \text{ dB} \pm 0.40 \text{ dB}$  für K2 vor. Wird die VL durch Zellen belegt, so findet eine geringfügige Dämpfung der Transmission statt. Ein zur Amplitudenänderung identisches Verhalten kann ebenfalls bei der Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  in Abb. 3.6. b) festgestellt werden. Während die Phasenverschiebung für  $\Delta\phi_{11}$  und  $\Delta\phi_{22}$  unspezifisch ist, ist diese jedoch besonders für  $\Delta\phi_{21}$  in der K2-Konfiguration in hohem Maße reproduzierbar. Die mittlere Verschiebung liegt für K1 bei  $\Delta\bar{\phi}_{21, K1} = 17.88^\circ \pm 9.50^\circ$  und für K2 bei  $\Delta\bar{\phi}_{21, K2} = 9.31^\circ \pm 1.65^\circ$ . Die positive Phasenverschiebung mit  $\Delta\phi_{21} > 0$  weist auf eine Erhöhung der Phasengeschwindigkeit durch die Zellbelegung der VL hin.

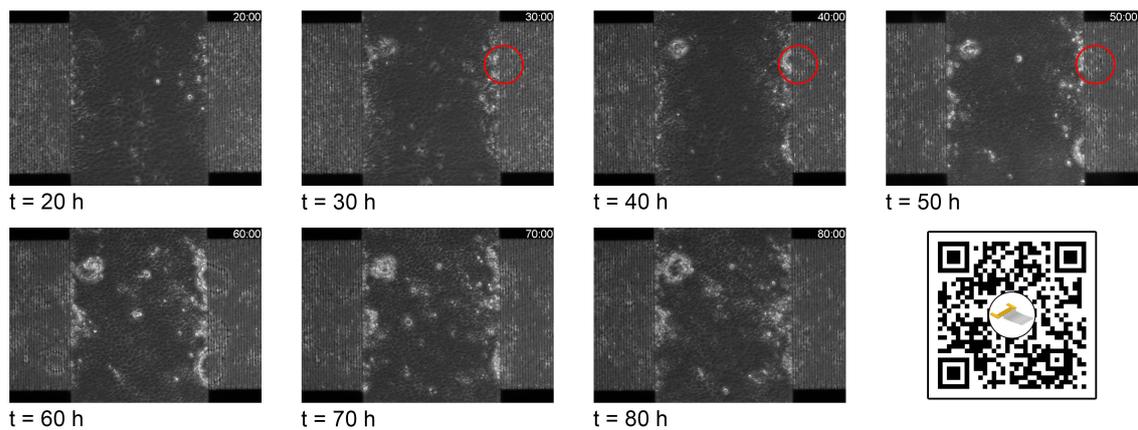
**Abbildung 3.6:**

Relative Amplituden-  $\Delta S$  (a)) und Phasen-Unterschied  $\Delta\phi_{21}$  (b)) in einem Wound-Healing-Assay zu Beginn  $t = 0\text{ h}$  und am Ende der Wundheilung mit  $F_{mig} = 0$  bei  $t = t_{\text{Ende}}$ . Dargestellt sind alle durchgeführten Experimente in beiden Konfigurationen K1 und K2. Die Farbe im Symbolinneren markiert die Erfüllung einer notwendigen Bedingung zur eindeutigen Bestimmung des Verlaufs von  $F_{mig}$ . (Daten entnommen aus [105]).

Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren eindeutig die Abhängigkeit der Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  von der durch Zellen belegten Fläche. Unabhängig von der gewählten Konfiguration nimmt mit abnehmender zellfreier Fläche die Phasenverschiebung des transmittierten Signals zu. Die positive Phasenverschiebung deutet auf eine Zunahme der Phasengeschwindigkeit durch die Zellbelegung hin. Die Reproduzierbarkeit der Phasenverschiebung wurde in besonderem Maße für die K2-Konfiguration demonstriert. Aufgrund dieser Ergebnisse ist als Messgröße für die Vermessung eines Wound-Healing-Assays  $\Delta\phi_{21}$  zu präferieren. In den folgenden Ergebnissen wird daher nur noch Bezug auf  $\Delta\phi_{21}$  genommen.

### 3.3.2. Konfluente Zelldynamik

Das hochdynamische System eines konfluenten Zellrasens unterliegt auch nach dem kompletten Wundschluss in einem Wound-Healing-Assay starken Veränderungen. Zellen wachsen und proliferieren, verändern ihre Form und strukturieren sich permanent neu. Um die Zellaktivität und das Wachstumverhalten eines konfluenten Zellrasens genauer untersuchen zu können, wurden die Experimente über den Zeitraum des Wound-Healing-Assay hinaus kultiviert und die Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  gemessen. In den Mikroskopieaufnahmen der *Abb. 3.7.* ist der geschlossene konfluente Zellrasen zu bestimmten Zeitpunkten dargestellt. Unmittelbar nach dem Wundschluss ist eine starke Fluktuation des Zellrasens sichtbar ( $19\text{ h} < t < 35\text{ h}$ ). Zellränder sind in diesem Zeitbereich nicht eindeutig identifizierbar. Ab  $t > 35\text{ h}$  nehmen die Fluktuationen des Zellrasens stetig ab. Bei  $t = 50\text{ h}$  bilden sich deutliche Zellkanten aus und es ist eine scharfe Abgrenzung der einzelnen Zellen möglich. Im weiteren Verlauf ( $t > 60\text{ h}$ ) findet keine weitere deutliche morphologische Veränderung des Zellrasens mehr statt.



**Abbildung 3.7:**

*Zeitliche Entwicklung eines konfluenten Zellrasens nach dem kompletten Wundschluss. Mit zunehmender Zeit ist eine Erhöhung der Zelldichte anhand der morphologischen Veränderung und des Auftretens von Zellkuppeln (rote Kreise erkennbar) sichtbar. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.*

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/ST5hzZNn7Uo>

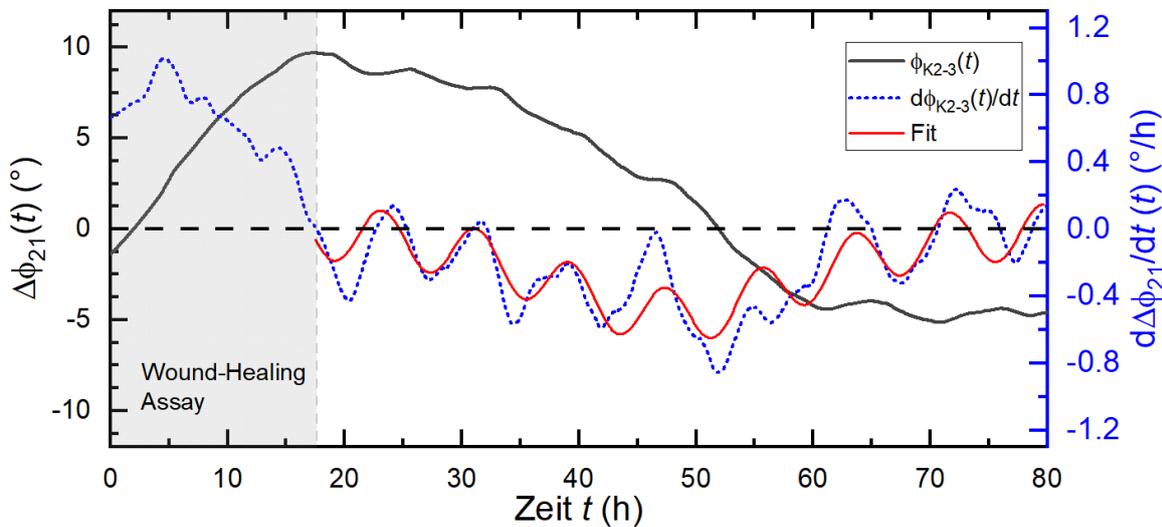
Die Ursache für dieses Verhalten ist unter anderem eine Zunahme der Zelldichte, bedingt durch die Zellmigration und das Zellwachstum. Zum einen migrieren Zellen weiterhin nach dem Wundschluss in den ehemals zellfreien Bereich und zum anderen findet eine Zunahme der Zelldichte durch Zellwachstum und Zellproliferation statt. Ein deutliches Indiz für eine Zunahme der Zelldichte ist das Auftreten sogenannter Zellkuppeln (bspw. ab  $t = 30\text{ h}$  auf dem rechten IDT, gekennzeichnet durch einen roten Kreis). Diese Kuppeln treten auf, wenn der laterale Druck innerhalb des Zellrasens zunimmt, sodass sich einzelne Zellen vom Substrat lösen und Wölbungen ausbilden. Mit steigender Zelldichte nimmt jedoch die Migrationsgeschwindigkeit und die Proliferationsrate aufgrund der Kontaktinhibition der Zellen ab [128]. Der Zellrasen erreicht schließlich eine maximale Zelldichte. Bei der Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  in *Abb. 3.8.* nach dem kompletten Wundschluss ist eine Korrelation des Verhaltens der Zellkultur mit dem gemessenen Signal feststellbar. Nach dem Erreichen der maximalen positiven Phasenverschiebung bei  $t = 18\text{ h}$  nimmt diese einer fallenden Sigmoidfunktion folgend stetig ab. Zellen strukturieren sich neu und die Zelldichte nimmt zu. Ab dem Zeitpunkt  $t > 60\text{ h}$ , bei dem keine deutliche Veränderung der Morphologie der Zellen mehr sichtbar ist, verweilt die Phasenverschiebung nahezu konstant bei einem Wert. Die absolute Änderung kann somit mit der Zelldichte in Zusammenhang gebracht werden.

Bemerkenswert im zeitlichen Verlauf von  $\Delta\phi_{21}$  ist die überlagerte Schwingung. Diese wird besonders

in der ersten zeitlichen Ableitung sichtbar. Der Verlauf der Phase unterliegt einer überlagerten harmonischen Oszillation. Unter der Annahme eines logistischen Wachstums<sup>4</sup> (Zellteilung bis zur Mitoseunterdrückung durch Kontaktinhibition) und einer überlagerten harmonischen Oszillation wird der Verlauf des Graphs durch die 1. Ableitung der fallenden Sigmoidfunktion und einer Sinusfunktion (Gl. 3.1) im Bereich  $18 \text{ h} \geq t \geq 80 \text{ h}$  angenähert:

$$f(t) = f_0 + \frac{-k\lambda S^2 e^{-\lambda St}}{(1 + ke^{-\lambda St})^2} + A \sin\left(\frac{\pi(t - t_1)}{w}\right) \quad (3.1)$$

mit  $k = \left(\frac{S}{f(0)} - 1\right)$ ,  $f_0$  dem Offset,  $S$  der Sättigungsgrenze,  $\lambda$  dem Wachstumsfaktor der Sigmoidfunktion und  $A, t_1, w$  der Amplitude, Phasenverschiebung und der halben Periode der Sinusfunktion. Die interessantesten Parameter sind die Sättigungsgrenze der maximalen Phasenverschiebung mit einem Wert von  $S = 15.26^\circ \pm 0.97^\circ$  und die halbe Periode  $T = 2w_2 = 8.07 \text{ h} \pm 0.02 \text{ h}$ .



**Abbildung 3.8:**

Zeitliche Entwicklung der Phase  $\Delta\phi_{21}$  und deren zeitliche Ableitung  $\Delta\dot{\phi}_{21}$  während der Kultivierung eines konfluenten Zellrasens auf einem SAW-Chip nach einem Wound-Healing-Assay.

In der Literatur wird eine Fluktuation des Gesamtvolumens von MDCK-II-Zellen um 20% während einer Zeitskala von  $T = 4 \text{ h}$  beschrieben [130]. Die hier beobachtete überlagerte Oszillation befindet sich somit in der gleichen Größenordnung und könnte den beobachteten Effekt erklären.

Der Grund der Oszillation und die Abnahme der absoluten Phasenverschiebung nach dem Wound-Healing-Assay ist die Änderung der effektiven Permittivität der Zellen. Eine Erläuterung hierfür findet anschließend in Kap. 3.4. statt.

Mit Hilfe akustischer Oberflächenwellen ist es somit möglich nicht nur die Zellmigration während eines Wound-Healing-Assays zu analysieren, sondern auch das Wachstumsverhalten in einem konfluenten Zellrasen zu untersuchen.

<sup>4</sup>Beschreibung eines biologischen Wachstumsprozesses mit einer Sättigungsgrenze durch eine Sigmoidfunktion:

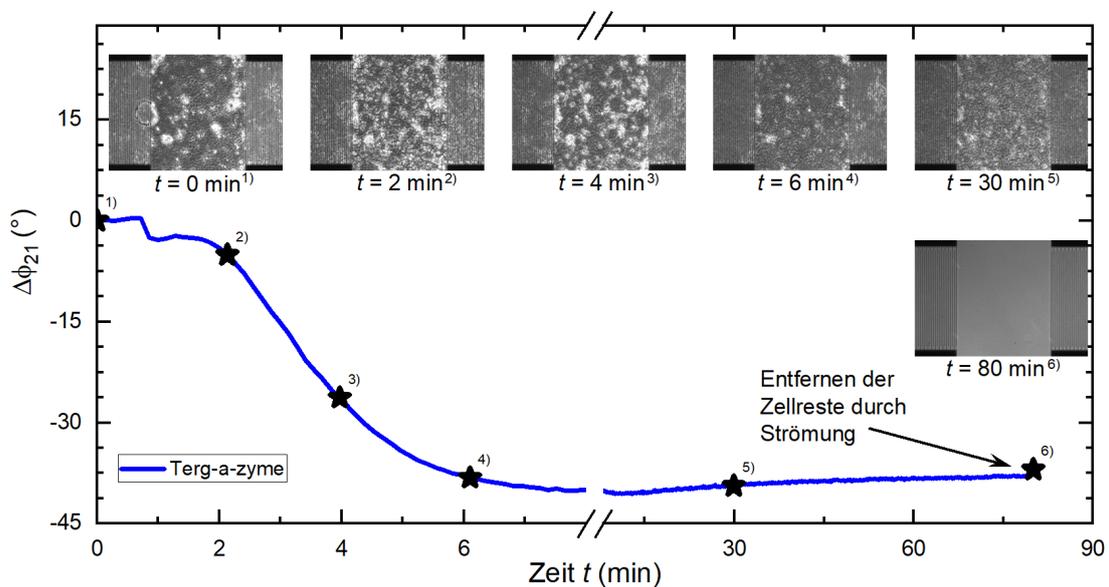
$f(t) = \frac{S}{1 + ke^{-\lambda t}}$  wobei  $k = \left(\frac{S}{f(0)} - 1\right)$  ist mit  $f$  der Population,  $\lambda$  dem Wachstumsfaktor und  $S$  der Sättigungsgrenze der Population. [129]

### 3.3.3. Quantifizierung des Ablösungsprozesses

Neben der Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Zellen ist auch deren Ableben von höchstem Interesse. Unter dem übermäßigen Einfluss von Noxen gehen Zellen in die Apoptose oder, falls kein kontrollierter Zelltod mehr möglich ist, in die Nekrose über. Dieser Prozess führt letztlich zur Lyse der Zelle und somit zur Ablösung von der Substratoberfläche. Durch die Einleitung des kontrollierten Zelltodes mittels Hyperthermie oder durch die Zugabe Zell-lysierender Stoffe wird im Folgenden der Ablösungsprozess mittels SAW überwacht und quantifiziert.

In *Abb. 3.9.* ist die zeitliche Entwicklung von  $\Delta\phi_{21}$  in einem Ablösungsprozess eines konfluenten Zellrasens auf einem SAW-Chip dargestellt. Als Zell-lysierender Stoff wurde das Enzym-basierte Reinigungsmittel Terg-a-zyme® (TGZ) (Z273287, SA) in Pulverform dem Nährmedium beigelegt, sodass eine finale Konzentration von  $c = 2.5 \text{ g/l}$  erreicht wurde. Zur Visualisierung des Ablösungsprozesses sind in dem Graphen zusätzlich Phasenkontrastaufnahmen des Zellrasens zu bestimmten Zeitpunkten eingefügt.

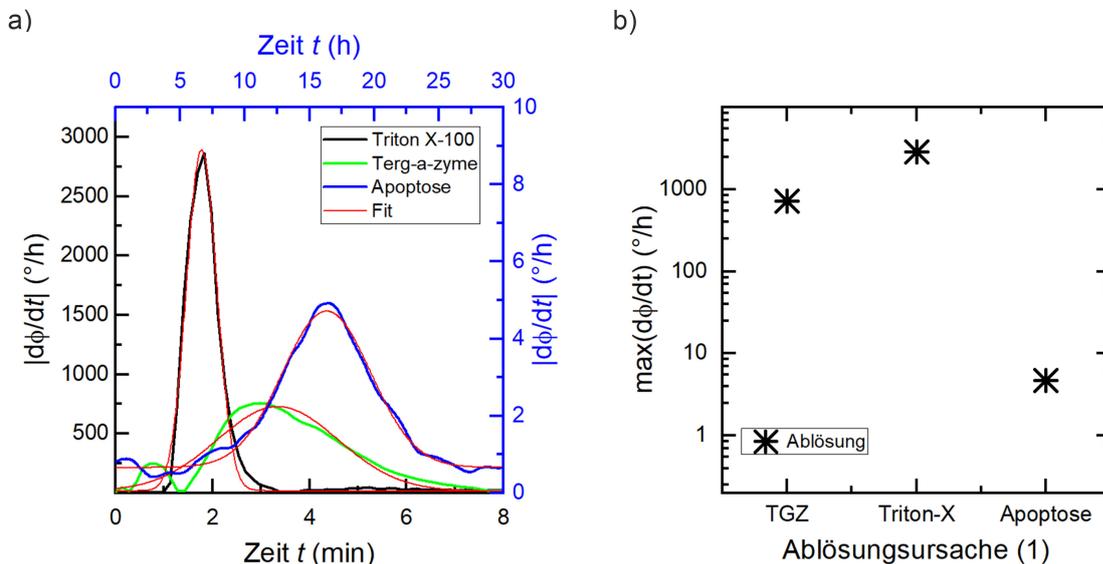
Nach einer anfänglichen Verzögerung verändert sich die Phase rapide und erreicht einen maximalen Wert von  $\Delta\phi_{21} = -40^\circ$ . Mit Erreichen des Maximalwertes verbleibt die Phase für die weitere Messdauer nahezu konstant. Wie zu erwarten war, verändert sich die Phase gegensätzlich zur Zellmigration. Während die Phasenverschiebung für die Zellmigration positive Werte einnimmt, werden negative Werte beim Ablösungsprozess erreicht. Dies deutet somit auf eine Abnahme der Phasengeschwindigkeit hin. In den Phasenkontrastaufnahmen ist die morphologische Veränderung der Zellstruktur deutlich zu erkennen. Bei  $t = 0 \text{ min}$  ist der konfluente Zellrasen mit Zellkuppeln (Hervorwölbungen aufgrund hoher Zelldichte) erkennbar. Durch die Zugabe von TGZ erhöht sich kurzzeitig die Intensität der einzelnen Zellen, bevor diese wieder rapide abnimmt und verblasst. Die Zellmembran wird lysiert und intrazelluläres Zytoplasma freigesetzt, sowie die Verbindungen zur Substratoberfläche aufgelöst. Nach ca. sechs Minuten ist die komplette Zellkultur lysiert und es findet keine Veränderung mehr statt. Abschließend ( $t = 80 \text{ min}$ ) wird durch eine Pipette eine leichte Strömung erzeugt, wodurch alle Zellreste von der Substratoberfläche restlos entfernt werden.



**Abbildung 3.9:**

Zeitliche Entwicklung der Phase  $\Delta\phi_{21}$  während der Ablösung eines konfluenten Zellrasens auf einem SAW-Chip. Durch Zugabe eines Zell-lysierenden Stoffes wird die Zellstruktur aufgelöst. Zu ausgewählten Zeitpunkten bilden Phasenkontrastaufnahmen den Zustand des Zellrasens ab. (Daten entnommen aus [105]).

Der Ablösungsprozess wurde mit dem Stoff Triton X-100 bei einer Konzentration von  $c = 0.05\%$  wiederholt. Des Weiteren wurde der Ablösungsprozess während der Zellapoptose, hervorgerufen durch Hyperthermie, untersucht. In allen Experimenten verlief der tendenzielle Verlauf nahezu identisch zu den in *Abb. 3.9.* dargestellten Ergebnissen. Die hierbei ermittelte durchschnittliche absolute Phasenverschiebung beträgt  $\Delta\bar{\phi}_{21} = -41.44^\circ \pm 5.9^\circ$ . Bezüglich der Geschwindigkeit der Phasenänderung ist jedoch ein deutlicher Unterschied in den einzelnen Experimenten feststellbar. Zur Quantifizierung der Ablösungsgeschwindigkeit ist in *Abb. 3.10. a)* die erste Ableitung der Phasenänderung nach der Zeit  $\Delta\dot{\phi}_{21}$  in Abhängigkeit der Ablösungsursache aufgetragen. Unter der Annahme, dass der Zeitpunkt der Zelllyse einer Normalverteilung folgt, kann der Verlauf von  $\Delta\dot{\phi}_{21}$  mit einer Gauß-Funktion angenähert werden. Da jedoch nicht von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden kann, wird die erweiterte Bi-Gauß-Funktion für asymmetrische Verläufe angewendet und nur der für beide Flanken identische Maximalwert der Amplitude bestimmt. Während die Ablösung durch Zell-lysierende Stoffe innerhalb von Minuten eintritt, benötigt die Apoptose Stunden bis zur vollständigen Ablösung. Da eine quantitative Darstellung der Ablösungsgeschwindigkeit von Interesse ist, ist in *Abb. 3.10. b)* die maximale Geschwindigkeit der Phasenänderung aufgetragen. Die logarithmische Skalierung verdeutlicht die Unterschiede in der Ablösungsgeschwindigkeit. Während die Apoptose-Werte eine Größenordnung von  $\mathcal{O}(10^1)$  annehmen erreicht Triton X-100  $\mathcal{O}(10^3)$ .



**Abbildung 3.10:**

Quantifizierung des Ablösungsprozesses. a)  $\Delta\dot{\phi}_{21}$  für unterschiedliche Ablösungsursachen angenähert durch eine Bi-Gauß-Funktion. Der Verlauf der Apoptose (blauer Graph) wird hierbei durch die blauen Achsen (oben, rechts) wiedergegeben. b) In a) ermittelte Maximalwerte der Phasenänderung geben Rückschluss auf die Effektivität der Zell-lysierende Stoffe und Prozesse. (Daten entnommen aus [105]).

### 3.3.4. Überwachung der Kultivierungsbedingungen

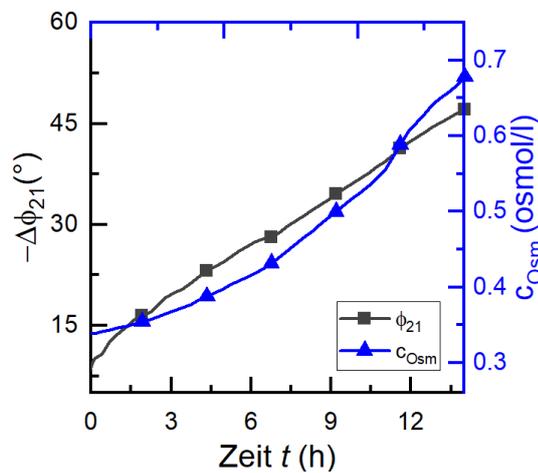
Für Zellkulturen sollten stets ideale Kultivierungsbedingungen wie Temperatur  $T = 37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  (v/v) oder eine wassergesättigte Atmosphäre vorliegen. Diese Randbedingungen können leicht durch Sensoren außerhalb der Zellkultur bestimmt werden. Neben diesen Kultivierungseigenschaften ist jedoch die Qualität des Nährmediums, wie beispielsweise der pH-Wert oder die Osmolalität, ebenfalls von höchstem Interesse. Der ideale pH-Wert von 7.4 wird durch das offene Hydrogencarbonat-Puffersystem gewährleistet, weshalb ein Volumenanteil von 5%  $\text{CO}_2$  in der Atmosphäre vorhanden sein muss. Zur visuellen Überwachung des pH-Wertes ist Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt. Bei 40  $\mu\text{M}$  Phenolrot in einem Nährmedium wird das Medium bei steigendem pH-Wert (7.6) zuerst pink und anschließend

(7.8) violett.

Bei sauren Werten findet ein Farbwechsel von orange zu gelb statt. Eine vergleichbare, leicht durchzuführende Überwachung ist jedoch nicht für die Osmolalität des Nährmediums möglich. Durch das Verdampfen der Flüssigkeit findet eine Erhöhung der Osmolalität statt, was wiederum zu einem erhöhten osmotischen Druck und somit zu einer Schädigung der Zellkultur führt.

Eine mögliche Form der Osmolalitäts-Überwachung ist die Messung der Änderung der Phasengeschwindigkeit einer SAW abseits der Zellkultur im Nährmedium. Durch die Messung der Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  und der Überprüfung der Osmolalität  $c_{\text{osm}}$  während der Volumenabnahme durch Evaporation konnte eine Abhängigkeit der beiden Größen identifiziert werden. In *Abb. 3.11* ist die Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  und die Osmolalität  $c_{\text{osm}}$  in Abhängigkeit der Experimentierdauer  $t$  aufgetragen. Wie zu erkennen ist, nimmt die invertierte Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  mit steigender Osmolalität  $c_{\text{osm}}$  zu. Die erhöhte Salzkonzentration und somit die veränderte Permittivität  $\epsilon$  des Nährmediums führt zu einer Veränderung der Phasengeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwelle.

Die physikalische Ursache dieser vielfältig dargestellten Änderungen der akustischen Oberflächenwelle sollen nun durch eine theoretische Betrachtung der Störeinflüsse erläutert werden.



**Abbildung 3.11:**

Abhängigkeit der Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  von der Osmolalität  $c_{\text{osm}}$  der SAW-Chip-bedeckenden Flüssigkeit. (Daten entnommen aus [105]).

### 3.4. Diskussion

---

*Die durch Zellbewuchs hervorgerufene Modifikation der Permittivität und Leitfähigkeit des sensorflächenbedeckenden Materials führt zu einer Erhöhung der Phasengeschwindigkeit. Diese „akustoelektrische Interaktion“ ist dominant gegenüber der mechanischen Störung wie der Änderung des Massenbelags, der Dichte oder Viskosität.*

---

In den vorliegen Daten konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Phasengeschwindigkeit des Transmissionssignals äußerst sensitiv gegenüber Änderungen in der Flächenbelegung der sensorischen Oberfläche durch adhärenente Zellen reagiert. Wie in *Kap. 2.3.2.* dargestellt, gibt es eine Vielzahl verschiedener Faktoren, die auf die SAW-Ausbreitung einwirken können. Die hierbei vorgestellte *Gl. 2.37* des komplexen Ausbreitungsvektors  $\gamma$  beschreibt die Überlagerung aller einzelnen Effekte und soll nun für den vorliegenden spezifischen Fall genauer untersucht werden [53]:

$$\frac{\gamma}{k} = \frac{1}{k} \left( \frac{\partial \gamma}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial \gamma}{\partial \eta} \Delta \eta + \frac{\partial \gamma}{\partial \rho} \Delta \rho + \frac{\partial \gamma}{\partial G} \Delta G + \frac{\partial \gamma}{\partial T} \Delta T + \frac{\partial \gamma}{\partial p} \Delta p + \frac{\partial \gamma}{\partial \sigma} \Delta \sigma + \frac{\partial \gamma}{\partial \epsilon} \Delta \epsilon \right) \quad (3.2)$$

mit Massebelag  $m$ , Dichte  $\rho$ , Viskosität  $\eta$ , Schermodul  $G$ , Leitfähigkeit  $\sigma$ , Permittivität  $\epsilon$ , Temperatur  $T$  und Druck  $p$ .

Im Rahmen eines Wound-Healing-Assays findet ein Übergang von einer zellfreien zu einer zellbelegten Sensoroberfläche statt. Hierbei ist die sensoraktive Oberfläche von Beginn an mit einer leitfähigen Flüssigkeit (Nährmedium) bedeckt, wodurch die SAW in ihrer Ausbreitung im Vergleich zum Vakuum bereits gestört wird. Die durch die Zellmigration in den Schallpfad bedingte Änderung der Störungseinflüsse führt zur einer relativen Variation des transmittierten Signals bezüglich ihrer Amplitude und ihrer Phase. Allgemein gilt nach *Gl. 2.36*, dass die Geschwindigkeits- und Dämpfungsänderungen unabhängig voneinander zu betrachten sind. Da in den vorliegenden Daten die Dämpfung der Transmission  $S_{21}$  nicht der Flächenbelegung  $A_{\text{mig}}$  zugeordnet werden kann, werden die Dämpfungsbeiträge der Dämpfungskonstanten  $\Delta\alpha$  im Folgenden vernachlässigt. Die in den Messungen festgelegte Messgröße der Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  des Transmissionssignals resultiert hingegen aus einer Änderung der Phasengeschwindigkeit  $\frac{\Delta c}{c_0}$ , wobei  $c_0$  die Phasengeschwindigkeit der SAW im Nährmedium ist. Die von der Phasengeschwindigkeit abhängige messbare Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  lässt sich wie folgt darstellen:

$$\Delta\phi_{21} = \frac{\Delta c}{c_0} \frac{l_d}{\lambda} \frac{360^\circ}{\lambda} \quad (3.3)$$

mit  $l_d$  der Länge der VL und  $\lambda$  der Wellenlänge. Im Fall der K2-Konfiguration wurde eine mittlere Verschiebung von  $\Delta\bar{\phi}_{21, K2} = 9.31^\circ \pm 1.65^\circ$  festgestellt, nach der *Gl. 3.3* ergibt dies mit einer Wegstrecke der Zell-unbelegten VL von  $l_d = l_2 = 500\mu\text{m}$  und einer Wellenlänge von  $\lambda = 20\mu\text{m}$  eine Geschwindigkeitsänderung von

$$\left( \frac{\Delta c}{c_0} \right)_{\text{exp}} = (1.03 \pm 0.18) \cdot 10^{-3}.$$

Die hierbei stattfindende Beeinflussung der Phasengeschwindigkeit kann, wie in *Gl. 2.37* beschrieben, von unterschiedlicher Natur sein. Unter der Annahme konstanter Kultivierungsbedingungen können die Beiträge der Temperatur  $T$  und des Drucks  $p$  vernachlässigt werden. Diese befinden sich, mit Ausnahme der kurzzeitigen Erwärmung des Nährmediums zu Beginn der Messung (siehe *Abb. 3.5.*), konstant bei  $T = 37^\circ\text{C}$  und  $p = 1\text{ atm}$ . Durch den Bewuchs des Schallpfades durch adhärenente Zellen findet jedoch eine Veränderung des Massenbelages, der viskoelastischen Eigenschaften (Steifigkeit) und der akustoelektrischen Wechselwirkung statt. Die einzelnen Beiträge der Gesamtstörung werden nun genauer erläutert.

### 3.4.1. Mechanische Störung

Eine auf der Substratoberfläche propagierende akustische Oberflächenwelle erfährt durch die mechanischen Eigenschaften einer angrenzenden Flüssigkeit eine Störung, welche abhängig ist von den Materialeigenschaften der angrenzenden Schicht. Diese kann unterschieden werden in eine Störung bedingt durch die viskoelastischen Eigenschaften der Flüssigkeit oder durch eine Massenablagerung auf der Sensoroberfläche.

#### *Viskose Kopplung*

Befindet sich eine Newtonsche (rein viskose) Flüssigkeit auf der Sensoroberfläche, so findet aufgrund der Scherbewegung des Substrates eine Teilchenauslenkung innerhalb einer dünnen Schicht nahe der Oberfläche statt. Abhängig von der Viskosität und der Dichte der Flüssigkeit kommt es hierbei zu einer Geschwindigkeitsänderung und Dämpfung der mechanischen Auslenkung. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass biologische Schichten nicht als starre Objekte, sondern viskoelastisch betrachtet werden müssen [131]. Diese Schicht besitzt gegenüber dem Nährmedium somit eine unterschiedliche Dichte  $\rho$  und Viskosität  $\eta$ . Unter der Annahme, dass sich das Nährmedium und die Zellschicht wie eine Newtonsche Flüssigkeit mit der Viskosität  $\eta_n$  bzw.  $\eta_z$  und der Dichte  $\rho_n$  bzw.  $\rho_z$  verhalten, kann die beim Zellbewuchs stattfindende Geschwindigkeitsänderung wie folgt beschrieben werden [119]:

$$\frac{\Delta c}{c_0} = -\frac{vv_2^2}{4\omega P} \left( \sqrt{\frac{\omega\rho_z\eta_z}{2}} - \sqrt{\frac{\omega\rho_n\eta_n}{2}} \right) \quad (3.4)$$

wobei  $v_2$  die Teilchengeschwindigkeitskomponente der SAW und  $P$  der Energiefluss pro Einheitslänge darstellen. Nach *Janshoff et al.* liegt das Dichte-Viskositätsprodukt der verwendeten Zelllinie MDCK-II bei  $\sqrt{\eta_z\rho_z} = 0.386 \pm 0.008 \sqrt{(\text{g}^2/(\text{cm}^4\text{s}))}$  und das eines vergleichbaren Nährmediums bei  $\sqrt{\eta_n\rho_n} = 0.103 \pm 0.005 \sqrt{(\text{g}^2/(\text{cm}^4\text{s}))}$  [132]. Unter Berücksichtigung der Literaturwerte wird eine Verringerung der Phasengeschwindigkeit mit  $\frac{\Delta c}{c_0} < 0$  erwartet. Da jedoch nach den zuvor vorgestellten experimentellen Daten eine positive Phasenverschiebung und somit eine Erhöhung der Phasengeschwindigkeit vorliegt, kann die viskose Kopplung als Ursache ausgeschlossen werden.

#### *Massenablagerung*

Die durch die Ablagerung einer elastischen, viskosen Schicht hervorgerufene Massenänderung  $\Delta m$  führt zu einer Geschwindigkeitsänderung der propagierenden SAW. Diese Änderung in der Phasengeschwindigkeit ist proportional zur Massenänderung auf der Sensorfläche und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden [133]:

$$\frac{\Delta c}{c_0} = -c_m f_{\text{SAW}} \Delta m \delta \quad (3.5)$$

mit  $c_m$  einer experimentell bestimmten Massensensitivität und  $\delta$  Anzahl pro Einheitsfläche (Belegung). Da Zellen eine höhere Dichte als das umgebende Nährmedium aufweisen, findet durch den Zellbewuchs eine Zunahme der Massenablagerung auf der Sensoroberfläche statt. Dies führt schließlich zu einer Verringerung der Phasengeschwindigkeit und schließt die Massenablagerung als Ursache des Effekts ebenfalls aus.

### 3.4.2. Akustoelektrische Interaktion

Auf piezoelektrischen Substraten propagierende akustische Oberflächenwellen erzeugen elektrische Felder, die evaneszent in beide Halbräume hineinreichen. Ladungsträger einer auf dem Substrat befindlichen leitfähigen Schicht reagieren auf diese elektrische Felder und versuchen diese zu kom-

pensieren. Die Störung einer SAW aufgrund der elektrischen Eigenschaften der bedeckenden Schicht wird im Allgemeinen als *akustoelektrische Interaktion* bezeichnet. Die Kenngrößen stellen hierbei die Permittivität  $\epsilon$  und die Leitfähigkeit  $\sigma$  der Schicht dar. Im Fall einer leitfähigen Probenflüssigkeit mit  $\sigma \neq 0$  erhält man die komplexe Permittivität  $\epsilon^*$  mit

$$\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon'' = \epsilon_r \epsilon_0 - i \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0} \quad (3.6)$$

mit  $\epsilon_0$  der elektrischen Feldkonstante,  $\epsilon_r$  der relativen Permittivität der Probe und  $\omega = 2\pi f_{\text{SAW}}$  der Kreisfrequenz. Im Fall einer nicht leitfähigen Referenzflüssigkeit ( $\sigma = 0$ ) mit der Permittivität  $\epsilon_{\text{ref}}^* = \epsilon_{r,\text{ref}} \epsilon_0$  mit  $\epsilon_{r,\text{ref}} = 80$  folgt durch den Austausch durch eine leitfähigen Probe mit  $\epsilon^*$  eine Veränderung der Phasengeschwindigkeit. Diese kann durch *Gl. 3.7* beschrieben werden [134]:

$$\frac{\Delta c}{c_0} = - \frac{K_{\text{eff}}^2 (\sigma/\omega)^2 + \epsilon_0 (\epsilon_r - \epsilon_{r,\text{ref}}) (\epsilon_r \epsilon_0 + \epsilon_P^T)}{2 (\sigma/\omega)^2 + (\epsilon_r \epsilon_0 + \epsilon_P^T)^2} \quad (3.7)$$

mit  $K_{\text{eff}}^2$  dem elektromechanischen Kopplungskoeffizienten und  $\epsilon_P^T$  die effektive Permittivität des piezoelektrischen Kristalls. Beim verwendeten Kristall LiTaO<sub>3</sub> 36° rot YX-Cut betragen diese Werte mit Wasser beladen  $K_{\text{eff}}^2 = 2.7 \cdot 10^{-2}$  und  $\epsilon_P^T = 4.58 \cdot 10^{-10}$  F/m [119].

Da sowohl das Nährmedium als auch die adhärennten Zellen eine Leitfähigkeit mit  $\sigma \neq 0$  aufweisen, ist die durch die Flächenbelegung gemessene Änderung der Phasengeschwindigkeit die relative Differenz beider gestörter Zustände:

$$\left( \frac{\Delta c}{c_0} \right)_{n \rightarrow z} = \left( \frac{\Delta c}{c_0} \right)_{r \rightarrow n} - \left( \frac{\Delta c}{c_0} \right)_{r \rightarrow z} \quad (3.8)$$

mit  $n$  dem Nährmedium,  $z$  den Zellen und  $r$  der Referenz.

Die Änderung der Phasengeschwindigkeit durch den Bewuchs mit Zellen und der hierbei stattfindende Wechsel der Permittivität von Nährmedium  $\epsilon_n^*$  zur Permittivität von Zellen  $\epsilon_z^*$  kann schließlich wie folgt beschrieben werden [135]:

$$\frac{\Delta c}{c_0} = - \frac{K_{\text{eff}}^2 (\epsilon_{\text{ref}}^* + \epsilon_P^T) AC + (BD/\omega^2)}{2 (\epsilon_{\text{ref}}^* + \epsilon_P^T) A^2 + (B/\omega)^2} \quad (3.9)$$

mit

- $A = (\epsilon_{r,z} \epsilon_0 + \epsilon_P^T) (\epsilon_{r,n} \epsilon_0 + \epsilon_P^T) - \frac{\sigma_z \sigma_n}{\omega^2}$
- $B = \sigma_z (\epsilon_{r,n} \epsilon_0 + \epsilon_P^T) + \sigma_n (\epsilon_{r,z} \epsilon_0 + \epsilon_P^T)$
- $C = \epsilon_0 (\epsilon_{r,z} - \epsilon_{r,n})$
- $D = \sigma_z - \sigma_n$

Für die Abschätzung der Phasengeschwindigkeitsänderung können die Permittivitäten des Nährmediums  $\epsilon_n^*$  und der Zellen  $\epsilon_z^*$  theoretisch berechnet werden.

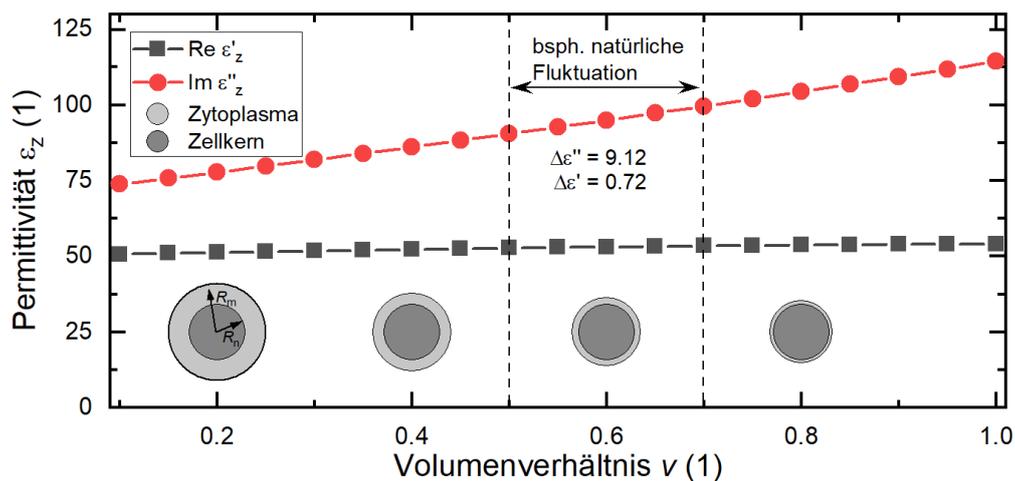
#### *Permittivität des Nährmediums (Elektrolyt-Lösung)*

Neben Aminosäuren, Vitaminen, Proteinen und Glucose sind anorganische Salze wie CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl oder NaHCO<sub>3</sub> dem Nährmedium beigesetzt. Durch die dissoziierten Salze kann das Nährmedium als Elektrolyt-Lösung betrachtet werden. Da es sich um eine konzentrierte Elektrolyt-Lösung mit  $c < 0.5$  mol/l handelt, kann die Permittivität anhand des klassischen Debye-Drude-Modells sowie der Davies-Gleichung berechnet werden. Die hierzu notwendigen Rechenschritte sind im Anhang *Kap. A.1.* erläutert. Für das verwendete Nährmedium erhält man schließlich eine Permittivität von

$$\underline{\epsilon_n^* = 79.64 + i124.86.}$$

## Permittivität der Zelle (Schalenmodell)

Die Permittivität von eukaryotischen Zellen kann im Allgemeinen mittels eines Zwei-Schalen-Modells theoretisch berechnet werden [136]. Hierbei stellt die äußere Schale des Modells die Zellmembran mit dem Zytoplasma dar und die innere Schale den Zellkern mit dessen Zellkernhülle. Jedes Kompartiment der Zelle weist eine unterschiedliche relative Permittivität und Leitfähigkeit auf und stellt einen Beitrag zur Gesamtpermittivität der Zelle dar. Eine exakte Beschreibung des Modells und der hierbei angewendeten Berechnungsgrundlage kann ebenfalls aus dem Anhang *Kap. A.2.* entnommen werden. Das Gesamtvolumen einer Zelle unterliegt permanenten dynamischen Schwankungen. Abhängig von der Zellaktivität und vom -zyklus kann sich die Größe des Zellkerns und/oder des Gesamtvolumens ändern. Dies geschieht aktiv unter anderem durch die Dynamik des Zytoskeletts oder auch passiv durch thermische Fluktuationen [137]. Bei der verwendeten Zelllinie MDCK-II oszilliert das Zellvolumen typischerweise mit einer Gesamtvolumenänderung von 20% bei einer Zeitskala von typischerweise  $t = 4\text{ h}$  [130]. Hierbei ändert sich das Volumenverhältnis des Zellkerns zum Gesamtvolumen stetig, wodurch sich die effektive Permittivität  $\epsilon_z^*$  ebenfalls dynamisch ändert. Hierbei wird das sogenannte Volumenverhältnis  $v$  eingeführt, was das Verhältnis Volumen Zellkern zu Volumen Zelle mit  $v = R_n^3/R_m^3$  mit  $R_n$  dem Radius des Zellkerns und  $R_m$  dem Gesamtradius der Zelle definiert. In der Berechnung wurde allerdings der Radius des Zellkerns als konstant angenommen mit  $R_n = \text{const.}$ , sodass sich nur das Gesamtvolumen  $R_m$  ändert. In *Abb. 3.12.* ist der Real- und Imaginärteil der komplexen Permittivität  $\epsilon_z^*$  der Zelle in Abhängigkeit des Volumenverhältnisses  $v$  aufgetragen.



**Abbildung 3.12:**

Theoretisch berechnete Permittivität einer eukaryotischen Zelle in Abhängigkeit des Volumenverhältnisses  $v$  Zellkern zu Gesamtvolumen [136] mit beispielhaften Modelldarstellungen. Hierbei wird der Radius des Zellkerns als konstant angenommen.

Wie deutlich zu erkennen ist, steigt der Imaginärteil  $\text{Im}(\epsilon_z^*)$  konstant mit steigendem Volumenverhältnis  $v$  an, während der Realteil  $\text{Re}(\epsilon_z^*)$  nahezu konstant verbleibt. Es werden somit Werte von minimal

$$\underline{\epsilon_{z,\min}^* = 50.7 + i73.8 \text{ für } v = 0.1}$$

bis maximal

$$\underline{\epsilon_{z,\max}^* = 54.0 + i114.3 \text{ für } v = 1.0}$$

eingegenommen.

Werden die nun theoretisch ermittelten Werte in die *Gl. 3.9* eingesetzt, so erhält man abhängig von dem Volumenverhältnis  $v$  eine Änderung der Phasengeschwindigkeit aufgrund der akustoelektrischen Interaktion von:

$$0.64 \cdot 10^{-3} \leq \frac{\Delta c}{c_0}(v) \leq 4.32 \cdot 10^{-3} \text{ für } v \in [0.1; 1]$$

Dieses Ergebnis spiegelt die experimentellen Daten mit  $\left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{exp}} = (1.03 \pm 0.18) \cdot 10^{-3}$  wider. Das Verdrängen des Nährmediums durch die migrierenden Zellen führt somit zu einer Verringerung der effektiven komplexen Permittivität, was aufgrund der akustoelektrischen Interaktion zu einer Erhöhung der Phasengeschwindigkeit führt. Das experimentell gemessene Ergebnis ist jedoch eine Überlagerung aller betrachteten Effekte und kann wie folgt beschrieben werden:

$$\left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{exp}} = \left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{vK}} + \left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{Ma}} + \left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{aI}} \quad (3.10)$$

mit vK: *viskose Kopplung*, Ma: *Massenablagerung* und aI: *akustoelektrische Interaktion*, wobei  $\left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)_{\text{aI}} > 0$  den mit Abstand größten Beitrag liefert.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann insbesondere in einem Wound-Healing-Assay in der K2-Konfiguration die gemessene Phasenverschiebung mit der Flächenbelegung durch die migrierenden Zellen korreliert werden. Die gesamte VL mit der Länge  $l_d$  kann somit untergliedert werden in eine Laufstrecke ohne Zellen definiert als  $l_n$  und einer Strecke belegt durch Zellen mit  $l_z$  wobei  $l_d = l_n + l_z$ . Nach eingehender Ermittlung der maximalen Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21, \text{max}}$  während eines Wound-Healing-Assays spiegelt das Verhältnis  $\Delta\phi_{21}/\Delta\phi_{21, \text{max}}$  die durch Zellen belegte VL mit  $l_z/l_d$  wider.

Die im Anschluss an den Wound-Healing-Assay gemessenen Fluktuationen in der ersten zeitlichen Ableitung des Messsignals  $\Delta\dot{\phi}_{21}$  in *Abb. 3.8.* werden vermutlich durch die kollektive Aktivität des Zytoskeletts hervorgerufen. Die nach der Literatur zu erwartende Fluktuation des Gesamtvolumens um 20% führt theoretisch, wie in *Abb. 3.12.* illustriert, zu einer Änderung der Permittivität von  $\Delta\epsilon_z^* = 9.12 + i0.72$  und somit einer Phasenverschiebung von  $\Delta\phi_{21} = \pm 7.3^\circ$ . Die beobachtete Phasenverschiebung mit  $\Delta\phi_{21} \approx \pm 3^\circ$  ist zwar für die erwartete Änderung des Volumenverhältnisses geringer, jedoch stimmt die Zeitskala in der Größenordnung der Periodendauer mit den Literaturwerten überein. Nach dem beobachteten Wundschluss des Wound-Healing-Assays und dem Erreichen der maximalen Phasenverschiebung nimmt die Phasengeschwindigkeit über den kompletten Messzeitraum wieder konstant ab. Dies beruht ebenfalls auf dem Volumenverhältnis  $v$  der Zellen. Während direkt nach dem Wundschluss eine relativ geringe Zelldichte vorliegt, steigt diese aufgrund der anhaltenden Proliferation der Zellen konstant an. Die verfügbare Fläche pro Zelle nimmt hierbei stetig ab und somit die relative Zellkerndichte pro Fläche stetig zu. Das Volumenverhältnis  $v$  nimmt somit durch eine ansteigende Zelldichte ab. Dies führt zu einer Steigerung der Permittivität und somit zu einer Verringerung der Phasengeschwindigkeit  $\left(\frac{\Delta c}{c_0}\right)$ . Aufgrund der zellulären Kontaktinhibition wird die Proliferation mit steigender Zelldichte zunehmend unterdrückt [128], bis schließlich die Zelldichte konstant verbleibt. Dieser Vorgang ist ebenfalls in *Abb. 3.8.* ab  $t = 60$  h ersichtlich mit einer nahezu konstanten absoluten Phasenverschiebung.

Abschließend erklärt die Permittivitätsänderung als Ursache dieses Effekts ebenfalls die beobachtete Phasenverschiebung während des Ablösungsprozesses. Aufgrund der Zellyse tritt das intrazelluläre Medium aus, wodurch eine Verdünnung mit dem Nährmedium stattfindet. Die effektive Permittivität der Zellen nähert sich somit dem des Nährmediums an und es findet die beobachtete gegensätzliche Phasenverschiebung statt.

Die hier vorgestellte Theorie konnte auch anhand von FEM (Finite Elemente Method) - Simulationen durch *Lukas Schnitzler* belegt werden, was in der gemeinsamen Publikation nachgelesen werden kann [105].

### 3.5. Fazit und Ausblick

Der hier vorgestellte Ansatz der Zelldetektion eröffnet ein neues Feld in der SAW-basierten Sensorik. Die Ergebnisse demonstrieren eindeutig das Potential akustischer Oberflächenwellen für die Verwendung zur Analyse eines standardisierten Wound-Healing-Assays ohne die Notwendigkeit optischer Systeme. Es konnte gezeigt werden, dass die Phasengeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwelle stark mit dem Wachstums- und Migrationsverhalten adhärenter Zellen korreliert. Nach eingehender Eichung der absoluten Phasenverschiebung durch die Zellbelegung kann der Fortschritt des Defektverschlusses eines Wound-Healing-Assays direkt überwacht werden. Durch die Änderung der Phasengeschwindigkeit kann die Dynamik eines konfluenten Zellrasens untersucht oder die Kinetik eines Ablösungsprozesses von Zellen bedingt durch zelluläre Vorgänge wie Apoptose oder durch Zell-lysierende Stoffe quantifiziert werden. Durch die kompakte Sensorik können nun Kultivierungsbedingungen den experimentellen Vorgaben angepasst werden, wie beispielsweise Untersuchungen bei Über- oder Unterdruck, welche zuvor durch die optischen Systeme limitiert wurden. Des Weiteren kann auf die Transparenz der Trägermaterialien verzichtet werden, wodurch das Wachstumsverhalten beispielsweise auf verschiedenen Implantatmaterialien untersucht werden kann.

Abhängig von der benötigten Sensitivität und Selektivität kann das SAW-Chip-Design auf die Anforderungen angepasst und spezifiziert werden. Durch Kombination metallisierter und freier VL nach dem Vorbild von *Kondoh et al.* [119] kann die Änderung der mechanischen und der elektrischen Eigenschaften der Substrat-bedeckenden Materialien unterschieden werden. Während auf der kurzgeschlossenen VL mechanische Eigenschaften wie Dichte, Masse oder Viskosität erfasst werden, kann aus der Differenz der kurzgeschlossenen und der freien VL auf die Änderung der elektrischen Eigenschaften wie Permittivität oder Leitfähigkeit zurückgeschlossen werden.

Durch die Verwendung einer dickeren  $\text{SiO}_2$ -Schicht auf der Substratoberfläche wird die Effektivität des Wellenleiters erhöht. Die akustische Energie wird an der Oberfläche konzentriert, wodurch die Sensitivität gegenüber mechanischen Eigenschaften drastisch erhöht wird. Wie in der Veröffentlichung demonstriert, konnten Simulationen zeigen, dass eine Zunahme des Abstandes des piezoelektrischen Substrates zur Zelle zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber elektrischen Eigenschaften führt [105].

Durch komplexere Split-IDTs zur Anregung akustischer Oberflächenwellen mit verschiedenen Wellenlängen kann auf die Eindringtiefe  $\delta$  Einfluss genommen werden. Die Eindringtiefe ist abhängig von der Frequenz und nimmt mit steigender Frequenz ab. So könnten selektiv die Eigenschaften in verschiedenen Schichtebenen simultan untersucht werden, wie beispielsweise die Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte zwischen Zelle und Substratoberfläche während des Vorgangs der Zellmigration.

Horizontal polarisierte Oberflächenwellen eignen sich somit ideal zur nicht-invasiven Untersuchung zellulärer Vorgänge. So kann nach zukünftigen Implantatoperationen beispielsweise die Osseointegration eines künstlichen Hüftgelenks überwacht und gegebenenfalls frühzeitig interveniert werden.

In der Sensorik propagiert eine Oberflächenwelle nahezu ohne Energieverlust auf dem mit Zellen und Nährmedium bedeckten Substrat. Durch die Wahl des Wellentyps kann jedoch direkt auf die Dissipationsleistung Einfluss genommen werden. Im Gegensatz zur Schwerwelle besitzt der Wellentyp *Rayleigh-Welle* eine vertikale Komponente der Substratauslenkung. Befindet sich ein Flüssigkeitsfilm im Schallpfad der SAW, so koppelt diese in die Flüssigkeit ein und führt durch die Bildung eines Druckgradienten zur sogenannten akustischen Strömung. Dieser Effekt kann ausgenutzt werden, um kleinste Objekte in Flüssigkeiten zu manipulieren. Zellen in Suspension können eingefangen und mikrometerngenau positioniert oder zelluläre Prozesse, wie die Ausbildung neuronaler Fortsätze, beeinflusst werden. Mit diesem Ziel beschäftigt sich das spannende Feld der SAW-Aktorik. Diese wird nun im anschließenden Kapitel behandelt.

## 4. Generierung künstlicher neuronaler Netze – Aktorik mittels akustischer Oberflächenwellen

*What I cannot create, I do not understand* - Richard Feynman

*Acoustic force* – die akustische Kraft. Hinter diesen beiden Wörtern verbirgt sich eine Disziplin, die in ihrer Vielfalt und Anwendbarkeit ihresgleichen sucht. Von der Levitation makroskopischer Objekte über Analyse- und Therapieprozesse in der Medizin bis hin zur aktiven Durchmischung kleinster Volumina nehmen akustische Kräfte stets eine entscheidende Rolle ein.

Auf der Grundlage akustischer Kräfte beschäftigt sich dieses Kapitel mit der kontrollierten Manipulation kleinster Objekte und Organismen mit dem Ziel, wohldefinierte zelluläre Strukturen auf einem Chip zu bilden. Nach der erfolgreichen Implementierung der nicht-invasiven akustischen Sensorik zur Überwachung zellulärer Vorgänge soll nun mit dem Instrument der akustischen Oberflächenwelle aktiv auf zelluläre Prozesse Einfluss genommen werden. Hierbei soll ein System entwickelt werden, mit dessen Hilfe ein auf SAW basierendes räumlich und zeitlich dynamisches Kraftfeld erzeugt werden kann und zugleich die Anforderungen einer sensiblen Zellkultur erfüllt werden können. Um diese Ziele zu bewerkstelligen müssen folgende Forschungsfragen beantwortet werden:

- Kann ein geeignetes räumlich und zeitlich variables Kraftfeld geschaffen werden?
- Welche Randbedingungen sind für die SAW-basierte Aktorik notwendig?
- Können die für die Zellkultur idealen Kultivierungsbedingungen sichergestellt werden?
- Ist es möglich, mit Hilfe akustischer Kraftfelder Zellen zu positionieren und ihr Wachstumsverhalten zu beeinflussen?
- Ist eine gezielte Bildung komplexer Strukturen aus mehreren Zellen auf einem Chip möglich?
- Können annähernd physiologische Randbedingungen für die Zellkultur erreicht werden?

Die hier vorliegende Forschung schließt direkt an die vorangegangene Arbeit

*Aktorische Anwendung akustischer Oberflächenwellen zur Zellmanipulation* -  
Brugger Manuel, Masterarbeit, Universität Augsburg, 2016

an. Für eine Übersicht des kompletten Entwicklungsprozesses kann diese Arbeit daher zusätzlich herangezogen werden. Ergebnisse aus dieser vorangegangenen Arbeit werden nur zum Zwecke der Schaffung eines einheitlichen Bildes erwähnt und gesondert zitiert. Des Weiteren wurden bereits einige der nun hier vorgestellten Erkenntnisse in Fach-Journalen veröffentlicht:

- M.S. Brugger, S. Grunden, A. Doyle, L. Theogarajan, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Orchestrating cells on a chip: Employing surface acoustic waves towards the formation of neural networks*, *Physical Review E*, **98**, 012411, 2018. [69]<sup>1</sup>
- P. Delsing, ... , M.S. Brugger & C. Westerhausen, *The 2019 surface acoustic waves roadmap*, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **52**, 343001, 2019. [138]<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Internet-Adresse zur Veröffentlichung: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.98.012411>

<sup>2</sup>Internet-Adresse zur Veröffentlichung: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/ab1b04>

## 4.1. Motivation und Stand der Technik

Seit der Entwicklung der ersten Schnittstelle zwischen einem Silizium-Chip und einer lebenden Nervenzelle durch Peter Fromherz und seine Mitarbeiter im Jahre 1991 [139] ist die Schaffung eines künstlichen Gehirns eine weit verbreitete Zielsetzung. Die direkte elektrische Kopplung neuronaler Systeme mit Halbleiterchips mittels Feldeffekttransistoren für die Detektion von Aktionspotentialen und Kondensatoren für die kontrollierte Zellstimulation erlaubten seitdem zelluläre Prozesse zu stimulieren und zu analysieren [140, 141]. So konnte die Grundlage für eine Anwendung in der Hirnforschung, Neuroprothetik und Informationstechnologie geschaffen werden. Es wird vermutet, dass in zukünftigen *Brain-on-a-chip*-Systemen der neuronale Part des hybriden Systems in der Lage sein wird, komplizierte Aufgaben wie beispielsweise Lernprozesse und Mustererkennung durchzuführen oder als Assoziativspeicher (inhaltsadressierbarer Speicher) zu dienen [141]. Für die Bewerkstelligung dieser Aufgaben ist die Erzeugung eines wohldefinierten neuronalen Netzwerkes auf einem Silizium-Chip essentiell [142]. Zum einen sollte die elektrische Aktivität simultan an mehreren Positionen erfasst werden können und zum anderen sollte eine bestimmte Strukturierung des Netzwerkes in einer definierten Geometrie reproduzierbar sein.

In der Literatur werden verschiedenste Ansätze zur Entwicklung komplexer neuronaler Strukturen vorgestellt. Durch strukturierte Protein- und Polymerbeschichtungen (z. B. extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen, Laminin etc.) - EMP) sollen selektiv die Zelladhäsion und -migration vermittelt werden oder durch Nutzung sogenannter Mikro- und Nanosäulen (engl. *pillars*) bzw. struktureller Kavitäten der Einschluss der Zellkörper sichergestellt werden [142–144]. Die sich nach der Zelladhäsion ausbildenden neuronalen Fortsätze konnten durch eine strukturierte Oberflächenbeschichtung [139], einer speziellen Chip-Topographie [144], durch Nanokarbonröhren [145] oder gar durch eine geschickte Wahl der Säulenabstände [146] anschließend kontrolliert geführt werden.

Alle hierbei vorgestellten Verfahren hatten jedoch eine gemeinsame Kehrseite – ihre statische Natur. Durch den zufallsbedingten, willkürlichen Prozess der Zellaussaat konnten die Zellkörper nicht gleichmäßig auf der Chipoberfläche verteilt werden und neuronale Fortsätze wuchsen nach einer gewissen Zeit über ihre statischen Beschränkungen hinaus. Die fehlende dynamische Manipulierbarkeit der Zellkultur während der Durchführung des Experiments verhinderte daher die Erschaffung eines höher entwickelten definierten Netzwerkes und ließ offene Fragestellungen unbeantwortet.

Eine kontrollierte und dynamische Manipulation biologischer Partikel ist daher unabdingbar. Im Bereich der Mikrofluidik existieren bereits unterschiedlichste Methoden zur Objektmanipulation. So können durch hydrodynamische Mechanismen, durch optisch, magnetisch oder elektrisch induzierte Kraftfelder (z. B. *optical tweezers*), durch Mikroroboter und gar durch künstliche Cilien Mikro- und Nanopartikel bewegt, sortiert, gefangen oder angereichert werden [147]. Insbesondere akustische Kraftfelder – auch *akustische Pinzette* genannt – bieten die Möglichkeit der effizienten, dynamischen und kontaktfreien Partikelhandhabung und finden daher in den Lebenswissenschaften ein breites Anwendungsspektrum.

Abhängig vom Anwendungsgebiet lässt sich die akustische Pinzette prinzipiell in drei Funktionsprinzipien untergliedern: *acoustic-streaming* (z. B. Flüssigkeitshandhabung, Sortierung) [73, 148–150], *traveling-wave* (z. B. Objektlevitation, Einzellanalyse) und *standing-wave* (z. B. Strukturbildung, Zellseparierung [96, 97]) [151]. Hierbei kommt der Objektmanipulation durch *standing-wave* Pinzetten auf Basis der akustischen Oberflächenwellen in der Rayleigh-Mode in der Literatur eine große Bedeutung zu. Basierend auf der ein- bzw. zweidimensionalen Interferenz akustischer Oberflächenwellen, erzeugt durch zwei bzw. vier IDTs, können in Suspension befindliche Objekte in einem SAW-Stehwellenfeld abhängig von ihren physikalischen Eigenschaften in die Knotenpunkte oder Bäuche des Kraftfeldes gebracht werden [96]. Durch Modulation akustischer Parameter wie Phase oder Amplitude kann eine 2D- (*in-plane*) oder eine 3D-Manipulation erreicht werden [152]. Neben der Positionsveränderung können Objekte zudem durch Anpassung der Wellenlänge auf den Objektdurchmesser einzeln in den Knotenpunkten ausgerichtet werden, was der sogenannten *Eine-Zelle-pro-Knotenpunkt*-Bedingung

(EZPK) [97] entspricht. Aufgrund des kompakten Designs und der leichten Kombinierbarkeit mit mikrofluidischen Systemen stellen akustische Oberflächenwellen ein wertvolles Werkzeug in *Lab-on-a-chip*-Systemen dar.

Im Hinblick auf die Generierung eines wohldefinierten neuronalen Netzwerkes soll durch die Überlagerung mehrerer akustischer Oberflächenwellen ein symmetrisches Kraftfeld in einer Flüssigkeit zur Zellmanipulation erzeugt werden. Nach der eingehenden Charakterisierung des experimentellen Aufbaus und der Überprüfung der Biokompatibilität sollen mit Hilfe des Stehwellenfeldes einzelne Zellen in Suspension eingefangen und mikrometerngenau auf der Substratoberfläche positioniert werden können. Während der Sicherstellung idealer Kultivierungsbedingungen werden die Einflüsse der akustischen Oberflächenwellen auf die Zellkultur untersucht und schließlich durch kontrollierte Anpassung des Kraftfeldes die neuronalen Auswüchse dynamisch manipuliert.

## 4.2. Entwicklung eines Setups

### 4.2.1. Anforderungen

Im Rahmen der Arbeit wurde ein experimenteller Aufbau entwickelt, mit dessen Hilfe lebende Organismen manipuliert werden können und in welchem zugleich ideale Kultivierungsbedingungen vorliegen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden eingehend diverse Eigenschaften definiert, die das System erfüllen muss. Diese können in zwei Bereiche untergliedert werden: den aktorisch-technischen Aspekten und der Adressierung der biologischen Anforderungen.

Auf dem Prinzip der akustischen Pinzette sollen Zellen in Suspension durch ein dreidimensionales Kraftfeld mittels SAW eingefangen werden. Durch Repositionierung der Zellen soll der Ort der Adhäsion definiert werden. Das Ziel ist es, nach dem Vorbild der EZPK-Falle einzelne Zellen zu manipulieren, sodass eine Clusterbildung von Zellen vermieden wird. Die Kraftfelder sollen zeitlich und räumlich dynamisch sein, um das Zellwachstum manipulieren zu können. Des Weiteren muss das Setup eine kompakte Bauform aufweisen, sodass es in standardisierten Probenträgern positioniert werden kann. Die Observierung der Zellmanipulation erfolgt durch optische Systeme. Dies erfordert eine Transparenz der verwendeten Materialien im sichtbaren Bereich. Des Weiteren soll eine mobile Einsatzmöglichkeit und eine integrierte Überprüfung der Funktionsfähigkeit gewährleistet werden. Abschließend soll die Option geschaffen werden, diese Technologie der kontrollierten Zellmanipulation mit bestehenden sensorischen Methoden, beispielsweise der Messung zellulärer Aktionspotentiale, zu verknüpfen.

Da es sich bei den verwendeten Zelltypen hauptsächlich um empfindliche neuronale Zellen handelt, ist eine adäquate Adressierung der biologischen Anforderungen essentiell. So muss eine stetige Nährstoffversorgung und der Abtransport von Metaboliten gewährleistet werden. Sowohl eine Kultivierungstemperatur von  $T = 37^\circ\text{C}$ , ein konstanter  $\text{CO}_2$ -Gasaustausch mit dem Nährmedium, als auch die Biokompatibilität aller mit dem Nährmedium in Kontakt stehenden Materialien muss sichergestellt werden. Da das Zellwachstum über einen längeren Zeitraum beobachtet werden soll, muss die Möglichkeit der Langzeitkultivierung über mehrere Tage gegeben sein.

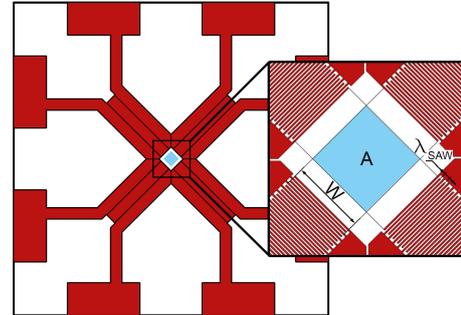
### 4.2.2. Das mikrofluidische System

Der Kern des kompletten Setups ist das mikrofluidische System. Dieses besteht im Prinzip aus einem SAW-Chip, einem mikrofluidischen Kanal und einem Reservoir. Das Setup wird vor jedem Experiment neu zusammengesetzt. Während der SAW-Chip und das Reservoir wiederverwertbar und leicht zu reinigen sind, wird zum Zwecke der Sterilität der mikrofluidische Kanal nur einmalig verwendet. Die Eigenschaften und der exakte Aufbau des Setups werden nun schrittweise erläutert.

### Der SSAW-Chip

Die Basis des experimentellen Aufbaus bildet, wie in der Sensorik, der SAW-Chip. Dieser besteht aus dem piezoelektrischen Kristall  $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut, dessen exakte Materialeigenschaften in *Kap. 2.2.2.* gelistet sind. Die Entwicklung der komplexen IDT-Struktur wurde bereits in der vorangegangenen Arbeit durchgeführt und ist dort detailliert beschrieben [60, S. 61-67]. Die wichtigsten Details werden nun kurz dargestellt.

Die Bildung eines zweidimensionalen manipulativen Stehwellenfeldes wird durch die Überlagerung zweier zueinander 90°-gekreuzter eindimensionaler Stehwellenfelder erreicht. Ähnlich wie bei der SAW-Sensorik sind jeweils zwei IDT-Strukturen gegenüberliegend mit einem definierten Abstand zueinander ausgerichtet. Hier dienen jedoch beide Strukturen als Quellen und führen durch Interferenz in dem aus der SAW-Sensorik bekannten Bereich der Verzögerungsleitung (VL) zu einem eindimensionalen Stehwellenfeld, den *standing surface acoustic waves* - SSAW. Die Einheit der beiden gegenüberliegenden Strukturen wird im Folgenden als *IDT-Paar* bezeichnet. Die Breite des Stehwellenfeldes ist abhängig von der Apertur  $W$  der IDTs. Zwei senkrecht zueinanderstehende IDT-Paare mit der gekreuzten Fläche in der VL, der sogenannten *aktiven Fläche*, bilden nun das in *Abb. 2.2.4.* visualisierte gitterförmige Kraftfeld mit *Knoten* und *Bäuchen*. Die aktive Fläche beträgt somit  $A = W \times W$ . Eine technische Zeichnung der IDT-Struktur ist in *Abb. 4.1.* dargestellt.



**Abbildung 4.1:**  
SSAW-Chip mit vier IDT-Strukturen zur Bildung eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes.

Die Anisotropie des verwendeten Kristalls führt zu einer Richtungsabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit  $c$  und des elektromechanischen Kopplungskoeffizienten  $k_{\text{eff}}^2$ . Durch die Orientierung der IDT-Paare in einem Winkel  $\Xi = 45^\circ$  zur Kristallachse liegt für jede IDT-Struktur eine identische Schallgeschwindigkeit von  $c_{\text{kurz}} = 3547 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  und ein elektromechanischer Kopplungskoeffizient von  $k_{\text{eff}}^2 = 1.95 \cdot 10^{-2}$  vor. Die Werte für  $k_{\text{eff}}^2$  wurden nach der *Gl. 2.13* mit den Datenpunkten aus *Abb. 2.3.* berechnet. Durch die identischen Materialparameter für jeden IDT kann so ein in beide Orientierungsrichtungen homogenes Kraftfeld erzeugt werden. Nach der in *Kap. 2.2.2.* dargestellten Slowness-Kurve ist jedoch eine Anregung reiner Wellenmoden nur in Richtung der  $X$ -Kristallachse, senkrecht zur Kristallachse und in einem Winkel von  $\Xi = 52.5^\circ$  möglich. Unter dem gewählten Winkel von  $\Xi = 45^\circ$  wird daher vermutlich keine reine Rayleigh-Mode angeregt.

Die Wellenlänge  $\lambda$  der IDTs wird durch den Durchmesser der zu manipulierenden Objekte bestimmt. Für die Erfüllung der Voraussetzung einer EZPK-Falle nach *Collins* (siehe *Kap. 2.3.4.*) werden in den Experimenten verschiedene Standard-IDT-Strukturen mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet. Hierbei finden SIDTs mit einer festen Wellenlänge von  $\lambda = 25 \mu\text{m}$  bzw.  $\lambda = 50 \mu\text{m}$  oder auch CIDTs mit einer variablen Wellenlänge, sogenannte *chirped-IDTs*, mit  $\lambda = 15 - 25 \mu\text{m}$  mit diskreten  $\Delta\lambda = 1 \mu\text{m}$ -Schritten Anwendung. Die IDT-Strukturen wurden auf die standardisierte Impedanz von  $Z = 50 \Omega$  angepasst. Da die Fläche für die Fingerpaare begrenzt ist, musste auf die Impedanzanpassung für den *chirped-IDT* verzichtet werden. Die Anzahl der Fingerpaare je Anregungsfrequenz wurde daher auf 15 festgelegt. Abhängig von der gewählten Wellenlänge unterscheidet sich die Größe der aktiven Fläche. Diese richtet sich nach der Abklinglänge der SAW in Wasser und wird nachfolgend erläutert. In *Tab. 4.1.* sind die Dimensionen und Kennwerte der verwendeten SSAW-Chips aufgelistet.

Wellenlänge $\lambda$ [ $\mu\text{m}$ ]	Apertur $W$ [ $\mu\text{m}$ ]	Fingerpaare	$f_{\text{res}}$ [MHz]
15, 16, ..., 25	300	165 (15 pro $f_{\text{res}}$ )	141.9 - 236.5
25	300	85	141.9
50	600	85	70.9

**Tabelle 4.1:** Parameter der in den Experimenten verwendeten SSAW-Chips

### Der mikrofluidische Kanal

Wird ein Flüssigkeitstropfen in den Schallpfad einer propagierenden SAW gebracht, so koppelt die Oberflächenwelle in die Flüssigkeit als *Leaky*-SAW ein und erzeugt dort eine akustische Strömung [153]. Durch die starke Strömung werden Objekte aus den Knotenpunkten geschwemmt und verhindern somit eine kontrollierte Manipulation. Die akustische Strömung, hervorgerufen durch eine in der Flüssigkeit propagierende Druckwelle, kann jedoch durch Reflexion dieser Druckwelle an einer Grenzschicht unterdrückt werden. Die hierbei stattfindende Interferenz der reflektierten mit der eingekoppelten Welle führt zu einem zum Substrat senkrecht stehendem Stehwellenfeld.

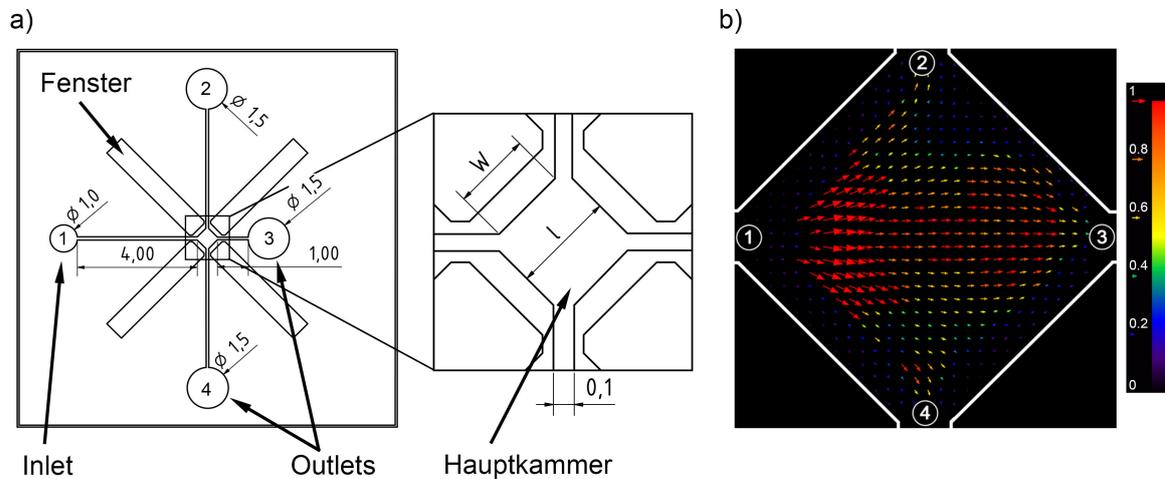
Diese Grenzschicht kann durch die Verwendung eines mikrofluidischen Kanals, wie in *Abb. 4.2* dargestellt, geschaffen werden. Mit dem Material PDMS kann mittels der in *Kap. D.8.* beschriebenen Methode der Soft-Lithographie ein Mikrokanal mit einer beliebigen Form geschaffen werden. Der Kanal ist derart konzeptioniert, dass die akustische Strömung unterdrückt und die Dämpfungsverluste der Oberflächenwelle reduziert werden. Durch die Anpassung der mikrofluidischen Kammer auf die Größe der aktiven Fläche  $A$  des SSAW-Chips und unter Berücksichtigung der Kontaktfreiheit der Apertur zum PDMS kann die Dämpfung der SAW auf ein Minimum reduziert werden. Die Größe der mikrofluidischen Kammer richtet sich nach der  $1/e$ -Abklinglänge der SAW-Intensität  $l_{\text{op45}^\circ}^{\text{calc}}$  in Wasser mit  $l_{\text{op45}^\circ}^{\text{calc}} = 11.2 \cdot \lambda_{\text{SAW}}$ . Die Gesamtintensität  $I_{\text{ges}}$  der SSAW nimmt aufgrund der *Leaky*-SAW zum Zentrum der Kammer hin ab, beträgt an ihrem Minimum im Mittelpunkt der Kammer jedoch die maximale Intensität einer einzelnen Welle  $I_{\text{SAW}}$ . Da der Reflexionsfaktor mit  $r = 0.17$  nach *Gl. 2.56* an der Grenzschicht PDMS-Nährmedium aufgrund des geringen Impedanzunterschiedes mit  $Z_{\text{PDMS}} = 1.05 \cdot 10^6 \frac{\text{Ns}}{\text{m}^3}$  und  $Z_{\text{Wasser}} = 1.49 \cdot 10^6 \frac{\text{Ns}}{\text{m}^3}$  sehr gering ist [154], und zur zusätzlichen Unterdrückung der Eckart-Strömung wird die Kanalhöhe  $h$  auf  $\frac{\lambda_{\text{SAW}}}{2} \leq h \leq \lambda_{\text{SAW}}$  festgelegt. Die untere Grenze von  $\frac{\lambda_{\text{SAW}}}{2} \leq h$  wurde daher gewählt, da bei niedrigeren Kanalhöhen aufgrund des geringen Querschnitts zu große Scherkräfte bereits bei geringsten Volumenströmungen auftreten.

Die Kontaktfreiheit des PDMS zur Apertur wird durch von der Mikrofluidik isolierte Kammern, sogenannter *Fenster*, erreicht. Diese *Fenster* befinden sich über der Aperturstruktur. Die mikrofluidische Hauptkammer besitzt vier Zuleitungen zur Kontaktierung durch Einlässe und Auslässe für die Einbringung der Zellsuspension und für die Versorgung mit Nährmedium. Anhand der Kanallänge der einzelnen Zuleitungen kann das Flussprofil in der Hauptkammer definiert werden. Eine Zuleitung fungiert als Einlass der Zellsuspension (Pos. 1). Da die Zellen beim Befüllungsvorgang über die komplette aktive Fläche strömen sollen, wird ein Fluss zum gegenüberliegenden Kanal präferiert (Pos. 3). Dies wird erreicht, indem der Abstand des gegenüberliegenden Auslasses zur Kammer minimiert wird, während die Kanallänge der beiden senkrecht stehenden Zuleitungen (Pos. 2, 4) maximiert wird. Das Verhältnis des Volumenstroms  $\frac{Q_3}{Q_{2,4}}$  lässt sich über die *Gl. 4.1* berechnen [155]:

$$Q = \frac{\left(\frac{w}{b}\right)^2 G b^3 w}{12 \eta} \quad (4.1)$$

mit  $w$  der Kanalbreite,  $b$  der Kanalhöhe,  $G$  dem Druckgradienten und  $\eta$  der Viskosität der Flüssigkeit. Für die gewählte Geometrie beträgt das Verhältnis somit  $\frac{Q_3}{Q_{2,4}} = \frac{1}{4}$  mit  $l_3 \approx 1 \text{ mm}$  und  $l_{2,4} \approx 4 \text{ mm}$ . Das komplette Design des mikrofluidischen Systems ist in *Abb. 4.2. a)* dargestellt.

In Abb. 4.2. b) ist das Flussprofil in der Hauptkammer durch eine sPIV-Messung<sup>3</sup> visualisiert. Hierbei wurden Beads mit einem Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  bei einem Fluss von  $Q = 0.01\ \mu\text{l/s}$  durchgespült. Die Farbskalierung ist auf die Maximalgeschwindigkeit von  $v_{\text{Fluss}} \approx 2.3\ \frac{\text{mm}}{\text{s}}$  normiert. Deutlich zu erkennen ist der laminare Fluss von  $1 \rightarrow 3$ .



**Abbildung 4.2:**

a) Technische Zeichnung des mikrofluidischen Kanals mit Bemaßung in Millimeter. Durch unterschiedliche Kanallängen kann das Strömungsprofil innerhalb der Hauptkammer definiert werden. Die Fenster dienen der Kontaktfreiheit des PDMS zur Apertur, um Verluste zu vermeiden. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Hauptkammer und die Bemaßung. Die Werte  $W$  und  $l$  richten sich nach den SAW-Parametern b) PIV-Analyse des Strömungsprofils innerhalb der Hauptkammer. Die weißen Linien kennzeichnen die Kanalgrenze. Die normierte Maximalgeschwindigkeit beträgt  $v_{\text{Fluss}} \approx 2.3\ \frac{\text{mm}}{\text{s}}$ .

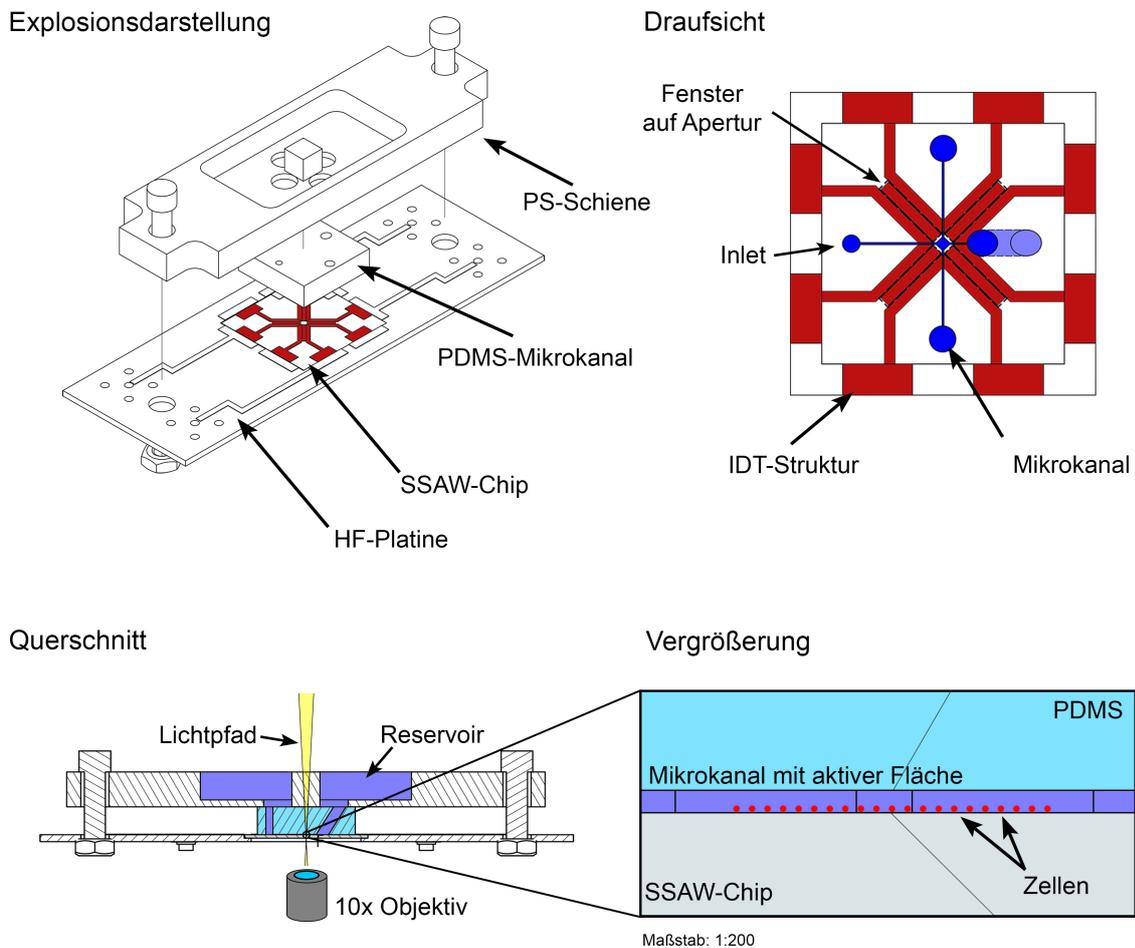
### Der experimentelle Aufbau

Die oben beschriebenen Komponenten sind Bestandteile eines komplexeren, wiederverwertbaren experimentellen Aufbaus, dessen exakte Montage nun erläutert wird.

Die Basis des Aufbaus bildet der SSAW-Chip. Dieser wird durch einen Sekundenkleber in eine Leiterplatte fixiert und mit Silberleitpaste (Acheson Silver DAG 1415M, Acheson Industries Inc., MI, USA) kontaktiert. An der Unterseite der Leiterplatte befinden sich U.FL-Anschlüsse für die HF-Kontaktierung. Nach der Funktionsüberprüfung durch einen NWA wird die Oberfläche mit einer 70/30-Ethanol/Wasser-Mischung sterilisiert. Bei Experimenten mit Zellkulturen erfolgt anschließend die Beschichtung der Oberfläche mit dem Polymer Poly-L-Lysin (PLL) (P1274, SA). PLL ist ein positiv geladenes Polymer und erhöht die Zelladhäsion auf festen Substraten. Hierbei werden  $125\ \mu\text{l}$  einer  $100\ \mu\text{g/ml}$ -PLL in PBS Lösung auf die Mitte der Chipoberfläche pipettiert und für mindestens zwei Stunden inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit PBS und Nährmedium abgespült und der Chip mit Stickstoff getrocknet. Der mikrofluidische Kanal wird wie in Kap. D.8. beschrieben hergestellt. Nach dem Ausschneiden des Kanals wird dieser durch Biopsiestanzen kontaktiert. Hierbei werden für den Einlass ein Durchmesser von  $d = 1\ \text{mm}$  und für die Auslässe  $d = 1.5\ \text{mm}$  verwendet. Pos. 3 wird hierbei schräg gestochen. Nach der Reinigung des PDMS-Kanals mit destilliertem Wasser und einem Scotch-Tape wird dieser mit Hilfe eines Mikroskops auf dem SSAW-Chip positioniert. Hierbei dienen die Fenster der Kanalstruktur als Referenzmarken, da sich diese direkt über der Aperturstruktur befinden müssen. Nach der Positionierung wird der PDMS-Kanal durch eine Polystyrol (PS)-Schiene fixiert, deren Herstellung mittels einer CNC-Fräse erfolgt ist. Die PS-Schiene fungiert neben der Fixierung der PDMS-Kammer auch als Reservoir für das Nährmedium mit einem Gesamtfassungsvermögen von  $V = 1.5\ \text{ml}$ . Um Störungen wie Reflexionen in der Mikroskopie aufgrund einer Flüssigkeit zu

<sup>3</sup>Nähere Informationen zu sPIV siehe Kap. 5.2.3.

vermeiden, ist im Lichtpfad des Mikroskops ein Sichtfenster in der PS-Schiene berücksichtigt. So kann der Übergang von Flüssigkeit zu PS vermieden werden. Dies führt zu deutlich besseren Kontrastverhältnissen. Die Kontaktfläche zwischen der PS-Schiene und der PDMS-Kammer wird vor der Montage mit einer dünnen Schicht hochviskosem Silikon benetzt, um Leckagen zu vermeiden. Abschließend wird die PS-Schiene durch zwei M3-Schrauben befestigt. Anhand des Anzugmoments  $M$  kann der Anpressdruck der PDMS-Kammer auf die SSAW-Chip-Oberfläche justiert werden. Die Einstellung erfolgt mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie, da sich durch die Deformation der PDMS-Kammer aufgrund des Anpressdrucks der Kontrast der Kanalstrukturen ändert. Als Richtgröße eignete sich ein Anzugsmoment von  $M \approx 0.1 \text{ cN/m}$ . Der montierte Aufbau wird abschließend durch UV-Licht sterilisiert. In *Abb. 4.3* ist das mikrofluidische System in verschiedenen Abbildungen dargestellt. Der Aufbau und deren Einzelkomponenten ist in der Explosionsdarstellung visualisiert. Die relative Position des mikrofluidischen Kanals bezüglich des SAW-Chips ist in der Draufsicht abgebildet. Der vertikale Querschnitt verdeutlicht die Größenverhältnisse und den optimierten Lichtpfad.



**Abbildung 4.3:**

Technische Darstellung des experimentellen Aufbaus. In der Explosionsdarstellung sind alle Einzelkomponenten und in der Draufsicht deren relative Position zueinander dargestellt. Der Querschnitt visualisiert den optimierten Lichtpfad durch die Aussparung des Reservoirs. Die Vergrößerung verdeutlicht den Unterschied der Dimensionen der mikrofluidischen Hauptkammer zum gesamten Aufbau.

### 4.2.3. Ansteuerung und Charakterisierung der SAW-Chips mittels eines Eigenbau-Multifunktionsgenerators

Die Anregung einer akustischen Oberflächenwelle erfolgt über eine hochfrequente Wechselspannung, deren Frequenz mit der Resonanzfrequenz der IDT-Strukturen übereinstimmt. Sowohl die Überprüfung auf die Funktionsfähigkeit des SSAW-Chips als auch die Erzeugung des HF-Signals erfolgt im Regelfall mittels kommerziell erwerbbarer Großgeräte. Hierunter fallen der Vektor-Netzwerkanalyser *ZVL* und der Frequenzgenerator *SML 01*, beide von Rhode & Schwarz GmbH, München, Deutschland.

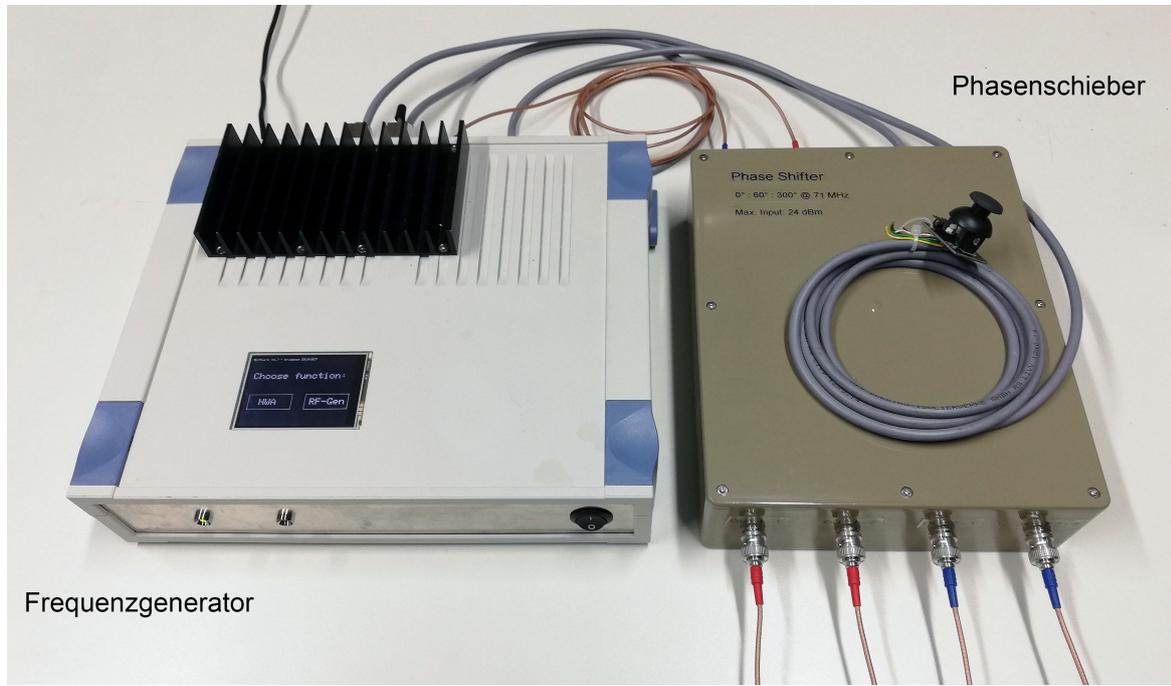
Die in *Kap. 4.2.1.* genannte Forderung der Kompaktheit und Mobilität kann durch die Verwendung dieser wenig kompakten Geräte nicht gewährleistet werden. Zur Sicherstellung einer mobilen Einsatzfähigkeit wurde ein kompakter Multifunktionsgenerator entwickelt, mit dessen Hilfe sowohl eine Funktionsüberprüfung als auch eine Ansteuerung der SSAW-Chips möglich ist. Im Folgenden wird kurz der Aufbau und die Funktion des Generators erläutert.

Der Funktionsgenerator kann in drei Hauptfunktionen untergliedert werden: die Signalerzeugung, die Signalmanipulation und die Funktionsprüfung. Die einzelnen Funktionen werden durch den Mikrokontroller *MEGA 2560 R3* von Arduino (Somerville, MA, USA) gesteuert. Als Benutzerschnittstelle für die Einstellung des Generators und die Visualisierung der Messergebnisse dient ein Touch-Display.

Die Signalerzeugung erfolgt durch zwei kommerziell erwerbbare Hochleistungs HF-Platinen der Firma *Advalytix AG*. Diese wurden für die Produkte *Array Booster* und *CellEvator* entwickelt und tragen die firmeninterne Bezeichnung *HF311* und *RF152*. Mit diesen Platinen kann ein Signal im Frequenzbereich 60-85 MHz mit der *RF152* bzw. 120-185 MHz mit der *HF311* mit einer Leistung von bis zu  $P = 30$  dBm erzeugt werden. Je nach benötigtem Frequenzbereich erfolgt die Signalerzeugung durch eine der beiden HF-Platinen. Der Frequenzbereich des Funktionsgenerators deckt im Regelfall die in diesen Messungen verwendeten Resonanzfrequenzen der SSAW-Chips ab. Die Ansteuerung der Platinen erfolgt durch den Mikrokontroller über das I<sup>2</sup>C-Bus-Protokoll, welches ein *Master-Slave*-Kommunikationsprinzip ist. Das durch die HF-Platinen erzeugte Signal wird durch eine interne Schaltung an zwei Ausgängen *RF-out* geführt. Durch die getrennte Kontaktierung der IDT-Paare mit jeweils einem Ausgang ist es möglich, durch eine Softwareeinstellung ein eindimensionales bzw. zweidimensionales SSAW-Kraftfeld zu erzeugen.

Für die kontrollierte Manipulation und Positionierung der Objekte im SSAW-Kraftfeld ist es notwendig, neben der Amplitude des Stehwellenfeldes auch die Positionen der Knotenpunkte verändern zu können. Dies geschieht durch eine Phasenverschiebung des Anregungssignals eines IDTs in einem IDT-Paar durch das erweiterbare Modul *Phasenschieber* des Signalgenerators. Kommerziell erwerbbarer Phasenschieber genügen nicht den Anforderungen der hohen Ausgangsleistung. Eine Lösung bietet jedoch die Verwendung von zwei 6-port HF-Schaltern (*HMC252A*) mit unterschiedlich langen Koaxialleitungen, mit denen eine diskrete Phasenverschiebung um jeweils  $\Delta\phi = 60^\circ$  erreicht werden kann. Durch die unterschiedlichen Leitungslängen wird ein Wegstreckenunterschied und somit eine Phasenverschiebung des Signals am ersten IDT relativ zum Signal des zweiten IDTs erzielt. Die Leitungslängen sind auf die Resonanzfrequenz von  $f_{\text{res}} = 71$  MHz der in den Experimenten hauptsächlich verwendeten SSAW-Chip-Geometrie mit  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  angepasst. Die Ermittlung der Leitungslängen wurde experimentell durchgeführt und wird nachfolgend beschrieben. Die Phasenverschiebung kann entweder durch einen Joystick direkt kontrolliert werden oder es kann eine stetige Phasenverschiebung im Steuerprogramm eingestellt werden. Neben der Phasenverschiebung kann das HF-Signal auch gepulst ausgegeben werden. Hierbei kann neben der Pulsfrequenz auch das Tastverhältnis in Prozent eingestellt werden. Die Funktionsprüfung der SSAW-Chips erfolgt durch die frequenzabhängige Messung des Leistungspegels des reflektierten Signals. Hierbei wird ein HF-Signal bei einer konstanten Leistung erzeugt und die Frequenz im gewählten Frequenzintervall schrittweise erhöht. Das reflektierte HF-Signal wird durch einen bi-direktionalen Koppler (*ZFBDC20-13HP-S+*) an einen Leistungsdetektor (*ZX47-40LN-S+*) geführt. Der Leistungsdetektor gibt in Abhängigkeit des Leistungspegels ein Gleichnungssignal aus, welches nach der Messung am Display graphisch dargestellt wird. Bei Frequenzen mit resonanter

Anregung, beispielsweise einer akustischen Oberflächenwelle, nimmt der Leistungspegel des reflektierten Signals ab und nimmt ein Minimum im frequenzabhängigen Verlauf ein. Dieses Minimum kann anschließend durch Anwahl direkt als Frequenzeinstellung übernommen werden. Eine Fotografie des Eigenbau-Multifunktionsgenerators mitsamt der Erweiterung des Phasenschiebers ist in *Abb. 4.4.* abgebildet. Eine Bedienungsanleitung des Multifunktionsgenerators kann aus dem Anhang *Kap. B.1.* entnommen werden.



**Abbildung 4.4:**  
Fotografie des Eigenbau-Multifunktionsgenerators mitsamt der Phasenschieber-Erweiterung zur Funktionsüberprüfung und Ansteuerung eines SSAW-Chips.

#### 4.2.4. Versuchsvorbereitung

Für die kontrollierte Manipulation von Objekten in Flüssigkeiten ist eine ausführliche Vorbereitung des experimentellen Aufbaus notwendig. Im Folgenden wird der komplette Versuchsaufbau und die Durchführung des Experiments mit lebenden Zellen beschrieben, da dies der ausführlichsten Vorbereitung bedarf. Abweichungen bei der Durchführung des jeweiligen Experiments werden gesondert erwähnt.

Nach dem Zusammenbau und der anschließenden Sterilisation des oben beschriebenen mikrofluidischen Systems werden insgesamt vier Experimente auf dem invertierten Forschungsmikroskop *Zeiss Axiovert 200 M* (Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) positioniert. Für die Sicherstellung idealer Kultivierungsbedingungen ( $T = 37^\circ\text{C}$ , wassergesättigte Atmosphäre, 5%  $\text{CO}_2$  (v/v)) befinden sich die mikrofluidischen Systeme in einem Mikroskopinkubator mit angeschlossenem Gasinkubationssystem (ibidi Heating System, ibidi Gas Incubation System, ibidi, Martinsried, Deutschland). Dieser Mikroskopinkubator bietet Platz für insgesamt vier Experimente zur parallelen Langzeitbeobachtung im *Live Cell Imaging*. Die Platinen werden anschließend mit U.FL-Steckern kontaktiert und mit einem Multifunktionsgenerator verbunden. Hierbei wird ein IDT-Paar an einen HF-Ausgang des Generators angeschlossen. Die für die Ansteuerung beider IDT-Strukturen notwendige Signalaufspaltung erfolgt über einen Leistungsteiler (ZFSC-2-4+, mini-circuits, Brooklyn, NY, USA). Im Falle einer gewünschten

Phasenverschiebung wird statt des Leistungsteilers das erweiterbare Modul *Phasenschieber* des Funktionsgenerators angeschlossen. Für jeden SSAW-Chip wird ein eigener Funktionsgenerator benötigt, welcher jeweils auf die zuvor bestimmten Resonanzfrequenzen  $f_{\text{res}}$  eingestellt wird. Die an einem IDT-Paar angelegte HF-Leistung wird im Folgenden als  $P_{\text{IN}}$  bezeichnet. Im Anschluss werden alle mikrofluidischen Kanäle durch eine 250  $\mu\text{l}$ -Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) mit einem Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Schlauch und einer Spritzenpumpe (neMESYS, Cetoni GmbH, Korbussen, Deutschland) befüllt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Spritze und der Schlauch zur Kontaktierung frei von Luftblasen sind und das Nährmedium zuvor in einem Exsikkator entgast wurde. Der PTFE-Schlauch wird am Einlass des Kanals angebracht und dieser mit einem Volumenstrom von  $Q = 0.5 \mu\text{l/s}$  befüllt. Sobald die Flüssigkeit an allen Auslässen erkennbar ist, wird der Befüllungsvorgang beendet und das komplette Reservoir mit Nährmedium befüllt. Nach dem Befüllungsvorgang werden alle Chips für mindestens eine Stunde im Mikroskopinkubator inkubiert. Zwischenzeitlich wird die Zellkultur für die Aussaat vorbereitet. Wie in *Kap. D.2.* beschrieben, werden durch die Passagierung Zellen für das Experiment gewonnen. Je nach Zelldichte wird die Zellsuspension bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um eine höhere Zellkonzentration in der Suspension zu erreichen. Die Zelldichte sollte ca.  $1 - 2 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter betragen, eine exakte Konzentration ist aufgrund des dynamischen Befüllungsvorgangs jedoch vernachlässigbar. Zur Vermeidung von Zellklumpen, u. a. bedingt durch freie DNA, können diese entweder mittels des Enzyms DNase I aufgelöst oder durch ein Zellsieb entfernt werden. Hierbei wurde die Filtration mit einem 20  $\mu\text{m}$ -Zellsieb (pluriStrainer Mini 20  $\mu\text{m}$  (Cell Strainer), pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland) präferiert, da diese Methode im Gegensatz zur DNase I-Behandlung überzeugendere Ergebnisse lieferte. Die Zellklumpen konnten durch die Filtration restlos entfernt werden, während bei DNase I-Behandlung stets weiterhin Zellklumpen vorhanden waren. Die gefilterte Zellsuspension wird bei einem Volumenstrom von  $Q = -0.01 \mu\text{l/s}$  in den Schlauch der Spritze angezogen, bis ein Gesamtvolumen von ca. 20  $\mu\text{l}$  erreicht ist. Anschließend wird der mit der Zellsuspension befüllte Schlauch in den Einlass des Kanals gesteckt und der Kanal wird vorsichtig mit der Zellsuspension mit  $Q = 0.5 \text{ nl/s}$  befüllt. Einströmende Zellen können nun durch Aktivierung des Kraftfeldes positioniert werden. Erfolgt eine Positionierung, so wird die Spritzenpumpe deaktiviert, um einwirkende Scherkräfte zu reduzieren. Die Positionierung muss rasch erfolgen, da die Zellen im Schlauch innerhalb kürzester Zeit erneut verklumpen oder sedimentieren. Nach erfolgter Positionierung und Adhäsion der Zellen kann der Schlauch vorsichtig entfernt werden. Im Anschluss werden die Funktionsgeneratoren dem Versuch entsprechend eingestellt. Sofern nicht anderweitig erwähnt, erfolgt die Observierung der mikrofluidischen Hauptkammer stets durch ein 10x-Objektiv im Phasenkontrastverfahren. Die Aufnahmen werden durch eine CMOS-Kamera (Orca 5G, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) mit einem Auflösungsvermögen von  $1344 \text{ px} \times 1024 \text{ px}$  erstellt. Bei Langzeitmessungen kann die Hauptkammer durch zwei Aufnahmepositionen vollständig erfasst werden. Die automatische Erfassung mehrerer Messpositionen erfolgt durch einen motorisierten Mikroskoptisch (SCAN IM 120x100, Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA). Hierbei werden alle fünf Minuten Aufnahmen von jedem SSAW-Chip erstellt. Die Ansteuerung der Kamera und des Mikroskops erfolgt über die Software *HCIImage* von Hamamatsu. Das anschließende Zusammenfügen der Einzelaufnahmen zu einer Bildkomposition erfolgt über das in MATLAB-entwickelte Programm *Photomerge*. Nach der manuellen Eingabe der Kenndaten des Bildrasters werden die Aufnahmen aller erfassten Zeitpunkte durch die Software automatisch zusammengeführt und gesondert abgespeichert.

### 4.3. Charakterisierung des Versuchsaufbaus

---

*Durch die Verwendung eines gekreuzten akustischen Stehwellenfeldes kann ein räumlich und zeitlich dynamisches Kraftfeld zur Realisierung einer „akustischen Pinzette“ generiert werden. In Suspension befindliche Objekte können in einem Mikrokanal durch das Kraftfeld einzeln separiert und positioniert werden. Die einwirkenden akustischen Kräfte, Kraftfeldsymmetrie, Strukturierungseffizienz und Temperaturentwicklung sind hierbei stark von den SAW-Parametern abhängig.*

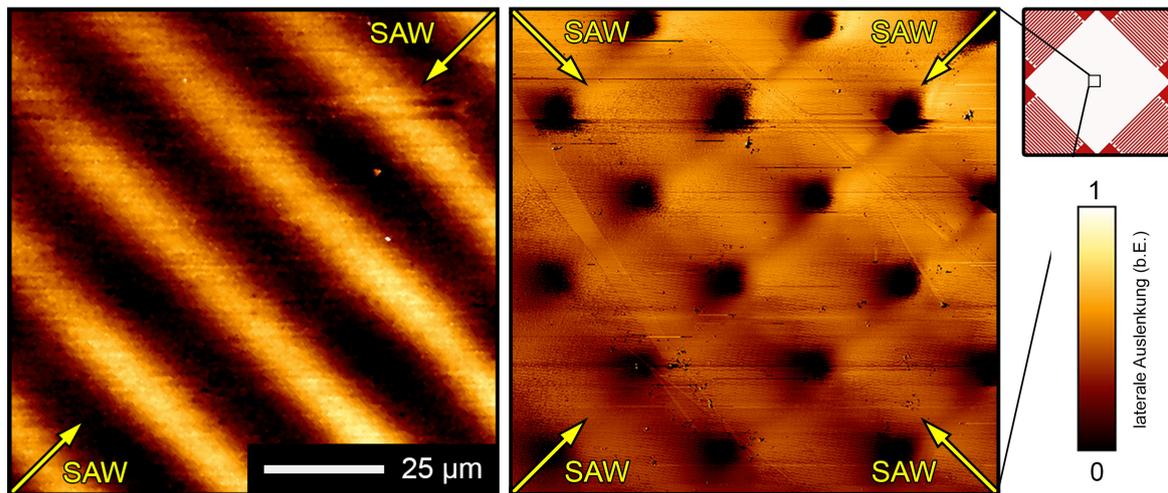
---

Die Bildung eines künstlichen neuronalen Netzwerkes auf einem Chip erfordert sowohl die exakte Kenntnis der physikalischen Eigenschaften des experimentellen Aufbaus als auch der auf die Zellkultur einwirkenden Einflüsse. Daher ist eine vollständige Charakterisierung des mikrofluidischen Systems essentiell. Im Folgenden wird die durch SSAW hervorgerufene Potentiallandschaft mittels AFM-Messung visualisiert und durch Experimente mit Mikrosphären die räumliche und zeitliche Dynamik des Kraftfeldes analysiert. Im Hinblick auf die Sicherstellung der idealen Kultivierungsbedingungen wird die Temperaturänderung im mikrofluidischen System bei aktivierter SAW durch eine Fluoreszenzmessung untersucht. Die Auswertung der Mikroskopieaufnahmen erfolgt, sofern nicht anderweitig erwähnt, standardmäßig durch die Software *ImageJ*. Die hierbei verwendeten Funktionen werden gesondert erwähnt.

#### 4.3.1. Visualisierung des Stehwellenfeldes durch Raster-Kraft-Mikroskopie

Für die Visualisierung der *Knoten* und *Bäuche* des akustischen Stehwellenfeldes wird die aktive Fläche eines SSAW-Chips mittels Raster-Kraft-Mikroskopie (engl. (Scanning) Atomic Force Microscopy (AFM), NanoWizard BioAFM, JPK Instruments, Berlin, Deutschland) untersucht. Hierbei wird die blanke SSAW-Chip-Oberfläche ohne mikrofluidischen Kanal mit einer AFM-Spitze (Cantilever) (CSC37/AI BS, Mikromasch, Wetzlar, DE) im sogenannten *constant-force-contact*-Modus vermessen. Es ist darauf zu achten, dass für die Detektion einer Megahertz-Oszillation der SAW mittels einer niederfrequenten Cantilever-Oszillation ( $\mathcal{O}(\text{kHz})$ ) eine ausgeprägte nichtlineare Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Substrat notwendig ist [156, 157].

Der zu untersuchende SSAW-Chip mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  wird auf dem AFM positioniert und beide IDT-Paare an einen Multifunktionsgenerator mit angeschlossenen Leistungsteilern kontaktiert. Die zu erwartende Periodizität des Stehwellenfeldes befindet sich in einem  $45^\circ$ -Winkel zur Scanrichtung, um einen Ausgleich des Musters durch die automatische Abstandsregelung des AFM zu vermeiden. Nach der Funktionsüberprüfung der IDT-Strukturen sowie der Kalibration des Cantilevers wird bei der ermittelten Resonanzfrequenz von  $f_{\text{res}} = 71 \text{ MHz}$  ein HF-Signal mit einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 24 \text{ dBm}$  je IDT-Paar erzeugt. Ein  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  Ausschnitt der aktiven Fläche wird mit einer Auflösung von  $512 \text{ Px} \times 512 \text{ Px}$  und einer Scanrate von  $1 \text{ Hz}$  vermessen. Hierbei wird eine Messung mit einem IDT-Paar und eine mit beiden IDT-Paaren durchgeführt. Durch die 4-Quadranten-Diode werden bei der Messung sowohl die lateralen als auch die vertikalen Komponenten der Cantileverauslenkung einzeln erfasst. Da jedoch aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen bei piezoelektrischen Kristallen mit dem Cantilever die vertikale Komponente nur eine unzureichende Aussage bezüglich des Höhenprofils der Substratauslenkung zulässt, wird nur die laterale Komponente berücksichtigt. In *Abb. 4.5* zeigt die normierte laterale Cantileverkomponente (*lateral deflection*) des gemessenen Signals in einem 1D- und 2D-Stehwellenfeld. Das 2D-modulierte Feld wurde zum Zwecke der Vollständigkeit aus [60] entnommen.



**Abbildung 4.5:**

Visualisierung eines 1D- (links) bzw. 2D-Stehwellenfeldes (rechts) in der aktiven Fläche eines SSAW-Chips durch die laterale Komponente der Cantileverbewegung. Die normierte Farbskalierung zeigt deutlich die dunklen Bereiche der Knotenpunkte und die hellen Bereiche der Bäuche der SSAW. (Daten entnommen aus [60, 69]).

Deutlich ist das symmetrisch-periodische Stehwellenbild erkennbar. Die dunklen Bereiche weisen auf eine geringe Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Substratoberfläche hin. Die Verkippung des Cantilevers ist somit in diesen Bereichen gering, was auf einen Knotenpunkt mit keiner oder einer sehr geringen  $z$ -Auslenkung der Substratoberfläche hindeutet. In den hellen Bereichen erfährt der Cantilever eine große Verkippung durch die starke Wechselwirkung mit der Substratoberfläche. Dies deutet auf eine starke  $z$ -Auslenkung des Substrats hin und lässt somit auf Bäuche schließen. Der periodische Abstand zweier Knotenpunkte im 1D- oder 2D-Stehwellenfeld entspricht exakt der halben Wellenlänge  $\lambda_{SAW}/2$ . Im eindimensionalen Fall kann das zweite inaktive IDT-Paar durch das sogenannte „Übersprechen“ (engl. Crosstalk) ebenfalls eine SAW erzeugen. Hierunter wird die Einkopplung elektrischer Leistung infolge elektromagnetischer Wechselfelder erzeugt durch benachbarte Quellen, wie beispielsweise das aktive IDT-Paar, verstanden. Wie im linken Bild allerdings erkennbar ist, kann hier das Übersprechen jedoch vernachlässigt werden, da keine zur 1D-SSAW vertikalen Komponenten sichtbar sind. Die AFM-Messung belegt somit die Existenz periodischer Knotenpunkte, deren Ausrichtung und Dimensionalität durch Wahl der aktivierten IDT-Paare bestimmt werden kann.

### 4.3.2. Die akustische Pinzette

*Acoustic tweezers* – Manipulation von kleinen Objekten durch Schallwellen. Das Werkzeug der folgenden Versuche ist eine akustische Pinzette, mit deren Hilfe eine aktive Ausrichtung und Manipulation von Zellen und Mikropartikeln erreicht werden soll. In diesem Abschnitt soll nun die zeitliche und räumliche Dynamik des Kraftfeldes untersucht werden. Hierbei wird mit Hilfe kleinster Mikropartikel, sogenannter *Beads*, das Kraftfeld visualisiert. Befinden sich Mikropartikel in einem akustischen Kraftfeld, so wirkt nach *Kap. 2.3.4.* eine Kraft abhängig von den Materialeigenschaften auf das Objekt ein. Da der akustische Kontrast der verwendeten Polystyrolkugeln (Polybead@-Carboxyl, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) in Wasser nach *Gl. 2.54* einen positiven Wert von  $\Psi \approx 0.59$  einnimmt ( $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1.03 \text{ g/cm}^3$ ,  $\kappa_{\text{H}_2\text{O}} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$ ;  $\rho_{\text{PS}} = 1.065 \text{ g/cm}^3$ ,  $\kappa_{\text{PS}} = 2.2 \cdot 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$  [158, 159]), sammeln sich die Beads in den Knotenpunkten der SSAW. Um ein Verklumpen der Beads zu vermeiden, befinden sich die Beads in einer 3% BSA-Lösung (w/w) (BSA: Bovine Serum Albumin) (Albumin bovine Fraction V, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE). In den Messungen wird ein SIDT-Design mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  und ein *chirped*-IDT mit  $\lambda_{\text{SAW}} = 15 - 25 \mu\text{m}$  verwendet. In den Experimenten wird das oben beschriebene mikrofluidische System verwendet, jedoch ohne Inkubationssystem. Die Versuchsvorbereitung erfolgt nach den in *Kap. 4.2.4.* beschriebenen Schritten. Da keine Zellen benötigt werden, wurde die Chipoberfläche nicht mit PLL beschichtet.

#### Zeitliche Dynamik

Eine der zeitlichen Dynamik des Kraftfeldes zu Grunde liegende Eigenschaft ist die Möglichkeit, die Stärke der akustischen Kraft beliebig einzustellen. Abhängig von der angelegten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  kann die auf Objekte wirkende Kraft dynamisch eingestellt werden. Durch die Observierung der dynamischen Bewegung von Mikropartikeln in einem Kraftfeld soll nun die Größenordnung der akustischen Kraft und die Strukturierungseffizienz des Kraftfeldes bestimmt werden. Für die folgenden Untersuchungen der zeitlichen Dynamik des Kraftfeldes wurde ein SSAW-Chip mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  und ein Kanal mit einer Kanalhöhe von  $h = 36 \mu\text{m}$  verwendet.

#### Akustische Kraft

Für die Bestimmung der akustischen Kraft wird die Bewegung von einzelnen  $10 \mu\text{m}$ -Beads in einem eindimensionalen Kraftfeld untersucht. Für eine hohe Zeitauflösung der Partikelbewegung erfolgt die Erstellung der Mikroskopieaufnahmen durch eine Hochgeschwindigkeitskamera (Fastcam 1024PCI, Photron, Tokyo, Japan) mit einem 20x-Objektiv. Abhängig von der Geschwindigkeit der Mikropartikel liegt die Bildwiederholungsrate bei 2000 - 10 000 fps. Die Dichte der Beads beträgt ca.  $2 \cdot 10^3$  Beads pro  $1 \mu\text{l}$ . Zu Beginn befinden sich die Mikropartikel bei deaktivierter SSAW zufällig verteilt im Mikrokanal. Nach dem Anlegen eines HF-Signals wandern die Beads in Abhängigkeit ihrer Startposition mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in die Knotenlinien des Stehwellenfeldes. Durch das ImageJ-Plugin *Mosaic - Particle Tracker 2D/3D* werden die Trajektorien der Beads analysiert und ausgegeben [160]. Hierbei werden nur Beads berücksichtigt, die eine sichtbare Bewegung aufweisen und keine unmittelbaren Nachbarn besitzen, sodass die sekundäre akustische Kraft vernachlässigt werden kann. Über die Koordinaten wird der euklidische Abstand ermittelt und mit der Bildwiederholungsrate multipliziert, um die mittlere Geschwindigkeit  $\bar{v}$  des Objekts zu berechnen. In *Abb. 4.6. a)* ist ein typisches Geschwindigkeitsprofil eines Beads dargestellt. Nach der Aktivierung der SAW beschleunigt das Objekt aufgrund der einwirkenden akustischen Kraft  $F_{\text{r}}$ . Bewegt sich allerdings ein sphärisches Objekt durch ein Medium, so wirkt eine Reibungskraft, die Stokes-Reibung  $F_{\text{R}}$ , gegen diese Bewegung. Während der Beschleunigungsphase gilt:  $F_{\text{r}} > F_{\text{R}}$ . Zum Zeitpunkt der maximalen mittleren Geschwindigkeit  $\bar{v}_{\text{max}}$  tritt ein Kräftegleichgewicht mit  $F_{\text{r}} = F_{\text{R}}$  ein. Nach *Gl. 2.53* ist die auf die Objekte einwirkende akustische Kraft  $F_{\text{r}}$  abhängig vom Abstand  $x$  des Objekts zur nächstgelegenen Knotenlinie und wird über den Term  $\sin(2kx)$  beschrieben. Da durch die Annäherung an die Knotenlinie  $F_{\text{r}}$  abnimmt

und somit  $F_r < F_R$  gilt, sinkt die mittlere Geschwindigkeit bis zum Stillstand in der Knotenlinie. Im weiteren Verlauf kann der Mikropartikel bedingt durch weitere Strömungseffekte entlang der Knotenlinie wandern. Dies ist sichtbar an der anschließenden Geschwindigkeitszunahme bei  $t = 15$  ms. Unter der Annahme des Kräftegleichgewichts zwischen der akustischen Kraft  $F_r$  und der Stokes-Reibung  $F_R$  kann die maximal auf das Mikropartikel einwirkende Kraft über das Stokes-Gesetz Gl. 4.2 berechnet werden:

$$F_r = F_R = 6\pi r\eta\bar{v}_{\max} \quad (4.2)$$

mit  $r$  dem Objektdurchmesser,  $\eta$  der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit und  $v$  der Geschwindigkeit des Objekts. Hierbei wurde eine Viskosität von  $\eta = 1$  mPas angenommen. Aufgrund der 3% BSA-Lösung wird die tatsächliche Kraft leicht erhöht sein, dies wird hier jedoch aufgrund der minimalen Änderung vernachlässigt. Zur Berücksichtigung der Abstandsabhängigkeit der akustischen Kraft zur nächstgelegenen Knotenlinie wird der Abstand  $x$  über das Integral zwischen  $\bar{v}_{\max}(t_{\max})$  und Stillstand in der Knotenlinie mit  $\bar{v}_{\min}(t_{\min})$  berechnet:

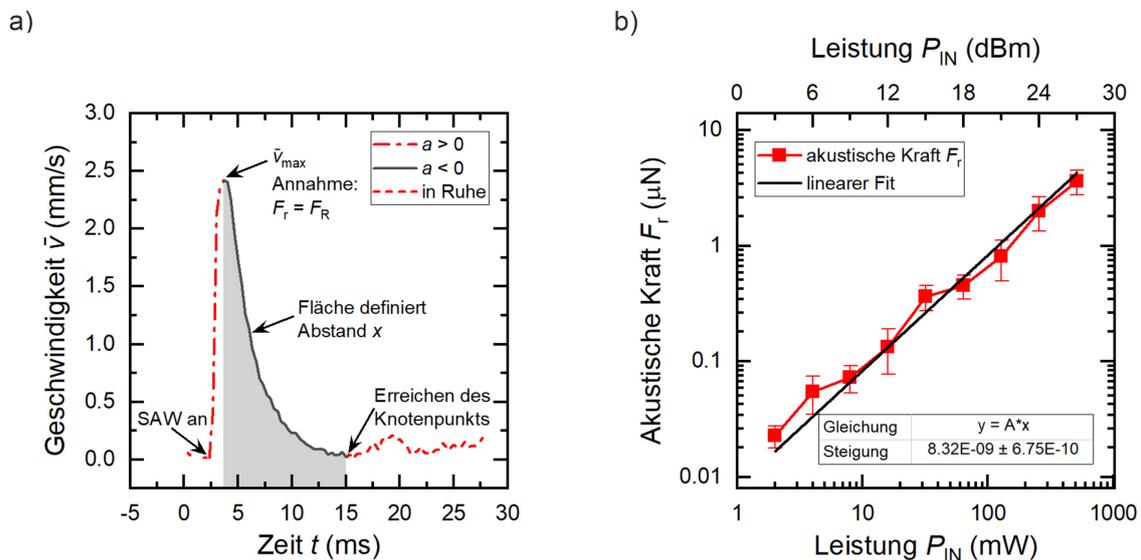
$$x = \int_{t_{\min}}^{t_{\max}} \bar{v}(t) dt. \quad (4.3)$$

Der Quotient aus der berechneten Kraft nach Gl. 4.2 durch  $\sin(2kx)$  mit  $k$  als Wellenzahl bildet nun die korrigierte akustische Kraft  $F_r$  ab.

In Abb. 4.6. b) ist die berechnete mittlere akustische Kraft  $F_r$  in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{IN}$  dargestellt. Zum Zwecke der Darstellung ist die Leistung in Milliwatt (mW) angegeben. Anhand des Verlaufs des Graphen ist eine eindeutige lineare Abhängigkeit der akustischen Kraft  $F_r$  zur angelegten Leistung  $P_{IN}$  mit

$$F_r(P_{IN}) = 8.32 \frac{\text{nN}}{\text{mW}} P_{IN} \sin(2kx) \quad (4.4)$$

ersichtlich.



**Abbildung 4.6:**

a) Typisches Geschwindigkeitsprofil eines Mikropartikels in einem akustischen Kraftfeld. Die maximale Geschwindigkeit und der Abstand zum Knoten (grau markierte Fläche) geben Auskunft über die akustische Kraft  $F_r$ . b) Auf  $10\ \mu\text{m}$ -Mikropartikel einwirkende akustische Kraft in einem eindimensionalen SAW-Stehwellenfeld in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{IN}$ .

Die akustische Kraft  $F_r$  ist nach Gl. 2.53 bezüglich der Objekteigenschaften neben dem akustischen Kontrast  $\Psi$  ( $\Psi_{\text{Bead}} = 0.59$ ) nur noch vom Volumen  $V$  des Objektes abhängig. Durch die Wahl des Mikropartikeldurchmessers von  $d = 10 \mu\text{m}$  lässt sich nun das hier festgestellte Ergebnis unter Berücksichtigung von  $\Psi$  auf Zellen übertragen, da diese in Suspension ein ähnliches Volumen aufweisen. Somit kann eine Gleichung von  $F_r$  in Abhängigkeit von  $P_{\text{IN}}$  und  $\Psi$  formuliert werden:

$$F_r(P_{\text{IN}}, \Psi) = 14.03 \frac{\text{nN}}{\text{mW}} P_{\text{IN}} \Psi \sin(2kx). \quad (4.5)$$

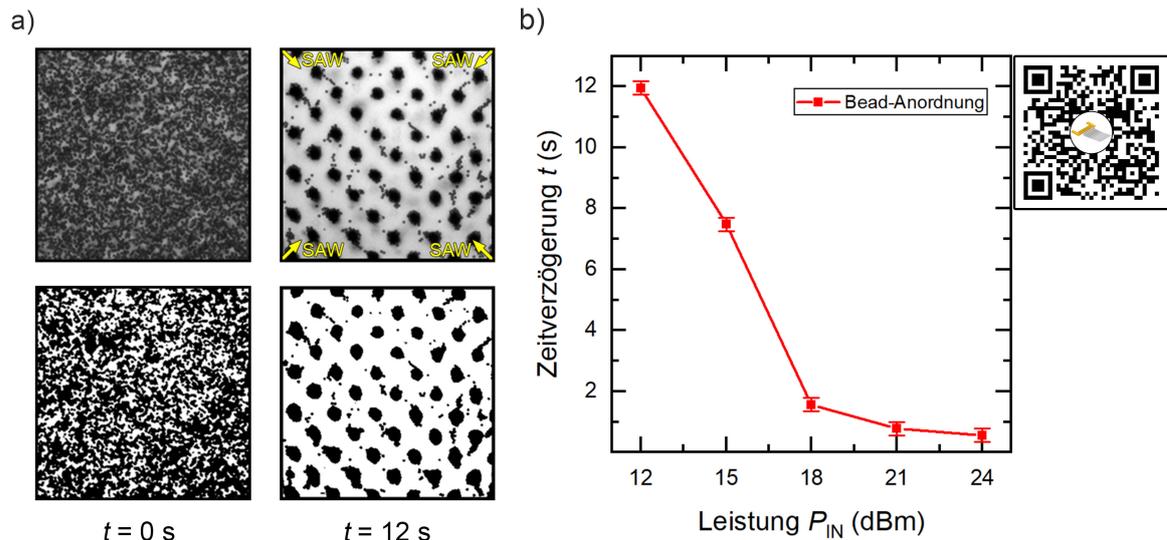
Der akustische Kontrast von Zellen ist stark vom Zelltyp abhängig. Für unterschiedliche Zelllinien wurden in der Literatur Werte gemäß  $\Psi \in [0.14; 0.25]$  ermittelt [161]. Wirkt ein zweidimensionales Kraftfeld auf das Objekt ein, so können die Beiträge der resultierenden Kraft unabhängig voneinander berechnet werden, da diese orthogonal zueinander stehen. Die hier ermittelten Ergebnisse gelten jedoch nur für den verwendeten SAW-Chip mit einer Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$ .

#### Strukturierungseffizienz

Durch Variation der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$  kann die auf ein einzelnes Objekt einwirkende akustische Kraft  $F_r$  exakt kontrolliert werden. Diese Kraft bestimmt die benötigte Zeit, um Objekte mit Hilfe des Kraftfeldes auszurichten und zu strukturieren. Zur Bestimmung dieser Strukturierungseffizienz wird nun die dynamische Agglomeration von  $2 \mu\text{m}$ -Beads in den Knotenpunkten eines zweidimensionalen Kraftfeldes bei einer hohen Partikeldichte von ca.  $1 \cdot 10^7$  Beads pro  $1 \mu\text{l}$  untersucht. Die dieser Auswertung zugrunde liegenden Rohdaten wurden aus [60] entnommen und werden nun neu bewertet. Zu Beginn, bei deaktivierter SAW, liegt eine homogene Verteilung der Beads im Mikrokanal vor. Nach dem Aktivieren der SAW beginnen sich die Beads in Richtung der Knotenpunkte zu bewegen und dort zu agglomerieren. Die Geschwindigkeit der Strukturierung ist hierbei stark abhängig von der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$ .

Die quantitative Bestimmung der benötigten Zeit des Stehwellenfeldes zur Ausrichtung der Mikropartikel erfolgt über die Analyse der durch die Beads belegten Fläche mit Hilfe eines *ImageJ*-Makros. Hierbei wird ein  $300 \text{ px} \times 300 \text{ px}$ -Ausschnitt der Bildsequenz binarisiert und über ein Histogramm die Anzahl der weißen ( $P_{\text{ws}}$ ) und schwarzen Pixel ( $P_{\text{sw}}$ ) je Aufnahme ermittelt. Als Messbereich wird die Kammermitte verwendet, um Effekte durch den Kammerrand auszublenden. Das Verhältnis  $P_{\text{ws}}/P_{\text{sw}}$  beschreibt die durch Beads belegte Fläche. Mit einer durchschnittlichen Knotenpunktfläche von  $A = 300 \text{ px}^2 \pm 80 \text{ px}^2$  und durchschnittlich  $60 \pm 2$  Knotenpunkte in dem gewählten Bildausschnitt liegt das maximale Verhältnis bei vollständiger Ausrichtung der Beads in Knotenpunkten bei 1:5. Bedingt durch diverse Effekte wie Oberflächenadhäsion, Klumpenbildung etc. kann die Agglomeration der Beads in die Knotenpunkte jedoch verzögert bzw. behindert werden. Um eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden, gelten die Beads schon bei einem Verhältnis von 1:3 als „ausgerichtet“. Abb. 4.7. a) zeigt die Mikroskopieaufnahme und das Binärbild vor dem Einschalten der SAW und beim Erreichen des festgelegten Grenzwertes.

In Abb. 4.7. b) ist die Zeitdifferenz zwischen dem Einschaltzeitpunkt des HF-Generators und dem Zeitpunkt des Überschreitens des festgelegten Grenzwertes in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$  abgebildet. Als Unsicherheit wird der zeitliche Abstand zwischen drei Einzelaufnahmen angenommen. Eine Verdoppelung der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$  führt nahezu zu einer Halbierung der benötigten Zeit  $t$ . Dies bestätigt somit die lineare Abhängigkeit der akustischen Kraft von  $P_{\text{IN}}$ . Bedingt durch die hohe Dichte wirkt nun neben der primären akustischen Kraft  $F_r$  auch die zwischen den Partikeln attraktiv wirkende sekundäre akustische Kraft  $F_B$  (Gl. 2.55), was die effiziente Agglomeration in den Knotenpunkten fördert.



**Abbildung 4.7:**

a) Mikroskopieaufnahme und binarisiertes Bild der Verteilung von  $2\ \mu\text{m}$ -Beads in einem Mikrokanal ohne und mit angelegtem SSAW-Kraftfeld. Zu Beginn liegt eine homogene Verteilung der Beads vor, welche sich nach der Aktivierung der SAW in den Knotenpunkten anlagern. Bei  $P_{IN} = 12\ \text{dBm}$  sind die Beads nach  $t = 12\ \text{s}$  ausgerichtet. b) Leistungsabhängige Zeitverzögerung der Anlagerung von Beads aus einer homogenen Suspension in den Knotenpunkten. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>. (Daten entnommen aus [69]).

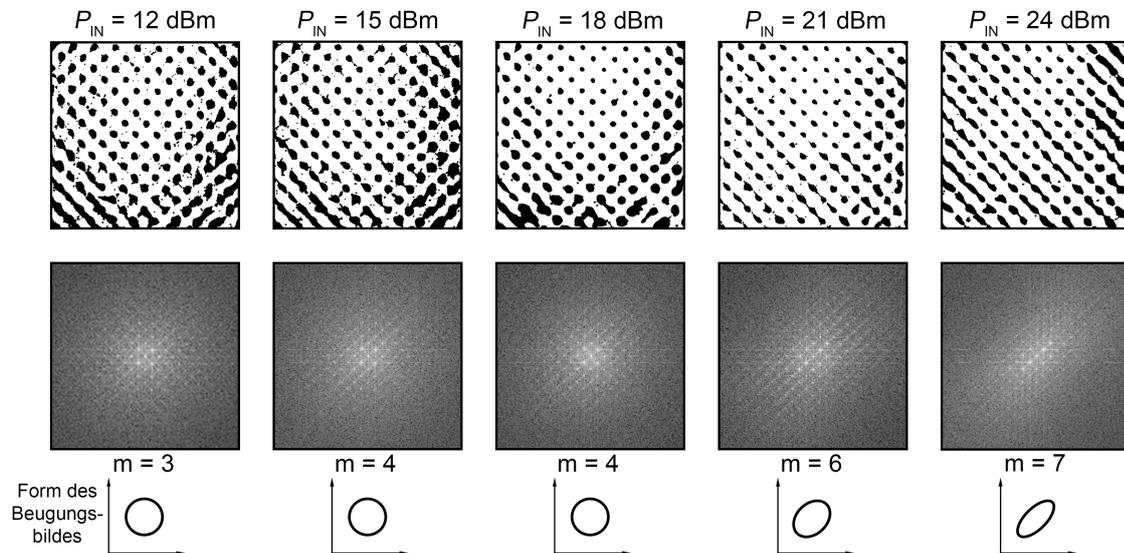
<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/8-yrLNo7RNg>

Die Visualisierung der Knotenpunkte mittels der Agglomeration von  $2\ \mu\text{m}$ -Beads erlaubt es nun zusätzlich, Rückschlüsse auf die Homogenität des Kraftfeldes ziehen zu können. Durch eine schnelle Fourier-Transformation (*Fast Fourier Transform*, FFT) des binarisierten Bildes vom Ortsraum (Pixelwert an Position  $x,y$ ) in den Frequenzraum (sin- und cos-Funktionen mit unterschiedlichen Frequenzen) kann die Periodizität eines Bildes dargestellt werden. In Abb. 4.8 sind die Binärbilder mit der maximal erreichbaren Strukturierung und deren transformierte Spektraldarstellungen (Amplitudenspektrum) bei unterschiedlichen Leistungen abgebildet. Der Bildausschnitt beträgt hier  $400\ \text{px} \times 400\ \text{px}$ . Das Amplitudenspektrum ist in Polarkoordinaten dargestellt. Hierbei definiert der Winkel die Orientierungsrichtung und der Grauwert die Amplitude und den radialen Abstand vom Zentrum die Frequenz der Welle, wobei mit steigendem Abstand die Frequenz zunimmt. Während das Zentrum den mittleren Grauwert eines Bildes beschreibt, definiert ein erhöhter Grauwert abseits des Zentrums eine dominante Welle mit einer bestimmten Frequenz und Orientierungsrichtung. Die Überlagerung der Wellenfunktionen liefert wieder das Bild im Ortsraum.

Die sichtbare Punktwolke um das Zentrum beschreibt somit ausgeprägte Wellenfunktionen in diskreten Richtungen und Frequenzen. Der gleichmäßige Abstand der Maxima vom Zentrum weist auf höhere Harmonische hin. Je höher die Ordnung der Harmonischen, desto ausgeprägter die Periodizität. Bei einer Leistung von  $P_{IN} = 15\text{-}18\ \text{dBm}$  ist eine radial gleichmäßige Verteilung bis zur 4. Ordnung erkennbar. Dies deutet auf eine gleichmäßige Potentiallandschaft, hervorgerufen durch die SSAW hin. Die Intensität der Maxima und die Anzahl der erkennbaren Maxima nehmen mit steigender Leistung zu, was auf eine höhere Homogenität hindeutet. Dies ist auch in den Binäraufnahmen sichtbar, in denen mit steigender Leistung die Gleichmäßigkeit der Struktur zunimmt.

Ab einer Leistung von  $P_{IN} = 21\ \text{dBm}$  werden noch höhere Harmonische erreicht, jedoch nimmt die Verteilung der diskreten Maxima eine elliptische Form an. Dies ist insbesondere bei der maximal gemessenen Leistung von  $P_{IN} = 24\ \text{dBm}$  sichtbar. Die ursprüngliche Schachbrettmuster-ähnliche Verteilung der Beads in den Binäraufnahmen geht in langgezogene Knotenpunkte über. Während in einer Richtung die Ordnung bis zur 7. Harmonischen zunimmt, reduziert sich diese in der orthogonalen

Richtung. Die Ursache hierfür kann ein asymmetrisches Kraftfeld sein, hervorgerufen u. a. durch Abweichungen in der SAW-Erregungseffizienz der IDT-Strukturen oder durch Unregelmäßigkeiten des mikrofluidischen Systems.



**Abbildung 4.8:**

*Binärbilder und die korrespondierenden Spektraldarstellungen berechnet durch FFT. Die maximale Ordnung  $m$  der Harmonischen beschreibt die Homogenität der Potentiallandschaft. Mit steigender Leistung wird eine gleichmäßigere Ausrichtung der Beads in den Knotenpunkten erreicht. Bei exzessiven Leistungen hingegen findet aufgrund einer beispielsweise inhomogenen SAW-Anregung eine Verzerrung der Potentiallandschaft statt. Dies ist besonders in der Verteilung der Maxima in der FFT-Analyse sichtbar.*

Die gleichmäßige Strukturierbarkeit von Objekten durch die Potentiallandschaft eines SSAW-Kraftfeldes ist somit direkt von der eingekoppelten Leistung abhängig. Während mit steigender Leistung eine gleichmäßigere Strukturierung erreicht wird, nimmt diese bei zu hohen Leistungen  $P_{IN} \geq 21$  dBm wieder ab. Daher ist eine Leistung zwischen  $P_{IN} = 18$ -21 dBm für einen hohen Strukturierungsgrad ideal.

Die Daten belegen, dass sich eine FFT-basierte Analyse von Mikroskopieaufnahmen eignet, um die Homogenität und die Symmetrie einer Potentiallandschaft zu analysieren. Die von der eingekoppelten Leistung abhängige Form der Potentiallandschaft führt direkt zur nächsten Charakterisierung des Stehwellenfeldes: der dynamischen räumlichen Variation des Kraftfeldes bezüglich der Lokalisation der Knotenpunkte und deren Abstände zueinander. Dies wird nun im nächsten Abschnitt untersucht.

## Räumliche Dynamik

Für die dynamische Manipulation von Objekten ist es essentiell, neben der Einstellbarkeit der Kraftfeldstärke auch die räumliche Ausdehnung des Kraftfeldes variieren zu können. Objekte lateral zu verschieben, zu positionieren und Abstände zu definieren sind grundlegende Anforderungen, die erfüllt werden müssen. Ein Überblick der Möglichkeiten des experimentellen Aufbaus soll nun geschaffen werden.

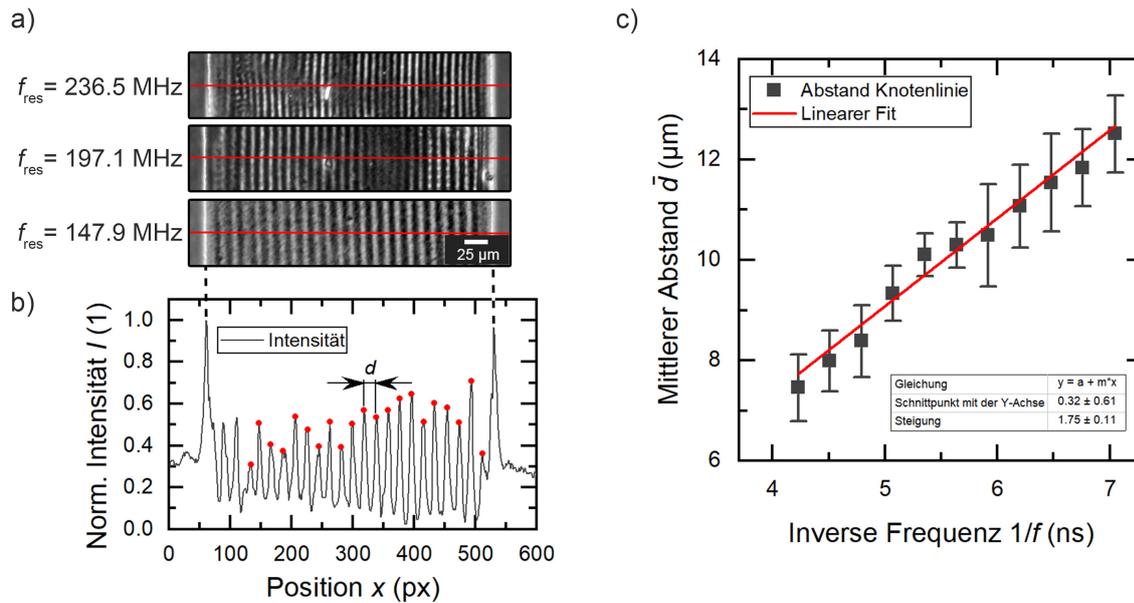
### *Variation der Wellenlänge*

Die Abstände der Knoten  $d$  in der Potentiallandschaft sind nach *Kap. 2.2.4.* definiert durch die Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}}$  zweier gegenläufiger interferierender Wellen mit  $d = \frac{\lambda_{\text{SAW}}}{2}$ . Durch die Änderung der Wellenlänge der angeregten SAW kann somit der Abstand zweier Knoten verändert werden. Während zuvor Standard-IDTs nur für die Anregung einer Wellenlänge geeignet sind, kann durch die Verwendung der *chirped*-IDTs ein breites Frequenzspektrum angelegt werden. Hierbei kann zwischen einer diskreten und einer kontinuierlichen Anregung unterschieden werden. Für die Erzeugung eines manipulativen Kraftfeldes ist die Verwendung diskreter Anregungsfrequenzen präferiert, da hierbei die SAW-Anregung aufgrund der erhöhten Anzahl der Fingerpaare einer Anregungsfrequenz effizienter ist. Diese Struktur kann mit einer Aneinanderreihung mehrerer SIDTs verglichen werden. Die gewählte IDT-Struktur besitzt im Bereich 15-25  $\mu\text{m}$  in 1  $\mu\text{m}$ -Schritten jeweils 15 Fingerpaare für die Anregung einer akustischen Oberflächenwelle. Die Anregungsfrequenz liegt somit zwischen  $f_{\text{res}} = 141.9 - 236.5$  MHz.

Für die Visualisierung des Kraftfeldes werden 300 nm-Nanopartikel verwendet. Aufgrund der geringeren Wellenlänge und kleineren aktiven Fläche beträgt die Kanalhöhe  $h = 25 \mu\text{m}$ . Für eine deutlichere Darstellung der Knoten wird ein eindimensionales Kraftfeld erzeugt. Die Anregung der SAW erfolgt über den Frequenzgenerator SML 01 mit angeschlossener Verstärker (Verstärkungsfaktor  $G = 30$  dB, AMP590033H-T, Becker Nachrichtentechnik GmbH, Asbach, Deutschland) und Leistungsteiler (ZFSC-2-4+). Nach dem Befüllen des Mikrokanals werden die eingehend homogen verteilten Nanopartikel durch die Aktivierung der SAW in den Knotenlinien ausgerichtet. Durch die stufenweise Erhöhung der Anregungsfrequenz von  $f_{\text{res}} = 141.9$  MHz nach  $f_{\text{res}} = 236.5$  MHz verringert sich der Abstand  $d$  der Knotenlinien. *Abb. 4.9. a)* zeigt einen Ausschnitt des mikrofluidischen Kanals bei unterschiedlichen Frequenzen. Die Zunahme der Knotenlinien und die damit einhergehende Verringerung des Abstandes  $d$  ist deutlich zu erkennen. Durch die Messung des Intensitätsprofils mittels eines Profilplots (*ImageJ*) entlang des Schallpfades und senkrecht zu den Knotenlinien (rote Linie) kann der Knotenlinienabstand ermittelt werden. Das gemessene Intensitätsprofil ist in *Abb. 4.9. b)* dargestellt. Abhängig von der dynamischen Agglomeration der Nanopartikel in den Knotenpunkten schwanken die Absolutwerte der gemessenen Intensität in den Bäuchen (helle Linien) und Knoten (dunkle Linien). Da die Bäuche ein schärferes Maximum abbilden und die Abstände identisch zu den Knotenlinien sind, wird der mittlere Abstand  $\bar{d}$  der lokalen Maxima (rote Punkte) ermittelt. Der gemessene mittlere Abstand  $\bar{d}$  wird gegenüber der inversen Frequenz  $1/f_{\text{res}}$  in *Abb. 4.9. c)* aufgetragen und stellt einen eindeutigen linearen Zusammenhang dar. Die Steigung  $m$  der linearen Annäherung beschreibt hierbei nach *Gl. 4.6*

$$d = m \frac{1}{f} = \frac{c}{2} \frac{1}{f} \quad (4.6)$$

die halbe Schallgeschwindigkeit des verwendeten Substrates. Die ermittelte Steigung von  $m = 1751 \pm 110 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  entspricht nahezu exakt der halben Schallgeschwindigkeit von  $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut mit  $c_{\text{LiNbO}_3 \text{ 128}^\circ \text{ rot Y-Cut}} = 3547 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ .

**Abbildung 4.9:**

Bestimmung des Stehwellenfeldes eines chirped-IDTs. a) Agglomerierte Nanopartikel in den Knotenlinien eines eindimensionalen Stehwellenfeldes bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen  $f_{res}$ . b) Abstände der lokalen Maxima im Intensitätsprofil entlang des Schallpfades geben Auskunft über die Wellenlänge  $\lambda_{SAW}$ . Linearer Zusammenhang zwischen dem mittleren Abstand  $\bar{d}$  und der inversen Anregungsfrequenz  $f_{res}$ . (Daten entnommen aus [69]).

Somit kann durch die Verwendung des IDT-Designs der *chirped*-IDTs nicht nur durch Wahl einer Resonanzfrequenz der Knotenabstand variiert werden, sondern auch durch die Bestimmung mehrerer Messwerte eine unbekannte Schallgeschwindigkeit ermittelt werden.

#### Erfüllung der EZPK-Bedingung

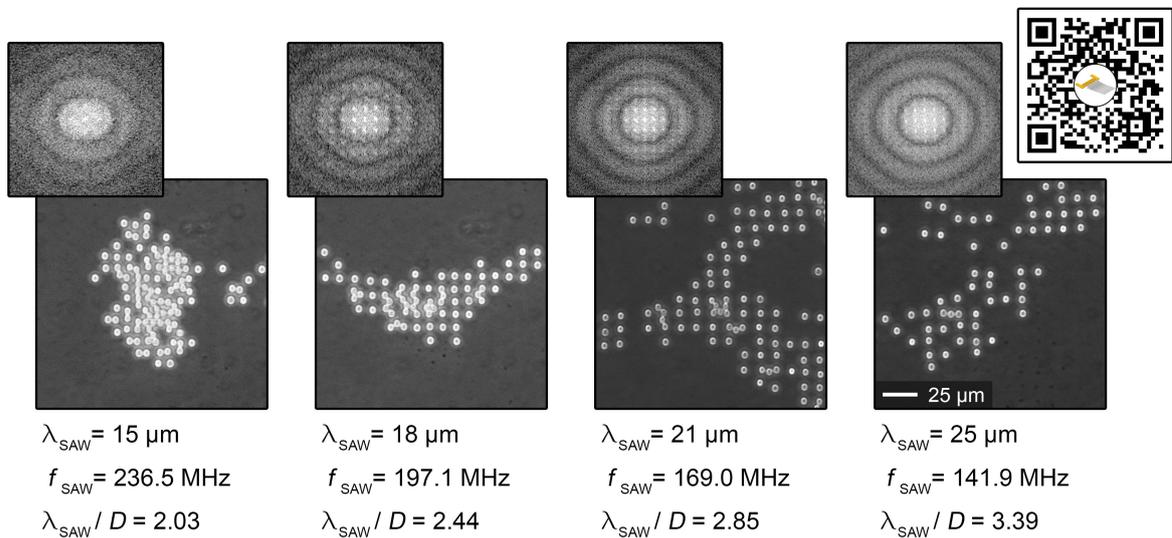
Liegt ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wellenlänge  $\lambda_{SAW}$  zu Objektdurchmesser  $D$  vor, so lagern sich Objekte in einem Stehwellenfeld selbstorganisiert einzeln in den Knotenpunkten an – dies ist die sogenannte EZPK-Falle (EZPK = Eine Zelle Pro Knotenpunkt). Wie in Kap. 2.3.4. beschrieben, wird die EZPK-Ausrichtung nur in einem schmalen Intervall erreicht und ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften der auszurichtenden Objekte wie z. B. dem akustischen Kontrast  $\Psi$ . Im Fall steifer Objekte wie PS- oder  $\text{SiO}_2$ -Kugeln wird eine EZPK-Ausrichtung beispielsweise in einem Intervall von  $3.2 < \lambda_{SAW}/D < 3.6$  erreicht.

Für die Überprüfung der Realisierbarkeit der EZPK-Bedingung wird der oben beschriebene *chirped*-IDT mit dem identischen mikrofluidischen Aufbau verwendet. Als Mikropartikel dienen  $\text{SiO}_2$ -Kügelchen mit einem Durchmesser von  $D = 7.38 \mu\text{m}$ . Durch die Wahl dieses Durchmessers wird bei hohen Frequenzen mit  $f_{res} = 236.5$  MHz und  $\lambda = 15 \mu\text{m}$  die EZPK-Bedingung mit  $\lambda_{SAW}/D \approx 2$  nicht erfüllt. Durch die stufenweise Verringerung der Anregungsfrequenz und somit der Vergrößerung der Wellenlänge  $\lambda_{SAW}$  kann das Verhältnis auf die EZPK-Bedingung justiert werden. Diese sollte bei dem gewählten Objektdurchmesser ab einer Wellenlänge von ca.  $\lambda_{SAW} = 24 \mu\text{m}$  mit  $\lambda_{SAW}/D = 3.25$  erfüllt sein.

Nach der homogenen Verteilung der Beads im Mikrokanal wird ein zweidimensionales Stehwellenfeld mit einer Leistung von  $P_{IN} = 27$  dBm angelegt. Beginnend mit der maximalen Anregungsfrequenz von  $f_{res} = 236.5$  MHz, wird diese stufenweise reduziert und die Vorgänge im Mikrokanal aufgezeichnet. In Abb. 4.9. ist die Ausrichtung der Beads bei verschiedenen Anregungsfrequenzen dargestellt. Bei hohen Frequenzen formieren sich die Beads zu einem Kugelhaufen. Dies ist bedingt durch den zu

geringen Knotenpunktabstand, da hierbei die sekundäre Kraft  $F_B$  gegenüber  $F_r$  überwiegt und zu einer Agglomeration führt. Durch die Reduktion der Anregungsfrequenz nimmt der Knotenpunktabstand zu, die Rückstellkraft  $F_r$  überwiegt und die Beads beginnen sich voneinander zu lösen und sich einzeln auszurichten. Im Gegensatz zur Literatur ([97]) wird eine vereinzelt Ausrichtung der Objekte bereits bei einer Frequenz von  $f_{\text{res}} = 197 \text{ MHz}$  ( $\lambda_{\text{SAW}}$ ) beobachtet, was einem Verhältnis von  $\lambda_{\text{SAW}}/D = 2.4$  entspricht.

Für eine quantitative Analyse der Ausrichtungseffizienz wird eine zum vorherigen Abschnitt (*Strukturierungseffizienz*) identische FFT-Analyse durchgeführt. Die im Frequenzraum auftretenden weiteren Maxima bei der Reduktion der Anregungsfrequenz weisen auf eine Zunahme der Strukturierung hin. Während bei  $f_{\text{res}} = 236.5 \text{ MHz}$  nur die erste Harmonische schemenhaft sichtbar ist, erscheint ab einer Frequenz von  $f_{\text{res}} = 197.1 \text{ MHz}$  die zweite Harmonische. Eine höhere Ordnung tritt bei einer weiteren Reduktion der Frequenz nicht auf, jedoch nehmen die Intensitätswerte der Maxima sichtbar zu. Ab einem Verhältnis von  $\lambda_{\text{SAW}}/D = 2.85$  wird keine effizientere Strukturierung mehr erreicht. Die hierbei auftretenden konzentrischen Ringe entstehen durch die endliche Ausdehnung der Objekte und werden als Artefakte angesehen. Sobald die EZPK-Bedingung erfüllt ist, werden nur die Abstände zwischen den Knotenpunkten durch Variation der Wellenlänge verändert:  $\lambda_{\text{SAW}} = 21 \mu\text{m} \rightarrow 25 \mu\text{m}$ :  $d = 10.5 \mu\text{m} \rightarrow 12.5 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.10:**

*Mikroskopieaufnahmen der vereinzelt Ausrichtung von Objekten ( $D = 7.38 \mu\text{m}$ ) in den Knotenpunkten eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen. Durch die Reduktion der Anregungsfrequenz wird die EZPK-Bedingung nach anfänglicher Agglomeration in einem Kugelhaufen durch die vereinzelt Separation der Beads in den Knotenpunkten sichtbar erfüllt. Der Strukturierungsgrad wird durch eine FFT-Analyse charakterisiert. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>. (Daten entnommen aus [69]).*

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/qqf1f8Un61k>

Durch die dynamische räumliche Anpassung des Kraftfeldes können somit Objekte getrennt voneinander ausgerichtet und positioniert werden. Es ist essentiell, vor dem Experiment den Durchmesser der auszurichtenden Objekte zu bestimmen. Auf Basis des Durchmessers kann anschließend eine Wellenlänge der SAW bestimmt werden, um die EZPK-Bedingung zu erfüllen. Liegt ein homogener, bekannter Durchmesser vor, so sind Standard-IDT-Strukturen mit einer Anregungsfrequenz zu präferieren. Diese weisen aufgrund der Impedanzanpassung eine deutlich höhere Rückflussdämpfung  $S_{11}$  und somit eine effektivere Anregung einer akustischen Oberflächenwelle auf.

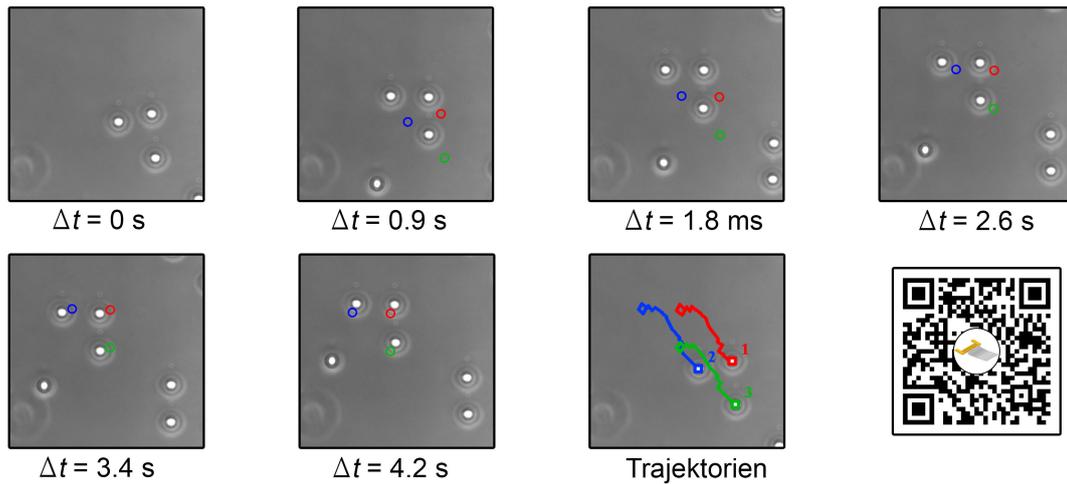
*Repositionierung von Objekten*

Erfolgt die Anregung einer SSAW über einen Leistungsteiler durch eine einzelne HF-Quelle mit konstanter Frequenz, so bildet sich aufgrund des relativen Phasenunterschiedes der interferierenden SAW ein lokal statisches Stehwellenfeld aus (siehe *Abb. 2.2.4.*). Wie in den vorangegangenen Messungen erkennbar war, kann durch Veränderung der Anregungsfrequenz bei einem *chirped*-IDT neben dem relativen Knotenabstand  $d$  auch die absolute Position der Knoten verändert werden. Eine beliebige Positionierung durch die Veränderung der Wellenlänge ist jedoch aufgrund der Abhängigkeit der Anregungsstruktur und der EZPK-Bedingung nicht möglich.

Liegt ein geringer Frequenzunterschied in der Größenordnung von  $\mathcal{O}(10^0)$  Hz zwischen beiden Quellen eines IDT-Paares vor, so kann ein fortlaufendes Stehwellenfeld erzeugt werden. Die Geschwindigkeit der Knoten ist hierbei abhängig vom relativen Frequenzunterschied  $\Delta f$ . Dies ist möglich, da in einem schmalen Spektrum mit der maximalen Rückflussdämpfung  $S_{11}$  bei  $f_{\text{res}}$  eine SAW angeregt werden kann. Dies erfordert jedoch eine Synchronisation von zwei qualitativ hochwertigen HF-Quellen, beispielsweise SML 01, um einen minimalen Frequenzunterschied bei Absolutwerten von  $\mathcal{O}(10^6 - 10^8)$  Hz zu erzeugen.

Eine effizientere Lösung bietet jedoch die Änderung der Phasendifferenz der SAW-erzeugenden Strukturen. Durch die Modifikation der Wegstrecke des HF-Signals in den Koaxialleitungen kann der relative Phasenunterschied zwischen beiden Quellen verändert werden. Während die Phase einer Quelle konstant ist, wird durch eine Verlängerung der Koaxialleitung eine Phasenänderung der zweiten Quelle erreicht. Durch die Bestimmung der relativen Phase eines HF-Signals durch mehrere Koaxialleitungen unterschiedlicher Länge ( $l_1 = 0.34$  m bis  $l_6 = 2.55$  m), wurde eine mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit des elektromagnetischen Feldes in der Leitung von  $c = 2.02 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  ermittelt. Bei einer Frequenz von  $f_{\text{res}} = 71$  MHz führt dies zu einer Phasenverschiebung von  $1.26^\circ$  pro Zentimeter Leitungslänge. Für die ungehinderte Bewegung eines Objekts muss ein Knotenpunkt um mindestens  $\lambda/2$  verschoben werden, was bei einer Interferenz zweier gegenläufiger Wellen einer relativen Phasenverschiebung von  $360^\circ$  entspricht. Die Änderung der Phase erfolgt hierbei diskret über  $60^\circ$ -Schritte mit Hilfe eines 6-Port-HF-Schalters, welcher unterschiedliche Leitungslängen von  $l_1 = 0.34$  m bis  $l_6 = 2.55$  m ansteuert.

Zur Überprüfung der Funktion der Phasenverschiebung werden  $15 \mu\text{m}$  große PS-Beads in einem zweidimensionalen Stehwellenfeld eines  $50 \mu\text{m}$  SSAW-Chips ausgerichtet. Nach dem Anlegen des HF-Signals bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 21$  dBm ordnen sich die Beads einzeln in den Knotenpunkten an, da die EZPK-Bedingung erfüllt ist. Durch die Ansteuerung des Phasenschiebers mittels eines Joysticks können die Beads nach Belieben im Stehwellenfeld lateral in  $x$ - und  $y$ -Richtung positioniert werden. In *Abb. 4.11.* ist das Bewegungsprofil akustisch manipulierter Beads zu verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. Für eine visuelle Nachverfolgung der Bead-Bewegung ist die Position in der vorherigen Aufnahme durch farbige Kreise symbolisiert. Der hierbei zurückgelegte Weg wird durch die Trajektorien in der letzten Aufnahme dargestellt. Über den QR-Code kann die komplette Sequenz als Video betrachtet werden.

**Abbildung 4.11:**

Mikroskopieaufnahmen der dynamischen lateralen Positionierung von  $15\ \mu\text{m}$ -Beads in einem akustischen Stehwellenfeld zu bestimmten Zeitpunkten. Durch Änderung der relativen Phase zwischen beiden Quellen kann eine Verschiebung der Knotenpunkte erreicht werden. Die Positionen der Beads in der vorherigen Aufnahme werden durch farbige Kreise symbolisiert. Die Trajektorien beschreiben den in der Bilderserie zurückgelegten Weg. Die komplette Aufnahme kann über den QR-Code aufgerufen werden<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/CpbXSHSgEw>

Wie in der Aufnahme ersichtlich ist, folgen die Beads größtenteils der akustischen Falle. Jedoch können die Beads in benachbarte Knotenpunkte zurückspringen, sodass eine gerichtete Bewegung erschwert wird. In den Experimenten wurde ein Leistungsspektrum von  $P_{\text{IN}} = 15 - 27\ \text{dBm}$  untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die effektivste Manipulation bei  $P_{\text{IN}} = 18 - 21\ \text{dBm}$  erfolgt. Eine höhere Leistung  $P_{\text{IN}}$  führt nicht zu einer effektiveren Kontrolle der Beads. Im Gegenteil, bedingt durch induzierte Strömungseffekte oder einer inhomogenen Kanalstruktur, führt eine höhere Leistung zu einem erhöhten Verlust der Beads aus dem aktiven Bereich der Hauptkammer in die Zuleitungen. Bei niedrigeren Leistungen ist die Kraftfeldstärke zu gering, um die Objekte schnell bewegen zu können.

In diesem Abschnitt konnten nun detailliert die physikalischen Eigenschaften und die hohe Leistungsfähigkeit der akustischen Pinzette dargelegt werden. Dynamisch in Ort und Zeit können Objekte mit Hilfe der akustischen Falle auf einem SSAW-Chip mikrometergenau positioniert werden. Die hierbei kontrollierbaren Parameter der eingekoppelten Leistung  $P_{\text{IN}}$ , der Frequenz  $f$  und der relativen Phase  $\Delta\Phi$  bestimmen die Kraftfeldstärke, den Knotenabstand und die Position der Knotenpunkte. Durch die Erfüllung der EZPK-Bedingung kann zudem eine individuelle, separate Ausrichtung von Objekten erreicht werden. Abhängig von den Objekteigenschaften wie Objektdurchmesser  $D$ , Kompressibilität  $\kappa$  oder Dichte  $\rho$  kann die auf die Objekte einwirkende akustische Kraft  $F_r$  exakt berechnet werden. Die Ergebnisse belegen, dass die Anwendung der akustische Pinzette bezüglich der Kraftfeldstärke, Homogenität und Kontrollierbarkeit in diesem Fall bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 18 - 21\ \text{dBm}$  am effektivsten ist.

In den nun folgenden Abschnitten wird der Aufbau auf die Kompatibilität für Zellkulturen überprüft und die optimalen SAW-Einstellungen evaluiert. Da der typische Durchmesser von Zellen in Suspension bei ca.  $D = 13 - 15\ \mu\text{m}$  liegt, beträgt die Wellenlänge in den nachfolgenden Experimenten stets  $\lambda_{\text{SAW}} = 50\ \mu\text{m}$ . Um eine effektive SAW-Anregung zu erreichen, wird auf einen *chirped*-IDT verzichtet. Die Kanalhöhe beträgt des weiteren  $h = 36 - 38\ \mu\text{m}$ .

### 4.3.3. Temperaturinduzierte Effekte

Die Anregung und Propagation einer akustischen Oberflächenwelle unterliegt diversen Verlusten, wie der Streuung an Kristalldefekten, Fehlimpedanzen oder Beugungseffekten [162]. Hierbei wird die Gesamtheit der Verlustmechanismen im Rahmen der Frequenzfilter-Technologie als *Insertion Loss* (IL) zusammengefasst. Diese Verluste führen zu einer thermischen Erwärmung des Substrates und der mit dem Substrat in Kontakt stehenden Materialien. Durch die Messung des Vorwärtstransmissionsfaktors  $S_{21}$  mittels eines NWA (ZVL, Rhode & Schwarz GmbH, München, Deutschland) wurde ein IL von  $S_{21} = 8.84$  dB für ein IDT-Paar eines  $50\ \mu\text{m}$ -SSAW-Chips ermittelt. Abzüglich der bidirektionalen Verluste für Sende- und Empfangs-IDT von 6 dB [163] beträgt der maximale Verlust  $S_{\text{korrr}} = 2.84$  dB. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass Verluste, die zu keiner thermischen Erwärmung führen, beispielsweise Reflexionen innerhalb der Leiterplatte und des SSAW-Chips sowie Beugungseffekte der SAW, in  $S_{\text{korrr}}$  mit inbegriffen sind. Diese können jedoch nicht quantitativ ermittelt werden.

Befindet sich zusätzlich ein dünner Flüssigkeitsfilm im Schallpfad der SAW, so erhöht sich, bedingt durch die Zunahme der kinetischen Energie der Flüssigkeit, die Temperatur in der Flüssigkeit als eine Funktion der SAW-Amplitude [164].

Die mit der SAW einhergehende Erwärmung des Nährmediums kann zu einer Überschreitung der Temperatur bezüglich der idealen Kultivierungsbedingungen führen. Temperaturen  $T > 40\ \text{°C}$  können in der Zellkultur zu einer starken Reduzierung der Zellviabilität und -proliferation [165, 166] führen, die Bildung von Heat-Shock-Proteinen anregen [167] und schließlich zur Apoptose und Nekrose führen [168].

Für die Bestimmung der tatsächlichen Erwärmung der Flüssigkeit im mikrofluidischen System als Funktion der eingekoppelten Leistung wird die Temperatur im Folgenden mittels Fluoreszenzmikroskopie durch das thermisch sensitive organische Molekül *Rhodamine B* (RhoB) ermittelt. RhoB findet in der Literatur bereits eine breite Anwendung in der Thermometrie, unter anderem zur Überwachung der thermischen Prägung von Polymerschichten [169], der zeitaufgelösten Messung der Temperaturverteilung durch Belichtung [170] oder zur Bestimmung der Temperatur in mikrofluidischen Systemen [171, 172]. Die Besonderheit des Xanthenfarbstoffes RhoB ist hierbei die lineare Abhängigkeit der Effizienz der Quantenausbeute von der Temperatur [173]. Die Fluoreszenz-Intensität von RhoB nimmt mit steigender Temperatur nahezu linear ab [171]. Bei bekannter relativer Änderung der Intensität kann somit die Temperatur in einem mikrofluidischen System ermittelt werden. Tritt der Farbstoff mit einem Polymer wie PDMS in Kontakt, so wird dieser absorbiert und diffundiert durch das Polymer [172]. Dies führt mit der Zeit zu einer erhöhten absoluten Fluoreszenz-Intensität und somit zu einer scheinbaren Änderung der Temperatur [174].

Die Temperaturbestimmung in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems erfolgt im Rahmen eines standardisierten Zellkulturexperiments. Hierbei befindet sich das mikrofluidische System in dem Mikroskopinkubator mit eingeschaltetem Gas-Inkubationssystem. Über eine Spritzenpumpe wird die Farbstofflösung in den Mikrokanal gespült. Die Stoffmengenkonzentration des in PBS gelösten Farbstoffs RhoB (83689, SA) beträgt  $c = 0.2\ \mu\text{M}$ . Für eine ausreichende Erwärmung der Flüssigkeit vor dem Eintritt in den Mikrokanal verlaufen ca. 20 cm des PTFE-Schlauches im Mikroskopinkubator. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, wird die Exposition der Farbstofflösung mit Umgebungslicht auf ein Minimum reduziert. Für jeden Messpunkt werden fünf Fluoreszenzaufnahmen mit einer Belichtungsdauer von  $t = 200$  ms erstellt. Die Intensität  $I$  eines Messpunktes ermittelt sich aus dem Mittelwert der fünf gemessenen mittleren Grauwerte einer  $650\ \text{px} \times 650\ \text{px}$ -Fläche im Zentrum der Hauptkammer. Da die Anregungs- und Emissionswellenlänge von RhoB mit  $\lambda_{\text{Ex}} = 553$  nm bzw.  $\lambda_{\text{Em}} = 627$  nm (in Methanol) beträgt, wurde das Filterset AlxF1594 (siehe *Kap. B.1.*) verwendet. Nach jeder Messung wird die Farbstofflösung im Mikrokanal durch kurzzeitige Aktivierung der Spritzenpumpe ( $Q = 0.5\ \mu\text{l/s}$ ,  $t = 2$  s) ersetzt. Für die Bestimmung des Intensitäts-Temperaturverhältnisses

$m$  wird die Intensität bei zwei Temperaturen ( $T_1 = 29.4^\circ\text{C}$  und bei  $T_2 = 42.1^\circ\text{C}$ ) bestimmt. Hierbei wurde vor der Messung die Emission des im PDMS absorbierten Farbstoffs durch Photobleaching reduziert. Das ermittelte Verhältnis beträgt hier  $m = \frac{\Delta T}{\Delta I} = 0.0097\text{K}$ .

Für die Bestimmung der leistungsabhängigen Temperatur  $T$  wird die Differenz der Intensität  $I$  in der Hauptkammer für jede Leistung bei ausgeschalteter SAW und zwei Minuten nach Aktivierung der SAW ermittelt. Durch die relative Betrachtung der Intensität können Artefakte, bedingt durch die Farbstoffabsorption in das PDMS, vermieden werden. Nach der Vermessung eines Leistungspegels kühlt das System über fünf Minuten ab. In *Abb. 4.12. a)* ist die leistungsabhängige Erwärmung in der mikrofluidischen Hauptkammer bei unterschiedlichen Leistungen und SAW-Einstellungen dargestellt. Hierbei wurde die Erwärmung in einem zweidimensionalen Stehwellenfeld bei konstanter Leistung (2D, PWM<sup>4</sup> =  $2 \times 50\%$ )<sup>5</sup> und in einem eindimensionalen Stehwellenfeld mit gepulstem Signal und daher reduzierter Aktivierungsdauer (1D, PWM =  $1 \times 30\%$ ) untersucht. Da das gepulste Signal im 1D-Fall zu hohen Fluktuationen in der gemessenen Intensität einer aufgenommenen Bilderserie führt, wird bei der Betrachtung der Intensität nur der minimale Wert der Serie berücksichtigt. Wie in der Grafik zu erkennen ist, wird bei einer konstanten Anregung bereits bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 15\text{dBm}$  die physiologische, afebrile Temperaturschwankung ( $\pm 1\text{K}$ ) mit  $\Delta T = 2.6\text{K}$  überschritten. Bereits bei  $P_{\text{IN}} = 18\text{dBm}$  ist mit  $\Delta T = 4.7\text{K}$  eine Schädigung der Zellkultur bei langanhaltender Aktivierung der SAW zu rechnen, da die Temperatur von  $T = 40^\circ\text{C}$  überschritten wird. Bezüglich des gepulsten SAW-Signals ist eine Reduzierung des durchschnittlichen Wärmeeintrags um bis zu  $60\%$  erkennbar, jedoch ist hier mit einer Beeinträchtigung der Effektivität der akustischen Pinzette zu rechnen.

Um die zeitliche Dynamik der Temperaturentwicklung zu bestimmen, wurde in einer Langzeitaufnahme die Entwicklung der Intensität nach dem Einschalten eines gepulsten eindimensionalen SAW-Signals beobachtet. Hierbei wurde erneut eine PWM von  $30\%$  und eine Leistung von  $P_{\text{IN}} = 30\text{dBm}$  eingestellt. Um den Effekt des Photobleachings zu korrigieren, wurde im Vorfeld die Bleichkonstante von RhoB bestimmt. Der Intensitätsabfall des Bleichprozesses folgt dem Zusammenhang gemäß *Gl. 4.7*:

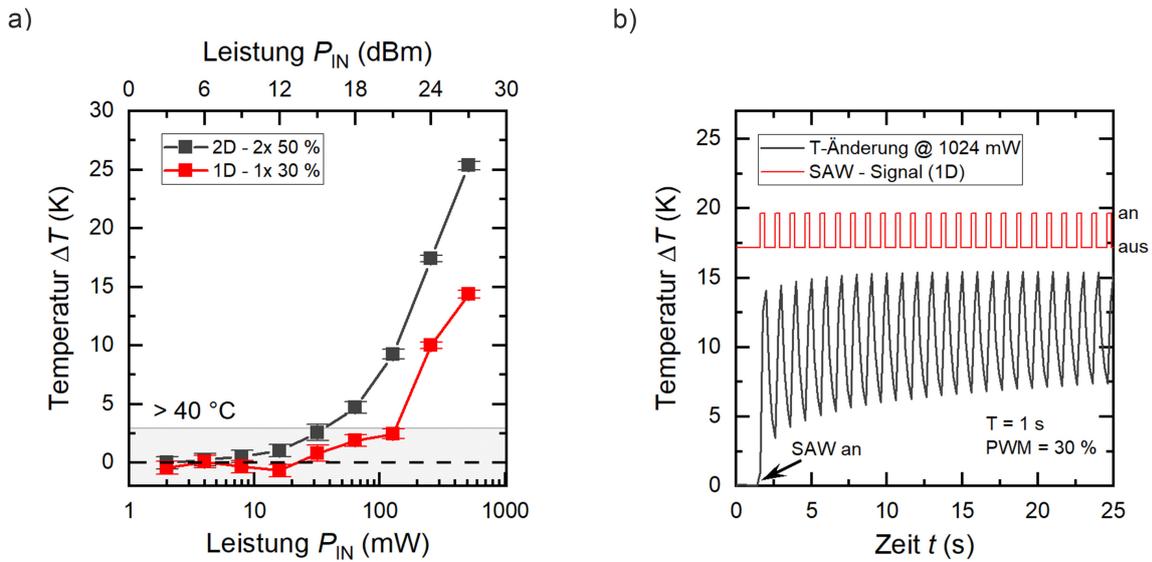
$$I(t) = I_0 e^{-t/b} \quad (4.7)$$

wobei  $b$  die Bleichkonstante ist und in diesem Fall  $b = 271.1\text{s} \pm 2.9\text{s}$  beträgt. *Abb. 4.12. b)* zeigt den Verlauf der Temperatur nach dem Einschalten des SAW-Signals. Die Temperatur steigt nahezu instantan an und erreicht bereits nach zehn Sekunden ihren maximalen Sättigungswert von  $\Delta T = 15.3\text{K}$  in dem beobachteten Zeitabschnitt. In den Zeitbereichen der deaktivierten SAW fällt die Temperatur zudem rasant ab. Bei der Betrachtung des jeweiligen Minimalwertes in einer Periode ist eine stetige Erhöhung erkennbar. Die starken Temperaturschwankungen, abhängig vom Aktivierungszustand der SAW, lassen auf den Zusammenhang der Temperatur und der kinetischen Energie der Moleküle schließen. Durch die *Leaky*-SAW wird die kinetische Energie erhöht, was zu einer Erwärmung der Flüssigkeit führt. Dieser Effekt und weitere Verlustmechanismen führen zusätzlich zu einer konstanten Erwärmung des gesamten Aufbaus, erkennbar an der Zunahme des Minimalwertes.

Auf Basis dieser Erkenntnisse ist daher eine kurzzeitige Aktorik mit einer maximalen Leistung von  $P_{\text{IN}} = 18\text{dBm}$  möglich. Für Langzeitstimulationen durch akustische Kraftfelder muss der Energieeintrag durch gepulste Signale reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Reduzierung der Temperatur des Mikroskopinkubators auf  $T = 35 - 36^\circ\text{C}$ . Bei dieser Temperatur ist sowohl für die Referenzproben als auch für die SAW-stimulierten Proben ein angemessenes Temperaturspektrum bis zu einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 18\text{dBm}$  gewährleistet.

<sup>4</sup>PWM: Pulsweitenmodulation

<sup>5</sup>Alternierende Aktivierung der IDT-Paare wie in *Kap. 4.2.3.* beschrieben

**Abbildung 4.12:**

Temperaturbestimmung mittels RhoB. a) Leistungsabhängige Erwärmung in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems bei einer aktivierten SAW. Beträgt die Temperaturerhöhung mehr als  $\Delta T > 3\text{ K}$ , so kann eine Schädigung der Zellkultur hervorgerufen werden. Die mittlere Temperaturerhöhung wird durch die Verwendung eines gepulsten Signals deutlich reduziert. b) Temperaturänderung bei einem gepulsten Signal ( $P_{IN} = 30\text{ dBm}$ ,  $f = 1\text{ Hz}$ , PWM = 30 %). Nahezu instantane Temperaturerhöhung bedingt durch die Aktivierung der SAW.

## 4.4. Aktorik und Beeinflussung von Zellen durch akustische Oberflächenwellen

---

*Mittels akustischer Oberflächenwellen können einzelne Zellen räumlich und zeitlich kontrolliert auf der Chipoberfläche ausgerichtet und zur Adhäsion gebracht werden. Das Wachstumsverhalten wird durch die SSAW beeinflusst. Mit steigender Leistung nimmt die Proliferation ab und nach dem Erreichen eines Schwellwertes nimmt die Apoptoserate rapide zu. Die Auswuchsrichtung neuronaler Fortsätze kann durch ein konstantes Stehwellenfeld erfolgreich manipuliert werden. Durch die Kombinierbarkeit mit 3D-bildenden Strukturen können zudem einfach physiologische Randbedingungen geschaffen werden.*

---

Im vorangegangenen Kapitel wurde erfolgreich die Entwicklung und Charakterisierung eines experimentellen Aufbaus demonstriert, mit dessen Hilfe ein in Raum und Zeit variables Kraftfeld erzeugt werden kann. Mittels eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes können Objekte vereinzelt, dynamisch manipuliert und positioniert werden. Durch die Überprüfung der leistungsabhängigen Temperaturentwicklung und der aktiven Durchmischung der Flüssigkeit in der Hauptkammer können ideale Kultivierungsbedingungen auch bei aktivierter SAW sichergestellt werden.

Mit dem Ziel der Generierung eines reproduzierbaren, künstlichen und wohldefinierten neuronalen Netzwerkes werden nun mit Hilfe dieses Werkzeugs lebende Zellen auf einem SSAW-Chip mikrometergenau positioniert und zur Adhäsion gebracht. Nach der Verifizierung der Langzeitkultivierung im mikrofluidischen System soll durch Variation der Kraftfeldstärke und -form eine Beeinflussung der Zellen erreicht werden. Hierbei wird unter anderem ermittelt, inwiefern die akustische Oberflächenwelle einen Einfluss auf Zellmechanismen wie Proliferation oder Migration besitzt und die maximal anwendbare Leistung  $P_{\text{N}}$  bestimmt. Durch die Potentiallandschaft des Kraftfeldes soll schließlich die Wachstumsrichtung der neuronalen Fortsätze primärer Neuronen kontrolliert werden. Für die Machbarkeitsstudien und die Untersuchungen morphologischer Veränderungen durch die akustische Oberflächenwelle wird im Folgenden hauptsächlich die Zelllinie der Neuroblastomzellen *B35* verwendet. Der experimentelle Aufbau besteht im Regelfall aus einem  $50\ \mu\text{m}$ -SSAW-Chip und einer PDMS-Kammer mit einer Höhe von  $h = 36\ \mu\text{m}$ . Die Versuchsdurchführung der nachfolgenden Experimente erfolgt, sofern nicht anderweitig erwähnt, nach dem in *Kap. 4.2.4.* beschriebenen Protokoll.

### 4.4.1. Differenzierung neuronaler Stammzellen

Für die Schaffung eines neuronalen Netzwerkes auf einem Chip werden in der Regel primäre Neuronen benötigt. Diese werden durch direkte Dissektion aus einem tierischem Spenderorgan gewonnen. Neben der hohen Verunreinigung durch Bestandteile des zerebralen Stützgewebes wie Gliazellen oder extrazellulärer Matrix erfordern Primärkulturen einen hohen finanziellen, organisatorischen und personellen Aufwand und unterliegen zudem ethischen Bedenken.

Vor dem Hintergrund, eine robuste, ergiebige und leicht zu kultivierende Neuronenquelle zu etablieren, bieten gliafreie Zelllinien neuronaler Krebszellen einen potentiellen Lösungsansatz. Extrahiert aus einem neoplastischen Tumorgewebe, wachsen diese immortalisierten Zellen relativ einfach in der Kultur und stellen einen unbegrenzten Vorrat an Zellen mit einer minimalen Variabilität der Kultur zur Verfügung. Eigenschaften neuronaler Zellen wie z. B. Neuritenwachstum oder Enzymexpression können somit ohne die Notwendigkeit von Spenderorganen untersucht werden. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um entartete Zellen handelt und signifikante Unterschiede in den physiologischen Eigenschaften im Vergleich zu primären Neuronen auftreten können [175].

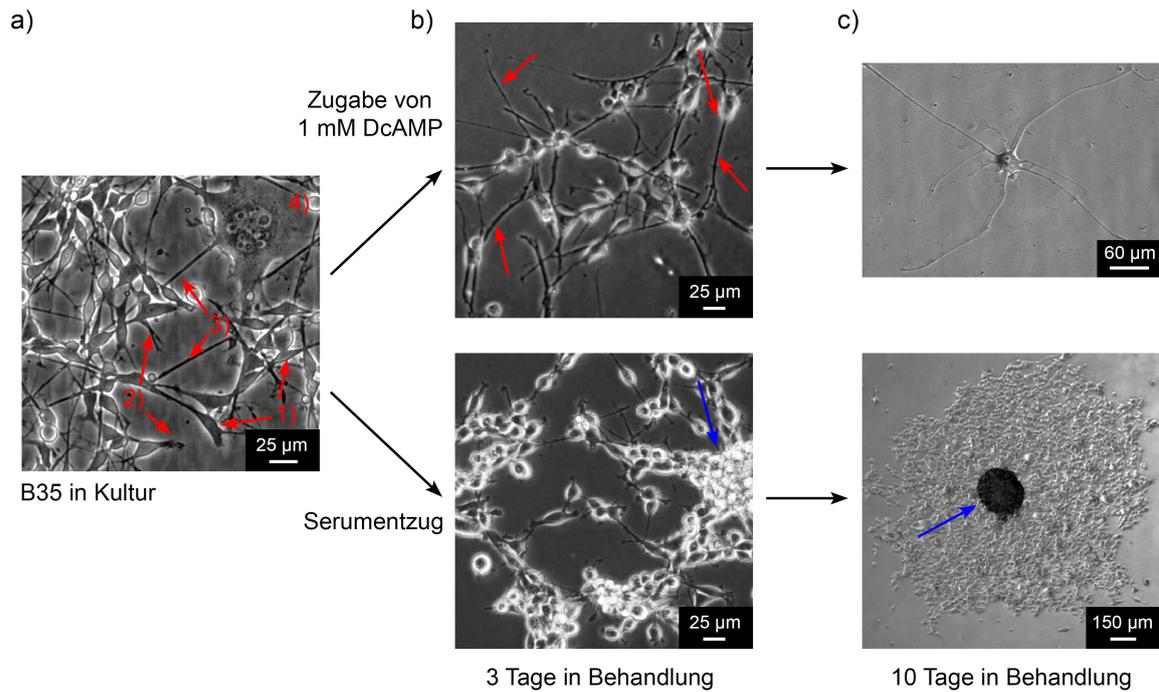
Eine derartige neuronale Zelllinie sind die *Neuroblastom B35*-Zellen. Wie in *Kap. 2.1.5.* beschrieben, weist diese Zelllinie im unbehandelten Zustand einen rundlichen Zellkörper (Perikaryon) und kurze Fortsätze auf. Durch die Zugabe von zyklischem Dibutyryl Adenosin-3,5-Monophosphat (DcAMP) oder durch die Kultivierung in Nährmedien mit niedrigem Serumgehalt wird eine reversible Ausdiffe-

renzierung der Zellen angestoßen. Während der hierbei stattfindenden morphologischen Änderung der Zellform liegt unter anderem ein ausgeprägtes Neuriten-Wachstum vor. Aufgrund der Kontrollierbarkeit dieser Eigenschaft eignet sich diese Zelllinie hervorragend für die morphologische Untersuchung SAW-manipulierter Zellkulturen.

Für die Etablierung dieser Zelllinie als permanente Neuronenquelle wird im Folgenden die Handhabung und Ausdifferenzierung der B35-Zelllinie betrachtet. Die B35-Zelllinie (CRL-2754) wurde von ATCC (American Type Culture Collection, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) erworben und nach den Herstellerempfehlungen kultiviert. Eine exakte Beschreibung der Kultivierung kann dem *Kap. D.2.* entnommen werden. Für die Untersuchung des Differenzierungsprozesses wurde das Zellwachstum und die Entwicklung der Zellmorphologie in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen in Zusammenarbeit mit *Sebastian Angermann* untersucht. Hierbei soll die Ausdifferenzierung sowohl durch die stufenweise Erhöhung der DcAMP-Konzentration (0.5-5 mM) als auch durch die Kultivierung in serumfreiem Nährmedium initiiert werden.

Nach der Passagierung wurden 10  $\mu$ l einer B35-Zellsuspension (ca. 10 000 Zellen) in jeweils einem Well einer 2  $\times$  2 Wellplatte (D6789-1CS, Nunclon Delta Surface Wellplate, SA) ausgesät. Die Suspension wurde anschließend mit DcAMP-versetztem Vollmedium bzw. mit serumfreiem Nährmedium verdünnt. Das Zellwachstum wurde jeden Tag durch ein Mikroskop observiert (4x- und 10x-Objektiv, Olympus CKX41) und Phasenkontrastaufnahmen erstellt. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage ersetzt. In *Abb. 4.13.* ist die Zellkultur zur Bestimmung der Zellmorphologie bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen abgebildet. In der unbehandelten Kultur in *Abb. 4.13. a)* entspricht die Morphologie der Zellkultur annähernd der in der Literatur [47]. Die Zellkörper (1)) weisen eine rundliche bis ovale Form auf und besitzen meist kurze Fortsätze (< 20  $\mu$ m, 2)). Allerdings liegen auch deutlich längere Fortsätze mit einer Länge > 50  $\mu$ m vor (3)). Da es sich um entartete Tumorzellen handelt, treten gelegentlich durch Verschmelzung von Einzelzellen (Synzytium) oder durch Endomitose mehrkernige bzw. polyploide Riesenzellen auf (4)).

Durch die Zugabe von DcAMP bzw. durch den Entzug des Serums treten markante morphologische Veränderungen auf. Ab einer DcAMP-Konzentration von 1-2.5 mM war das Einsetzen einer signifikanten Ausbildung neuronaler Fortsätze innerhalb eines Tages ersichtlich (rote Pfeile in *Abb. 4.13. b)*). Diese wuchsen stetig und erreichten, wie in *Abb. 4.13. c)* abgebildet, eine Länge von mehreren hundert Mikrometern. Eine weitere Erhöhung der DcAMP-Konzentration auf 5 mM führte zu keiner stärkeren Ausbildung der neuronalen Fortsätze. Eine auffällige Apoptose der Zellkultur wurde bei der DcAMP-Behandlung nicht beobachtet. Im Gegensatz zur Zugabe von DcAMP war durch den Serumentzug keine Ausdifferenzierung der Zellkultur ersichtlich. Wie in (*Abb. 4.13. b)* zu erkennen ist, liegen nur kurze Fortsätze vor, und die Zellen beginnen zu agglomerieren (blauer Pfeil). Die Agglomeration nimmt mit fortschreitender Zeit zu, bis schließlich ein dominanter Zellklumpen (blauer Pfeil) nach zehntägiger Kultivierung zu erkennen ist. Vermutlich aufgrund der fehlenden Wachstumsfaktoren kommt es zu der beobachteten Agglomeration und zudem zu einer erhöhten Apoptose der Zellkultur. Die kontrollierte Manipulation einzelner Zellen in den nachfolgenden Experimenten erfordert es, den Verlust einzelner Zellen durch Apoptose bzw. Nekrose auf ein Minimum zu reduzieren. Da durch die Verwendung von 1-2 mM DcAMP eine deutliche Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen ohne einsetzende Apoptose angestoßen werden kann, wird diese Methode nachfolgend präferiert angewendet. Die Ausdifferenzierung muss zudem nach erfolgter Aussaat und Positionierung der Zellen im experimentellen Aufbau erfolgen, da eine Passagierung bereits ausdifferenzierter B35-Zellen zu einer Beschädigung der Zellkultur führt.



**Abbildung 4.13:**

Vordifferenzierte B35-Neuroblastomzellen in Kultur und Induktion der Ausdifferenzierung zu neuronalen Zellen durch Zugabe von DcAMP oder durch Entzug des Serums. a) Kultivierte vordifferenzierte B35-Zellen weisen ein ovals, lose anhaftendes Soma (1)) und zumeist kurze Fortsätze (2)) auf. Gelegentlich liegen längere Fortsätze vor ( $> 50 \mu\text{m}$ , 3)). Aufgrund der entarteten Natur des Neuroblastoms existieren Zellen mit mehreren Zellkernen (4)). b)/c) Während durch die Zugabe von DcAMP eine deutliche Ausdifferenzierung mit der Bildung langer neuronaler Fortsätze ( $> 250 \mu\text{m}$ ) erreicht wird, ist keine morphologische Änderung bei Serumentzug ersichtlich. Jedoch agglomerieren die B35-Zellen mit der Zeit zu einem Zellhaufen (blaue Pfeile).

#### 4.4.2. Strukturierte Zelladhäsion mit Langzeitkultivierung

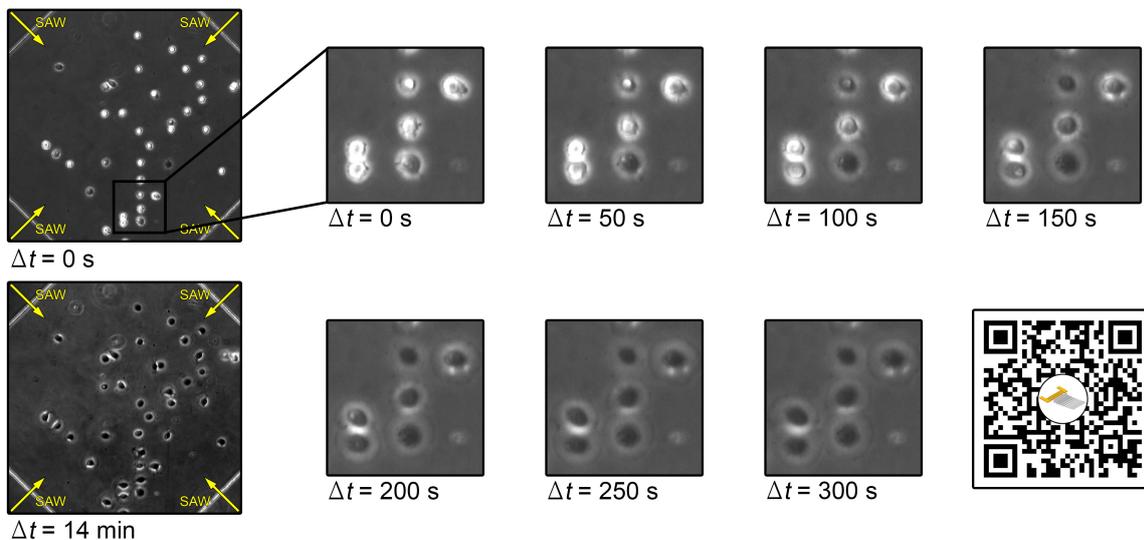
Nach der erfolgreichen Kultivierung und Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen B35 in einer standardisierten Zellkultur sollen nun die gewonnenen Erkenntnisse auf die Zellkultivierung in einem mikrofluidischen System übertragen werden. Hierbei wird die Biokompatibilität des Bioreaktors und die Anwendbarkeit der akustischen Oberflächenwelle auf zelluläre Strukturen überprüft.

##### Zellpositionierung und -adhäsion

Nach der Vorbereitung der Zellsuspension und dem Befüllen des PTFE-Schlauches werden die Zellen in den mikrofluidischen Kanal überführt. Bei einem Volumenstrom von  $Q = 0.0005 \mu\text{l/s}$  strömen die Zellen vereinzelt in die Hauptkammer der Mikrokanalstruktur. Durch die Aktivierung eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes werden die Zellkörper größtenteils in den Knotenpunkten des Kraftfeldes lokalisiert und verweilen dort. Ein Leistungspegel von  $P_{\text{IN}} = 15 - 18 \text{ dBm}$  ist hierbei für die Positionierung ausreichend. Ist die Oberfläche nicht mit PLL beschichtet, so können die Zellkörper durch Phasenverschiebung neu positioniert werden. Durch die fehlende elektrostatische Wechselwirkung ist jedoch die Zelladhäsion mit der Substratoberfläche stark vermindert. Eine ausreichende Haftung der Zellen an der Substratoberfläche bildet sich erst nach Minuten aus, sodass durch eine vorzeitige Deaktivierung des Kraftfeldes die Zellkörper durch die nicht vermeidbare Strömung weggeschwemmt werden. Dies kann durch eine PLL-Beschichtung verhindert werden. Sobald die Zellkörper durch das Kraftfeld positioniert werden, ist eine ausreichende Haftung mit der Substratoberfläche gewährleistet. Dies verhindert jedoch eine nachträgliche Neupositionierung durch eine Phasenverschiebung. Durch die

Reduktion der PLL-Konzentration konnte kein Zustand festgestellt werden, bei der trotz bestehender Manipulierbarkeit durch Phasenverschiebung auch eine ausreichende Zelladhäsion vermittelt werden konnte. Durch die gleichmäßige Verteilung der Zellkörper im laminaren Fluss (siehe *Abb. 4.2.*) kann dennoch durch eine Aktivierung des Kraftfeldes zur exakten Zeit eine gleichmäßige Strukturierung erreicht werden.

Nach der Positionierung der Zellkörper beginnen diese aktiv auf der Substratoberfläche zu spreiten und zu wachsen. In *Abb. 4.14.* ist die Adhäsion und Spreitung von B35-Zellen bei einer aktivierten SAW mit  $P_{IN} = 18 \text{ dBm}$  auf der Substratoberfläche im experimentellen Aufbau zu bestimmten Zeitpunkten dargestellt. *Guo et al.* beschreiben, dass eine Zelladhäsion nur bei deaktivierter SAW stattfinden kann, da eine Sedimentierung durch das Kraftfeld verhindert wird [152]. Im Gegensatz zu dieser Darstellung findet hier auch bei aktivierter SAW eine deutliche Zelladhäsion statt. So kann nach erfolgter Positionierung der Zellkörper, unabhängig vom Vorliegen einer PLL-Beschichtung, durch ein aktives Kraftfeld die Wahrung der Zellposition bis zur Adhäsion sichergestellt werden.



**Abbildung 4.14:** Zelladhäsion von B35 auf einer PLL-beschichteten Substratoberfläche in einem zweidimensionalen Stehwellenfeld. Die angelegte Leistung beträgt  $P_{IN} = 18 \text{ dBm}$ . Innerhalb von Minuten adhären die Zellen trotz aktiver SAW. Deutlich zu erkennen ist der Übergang von der kugelförmigen zur gespreiteten, abgeflachten Zellform während des Adhäsionsvorgangs. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/30rgD0rAp0E>

### Wachstum und Ausdifferenzierung neuronaler Stammzellen im mikrofluidischen Kanal

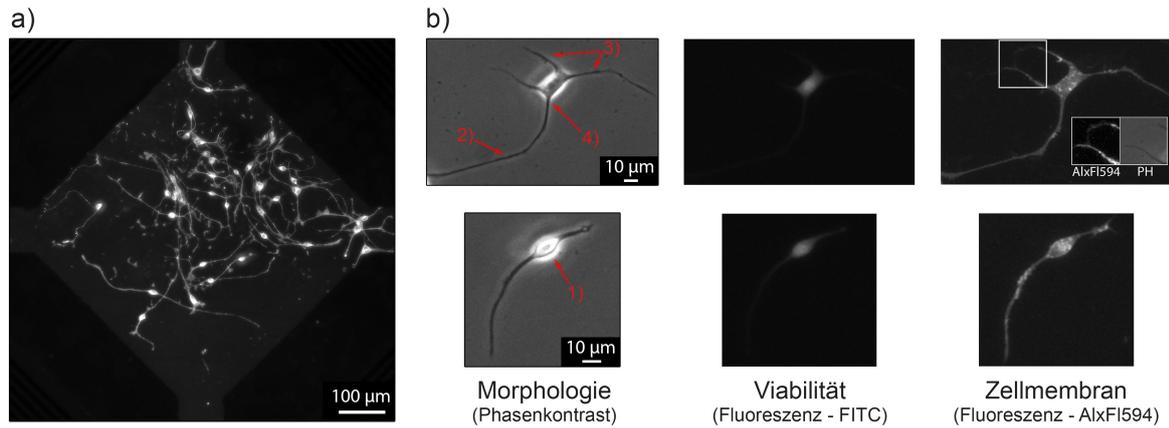
Nach der erfolgreichen Positionierung und Adhäsion der B35-Zellen auf der Substratoberfläche des SSAW-Chips wurde das Wachstum der Zellkultur in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems bei deaktivierter SAW untersucht. Während der Sicherstellung idealer Kultivierungsbedingungen wurden alle fünf Minuten Mikroskopieaufnahmen der Zellkultur erstellt. Unmittelbar nach der Spreitung liegt ein reguläres Wachstumsverhalten der Zellen vor, welches sich durch Wachstum und Proliferation der Zellkultur äußert. Im vordifferenzierten Zustand weist das Zellsoma erneut eine rundliche bis ellipsoide Form auf und besitzt zwei verkürzte neuronale Fortsätze, deren Längen in der Regel  $20\text{--}30 \mu\text{m}$  nicht überschreiten. Durch den Austausch des Nährmediums im Reservoir des experimentellen Aufbaus durch eine  $2 \text{ mM}$ -DcAMP-Lösung wird eine Ausdifferenzierung der Zellkultur innerhalb des Mikrokanals erreicht. Hierbei wurde im Mikrokanal ein zum Bulk (siehe *Kap. 4.4.1.*) identischer Differenzierungsprozess beobachtet. Während der morphologischen Veränderung der Zellkultur liegt

eine Elongation und Ausbildung von Neuriten und Dendriten vor. Die Länge der neuronalen Fortsätze nimmt hierbei stark zu und im Perikaryon beginnt sich ein Axonhügel auszubilden. Eine zeitliche Beschränkung der Zellkultur-Fähigkeit konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht festgestellt werden. Durch die Verwendung eines Reservoirs konnte eine Evaporation der Flüssigkeit im mikrofluidischen System verhindert und eine konstante Nährstoffversorgung der Zellen sichergestellt werden. Die Zellkultur konnte somit über mehrere Tage bis Wochen erfolgreich im Mikrokanal kultiviert werden, ohne eine offensichtliche Schädigung der Kultur festzustellen.

Für eine qualitative Überprüfung der Zellviabilität und der Existenz neuronaler Fortsätze wurde die Zellkultur mit Hilfe des *Neurite Outgrowth Staining Kits* (A15001, TF) untersucht. Das Kit färbt selektiv die Oberfläche einer Zellmembran ein und dient als Zellviabilität-Indikator. Somit kann zum einen die Existenz neuronaler Strukturen dargestellt und zum anderen zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Die Proben wurden nach dem Herstellerprotokoll eingefärbt [176]. Da der Färbeprozess mehrere Färb- und Waschschriffe erfordert, wurde die Zellkultur durch das Entfernen des PDMS-Mikrokanals freigelegt. Nach der Durchführung des Färbeprotokolls wurde die Zellkultur auf dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 20x-Objektiv untersucht. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge des Zellviabilität-Indikators beträgt  $\lambda_{\text{Ex}} = 495 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{\text{Em}} = 515 \text{ nm}$  und die des Membranfarbstoffs  $\lambda_{\text{Ex}} = 555 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{\text{Em}} = 565 \text{ nm}$ . Hierbei wurden die entsprechenden Filter FITC und AlxF1594 (siehe *Kap. B.1.*) verwendet. *Abb. 4.15. a)* zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der zellulären Membran ausdifferenzierter B35-Zellen in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems zum Zeitpunkt  $t = 67 \text{ h}$  nach der Aussaat. Deutlich sichtbar sind die Zellkörper und die neuronalen Fortsätze. Die durch Pfeile markierten Fortsätze erreichen im ausdifferenzierten Zustand eine Länge von mehreren hundert Mikrometern. *Abb. 4.15. b)* zeigt eine Vergrößerung ausgewählter B35-Zellen in den verschiedenen Mikroskopiekanälen. In der Phasenkontrastaufnahme ist die Morphologie der Zellen deutlich erkennbar. Typisch für die B35-Zellkultur können unterschiedliche Zellformen auftreten. Während die Perikaryonen (1)) stets eine rundliche bis ellipsoide Form aufweisen, liegt eine unterschiedliche Anzahl an neuronalen Fortsätzen vor (2), 3)). Durch die deutlich längere Elongation ( $> 10 \mu\text{m}$ ) gegenüber den anderen neuronalen Fortsätzen sowie das Fehlen einer Verzweigung handelt es sich bei 2) vermutlich um ein Axon und bei 3) um entsprechende Dendriten [177]. Für eine zweifelsfreie Differenzierung kann eine Strukturprotein-abhängige Färbung durchgeführt werden. So ist beispielsweise das Protein MAP-2 (microtubuli-associated protein Typ 2) nur in Dendriten lokalisiert [178], während GAP-43 (growth associated protein) spezifisch für Axone ist [179]. Die Unterscheidung der Fortsätze nimmt im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur eine untergeordnete Rolle ein, weshalb auf die Färbung verzichtet wurde. Das in den Somata der Zellen lokalisierte Fluoreszenzsignal im FITC-Kanal weist auf eine reguläre Zellaktivität lebender Zellen hin. Somit findet auch in dem Mikrokanal ein regulärer Zellmetabolismus statt. Durch die selektive Färbung der Zellmembran können im AlxF1594-Kanal selbst feinste Strukturen sichtbar gemacht werden (siehe Einschub).

Diese Daten bestätigen nun die hohe Biokompatibilität des experimentellen Aufbaus, die Sicherstellung einer ausreichenden Nährstoffversorgung im mikrofluidischen Kanal sowie die Verwendbarkeit der B35-Zellen als Modellzelle für neuronale Strukturen. Im Folgenden soll nun untersucht werden, welche Einflüsse das akustische Stehwellenfeld auf zelluläre Prozesse ausübt und ob die Morphologie beeinflusst werden kann.



**Abbildung 4.15:**

Ausdifferenzierte neuronale Stammzellen in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems bei deaktivierter SAW. a) Fluoreszenzaufnahme der eingefärbten Zellmembran ausdifferenzierter B35-Zellen  $t = 67$  h nach der Aussaat. b) Ausgewählte neuronale Zellen in verschiedenen Kanälen. Phasenkontrastaufnahme zur Überprüfung der Morphologie. Fluoreszenzaufnahme im FITC-Kanal zur Messung der Zellviabilität und im AlxFl594-Kanal zur Darstellung der Zellmembran.

#### 4.4.3. Bestimmung des anwendbaren Leistungsbereichs

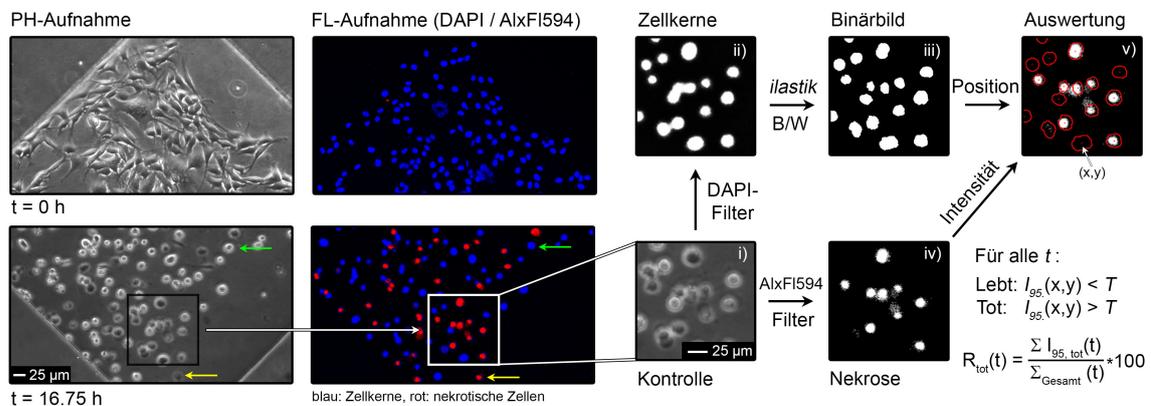
Die Manipulation der Zellkultur durch akustische Oberflächenwellen führt zu einer Abweichung der idealen Kultivierungsbedingungen bei einer exzessiven Leistungsintensität. Induzierte Druckgradienten, Scherkräfte und Temperaturschwankungen können zu einer Schädigung der Zellkultur führen. Wie bereits in Kap. 4.3.3. gezeigt wurde, führt eine Leistung von  $P_{IN} = 18$  dBm bei einer konstanten SSAW zu einer Überschreitung der idealen Kultivierungstemperatur auf  $T = 40$  °C. Da nachfolgend durch Stehwellenfelder auf das Wachstumsverhalten von Zellen Einfluss genommen werden soll, ist es notwendig die zelluläre Belastung durch die SAW-Manipulation zu erfassen, um somit die Leistungsgrenzen der akustischen Oberflächenwelle zu ermitteln. Dies gelingt durch Messung der Apoptose bzw. der sekundären Nekrose von B35-Zellen in einem eindimensionalen Stehwellenfeld bei einer stufenweisen Erhöhung der eingekoppelten Leistung  $P_{IN}$ . Da eine deutliche Verringerung der Temperaturerhöhung bei einem gepulsten HF-Signal festgestellt wurde, wird neben einem konstanten SAW-Signal auch der Einfluss einer gepulsten SAW untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden in Kooperation mit *Sophie Mauritz* erarbeitet.

Sind die durch äußere Einflüsse hervorgerufenen Beschädigungen irreparabel, so durchläuft die Zelle, sofern möglich, den Prozess der Apoptose. Dieser durch Signalkaskaden aktiv gesteuerte Prozess des Zelltodes führt unter anderem zur Aktivierung der Proteasen Caspase-3/7 [180], deren Enzymaktivitäten durch das Reagenz *Molecular Probes™ CelleEvent™ Caspase-3/7 Green ReadyProbes™* (Caspase-3/7) (R37111, TF) detektiert werden können. Da apoptotische Zellen in der Kultur nicht durch Phagozytose entfernt werden, kommt es nach der Apoptose zur sekundären Nekrose und somit zum Kollaps der Zellmembran. An die hierbei exponierte DNA bindet der membranundurchlässige DNA-selektive Farbstoff *Probidiumiodid Ready Probes™* (PI) (R37108, TF) und markiert somit zuverlässig nekrotische Zellen. Für die Erfassung aller in der Zellkultur befindlichen Zellen werden die Zellkerne durch den erneut DNA-selektiven allerdings membranpermeablen Farbstoff *Hoechst 33342* (Hoechst) (H1399, TF) angefärbt.

Für die Durchführung des Experimentes werden die Zellen nach der Positionierung im mikrofluidischen Kanal eingehend für 24 h im Brutschrank ohne aktive SSAW inkubiert, um ein reguläres Zellwachstum bei idealen Kultivierungsbedingungen zu erreichen. Nach der Inkubation werden in das Nährmedium im Reservoir die Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion der Apoptose (Caspase-3/7), Nekrose (PI) sowie zur Detektion aller Zellkerne (Hoechst) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben hinzugegeben

und für eine weitere Stunde inkubiert. Vier Proben werden in den Mikroskopinkubator überführt und mit den Frequenzgeneratoren verbunden. Drei Proben werden mit einer eindimensionalen SSAW behandelt, während die vierte Probe als externe Referenz dient. Die SSAW-behandelten Proben unterscheiden sich in der Pulsweitenmodulation (PWM) des HF-Signals, welches auf 100 %, 50 % und 30 % eingestellt wird. Nach der Aktivierung des HF-Signals wird das Zellwachstum alle fünf Minuten im Phasenkontrastverfahren und in den Fluoreszenzkanälen DAPI (alle Zellkerne, Hoechst), FITC (Apoptose, Caspase-3/7) und AlxF1594 (Nekrose, PI) über einen Zeitbereich von 15-20 h erfasst. Die Auswertung der aufgenommenen Mikroskopieaufnahmen erfolgt anschließend durch das Skript *Intensity-Plotter*. Proben, die bereits vor Beginn des Experiments apoptotisch waren oder deren Zelldichte zu gering war, sind von der Auswertung ausgeschlossen worden. Zwingend notwendig war jedoch die Verwendbarkeit der externen, unbehandelten Referenz.

Das Skript wurde in *MATLAB R2019b* (MathWorks®, Natick, MA, USA) erstellt und gibt einen Intensitätswert der zu erfassenden Messgröße für jede in der Zellkultur detektierte Zelle in einem Textdokument aus. Die hierfür notwendigen einzelnen Auswerteschritte werden nun erläutert. Zur Veranschaulichung des Auswerteprozesses ist eine B35-Zellkultur unter Einwirkung einer SSAW bei  $P_{IN} = 9$  dBm zu verschiedenen Zeitpunkten in *Abb. 4.16*. abgebildet. Hierbei werden die einzelnen Auswerteschritte am Beispiel der Nekrose (Farbstoff: PI, AlxF1594-Kanal) erläutert.



**Abbildung 4.16:**

PH- und FL-Aufnahme einer B35-Zellkultur in einem mikrofluidischen System zu verschiedenen Zeitpunkten bei  $P_{IN} = 9$  dBm zur Erfassung der Nekrose. Zu Beginn liegt bei  $t = 0$  h eine hohe Viabilität vor, nach  $t = 16.75$  h eine ausgeprägte Nekrose der Zellkultur vor. Die Gesamtheit der Zellkerne ist blau und die nekrotischen Zellen rot dargestellt. Die mit einem grünen Pfeil markierte Zelle durchläuft bereits die Apoptose, deren Zellmembran ist jedoch noch nicht wie bei der gelb markierten Zelle lysiert. Die Auswertung einer durch Fluoreszenzmikroskopie erfassten Messgröße je Zelle erfolgt durch das MATLAB-Skript *Intensity-Plotter*. Nach einer optischen Kontrolle (i) werden die im DAPI-Kanal erfassten Zellkerne (ii) durch die Software *ilastik* binarisiert (iii) und anschließend durch eine Objekterkennung die Messbereiche festgelegt. Liegt die in einem weiteren Fluoreszenz-Kanal (FITC bzw. AlxF1594) erfasste Messgröße (iv) über einem festgelegten Grenzwert  $T$ , gilt die Zelle als apoptotisch bzw. nekrotisch. Für jeden erfassten Zeitschritt  $t$  wird das Verhältnis apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen  $R_{tot}$  ermittelt.

In den gezeigten Phasenkontrastaufnahmen liegt bei  $t = 0$  h eine hohe Zellviabilität vor, welche mit der fortschreitenden Experimentdauer abnimmt und in eine ausgeprägte Apoptose bzw. Nekrose resultiert. Die parallel aufgenommenen FL-Aufnahmen verdeutlichen hierbei die einsetzende Nekrose.

Das auf diese Aufnahmen angewendete Skript *Intensity-Plotter* ermittelt im Prinzip anhand einer binarisierten Aufnahme mit den Positionsinformationen der Zellen (DAPI) die Intensitätswerte für jede Zelle in einer Graustufen-Aufnahme (FITC/AlxF1594) der zu erfassenden Messgröße. Eingehend wird nach einer optischen Kontrolle der Zellkultur (i) in der PH-Aufnahme die im DAPI-Kanal erstellte Fluoreszenzaufnahme (FL) (ii) binarisiert, um die Positionsinformationen aller in der Zellkultur befindlichen Zellkerne zu ermitteln (iii). Die Binarisierung der Aufnahme erfolgt entweder durch einen

Grenzwertfilter im MATLAB-Skript oder durch die zusätzliche Software *ilastik*. Durch das interaktive, auf maschinelles Lernen basierende Programm *ilastik* kann durch eine manuelle Annotation der Zellkerne eine schnelle und adaptive Bildsegmentierung der Graustufen-Aufnahmen bei gleichbleibend hoher Qualität erreicht werden [181]. Anschließend wird die Fläche der Zellkerne im Binärbild korrigiert, ggf. vergrößert und zusammenhängende Zellklumpen werden über die *watershed*-Funktion getrennt. Die einzelnen Objekte werden automatisch detektiert und die Objekt-assoziierten Pixelkoordinaten erfasst. Die Positionsinformationen werden im nächsten Schritt auf die Graustufenaufnahme der in einem weiteren FL-Kanal (FITC bzw. AlxFl594) erfassten Messgröße (*iv*) übertragen, um die Intensitätswerte  $I$  an den Objekt-assoziierten Pixelkoordinaten zu ermitteln (*v*). Da das Signal einer nekrotischen Zelle stark im Zellkern lokalisiert sein kann und nicht zwangsweise dieselbe Flächenausdehnung wie der Nukleus im DAPI-Kanal besitzt, wird für jedes detektierte Objekt das 95. Perzentil der Intensität  $I_{95}$  ermittelt. Die Intensitätswerte  $I_{95}$  mit den Schwerpunktkoordinaten  $(x,y)$  aller Zellen werden abschließend in einer Textdatei abgespeichert.

Für die Überprüfung der zeitlichen Entwicklung wird dieser Auswerteprozess für jeden erfassten Zeitschritt  $t$  durchgeführt und die Anzahl der absterbenden Zellen im Vergleich zur Gesamtanzahl aller Zellen in der Kultur bestimmt. Hierbei gilt eine Zelle als *apoptotisch* bzw. *nekrotisch*, sobald die Intensität  $I_{95}$  einen zuvor festgelegten Grenzwert  $T$  überschritten hat. Das Verhältnis bereits abgestorbener Zellen im Vergleich zur Gesamtanzahl aller in der Zellkultur befindlichen Zellen wird durch die Variable  $R_{\text{tot}}$  abgebildet. In einem typischen Experiment ist die Zellviabilität zu Beginn hoch. Hierbei ist ein Großteil der Zellen lebendig und es liegen vereinzelt bereits nekrotische, lysierte Zellen vor, sodass  $R_{\text{tot}}(0\text{h}) \geq 0$  betragen kann. Liegt nun eine akustische Oberflächenwelle mit einer für die Zellkultur schädlichen Intensität vor, so nimmt aufgrund der einsetzenden Apoptose der Wert  $R_{\text{tot}}$  zu. Ist die komplette Zellkultur betroffen, so wird einer sigmoidalen Kurve folgend der Maximalwert von  $R_{\text{tot}} = 1$  erreicht. Um die Toxizität der SAW-Intensität in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$  und der Pulsweitenmodulation PWM zu erfassen, wird die letale Dosis (LD) der akustischen Oberflächenwelle ermittelt. Hierbei wird der Zeitpunkt anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt, bei der 50% der anfänglich lebensfähigen Zellen nekrotisch sind ( $\text{LD}_{50}$ ). Eine beispielhafte Dosis-Wirkungs-Kurve mit der Erfassung nekrotischer Zellen ist in *Abb. 4.17. a*) für eine Leistung von  $P_{\text{IN}} = 15\text{ dBm}$  gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die Abhängigkeit von  $R_{\text{tot}}$  von der eingestellten Pulsweite. Die für die Zellen letale Dosis wird mit steigender PWM früher erreicht. Da der Farbstoff *Hoechst 33342* ebenfalls nach einer gewissen Kultivierungszeit toxisch unter UV-Belichtung auf die Zellen wirkt [182], steigt  $R_{\text{tot}}$  auch für die Referenzprobe, allerdings deutlich zeitversetzt, mit zunehmender Experimentdauer an. Der Zeitpunkt des Erreichens von  $\text{LD}_{50}$  ist in dem Graph durch einen Stern gekennzeichnet. Der eindeutige sigmoidale Verlauf von  $R_{\text{tot}}$  wird durch die Funktion *Gl. 4.8* mit Hilfe der Software *Origin 2019b* angenähert:

$$y(t) = A_a + \frac{A_a - A_e}{1 + 10^{(w-t)p}} \quad (4.8)$$

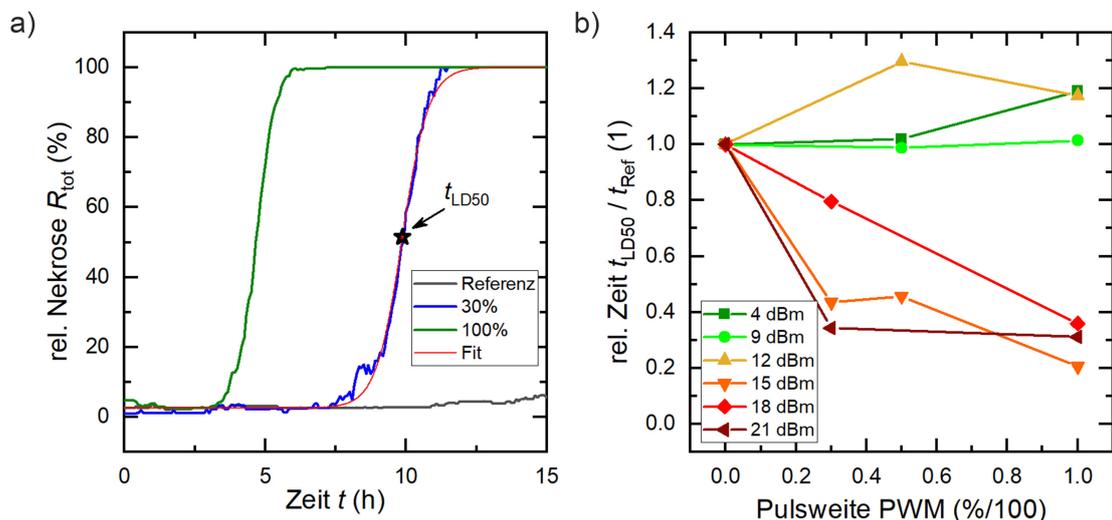
mit  $A_a$  bzw.  $A_e$  der unteren bzw. oberen Asymptote,  $w$  dem Wendepunkt ( $\text{LD}_{50}$ ) und  $p$  der Steigung im Wendepunkt. Als relevantes Maß wird der Zeitpunkt  $t_{\text{LD}_{50}}$ , bei dem der Wendepunkt  $\text{LD}_{50}$  erreicht wird, für jeden Messparameter ermittelt.

In den ersten Messungen wurde sowohl die Apoptose als auch die Nekrose parallel in einem Messdurchlauf erfasst. Hierbei wurde festgestellt, dass ein Signal, hervorgerufen durch die einsetzende Apoptose, stets vor der Nekrose vorliegt. Dies lässt somit auf eine konsekutive sekundäre Nekrose schließen. Die zeitliche Differenz des Auftretens der im FITC (Apoptose) bzw. AlxFl594 (Nekrose)-Kanal erfassten Messsignale beträgt in etwa  $\Delta t = 17.4 \pm 1.1$  Minuten. Die einsetzende Apoptose kann auch in den Phasenkontrastaufnahmen beobachtet werden. Zellen, die den aktiven Prozess der Apoptose durchlaufen, lösen sich von der Substratoberfläche ab und nehmen eine rundliche Morphologie an. Durch die weiterhin intakte Zellmembran ist die Zelle gegenüber dem Hintergrund mit einem deutlichen Kontrastunterschied scharf abgrenzbar. Verliert die Zellmembran mit der einsetzenden Zellyse ihre

Integrität, nimmt der Kontrastunterschied zum Hintergrund deutlich ab. Die in *Abb. 4.16.* markierten Zellen demonstrieren diesen Unterschied. Die rundliche Morphologie der mit einem grünen Pfeil markierten Zelle entspricht der einer apoptotischen Zelle, jedoch ist noch kein Signal im AlxF1594-Kanal erkennbar. Diese Zelle besitzt noch eine intakte Zellmembran, sodass der Farbstoff PI noch nicht an die DNA binden kann. Im Gegensatz hierzu ist die mit dem gelben Pfeil markierte, gegenüber dem Hintergrund schwer erkennbare Zelle bereits lysiert und es liegt im AlxF1594-Kanal ein Signal vor. Da aufgrund der zeitlichen Konstanz zwischen Apoptose und sekundärer Nekrose die Erfassung der Apoptose keinen Mehrwert bietet, wird auf die Auswertung der Caspase-3/7 Aktivität bei einem Großteil der Messungen verzichtet.

Da in den vorangegangenen Bead-Experimenten ein optimaler Leistungspegel von  $P_{IN} = 18\text{-}21$  dBm zur Manipulation von Objekten festgelegt wurde, ist der anwendbare Leistungsbereich bis zu einer maximalen Leistung von  $P_{IN} = 21$  dBm untersucht worden. Die Ergebnisse der relativen Zeit  $t_{LD50}/t_{Ref}$  bis zum Erreichen der letalen Dosis sind in *Abb. 4.17. b)* aufgetragen. Als Referenz  $t_{Ref}$  wird der Zeitpunkt der jeweiligen Referenzprobe verwendet, bei der die Zellen die letale Dosis durch die Toxizität des Farbstoffs *Hoechst33342* erreichen. Der erste Messpunkt der relativen Zeit bei  $PMW = 0\%$  beträgt somit  $t_{LD50}/t_{Ref} = 1$ , da hier gilt  $t_{LD50} = t_{Ref}$ .

Durch diese Darstellung ist die eindeutige Abhängigkeit der letalen Dosis sowohl von der angelegten Leistung  $P_{IN}$  als auch von der Pulsweitenmodulation PWM sichtbar. Bei niedrigen Leistungen  $P_{IN} \leq 12$  dBm liegt keine Beeinträchtigung des Zellwachstums vor, somit wirkt die SAW in diesem Leistungsbereich nicht negativ auf die Zellkultur ein. Im Gegenteil, bei Leistungen  $P_{IN} \leq 12$  dBm ist ein scheinbar positiver Effekt erkennbar. Dieser kehrt sich jedoch bei höheren Leistungen um. Mit zunehmender Intensität und Pulsweite ist eine deutliche Reduktion der Zellviabilität durch das Erreichen einer vorzeitigen letalen Dosis sichtbar. Ein Leistungspegel von  $P_{IN} = 15$  dBm bildet hierbei einen Grenzwert. Während bei  $P_{IN} = 21$  dBm unabhängig von der PWM innerhalb kürzester Zeit die letale Dosis erreicht wird, liegt bei  $P_{IN} = 15\text{-}18$  dBm ein annähernd lineares Verhalten der relativen Zeit zur PWM vor. Somit kann durch die Verwendung eines gepulsten Signals das Erreichen der letalen Dosis verzögert werden. Zellen, die durch eine akustische Oberflächenwelle stimuliert werden, sollten somit mit einem Leistungspegel von  $P_{IN} \leq 12$  dBm behandelt werden. Bei höheren Intensitäten ist die Verwendung eines gepulsten Signals für eine langfristige Stimulation bzw. Manipulation unabdingbar.



**Abbildung 4.17:**

Bestimmung des letalen Leistungspegels von B35-Zellen unter Einwirkung einer akustischen Oberflächenwelle. a) Dosis-Wirkungs-Kurve zur Bestimmung des Zeitpunktes  $t_{LD50}$  der letalen Dosis  $LD_{50}$  bei einer Leistung von  $P_{IN} = 15$  dBm mit unterschiedlichen Pulsweiten PWM. b) Relative Zeit im Verhältnis zur Referenz bis zum Erreichen der letalen Dosis in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{IN}$  und der verwendeten Pulsweite PWM.

#### 4.4.4. Proliferation

Die Zellproliferation ist stark abhängig von äußeren Einflussfaktoren. Wie in *Kap. 2.1.4.* beschrieben, ist zwar der Regulationsmechanismus der Proliferation für entartete Zellen gestört, jedoch benötigen auch Tumorzellen eine Sicherstellung des Lebensunterhalts in Form von Nährstoffen, Sauerstoff, Abtransport metabolischer Abfälle und idealer Temperatur bzw. pH-Wert [34]. Liegt hierbei eine Beeinträchtigung der idealen Kultivierungsbedingungen vor, so äußert sich dies in einer Veränderung der Zellproliferation. Die Bestimmung der Fähigkeit von Zellen zur Proliferation durch Messung der DNA-Synthese ist daher eine akkurate und fundamentale Methode, die Viabilität der Zellkultur zu evaluieren.

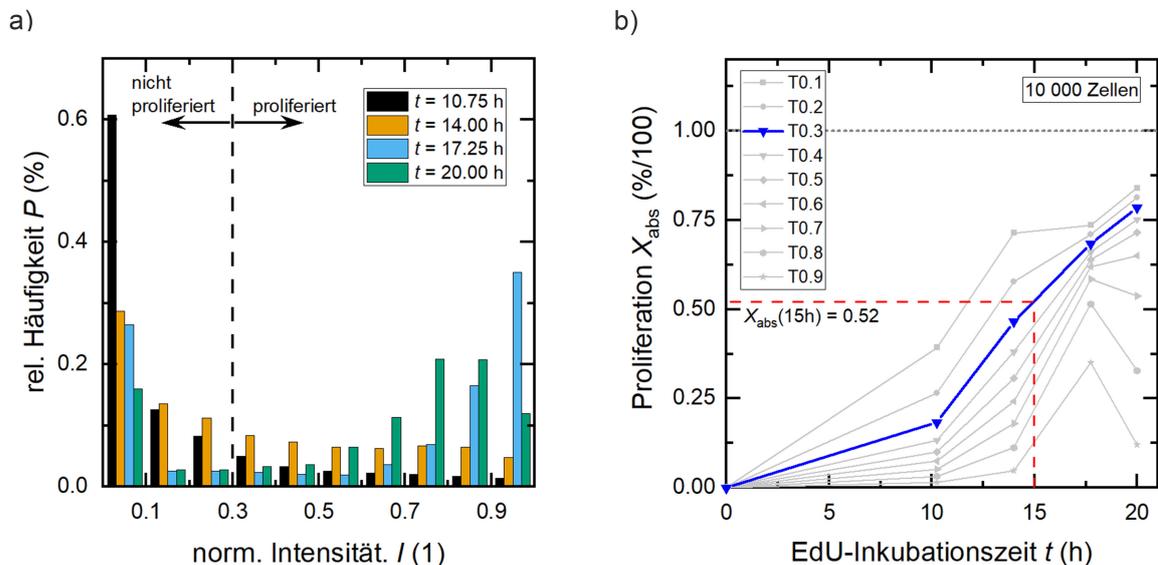
Für eine quantitative Analyse des Zellwachstums im Mikrokanal des experimentellen Aufbaus wurde daher in Zusammenarbeit mit *Kathrin Baumgartner* [183] die Proliferation von B35-Zellen gemessen und die Zellteilungsrate bei idealen Kultivierungsbedingungen mit der Rate im mikrofluidischen Kanal bei unterschiedlichen SAW-Leistungen verglichen.

Für die Detektion frisch synthetisierter DNA wird das *Click-iT<sup>®</sup> EdU Imaging Kit* (C10337, TF) verwendet. Durch Inkubation des Thymin-Nukleosidanalogen *EdU* (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) während der DNA-Synthese kann durch anschließende *klick*-Reaktion ein Fluorophor angebunden und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Eine detaillierte Beschreibung des Färbeprotokolls und des Reaktionsmechanismus kann dem Herstellerprotokoll entnommen werden [184].

Da die Zellproliferation in einer Zellkultur ein dynamischer, kontinuierlich ablaufender Prozess ist, befinden sich die einzelnen Zellen zu einem beliebigen Zeitpunkt in unterschiedlichen Phasen der Proliferation. Dies hat direkt Einfluss auf die gemessene Fluoreszenz-Intensität einer proliferierenden Zelle, da das EdU nur während der S-Phase in die DNA integriert wird. Befindet sich nach der Zugabe des EdU eine Zelle in der G2-Phase, so wird mehr Zeit zur Integration des EdU benötigt als für eine Zelle in der S-Phase. Daher ist es notwendig, die Generationszeit (Zeit für einen kompletten Zellzyklus) einer Zellkultur zu bestimmen. Dies geschieht durch Messung der Proliferation zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierbei wurden für jeden Messpunkt jeweils 10 000 B35-Zellen in einer 4-Well-Schale (176740, TF) ausgesät und das Nährmedium nach der Zelladhäsion mit 20  $\mu\text{M}$  EdU versetzt. In einem Zeitintervall von  $t \in [10 \text{ h}; 20 \text{ h}]$  wurde die Proliferation zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Durch das Proliferationskit werden durch den Farbstoff *Hoechst 33342* alle in der Zellkultur befindlichen Zellkerne angefärbt und zusätzlich durch die *klick*-Reaktion die in dem gemessenen Zeitraum frisch synthetisierte DNA mit dem Fluorophor AlexaFluor<sup>®</sup> 488 versehen. Die Farbstoffe wurden durch die Fluoreszenzmikroskopie im DAPI- (alle Zellkerne) und FITC-Kanal (proliferierte Zellen) detektiert. Zur Überprüfung der Zellmorphologie wurde zusätzlich die Zellkultur im Phasenkontrastverfahren aufgenommen.

Die Auswertung der Proliferation erfolgt über die Bestimmung der mittleren Intensität im FITC-Kanal an der Position jeder detektierten Zelle im DAPI-Kanal durch die in *Kap. 4.4.3.* beschriebene Software *Intensity-Plotter*. Hierfür wird erneut zuerst durch die Software *ilastik* die im DAPI-Kanal aufgenommene Fluoreszenzaufnahme binarisiert. Anschließend wird über das Skript *Intensity-Plotter* im Gegensatz zur Nekrose-Messung nun der mittlere Grauwert  $\bar{I}$  im FITC-Kanal für jedes im DAPI-Kanal detektierte Objekt bestimmt. Die ermittelten Grauwerte werden gegenüber dem Mittelwert der maximalen 5% aller ermittelten Intensitätswerte normiert. In *Abb. 4.18. a)* ist die relative Häufigkeit  $P$  der gemessenen normierten Intensität zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Wie deutlich zu erkennen ist, liegt keine eindeutige Verteilung von Zellen mit niedrigen und mit hohen Intensitätswerten  $I$  vor. Vielmehr findet ein kontinuierlicher Übergang mit zunehmender Zeit hin zu höheren Werten statt. Während bei  $t = 10.75 \text{ h}$  die meisten Zellen noch eine sehr geringe Intensität aufweisen ( $I \approx 0.0 - 0.2$ ), nimmt die Verteilung hin zu höheren Werten mit zunehmender Zeit zu. Besonders zwischen  $t = 14.00 \text{ h}$  und  $t = 17.25 \text{ h}$  ist ein deutlicher Sprung mit  $I > 0.5$  erkennbar. Daher muss ein Grenzwert für die ermittelte Intensität festgelegt werden, ab der eine Zelle als *proliferiert* gilt. Wie in *Abb. 4.18. b)* dargestellt, beeinflusst der gewählte Grenzwert allerdings stark die ermittelte Proliferation. Sehr hohe

Grenzwerte mit  $I > 0.6$  führen zu einer Verfälschung der Proliferationsergebnisse, da ein Rückgang der absoluten Proliferation von  $X_{\text{abs}}(17.25 \text{ h})$  zu  $X_{\text{abs}}(20.00 \text{ h})$  festgestellt wird, obwohl eine höhere Proliferation aufgrund der längeren Inkubationszeit vorliegen sollte. Dies kann durch die Effektivität der Integration von EdU in proliferierende Zellen erklärt werden. Während eines Zellzyklus kann unterschiedlich viel EdU in die DNA integriert werden, was unmittelbar Einfluss auf die Intensität der Zelle hat. Obwohl sie den Zellzyklus einmal durchlief, kann bei geringer EdU-Inkubation der maximale ermittelte Intensitätswert nicht erreicht werden. Durch eine optische Kontrolle der Zellkultur und aufgrund des signifikanten Sprungs der Proliferationsrate zwischen  $t = 14.00 \text{ h}$  und  $t = 17.25 \text{ h}$  wird der Grenzwert auf  $T = 0.3$  festgelegt. Bei diesem Grenzwert beträgt die absolute Proliferation  $X_{\text{abs}}$  bei  $t = 15 \text{ h}$  ca.  $X_{\text{abs}} \approx 0.5$ . So kann eine Sättigung der Proliferation ausgeschlossen werden und proliferierte Zellen werden sicher erkannt. Die subjektive Festlegung des Grenzwertes ist möglich, da dies einen gleichbleibenden Einfluss auf die kompletten Messergebnisse hat. Das Messergebnis der absoluten Proliferation  $X_{\text{abs}}(15 \text{ h}) = 0.52$  dient nun als externe Referenz einer regulär wachsenden, unbeeinflussten Probe im Bulk.

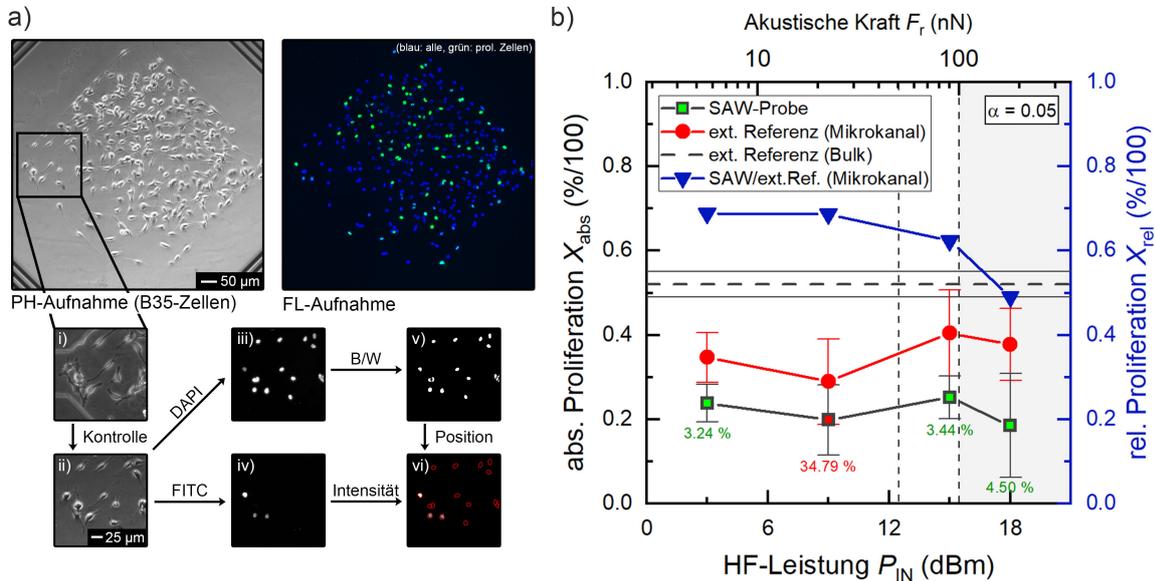


**Abbildung 4.18:**

*Bestimmung der Inkubationszeit von B35-Zellen und Festlegung des Grenzwertes proliferierter Zellen. a) Relative Intensität proliferierender B35-Zellen in einer Zellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Verteilung hin zu höheren Intensitäten nimmt mit steigender Inkubationszeit zu. b) Relative Proliferation der in a) vermessenen Zellkultur in Abhängigkeit des gewählten Grenzwertes  $T$ , ab der eine Zelle als proliferiert gilt. (Erstellt in Zusammenarbeit mit Kathrin Baumgartner [183]).*

Nach der Festlegung des Grenzwertes  $T$  auf  $T = 0.3$ , ab der eine Zelle als proliferiert gilt, wird im Folgenden die Proliferation von B35-Zellen im Mikrokanal des experimentellen Aufbaus in Abhängigkeit der eingekoppelten Leistung  $P_{\text{IN}}$  bestimmt. Nach der Ausrichtung der Zellen mit einer Stückzahl von ca. 100 bis 200 Zellen im aktiven Bereich des mikrofluidischen Kanals wurden die Proben für vier Stunden im Brutschrank (HERAcell 150 CO<sub>2</sub> Inkubator, TF) bei idealen Kultivierungsbedingungen inkubiert und die Zellen zur Adhäsion gebracht. Für jede Versuchsreihe wurden sechs Proben angesetzt, wobei drei Proben durch SAW stimuliert wurden und drei als externe Referenz fungierten. Im Anschluss wurde das Nährmedium im Reservoir durch eine 20  $\mu\text{M}$ -EdU-Lösung ausgetauscht, die SAW-Proben mit einem HF-Generator verbunden und für  $t = 15 \text{ h}$  stimuliert. Zur Reduktion der Temperatur wurde ein gepulstes, eindimensionales SAW-Signal mit PWM = 30 % angelegt. Nach der festgelegten Inkubationszeit wurde die Behandlung beendet und das Färbeprotokoll durchgeführt. Die einzelnen Auswertungsschritte sind am Beispiel einer Zellkultur im Mikrokanal in Abb. 4.19. a) dargestellt. Für die Färbung der Zellkultur musste der Mikrokanal vorsichtig entfernt werden, um einen direkten

Zugriff auf die Zellkultur zu erhalten. Durch das Vergleichen der Phasenkontrastaufnahmen vor (*i*) und nach (*ii*) dem Entfernen des Mikrokanals konnte ein Verlust an Zellen ausgeschlossen werden. Nach dem Erstellen der Fluoreszenzaufnahmen (*iii* und *iv*) und der Binarisierung des DAPI-Bildes (*v*) wird der mittlere Grauwert an den in *v*) ermittelten Positionen (rote Konturen) im FITC-Kanal (*vi*) ausgewertet.



**Abbildung 4.19:**

Messung der Proliferation im experimentellen Aufbau. a) Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen einer Zellkultur auf einem SAW-Chip nach 15-stündiger Behandlung durch ein 1D-SSAW-Feld mit  $P_{IN} = 9$  dBm. i)-vi) stellt die Prozessschritte der Auswertung dar. Nach der Entfernung des Mikrokanals (i)-ii)) und Erstellen der FL-Aufnahmen (iii)-iv)) wird der mittlere Grauwert an den im DAPI-Kanal detektierten Positionen (rote Kreise) im FITC-Kanal bestimmt (vi)). b) Absolute Proliferationsrate  $X_{abs}$  von B35-Zellen in Abhängigkeit der eingekoppelten Leistung  $P_{IN}$  im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (ext. Ref. (Mikrokanal)) und zu einer externen Referenz im Bulk sowie die relative Proliferation  $X_{rel}$  von behandelten und unbehandelten Zellen im Mikrokanal. Zur Überprüfung eines signifikanten Einflusses durch SAW wurde ein einseitiger  $t$ -Test durchgeführt. Die Farben in der Symbolfläche der SAW-Proben beschreiben, ob das 5% Signifikanzniveau erreicht wurde (grün) oder nicht (rot). (Erstellt in Zusammenarbeit mit Kathrin Baumgartner [183]).

In Abb. 4.19. b) ist die absolute Proliferation  $X_{abs}$  von behandelten und unbehandelten B35-Zellen im Mikrokanal in Abhängigkeit der angelegten HF-Leistung  $P_{IN}$  im Bereich  $P_{IN} \in [3 \text{ dBm}; 18 \text{ dBm}]$  dargestellt. Im Vergleich zur externen Referenz im Bulk liegt eine deutliche Reduzierung der absoluten Proliferation  $X_{abs}$  sowohl für die unbehandelte als auch für die behandelte SAW-Probe vor. Sobald die Zellkultur sich im Mikrokanal befindet, sinkt die Proliferation. Dies kann auf die reduzierte Nährstoffversorgung im mikrofluidischen System zurückgeführt werden, da das Gesamtvolumen in der Hauptkammer nur ca.  $V \approx 0.015$  nl beträgt. Wird die Zellkultur zusätzlich durch eine akustische Oberflächenwelle behandelt, so reduziert sich die Proliferationsrate zusätzlich signifikant.

Das Erreichen eines Signifikanzniveaus von 5% wurde durch einen einseitigen  $t$ -Test für alle Messpunkte mit Ausnahme von  $P_{IN} = 9$  dBm bestätigt. Für eine bessere Visualisierung des SAW-bedingten Einflusses wurde die relative Proliferation der behandelten zur unbehandelten Probe  $X_{rel}$  gebildet. Während der Graph für niedrige Leistungen konstant bei  $X_{rel} = 0.69$  verbleibt, sinkt dieser für hohe Leistungen mit  $P_{IN} \geq 15$  dBm weiter ab und erreicht bei einer Leistung von  $P_{IN} = 18$  dBm nur nahezu 50% der Proliferationsrate einer unbehandelten Probe. Bei einer Leistung von  $P_{IN} = 21$  dBm findet ein Absterben der Zellkultur statt. Dies deutet auf eine starke Beeinträchtigung bzw. Unterdrückung des Zellwachstums, bedingt durch hohe Leistungen der akustischen Oberflächenwelle, hin.

Die Ursache hierfür kann unterschiedlicher Natur sein. Obwohl die Temperatur für den gewählten Leistungsbereich unterhalb der kritischen Temperaturerhöhung von  $\Delta T = 3$  K liegt, kann die Hyperthermie eine mögliche Erklärung darstellen. Eine weitere Möglichkeit ist die Unterdrückung der Zellproliferation durch mechanische Kräfte. In der Literatur wird beschrieben, dass durch die Kompression des Nukleus mit einer AFM-Spitze die Mitose einer proliferierenden Zelle bei Kräften von  $F = 50 - 100$  nN verlangsamt und ab  $F > 100$  nN komplett unterdrückt werden kann [185]. Diese Bereiche sind in *Abb. 4.19. b)* unter Verwendung der in *Kap. 4.3.2., Abb. 4.6.* ermittelten Relation von  $F_r$  zu  $P_{\text{IN}}$  durch senkrechte Linien markiert und hellgrau (Übergangsbereich) und grau (Unterdrückung) hinterlegt. Nach *Gl. 4.5* wirkt auf ein sphärisches Objekt in Suspension mit einem mittleren akustischen Kontrast für Zellen von  $\Psi \approx 0.2$ <sup>6</sup> für das gewählte Stehwellenfeld mit  $P_{\text{IN}} = 15$  dBm bzw. 18 dBm eine maximale akustische Kraft von  $F_r \approx 90$  nN bzw. 180 nN. Der Verlauf von  $X_{\text{rel}}$  im Vergleich zur akustischen Kraft  $F_r$  korreliert somit mit den Literaturangaben. Insbesondere der Übergang von  $P_{\text{IN}} = 15$  dBm auf 18 dBm markiert erstaunlicherweise exakt den durch die AFM-Messung ermittelten Grenzwert der einsetzenden Mitose-Unterdrückung. Die berechneten Kräfte gelten jedoch nur exakt für Objekte in Suspension. Da die Zelle bereits auf dem Substrat adhärert ist, kann die tatsächlich auf die Zelle wirkende Kraft verschieden sein.

#### 4.4.5. Beeinflussung des zellulären Wachstums durch eine akustische Potentiallandschaft

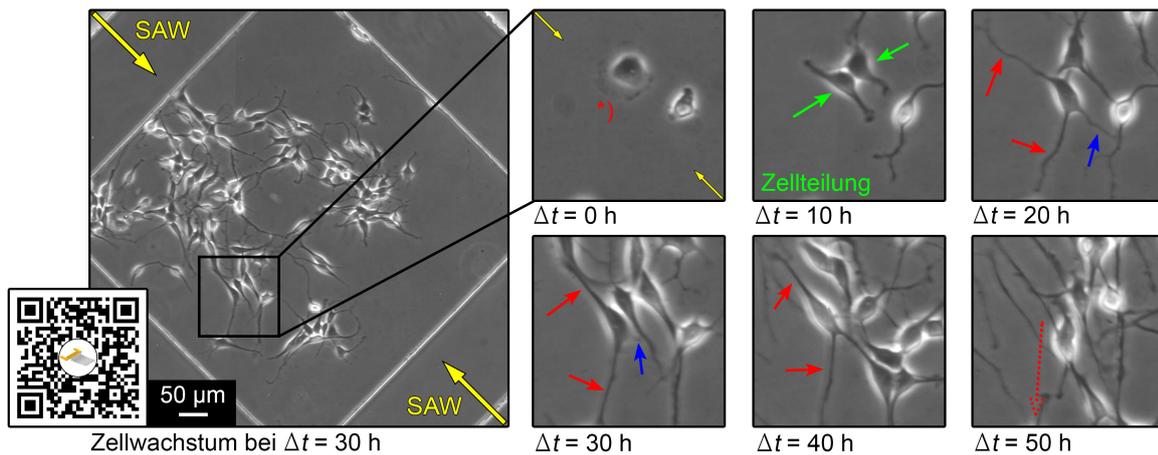
Zellen können adaptiv auf ihre Umgebung reagieren. Wie in *Kap. 2.1.2.* beschrieben, können zelluläre Funktionen wie die Zellmigration durch Gradienten in den Umgebungseigenschaften beeinflusst werden. Liegt beispielsweise ein Nährstoffgradient vor, so migrieren Zellen in Richtung der Nährstoffquelle [25]. Doch nicht nur die Migrationsrichtung der Zellkörper kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden, sondern auch die Wachstumsrichtung neuronaler Fortsätze durch Konzentrationsgradienten neurotropher Wachstumsfaktoren [186]. Im Hinblick auf eine kontrollierte Beeinflussung der Migrationsrichtung der Zellkörper (Soma), auch *Acoustotaxis* genannt, wird in diesem Abschnitt sowohl die Manipulierbarkeit des Wachstumsverhalten von undifferenzierten als auch ausdifferenzierten B35-Zellen durch akustische Oberflächenwellen in Kooperation mit *Michelle Lienhart* [187] und *Felix Palzer* [188] untersucht.

Nach der Aussaat der Zellen in dem experimentellen Aufbau und der Zugabe von 2 mM DcAMP wurde das Zellwachstum in unterschiedlichen Kraftfeldern auf dem Mikroskop im *Live-Cell-Imaging* für bis zu drei Tage untersucht und mit einer unbehandelten externen Referenz verglichen. Hierbei wurden konstante, gepulste ( $f = 1$  Hz, PWM = 10 % - 30 %) und fortlaufende<sup>7</sup> eindimensionale Stehwellenfelder und fortschreitende akustische Oberflächenwellen in einem Leistungsbereich von  $P_{\text{IN}} \in [9$  dBm; 18 dBm] erzeugt.

In *Abb. 4.20.* ist das Wachstum einer Zellkultur in einem eindimensionalen gepulsten ( $f = 1$  Hz, PWM = 20 %) Stehwellenfeld mit  $P_{\text{IN}} = 18$  dBm zum Zeitpunkt  $t = 30$  h dargestellt. In dem Ausschnitt ist das Wachstumsverhalten einer beispielhaften B35-Zelle (\*) zu verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. Nach einer vollendeten Zellteilung (grüne Pfeile,  $\Delta t = 10$  h) bilden sich deutlich mehrere neuronale Fortsätze aus (rote Pfeile,  $\Delta t = 20$  h). Im weiteren Verlauf ( $\Delta t = 30 - 40$  h) nimmt die Länge der Fortsätze zu (rote Pfeile) oder sie verkümmern (blaue Pfeile). Das Auftreten zusätzlicher Zellen ab  $t > 30$  h in dem vergrößerten Bereich lässt auf eine hohe Mobilität der Zellkultur schließen. So migriert beispielsweise die mit \*) markierte Zelle entlang ihrer Fortsätze aus dem Bildausschnitt bei  $\Delta t = 50$  h (roter, gestrichelter Pfeil). Die hohe Mobilität des Somas resultiert vermutlich aus der durch die neuronalen Fortsätze hervorgerufenen Zugkräfte auf den Zellkörper.

<sup>6</sup>Hypothetischer akustischer Kontrast aus dem Mittelwert der aus der Literatur entnommenen Maximalwerte für Zellen  $\Psi \in [0.14; 0.25]$  (siehe Abschnitt *Akustische Pinzette*).

<sup>7</sup>Erzeugt durch eine konstante Phasenverschiebung durch den *Phasenschieber* mit  $\dot{\Phi} = 180^\circ/\text{h}$  bzw.  $\dot{l} = 25 \mu\text{m}/\text{h}$ .



**Abbildung 4.20:**

Wachstum von B35-Zellen in einem eindimensionalen, gepulsten Stehwellenfeld ( $P_{IN} = 18 \text{ dBm}$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$ ,  $PWM = 20 \%$ ) im mikrofluidischen Kanal zu verschiedenen Zeitpunkten. An einer exemplarischen Zelle ist die Proliferation (grüne Pfeile,  $\Delta t = 10 \text{ h}$ ), die Ausbildung neuronaler Fortsätze (rote Pfeile,  $\Delta t = 20 - 40 \text{ h}$ ) und die hohe Mobilität (roter, gestrichelter Pfeile,  $\Delta t = 50 \text{ h}$ ) deutlich zu erkennen. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Link zum Video: [https://youtu.be/vXHLjUhmV\\_k](https://youtu.be/vXHLjUhmV_k)

Für die Auswertung dieser hochdynamischen Zellkulturen wurde eine Software entwickelt, mit deren Hilfe die Position der Zellkörper vollautomatisch detektiert werden kann. Die Software basiert auf dem Prinzip des *Deep convolutional neural network* - DCNN, zu Deutsch in etwa „tief faltendes neuronales Netzwerk“, und ist ein Konzept im Bereich des maschinellen Lernens. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Software geschaffen werden, für eine detaillierte Beschreibung kann die Arbeit *Detecting and Tracking the Migration of Adherent Cells Influenced by Surface Acoustic Waves with Deep Convolutional Neural Networks* von Michelle Lienhart herangezogen werden [187].

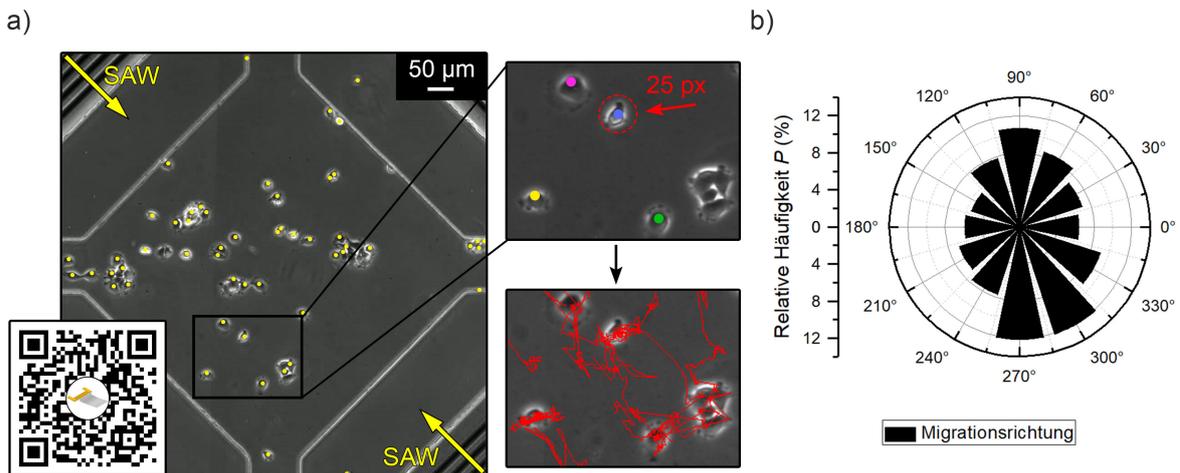
Das auf die Detektion von Zellkörpern trainierte Netzwerk bestimmt in einer Mikroskopieaufnahme die Wahrscheinlichkeit, dass sich auf einer bestimmten Pixelkoordinate ein Zellkörper befindet. Diese Wahrscheinlichkeit wird in einer sogenannten *Heatmap* mit Werten zwischen 0 und 1 ausgegeben, wobei 0 einer minimalen und 1 einer maximalen Konfidenz entspricht, dass an der betrachteten Pixelkoordinate ein Zellkörper vorliegt. Die Architektur des Netzwerkes besteht aus 15 Faltungsschichten und zwei Pooling Layer. Das Training und die Validierung erfolgte über einen manuell angefertigten Datensatz annotierter Zellkörper. Die Koordinaten der Zellkörper werden anschließend über einen Grenzwertfilter (Konfidenz  $> 0.235$ ) und die Bestimmung der lokalen Maxima ermittelt und in einer .json-Datei ausgegeben. In der Nachbearbeitung der Zellkoordinaten können über einen längeren Zeitabschnitt einzelne Zellen verfolgt und deren Migrationstrajektorien bestimmt werden. Die Trajektorien geben Auskunft über die Migrationsrichtung und -geschwindigkeit einzelner Zellen. Der DCNN-Ansatz liefert eine hohe Leistungsfähigkeit mit einem *Recall*<sup>8</sup> größer 98% und einer *Präzision*<sup>9</sup> größer 96% auf dem Validierungs-Satz sowie Recall und Präzision größer 84% auf den Test-Aufnahmen. Diese Werte demonstrieren somit die hohe und zuverlässige Trefferquote des neuronalen Netzwerkes.

Die Trajektorien der B35-Zellen wurden anschließend in Abhängigkeit des angelegten Kraftfeldes durch die Software ausgewertet und untersucht. In *Abb. 4.21. a)* sind die detektierten Schwerpunkte der Zellkörper der in *Abb. 4.20.* gezeigten Zellkultur als gelbe Punkte dargestellt. Da zueinander in Kontakt

<sup>8</sup>*Recall* (Sensitivität) ist das Verhältnis  $\frac{t_p}{t_p + f_n}$  mit  $t_p$  Anzahl der *wahr Positive* und  $f_n$  Anzahl der *falsch Negative*

<sup>9</sup>*Präzision* ist das Verhältnis  $\frac{t_p}{t_p + f_p}$  mit  $t_p$  Anzahl der *wahr Positive* bzw.  $f_p$  Anzahl der *falsch Positive*

stehende Zellen sich im Migrationsverhalten gegenseitig beeinflussen, kann durch die Festlegung eines Mindestabstandes zu benachbarten Zellen eine Betrachtung isolierter ungestörter Zellen durchgeführt werden. Zellen, die diese Bedingung erfüllen (hier: Mindestabstand von  $r = 25 \text{ px} \approx 18 \mu\text{m}$ ), werden zur besseren Identifikation mit farbigen Punkten markiert und über einen längeren Zeitraum nachverfolgt. Die für den gewählten Abstand ermittelten Trajektorien einzelner Zellen werden abschließend in einer .txt-Datei ausgegeben und in der ersten Mikroskopieaufnahme als rote Linien dargestellt. Unter Berücksichtigung einer zurückgelegten Migrationsstrecke von mindestens  $\approx 2 \mu\text{m}$  wird die relative Häufigkeit der Migrationsrichtung in einem Winkeldiagramm, wie in *Abb. 4.21. b)* dargestellt, ausgegeben.



**Abbildung 4.21:**

*Ermittlung der Trajektorien der in Abb. 4.20. gezeigten B35-Zellkultur in einem eindimensionalen gepulsten SSAW-Stehwellenfeld ( $P_{IN} = 18 \text{ dBm}$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$ ,  $PWM = 20 \%$ ) durch die Verwendung eines DCNN. a) Die durch die Software automatisch detektierten Positionen der Zellkörper (Somata) werden durch gelbe Punkte dargestellt. Zur Vermeidung der gegenseitigen Beeinflussung in Kontakt stehender Zellen, werden nur alleinstehende Zellen, die einen Mindestabstand (hier  $25 \text{ px} \approx 18 \mu\text{m}$ ) zu einer benachbarten Zellen aufweisen, in Betracht gezogen. Die Positionen der einzelnen Zellen werden anschließend über einen längeren Zeitraum ermittelt und als Trajektorie (rote Linien) ausgegeben. b) Über die Trajektorien kann die relative Häufigkeit der Migrationsrichtung berechnet werden. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.*

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/mmUZUZ01tSQ>

Die Auswertungen der Trajektorien unter dem Einfluss verschiedener Kraftfelder (konstant, gepulst ( $f = 1 \text{ Hz}$ ,  $PWM = 10 \%$  -  $30 \%$ ), fortlaufend,  $P_{IN} \in [9 \text{ dBm}; 18 \text{ dBm}]$ ) ergab bisher keinen Hinweis auf eine eindeutige Manipulierbarkeit der B35-Zellen durch akustische Oberflächenwellen. Die Zellen migrierten, wie in *Abb. 4.21. b)* dargestellt, stets ohne eine präferierte Vorzugsrichtung. Ausgewählte Daten der durchgeführten Experimente befinden sich im Anhang *Kap. C*.

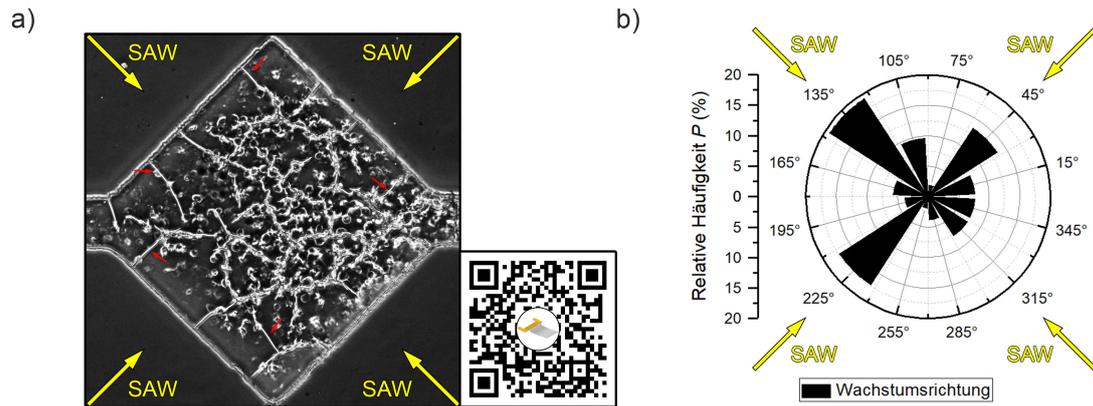
Da die Zellmanipulation durch akustische Oberflächenwellen mittels mechanischer Kräfte vermittelt wird, kann die Effektivität der Beeinflussung von der Zelllinie abhängig sein. Die Mechanosensitivität von Zellen ist unter anderem abhängig von der Ausprägung mechanosensitiver Ionenkanäle und kann zwischen den Zelltypen verschieden sein [189]. Daher könnte in zukünftigen Studien durch die Verwendung mechanosensitiver Zelltypen wie beispielsweise Osteoblasten, Muskelzellen oder sensorischen Neuronen eine Manipulierbarkeit von Zellen durch SAW dargelegt werden. Des Weiteren bietet das hier vorgestellte DCNN eine verlässliche Möglichkeit zur vollautomatischen und effizienten Detektion von Zellen in einer Zellkultur. Durch das Training mittels weiterer annotierter Datensätze kann ein breites Anwendungsspektrum auf unterschiedliche Zelltypen gewährleistet werden.

#### 4.4.6. Gerichtetes Wachstum neuronaler Fortsätze

In den vorangegangenen Experimenten konnte durch die Modellzelle der B35-Zelllinie erfolgreich die Biokompatibilität des experimentellen Aufbaus und die Einflüsse einer akustischen Oberflächenwelle auf eine Zellkultur charakterisiert und beleuchtet werden. Die B35-Zellen stellten bis dahin ein ideales Modellsystem dar, um die Effekte des durch SSAW-generierten Kraftfeldes auf Zellen eingehend zu untersuchen. Für die Bildung eines wohldefinierten neuronalen Netzwerkes ist jedoch letztendlich die Nutzung primärer Neuronen erforderlich. Nur durch die Verwendung einer primären Kultur können dynamische Prozesse der Neurogenese, wie die Mechanismen der Fortsatzbildung und Polarisierung, die Bildung synaptischer Kontakte oder die Physiologie der Nervenzelle wie die intrazelluläre Kommunikation besser verstanden werden. Hierfür wurde eine internationale Kooperation mit der *University of California, Santa Barbara - UCSB* finanziert durch Fördermittel des *Bavaria California Technology Center - BaCaTeC* gegründet.

In Zusammenarbeit mit *Sarah Grundeen* von der *UCSB* konnten durch die Verwendung akustischer Oberflächenwellen primäre Neuronen kontrolliert positioniert und anschließend manipuliert werden. Nach der kontrollierten Adhäsion der Zellkörper im Stehwellenfeld soll durch konstante Kraftausübung, induziert durch das SSAW-Kraftfeld, die Wachstumsrichtung der neuronalen Fortsätze manipuliert werden. Da primäre Neuronen in Suspension einen geringeren Durchmesser als B35-Zellen aufweisen ( $D_{\text{Neuron}} = 9 \pm 1 \mu\text{m}$ ), wird ein mit PLL beschichteter SSAW-Chip mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SSAW}} = 25 \mu\text{m}$  verwendet. Die Mikrokanalhöhe beträgt des Weiteren  $h = 15 \mu\text{m}$ . Nach der Vorbereitung des experimentellen Aufbaus und Befüllung des mikrofluidischen Systems mit Nährmedium (Neurobasal Medium (21103049) mit 2% B-27<sup>TM</sup> Supplement ((17504044), beide TF) wird die durch Dissektion gewonnene Zellsuspension in den mikrofluidischen Kanal eingebracht. Eine Beschreibung der Dissektion befindet sich in *Kap. D.5.*. Durch die Aktivierung des HF-Signals mit  $P_{\text{IN}} = 18 \text{ dBm}$  konnten die Neuronen im Kraftfeld gefangen und positioniert werden. Nach der Reduktion der Kraftfeldstärke auf  $P_{\text{IN}} = 15 \text{ dBm}$  adhärten die Neuronen auf der Substratoberfläche des SSAW-Chips. Bei konstanter HF-Leistung ( $P_{\text{IN}} = 15 \text{ dBm}$ ) des zweidimensionalen Kraftfeldes wurde anschließend das Zellwachstum im Mikrokanal durch das Erstellen von Phasenkontrastaufnahmen alle fünf Minuten dokumentiert. In *Abb. 4.22. a)* ist die neuronale Zellkultur nach elfstündiger Behandlung durch das SSAW-Feld abgebildet. In der Aufnahme ist deutlich die Zelladhäsion auf der Substratoberfläche und die anschließende Neubildung neuronaler Fortsätze zu erkennen. Ausgewählte Beispiele neuronaler Fortsätze sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Dem ersten Eindruck nach zu urteilen und bestätigt durch eine Analyse der Wachstumsrichtung der neuronalen Fortsätze, ist eine eindeutige Präferenz der Neuriten-Orientierung entlang der Symmetrieachsen des SSAW-induzierten zweidimensionalen Kraftfeldes erkennbar. Für die Auswertung wurde die Auswuchsrichtung sämtlicher neuronaler Fortsätze zum Zeitpunkt  $t = 11 \text{ h}$  mit Hilfe von *ImageJ* bestimmt. Hierbei wurde der Winkel durch Bestimmung der Positionen des Soma und der Fortsatzenden berechnet. In *Abb. 4.22. b)* ist die relative Winkelverteilung der neuronalen Fortsätze aus der in *Abb. 4.22. a)* gezeigten Zellkultur aufgetragen. Die Vorzugsrichtungen der Auswüchse korrelieren exakt mit den Propagationsrichtungen der akustischen Oberflächenwelle. Sie wachsen entlang der Knotenlinien des Stehwellenfeldes und folgen somit den Minima der Potentiallandschaft.

Die ersten hier gezeigten und in der oben genannten Publikation [69] veröffentlichten Ergebnisse demonstrieren somit eindrucksvoll eine Beeinflussbarkeit der neuronalen Fortsätze durch akustische Oberflächenwellen.



**Abbildung 4.22:**

Wachstum primärer Neuronen im Stehwellenfeld einer SSAW. a) Phasenkontrastaufnahme der Zellkultur nach einer elfstündigen Behandlung durch ein Kraftfeld mit  $P_{IN} = 15 \text{ dBm}$  und  $\lambda_{SAW} = 25 \mu\text{m}$ . Deutlich erkennbar ist die Zelladhäsion auf der Substratoberfläche und die Neubildung neuronaler Fortsätze. Beispielhafte Fortsätze sind durch rote Pfeile markiert. b) Winkelverteilung der neuronalen Fortsätze aus der Zellkultur gezeigt in a). Die präferierten Wachstumsrichtungen folgen den Symmetrieachsen des Stehwellenfeldes. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>. (Daten entnommen aus [69]).

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/bbv5g0Kpzs>

#### 4.4.7. Schaffung physiologischer Randbedingungen

Für eine fortgeschrittenere und weitere strategische Anwendung akustischer Oberflächenwellen im Bereich der biologischen Physik und der weichen Materie ist es notwendig, die Randbedingungen des experimentellen Aufbaus auf die Anforderungen der zu manipulierenden Organismen zu optimieren. Insbesondere die Steifigkeit des Substrates übt einen großen Einfluss auf zelluläre Funktionen aus. Sie wirkt sich unter anderem auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten (Durotaxis) [190–192] oder den Aufbau des Zytoskeletts bezüglich der Orientierung der Stressfasern [27] aus. Bei mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) konnte bewiesen werden, dass die Substrat-Elastizität Einfluss auf die Differenzierung in verschiedene Zelllinien (neuronal und muskuloskelettal) nehmen kann [193]. Ein ausführlicher Überblick über die als *Mechanotransduktion* bekannte Sensibilität von Zellen gegenüber externen physikalischen Kräften kann in der Literatur *Mechanotransduction: use the force(s)* von Paluch et al. gewonnen werden [27].

Mit dem Ziel, ein komplexes neuronales Netzwerk auf einem akustischen Chip zu generieren, ist es notwendig, eine *in vivo*-ähnliche Umgebung zu schaffen. Neben der zuvor gezeigten 3D-Strukturierung von Zellen in einem Netzwerk aus Kollagen ist die Anpassung der effektiven Steifigkeit  $E_{\text{eff}}$  der Substratoberfläche durch eine dünne Gel-Schicht auf die Anforderungen neuronaler Zellen eine weitere potentielle Möglichkeit. Die dünne Gel-Schicht besteht hierbei aus dem elastischem Polymer Polyacrylamid (PA) und ist kovalent mit der  $\text{SiO}_2$ -Schicht der Substratoberfläche verbunden. Die Steifigkeit (E-Modul) von PA-Gelen kann über mehrere Größenordnungen von extrem weich  $\mathcal{O}(10^{-1} \text{ kPa})$  bis sehr steif  $\mathcal{O}(10^3 \text{ kPa})$  [194] über den Grad der Polymer-Quervernetzungen eingestellt werden.

In diesem Abschnitt soll nun die Möglichkeit der Schaffung eines Hybrid-Systems, bestehend aus einem SSAW-Chip und einer PA-Schicht, untersucht und die Frage beantwortet werden, ob Zellen auf der modifizierten SSAW-Chip-Oberfläche kultiviert werden können. Als physiologische Randbedingung für neuronale Zellen wird der E-Modul des Hirngewebes mit  $E = \mathcal{O}(10^0 \text{ kPa})$  [195] angenommen. Für die Realisierung dieser Randbedingung werden in den Experimenten daher PA-Gele verwendet, deren Volumensteifigkeit  $E_{\text{Vol},1} = 1 \text{ kPa}$  bzw.  $E_{\text{Vol},2} = 5 \text{ kPa}$  beträgt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die PA-Schicht aufgrund der Gewährleistung der SAW-Aktorik eine möglichst dünne Schichtdicke  $h$  aufweisen soll. Da bei dünnen Schichten die effektive Steifigkeit  $E_{\text{eff}}$  eine Kombination sowohl aus der Steifigkeit des Trägermaterials als auch der Steifigkeit der aufgetragenen Schicht ist, wird im

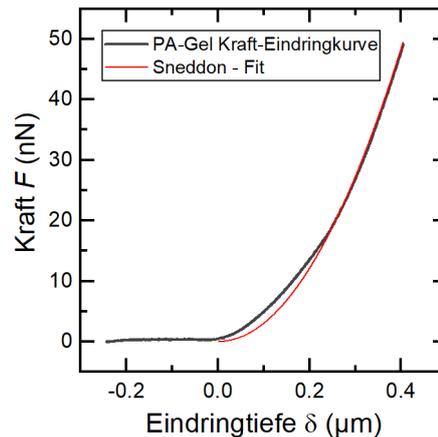
Folgendes das effektive E-Modul in Abhängigkeit der Schichtdicke ermittelt. Die Anfertigung des PA-Gels auf der SSAW-Chip Oberfläche bei unterschiedlichen Schichtdicken ist detailliert in *Kap. D.9.* beschrieben.

Die Bestimmung von  $E_{\text{eff}}$  in Abhängigkeit der Schichtdicke  $h$  erfolgt über die Messung der Kraft-Eindringkurve mittels AFM. Basierend auf dem Sneddon-Modell, kann über die Parameter der verwendeten AFM-Spitze (Winkel der Spitze  $\alpha$ , Federkonstante  $k$ ), die Poisson-Zahl des Gels  $\nu$  und die gemessene Eindringtiefe  $\delta$  bei bekannter Kraft  $F$  der E-Modul nach *Gl. 4.9* berechnet werden [196]:

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2 \quad (4.9)$$

Für eine detaillierte Beschreibung der Grundlagen sei an dieser Stelle auf die Herstellerbeschreibung verwiesen: *JPK Instruments, Application Note: Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy*<sup>10</sup>.

Der verwendete Cantilever trägt die Bezeichnung *CSC37/Al BS* und besitzt näherungsweise eine konische Spitze mit einem Winkel von  $\alpha = 20^\circ$  und einer Federkonstante von  $k = 0.59 \text{ N/m}$ . Die Volumensteifigkeit des verwendeten Gels beträgt  $E_{\text{Vol}} = 5 \text{ kPa}$ . Für die Poisson-Zahl wurde ein Wert von  $\nu = 0.5$  angenommen. Für jede Schichtdicke wurden 30 Kraft-Eindringkurven aufgenommen und mit der JPK-Software analysiert. Eine beispielhafte Kraft-Eindringkurve eines PA-Gels mit einer Schichtdicke von  $28 \mu\text{m}$  und deren Annäherung durch den Sneddon-Fit ist in *Abb. 4.23.* abgebildet.



**Abbildung 4.23:**

Typische Kraft-Eindringkurve einer AFM-Messung in ein PA-Gel mit einer Schichtdicke von ca.  $28 \mu\text{m}$  und einer Volumensteifigkeit von  $E_{\text{Vol}} = 5 \text{ kPa}$ . (Daten entnommen aus [138]).

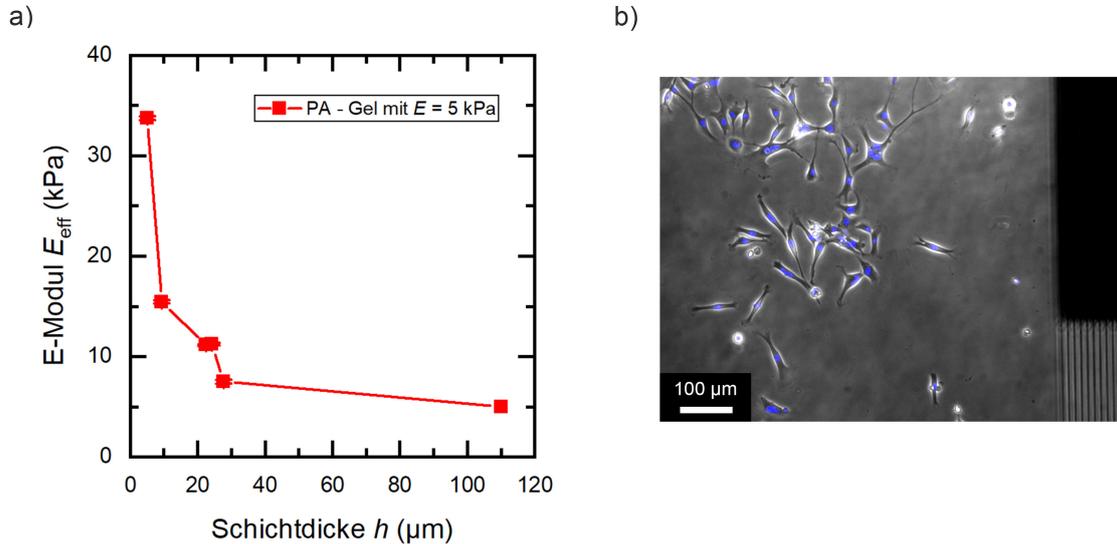
Die Schichtdicke der PA-Gele wurde per Mikroskop durch die Sedimentierung von  $4.5 \mu\text{m}$ -Beads auf der Geloberfläche bestimmt. Der äußere Rand des SSAW-Chip ist stets vom Gel befreit und dient als Referenzebene. Hierbei wird die mittlere Höhe der Fokusebene über Triangulation mehrerer Beads bestimmt und die Differenz zwischen beiden Ebenen (Gel und Substrat) gebildet.

In *Abb. 4.24. a)* ist der gemessene E-Modul in Abhängigkeit der Schichtdicke aufgetragen. Bei sehr dicken Schichten ( $h = 100 \mu\text{m}$ ) beträgt die effektive Steifigkeit  $E_{\text{eff}}$  die des Volumens. Das Trägermaterial liefert keinen Beitrag. Nimmt die Schichtdicke ab, so ist erst ab einem Wert von  $h = 20 \mu\text{m}$  ein signifikanter Beitrag von  $E_{\text{eff}} = 10 \text{ kPa}$  ersichtlich. Mit der weiteren Abnahme von  $h$  nimmt  $E_{\text{eff}}$  exponentiell zu.

Durch die Verwendung des Vernetzers *Sulfo-SANPAH* (803332, SA) und Kollagen I kann die Zelladhäsion auf dem PA-Gel gefördert werden. Die Phenylazid-Gruppe des Sulfo-SANPAH geht unter Photoaktivierung bei  $365 \text{ nm}$  eine kovalente Verbindung mit dem PA-Gel ein und hinterlässt ein

<sup>10</sup>Siehe hierzu: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-app-elastic-modulus.14-1.pdf>

Succinimidylester für die Reaktion mit den Aminogruppen von Kollagen oder anderen Proteinen [195]. Eine Phasenkontrastaufnahme einer sieben Tage alten B35-Kultur auf der Geloberfläche in Abb. 4.24. b) demonstriert die Anwendbarkeit der PA-Gele für die neuronale Zellkultur. Die Zellkerne wurden hierbei mit dem DNA-Farbstoff NucBlue eingefärbt. Dies eröffnet nun in weiteren Experimenten die Möglichkeit, ideale Kultivierungsbedingungen für neuronale Zellen zu schaffen.



**Abbildung 4.24:**

a) Effektives E-Modul  $E_{\text{eff}}$  eines PA-Gels mit einer Volumensteifigkeit von  $E_{\text{Vol}} = 5 \text{ kPa}$  bei unterschiedlichen Schichtdicken. b) Lebende B35-Zellkultur auf einem mit PA-Gel beschichtetem SSAW-Chip (Dicke  $h = 25 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{Vol}} = 1 \text{ kPa}$ ,  $E_{\text{eff}} \approx 5 \text{ kPa}$ ) nach sieben Tagen in Kultur. (Daten entnommen aus [138]).

#### 4.4.8. 3D-Strukturierung im Stehwellenfeld

Dreidimensionale (3D) Zellkultursysteme stoßen in der Forschung im Bereich der Medikamentenentwicklung oder der Gewebeentwicklung (engl. *Tissue Engineering*) auf immer größeres Interesse. Sie liefern physiologische Informationen von großer Relevanz und ermöglichen aussagekräftigere Prognosen für *in vivo*-Tests. Durch die Imitation der *in vivo*-Bedingungen wachsen Zellkulturen in natürlicheren Strukturen und weisen ein aus *in vivo* stammenden Zellen ähnliches Verhalten bezüglich der Genexpression, Proliferation und Migration auf [197–200]. Die *in vivo*-Adaption der Zellmorphologie und -funktion ist insbesondere für die Bildung hochkomplexer neuronaler Netzwerke auf einem Chip essentiell, da durch 3D neuronale Zellkulturen ein *in vivo*-ähnliches Gehirngewebe generiert werden kann [201].

Bei einer 3D Zellkultur werden Zellen entweder auf einem azellulären, bereits bestehendem Gerüst bzw. Matrix ausgesät oder in einer flüssigen Matrix verteilt, welche sich anschließend durch Erstarrung oder Polymerisation verfestigt. Aufgrund der Nutzung eines mikrofluidischen Systems ist die Verwendung einer erstarrenden bzw. auspolymerisierenden Matrix wie beispielsweise Kollagen I notwendig. Kollagen Typ I-Moleküle sind eine homogene Ansammlung von dünnen, stabähnlichen Molekülen, welche bei physiologischen Bedingungen (pH: 6.5–8.5,  $T = 20 - 37^\circ\text{C}$ ) polymerisieren und sich zu heterogenen, quervernetzten Strukturen anlagern. Die Eigenschaften der sich hierbei bildenden Kollagen-Fasern ist abhängig von den Polymerisationsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Polymerisationsrate [202].

Für die Bildung einer strukturierten 3D-Zellkultur soll nun die Polymerisation von Kollagen I einer HeLa-Zellsuspension in einem akustischen Stehwellenfeld untersucht werden. Für die Arbeitslösung wird die Stammlösung des Kollagen I (354249, Collagen I, High Concentration, Rat Tail, 100 mg -

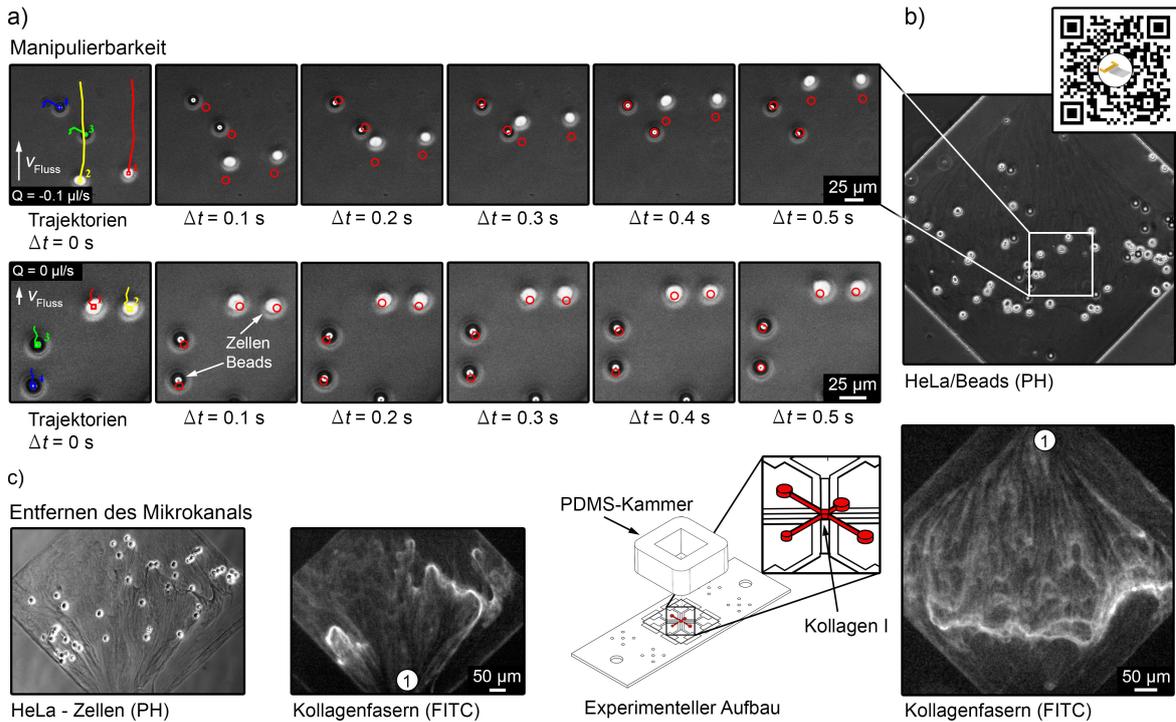
Corning Incorporated, NY, USA) mit der Zellsuspension (600 000 Zellen/ml,  $V = 45\%$  des Gesamtvolumens) vermischt und mit Natriumhydroxid (1 M NaOH) neutralisiert. Durch Zugabe von DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS (1x)), ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) wird eine finale Kollagen-Konzentration von 1.85 mg/ml erreicht. Für die Visualisierung der Kollagenfasern wird 0.5 % (w/w) des Kollagens mit Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-konjugiertem Typ I-Kollagen (AS-85111, AnaSpec, Seraing, Belgien) ersetzt. Als Referenzobjekt bezüglich der akustischen Kraft werden der Lösung neben den verwendeten HeLa-Zellen zusätzlich 15  $\mu\text{m}$  Beads (100  $\mu\text{l}$ , 120 000 Beads/ml) beigefügt<sup>11</sup>. Alle mit der Kollagen-Mischung in Kontakt stehenden Komponenten werden im Vorfeld gekühlt, um eine frühzeitige Polymerisation zu verhindern.

Als Setup wurde der oben beschriebene Aufbau (50  $\mu\text{m}$  SSAW-Chip) mit angeschlossenem Phasenschieber verwendet. Um eine schnelle Polymerisation des Kollagen I zu verhindern, wurde der komplette experimentelle Aufbau ebenfalls mit Eis gekühlt. Nach der Befüllung der Mikrokanalstruktur mit DPBS wurde die Flüssigkeit im Reservoir durch die Arbeitslösung ersetzt und durch die Spritzenpumpe in den Mikrokanal gezogen ( $Q = -0.5 \mu\text{l/s}$ ), bis kein deutlicher Kontrastunterschied zwischen DPBS und Arbeitslösung mehr sichtbar war. Nach der Verringerung des Volumenstroms auf  $Q = -0.1 \mu\text{l/s}$  wurde das zweidimensionale Stehwellenfeld bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 21 \text{ dBm}$  aktiviert. Wie in den Aufnahmen und in den Trajektorien der *Abb. 4.25. a)* erkennbar, können die PS-Beads durch das Stehwellenfeld anfänglich problemlos positioniert und verschoben werden, während die Zellen jedoch nahezu ungehindert durch das Kraftfeld strömen. Selbst durch die Erhöhung der angelegten Leistung auf  $P_{\text{IN}} = 24 \text{ dBm}$  konnte bei der bestehenden Strömung kein sichtbarer Effekt der akustischen Oberflächenwelle auf die Zellkörper erreicht werden. Durch eine deutliche Reduktion des Volumenstroms aufgrund der Deaktivierung der Spritzenpumpe ( $Q = 0 \mu\text{l/s}$ ) konnten schließlich auch die Zellkörper positioniert werden, bevor die polymerisierenden Kollagenfasern eine weitere Manipulation verhindern. Dies ist durch die identische Bewegung der Zellkörper gegenüber den Beads anhand der Trajektorien in der zweiten Bildreihe ersichtlich. Die Ursache der stark verminderten akustischen Kraft auf die Zellkörper im Vergleich zu den PS-Beads ist vermutlich der geringere akustische Kontrast der Zellkörper in der mit Kollagen I angereicherten Flüssigkeit. Durch das Kollagen I wird die Dichte der Flüssigkeit erhöht und nähert sich dem Wert der Zellkörper an. Die vollständige und zügige Polymerisation des Kollagen I innerhalb von Minuten ist des Weiteren bedingt durch die von der SAW hervorgerufene Temperaturerhöhung der Flüssigkeit. Für die Visualisierung der Kollagenfasern wurde eine Fluoreszenzaufnahme im FITC-Kanal nach der vollständigen Polymerisation erstellt. Die Kollagenfasern und die positionierten HeLa-Zellen und Beads (PH-Aufnahme) sind in *Abb. 4.25. b)* abgebildet. Während in der Phasenkontrastaufnahme die Kollagenfasern nur schemenhaft erkennbar sind, sind diese in der Fluoreszenzaufnahme deutlich hervorgehoben. Die Struktur der Polymerisation folgt sichtlich dem Strömungsprofil des mikrofluidischen Systems. Die Fasern weisen stets eine Orientierung in Richtung 1 auf.

Nach der Bildung der Kollagenfasern konnte die 3D-Zellkultur durch Austausch des Mikrokanals mit einer PDMS-Kammer in ein Bulk-Medium überführt werden. Wie in den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen in *Abb. 4.25. c)* dargestellt ist, bleibt die Struktur der Zellkultur auf dem SSAW-Chip durch vorsichtiges Entfernen des PDMS-Mikrokanals erhalten. So kann auch nach der Gelierung der Kollagenlösung die Nährstoffversorgung der Zellkultur sichergestellt werden.

Die in diesem Vorgang erreichte hochgradige Kollagenstrukturierung kann für die Untersuchung der Wechselwirkung von Zellen mit gerichteter extrazellulärer Matrix verwendet werden. So ist beispielsweise die Untersuchung der Rolle der Faserorientierung bei der Migration von metastasierenden Zellen aus einem künstlichen Tumor Gegenstand aktueller Forschung durch die Kooperationspartner *Geiger et al.* [203].

<sup>11</sup> Angesetzte Arbeitslösung:  
 239.9  $\mu\text{l}$  Kollagen I (8.7 mg/ml); 8  $\mu\text{l}$  FITC-Kollagen I (1 mg/ml);  
 5.4  $\mu\text{l}$  1 M NaOH; 254.8  $\mu\text{l}$  DPBS; 110  $\mu\text{l}$  Bead-Lösung 488.9  $\mu\text{l}$  Zellsuspension



**Abbildung 4.25:**

*Bildung und Strukturierung einer 3D-Zellkultur mittels Kollagen I. a) In einer HeLa-Zellen / 15 µm-Bead / Kollagen I-Suspension ist die Effektivität der Zellaktorik durch den geringen akustischen Kontrast der Zellen gegenüber der Kollagenlösung stark vermindert. Durch Reduktion des Volumenstroms können schließlich auch Zellen manipuliert werden. b) Positionierte HeLa-Zellen und Beads (PH) sowie vollständig polymerisiertes Kollagen I (FITC) in der Hauptkammer des mikrofluidischen Systems. c) Durch Entfernen des Mikrokanals kann die Nährstoffversorgung nach der Gelation sichergestellt werden. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.*

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/DYGC4AbQTKY>

#### 4.4.9. Positionierung aktiv beweglicher Einzeller

In zahlreichen biologischen und medizinischen Arbeiten mit Zellkulturen ist eine exakte Bewertung einzelner Zellen erforderlich. Führen diese Einzeller (Protozoen) eine aktive Schwimmbewegung aus, stellt die adäquate Bewertung ein schwieriges bis gar unmögliches Unterfangen dar. Flagellaten (Geißeltierchen) wie Bakterien und Spermien oder Ciliaten (Wimpertierchen) wie das Pantoffeltierchen (Paramecium) können in elektrolytreichen Lösungen sehr hohe Bewegungsgeschwindigkeiten erreichen (einige µm/s bis zu einigen mm/s). Die hierbei permanent stattfindende, teilweise stochastische Positionsveränderung erschwert eine sichere Bewertung der Aktivität sich bewegendes Mikroobjekte. Für die gesicherte Einzelobjektcharakterisierung stehen nach aktuellem Stand der Technik unterschiedliche Methoden zur Verfügung, unter anderem die

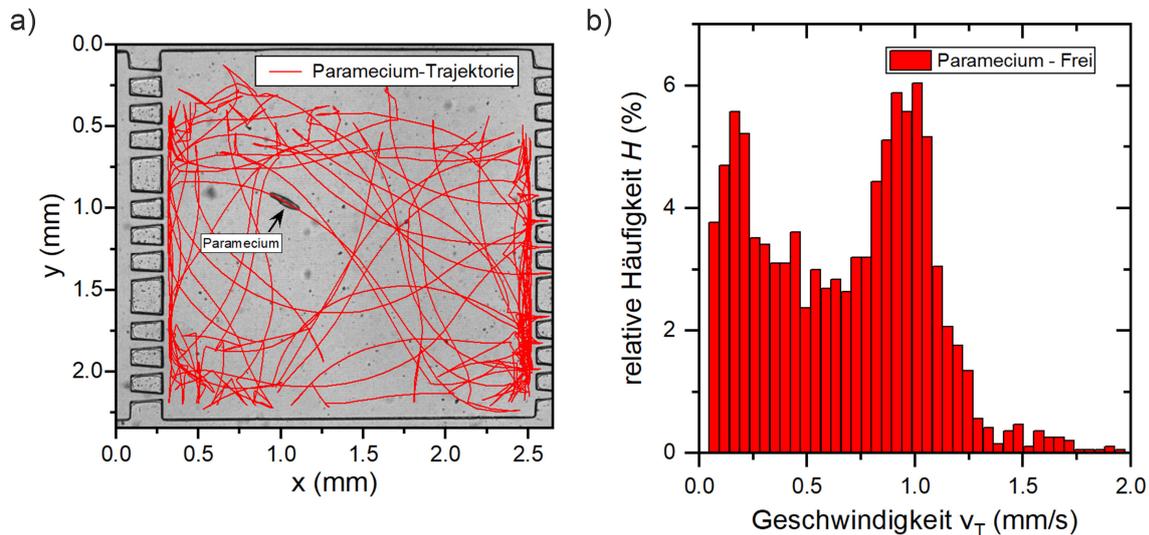
- Immobilisierung (Retardierung) bzw. komplette temporäre oder vollständige Bewegungshemmung durch Applikation biochemisch wirksamer Substanzen,
- Charakterisierung mittels komplexer Videosysteme mit automatischer Objektidentifikation,
- kontaktfreie Positionierung durch wechselnde oder wandernde hochfrequente elektrischer Felder in mikrofluidischen Systemen [204, 205].

Die Immobilisierung, beispielsweise von Paramecien, durch Zugabe von Ethanol (5 % v/v) führt zum vollständigen Verlust der Cilien [206] und stellt daher einen massiven Eingriff in die Physiologie der

Zelle dar. Aufwendige Prozessschritte mit hohen Ansprüchen oder kostenintensiven Geräten und Materialien behindern des Weiteren die Etablierung einer weit verbreiteten und effektiven Methode zur Zellauswertung.

Eine berührungslose Positionierung würde es erlauben, Einzeller frei schwebend in einer physiologischen Lösung zu charakterisieren, um beispielsweise die aktive Bewegung der motilen Organellen, wie Geißeln, Flagellen und Cilien, oder die Morphologie der Zelle störungsfrei zu untersuchen.

Die stochastische, permanente Positionsveränderung eines frei beweglichen Parameciums in einem mikrofluidischen Kanal ist in *Abb. 4.26.* abgebildet. Durch die Erfassung der Trajektorien mittels eines in *ImageJ* erstellten Skripts kann die Mobilität und Vorzugsrichtung des Einzellers erfasst werden. Die Schwimmbewegung des Parameciums über den erfassten Zeitraum ist in *Abb. 4.26. a)* abgebildet. Die hierbei vorliegende Schwimgeschwindigkeit  $v_T$  ist in *Abb. 4.26. b)* als relative Häufigkeit  $H$  aufgetragen. Sofern keine Richtungsänderung vorliegt, bewegt sich der Einzeller mit einer relativ konstanten Geschwindigkeit von ca.  $v_T \approx 1 \text{ mm/s}$  fort. Die permanenten Änderungen der Schwimmrichtung äußern sich in der Erhöhung der relativen Häufigkeit  $H$  bei  $v_T = 0-0.25 \text{ mm/s}$ . Die Auswertung demonstriert somit eindrucksvoll die stochastische und hochdynamische Fortbewegung des Parameciums. Die Daten und die Auswertung der Trajektorien des Parameciums im Mikrokanal wurden von *Lukas Schnitzler* erstellt und durchgeführt.



**Abbildung 4.26:**

*Einzelnes Paramecium in einem mikrofluidischen Kanal. a) Erfasste Trajektorien des Parameciums und (b) dessen Schwimgeschwindigkeit  $v_T$ . (Rohdaten erstellt von Lukas Schnitzler.)*

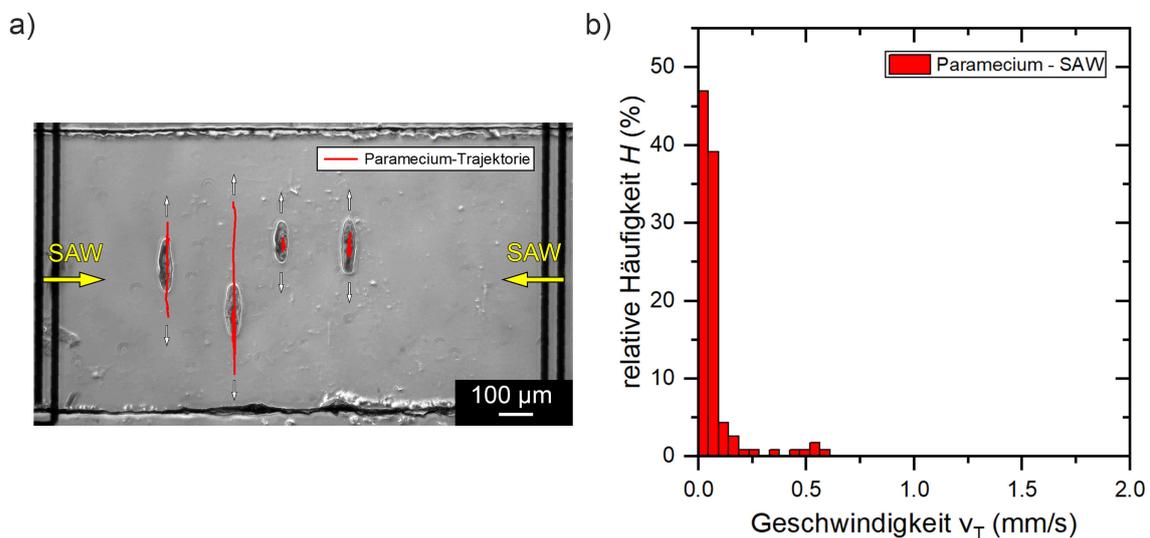
Zur Realisierung der Immobilisation von Einzellern als Voraussetzung für die hochauflösende mikroskopische Beobachtung sollen nun zwei Methoden für eine berührungslose Positionierung vorgestellt werden.

#### *Immobilisierung durch SSAW*

Die berührungsfreie Positionierung agiler Protozoen soll nun mittels eines akustischen Stehwellenfeldes erreicht werden. Stellvertretend für die Ciliaten wird die Manipulierbarkeit und Positionierung von Paramecien (*Paramecium caudatum*) in einem eindimensionalen SAW-Stehwellenfeld untersucht. Das in Hauptausbreitungsrichtung (X-Richtung) des  $\text{LiNbO}_3$ -Kristalls orientierte IDT-Paar erzeugt eine SAW mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 100 \mu\text{m}$  bei einer Schallpfadbreite von  $W = 1 \text{ mm}$ .

Die Resonanzfrequenz der IDT-Strukturen beträgt  $f_{\text{res}} = 34.7 \text{ MHz}$  und die IDT-Strukturen weisen einen Abstand von  $l = 1.5 \text{ mm}$  auf. Mit einer durchschnittlichen Breite  $b$  der Paramecien von  $D_{\text{Paramecium}} \approx 30 \mu\text{m}$  ist durch die Wahl der Wellenlänge die EZPK-Bedingung mit  $\frac{\lambda_{\text{SAW}}}{D_{\text{Paramecium}}} \approx 3.3$  erfüllt. Die HF-Signalerzeugung und -aufspaltung erfolgt über den Frequenzgenerator SML 01 mit einem angeschlossenen Verstärker (Verstärkungsfaktor  $G = 30 \text{ dB}$ , AMP590033H-T) und einem Leistungsteiler ZFSC-2-4+. Zur Unterdrückung der durch die *Leaky*-SAW-induzierten Strömung durch vertikale Reflexion der Schallwelle an einer Grenzfläche und um die Höhe des für die Paramecien zugänglichen Volumens auf eine Kanalhöhe von ca.  $h = 50 \mu\text{m}$  einzuschränken, wird auf den SSAW-Chip ein Glasplättchen aufgelegt. Hierzu werden jeweils parallel zum Schallpfad des IDT-Paars zwei Scotch-Tape-Streifen auf den SSAW-Chip aufgeklebt und auf den Klebestreifen das Glasplättchen (Abmaße:  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ ) positioniert.

Die Paramecien wachsen in einem Ciliatenkulturmedium (Lebendkulturen Helbig, Prien, Deutschland) und werden direkt durch eine Pipette der Lösung entnommen. Die Paramecium-Suspension wird auf den SSAW-Chip pipettiert und durch Kapillarkräfte in die aktive Fläche des SSAW-Chips gezogen. Durch Aktivierung des Stehwellenfeldes bei  $P_{\text{IN}} = 24 \text{ dBm}$  werden die Paramecien linear entlang der Knotenlinien temporär ausgerichtet (siehe *Abb. 4.27. a*). Nach einer kurzen Verweildauer an einer Position bewegen sich die Einzeller aufgrund des eindimensionalen Stehwellenfeldes entlang der Knotenlinien fort (rote Trajektorien) und folgen somit der Potentiallandschaft des Stehwellenfeldes. Die hierbei vorliegende relative Häufigkeit der Geschwindigkeit ist in *Abb. 4.27. b*) aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist im Vergleich zum ungestörten Paramecium (*Abb. 4.26.*) eine starke Beeinträchtigung der Beweglichkeit. Zumeist verweilt der Einzeller an einer Position, erreicht aber dennoch gelegentlich eine Geschwindigkeit von bis zu  $v_{\text{T}} = 0.6 \text{ mm/s}$ . Da die Feldkräfte selbst bei hohen HF-Leistungen nicht vollständig ausreichen, um die Nettobewegung der Einzeller zu kompensieren, ist eine langfristige Positionierung mittels SAW daher nicht möglich. HF-Leistungen  $P_{\text{IN}} \geq 27 \text{ dBm}$  führen aufgrund der Temperaturerhöhung des Mediums zu einem raschen Absterben der Einzeller. Eine Reduktion der Freiheitsgrade über einen kurzen Zeitraum kann somit durch die Verwendung von SSAW erreicht werden, für eine vollständige Immobilisierung ist diese Methode jedoch nicht ausreichend.



**Abbildung 4.27:**

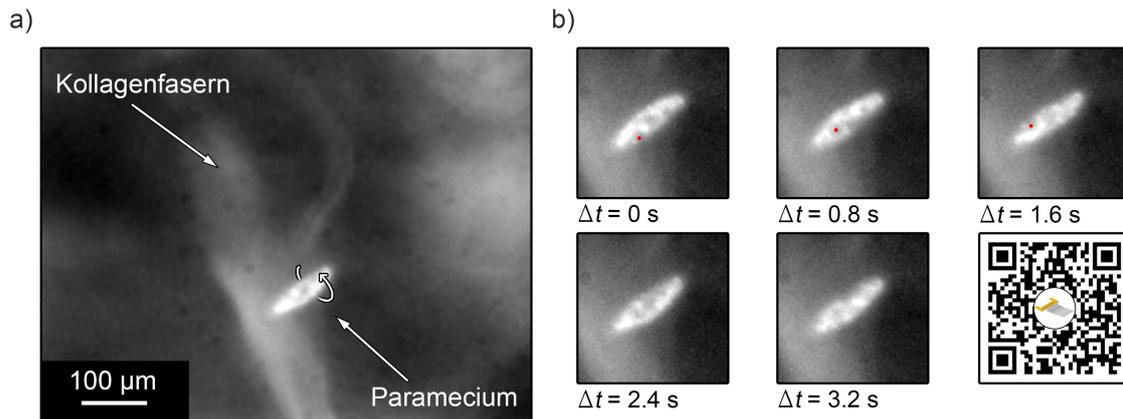
Positionierung agiler Einzeller durch ein Stehwellenfeld. a) *Paramecium caudatum* in einem 1D-SSAW-Kraftfeld mit  $P_{\text{IN}} = 24 \text{ dBm}$  und  $\lambda_{\text{SAW}} = 100 \mu\text{m}$ . Durch das Stehwellenfeld erfolgt eine deutliche Positionierung der Einzeller entlang der Knotenlinien, welche sich weiterhin entlang der Knotenlinien fortbewegen können. b) Relative Häufigkeit der Fortbewegungsgeschwindigkeit.

*Immobilisierung durch Strukturproteine*

Durch die Verwendung auspolymerisierender Strukturproteine wie Kollagen I kann ebenfalls die Bewegungsfreiheit der Paramecien stark reduziert werden. Analog zu der zuvor demonstrierten Positionierung von Zellen in einem Mikrokanal können durch die gezielte Polymerisation von Kollagen I agile Einzeller schonend immobilisiert werden. Dies gelingt durch Aussaat der Paramecien in einer Kollagen I-Lösung und deren Polymerisation bei Raumtemperatur in einer Kultivierungskammer. Die hierbei verwendete Arbeitslösung ist identisch zu *Kap. 4.4.8.* In *Abb. 4.28. a)* ist eine Fluoreszenzaufnahme (FITC) eines Parameciums in polymerisierten Kollagen I in einer Kammer eines 8 Well  $\mu$ -Slide (80826, ibidi, Martinsried, Deutschland) abgebildet. Hierbei wurde die Viabilität des Parameciums durch Zugabe von  $1\ \mu\text{g}$  des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein Green Acetoxymethyl (AM) (56496-20X50UG, SA) im FITC-Kanal überprüft. Das zellpermeable, nicht-fluoreszierende Calcein-Derivat wird durch Hydrolyse im Zytosol einer Zelle fluoreszent und dient somit als Indikator für einen aktiven Zellmetabolismus. Das intensive Fluoreszenzsignal des Parameciums weist somit auf eine hohe Zellviabilität hin. Die Strukturen um das Paramecium stellen die polymerisierten Kollagenfasern dar. Die Bewegungsfreiheit des Parameciums ist so stark reduziert, dass nur noch die Rotation um die eigene Achse möglich ist. Diese Rotationsbewegung ist in den Einzelaufnahmen in *Abb. 4.28. b)* zu erkennen. Zur Verdeutlichung der eingeschränkten Bewegungsfreiheit ist die Rotation des ortsfesten Parameciums anhand eines Fixpunktes auf der Zellmembran gekennzeichnet. Somit liegt die effektive Schwimmggeschwindigkeit des Parameciums in Kollagen I bei  $v_T = 0\ \text{mm/s}$  und stellt daher eine vollständige Immobilisierung des Einzellers dar.

Im Gegensatz zur weit verbreiteten Immobilisierung durch Zugabe von Ethanol können durch diese Methode – ohne Beeinträchtigung der Physiologie einer Zellkultur – agil bewegliche Einzeller über einen langen Zeitraum an Ort und Stelle fixiert werden. Durch die Permeabilität der Kollagenstruktur gegenüber Flüssigkeiten und durch die Manipulierbarkeit der Umgebungsbedingungen kann durch Änderung diverser Kultivierungsbedingungen wie beispielsweise pH-Wert, Nährstoff- und Wachstumsfaktorenkonzentration oder der Temperatur direkt Einfluss auf die Zellkultur genommen werden. Hierbei stattfindende Änderungen des Zellmetabolismus, der Aktivität gewisser Enzyme oder des Phasenzustandes der Zellmembran können anschließend direkt an einer einzelnen Zelle observiert werden. Durch die einfache Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen kann anschließend zudem eine Reversibilität der Behandlung überprüft werden.

Die hier vorgestellten Methoden zur schonenden Positionierung von beweglichen Einzellern sollen unter anderem in einer gemeinsamen Publikation mit *Lukas Schnitzler* veröffentlicht werden [207].

**Abbildung 4.28:**

Positionierung agiler Einzeller durch eine Kollagenstruktur. a) Fluoreszenzaufnahme (FITC) eines vitalen Parameciums in einer polymerisierten Kollagenfaserstruktur, bestehend aus Kollagen I. b) Bewegung des Parameciums zu bestimmten Zeitpunkten. Die stark verminderte Bewegungsfreiheit führt zur Rotation des Einzellers um die eigene Achse. Die Rotationsbewegung ist durch einen roten Punkt markiert. Online-Link zum Film mittels QR-Code<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/DX4Bq5p06jU>

## 4.5. Ausblick

Die Zielsetzung dieser Studie war es, ein Werkzeug zu entwickeln, mit dessen Hilfe Zellen durch ein dynamisches Kraftfeld manipuliert werden können, während zeitgleich die idealen Kultivierungsbedingungen für die Zellkultur sichergestellt bleiben. Durch den Einsatz akustischer Oberflächenwellen in Kombination mit einem mikrofluidischen System konnten die gesteckten Ziele erfolgreich erreicht werden. Nach eingehender Überprüfung der zeitlichen und räumlichen Dynamik des Kraftfeldes, der definierten separaten Positionierung von Objekten und der Bestimmung hierbei wirkender Kräfte konnten anhand neuronaler Zellen die Biokompatibilität und die Einflüsse einer SAW auf die Zellkultur untersucht werden. Während nach der Zelladhäsion keine Einflüsse der akustischen Oberflächenwelle auf Neuroblastom-B35-Zellen feststellbar war und eine zufällige Migrationsrichtung vorlag, konnte für primäre Neuronen ein deutlicher Effekt in der Ausbildung neuronaler Fortsätze festgestellt werden. Die hier gezeigten ersten vielversprechenden Ergebnisse geführter Neuronen mittels akustischer Oberflächenwellen bereiten den Weg zur Generierung komplexer neuronaler Strukturen auf einem Chip. Durch die einfache Kombinierbarkeit mit 3D-Materialien können nach der kontrollierten Ausrichtung der Zellkörper physiologische Randbedingungen geschaffen werden, um ein möglichst unbeeinträchtigtes Zellwachstum bei *in vivo*-ähnlichen Randbedingungen zu erhalten.

Ein konsekutiver Schritt in zukünftigen Studien ist die Untersuchung der intrazellulären Antwort auf die durch SAW hervorgerufenen mechanischen Stimuli. Wie werden die mechanischen Reize in biochemische Signale in der Mechanotransduktion umgewandelt und welche Signalwege können durch eine akustische Oberflächenwelle adressiert und stimuliert werden? Aktuelle Publikationen beleuchten dieses Forschungsgebiet und beschreiben, wie Zellen ihre Umgebung wahrnehmen und welche Mechanismen in der Mechanotransduktion (z. B. Acto-Myosin-Kinetik, Verstärkung der fokalen Adhäsionspunkte, mechanosensitive Ionenkanäle) eine entscheidende Rolle spielen [27]. So wurde zuletzt durch *Patkunarajah et al.* ein bislang unbekanntes Protein *Elkin1* beschrieben, das einen Teil eines neu identifizierten Pfades in der Mechanotransduktion darstellt, indem es mechanische Kräfte in elektrische Ströme umwandelt [208].

Neben der Identifizierung intrazellulärer Mechanismen können mit Hilfe der hier vorgestellten Technologie der Manipulation mittels akustischer Oberflächenwellen weitere Fortschritte im Hinblick auf die

Erforschung der *Brain-on-a-Chip*-Systeme und der Schaffung komplexer neuronaler Netzwerke erreicht werden. Durch Kombination der SAW-Technologie mit dem eingehend beschriebenen Silizium-Chip können nun Zellkörper exakt auf die fest vorgegebenen Positionen der Sensorik (z. B. Feldeffekttransistoren) und der Stimulatoren (z. B. Kondensatoren) positioniert werden. Nach der Zelladhäsion könnte mittels asymmetrischer Kraftfelder die präferierte Auswuchsrichtung der neuronalen Fortsätze definiert werden, um so die Verbindungen zwischen den Neuronen zu kontrollieren. Zur Unterstützung des gerichteten Wachstums können biochemische Substanzen eingebracht werden. Durch die Bildung eines Konzentrationsgradienten von Nervenwachstumsfaktoren (NGFs) findet innerhalb weniger Minuten ( $t = 20$  min) eine Neuorientierung der Wachstumsrichtung neuronaler Fortsätze entlang des Gradienten statt [209]. Da durch SSAW eine Agglomeration von Proteinen in einer Zellmembran erreicht werden kann [51], ist es vorstellbar, ebenfalls NGFs, die typischerweise ein Molekülmasse  $M$  von ca.  $M \approx 27$  kDa<sup>12</sup> aufweisen, in einem Stehwellenfeld zu agglomerieren.

Nach der erfolgreichen Bildung des neuronalen Netzes ist die Untersuchung der Interaktion einzelner Zellen untereinander und im gesamten kollektiven Netzwerk von höchstem Interesse. Spannende Fragestellungen, ob neuronale Netze trainiert werden können, wie gegenläufige Nervenimpulse auf eine Kollision reagieren oder wie sich der Phasenzustand der Zellmembran während einer Reizweiterleitung verändert, können untersucht werden. Die hierbei notwendige Erregung der Aktionspotentiale kann durch das bereits bekannte System der Kondensatoren [141] oder durch einen kontrollierten SAW-Impuls erfolgen. Diese erregbare Eigenschaft der akustischen Oberflächenwelle konnte bereits durch *Zhou et al.* anhand der Ultraschallstimulation sensorischer Neuronen eines Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* demonstriert werden [210].

Die hier vorgestellte Technologie, welche erfolgreich in *Physical Review E* veröffentlicht wurde [69], demonstriert eindrucksvoll die vielfältige Anwendbarkeit der akustischen Oberflächenwelle im Bereich der Zellmanipulation. Sie eröffnet nun die Möglichkeit, bestehende Limitierungen durch statische Ansätze der Zellmanipulation zu umgehen und neue Wege in der kontrollierten Bildung neuronaler Netzwerke sowohl in der Grundlagen- als auch in der Implantatforschung zu beschreiten!

---

<sup>12</sup>Nerve Growth Factor- $\beta$  - GF028 von Sigma Aldrich



## 5. Gesteigertes Zellwachstum durch den Einsatz akustischer Oberflächenwellen

In den vorangegangenen Kapiteln konnte erfolgreich demonstriert werden, welche vielfältigen Einsatzmöglichkeiten akustische Oberflächenwellen für die Detektion und Manipulation lebender Organismen bieten. Durch nicht-invasive Detektion adhärenter Zellen auf einer Substratoberfläche ist es möglich, den Heilungsprozess *in vitro* zu vermessen und die Kultivierungsbedingungen zu überwachen. Doch nicht nur die Observation des Zellwachstums kann durch akustische Oberflächenwellen erreicht werden, sondern auch die kontrollierte Manipulation. Durch die Verwendung der *akustischen Pinzette* können komplexe Strukturen auf einem Chip gebildet werden. Durch die Implementierung dieser Technologie werden neue Möglichkeiten zur Bildung eines *Brain-on-a-chip* geschaffen. Doch weder die Detektion noch die Manipulation von Zellen stellen einen derartigen Durchbruch dar wie die aktive Stimulation von Zellen.

In diesem Kapitel wird die erfolgreiche und vielversprechende Anwendung akustischer Oberflächenwellen für die aktive Zellstimulation demonstriert. Unter Verwendung sogenannter Wound-Healing-Assays wird die progressive Wundheilung eines durch SAW stimulierten konfluenten Zellrasens untersucht und es werden zellspezifische Parameter analysiert. Die hierbei vorgestellten Ergebnisse sind zum Teil bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- M.S. Brugger\*, M.E.M. Stamp\*, A. Wixforth & C. Westerhausen *Acoustotaxis - in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves, Biomaterials science* 2016, 4, 1092-1099. \*Authors contributed equally [211]<sup>1</sup>
- M.S. Brugger, K. Baumgartner, S.C.F. Mauritz, S.C. Gerlach, F. Röder, C. Schlosser, R. Fluhrer, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Vibration enhanced cell growth induced by surface acoustic waves, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117, 202005203. [212]<sup>2</sup>

### 5.1. Motivation und Stand der Technik

Die rapide und gesicherte Genesung einer Läsion nach einem Trauma oder in Folge eines invasiven operativen Eingriff, ist ein essentieller Aspekt in der Medizin. Implantatmaterialien oder Behandlungsmethoden, die zur erhöhten Wundheilung führen, sind daher von höchstem Interesse. Berichte über *intelligente* Materialien reichen über die bedarfsgerechte Emission entzündungshemmender Nanopartikel wie Kupfer, Silber oder Zinkoxid [3] bis hin zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren bei der Zelladhäsion auf der Substratoberfläche [4]. Doch nicht nur passive Materialien finden immer häufiger Anwendung, sondern ebenfalls die aktive Stimulation beschädigten Gewebes durch mechanische und elektrische Kraftfelder. Bereits 1960 regten *Knoch* und *Klug* die Verwendung therapeutischen Ultraschalls (US) für die aktive Zellstimulation an [213, 214]. Durch das Auflegen eines Ultraschallkopfes soll der US das Gewebe perkutan durchdringen und durch mechanische Vibration, Kavitation und zielgenauen Wärmeeintrag Schmerzen lindern und gleichzeitig zelluläre Prozesse aktivieren und beschleunigen. Seitdem wurde erfolgreich demonstriert, dass durch US bei Leistungsintensitäten von  $I_{US} = 30 \text{ mW/cm}^2$  bis  $I_{US} = 500 \text{ mW/cm}^2$  die Regenerations- und Heilungsrate von weichem und

<sup>1</sup>Internet-Adresse zur Veröffentlichung: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/bm/c6bm00125d>

<sup>2</sup>Internet-Adresse zur Veröffentlichung: <https://www.pnas.org/content/117/50/31603>

hartem Gewebe um bis zu 40 % gesteigert werden kann [11, 215, 216]. Doch nicht nur beschädigtes Gewebe lässt sich durch mechanische Einflüsse mittels US therapieren, sondern auch entzündete Organe. Durch US-Stimulation der Milz konnten bereits erfolgreich entzündliche Arthritiden behandelt werden [217]. Seither liegt ein stark wachsendes Interesse vor, durch Ultraschalltherapie Organfunktionen zu verstärken oder Krankheiten zu behandeln. Um dieses Gebiet voran zu bringen, ist es jedoch notwendig, zu demonstrieren, dass die Therapie und der beschriebene Wirkungsmechanismus abhängig von spezifischen Stimulationsparametern und der adressierten Aktivierung spezifischer Strukturen oder Zellen sind. Die Studien müssen dabei konsistent und wiederholbar für Mensch- und Tierversuche sein [217].

Neben den offensichtlichen Vorteilen der US-Behandlung, unterliegt diese Technologie allerdings auch bedeutenden Nachteilen. Bei exzessiven US-Intensitäten mit  $I_{\text{US}} \geq 1 \text{ W/cm}^2$  liegt eine Unterdrückung der Frakturheilung [218] vor und es kommt zu einem erhöhten Wärmeeintrag in das Gewebe von bis zu  $\dot{T} = 0.86 \text{ K/min}$  bei  $I_{\text{US}} = 1 \text{ W/cm}^2$  und einer Frequenz von  $f = 1 \text{ MHz}$  [219]. Dies führt zu einer Limitierung der US-Anwendung auf eine gepulste Schalleinwirkung bei einer Intensität von  $I_{\text{US}} = 30 \text{ mW/cm}^2$  [220]. Neben den physikalischen Nachteilen sind die Notwendigkeit von medizinischem Personal während der Therapie und die damit einhergehenden hohen Kosten weitere Aspekte, die eine breite Anwendung des US verhindern.

Mit dem Ziel diese limitierenden Faktoren zu umgehen und ein standardisiertes Modellsystem zu realisieren, wurden die Zellstimulation und -interaktion mit akustischen Oberflächenwellen untersucht. Im Gegensatz zur konventionellen US-Therapie würde eine SAW-gestützte Behandlung folgende Fortschritte mit sich bringen: Durch die lokale *in vivo*-Anwendung und die Kombinationsmöglichkeit der SAW-Technologie mit bestehenden Materialien (z. B. Hüftgelenkimplantaten) ist eine permanente Stimulation ohne die Notwendigkeit ärztlicher Unterstützung möglich. Die stark etablierte Hochfrequenztechnologie ermöglicht zudem eine kosteneffiziente Behandlung.

Vor diesem Hintergrund wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten erste Erkenntnisse der Zellstimulation mittels akustischer Oberflächenwellen gewonnen. Die hierbei festgestellten Erkenntnisse sollen nun kurz dargestellt werden, können allerdings in den Originalarbeiten im Detail nachgelesen werden [60, 211, 221, 222].

Mit dem Kernanliegen der unterstützten Wundheilung, beispielsweise nach Implantation einer Hüftgelenk-Endoprothese, wurden die Einflüsse akustischer Oberflächenwellen auf Knochenzellen (Osteoblasten) untersucht. Die hierbei verwendeten Modellzellen der Zelllinie SaOs-2 für ossäre Strukturen wurden auf einem SAW-Chip ausgesät und kultiviert. Nach der Bildung eines konfluenten Zellrasens wurde eine künstliche Wunde geschaffen. Diese Wunde wurde durch SAW stimuliert und mit einer unbehandelten, auf demselben Chip befindlichen internen Referenz verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass durch SAW die Migrationsgeschwindigkeit und somit die Wundheilung um bis zu  $15.2\% \pm 1.7\%$  gegenüber einer internen Referenz gesteigert werden konnte. Da auf die Zellkultur nicht nur die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle wirkt, sondern ebenfalls parasitäre Seiteneffekte wie Temperatur, Scherspannungen oder erhöhte Nährstoffversorgung einwirken, wurden diese Einflüsse ebenfalls untersucht und quantifiziert. Hierbei konnten eine ballistische Verschiebung und eine erhöhte Nährstoffversorgung durch die *Leaky*-SAW-induzierte Strömung des Nährmediums ausgeschlossen werden. Die auf die Zellen einwirkenden Scherspannungen in Höhe von  $\tau \leq 0.01 \text{ dyn/cm}^2$  sind ebenfalls in dem untersuchten Leistungsspektrum vernachlässigbar gering. Die bei der SAW-Erzeugung durch Verluste hervorgerufene Substraterwärmung wurde quantifiziert und ein linearer Zusammenhang der Erwärmung zur eingekoppelten Leistung für den hier verwendeten Chip festgestellt. Hierbei wurde unterschieden zwischen einer mit Flüssigkeit unbeladenen (Gl. 5.1) und beladenen (Gl. 5.2) SAW-Chip-Oberfläche:

$$\Delta T = 80 \text{ mK/mW} \Delta P_{\text{IN}} \quad (5.1)$$

$$\Delta T = 37 \text{ mK/mW} \Delta P_{\text{IN}} \quad (5.2)$$

Für die in diesen Arbeiten angelegte maximale Leistung von  $P_{\text{IN}} = 4 \text{ mW}$  konnten temperaturinduzierte Effekte mit einem maximalen Temperaturanstieg von  $\Delta T = 0.34 \text{ K}$  ausgeschlossen werden, da bereits *in vivo* die afebrile Körpertemperatur einer Schwankung von  $\Delta T \approx \pm 1 \text{ K}$  unterliegt. Durch den Ausschluss dieser parasitären Seiteneffekte konnte der Stimulationsmechanismus auf die mechanische oder elektrische Komponente der akustischen Oberflächenwelle eingegrenzt werden.

Da sich eine propagierende akustische Oberflächenwelle auf einem piezoelektrischen Kristall durch eine Vibration des Substrates gekoppelt mit einem elektrischen Feld äußert, kann der Stimulationsmechanismus der Zellen elektrischer oder mechanischer Natur sein. Während die Substratauslenkung bei einer Rayleigh-Welle in z-Richtung bis zu einigen Nanometern beträgt, können Feldstärken bis zu einigen  $\mathcal{O}(\text{kV/cm})$  erreicht werden. Bereits in vorangegangenen Studien wurde bewiesen, dass durch mechanische Vibration die Proliferation um bis zu 35 % - 52 %, aber auch die Proteinsynthese und die Produktion von Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) gesteigert werden können [223]. Neben den mechanisch induzierten Effekten konnten ebenfalls durch elektrische Felder ein erhöhtes Wachstum bei Knochenheilung ( $f = 10 - 90 \text{ Hz}$ ) oder gesteigerte entzündungshemmende Reaktionen ( $f = 27 \text{ MHz}$ ) festgestellt werden [224, 225].

An diese Erkenntnisse anknüpfend wurden für eine Unterscheidung der Stimulationsmechanismen die lateralen E-Felder der akustischen Oberflächenwelle durch das Aufbringen einer leitfähigen Schicht kurzgeschlossen. In den durchgeführten Messungen konnte keine bzw. nur eine geringfügige Änderung der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Dies lässt qualitativ auf eine untergeordnete Rolle des elektrischen Feldes schließen, konnte allerdings aufgrund des experimentellen Designs nicht quantitativ erfasst werden.

Mit diesen Studien wurde bewiesen, dass durch akustische Oberflächenwellen eine Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit für Knochenkrebszellen für die verwendeten SAW-Parameter erreicht werden kann. Die Wellenlänge der Rayleighwelle betrug jeweils  $\lambda_{\text{SAW}} = 25 \mu\text{m}$  bei einem Leistungsspektrum von  $P_{\text{IN}} = [2 \text{ mW}; 4 \text{ mW}]$ . Da die Parameter der SAW durch Variation des Substrates, des IDT-Designs oder der eingekoppelten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  vielfältig geändert werden können, und in den Studien nur eine Zelllinie untersucht worden ist, ergeben sich folgende spannende Fragestellungen:

- Welche Schlüsselparameter der SAW sind verantwortlich für die Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit? Kann durch Variation von  $\lambda_{\text{SAW}}$ ,  $P_{\text{IN}}$  oder der Wellenmode eine effizientere Stimulation erreicht werden?
- Ist die Stimulation mittels SAW neben der SaOs-2 Zelllinie ebenfalls auf weitere Zelllinien anwendbar?
- Welche Beiträge liefert die mechanische bzw. elektrische Komponente der SAW zur Stimulation?
- Welche intrazellulären Mechanismen werden durch die akustische Oberflächenwelle beeinflusst?

Das vorliegende Kapitel beschäftigt sich mit der Beantwortung dieser Fragestellungen. Durch Variation der SAW-Parameter sollen die Schlüsselparameter der akustischen Oberflächenwelle identifiziert und quantifiziert werden. Durch Verwendung der mesodermalen Zelllinie MDCK-II wird das Spektrum durch eine Modellzelle der Epithelschichten erweitert. Zur Feststellung der intrazellulären Mechanismen wird die Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stellvertretend für zellulären Stress, die Zellteilungsrate (Proliferation) und die Abhängigkeit von Membranproteinen während einer SAW-Stimulation vermessen.

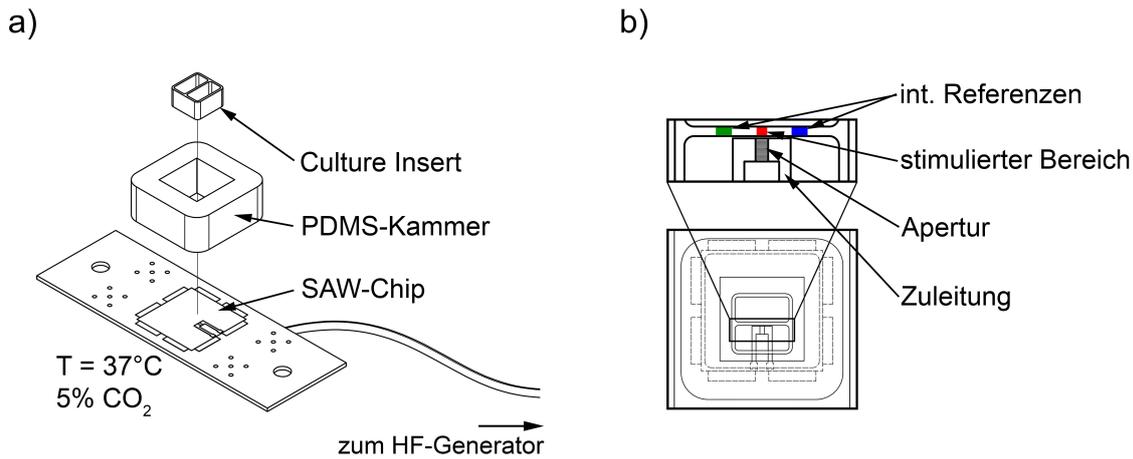
## 5.2. Methoden und Materialien

Einleitend wird der experimentelle Aufbau, die Versuchsdurchführung und die Datenauswertung stellvertretend für alle folgenden Experimente, sofern nicht anderweitig erwähnt, beschrieben. Für eine Standardisierung und exakte Vergleichbarkeit der untersuchten Messgrößen findet jedes Experiment mit einer Zellkultur im Rahmen eines Wound-Healing-Assays statt, wie bereits in *Kap. 3.* beschrieben wurde. Im ersten Abschnitt werden der experimentelle Aufbau und die durch die SAW einwirkenden Einflussgrößen erläutert. Da die hier angewendeten Methoden bereits in vorangegangenen Kapiteln zum Einsatz kamen, werden an dieser Stelle nur die Experiment-spezifischen Details erläutert.

### 5.2.1. Experimenteller Aufbau

Das Kerninteresse der Studie liegt in der Beobachtung des mittels Ultraschall stimulierten Zellwachstums und der Zellmigration. Ein bedeutender Vorteil der SAW-basierten Zellstimulation gegenüber der konventionellen US-Behandlung ist die Möglichkeit der Schallerzeugung direkt am Ort des Zellwachstums. Der verwendete Aufbau ist in *Abb. 5.1. a)* dargestellt und entspricht, abgesehen von der Peripherie und den Eigenschaften des SAW-Chips, dem in *Kap. 3.2.2.* dargestellten Experiment. Abhängig von der geforderten Wellenmode besteht das Substrat des SAW-Chips entweder aus  $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut (LB) für die Rayleigh-Mode (RW) oder aus  $\text{LiTaO}_3$  40° rot YX-Cut (LT) für die Scherwellen (SW). Zur Schallerzeugung wurden zwei verschiedene SIDT-Strukturen verwendet. Die Apertur des IDTs weist für den SAW-Chip 1 eine Periodizität von  $a_1 = 25 \mu\text{m}$  und eine Aperturbreite von  $W_1 = 600 \mu\text{m}$  auf und für den SAW-Chip 2 beträgt  $a_2 = 50 \mu\text{m}$  mit  $W_2 = 650 \mu\text{m}$ . Dies entspricht einer Wellenlänge der SAW  $\lambda_{\text{SAW}}$  von  $\lambda_1 = 25 \mu\text{m}$  bzw.  $\lambda_2 = 50 \mu\text{m}$ . Die anschließende Vorbereitung des Experiments und Bildung des standardisierten Wound-Healing-Assays erfolgt analog zu den in *Kap. 3.* beschriebenen Schritten. Im Gegensatz zu der MDCK-II Zelllinie müssen die nun verwendeten SaOs-2-Zellen für 48 h nach der Zellaussaat inkubiert werden, um einen konfluenten Zellrasen zu bilden. Der nach dem Entfernen des CI produzierte zellfreie Spalt verläuft parallel, mittig, ca.  $d = 50 \mu\text{m}$  entfernt zur Apertur (siehe Draufsicht in *Abb. 5.1. b)*) und kann in einen stimulierten Bereich (rot) und in zwei interne Referenzen (grün und blau) eingeteilt werden.

Die präparierten Versuchsaufbauten werden auf dem Forschungsmikroskop Zeiss Axiovert 200M in einen Mikroskopinkubator gestellt und mit einer HF-Quelle verbunden. Abhängig vom verwendeten Mikroskopinkubator (HT 200 bzw. ibidi Heating System) können entweder eine oder vier Platinen auf dem Mikroskop positioniert werden. Zur Durchführung mehrerer Experimente im Inkubationssystem HT 200 wurde eine zur *Abb. 5.1. a)* modifizierte Leitungsplatine verwendet, in der zwei SAW-Chips montiert werden können (vgl. [60, S.49]). Das HF-Signal wird durch einen Signalgenerator (SML01, Rhode & Schwarz GmbH & Co. KG, München, Deutschland) erzeugt und mittels eines Signalverstärkers (AMP590033H-T, Becker Nachrichtentechnik GmbH, Asbach, Deutschland) verstärkt. Die Aufteilung der Gesamtausgangsleistung in eine äquivalente Eingangsleistung  $P_{\text{IN}}$  je SAW-Chip erfolgt je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden Experimente durch einen Zweifach- (ZFSC-2-4+) oder Vierfach- (ZB4PD-52-20W+) (beide mini-circuits, NY, USA) Leistungsteiler. Zum Schutz des Signalgenerators wird ein 3 dB-Dämpfer (VAT-3+, mini-circuits, NY, USA) am Ausgang des Generators montiert. Phasenkontrastaufnahmen des kompletten Zellrasens jedes SAW-Chips werden mit einem 10 x-Objektiv alle fünf Minuten bis zur kompletten Belegung der zellfreien Fläche automatisch erstellt. In der Regel wird der komplette Spalt in zehn sich überlappenden Einzelpositionen erfasst. Die Ansteuerung der Kamera (Orca 5G, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) und der Mikroskopkomponenten erfolgt über die Software *HCIImage* von Hamamatsu.



**Abbildung 5.1:**

Darstellung des experimentellen Aufbaus und der Datenauswertung. a) Technische Zeichnung des experimentellen Aufbaus. Auf dem Substrat des SAW-Chips befindet sich ein Standard-IDT. Durch die Verwendung eines Culture Inserts wird eine standardisierte künstliche Wunde in unmittelbarer Nähe der Apertur des IDTs erzeugt. b) Draufsicht des experimentellen Aufbaus. Der Abstand Apertur - Zellrasenkante beträgt  $d = 50 \mu\text{m}$ . Der zellfreie Bereich kann in einen stimulierten (rot) und in zwei interne Referenzen (grün, blau) eingeteilt werden. (Grafik entnommen aus [212]).

### 5.2.2. Abschätzung der Schallintensität

In der US-Therapie ist die sogenannte Schallintensität  $I$  ein Maß für die auf das Gewebe einwirkenden Kräfte. Ausgehend von den physikalischen Eigenschaften des Substrates, den Abmaßen des IDTs und der eingekoppelten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  ist es möglich, die erzeugte Schallintensität  $I_{\text{SAW}}$  zu ermitteln. Hierbei wird durch Abschätzung der Verluste zuerst die akustische Leistung  $P_{\text{SAW}}$  der SAW ermittelt und unter Berücksichtigung der  $1/e$ -Abklinglänge  $l_{\text{op}}^{\text{Calc}}$  und Aperturbreite  $W$  die Schallintensität  $I$  berechnet:

Das symmetrische Design des IDTs führt zu einer bidirektionalen Abstrahlung einer SAW und somit zu einer gleichmäßigen Aufteilung der eingekoppelten Leistung  $P_{\text{IN}}$ . Da bei der Resonanzfrequenz  $f_{\text{SAW}}$  typischerweise ein Wert für den Streuparameter  $S_{11}$  von  $S_{11} \geq -18 \text{ dB}$  erreicht wird, ist der reflektierte Anteil der angelegten HF-Leistung vernachlässigbar gering. Die bei der Anregung einer akustischen Oberflächenwelle hervorgerufenen Verluste werden durch die Einfügedämpfung  $IL$  (engl. *insertion loss*) beschrieben und liegen typischerweise bei  $IL \approx 3 \text{ dB}$  [211]. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass unter der Annahme der kompletten Einkopplung der HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  und der jeweiligen Halbierung der Leistung durch Verluste und der bidirektionalen Schallausbreitung die effektive akustische Leistung in eine Richtung auf  $P_{\text{SAW}} \approx \frac{1}{4} P_{\text{IN}}$  abgeschätzt werden kann.

Da die Schichtdicke des den SAW-Chip-benetzenden Materials nicht vernachlässigbar gering ist, unterliegt die SAW aufgrund von Energieabsorption in das Nährmedium einer Dämpfung. Wie in Kap. 2.3.1. beschrieben, führt dies zur sogenannten *Leaky-SAW* mit der Erzeugung einer akustischen Strömung. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 25 \mu\text{m}$  liegt die  $1/e$ -Abklinglänge  $l_{\text{op}}^{\text{Calc}}$  der dominierenden „out-of-plane“-Dämpfung bei  $l_{\text{op}}^{\text{Calc}} = 12.5 \lambda_{\text{SAW}} = 331 \mu\text{m}$  [76]. Unter Berücksichtigung der  $1/e$ -Abklinglänge  $l_{\text{op}}^{\text{Calc}}$ , der Aperturbreite  $W$  und der akustischen Leistung  $P_{\text{SAW}}$  kann für den SAW-Chip 1 die SAW-Intensität wie folgt angenähert werden:

$$I_{\text{SAW}} = P_{\text{SAW}} \frac{(1 - \frac{1}{e})}{W l_{\text{op}}^{\text{Calc}}}. \quad (5.3)$$

Unter Anwendung der Gl. 5.3 folgt eine Intensität von  $I_{\text{SAW}} \approx 80 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$  für  $P_{\text{IN}} = 1 \text{ mW}$  als Referenzwert und  $I_{\text{SAW}} \approx 1 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$  für  $P_{\text{IN}} = 13.6 \text{ mW}$  als Vergleich für die in der Literatur beschriebene maximale Schallintensität [218].

Die Konzeptionierung des SAW-Chip-Designs und der Versuchsdurchführung sind entsprechend folgender Überlegungen gewählt:

- Die Wellenlänge soll mit der Dimension einer gespreiteten Zelle vergleichbar sein.
- Das überprüfte Leistungsspektrum entspricht den Schallintensitäten  $I_{\text{SAW}}$  konventioneller US-Behandlungen.
- Die durch die *Leaky*-SAW induzierte Strömung führt nicht zu einer ballistischen Verschiebung adhärenter Zellen.

### 5.2.3. Charakterisierung des Flussprofils

Für die Charakterisierung eines Flussprofils wird die Methode des *scanning Particle Image Velocimetry* (sPIV) verwendet. sPIV ist ein erweiterter automatisierter Analyseansatz, der auf dem PIVlab-Toolkit von Thielicke basiert [226]. Hierbei wird eine beliebige Fläche größer als der Ausschnitt einer Einzelaufnahme automatisch erfasst. Durch die Auswertung der lokalen Flussprofile an den Einzelpositionen mittels *micro-particle image velocimetry*-Messungen ( $\mu$ PIV, siehe [227]) kann durch die Kombination der Einzelergebnisse mittels Aneinanderreihung und linearer Interpolation auf das Strömungsprofil der globalen Gesamtfläche geschlossen werden. Weitere detaillierte Informationen können der Literatur von Strobl *et al.* entnommen werden [228].

Für die Bestimmung der auf die Zellkulturen einwirkenden Scherspannungen wird das Flussprofil im experimentellen Aufbau  $25 \mu\text{m}$  über der Substratoberfläche bestimmt. Als Tracerpartikel werden  $3 \mu\text{m}$  Mikrokügelchen (Polybead<sup>®</sup>, Polysciences Inc., Hirschberg an der Bergstraße, DE) im Nährmedium verwendet. Zur Vermeidung der Partikel-Agglomerationen werden 3% BSA (w/w) (Albumin bovine Fraction V, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE) der Lösung beigelegt. Auf einer Gesamtfläche von  $A = 600 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$  wurden jeweils an den Einzelpositionen 50 Aufnahmen mit einem 20x-Objektiv in der Hellfeld-Mikroskopie bei einer Bildrate von 2000 fps mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (FASTCAM 1024PCI, Photron, Pfullingen, DE) erstellt.

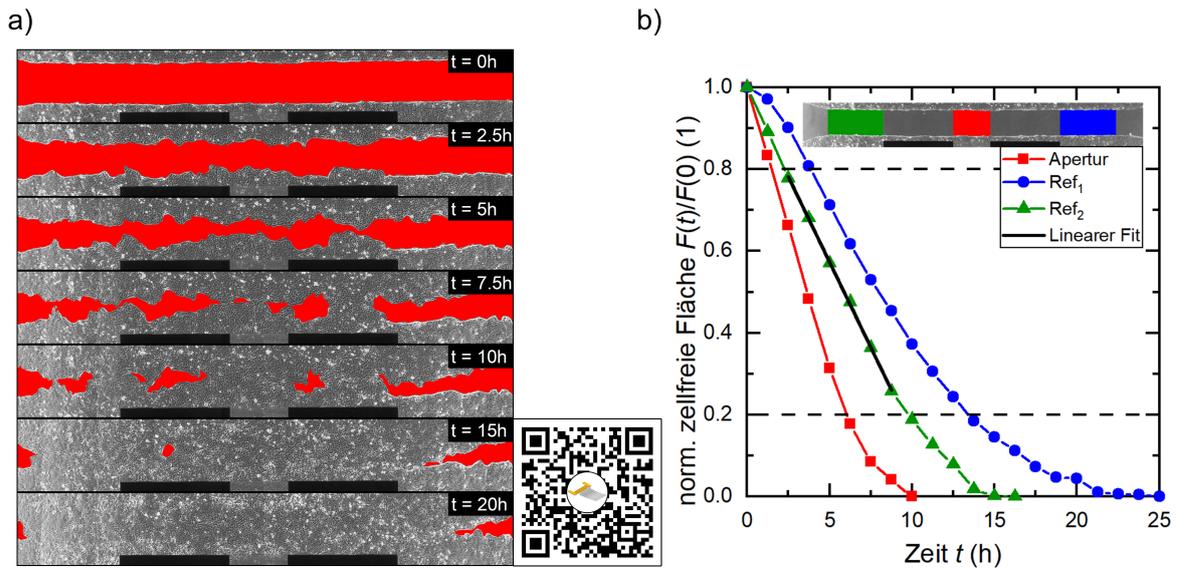
### 5.2.4. Datenanalyse

#### Wound-Healing-Assay

In den in Abb. 5.2. a) dargestellten Aufnahmen ist eine typische Migration von MDCK-II-Zellen in die zellfreie Fläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Die verstrichene Zeit nach dem Entfernen des *Culture Inserts* und dem Aufnahmezeitpunkt ist jeweils rechts markiert. Durch die Geometrie des IDTs ist die Schallpfadbite der akustischen Oberflächenwelle auf die Aperturbite scharf abgegrenzt [229]. Daher werden nur Zellen im Schallpfad vor und auf der Apertur des IDTs durch die SAW beeinflusst. Der zellfreie Bereich im Schallpfad des IDTs wird im Folgenden als *Apertur* bezeichnet. Durch diesen wohldefinierten Bereich der aktiven Stimulation kann eine unbehandelte *interne Referenz* ( $Ref_1$  und  $Ref_2$ ) neben den elektrischen Zuleitungen des IDTs und somit außerhalb des Schallpfades definiert werden. Im Einschub der Abb. 5.2. b) ist die Zuordnung der auszuwertenden Flächen farblich kodiert (rot: *Apertur*, blau:  $Ref_1$ , grün:  $Ref_2$ ). Mit dieser Herangehensweise kann der Einfluss der SAW auf das Zellwachstum mit einer Referenz verglichen werden, die unter nahezu identischen Bedingungen (z. B. Nährstoffangebot, Zelldichte, Zellviabilität oder Temperatur) kultiviert wird. Zur Bestimmung des wissenschaftlichen Inhalts der Phasenkontrastaufnahmen wird die zellfreie Fläche  $F(t)$  für jeden Bereich als Funktion der Zeit  $t$  analysiert. Zur Sicherstellung einer qualitativ hochwertigen Auswertung erfolgt die Detektion der zellfreien Fläche halbautomatisch durch das modifizierte ImageJ-Macro

„MRI-Wound-Healing tool“ analog zu *Kap. 3.2.4.*. Die mit der Zeit schrumpfende Fläche  $F(t)$  wird auf die zellfreie Fläche nach Entfernen des *Culture Inserts*  $F(0)$  zu Beginn des Experiments normiert. In einem Wound-Healing-Assay migrieren Zellen mit einer nahezu konstanten Geschwindigkeit in den zellfreien Bereich [127]. Die zeitliche Entwicklung von  $F(t)$  kann somit durch einen linearen Verlauf angenähert werden. Da Zellen aufgrund der für die Migration notwendigen Polarisation ihrer Struktur anfangs noch keine konstante Geschwindigkeit besitzen und die komplette Belegung der zellfreien Fläche verzögert erreicht wird, wird nur der Bereich zwischen  $0.2 \leq F(t)/F(0) \leq 0.8$  für die Annäherung herangezogen. Die durch die lineare Annäherung erhaltene Größe der Steigung beschreibt die Flächenbelegungsrate  $A_{\text{mig}}$  der Zellen und wird in der Einheit  $[\frac{\%}{\text{h}}]$  angegeben. Eine beispielhafte Auswertung eines Wound-Healing-Assay ist in *Abb. 5.2. b)* dargestellt.

Da es sich bei der Untersuchung des Wachstums adhärenter Zellen um ein biologisches System handelt, können systematische Fehler nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Bei der Versuchspräparation und deren Durchführung wird insbesondere Wert auf die Einhaltung konstanter zeitlicher Abfolgen und gleichbleibender Vorbereitungsschritte gelegt, um möglichst identische Startbedingungen zu erhalten. Allerdings können Fluktuationen von zellbiologischen Faktoren wie Zelldichte oder Zellviabilität nicht komplett vermieden werden. Dies kann zu Schwankungen in den Absolutwerten der Flächenbelegungsrate  $A_{\text{mig}}$  führen. Um diese systematischen Fehler auf ein Minimum reduzieren zu können, erfolgt die Gegenüberstellung der Flächenbelegungsrate in Abhängigkeit der Einflussgrößen der SAW durch Bildung eines Relativwertes  $A_{\text{Ap.}}/A_{\text{int. Ref.}}$ . Hierbei wird in einer Probe das Verhältnis zwischen der Flächenbelegungsrate  $A_{\text{Ap.}}$  (Apertur) im stimulierten Bereich und dem Mittelwert  $A_{\text{int. Ref.}}$  der internen Referenzen gebildet und wird im Folgenden als Stimulationseffizienz, kurz Effizienz  $E$ , bezeichnet. Die im Regelfall aus vier Einzelmessungen ermittelten Verhältnisse werden anschließend in Abhängigkeit der SAW-Parameter als Mittelwert zusammengefasst. Bei der Ermittlung der Mittelwerte wird jeweils das Gaußsche Fehlerfortpflanzungsgesetz angewendet. Für die Ermittlung des zweiseitigen Signifikanzniveaus wird der *Zweistichproben-t-Test* unter der Annahme gleicher Varianzen in der Software *Excel* (Microsoft Co. Washington, USA) verwendet und mit einer unbehandelten externen Referenz verglichen.

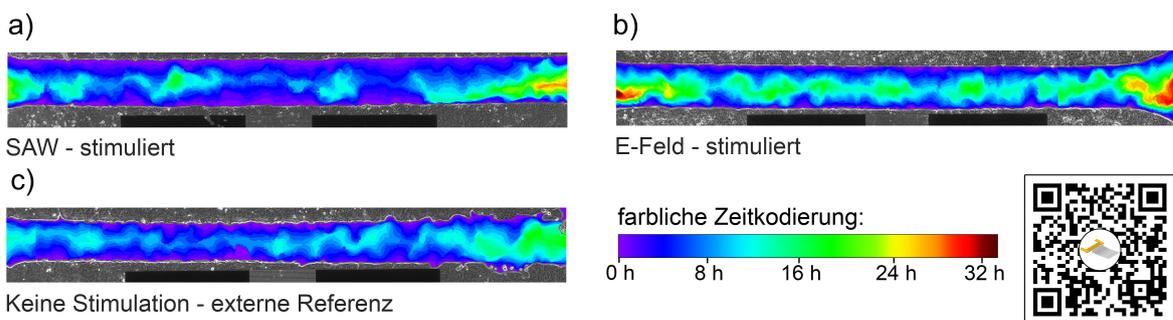


**Abbildung 5.2:**

Auswertung eines Wound-Healing-Assay mit MDCK-II-Zellen. a) Phasenkontrastaufnahmen zu bestimmten Zeitpunkten während der Zellmigration. Die zellfreie Fläche ist in rot gekennzeichnet. b) Zeitabhängige Abnahme der normierten zellfreien Fläche in den verschiedenen Messbereichen (rot: stimulierter Bereich, grün/blau: interne Referenzen). Der Bereich zwischen  $0.2 \leq F(t)/F(0) \leq 0.8$  wird durch einen linearen Fit angenähert. Dessen Steigung gibt Auskunft über die Flächenbelegungsrate  $A_{mig}$ . Der Wundheilungsprozess kann im Zeitraffer über den Online-Link mittels QR-Code<sup>a</sup> beobachtet werden. (Grafik und Daten entnommen aus [212]).

<sup>a</sup>Link zum Video: [https://youtu.be/qENJlrc\\_p8kw](https://youtu.be/qENJlrc_p8kw)

Die in die Auswertung einbezogenen Daten müssen des Weiteren gewisse Qualitätsvoraussetzungen erfüllen. In Abb. 5.3. a)-c) ist ein Überlagerungsbild, bestehend aus mehreren Aufnahmen für unterschiedliche SAW-Parameter, dargestellt. Während die Aufnahmen in a) und b) einen konfluenten und gleichmäßigen Zellrasen aufweisen, ist in c) die rechte Seite des Spalts und somit Ref<sub>1</sub> nur ungenügend bewachsen. Diese externe Referenz erfüllt nicht die Bedingung der notwendigen Konfluenz und wird daher nicht in die Gesamtbewertung mit einbezogen.



**Abbildung 5.3:**

Überlagerte Einzelaufnahmen eines Wundheilungsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten. Die unterschiedlichen Zeitpunkte sind im Farbspektrum des sichtbaren Lichts kodiert. Exemplarische Darstellung der Auswertungskriterien: a)/b) bilden einen konfluenten Zellrasen und erfüllen die Anforderungen, während die rechte Referenz in c) durch den inhomogenen Zellrasen ausgeschlossen werden muss. Der dynamische Entwicklungsprozess der farbkodierten Aufnahme kann über den Online-Link mittels QR-Code<sup>a</sup> betrachtet werden. (Grafik entnommen aus [212]).

<sup>a</sup>Link zum Video: <https://youtu.be/XMkuasMBnEw>

### 5.3. SAW-unterstützte Wundheilung bei Osteosarkomzellen *in vitro*: Identifizierung der Schlüsselparameter

---

*Die Effizienz der SAW-Stimulation ist eindeutig abhängig von den physikalischen Parametern der akustischen Oberflächenwelle. Die Wellenlänge der SAW muss in der Größenordnung der Ausdehnung einer Zelle liegen und es ist eine vertikale Substratauslenkung notwendig. Die Stimulationseffizienz ist stark von der eingekoppelten Leistung und dem Tastverhältnis des Signals abhängig.*

---

Nach der erfolgreichen Demonstration der positiven Zellstimulation durch akustische Oberflächenwellen in den vorangegangenen Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit *Stefan Gerlach* [230] und *Florian Röder* [231] überprüft, welche Parameter der SAW für diesen Effekt verantwortlich sind. In der vorangegangenen Publikation von *Stamp, Brugger et al. (2016)* wurde eine Stimulationseffizienz von SaOs-2-Zellen von  $15.2\% \pm 1.7\%$  unter Verwendung konstanter Rayleigh-Wellen bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 25\ \mu\text{m}$  festgestellt. Die hohe Variabilität der SAW-Anregung wirft die Frage auf, welche Parameter den größten Einfluss auf die Zellstimulation aufweisen und ob eine Erhöhung der Stimulationseffizienz  $E$  durch Anpassung und Feinjustierung der Parameter erreicht werden kann. Die physikalischen Eigenschaften der akustischen Oberflächenwelle hängen von der Auswahl des piezoelektrischen Substrates, dessen Kristallschnitt und des Designs und der Orientierung der IDT-Struktur ab. Im Folgenden wird anhand der SaOs-2-Zelllinie der Einfluss der SAW auf die Zellstimulation bei Variation der Wellenmode, der Wellenlänge, der eingekoppelten Leistung und der zeitlichen Ausprägung durch Amplitudenmodulation untersucht. Zunächst wird durch Verdoppelung der Wellenlänge  $\lambda_{\text{SAW}}$  bei RW auf  $\lambda_{\text{SAW}} = 50\ \mu\text{m}$  die Effizienz  $E$  in einem ausgedehnten Leistungsspektrum  $P_{\text{IN}} \in [4\ \text{mW}; 64\ \text{mW}]$  untersucht. Anschließend wird neben der bereits bekannten Rayleigh-Welle die Stimulationseffizienz  $E$  von Scherwellen in einem Leistungsspektrum von  $P_{\text{IN}} \in [4\ \text{mW}; 8\ \text{mW}]$  ermittelt. Zuletzt sollen durch Amplitudenmodulation der akustischen Oberflächenwelle Druckschwankungen generiert werden, um physiologische Randbedingungen näherungsweise zu imitieren. In allen Messungen repräsentieren die Fehlerbalken typischerweise die Standardabweichung von vier unabhängigen Proben. In den Grafiken der *Abb. 5.4.* sind die Ergebnisse der Stimulationseffizienz  $E$  bei unterschiedlichen SAW-Parametern aufgeführt. Die Resonanzfrequenzen, die Wellenmoden und -form sind im Folgenden in den Abbildungen als Grafik dargestellt.

#### *Wellenlänge und Leistung*

Die Verdopplung der Wellenlänge von  $\lambda_1 = 25\ \mu\text{m}$  auf  $\lambda_2 = 50\ \mu\text{m}$  führt bei der ersten Messung zu einer Verringerung der Resonanzfrequenz auf  $f_{\text{SAW},2} = 77\ \text{MHz}$ . *Abb. 5.4. a)* zeigt die Stimulationseffizienz  $E$  in Abhängigkeit der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$ . Während bei niedrigen Leistungen kein Einfluss der SAW auf das Zellwachstum feststellbar ist, erreicht die Effizienz ihr Maximum mit  $E = 1.13 \pm 0.04$  bei  $P_{\text{IN}} = 8\ \text{mW}$ , was eine leicht, aber signifikant erhöhte Migrationsrate darstellt. Durch eine weitere Erhöhung der SAW-Intensität wird jedoch eine Unterdrückung der Zellmigration festgestellt. Dies führt bei sehr hohen Leistungen ( $P_{\text{IN}} = 64\ \text{mW}$ ) zu einer Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit um bis zu 20%. Der erreichte Maximalwert  $E$  bei  $P_{\text{IN}} = 16\ \text{mW}$  ist somit leicht geringer als die Effizienz bei  $\lambda_1 = 25\ \mu\text{m}$  mit  $E = 1.17 \pm 0.04$  bei einer niedrigeren Leistung von  $P_{\text{IN}} = 4\ \text{mW}$ .

#### *Wellenmode*

Die Ergebnisse, dargestellt in *Abb. 5.4. b)*, beantworten die spannende Fragestellung, ob SW den gleichen Einfluss auf das Zellwachstum haben wie RW. Im Gegensatz zur erfolgreichen Stimulation

mit RW bei  $P_{\text{IN}} = 4 \text{ mW}$  kann bei SW mit einer planen horizontalen Auslenkung des Substrates kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Die nicht signifikante Effizienz liegt nur bei  $E = 1.08$ .

#### *Gepulste Anregung*

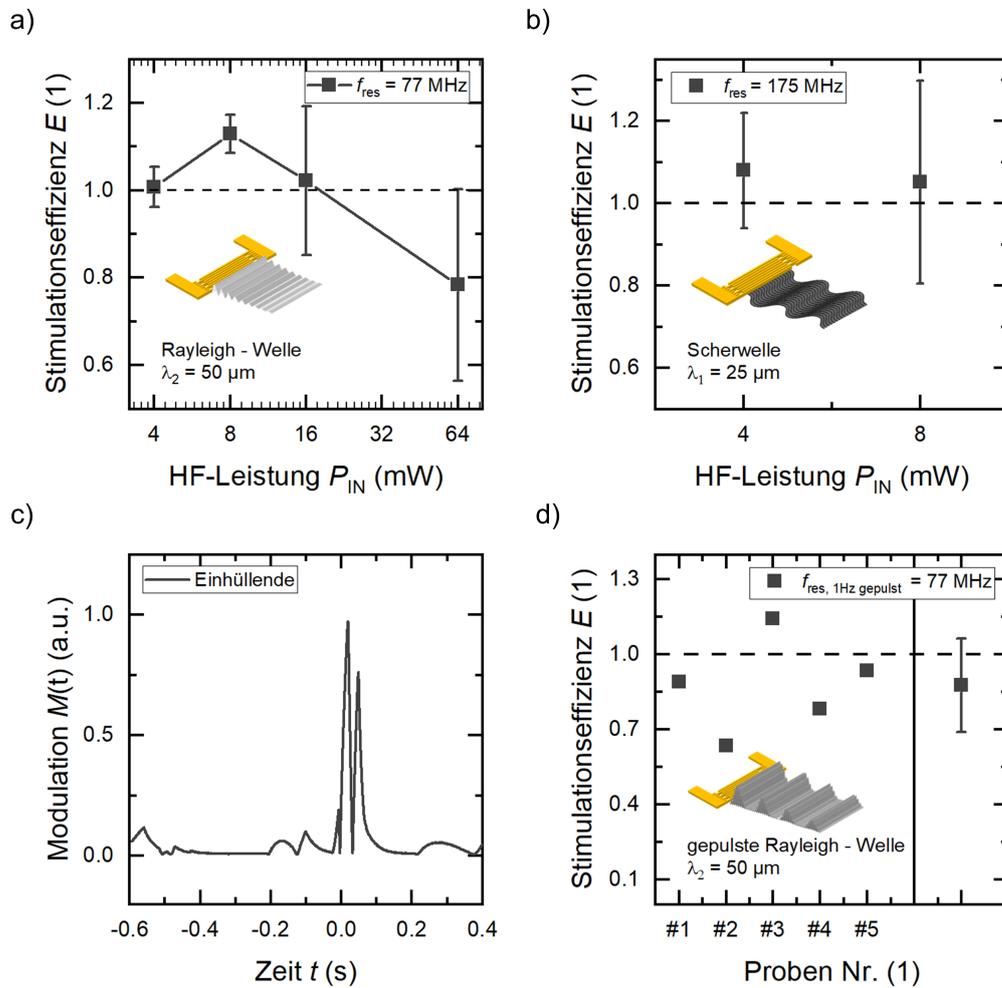
Zellen sind in einem komplexen Organismus in der Regel stetigen Druckschwankungen ausgesetzt. Durch Amplitudenmodulation des SAW-Signals, deren Einhüllende dem Betrag des Elektrokardiogramms eines menschlichen Herzens entspricht, sollen die im menschlichen Organismus herrschenden physiologischen Druckschwankungen imitiert werden. Hierbei wird die Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}} = 77 \text{ MHz}$  mit den Absolutwerten der in *Abb. 5.4. c)* dargestellten kardialen Funktion  $M(t)$  moduliert. Die Modulationsfrequenz entspricht mit  $f_{\text{mod}} = 1 \text{ Hz}$  oder 60 Wiederholungen pro Minute in etwa dem typischen Ruhepuls eines Menschen. Während der Maximalwert  $P_{\text{IN}} = 16 \text{ mW}$  beträgt, liegt der mittlere Leistungsdurchschnitt bei  $\bar{P}_{\text{IN}} = 1 \text{ mW}$ . Das eingestellte Puls-Signal deckt somit einen Leistungsbe-  
reich zwischen  $0 \text{ mW} \leq P_{\text{IN}} \leq 16 \text{ mW}$  ab. Dies entspricht exakt dem in *Abb. 5.4. a)* dargestellten Bereich, in welchem eine erhöhte Effizienz  $E > 1$  für RW festgestellt wurde.

Bei den in *Abb. 5.4. d)* abgebildeten fünf Einzelmessungen weist nur eine Messung einen leicht erhöhten Effekt auf, während im Mittel das Wachstum der Proben im Schallpfad eindeutig gegenüber der Referenz reduziert ist. Im Gegensatz zur permanenten Stimulation, liegt für eine gepulste SAW kein oder ein anscheinend negativer Einfluss auf das Zellwachstum vor.

Die hier vorgestellten Daten demonstrieren die hohe Abhängigkeit der Stimulationseffizienz  $E$  von den physikalischen Eigenschaften der akustischen Oberflächenwelle. Eine fehlende vertikale Substratauslenkung, ein gepulstes Signal oder eine Vergrößerung der Wellenlänge führen nicht zu einer erhöhten Effizienz. Allerdings verbleibt die Frage, ob die Stimulation aufgrund der mechanischen Vibration oder der elektrischen Felder der SAW hervorgerufen wird. Darüber hinaus belegen die Daten eine starke Leistungsabhängigkeit der Effizienz. Während bei niedrigen Intensitäten offenbar die positive Stimulationsmechanismen überwiegen, führen bei Leistungen ab  $P_{\text{IN}} = 64 \text{ mW}$  die durch die SAW-Anregung auftretenden negativen Einflüsse vermutlich zu einer Unterdrückung des Wachstums. Dies kann unter anderem durch den Zusammenhang der Substraterwärmung mit der eingekoppelten Leistung erklärt werden. Für einen IDT mit einer Wellenlänge von  $25 \mu\text{m}$  wurde bereits in vorangegangenen Studien bewiesen, dass die Substrattemperatur im flüssigkeitsbedeckten Zustand mit  $\Delta T/\Delta P = 37 \text{ mK/mW}$  linear mit der Leistung  $P_{\text{IN}}$  ansteigt. Dies führt unter der Annahme der identischen Wärmeentwicklung für  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 64 \text{ mW}$  zu einem theoretischen Temperaturanstieg von bis zu  $\Delta T = 2.4 \text{ K}$ . Dies übersteigt die afebrile Temperaturschwankung und kann somit zu einer Beeinträchtigung der Zellen führen.

Für eine Maximierung des Effektes und zum Erreichen einer möglichst effizienten Stimulation durch akustische Oberflächenwellen, ist es notwendig, eine Optimierung der SAW-Parameter durchzuführen. Befindet sich die Wellenlänge in der Größenordnung eines Zelldurchmessers ( $\lambda_1 = 25 \mu\text{m}$ ) und weist die Wellenmode eine zur Oberfläche vertikale Auslenkung auf, so wird im Fall der SaOs-2-Zellen eine maximale Stimulationseffizienz  $E = 1.17 \pm 0.04$  bei niedrigen Leistungen  $\mathcal{O}(10^0 \text{ mW})$  erreicht.

Die hier durchgeführte Studie untersuchte jedoch nur die Auswirkungen der Behandlung auf die Knochenkrebszellen der SaOs-2-Zelllinie. Für eine weitere Beleuchtung des beobachteten Effekts ist die Untersuchung weiterer Zellenlinien wie beispielsweise der Epithelzellen *MDCK-II* von großem Interesse. Für die Identifikation der Stimulationsursache ist es zudem notwendig, die Einflüsse elektrischer Felder gegenüber der SAW-Stimulation abzuschätzen. Des Weiteren trägt eine Untersuchung intrazellulärer Mechanismen wie Proliferation, zellulärer Stress und Enzymaktivität während einer SAW-Behandlung zum Verständnis bei.

**Abbildung 5.4:**

SAW-stimuliertes Zellwachstum bei der Variation der physikalischen Eigenschaften der SAW. a) Stimulation bei verschiedenen Leistungen unter Einfluss einer Rayleigh-Welle mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{SAW} = 50 \mu\text{m}$  (Mittelwert und Standardabweichung ermittelt aus jeweils vier Einzelmessungen). b) Effizienz einer Scherwelle auf das Zellwachstum. c) Amplitudenmoduliertes Signal für die gepulste Zellstimulation, dargestellt in d). Die durchschnittliche Zeit für die komplette Flächenbelegung durch SaOs-2-Zellen betrug ca. 60 h. (Daten entnommen aus [212]).

## 5.4. Ultraschallstimulierte kollektive Zellmigration im Rahmen der Wundheilung

*Die SAW-Stimulation führt in einem schmalen Leistungsbereich zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit bei weiteren Zelltypen. Durch den Ausschluss von Artefakten wie Temperatur, Strömung oder elektrischen Feldern kann die Stimulationsursache auf die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle zurückgeführt werden.*

Die erfolgreiche Identifizierung der relevanten SAW-Parameter zur effizienten Stimulation einer Zellkultur hebt die vielversprechende Bedeutung der SAW-gestützten Therapie hervor. Durch die Vielfältigkeit des menschlichen Organismus stellt sich die spannende Frage, ob diese Technologie als potentieller Kandidat für eine unterstützte Knochenregeneration in der zukünftigen Implantatforschung auch bei der Wundheilung von Läsionen des Epithels oder weiterer Gewebetypen, bei denen ein erhöhtes Zellwachstum notwendig ist, angewendet werden kann. Daher wird nun die Studie durch die Stimulation von Epithelschichten erweitert. Wie in *Kap. 2.1.5.* beschrieben, ist die MDCK-II-Zelllinie eine optimale Modellzelle für Epithelschichten. In ihrer Funktion und Morphologie zur SaOs-2 verschieden, dient sie dem Zweck unterliegendes Gewebe zu trennen, zu bedecken und zu schützen. Daher weist sie eine starke Ausprägung fester Verbindungsstrukturen (engl. *tight junctions* / lat. *zonula occludens*) auf, wodurch ein hoher Zell-Zell-Kontakt und somit eine geschlossene und kollektive Zellmigration vorliegt. In diesem Abschnitt soll nun neben der Untersuchung der Stimulationseffizienz für MDCK-II-Zellen auch der Beitrag der mechanischen und elektrischen Komponente der SAW untersucht werden, um einen Rückschluss auf die Stimulationsursache ziehen zu können.

### 5.4.1. Stimulation von Epithelzellen

Für die Untersuchung eines Wound-Healing-Assays mit MDCK-II-Zellen wird die Probenvorbereitung und Experimentdurchführung analog zu den Schritten des *Kap. 5.2.* durchgeführt. Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse der relevanten Schlüsselparameter des SAW-Chips wird als Substrat LB für die RW-Mode, eine Periodizität von  $a_1 = 25\ \mu\text{m}$  und eine Aperturbreite von  $W_1 = 600\ \mu\text{m}$  verwendet. Die experimentell bestimmte Resonanzfrequenz des SAW-Chips  $f_{\text{res}}$  liegt unter Massenbelag somit bei  $f_{\text{res}} = 164\ \text{MHz}$ . Zur Überprüfung der Stimulationseffizienz  $E$  wird das Zellwachstum in einem Leistungsspektrum von  $P_{\text{IN}} \in [1\ \text{mW}; 64\ \text{mW}]$  bei einer kontinuierlichen SAW untersucht.

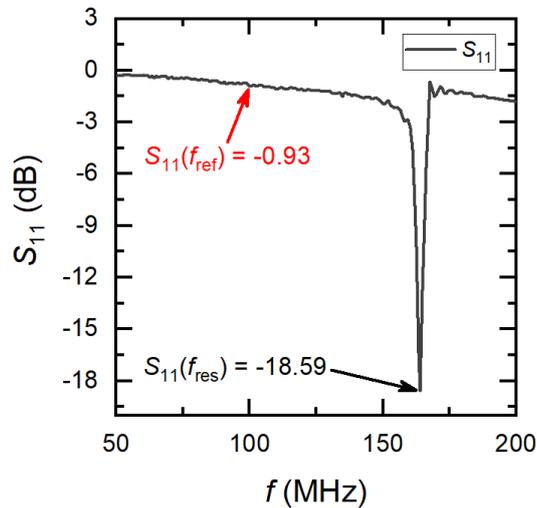
Durch die HF-Signaleinkopplung entsteht zwischen den Elektroden des IDTs und in der fortschreitenden piezoaktiven SAW ein elektrisches Wechselfeld in der Größenordnung  $\mathcal{O}(1\ \text{kV/cm})$ . Zur quantitativen Abschätzung der elektrischen Feldstärke einer propagierenden SAW kann mittels des von *Datta* 1986 beschriebenen Modells das Oberflächenpotential  $\Phi$  einer SAW durch die akustische Leistung  $P_{\text{SAW}}$  berechnet werden [232]:

$$P_{\text{SAW}} = \frac{1}{2} \frac{W}{\lambda_{\text{SAW}}} y_0 |\Phi|^2. \quad (5.4)$$

$y_0$  beschreibt die materialabhängige Admittanz und beträgt für  $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut  $y_0 = 0.21\ \text{mS}$ . Dies ergibt für das nun untersuchte Leistungsspektrum ein Oberflächenpotential von  $\Phi = 0.3\ \text{V}$  für  $P_{\text{IN}} = 1\ \text{mW}$  bis zu  $\Phi = 2.4\ \text{V}$  für  $P_{\text{IN}} = 64\ \text{mW}$ . Somit werden Zellen durch die propagierende SAW entlang des Schallpfades durch ein elektrisches Feld beeinflusst. Des Weiteren kann der IDT als Dipoltransmitter angesehen werden, durch den Zellen in seiner Nähe in dem entstehenden elektrischen Feld, hervorgerufen durch das angelegte HF-Signal, stimuliert werden.

Um nun die Beiträge der mechanischen und elektrischen Komponente der SAW zur Zellstimulation zu identifizieren, wird die Stimulationseffizienz  $E(P_{\text{IN}})$  neben der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$  zusätzlich bei einer Referenzfrequenz  $f_{\text{ref}}$  mit  $f_{\text{ref}} = 100\ \text{MHz}$  im identischen Leistungsspektrum ermittelt. Wie in *Abb. 5.5.* für einen SAW-Chip (LB,  $\lambda_1 = 25\ \mu\text{m}$ ) beispielhaft dargestellt, ist der Streuparameter  $S_{11}$

eines SAW-Chips stark frequenzabhängig und  $f_{\text{ref}}$  liegt weit abseits der Anregungsfrequenz. Bei der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$  wird in einem schmalen Intervall der Minimalwert von  $S_{11}(f_{\text{res}}) = -18.59$  dB erreicht und weist auf eine sehr ausgeprägte Rückflussdämpfung hin. Im Gegensatz hierzu wird bei der Referenzfrequenz  $f_{\text{ref}}$  nahezu die komplette eingekoppelte HF-Leistung reflektiert ( $S_{11}(f_{\text{ref}}) = -0.93$  dB). Somit wird bei  $f_{\text{ref}}$  an der IDT-Struktur ein der SAW-Anregung ähnliches elektrisches Feld erzeugt, jedoch keine akustische Oberflächenwelle emittiert.



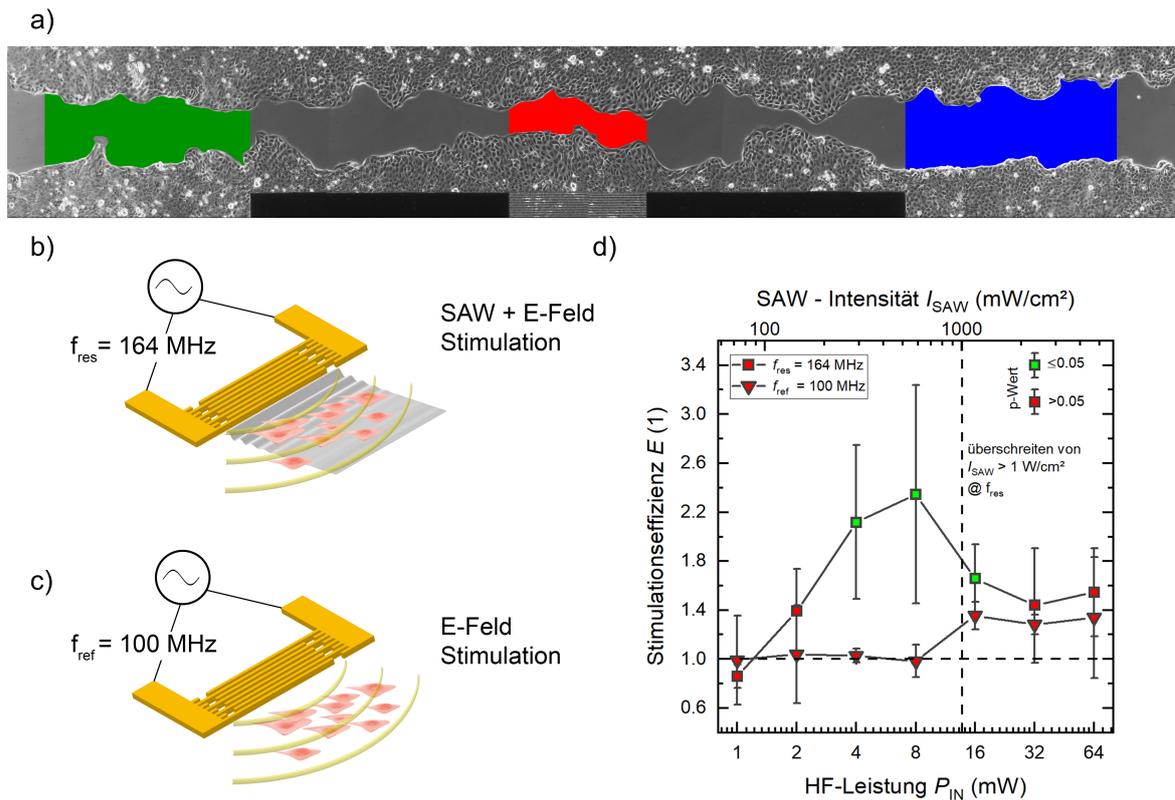
**Abbildung 5.5:**  
Frequenzabhängige Streuparameter  $S_{11}$  eines unbeladenen SAW-Chips. Während bei  $f = f_{\text{res}}$  eine SAW angeregt wird, werden Zellen bei  $f = f_{\text{ref}}$  nur durch das anliegende elektrische Feld stimuliert.

Die Phasenkontrastaufnahme in *Abb. 5.6. a)* zeigt ein Wound-Healing-Assay mit MDCK-II-Zellen fünf Stunden nach Entfernung des CI und Aktivierung der SAW. Im Gegensatz zu SaOs-2-Zellen migrieren die MDCK-II-Zellen im Kollektiv und bilden eine deutliche Zellrasenkante ab. Wie bereits definiert, bilden die farblich kodierten Bereiche die *Apertur* (rot) und die *internen Referenzen* (grün und blau) ab. Durch den Vergleich dieser Bereiche ist in dieser Aufnahme bereits die durch SAW induzierte erhöhte Zellmigration in der Umgebung der Apertur gegenüber den Referenzen ersichtlich.

Die beiden Grafiken in *Abb. 5.6. b)/c)* illustrieren die auf die Zellkultur einwirkenden Stimulationsmechanismen. Bei der Resonanzfrequenz  $f = f_{\text{res}}$  werden adhärenente Zellen im Schallpfad des SAW-Chips durch eine mechanische Vibration des Substrates und durch ein elektrisches Wechselfeld stimuliert (*Abb. 5.6. b)*), während bei der Referenzfrequenz  $f = f_{\text{ref}}$  nur ein elektrisches Feld vorliegt (*Abb. 5.6. c)*).

In der *Abb. 5.6. d)* zeigt die Stimulationseffizienz  $E(P_{\text{IN}})$  einen deutlichen Anstieg für einen Leistungspegel  $P_{\text{IN}}$  im Bereich  $P_{\text{IN}} \in [4 \text{ mW}; 16 \text{ mW}]$ . Bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 8 \text{ mW}$  wird der Maximalwert erreicht, bei der das Zellwachstum im SAW-stimulierten Bereich um das  $2.35 \pm 0.73$ -fache gegenüber der Referenz erhöht ist. Die nach dem zweiseitigen  $t$ -Test errechneten  $p$ -Werte betragen in diesem Bereich  $p_{4 \text{ mW}} = 0.02$ ;  $p_{8 \text{ mW}} = 0.03$  und  $p_{16 \text{ mW}} = 0.03$  und bestätigen einen signifikanten Anstieg gegenüber einem 5%-Signifikanzniveau. Ein weiterer Anstieg der SAW-Intensität  $I_{\text{SAW}}$  über  $1 \text{ W/cm}^2$  führt zu einer Abnahme der Effizienz  $E$ . Dies stimmt exakt mit den bereits erwähnten Grenzwerten für die konventionelle US-Therapie überein [219]. Ab einer Leistung von  $P_{\text{IN}} \geq 32 \text{ mW}$  ist keine signifikante Erhöhung von  $E$  mehr feststellbar, was auf eine Umkehr des positiven Einflusses hin zu einer schädlichen Einwirkung schließen lässt. Bei Leistungen über  $P_{\text{IN}} \geq 128 \text{ mW}$  ist ein deutliches Einsetzen einer Apoptose anhand einer morphologischen Veränderung der Zellkultur und Ablösen der Zellen vom Substrat ersichtlich. In keinem der durchgeführten Experimente wurde für Leistungen  $P_{\text{IN}} \geq 2 \text{ mW}$  bei  $f_{\text{res}}$  in der internen Referenz ein gegenüber dem stimulierten Bereich erhöhtes Zellwachstum festgestellt.

Im Gegensatz zur offensichtlich SAW-induzierten Erhöhung von  $E$  ist kein Effekt bei der Referenzfrequenz  $f_{\text{ref}}$  ersichtlich, obwohl ein zu  $f_{\text{res}}$  vergleichbares elektrisches Feld vorliegt. Für einen weiten Leistungsbereich ist das Zellwachstum im Schallpfad identisch zum Wachstum in der Referenz, wodurch  $E \approx 1$  ist. Erst bei einer Leistung ab  $P_{\text{IN}} \geq 16 \text{ mW}$  ist ein schwacher Effekt in den Referenzmessungen messbar. Jedoch wird für keinen Messwert das erforderliche Signifikanzniveau von 5 % erreicht. Der Anstieg bei hohen Leistungen kann auf die stark gedämpfte Anregung einer SAW auch abseits der Resonanzfrequenz zurückgeführt werden. Bei der großen Differenz zwischen  $S_{11}(f_{\text{res}})$  und  $S_{11}(f_{\text{ref}})$  von 18 dB kann die SAW-Anregung bei niedrigen Leistungen vernachlässigt werden. Bei steigender Leistungseinkopplung kann dies jedoch zu einer schwachen, aber nicht mehr vernachlässigbaren SAW-Anregung führen.



**Abbildung 5.6:**

SAW-stimuliertes Zellwachstum der ektodermalen Zelllinie MDCK-II. a) Hochauflösende Phasenkontrastaufnahme des zellfreien Bereichs zum Zeitpunkt  $t = 5 \text{ h}$ . Deutlich sichtbar ist die progressive Migration des konfluenten Zellrasens in den Spalt. Die farbigen Bereiche markieren den im Schallpfad befindlichen stimulierten Bereich „Apertur“ (rot) und die außerhalb gelegenen, unbehandelten internen Referenzen (grün, blau) b),c) Repräsentation der unterschiedlichen Stimulationsmechanismen bei unterschiedlichen Frequenzen  $f$ . Während bei der Resonanzfrequenz  $f_{\text{res}}$  adhärenente Zellen einer mechanischen und elektrischen Stimulation durch die SAW unterliegen (b)), wird durch Verstimmung der HF-Frequenz zur Referenzfrequenz  $f_{\text{ref}}$  keine SAW emittiert. Zellen werden somit nur durch das elektrische Wechselfeld beeinflusst (c). d) Leistungsabhängige Stimulationseffizienz  $E(P_{\text{IN}})$  bei unterschiedlichen Frequenzen. Signifikante Verbesserung des Zellwachstums um bis zu 135 % durch SAW-Behandlung bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 4 \text{ mW}$  und  $8 \text{ mW}$ . Überschreitung von  $I_{\text{SAW}} = 1 \text{ W}/\text{cm}^2$  führt zur Abnahme von  $E$ . Bei  $f_{\text{ref}}$  ist kein sichtbarer Effekt feststellbar. Ein signifikanter Anstieg der Stimulationseffizienz  $E$  ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur externen Referenz wird durch die mittlere Symbolfarbe repräsentiert. Die mittlere Zeit zur kompletten Flächenbelegung betrug bei MDCK-II-Zellen ca. 31 h. (Daten entnommen aus [212]).

Die hier gefundenen Erkenntnisse werden durch die beispielhaft dargestellten überlagerten Einzelaufnahmen in *Abb. 5.3. a)-c)* belegt. Die hier dargestellten Aufnahmen beschreiben den Wundheilungsprozess in einer SAW- (*a*) und E-Feld- (*b*) stimulierten Probe sowie einer externen Referenz (*c*) zu diskreten Zeitpunkten ( $\Delta t = 1.5 h$ ). Die im Spalt dargestellten Farben beschreiben die verbleibende zellfreie Fläche zum Zeitpunkt  $t$ . Dem Farbspektrum des sichtbaren Lichts folgend, wechselt die Farbe mit zunehmender Belegungsdauer von violetten Farbtönen, stellvertretend für eine rasche Zellbelegung, bis hin zu roten Farbtönen für eine langsame Zellbelegung. Die SAW-stimulierte Probe (*a*) weist im Gegensatz zur internen Referenz vor der Apertur ausschließlich violette bzw. blaue Farbtöne auf. Dies deutet auf eine hohe Migrationsgeschwindigkeit hin. In der E-Feld-stimulierten Probe (*b*) bzw. in der externen Referenz (*c*) ist über den kompletten Spalt ein gleichmäßiger Farbverlauf erkennbar. Dies entspricht einer gleichmäßigen Zellmigration entlang der gesamten Wunde.

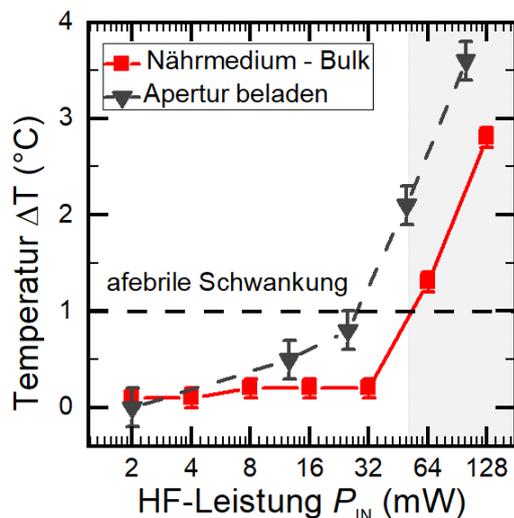
Durch die hohen eingekoppelten Leistungen können die durch die SAW erzeugten parasitären Einflüsse auf die Zellkultur wie Scherspannungen und Temperaturanstieg durch Substraterwärmung nicht länger vernachlässigt werden. Aus diesem Grund wird der durch die SAW-Erzeugung induzierte Temperaturanstieg des Nährmediums und das Flussprofil des SAW-Chips im nachfolgenden Abschnitt vermessen und diskutiert. Des Weiteren ermöglicht diese Methode eine indirekte, jedoch quantitative Vermessung der bei  $f_{\text{ref}}$  erzeugten SAW-Intensität  $I_{\text{SAW}}$  und erlaubt somit eine exakte Gegenüberstellung zu  $I_{\text{SAW}}$  bei  $f_{\text{res}}$ .

#### 5.4.2. Abschätzung der SAW-begleitenden Einflussgrößen auf das Zellwachstum

Zum Verständnis der auf die Zellkultur einwirkenden Einflussgrößen ist eine Betrachtung der Temperaturentwicklung und des Strömungsprofils innerhalb der gesamten Zellkultur von Interesse.

##### *Temperatur*

Wie bereits in vorangegangenen Studien identifiziert wurde, sind die thermischen Effekte der SAW-Anregung vor allem bei höheren Leistungen nicht mehr vernachlässigbar. Auf der Apertur und in deren unmittelbaren Nähe ist die lokale Temperaturerhöhung  $\Delta T$  linear mit der eingekoppelten Leistung  $P_{\text{IN}}$  verknüpft und beträgt im mit Flüssigkeit benetzten Fall  $\Delta T = 37 \frac{\text{mK}}{\text{mW}} P_{\text{IN}}$ . Bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 64 \text{ mW}$  entspricht dies in unmittelbarer Umgebung der Apertur einem Anstieg von  $\Delta T = 2.4 \text{ K}$  und somit einer Überschreitung der physiologischen, afebrilen Temperaturschwankungen von  $\Delta T = \pm 1 \text{ K}$ . Da zudem ein Wärmeabtransport durch Strömung stattfindet, muss ebenfalls eine Betrachtung der Temperaturentwicklung des kompletten Nährmediums im Bulk vorgenommen werden. Zur Überprüfung des thermischen Eintrages wurde mittels eines Temperatursensors (PASCO PASPort - Precision pH/ORP/ISE Temperature Sensor, Roseville, CA, USA) die Temperatur des Nährmediums auf einem SAW-Chip ( $V = 3 \text{ ml}$ ) bei Kultivierungsbedingungen ( $T = 37^\circ \text{C}$ ) ermittelt. In *Abb. 5.7.* ist der relative Temperaturanstieg des Nährmediums im Bulk und in der Nähe der Apertur (Daten entnommen aus [60]) in Abhängigkeit der eingekoppelten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  dargestellt. Bei niedrigen Leistungen  $P_{\text{IN}} \leq 16 \text{ mW}$  ist keine deutliche Erhöhung der Temperatur feststellbar. Thermische Effekte können somit für dieses Leistungsspektrum ausgeschlossen werden. Bei  $P_{\text{IN}} = 32 \text{ mW}$  findet ein Übergang der thermischen Belastung statt. Während für Zellen in unmittelbarer Nähe der Apertur Werte außerhalb der physiologischen Temperaturschwankungen erreicht werden, verbleibt die Temperatur im Bulk bei den optimalen Kultivierungsbedingungen. Bei Überschreitung der HF-Leistung von  $P_{\text{IN}} > 32 \text{ mW}$  führt der Wärmeeintrag jedoch zu einer starken Erwärmung des gesamten Nährmediums. Bereits bei  $P_{\text{IN}} = 64 \text{ mW}$  wird die Temperaturschwankung von  $\Delta T = \pm 1 \text{ K}$  für die gesamte Zellkultur überschritten. Dies führt zu Temperaturen  $T > 38^\circ \text{C}$  und kann somit zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der kompletten Zellkultur führen.



**Abbildung 5.7:**  
SAW-bedingte Erhöhung der Temperatur des Nährmediums im Bulk in Abhängigkeit der eingekoppelten HF-Leistung  $P_{IN}$ .  
(Datenpunkte „Apertur beladen“ entnommen aus [211]).

### Scherspannung

Die mechanischen Einflussgrößen können durch den wohldefinierten Effekt der *Leaky*-SAW ermittelt werden. Durch die hierbei induzierte akustische Strömung (Eckart-Strömung) ist es möglich, die SAW-Amplituden abzuschätzen und zu vergleichen, da die Geschwindigkeit des Flussprofils proportional zur SAW-Intensität ist [153]. Durch die *sPIV*-Methode wurde das Flussprofil eines SAW-Chips auf einer Höhe  $h = 25\ \mu\text{m}$  über der Substratoberfläche ermittelt. Wie in *Abb. 5.8. a*) erkennbar strömt die Flüssigkeit zur Apertur des IDTs hin und wird unter dem sogenannten *Rayleigh*-Winkel abgestrahlt. Es ist ersichtlich, dass die Strömungsgeschwindigkeit des inhomogenen Flussprofils mit abnehmendem Abstand zur Apertur zunimmt. Da somit in der gemessenen Fläche *Apertur* eine zur internen Referenz verschiedene Strömungsgeschwindigkeit vorliegt, wirken unterschiedliche Scherspannungen je nach relativem Abstand zur Apertur auf die Zellkultur ein.

In *Abb. 5.8. b*) ist die orts- und leistungsabhängige mittlere Geschwindigkeit  $v_{as}$  in der Mitte der Fläche *Apertur* (\*) und in der *internen Referenz* (\*\*)) aufgetragen. Wie zu erwarten war, steigt bei  $f = f_{res}$  die Strömungsgeschwindigkeit  $v_{as}$  linear mit der eingekoppelten Leistung  $P_{IN}$  an und erreicht vor der Apertur eine im gemessenen Leistungsspektrum maximale Geschwindigkeit von  $v_{as} = 1.2\ \text{mm/s}$  bei  $P_{IN} = 128\ \text{mW}$ . Die Werte für  $v_{as}$  in der internen Referenz sind im mittleren Durchschnitt um  $34.8\% \pm 6.4\%$  geringer, als vor der Apertur. Die bei  $f = f_{ref}$  erzeugte akustische Intensität  $I_{ref}$  erreicht im Median nur 3% der Intensität  $I_{SAW}$  bei  $f = f_{res}$ . Visuell ist eine sichtbare Strömung erst bei  $P_{IN} \geq 32\ \text{mW}$  erkennbar. Des Weiteren gilt  $v_{f_{ref}, 128\ \text{mW}} \approx v_{f_{res}, 1\ \text{mW}}$  bei der die Strömungsgeschwindigkeit eine Größenordnung von  $\mathcal{O}(10^{-2}\ \text{mm/s})$  erreicht.

Die maximale Geschwindigkeit  $v_{as} = 1.2\ \text{mm/s}$  resultiert in einen dynamischen Druck  $q$ :

$$q = \frac{\rho}{2} v^2 = 6.05 \cdot 10^{-4}\ \text{Pa} \quad (5.5)$$

und eine Schubspannung  $\tau$  von:

$$\tau = \eta \frac{\Delta v_{as}}{\Delta z} = 0.47\ \text{dyn/cm}^2, \quad (5.6)$$

wobei  $\rho = 1.0\ \text{g/ml}$  der Dichte von Wasser,  $\Delta z = 25\ \mu\text{m}$  der Höhe über dem Substratboden und  $\eta = 0.97\ \text{cP}$  der Viskosität des Nährmediums mit 10% FBS bei einer Temperatur von  $T = 37^\circ\text{C}$  [233] entsprechen.

Da eine sichtbare morphologische Veränderung und eine Ausrichtung und Polarisierung in Flussrichtung meist erst bei Schubspannungen  $\tau > 8 \text{ dyn/cm}^2$  auftreten [234, 235], kann eine ballistische Verschiebung der Zellen ausgeschlossen werden. Falls jedoch der observierte Effekt der erhöhten Wundheilung durch Schubkräfte in Richtung der Apertur resultiert, so sollte dies in einer asymmetrischen Migrationsgeschwindigkeit der aufeinander zumigrierenden Zellfronten sichtbar sein: Wie in *Abb. 5.8. d)* illustriert, migrieren Zellen auf der IDT-Seite „stromaufwärts“ gegen die Strömung und befinden sich auf der *Luv*-Seite<sup>3</sup>. Zellen in der gegenüberliegenden Seite sind auf der sogenannten *Lee*-Seite und migrieren mit der Strömung daher „stromabwärts“. Ist die Zellmigration durch die Schubspannung erhöht, so sollte die dem IDT gegenüberliegende Seite schneller migrieren. In *Abb. 5.8. c)* sind die Geschwindigkeiten der gegenüberliegenden Zellfronten (*Luv* und *Lee*) vor der Apertur gegeneinander aufgetragen.

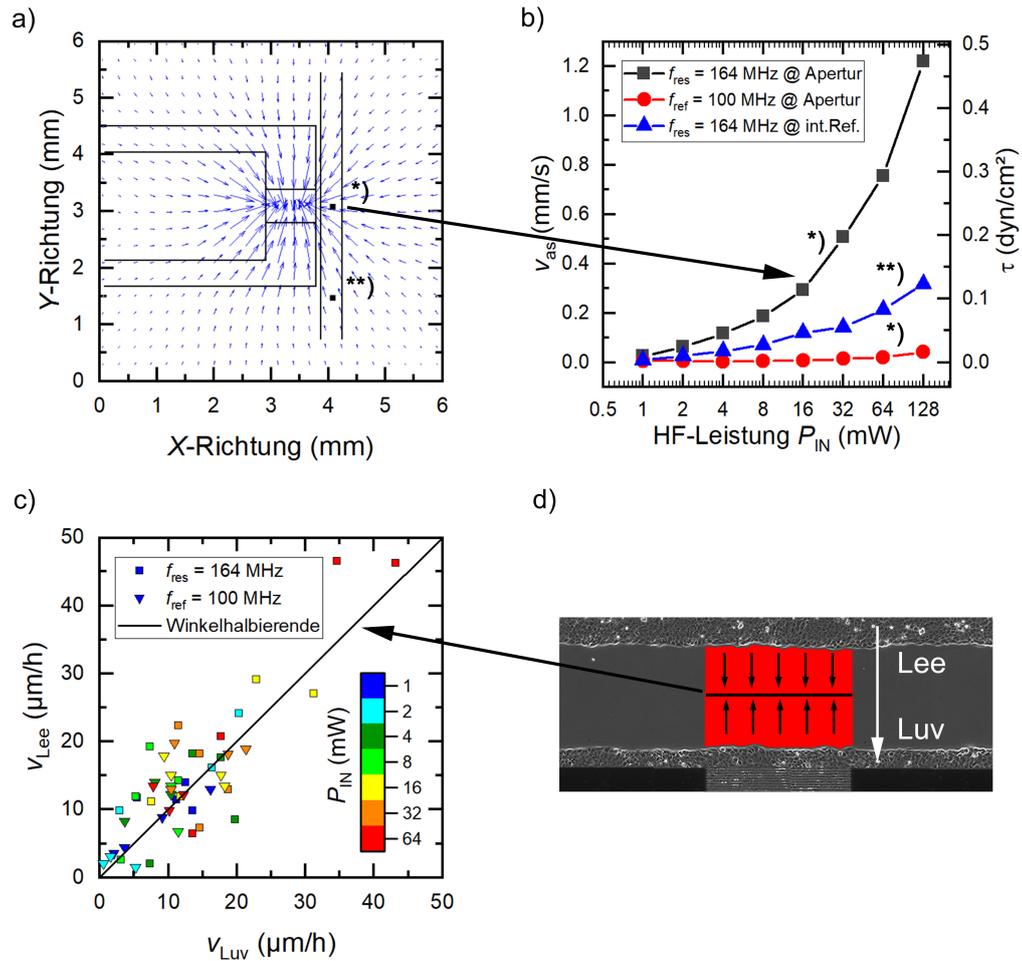
Die dargestellten Datenpunkte streuen deutlich um die Winkelhalbierende des ersten Quadranten mit einer leichten Präferenz zur oberen Hälfte. Bei 65 % der Messpaare ist die Geschwindigkeit für  $f = f_{\text{res}}$  auf der gegenüberliegenden Seite  $v_{\text{Lee}}$  größer als auf der IDT-Seite  $v_{\text{Luv}}$  und bei 59 % für  $f = f_{\text{ref}}$ . Das durchschnittliche Verhältnis  $v_{\text{Luv}}/v_{\text{Lee}}$  liegt bei  $v_{\text{Luv}}/v_{\text{Lee}} = 1.08 \pm 0.67$  für die SAW-bedingte und  $v_{\text{Luv}}/v_{\text{Lee}} = 0.95 \pm 0.61$  für die elektrisch bedingte Stimulation. Nur bei sehr hohen Leistungen mit  $P_{\text{IN}} = 64 \text{ mW}$  bei  $f = f_{\text{res}}$  liegt eine schwache, aber sichtbare Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit in Richtung IDT vor. Durch die Tatsache, dass das durchschnittliche Verhältnis um 1 schwankt und nur eine leichte Präferenz zu höheren Geschwindigkeiten auf der gegenüberliegenden Seite vorliegt, können strömungsbedingte Effekte für die signifikante Erhöhung der Zellmigration ausgeschlossen werden. Wenn die Zellen schneller migrieren, so geschieht dies auf beiden Seiten.

Die hier vorgestellten Daten demonstrieren den positiven Effekt der SAW-induzierten Zellstimulation. In einem schmalen Leistungsspektrum führt die SAW-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung des Zellwachstums in einem Wound-Healing-Assay. Während bei niedrigen Leistungen  $P_{\text{IN}} \leq 16 \text{ mW}$  kein sichtbarer parasitärer Effekt feststellbar ist, führt eine zu große SAW-Intensität, unter anderem durch die Temperaturerhöhung, zu einer Unterdrückung der Wundheilung.

Der Vergleich eines scharf abgegrenzten stimulierten Bereichs mit einer internen Referenz, der Ausschluss parasitärer und strömungsbedingter Effekte und das unbeeinflusste Zellwachstum bei einer elektrischen Stimulation lassen den sicheren Rückschluss auf die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle als Stimulationsursache zu.

Um die Gründe und die intrazellulären Mechanismen für die erhöhte Migrationsrate weiter eingrenzen und beleuchten zu können, wird nun die Proliferation und die Beeinflussung der Membranproteine der im Schallpfad befindlichen Zellen und derer in der internen Referenz ermittelt und gegenübergestellt. Um ebenfalls negative Effekte der SAW-Stimulation bei zu hohen Intensitäten abschätzen zu können, wird der zelluläre Stress (reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) in Abhängigkeit der eingekoppelten Leistung bestimmt.

<sup>3</sup>Die Begriffe *Luv* und *Lee* entstammen aus der Seefahrt und beschreiben die Seiten eines Objekts im Bezug zum Wind. *Luv* ist die dem Wind zugewandte Seite und *Lee* die dem Wind abgewandte Seite.



**Abbildung 5.8:**

Abschätzung der durch die Leaky-SAW induzierten Strömung. a) Zur Bestimmung der SAW-induzierten akustischen Strömung wurde mittels sPIV das Strömungsprofil  $h = 25 \mu\text{m}$  über der Substratoberfläche vermessen. Die Flüssigkeit strömt in Richtung der Apertur. Die Strömungsgeschwindigkeit  $v_{as}$  wurde in der Mitte des Spalts vor der Apertur (\*) und in der internen Referenz vermessen (\*\*). b) Frequenz- und leistungsabhängige Strömungsgeschwindigkeit  $v_{as}$  an den verschiedenen Messpositionen. c) Gegenüberstellung der Migrationsgeschwindigkeiten der aufeinander zu migrierenden Zellfronten, dargestellt in d), unter dem Einfluss des Strömungsprofils. Die Streuung um die Winkelhalbierende deutet auf einen geringen Einfluss des asymmetrischen Strömungsprofils auf die Migrationsgeschwindigkeit hin. (Daten entnommen aus [212]).

## 5.5. Mechanisch induzierte intrazelluläre Reaktion

---

*Die Messung der intrazellulären Mechanismen zeigt keine Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies im Zytoplasma mit steigender SAW-Intensität. Die Proliferation hingegen ist von der Leistung der akustischen Oberflächenwelle abhängig. Über ein weites Leistungsspektrum wird die Proliferation sowohl vor der Apertur als auch in der internen Referenz erhöht. Im Gegensatz hierzu werden nur Membranproteine im Schallpfad der SAW beeinflusst, was auf eine mechanisch induzierte Stimulation hindeutet.*

---

Für ein tiefgehendes Verständnis der Stimulationsursache durch die akustische Oberflächenwelle werden im folgenden Abschnitt verschiedene intrazelluläre Parameter durch Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie vermessen. Hierbei ist die Bestimmung der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der Proliferationsrate und der Aktivität von Membranproteinen von essentieller Bedeutung. Zur Schaffung identischer Rahmenbedingungen finden alle Messverfahren stets im Rahmen eines Wound-Healing-Assays statt. Je nach zu untersuchendem Parameter werden verschiedene Färbeprotokolle angewendet. Detaillierte Beschreibungen der Präparationsschritte können aus den jeweils zitierten Herstellerprotokollen entnommen werden. Wie im vorangegangenen Kapitel wird auch hier der SAW-Chip 1 mit LB verwendet.

### 5.5.1. Zellulärer Stress – Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Als Nebenprodukt der Zellatmung sind die reaktiven Sauerstoffspezies ein Indikator des zellulären Stresses und nehmen eine entscheidende Rolle in zellulären Signalwegen und Funktionen ein [236, 237]. Besonders die schädlichen Aspekte der ROS stehen hierbei im Vordergrund. Freie Radikale wie Hyperoxid-Anionen  $O_2^-$  oder Hydroxyl-Radikale  $OH^-$  führen durch Oxidation zur Schädigung zellulärer Strukturen und Proteine. Bei zu hohen Konzentrationen induzieren diese schließlich den programmierten Zelltod (Apoptose) oder führen gar zur Nekrose. Aus diesem Grund eignet sich die Messung der intrazellulären ROS-Konzentration zur Bestimmung der Überschreitung zellulärer Reparatursmechanismen durch Einwirkung schädlicher Noxen wie Scherspannungen oder Temperatur, die hier durch die akustische Oberflächenwelle bedingt sind.

Im Folgenden wird die Entwicklung der ROS-Konzentration im Leistungsspektrum

$P_{IN} \in [2 \text{ mW}; 128 \text{ mW}]$  untersucht. Die Untersuchung fand in Kooperation mit *Sophie Mauritz* [238] statt. Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration erfolgt durch den Vergleich der mit SAW stimulierten Probe mit einer *Hochkontrolle* und einer unbehandelten Probe, der *Tiefkontrolle*. Die Hochkontrolle beschreibt eine Probe mit einer möglichst maximalen ROS-Konzentration. Für jeden Messpunkt werden vier SAW-Proben und jeweils zwei Tief- und zwei Hochkontrollen angesetzt. Nach der Entfernung des CI werden die SAW-Proben für einen Zeitraum von  $t = 24 \text{ h}$  durch die SAW stimuliert. Eine Stunde vor der Beendigung der SAW-Stimulation wird die Hochkontrolle mit  $100 \mu\text{M}$  der ROS-induzierenden Substanz Menadione (M2518, SA) behandelt. Die ROS-Konzentration wird nach Abschluss der Stimulation durch Zugabe der fluorogenen Sonde *CellROX Green* (C10444, TF) und des Farbstoffs Höchst 33342 ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , H1399, TF) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben ermittelt [239]. Analog zu den Proliferationsmessungen in *Kap. 4.4.4.* wird hierbei jeweils eine Phasenkontrastaufnahme des kompletten Zellrasens zur Qualitätssicherung und Fluoreszenzaufnahmen in den Kanälen *DAPI* und *FITC* erstellt (Filterdaten siehe *Kap. B.1.*).

Die Mikroskopieaufnahmen in *Abb. 5.9.* bilden das erstellte Datenmaterial eines typischen Wound-Healing-Assays mit anschließender ROS-Bestimmung ab. In *Abb. 5.9. a)* ist der Zellrasen um die IDT-Struktur auf einem SAW-Chip nach dem Wundschluss bei einer SAW-Stimulation mit  $P_{IN} = 64 \text{ mW}$  großflächig im Phasenkontrastverfahren dargestellt. *Abb. 5.9. b)-d)* bilden eine Vergrößerung des Bereichs vor der Apertur im Phasenkontrast (*b*)), im DAPI- (*c*)) und im FITC-Kanal (*d*)) ab. Die

Phasenkontrastaufnahmen werden im Rahmen der Qualitätssicherung des Zellrasens erstellt, um morphologische Veränderungen der Zellkultur zu identifizieren. Durch Anfärbung der zellulären DNA mittels des DNA-selektiven Farbstoffs Höchst 33342 werden die Abmaße und Positionen der Zellkerne im DAPI-Kanal visualisiert (*Abb. 5.9. c*). Die Intensität des Farbstoffs CellROX-Green ist proportional zur ROS-Konzentration und wird, wie in *Abb. 5.9. d*) abgebildet, im FITC-Kanal ermittelt. Der Farbstoff CellROX-Green ist nach der Oxidierung durch freie ROS ebenfalls DNA-selektiv und lagert sich im Zellkern bzw. in den Mitochondrien an. Analog zu *Kap. 4.4.3.* kann somit durch die Bestimmung der Positionsdaten der Zellkerne im DAPI-Kanal und durch anschließende Ermittlung der mittleren Intensität im FITC-Kanal an den Positionen auf die einzelnen ROS-Konzentrationen in jeder Zelle geschlossen werden.

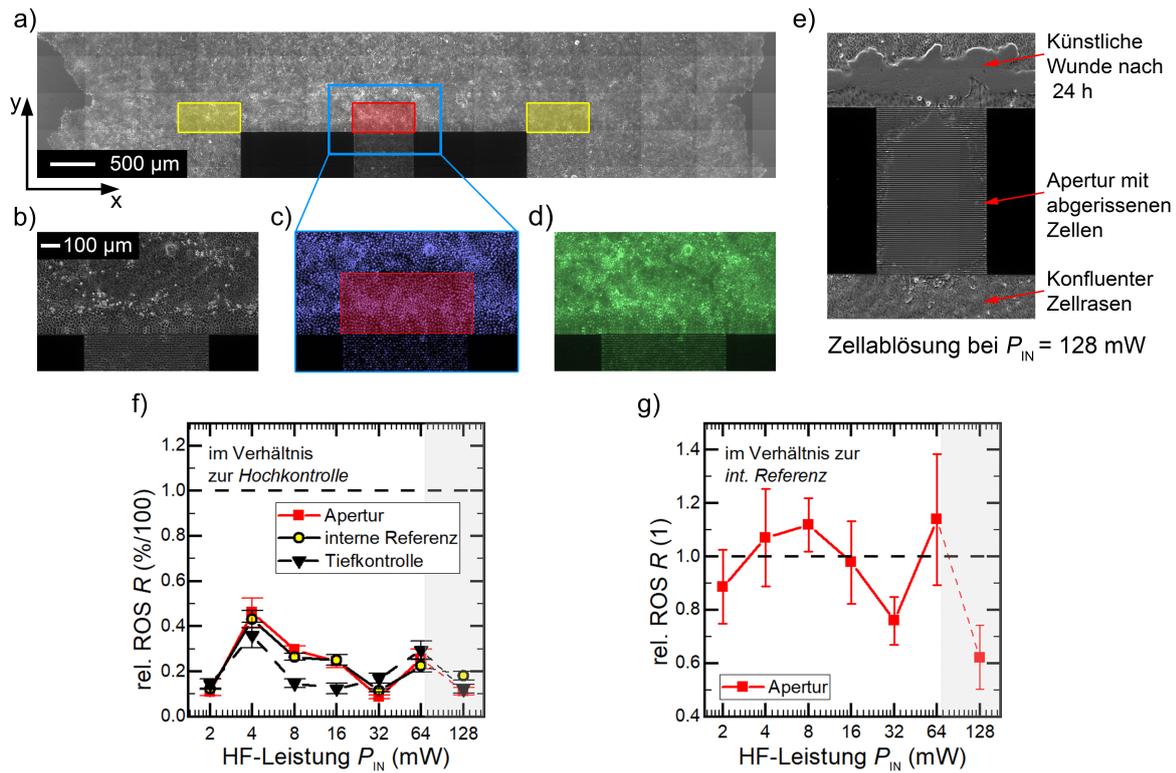
Um nun den wissenschaftlichen Inhalt dieser Mikroskopieaufnahmen zu erhalten, wird die ROS-Konzentration vor der Apertur des IDTs und in den internen Referenzen analysiert. Der auszuwertende Bereich ist in *Abb. 5.9. a*) durch farbige Rechtecke markiert. Hierbei beschreibt die rote Fläche den stimulierten Bereich und somit die *Apertur*, während die gelben Flächen die korrespondierenden *internen Referenzen* darstellen. Die Größe der Flächen beträgt jeweils  $\Delta x = 300 \mu\text{m}$  und  $\Delta y = 650 \mu\text{m}$  und entspricht somit annähernd der  $1/e$ -Abklinglänge  $l_{\text{op}}^{\text{Calc}}$  und der Aperturbreite  $W$ . In diesen definierten Bereichen wird jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung der ROS-Konzentrationen aller detektierten Zellkerne gebildet. Dieses Verfahren wird zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit jeweils für die SAW-stimulierten Proben und externen Referenzen angewendet. Da bei der Hochkontrolle die maximale ROS-Konzentration benötigt wird und Zellen in der Kultur unterschiedlich stark auf das Reagenz Menadione reagieren, wird zur Bestimmung der Hochkontrolle der mittlere Wert der oberen 5 % der Intensitätswerte der kompletten Probe ermittelt.

*Abb. 5.9. f*) zeigt die absolute ROS-Konzentration normiert auf die Hochkontrolle. Wie deutlich zu erkennen ist, verbleibt das gemessene Signal vor der Apertur und der internen Referenzen in der SAW-stimulierten Probe im Bereich der Tiefkontrolle. Es findet in dem untersuchten Leistungsspektrum  $P_{\text{IN}} \in [4 \text{ mW}; 64 \text{ mW}]$  keine durch SAW induzierte Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration statt. Morphologische Veränderungen sind ebenfalls für Werte  $P_{\text{IN}} < 64 \text{ mW}$  nicht feststellbar. Bei sehr hoher HF-Leistung ( $P_{\text{IN}} = 128 \text{ mW}$ ) findet jedoch eine Ablösung der auf der Apertur befindlichen Zellen statt. Ursache der Zelldeadhäsion sind vermutlich die durch die akustische Strömung induzierten hohen Scherspannungen und die durch Verluste erzeugte Substraterwärmung. Berechnet nach *Gl. 5.1* wird für einen beladenen SAW-Chip bei  $P_{\text{IN}} = 128 \text{ mW}$  eine Temperaturerhöhung von  $\Delta T = 4.7 \text{ K}$  erreicht, die somit deutlich schädigend für die Zellkultur ist. Des Weiteren findet durch die Erwärmung des kompletten Nährmediums von  $T_{0\text{mW}} = 36.6^\circ\text{C}$  zu  $T_{128\text{mW}} = 39.1^\circ\text{C}$  eine Überschreitung der optimalen Kultivierungsbedingungen statt. Dies äußert sich in einem verlangsamten Zellwachstum, was durch die verzögerte Wundheilung mit dem nach 24 h noch vorhandenen Zellsplatt sichtbar wird. Wegen der unvollständigen Wundheilung und der abgelösten Zellen werden die gemessenen Werte der ROS-Konzentration bei  $P_{\text{IN}} = 128 \text{ mW}$  nicht in die Betrachtung mit einbezogen und sind in der Grafik *Abb. 5.9. f*)/*g*) grau hinterlegt. Dieser Leistungsbereich markiert einen Grenzwert, da bei noch höhere Leistungen, z. B.  $P_{\text{IN}} = 256 \text{ mW}$  die komplette Zellkultur nekrotisch wird und sich weiträumig um die Apertur ablöst.

Erwähnenswert ist das Verhältnis der ROS-Konzentration stimulierter Zellen im Schallpfad zur korrespondierenden internen Referenz. Wie in *Kap. 2.1.3.* dargestellt, beschreiben ROS nicht nur den zellulären Stress, sondern fungieren ebenfalls als Signalmoleküle in der zellulären Signaltransduktion. Hierbei sind die ROS von besonderer Bedeutung in der Zellmigration, -proliferation und -adhäsion, da sie Signale von der Zelloberfläche zu Signalproteinen in der Zelle weitergeben und so das Verhalten der Zelle beeinflussen [240]. Die ROS-Konzentration verbleibt einerseits über das komplette Messspektrum im physiologischen Bereich, andererseits nimmt diese jedoch im Schallpfad im bereits beschriebenen optimalen Leistungsbereich von  $P_{\text{IN}} = 4 \text{ mW}$  bzw.  $8 \text{ mW}$  gegenüber der internen Referenz zu (siehe

Abb. 5.9. g)). Die relative ROS-Konzentration ermittelt aus dem Quotienten der Apertur durch die interne Referenz ist mit einem Wert von  $R = 1.12 \pm 0.1$  bei  $P_{IN} = 8 \text{ mW}$  vor der Apertur gegenüber der internen Referenz leicht erhöht. Dies könnte durch eine Zellaktivierung, hervorgerufen durch die SAW-Stimulation, bedingt sein. Da jedoch der verwendete Farbstoff unspezifisch auf alle Radikale reagiert, ist eine gesicherte Rückführung auf eine Erhöhung der Konzentration von korrespondierenden Signalmolekülen wie z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht möglich.

Die Messergebnisse verdeutlichen, dass die SAW unmittelbar keine negativen Einflüsse im gewählten Leistungsbereich  $P_{IN} \leq 64 \text{ mW}$  ausübt. Die ROS-Konzentration verbleibt im normalen Bereich bei SAW-stimulierten Zellen und deren internen Referenzen für die zuvor bestimmten idealen SAW-Parameter.



**Abbildung 5.9:**

Charakterisierung des SAW-induzierten Anstiegs intrazellulärer ROS. a) Großflächige Phasenkontrastaufnahme des Zellrasens nach dem Wundschluss. Farblich markiert sind die auszuwertenden Flächen (rot: Apertur, gelb: interne Referenz). b)-d) Beispielhaftes Datenset bei  $P_{IN} = 64 \text{ mW}$  der je Messreihe erstellten Mikroskopieaufnahmen: b) Phasenkontrastaufnahme, Fluoreszenzaufnahme der c) Zellkerne und d) intrazelluläre Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies. e) Phasenkontrastaufnahme des Zellrasens über der Apertur bei  $P_{IN} = 128 \text{ mW}$ . f) Vergleich der normierten ROS-Konzentration relativ zur Hochkontrolle. g) ROS-Konzentration im Vergleich zur internen Referenz. (Daten entnommen aus [212]).

### 5.5.2. Beeinflussung des Zellwachstums – Proliferation

Der Wundheilungsprozess wird dominiert durch die Prozesse der Zellmigration und -proliferation. Hierbei bildet vor allem die Zellproliferation durch die Bildung neuer Tochterzellen eine entscheidende Komponente. Wie in *Kap. 2.1.4.* beschrieben, ist die Proliferation von Zellen streng kontrolliert und wird durch externe Einflüsse wie mechanische Kräfte, elektrische Felder, Kontakthemmung und Wachstumsfaktoren, sowie weitere Mechanismen beeinflusst [128, 185, 241].

Da die observierte erhöhte Flächenbelegungsrate durch eine Erhöhung der proliferierenden Zellen erklärt werden könnte, wurde in Zusammenarbeit mit *Kathrin Baumgartner* [242] die Zellproliferation der im Schallpfad befindlichen Zellen mit denen in der internen Referenz verglichen. Zur Feststellung einer Veränderung der Proliferation in der gesamten auf dem SAW-Chip befindlichen Zellkultur wird zusätzlich eine gänzlich unbehandelte externe Referenz mit betrachtet. Hierbei wird erneut das Click-iT<sup>®</sup> EdU Imaging Kit (C10337, TF) verwendet. Nach Entfernung des CI wird das Thymine-Analogon EdU dem Nährmedium beigefügt und anschließend die zu behandelnden Proben mit dem Signalgenerator verbunden. Eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation kann dem Herstellerprotokoll entnommen werden [184]. Für jeden Messpunkt im Leistungsspektrum  $P_{\text{IN}} \in [2 \text{ mW}; 128 \text{ mW}]$  werden jeweils vier SAW-Proben und vier externe Referenzen angesetzt und anschließend, soweit nicht anderweitig erwähnt, für  $t = 27 \text{ h}$  mit einer SAW behandelt. Die Auswertung findet vergleichbar zur Proliferationsmessung im Mikrokanal in *Kap. 4.4.4.* statt.

In *Abb. 5.10. a)* sind die Zellkerne der während der Stimulationszeit neu proliferierten Zellen in einer großflächigen Fluoreszenzaufnahme dargestellt. Deutlich sichtbar ist die IDT-Struktur in der Mitte der Aufnahme. Die Einbuchtungen der Zellrasenkante in der oberen Hälfte der Aufnahme markieren den Verlauf der ehemals zellfreien Fläche, während der untere Abschnitt einen großen Bereich des ursprünglichen Zellrasens zeigt. Da die Proliferationsrate stark von der Zelldichte abhängig ist, wird im Rahmen der Proliferationsmessung das Zellwachstum im Spalt der künstlichen Wunde (*vorne*) und innerhalb des konfluenten Zellrasens (*hinten*) vermessen. Während Zellen innerhalb des Zellrasens sich stets im konfluenten Zellverband befinden und dort eine hohe Zelldichte vorliegt, sinkt durch Entfernung des CI die Zelldichte durch Zellmigration für Zellen an der Zellrasenkante.

In Anlehnung an die ROS-Messungen sind die auszuwertenden Bereiche mit farblichen Rechtecken markiert ( $\Delta x = 300 \mu\text{m}$ ,  $\Delta y = 650 \mu\text{m}$ ). Rot markiert hierbei den *vorderen* und blau den *hinteren* stimulierten Bereich der *Apertur*. Gelb und grün beschreiben jeweils die korrespondierenden *internen Referenzen* beidseitig außerhalb des Schallpfades. Die Mikroskopieaufnahmen in *Abb. 5.10. b)-d)* zeigen einen kleinen Ausschnitt des Zellrasens nach dem Wundschluss im vorderen Bereich der *Apertur*. Während die Phasenkontrastaufnahme in *b)* zur Sicherstellung der Qualität des Zellrasens verwendet wird, zeigen die Aufnahmen *Abb. 5.10. c)* die Gesamtheit aller Nuklei des Zellrasens und *d)* die Zellkerne mit einer neu synthetisierter DNA. Die statistische Evaluierung der markierten Bereiche erfolgt analog zu den ROS-Messungen.

*Abb. 5.10. g)-h)* zeigen die absolute Proliferationsrate in Abhängigkeit der eingekoppelten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  im vorderen und hinteren Bereich, sowie in den korrespondierenden internen und den externen Referenzen. Die grau hinterlegte Fläche beschreibt den Mittelwert mit Standardabweichung der Proliferationsrate aller externen Referenzen, um tagesabhängige Fluktuationen auszugleichen. *Abb. 5.10. i)* stellt den leistungsabhängigen Verlauf der relativen Proliferation zwischen dem vorderen und hinteren Bereich im Schallpfad des IDTs dar. Dies dient zur Darstellung eines Unterschiedes der Proliferation von Zellen an der Zellrasenkante zu jenen im konfluenten Zellrasen. In *Abb. 5.10. j)-k)* wird die Proliferationsrate der behandelten Proben mit der unbehandelten externen Referenz verglichen. Da die Zellproliferation von der aktuellen Zelldichte abhängig ist, ist die post-mitotische Zellfläche in der unbehandelten externen Referenz in *Abb. 5.10. l)* aufgetragen.

Wie in den Abbildungen *Abb. 5.10. g)* und *h)* dargestellt, ist der Verlauf der absoluten Proliferation  $X_{\text{abs}}$  im stimulierten Bereich des Schallpfades sowohl im vorderen als auch im hinteren Bereich des IDTs fast über das gesamte Leistungsspektrum identisch zur internen Referenz. Die Proliferationsrate  $X_{\text{abs}}$  ist jedoch vor allem im vorderen Bereich deutlich gegenüber der externen Referenz erhöht und besitzt ein markantes Maximum von  $X_{\text{abs-SAW}}(8\text{mW}) = 0.88 \pm 0.05$  bzw.  $X_{\text{abs-int.Ref.}}(8\text{mW}) = 0.86 \pm 0.05$  verglichen mit  $X_{\text{abs-ext.Ref.}}(8\text{mW}) = 0.68 \pm 0.12$  (*Abb. 5.10. g)*). Des Weiteren ist ein signifikanter Abfall der Proliferationsrate im Schallpfad des IDTs bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 128\text{ mW}$  feststellbar.

Auf Basis der vorliegenden Daten ist keine signifikante Erhöhung der Zellproliferation im Schallpfad gegenüber der internen Referenz feststellbar. Im Vergleich zur externen Referenz ist jedoch über einen weiten Leistungsbereich zwischen  $P_{\text{IN}} = 4\text{ mW} - 64\text{ mW}$  ein deutlicher Zuwachs sichtbar (*Abb. 5.10. j)*). Die zur externen Referenz gebildete relative Proliferation der SAW-stimulierten Probe erreicht ein signifikantes Maximum bei  $P_{\text{IN}} = 8\text{ mW}$  mit  $X_{\text{rel-SAW}}(8\text{ mW}) = 1.29 \pm 0.23$  mit einem Signifikanzniveau von  $p_{8\text{ mW}} = 0.049$ . Der dargestellte Verlauf, insbesondere bei  $P_{\text{IN}} = 4\text{ mW}$  und  $8\text{ mW}$ , entspricht exakt dem Maximum der Stimulationseffizienz  $E$  im Wound-Healing-Assay in *Abb. 5.6. d)*. Im Gegensatz zur internen Referenz mit  $X_{\text{rel-int.Ref.}}(128\text{ mW}) = 0.98 \pm 0.36$  sinkt bei einer sehr hohen Leistung von  $P_{\text{IN}} = 128\text{ mW}$  die relative Proliferation vor der Apertur auf einen Wert von  $X_{\text{rel-SAW}}(128\text{ mW}) = 0.68 \pm 0.25$ .

Im Gegensatz zu Zellen an der Zellrasenkante ist für Zellen im Zellrasen keine deutliche Erhöhung der Proliferationsrate zur externen Referenz über ein weites Leistungsspektrum feststellbar. Wie in *Abb. 5.10. k)* sichtbar, schwankt der Wert  $X_{\text{rel}}$  stets um 1.0. Eine Ausnahme bildet der Wert bei  $P_{\text{IN}} = 4\text{ mW}$  mit einer deutlichen Erhöhung auf  $X_{\text{rel-SAW}} = 1.55 \pm 0.51$  ( $p_{4\text{ mW}} = 0.027$ ). Analog zum vorderen Bereich findet ebenfalls im Zellrasen eine Verringerung der Proliferationsraten bei sehr hohen Leistungen ( $P_{\text{IN}} = 128\text{ mW}$ ) auf einen Wert von  $X_{\text{rel-SAW}} = 0.13 \pm 0.05$  statt.

Im Gegensatz zur Zellrasenkante unterliegt die Proliferationsrate besonders im inneren Bereich des Zellrasens einer starken Streuung von  $\bar{X}_{\text{ext.Ref.}} = 0.38 \pm 0.20$ . Die Proliferationsrate an der Zellrasenkante ist jedoch stets höher mit  $\bar{X}_{\text{ext.Ref.}} = 0.68 \pm 0.07$  als für Zellen im Inneren. Das direkte Verhältnis zwischen *vorne* und *hinten* ist in *Abb. 5.10. i)* aufgetragen. SAW-induzierte Effekte können für die unterschiedlichen Proliferationsraten in beiden Bereichen ausgeschlossen werden, da der Verlauf der relativen Proliferation *hinten/vorne* in der externen Referenz identisch zur SAW-stimulierten Probe ist. Somit ist dieser Effekt vermutlich abhängig von der Tagesform und Viabilität der Zellen sowie der lokalen Zelldichte. Besonders die Zelldichte unterscheidet sich für den vorderen und hinteren Bereich. In *Abb. 5.10. l)* ist die post-mitotische Fläche pro Zelle dargestellt. Die pro Zelle zur Verfügung stehende Fläche ist nach dem Wundschluss im vorderen Bereich der Apertur stets größer als im Zellrasen. Die starken Schwankungen im vorderen Bereich werden durch unvermeidbare Unterschiede in der individuellen Probenpräparation (bspw. Schwankungen in der Zelldichte der Zellsuspension oder Tagesform-abhängige Zellviabilität) hervorgerufen. Im Zellrasen ist die belegbare Fläche nahezu über alle Experimente konstant und schwankt um einen Wert von  $A = 200\text{ }\mu\text{m}^2$ . *Puliafito et al.* berichten, dass die Zellteilungsrate von MDCK-II-Zellen direkt von der belegbaren Fläche pro Zelle abhängig ist [128]. Aufgrund der Kontakthemmung nimmt die Zellteilungsrate bei der Unterschreitung einer kritischen Zellfläche von  $A_{\text{krit.}} = 200\text{ }\mu\text{m}^2$  drastisch ab. Da für Zellen an der Zellrasenkante durch Entfernen des CI mehr Fläche zur Verfügung steht, proliferieren diese mehr als Zellen im konfluenten Zellrasen, welche bereits die kritische Fläche  $A_{\text{krit.}}$  erreicht haben. In den Phasenkontrastaufnahmen der *Abb. 5.10. e)* und *f)* ist der Zellrasen sowie die Zellgrenzen im vorderen und hinteren Bereich 27 h nach Entfernen des CI abgebildet. Im vorderen Bereich ist die Fläche mit  $\bar{A} = 193\text{ }\mu\text{m}^2$  größer als im Zellrasen mit  $\bar{A} = 170\text{ }\mu\text{m}^2$ . Das Auftreten der sogenannten „Zellkuppeln“ in *Abb. 5.10. f)* (blau markierte Flächen) wird auf die erhöhte Zelldichte und den somit steigenden Druck innerhalb des Zellrasens zurückgeführt.

Das Phänomen der Kontakthemmung kann zudem den markanten Abfall der Proliferationsrate bei  $P_{\text{IN}} = 16 \text{ mW}$  und  $32 \text{ mW}$  in *Abb. 5.10. j)* erklären. Bei diesen Experimenten lag präparationsbedingt eine sehr hohe Zelldichte vor, was vermutlich zur Unterschreitung der kritischen Zellfläche und somit zu einer Verringerung der Proliferationsrate geführt hat.

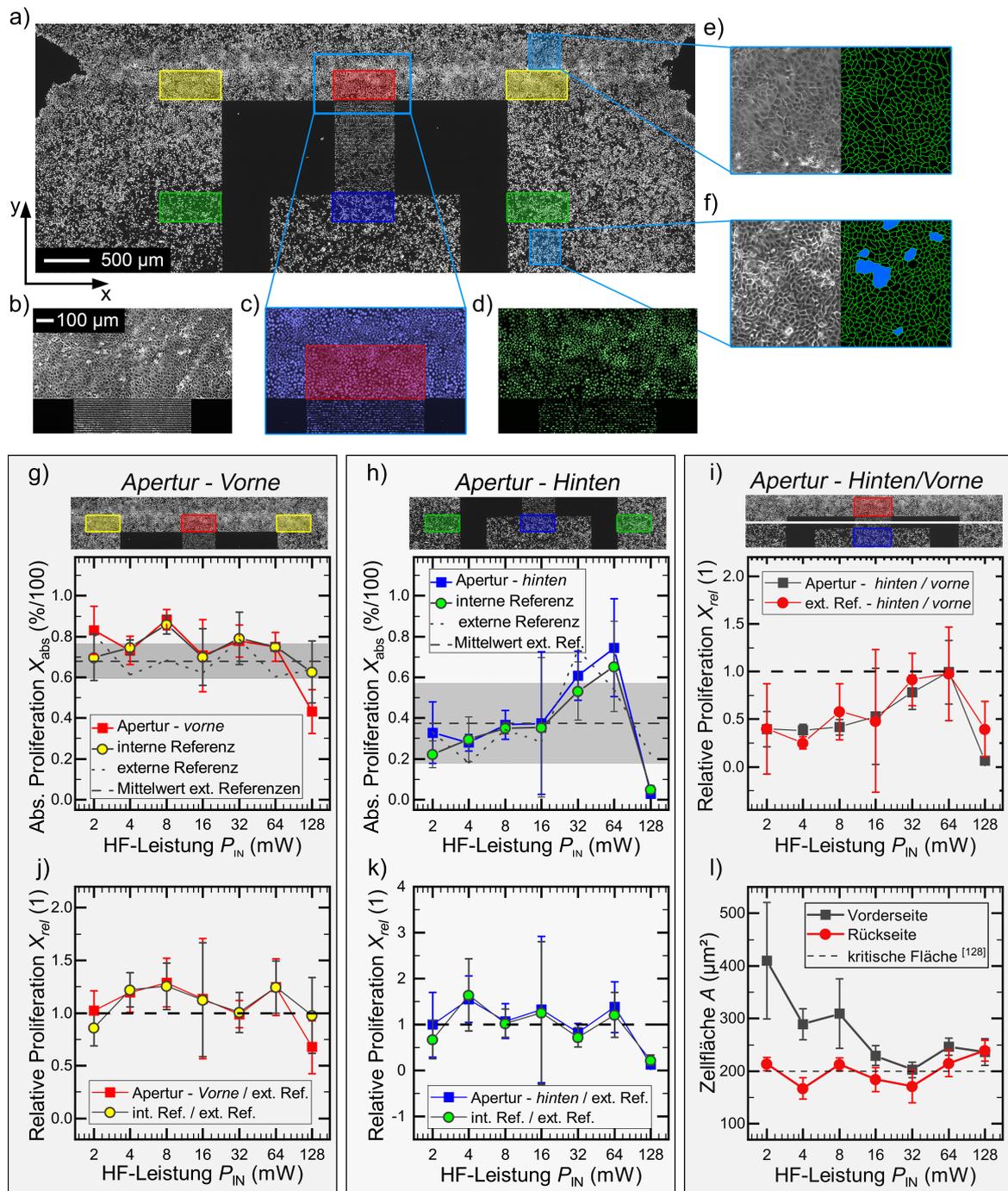
Im Gegensatz hierzu ist die signifikante Erhöhung der Proliferationsrate im Zellrasen mit  $X_{\text{rel-SAW}} = 1.55 \pm 0.51$  ( $p_{4 \text{ mW}} = 0.027$ ) bei  $P_{\text{IN}} = 4 \text{ mW}$  hervorzuheben, obwohl die belegbare Fläche stets um  $A_{\text{krit.}}$  schwankt. Dies korreliert mit der erhöhten Effizienz  $E$  bei dieser Leistung und lässt einen Rückschluss auf SAW-bedingte Effekte zu.

Die hier vorgestellten Daten demonstrieren eindeutig den positiven Einfluss akustischer Oberflächenwellen auf die Zellproliferation in der kompletten Zellkultur eines SAW-Chips. Die durch die SAW induzierten Effekte führen zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation um  $29\% \pm 23\%$  gegenüber der unbehandelten externen Referenz. Die Tatsache, dass die interne Referenz den selben Verlauf aufweist wie die stimulierte Probe im Schallpfad, weist auf einen strömungsinduzierten Effekt hin. Wie in *Abb. 5.8. b)* dargestellt, wird das Medium durch die akustische Strömung auch in der internen Referenz aktiv umgewälzt [148]. Dies führt zu einer Erhöhung des Nährstoff- und Gasaustausches der Zellen verglichen zur diffusionslimitierten statischen Kultur [243].

Der starke Abfall der Proliferationsrate bei sehr hohen Leistungen ( $P_{\text{IN}} = 128 \text{ mW}$ ) kann durch unterschiedliche Effekte hervorgerufen werden. So kann die niedrige Proliferationsrate durch den Verlust proliferierender Zellen durch hohe Scherspannungen erklärt werden. Während Zellen in der Interphase stark mit der Substratoberfläche verbunden sind, lösen diese ihre Substratkontakte durch Bildung einer kugelförmigen Struktur während der  $M$ -Phase weitgehend auf [244]. Die wirkenden Scherspannungen von  $\tau \approx 0.47 \text{ dyn/cm}^2$  bei einer Flussgeschwindigkeit von  $v_{\text{as}} = 1.2 \text{ mm/s}$  bei  $P_{\text{IN}} = 128 \text{ mW}$  sind anscheinend ausreichend, um mitotische Zellen in der Umgebung der Apertur zu entfernen. Der Verlust proliferierender Zellen resultiert somit in eine Verringerung der absoluten Proliferationsrate. Des Weiteren können, wie bereits in den ROS-Messungen erklärt, temperaturinduzierte Effekte das Zellwachstum deutlich beeinträchtigen.

Dass die Zellproliferation durch akustische Oberflächenwellen manipuliert werden kann, wurde bereits von *Greco et al.* demonstriert [245]. Durch die Verwendung zweier definierter Leistungspegel wurde für niedrige Leistungen kein Effekt der SAW festgestellt, während für hohe Leistungen die Proliferation der Zellen gegenüber einer Kontrolle um  $36\% \pm 12\%$  erhöht war. Die relative Proliferation in *Abb. 5.10. g)* lässt nun den Rückschluss zu, dass die Effektivität der Beeinflussung der Proliferation in Leistungsbereiche eingeteilt werden kann. Während die Proliferation für niedrige Leistungen  $P_{\text{IN}} \leq 2 \text{ mW}$  identisch zur externen Referenz ist, steigt diese für Leistungen  $P_{\text{IN}} \geq 4 \text{ mW}$  an und verbleibt auf einem nahezu konstanten Wert von  $\bar{X}_{\text{rel-SAW}} = 1.22 \pm 0.07$  (exkl.  $X_{\text{rel-SAW}}(32 \text{ mW})$ ). Eine proportionale Leistungsabhängigkeit der Proliferationsrate zur eingekoppelten Leistung  $P_{\text{IN}}$  ist nicht feststellbar. Wird ein Leistungsgrenzwert erreicht, ist die Proliferation erhöht und verbleibt konstant. Überschreitet  $P_{\text{IN}}$  einen weiteren Grenzwert mit  $P_{\text{IN}} > 64 \text{ mW}$ , kehrt sich dieser Effekt um und die Proliferation der Zellen wird unterdrückt.

Die Tatsache, dass die komplette Kultur positiv durch die SAW beeinflusst wird, schließt eine erhöhte Proliferation als Ursache für die gesteigerte Stimulationseffizienz  $E$  aus. Die im Schallpfad stimulierten Zellen proliferieren nicht mehr als Zellen in der internen Referenz. Da nun ROS und Proliferation als Ursache ausgeschlossen wurden, soll im nächsten Abschnitt die Beeinflussung der Aktivität von Membranproteinen durch SAW untersucht werden.

**Abbildung 5.10:**

Bestimmung der durch SAW beeinflussten Zellproliferation. a) Fluoreszenzaufnahme der Nuklei proliferierender Zellen auf einem SAW-Chip nach dem Wundschluss. Farbliche Markierung der auszuwertenden Flächen: Rot: Apertur - Vorne, Gelb: interne Referenz - Vorne, Blau: Apertur - Hinten, Grün: interne Referenz - Hinten. b) - d) Vergrößerte Mikroskopieaufnahmen der künstlichen Wunde nach Wundschluss im b) Phasenkontrast, c) alle vorhandenen Zellkerne und d) der neu proliferierten Zellen. e) / f) Phasenkontrastaufnahme und Zellgrenzen des konfluenten Zellrasens. e) MDCK-II-Zellen bei niedriger Zelldichte (Wunde) und f) bei hoher Zelldichte mit sich ausbildenden Zellkuppeln (blaue Bereiche). g) / h) Absolute Proliferation  $X_{abs}$  ( $P_{IN}$  im vorderen und hinteren Bereich des IDTs. i) Relative Proliferation im Zellrasen und an der Zellrasenkante. j) / k) SAW-stimulierte Proben im Vergleich zur externen Referenzen. l) Mittlere Fläche pro Zelle in der unbehandelten externen Referenz im vorderen und hinteren Bereich der Apertur. Kultivierungsdauer für die einzelnen Messpunkte bei  $P_{IN} = 16$  mW  $t = 22$  h, sonst  $t = 27$  h. (Daten entnommen aus [212]).

### 5.5.3. Rolle der Membranproteasen

Nach Ausschluss einer erhöhten Proliferation oder einer ROS-bedingten zellulären Reaktion auf die SAW-Stimulation wird in diesem Abschnitt die Beeinflussung von Enzymen und deren Aktivität durch akustische Oberflächenwellen untersucht. Hierbei bildet die Intramembranproteolyse-vermittelnde Aspartylprotease „Signal Peptide Peptidase 3“ (SPPL3) ein ideales Modellsystem. SPPL3 verändert durch proteolytische Spaltung von Glycosyltransferasen das zelluläre Glykosylierungsmuster (*N*-Glykosylierung) und somit die zelluläre Aktivität und Funktion [246]. Membran-Glykoproteine vermitteln wichtige Funktionen der eukaryotischen Zelloberfläche und sorgen beispielsweise für die Zell-Zell-Erkennung und die Adhäsion von Zellen. Zur Untersuchung werden drei verschiedene mit siRNA transfizierte HEK293 T-REx<sup>TM</sup>-Zelllinien verwendet. Während bei der Zelllinie HEK293-*TR* (*TR*) die Expression von SPPL3 unverändert ist (Wildtyp), liegt bei der Linie HEK293-*KO* (*KO*, *knockout*) keine SPPL3-Expression vor. Hierbei wurde durch Modifikation der Gensequenz die Expression von SPPL3 in der *KO*-Zelllinie deaktiviert. Im Gegensatz hierzu findet in der Zelllinie HEK293-*HI* (*HI*) eine durch Doxycyclin (DOX) induzierte Überexpression des SPPL3-Proteins statt. Eine konstante SPPL3-Überexpression wäre schädlich für die Zellen, sodass das SPPL3-Gen in das TReX-System eingebracht wurde, um eine kontrollierte Expression zu erreichen.

SPPL3 schneidet proteolytisch die Ektodomäne diverser membranständiger Glykosidasen und Glykosyltransferasen, wodurch diese als deaktiviert gelten. Da Glykosidasen und Glykosyltransferasen für die Proteinglykosylierung verantwortlich sind, führt somit eine SPPL3-Überexpression zu einer Hypoglykosylierung und ein Fehlen bzw. eine Reduktion von SPPL3 zu einer Hyperglykosylierung. Dies führt schließlich zu einer stärkeren Adhäsion für die *KO* bzw. verminderten Adhäsion für die *HI* im direkten Vergleich zur *TR*.

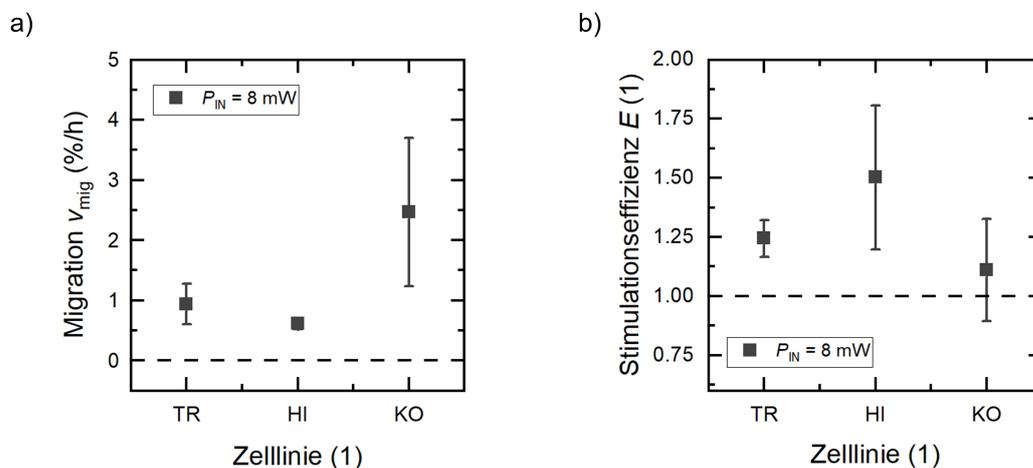
Mittels dieser Zelllinien gilt es zu untersuchen, ob durch die Verwendung akustischer Oberflächenwellen die Aktivität der Protease SPPL3 verändert werden kann. Liegt eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch SAW vor, so weisen Zellen im Schallpfad eine zur internen Referenz verschiedene *N*-Glykosylierung der Zellmembran auf. Dies sollte sich in einer veränderten Zelladhäsion und somit Migration äußern.

Die Vermessung der Zellmigration erfolgt erneut im Rahmen eines Wound-Healing-Assays. Hierfür werden für jeden Messtag drei SAW-Chips mit einer *TR*-, *KO*- und *HI*-Zellkultur angesetzt. Da die Generationszeiten der Zelllinien verschieden sind, wird die Zelldichte der Zellsuspension angepasst. Durch die Verwendung folgender Zellkonzentrationen wird ein konfluenter Zellrasen für jede Zelllinie beim Start des Experiments erreicht. Die Werte sind in tausend Zellen pro hundert Mikroliter angegeben (1 000/100  $\mu$ l): *TR*: 80, *KO*: 60, *HI*: 100. Nach der Aussaat der Zellen in den CI werden diese für 48 h inkubiert. 24 h vor Entfernen des CI wird das Nährmedium durch ein mit DOX angereichertes Nährmedium ausgetauscht. DOX induziert nun die Expression der proteolytisch aktiven SPPL3-Protease in der *HI*-Zelllinie. Nach der 24-stündigen Inkubation werden die Membranproteine modifiziert und durch die Entfernung des CI wird die Messung gestartet. Für die HF-Leistung  $P_{IN}$  wird der für MDCK-II-Zellen zuvor als optimal erwiesene Leistungspegel von  $P_{IN} = 8$  mW verwendet. In einer Versuchsreihe werden alle Zelltypen parallel untersucht und die Messung in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

In Abb. 5.11. sind die Ergebnisse des Wound-Healing-Assays bei einer HF-Leistung von  $P_{IN} = 8$  mW dargestellt. In Abb. 5.11. a) ist die jeweilige Migrationsgeschwindigkeit  $v_{mig}$  der Zellen in % pro Stunde aufgetragen und in Abb. 5.11. b) die Stimulationseffizienz  $E$  als Maß für das Verhältnis der Flächenbelegungsrate der Apertur zur internen Referenz. Bereits in Abb. 5.11. a) sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennbar. Wie zu erwarten war, zeigt die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen eine Abhängigkeit vom Glykosylierungsstatus der Membranproteine. Während die hypoglykosylierten *HI*-Zellen eine verringerte Migrationsgeschwindigkeit gegenüber der

Kontrolle aufweisen, führt eine Hyperglykosylierung (*KO*) zu einer deutlich gesteigerten Migrationsgeschwindigkeit. Dies weist darauf hin, dass glykosylierte Membranproteine für eine effektive Migration essentiell sind. Besonders hervorzuheben ist jedoch die ermittelte Stimulationseffizienz  $E$  der unterschiedlichen Zelllinien. Während in *TR* und *HI* die Flächenbelegungsrate gegenüber der internen Referenz erhöht ist und die Stimulationseffizienz bei *HI* sogar einen maximalen Wert von  $E = 1.5 \pm 0.3$  erreicht, ist keine signifikante Veränderung für die Zelllinie *KO* feststellbar. Die eindeutige Abhängigkeit der Stimulationseffizienz  $E$  von dem SPPL3-Expressionsverhalten der einzelnen Zelllinien lässt auf eine Korrelation der Effizienz der SAW-Stimulation mit der Proteaseaktivität bzw. dem Glykosylierungszustand der Zellmembran schließen. So könnte die Effizienz zum einen vom Zellmembran-Substrat-Abstand abhängig sein. Je größer der Zellmembran-Substrat-Abstand bedingt durch einen höheren Glykosylierungsgrad ist, desto geringer ist die effektive Stimulation durch die SAW. Dies ist sichtbar an der Abnahme von  $E$  bei steigender Glykosylierung der Zellmembran ( $E_{HI} > E_{TR} > E_{KO}$ ). Zum anderen könnte aber auch eine direkte Veränderung der Zellmembranglykosylierung durch SAW-Stimulation vorliegen, was auf eine Beeinflussung der Membranprotease-Aktivität zurückgeführt werden könnte. Die SPPL3-Aktivität müsste hierbei durch die SAW-Stimulation reduziert werden, was zu einer Erhöhung der Glykosylierung der Membranproteine und somit zu einer schnelleren Migration im Schallpfad führen würde. Diese Hypothese ist im Einklang mit dem Verhalten der *HI*-Zelllinie. Dies gilt ebenso für den Wildtyp (*TR*-Zelllinie), jedoch weniger ausgeprägt. Da bei *HI* eine höhere Expressionsrate von SPPL3 als bei *TR* vorliegt, wäre der durch SAW verursachte Effekt höher, da mehr Proteine in *HI* beeinflusst werden. Das unveränderte Verhalten bzw. der deutlich abgeschwächte Effekt für die *KO*-Zelllinie könnte auf das fehlende SPPL3-Protein zurückgeführt werden, da hier keine Beeinflussung des zellulären Glykosylierungsmusters stattfinden kann.

Die dargelegten Daten legen eine Einflussnahme auf intrazelluläre Mechanismen durch akustische Oberflächenwellen nahe. Jedoch muss in zukünftigen Studien anhand biochemischer Analysen die direkte Beeinflussbarkeit der Enzymaktivität durch SAW erbracht werden, z. B. durch Untersuchung einer Zelllinie mit überexprimierter, aber durch Mutation inaktiver SPPL3-Proteasen.



**Abbildung 5.11:**

Beeinflussung der SPPL3-Protease durch SAW in Zelllinien mit unterschiedlichen Expressionsverhalten: *TR* - Wildtyp, *HI* - Überexpression, *KO* - unterdrückte Expression. a) Absolute Migrationsgeschwindigkeit  $v_{mig}$  in (%/h). b) Stimulationseffizienz  $E$  einer SAW bei  $P_{IN} = 8 \text{ mW}$ . Deutlich sichtbar ist der SAW-bedingte Effekt auf die Effizienz in Abhängigkeit der SPPL3-Expression.

## 5.6. Diskussion

---

*Die erhöhte Wundheilungsrate im Schallpfad eines SAW-Chips konnte durch den Ausschluss einer erhöhten Proliferation, elektrischer Wechselfelder und einwirkender Scherspannungen als Stimulationsursache auf die mechanische Komponente der SAW zurückgeführt werden. Zusätzlich konnte eine spannende Korrelation der SAW mit der Glykosylierung der Zellmembran beobachtet werden.*

---

Die hier dargestellten Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll die erfolgreiche Stimulation von Zellkulturen durch akustische Oberflächenwellen. Im Rahmen eines wohldefinierten Wound-Healing-Assays konnte im Schallpfad des IDTs für einen bestimmten Leistungsbereich eine signifikant erhöhte Wundheilungsrate um bis zu 135 % festgestellt werden. Die erhöhte Wundheilung kann durch unterschiedlichste Mechanismen bestimmt sein, wie beispielsweise erhöhte Proliferation oder Zellaktivität in Form von beschleunigter Zellspreitung oder -migration. Bereits in vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine beschleunigte Zellspreitung und Zellmigration im Gegensatz zur Proliferation als Hauptmechanismus für den Wundheilungsprozess bei *in vitro*-Wound-Healing-Assay-Studien angesehen werden kann [247, 248].

Diese Annahme kann durch die Proliferationsmessung bestätigt werden. Da durch die SAW eine erhöhte Proliferation in der gesamten Zellkultur auf dem SAW-Chip, anstatt lokal im Schallpfad des IDTs auftritt, kann eine erhöhte mitotische Aktivität als Ursache der gesteigerten Wundheilung im Schallpfad ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz führt die Proliferationssteigerung zu einer erhöhten Wundheilung im direkten Vergleich zu einer externen Referenz. Daher verbleibt nur noch die Zellaktivität hinsichtlich der Zellmigration und -spreitung als stimulierter Mechanismus für den observierten Effekt.

Die Gründe für eine Erhöhung der Zellmigration können vielfältig sein. Diese wird beeinflusst durch Signalmoleküle, das Stadium der Zellaktivierung, ROS oder durch exogene Kräfte. Im Falle einer künstlichen Wunde im konfluenten Zellrasen werden Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren durch Zellen an der Zellrasenkante ausgeschüttet, wodurch die Zellmotilität der Zellkultur erhöht wird [249]. Da jedoch durch die *Leaky*-SAW ein laminarer Fluss in Richtung des IDTs vorliegt, werden durch Zellen ausgeschüttete Chemokine zur IDT-Seite transportiert. Durch die Konzentrationssteigerung der Chemokine sollte die Migration auf der IDT-Seite erhöht sein. Da jedoch auf beiden Seiten des Spaltes eine erhöhte Wundheilung vorliegt (vgl. *Abb. 5.8. c*), ist es unwahrscheinlich, dass die Zellmigration durch Chemokine beeinflusst wird.

Neben den Chemokinen können sich ROS ebenfalls auf die Zellmigration auswirken. Aufgrund der fehlenden Sensitivität gegenüber Hydroperoxiden und dem geringen Unterschied der ROS-Konzentration im stimulierten Bereich gegenüber der internen Referenz konnte ein signifikanter Beitrag nicht festgestellt werden.

Die durch die *Leaky*-SAW hervorgerufenen Scherspannungen sind vor allem in den hohen Leistungsbereichen mit  $P_{IN} \geq 32$  mW nicht mehr zu vernachlässigen und können daher als Ursache für die Zellstimulation in Betracht gezogen werden. Scherspannungen wirken unter anderem als wichtige Modulatoren für Endothelzellen, beeinflussen zelluläre Funktionen wie Elongation und Permeabilität, die Ausbildung von Aktin-Stressfasern, die Ausschüttung von chemischen Lockstoffen (engl. *Chemoattractants*) oder die Aktivierung von G-Proteinen [250, 251]. Jedoch hängt die zelluläre Art der Beeinflussung von der Größenordnung der auf die Zellkultur einwirkenden Scherspannungen ab: Aktivierung von Proteinkinasen ( $> 0.5$  dyn/cm<sup>2</sup>) [252], gerichtete Zellmigration ( $> 3$  dyn/cm<sup>2</sup>) [253], Änderungen in der Morphologie und Orientierung ( $> 8$  dyn/cm<sup>2</sup>) [234, 235], Ausschüttung von Chemoattractants ( $> 9.8$  dyn/cm<sup>2</sup>) [254] oder gar die Unterdrückung der Apoptose ( $> 15$  dyn/cm<sup>2</sup>)

[255]. Bezüglich der Zellmigration konnten *Hsu et al.* bereits erfolgreich zeigen, dass die Migrationsgeschwindigkeit im laminaren und turbulenten Fluss bei hohen Scherspannungen ( $> 17 \text{ dyn/cm}^2$ ) an der Zellrasenkante gegenüber einer statischen Kultur erhöht ist [256]. Besonders der laminare Fluss fördert die Zellmigration durch Auflösung der Zell-Zell-Kontakte, unterstützte Dynamik der Bildung fokaler Adhäsionspunkte, sowie mechanischer Schubkräfte. Des Weiteren stimulieren hohe Scherspannungen intrazelluläre Signalwege, wie die der kleinen GTPasen der Rho-Familie, sowie Tyrosinkinasen, welche direkt die Zellmotilität beeinflussen.

Laut einschlägiger Literatur ist die bei der SAW-Stimulation maximal wirkende Scherspannung mit  $\tau = 0.07 \text{ dyn/cm}^2$  in dem Leistungsbereich der maximalen Stimulationseffizienz  $E$  mit  $P_{\text{IN}} = 4\text{-}8 \text{ mW}$  zu gering, um Zellen merklich zu stimulieren. Wäre der beobachtete Effekt eine Konsequenz aus der auf die Zellkultur einwirkende Scherspannung, so müssten die absoluten Werte der Flächenbelegungsrate mit steigender Leistung ebenfalls steigen. *Abb. 5.8. b)* zeigt auf, dass in der internen Referenz bei Leistungen  $P_{\text{IN}} > 32 \text{ mW}$  ebenfalls Größenordnungen der Scherspannungen identisch zu denen vor der Apertur im Schallpfad bei  $P_{\text{IN}} = 8$  mit  $\tau \approx 0.07 \text{ dyn/cm}^2$  vorliegen. Ein scherspannungs-bedingter Effekt ist jedoch nicht der Fall, da die gemessene Flächenbelegungsrate in der internen Referenz stets über dem gesamten Leistungsbereich nahezu konstant verbleibt. Des Weiteren müsste ein Rückgang der Effizienz  $E$  erst bei  $P_{\text{IN}} \geq 32 \text{ mW}$  feststellbar sein und nicht bereits bei  $P_{\text{IN}} \geq 16 \text{ mW}$ . Letztlich sollte bei hohen Leistungen durch die stärker auftretenden negativen Einflüsse Werte mit  $E < 1$  erreicht werden, da auf der einen Seite das Wachstum der Zellen im Schallpfad unterdrückt und auf der anderen Seite in der internen Referenz positiv beeinflusst wird. Dies tritt jedoch für keinen Leistungsbereich auf und die Effizienz ist stets  $E \geq 1$ . Aufgrund des frühen Abfalls der Effizienz  $E$  für Leistungen  $P_{\text{IN}} \geq 16 \text{ mW}$  und des fehlenden Anstiegs der Flächenbelegungsrate in den internen Referenzen kann eine Zellaktivierung durch Scherspannungen im Bereich  $P_{\text{IN}} \in [4 \text{ mW}; 8 \text{ mW}]$  definitiv ausgeschlossen werden. Für Werte  $P_{\text{IN}} > 32 \text{ mW}$  mit einer effektiven Scherspannung von  $\tau > 0.2 \text{ dyn/cm}^2$  im Schallpfad ist es jedoch möglich, dass die einwirkenden Scherspannungen nicht mehr länger vernachlässigbar sind. Zellen könnten, wie oben beschrieben, beispielsweise durch Aktivierung der Proteinkinasen stimuliert werden. Jedoch treten hier die bereits erwähnten negativen Effekte wie die Temperaturerhöhung des Nährmediums auf.

Die durch die Einkopplungsverluste hervorgerufene Substraterwärmung führt für das hier betrachtete System bei Leistungen  $P_{\text{IN}} < 100 \text{ mW}$  zu einem linearen Anstieg der Temperatur mit der eingekoppelten Leistung:  $\Delta T = 37 \text{ mK/mW} \Delta P_{\text{IN}}$ . Bei der Überschreitung eines Leistungspegels von  $P_{\text{IN}} \geq 32 \text{ mW}$  wird die physiologische, afebrile Temperaturschwankung von  $\Delta T \approx \pm 1 \text{ K}$  sowohl in unmittelbarer Nähe zur Apertur als auch im Bulk überschritten (vgl. *Abb. 5.7.*). Des Weiteren korreliert die Abnahme der Effizienz  $E$  bei  $P_{\text{IN}} \geq 16 \text{ mW}$  mit der maximal zulässigen Schallintensität von  $I_{\text{US}} = 1 \text{ W/cm}^2$  in der konventionellen US-Therapie. In dem verwendeten IDT-Design wird die Intensität  $I_{\text{SAW}} = 1 \text{ W/cm}^2$  bereits bei einer eingekoppelten Leistung von  $P_{\text{IN}} = 13.6 \text{ mW}$  erreicht. Diese Effekte können letztlich bei hohen Leistungen zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums vor der Apertur und in der kompletten Zellkultur führen.

Aufgrund der hier dargelegten Gründe kann ein Beitrag der Proliferation, Scherspannung und der ROS als Hauptursache für die erhöhte Effizienz bei niedrigen Leistungspegeln ausgeschlossen werden. Somit verbleibt der Mechanismus der elektrischen und mechanischen Stimulation bedingt durch die akustische Oberflächenwelle als einzige Stimulationsursache.

Bereits in vorangegangenen klinischen Studien wurde bewiesen, dass neben der mechanischen Stimulation in der US-Therapie auch elektrische Wechselfelder heilungsfördernde Auswirkungen auf das Gewebe bewirken können. So konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch elektrische Wechselfelder im niederfrequenten Bereich (10-90 Hz) eine erhöhte Heilungsrate von Knochenbrüchen erzielt werden kann [224, 257]. Zusätzlich wurden entzündungshemmende und heilungsfördernde Reaktionen im Gewebe bei hochfrequenten elektrischen Feldern (27 MHz) festgestellt [225]. Adhärente Zellen in

der Umgebung des IDTs und entlang des Schallpfades werden durch das mit der SAW verknüpfte elektrische Feld stimuliert. Sofern der Effekt durch das elektrische Feld hervorgerufen wird, sollte bei der Referenzfrequenz  $f_{\text{ref}} = 100$  MHz ebenfalls ein positiver Einfluss auf das Zellwachstum feststellbar sein. Bei dieser Frequenz wird keine SAW, jedoch ein zur SAW ähnliches elektrisches Wechselfeld in der Umgebung des IDTs erzeugt. Da jedoch kein Effekt bei niedrigen Leistungen feststellbar ist und die Zellen in der Umgebung der Apertur ein zur internen Referenz identisches Zellwachstum aufweisen (vgl. Abb. 5.6.), kann die elektrische Komponente der akustischen Oberflächenwelle ebenfalls ausgeschlossen werden.

Der systematische Ausschluss der verschiedenen Einflussfaktoren führt die Ursache des positiven Zellwachstums eindeutig auf die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle zurück. Hier stellt sich jedoch die Frage, wie die Zellen auf eine mechanische Stimulation reagieren. Durch die Substratauslenkung erfahren Zellen entlang des Schallpfades mechanische Vibration, Druck- und Deformationskräfte. Da die meisten Zellen mechanosensitiv sind [258, 259], kann von einer zellulären Antwort auf die mechanischen Reize ausgegangen werden. Eine mögliche zelluläre Reaktion wäre die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Intrazelluläres freies Kalzium  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nimmt eine wichtige Rolle als sogenannter *second messenger* in den intrazellulären Signalwegen ein [260]. Studien belegten den Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induziert durch die mechanische Reizung und Deformation der Zellmembran mit einer Mikrosonde [261–263]. Stehen Zellen in direktem Kontakt zueinander, wie beispielsweise durch „Gap-junctions“, zeigen angrenzende, nicht-stimulierte Zellen ebenfalls einen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration. In einem konfluenten Zellrasen propagiert diese Kalzium-Welle bis zu einem Radius von 4–6 Zellen oder einer Distanz von bis zu 100  $\mu\text{m}$  [261]. Da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  essentiell für die Regulation der Zellmigration ist (siehe hierzu: Artikel: [264, 265], Reviews: [260, 266, 267]), kann die mechanisch induzierte Kalziumfreisetzung als plausible Ursache der erhöhten Zellbeweglichkeit in Erwägung gezogen werden. Die Transmission der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort über Zellgrenzen hinweg kann ebenfalls die erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der nicht-stimulierten Zellen in unmittelbarer Nähe, allerdings außerhalb des Schallpfades der Apertur, erklären (Bystander-Effekt). Demgegenüber sind Zellen in der internen Referenz zu weit entfernt ( $> 1$  mm), um durch die SAW beeinflusst zu werden. Ein weiterer Hinweis für die mechanische Komponente ist die Beeinflussung der Enzymaktivität von SPPL3. Mechanische Kräfte, sowie *second messenger* wie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  können die Enzymaktivität und die Genexpression beeinflussen [268, 269]. Dies wurde bestätigt durch die eindeutige Abhängigkeit der Effizienz  $E$  der SAW-Stimulation von der Expression des SPPL3-Enzyms (vgl. Abb. 5.11.). Der Anstieg der Effizienz mit steigender SPPL3-Konzentration weist auf eine Beeinflussbarkeit des Enzyms durch eine SAW hin.

Die Stimulationseffektivität ist jedoch stark abhängig von der gewählten Wellenmode. Während ein signifikanter Anstieg von  $E$  bei der Verwendung der Rayleigh-Welle feststellbar ist (vgl. [211]), ist keine Stimulation bei Scherwellen mit identischen IDT-Parametern zu erkennen (vgl. Abb. 5.4.). Dies deutet auf die Notwendigkeit einer vertikalen Substratauslenkung hin. Da der Wellentyp der Scherwelle horizontal polarisiert ist und somit in der Ebene schwingt, erfahren Zellen aufgrund der fehlenden vertikalen Substratauslenkung keine Vibration. Die ineffektive Stimulation bei Scherwellen schließt ebenfalls eine elektrisch bedingte Stimulation aus, da auch bei Scherwellen ein elektrisches Feld propagiert, Zellen jedoch nicht stimuliert werden.

Letztlich kann die mechanische Komponente auch den beobachteten Effekt der verringerten Effizienz bei der gepulsten SAW erklären. Zellen reagieren durch Adaption auf äußere Kräfte, indem sie ihr Zytoskelett umstrukturieren oder ihre Zellform ändern [270]. So ist z. B. die Steifigkeit des Zytoskeletts direkt proportional zur angelegten externen Kraft [271]. Neben der absoluten Kraft ist die Zeitkonstante ein wichtiger Faktor. Abhängig vom Kraftstoß reicht die zelluläre Reaktion von einer instantanen viskoelastischen Antwort über die adaptive Versteifung der zellulären Adhäsionsstrukturen bei konstantem Zug ( $> 15$  Sekunden) bis hin zur einer umfassenden zellulären Umstrukturierung und Umpositionierung bei einer langanhaltenden Kraft ( $> 1$  Minute) [272].

Eine zeitliche Auflösung der Substratvibration im MHz-Regime ist für eine Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht möglich. Daher wird voraussichtlich der beobachtete Effekt durch den strömungserzeugenden Druckgradienten beeinflusst, der von dem hochfrequenten Kraftfeld hervorgerufen wird. Diese wirken mit einer konstanten Kraft (DC-Effekt) auf die Zelle, deren Membran und deren intrazelluläres Medium ein, wodurch schließlich eine Adaption auf die externen Kräfte ermöglicht wird. Dieser Ansatz wäre konsistent mit dem nicht beobachteten Effekt bei Scherwellen, da hier nur eine sehr schwache akustische Strömung bzw. Druck und somit eine vernachlässigbare Kraft vorliegt. Im Falle der gepulsten SAW mit einer Frequenz von 1 Hz ist zusätzlich aufgrund der kurzen Impulsdauer anscheinend keine effektive zelluläre Adaption möglich. Wie die Mechanotransduktion dieser Stimulation im MHz-Bereich explizit erfolgt, muss allerdings in zukünftigen Messungen beleuchtet werden.

Zusammenfassend ist der Stimulationsmechanismus über den kompletten gemessenen Leistungsbereich von  $P_{\text{IN}} \in [1 \text{ mW}; 64 \text{ mW}]$  eine Kombination aus mechanischer Vibration und Scherspannungen. Abhängig von der angelegten HF-Leistung  $P_{\text{IN}}$  können die Beiträge dieser Komponenten variieren. Während bei niedrigen Leistungen mit  $P_{\text{IN}} = 4\text{-}16 \text{ mW}$  Zellen nur durch die mechanische Vibration positiv beeinflusst werden können, steigt der Beitrag der Scherspannungen auf die zelluläre Stimulation mit steigender HF-Leistung. Jedoch erfährt dies bei zu hohen Leistungen schließlich eine negative Wende.

## 5.7. Zusammenfassung und Ausblick

Dieses Kapitel demonstrierte eindrucksvoll, dass die Technologie der akustischen Oberflächenwellen nicht nur im Bereich der Sensorik und Aktorik erfolgreich Anwendung findet, sondern auch in der Zellstimulation einen bedeutenden Beitrag leisten kann. Anknüpfend an die erfolgreiche Erstpublikation – *Acoustotaxis - in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves* [211] – im Bereich der SAW-unterstützten Wundheilung sind in dieser Arbeit spannende Forschungsfragen beantwortet worden. Durch die umfangreiche Variation der SAW-Parameter wurden die für eine effektive Stimulation notwendigen physikalischen Eigenschaften der SAW identifiziert. Die Mode der Rayleigh-Welle mit einer Wellenlänge in der Größenordnung einer Zelle weist in einem schmalen Leistungsbereich das Potential auf, eine Zellkultur signifikant zu stimulieren und somit das Zellwachstum zu erhöhen. So konnte im Falle der SaOs-2 Zelllinie eine maximale Stimulationseffizienz von  $E = 1.18$  bei einer Leistung von  $P_{\text{IN}} = 8 \text{ mW}$  festgestellt werden.

Zu Beginn ausgerichtet auf die Forschungsfrage der SAW-unterstützten Knochenheilung in der Implantatforschung wurde die Studie aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse um einen weiteren Gewebetyp durch die Epithelzellen der MDCK-II-Zelllinie erweitert. Hierbei wurde eine weitaus ausgeprägtere Reaktion der Zellen auf die SAW-Stimulation mit einer Stimulationseffizienz von bis zu  $E = 2.35$  bei einem optimalen Leistungspegel von  $P_{\text{IN}} \in [4 \text{ mW}; 8 \text{ mW}]$  festgestellt.

Die Stimulation einer Zellkultur mittels akustischer Oberflächenwellen ist ein komplexer Mechanismus mit diversen physikalisch beschreibbaren Beiträgen. So besteht die auf einem piezoelektrischen Substrat propagierende SAW sowohl aus einer mechanischen als auch aus einer elektrischen Komponente. Durch die *Leaky*-SAW wird eine laminare Strömung induziert, welche eine Scherspannung auf die Zellen ausübt. Durch Verluste in der Einkopplung des HF-Signals wird das Substrat und das Nährmedium erwärmt. Zur Eingrenzung des Stimulationsmechanismus auf die mechanische Vibration des Substrates wurden verschiedene Kontroll- und Referenzmessungen durchgeführt, sowie intrazelluläre Vorgänge analysiert.

Durch die Durchführung einer Referenzmessung bei einer Frequenz abseits der Resonanzfrequenz des IDTs und durch die ineffektive Stimulation bei einer Scherwelle konnte die elektrische Komponente der SAW sicher ausgeschlossen werden. Der weitaus komplexere mögliche Beitrag der Scherspannung zur Zellstimulation kann durch Abschätzung der wirkenden Kräfte eingegrenzt werden. Auf Grundlage

der Literatur können durch die laminare Strömung und der damit einhergehenden Scherspannung signifikante Änderungen in einer Zellkultur hervorgerufen werden. Da jedoch die hierfür notwendigen Scherspannungen in dem observierten optimalen Leistungsbereich nicht erreicht werden, können Scherspannungs-induzierte Effekte für den niedrigen Leistungsbereich bei  $P_{\text{IN}} \leq 16 \text{ mW}$  ebenfalls ausgeschlossen werden.

Zum Verständnis der intrazellulären Antwort auf die akustische Oberflächenwelle wurden Zellparameter wie ROS, Proliferation und die Eigenschaften von Membranproteinen vermessen. Während der zelluläre Stress über einen weiten Leistungsbereich unauffällig gering ist und auf einem zur externen Referenz identischen Niveau verbleibt, wurde für die Proliferation eine deutliche Beeinflussung durch die akustische Oberflächenwelle festgestellt. Durch die Überprüfung in einem weiten Leistungsspektrum konnte ein zweistufiges Grenzwertverhalten der Zellkultur beobachtet werden. Gegenüber einer unbehandelten externen Referenz wurde in der gesamten Zellkultur des SAW-Chips eine um  $29\% \pm 23\%$  erhöhte Zellproliferation bei der Überschreitung eines Leistungspegels von  $P_{\text{IN}} \geq 4 \text{ mW}$  festgestellt. Die Proliferationsrate verbleibt über einen weiten Leistungsbereich konstant und nimmt bei einer überhöhten Leistung von  $P_{\text{IN}} \geq 128 \text{ mW}$  wieder merklich ab. Da Zellen in der kompletten Kultur eine höhere Proliferation aufweisen, wurde die Zellmitose als Ursache des observierten Effekts ausgeschlossen.

Der sukzessive Ausschluss verschiedener möglicher Stimulationsmechanismen wie Scherspannungen, ROS, Proliferation und dem elektrischen Feld identifiziert die mechanische Komponente der akustischen Oberflächenwelle als Hauptursache für die effektive Zellstimulation und den beobachteten Effekt der erhöhten Wundheilung. Diese Ergebnisse, kombiniert mit der zuvor erwähnten Literatur zu mechanisch induzierter Aktivierung, sind gut vereinbar mit der Hypothese, dass durch die SAW-Stimulation die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration positiv beeinflusst wird und zu dem beobachteten Effekt beiträgt. Erste Untersuchungen zur Korrelation mit der Aktivität von Membranproteasen eröffnen zudem einen weiteren spannenden Ansatz.

Da Zellen durch Umstrukturierung ihres Zytoskelettes oder ihrer Form auf äußere Kräfte reagieren, wäre in zukünftigen Studien die Untersuchung der zellulären Antwort wie beispielsweise der Organisation von Stressfasern bei unterschiedlichen Leistungen von höchstem Interesse. Zusätzlich kann durch Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Biomarkerexpression die Zellaktivität bestimmt werden. Bezüglich des zellulären Stresses und der Bildung freier Radikale wäre eine Verwendung Hydroperoxid-sensitiver Farbstoffe [273] zur Überprüfung der zellulären Signalwege interessant. Die SAW-Technologie eröffnet nicht nur die Möglichkeit der aktiven Stimulation von Zellen und Geweben, sondern erlaubt es gegebenenfalls, einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung zu nehmen. Da sich Zellen, insbesondere Stammzellen, durch die Steifigkeit des unterliegenden Substrates in ihrem Differenzierungsverhalten beeinflussen lassen [27], wäre die SAW-abhängige Ausdifferenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen ein weiterer spannender Forschungsbereich.

Eine Übertragung dieser Technologie auf Implantate bietet die eindrucksvolle Möglichkeit einer leicht integrierbaren unterstützten Wundheilung. Perkutane, durch medizinisches Personal durchgeführte Behandlungsmethoden werden obsolet, da die vielfältig gezeigte positive Ultraschall-Therapie *in vivo* am Ort der Läsion realisiert werden kann. Durch eine kabellose Ansteuerung des auf dem Implantat aufgebrachten Schall-erzeugenden IDTs kann eine permanente Stimulation des Gewebes durch den Patienten erfolgen. Die standardisierte Technologie der akustischen Oberflächenwellen hält zudem die Material- und Gerätekosten gering. Durch den Einsatz von SAW könnte ein großer Schritt in Richtung intelligenter Implantate für eine optimale Patientenversorgung vollzogen werden.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die akustische Oberflächenwelle, ein Phänomen, dessen Einsatzmöglichkeiten seinesgleichen sucht. Mit dem Ziel, die akustische Oberflächenwelle als Methode zur Zelldetektion, -manipulation und -stimulation in dem interdisziplinären Forschungsgebiet der Biowissenschaften zu etablieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ihre Anwendbarkeit untersucht und ihr Potential eruiert.

Die vielfältigen Erscheinungsformen der akustischen Oberflächenwelle machten es möglich, diese auf die expliziten Anforderungen des jeweiligen Einsatzgebietes anzupassen und die festgelegten wissenschaftlichen Fragestellungen systematisch zu erarbeiten.

### *Sensorik*

Empfindlich gegenüber kleinsten Änderungen in der Schallausbreitung, hervorgerufen durch Modifikationen der physikalischen Eigenschaften der Schallausbreitung, können akustische Oberflächenwellen bereits seit Langem ihr Potential in diversen Bereichen der Biosensorik unter Beweis stellen. Für eine zukünftige kontrollierte und überwachte Zelladhäsion und -migration, beispielsweise auf Implantat-Materialien, wurde daher die Sensitivität einer horizontal polarisierten Scherwelle gegenüber der Flächenbelegung durch adhärente Epithelzellen der MDCK-II-Zelllinie untersucht. Erzeugt und detektiert auf dem piezoelektrischen Kristall  $\text{LiTaO}_3$  36° rot YX-Cut, wurde die Zellmigration in den zellfreien Bereich im Rahmen eines Wound-Healing-Assays durch Messung der Signaltransmission, -reflexion und -phase erfasst. Die durch die Zellmigration hervorgerufene Belegung der sensoraktiven Fläche führte zu einer deutlichen Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der SAW und somit zu einer Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  des detektierten transmittierten Signals. Abhängig von der Länge der Verzögerungsstrecke und der gewählten Migrationsrichtung wurden reproduzierbare Werte für das verwendete Setup von  $\Delta\bar{\phi}_{21, K2} = 9.31^\circ \pm 1.65^\circ$  bestimmt. Die Phasenverschiebung  $\Delta\phi_{21}$  korreliert hierbei exakt mit der ermittelten Flächenbelegungsrate  $A_{\text{mig}}$  der Zellen. Im weiteren Verlauf wurden zudem das Zellwachstum und die Fluktuationen in einem konfluenten Zellrasen erfasst und untersucht. Hierbei konnte eine harmonische Oszillation, vermutlich bedingt durch die Aktivität des zellulären Zytoskeletts oder durch Variation des Zell-Substratabstandes, registriert werden. Die anschließende Untersuchung der zellulären Ablösung von der Substratoberfläche, hervorgerufen durch Zell-lyisierende Stoffe oder durch Apoptose, ermöglichte eine Quantifizierung des Ablöseprozesses. Neben der Untersuchung zellulärer Prozesse konnte eine Abhängigkeit des SAW-Signals von der Osmolarität des Nährmediums dargelegt werden. Die experimentell erlangten Ergebnisse wurden durch eine theoretische Betrachtung der Störungsmechanismen auf die Ausbreitung akustischer Oberflächenwellen bestätigt. Als Ursache für die Phasenverschiebung wurde die Änderung der akustoelektrischen Interaktion identifiziert. Die Belegung der Sensorfläche durch migrierende Zellen führt zu einer Änderung der Permittivität an der Grenzfläche des Substrates und somit zu einer Beeinflussung der Ausbreitungsgeschwindigkeit.

Die hier gezeigten Erkenntnisse demonstrieren somit den möglichen Einsatz von SAW-Sensoren zur Überwachung von Wound-Healing-Assays ohne die Notwendigkeit der optischen Mikroskopie. Neben der Observierung der Zellmigration können in Zukunft dynamische Prozesse wie die Ablösung von Zellen besser quantifiziert oder durch den Einsatz zusätzlicher SAW-Sensoren eine stetige Überwachung der Kultivierungsbedingungen sichergestellt werden.

Bei zukünftigen SAW-Chip-Designs kann eine Optimierung hinsichtlich der benötigten Sensitivität oder Selektivität durchgeführt werden. Durch die Verwendung einer Kombination aus einer Metall-beschichteten und Metall-freien Sensoroberfläche können Variationen in den elektrischen und mechanischen Eigenschaften separat bestimmt werden [81, 134].

### *Manipulation*

Die Bildung komplexer neuronaler Strukturen auf einem Chip ist in sogenannten *bottom-up*-Ansätzen für das Verständnis des menschlichen Gehirns von größtem Interesse. Limitiert durch vorwiegend statische und randomisierte Ansätze der Zellpositionierung und -manipulation konnten bislang keine komplexen Strukturen geschaffen werden, da eine dynamische Manipulierbarkeit der Zellkultur fehlte. Durch die Verwendung dynamischer Kraftfelder, erzeugt durch akustische Oberflächenwellen, soll diese Limitierung behoben werden.

Bestehend aus dem Material  $\text{LiNbO}_3$  128° rot Y-Cut und vier orthogonal zueinander stehenden IDTs konnte ein Kraftfeld geschaffen werden, dessen Eigenschaften durch die angelegte hochfrequente Wechselspannung festgelegt wurden. Nach der eingehenden Visualisierung des Kraftfeldes mittels AFM wurde die räumliche und zeitliche Dynamik des Kraftfeldes in einem mikrofluidischen System durch Verwendung von Mikropartikeln ausführlich charakterisiert. Abhängig vom gewählten SAW-Chip-Design konnte für eine Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  eine lineare Abhängigkeit der akustischen Kraft  $F_r$  gegenüber der angelegten Leistung  $P_{\text{IN}}$  von  $F_r(P_{\text{IN}}, \Psi) = 14.03 \frac{\text{nN}}{\text{mW}} P_{\text{IN}} \Psi \sin(2kx)$  identifiziert werden. Für eine hohe Homogenität und Strukturierungseffizienz des Kraftfeldes ist hierbei die Größenordnung der angelegten Leistung ausschlaggebend und erzielt in einem Intervall von  $P_{\text{IN}} = 18\text{-}21 \text{ dBm}$  die besten Ergebnisse. Durch Anpassung der Anregungsfrequenz bei *chirped*-IDTs konnte der Abstand der Knotenpunkte variiert und eine separate Ausrichtung einzelner Objekte in einem Knotenpunkt erreicht werden. Die Phasenverschiebung des Anregungssignals ermöglichte es zudem, die Mikropartikel lateral zu verschieben und zu positionieren. Unter Verwendung der Neuroblastomzelle B35 als neuronale Modellzelle konnte die hohe Biokompatibilität des Setups verifiziert und eine maximale anwendbare Eingangsleistung  $P_{\text{IN}} = 18 \text{ dBm}$  identifiziert werden. Hierbei wurde eine Abnahme der Proliferation im Mikrokanal unter Einfluss einer SAW ermittelt, was mit der Mitoseunterdrückung durch mechanische Kräfte erklärt werden kann [185]. Schließlich konnte erfolgreich die Manipulierbarkeit neuronaler Fortsätze primärer Neuronen in einem Stehwellenfeld an der UCSB demonstriert werden. Die Wachstumsrichtung der neuronalen Fortsätze korrelierte hierbei exakt mit der Symmetrie des Kraftfeldes. Durch die Kombination des mikrofluidischen Systems mit Polyacrylamid-Gelen oder Kollagen I können die Wachstumsbedingungen der Zellkultur zudem an eine physiologische Umgebung angepasst und optimiert werden.

Anhand der hier dargelegten Beweise der Anwendbarkeit akustischer Oberflächenwellen zur Manipulation von Zellkulturen konnte schließlich erfolgreich der Grundstein für die Generierung komplexer neuronaler Netzwerke auf einem Chip gelegt werden. Das räumlich und zeitlich variable Kraftfeld ermöglicht es, dynamisch Einfluss auf die Zellkultur nehmen zu können. Nach der Positionierung der Zellkörper können durch asymmetrische Kraftfelder die Wachstumsrichtungen der neuronalen Fortsätze manipuliert und definiert werden. In weiteren Experimenten ist daher die Identifizierung der Ursache der beobachteten Manipulation der neuronalen Fortsätze von Interesse. So können durch die Potentiallandschaft hervorgerufene Rückstellkräfte oder eine Anreicherung von Wachstumsfaktoren in den Knotenpunkten bzw. -linien eine mögliche Wirkursache darstellen. Die Kombinierbarkeit der Technologie der akustischen Oberflächenwelle mit der durch *Fromherz* erstmals vorgestellten Schnittstelle zwischen Zelle und Silizium-Chip [139, 141, 274] erlaubt in zukünftigen Studien eine Vermessung und Interaktion mit dem generierten Netzwerk. Durch die hier gezeigten Konzepte und Ergebnisse rücken reproduzierbare, wohldefinierte neuronale Netzwerke mit festgelegten interzellulären Kontakten für *Brain-on-a-chip*-Systeme in greifbare Nähe!

In den vorangegangenen Kapiteln konnte das breite Anwendungsspektrum der akustischen Oberflächenwelle in der biologischen Physik ausführlich gezeigt werden. Aber kein Anwendungsbereich akustischer Oberflächenwellen, weder in der Sensorik, noch in der Aktorik, stellt ein derartig hohes Potential dar, wie die Möglichkeit der aktiven Stimulation von Zellen zur unterstützten Wundheilung. Im Hinblick auf eine effiziente Osseointegration künstlicher Hüftimplantate wurde die Stimulationseffizienz  $E$  der akustischen Oberflächenwellen auf die Osteosarcom-Zelllinie SaOs-2 in Abhängigkeit diverser SAW-Parameter im Rahmen eines Wound-Healing-Assays untersucht. In einem schmalen Leistungsspektrum von  $\mathcal{O}(10^0 \text{ mW} - 10^1 \text{ mW})$  konstanter Leistung wurde für die Rayleigh-Welle mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$  eine Erhöhung der Stimulationseffizienz mit einem globalen Maximum von  $E(8 \text{ mW}) = 1.18$  für die SaOs-2-Zelllinie festgestellt. Horizontal polarisierte Scherwellen oder ein gepulstes Signal führten zu keinem positiven bzw. messbaren Einfluss.

Mit der Verwendung der Zelllinie MDCK-II wurde die Studie um die Gewebeart des Epithels erweitert. Hierbei wurde ein deutlich ausgeprägter Effekt der Stimulationseffizienz  $E$  ermittelt, bei dem der Einsatz akustischer Oberflächenwellen lokal zu einem bis zu 135 % gesteigertem Zellwachstum führte! Als Ursache für das stimulierte Zellwachstum konnten parasitäre, durch die SAW-Anregung entstehende Effekte wie eine ballistische Verschiebung, eine erhöhte lokale Nährstoffversorgung, elektrische Wechselfelder, Scherkräfte oder temperaturinduzierte Effekte sukzessiv ausgeschlossen werden. Zum Verständnis der intrazellulären Antwort auf die mechanische Vibration wurde die Proliferationsrate, der zelluläre Stress und die Enzymaktivität von Membranproteinen vermessen. Hierbei wurde in der gesamten Zellkultur eine homogene, unauffällige physiologische ROS-Konzentration für ein breites Leistungsspektrum mit  $P_{\text{IN}} \leq 64 \text{ mW}$  erfasst. Bezüglich der Proliferation konnte eine zweistufige leistungsabhängige Änderung der Proliferationsrate gemessen werden. Nach dem Erreichen eines Leistungspegels von  $P_{\text{IN}} = 8 \text{ mW}$  steigt die Proliferationsrate auf einen Wert von  $\bar{X}_{\text{rel-SAW}} = 1.19 \pm 0.05$  an und verbleibt dort über einen weiten Leistungsbereich nahezu konstant. Ab einem zweiten Grenzwert mit  $P_{\text{IN}} > 64 \text{ mW}$  sinkt die Proliferationsrate und wird durch die SAW unterdrückt. Hinsichtlich der Aktivität der SPPL3-Membranproteine wurde zudem ein lokaler Unterschied der im Schallpfad befindlichen Zellen zu denen in der internen Referenz detektiert.

Durch Ausschluss der Proliferation, ROS oder parasitärer Effekte, sowie die Abhängigkeit von der Wellenmode, -form und der lokal unterschiedlichen Enzymaktivität untermauert schließlich die Identifikation der mechanischen Komponente der SAW als Stimulationsursache.

Da Zellen sensitiv auf mechanischen Stress durch die Reorganisation des Zytoskeletts oder der Zellform reagieren [270], sollte in zukünftigen Studien weiterhin ein Augenmerk auf Faktoren, die die Struktur des Zytoskeletts oder der Zellform regulieren, gerichtet werden. So können beispielsweise durch „Filamentsensoren“ in Echtzeit die durch SAW hervorgerufene Umstrukturierung des Zytoskeletts beobachtet und quantifiziert werden [275]. Des Weiteren ist sowohl die Messung des intrazellulären Kalziums  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der Zellaktivierung als auch der Biomarkerexpressionen von höchstem Interesse.

Diese spannenden Forschungsergebnisse ebnen nun den Weg für zukünftige medizinische Anwendungen. Durch die periodische Anordnung von interdigitalen Schallwandlern auf einem flexiblen Substrat [276] oder auf einem künstlichen Implantat (z. B. Hüftprothese) können sowohl perkutane als auch subkutane Behandlungsmethoden für eine kontinuierliche unterstützte Stimulation des Gewebes durchgeführt werden.



# A. Berechnung der Permittivität

## A.1. Herleitung und Berechnung der Elektrolyt-Permittivität

Nach *Li et al.* kann durch Kombination des klassischen Debye-Drude-Modells die Permittivität von Elektrolyt-Lösungen bestimmt werden [277]. Diese ist die Summe aus dem Wasser-Hintergrund, beschrieben durch das Debye-Modell,  $\epsilon_l^{\text{Debye}}(\omega)$  und der Leitfähigkeit der Ionen, beschrieben durch das Drude-Modell,  $\epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega)$ :

$$\epsilon_l(\omega) = \epsilon_l^{\text{Debye}}(\omega) + \epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega) \quad (\text{A.1})$$

Im **Debye-Modell** folgt die relative Permittivität von reinem Wasser der Dispersionsrelation [278]. Für eine exakte Darstellung der dielektrischen Eigenschaften von Wasser ist jedoch die Berücksichtigung einer bimodalen Relaxationszeit notwendig [279]:

$$\epsilon_l^{\text{Debye}}(\omega) = \frac{\epsilon_s - \epsilon_2}{1 + i\omega\tau_1} + \frac{\epsilon_2 - \epsilon_\infty}{1 + i\omega\tau_2} + \epsilon_\infty \quad (\text{A.2})$$

mit  $\epsilon_s$  der statischen (DC) Dielektrizitätskonstante bei niedrigen Frequenzen,  $\epsilon_2$  der intermediären Dielektrizitätskonstante und  $\epsilon_\infty$  der Dielektrizitätskonstante der induzierten Polarisation bei hohen Frequenzen.  $\omega$  beschreibt die Kreisfrequenz und  $\tau_1$  bzw.  $\tau_2$  die Stoßzeiten der Wassermoleküle. Die *Gl. A.2* kann vereinfacht werden zu:

$$\epsilon_l^{\text{Debye}}(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_2}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \frac{\epsilon_2 - \epsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau_2^2} + i \left\{ \frac{\omega\tau_1(\epsilon_s - \epsilon_2)}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \frac{\omega\tau_2(\epsilon_2 - \epsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau_2^2} \right\} \quad (\text{A.3})$$

Nach *Buchner et al.* erreichen die dielektrischen Relaxationsparameter von Wasser bei einer Temperatur von  $T = 35^\circ\text{C}$  folgende Werte:

$\epsilon_s$	$\tau_1$ (ps)	$\epsilon_2$	$\tau_2$ (ps)	$\epsilon_\infty$
74.91	6.69	6.22	1.5	4.74

Unter Berücksichtigung dieser Werte erhält man eine komplexe Permittivität für Wasser bei  $\omega_{\text{res}} = 2\pi f_{\text{res}}$  mit der verwendeten Arbeitsfrequenz  $f_{\text{res}} = 205$  MHz von:

$$\underline{\epsilon_l^{\text{Debye}}(\omega_{\text{res}}) = 79.64 + i0.65}$$

Das **Drude-Modell** der relativen Permittivität eines metallischen Leiters kann wie folgt beschrieben werden:

$$\epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega) = \epsilon_l^{\text{Drude}'}(\omega) + i\epsilon_l^{\text{Drude}''}(\omega) = \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2}\right) + i\frac{\omega_p^2}{\omega} \frac{\gamma}{\omega^2 + \gamma^2} \quad (\text{A.4})$$

mit

$$\omega_p^2 = \frac{Ne^2}{\epsilon_0 m} \quad (\text{A.5})$$

bei der  $\omega_p^2$  die Plasmafrequenz,  $N$  die Teilchendichte,  $e$  die Elementarladung,  $m$  die Teilchenmasse,  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante und  $\gamma$  den Dämpfungsterm beschreiben. Durch die Näherung  $\omega \ll \gamma$  kann die Gl. A.4 nach [280] vereinfacht werden zu:

$$\epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega) \approx i\frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega} \quad (\text{A.6})$$

mit der Leitfähigkeit

$$\sigma = \frac{Ne^2}{m\gamma}. \quad (\text{A.7})$$

Ähnlich den freien Elektronen in Metallen können Ionen in Elektrolyt-Lösungen als freie Ladungsträger betrachtet werden. Der einzige Unterschied liegt in der Bewegungsumgebung. Während sich in einem Leiter die freien Ladungsträger in einer atomaren Gitterstruktur fortbewegen, ist es bei Ionen der Elektrolyt-Lösung freies Wasser.

Ist die Ionen-Konzentrationen geringer als  $c < 0.5$  mol/l, so entspricht die Mikrowellenleitfähigkeit der Gleichstromleitfähigkeit  $\sigma_{\text{DC}}$ .

Die Gleichstromleitfähigkeit einer Elektrolyt-Lösung  $\sigma_{\text{DC}}$  lässt sich wie folgt berechnen:

Für konzentrierte wässrige Lösungen mit Ionenkonzentrationen  $c < 0.5$  mol/l wird die erweiterte Debye-Hückel-Theorie, die sogenannte Davies-Gleichung angewendet, um die Aktivitätskoeffizienten der Salze zu bestimmen [281]:

$$\log f_i = -0.5z_i^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.3I \right) \quad (\text{A.8})$$

mit  $f_i$  dem ionischen Aktivitätskoeffizient,  $z_i$  der Ladungszahl der Ionen und  $I$  dem Zahlenwert der Ionenstärke. Die Ionenstärke folgt der Gleichung Gl. A.9:

$$I = \sum_i I_i = \sum_i \frac{1}{2} c_i z_i^2 \quad (\text{A.9})$$

während  $c_i$  die  $i$ -te Ionenkonzentration beschreibt.

Die molare Leitfähigkeit  $\Lambda_{m,i}$  kann anschließend aus dem ionischen Aktivitätskoeffizienten  $f_i$  und der molaren Grenzleitfähigkeit  $\Lambda_{m,i}^0$  berechnet werden:

$$\Lambda_{m,i} = f_i \Lambda_{m,i}^0. \quad (\text{A.10})$$

So folgt für die Gesamtgleichstromleitfähigkeit der Elektrolyt-Lösung:

$$\sigma_{\text{DC}} = \sum_i c_i \Lambda_{m,i} \quad (\text{A.11})$$

Für die Berechnung von  $\sigma_{\text{DC}}$  werden alle anionischen Salze berücksichtigt, deren Konzentration  $c > 0.1$  g/l ist. In Tab. A.1. sind alle berücksichtigten Salze des Nährmediums *MEM Earle's* -

M0325 von Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufgelistet. Die entsprechenden Konzentrationen wurden aus der Produktinformation entnommen [282].

Salz	$c(\text{g/l})$	$M(\text{g/mol})$	$c(\text{mmol/l})$
CaCl <sub>2</sub>	0.265	110.98	2.39
MgSO <sub>4</sub>	0.098	120.37	0.81
KCl	0.400	74.55	5.37
NaHCO <sub>3</sub>	2.200	84.01	25.19
NaCl	6.800	58.44	116.36
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.122	199.98	0.61

**Tabelle A.1:**  
Auflistung der im  
Nährmedium enthaltenen  
anionischen Salze nach [282]

Auf Basis dieser Werte wurden die entsprechenden Schritte zur Berechnung der Gesamtgleichstromleitfähigkeit durchgeführt. Diese sind in *Tab. A.2.* aufgelistet:

Ion	$\Lambda_{m,i}^0 \left[ \frac{\text{Scm}^2}{\text{mol}} \right]$	$z_i$ [1]	$c_i \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]$	$I_i$ [ $10^{-3}$ ]	$f_i$ [1]	$\Lambda_{m,i} \left[ \frac{\text{Scm}^2}{\text{mol}} \right]$	$\sigma_{\text{DC},i} \left[ \frac{\text{S}}{\text{m}} \right]$
Ca <sup>2+</sup>	119	2	2.39	4.78	0.34	39.89	0.010
Cl <sup>-</sup>	76.4	1	126.50	63.24	0.76	58.13	0.735
Mg <sup>2+</sup>	106.2	2	0.81	1.62	0.34	35.60	0.003
SO <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	160	2	0.81	1.62	0.34	53.63	0.004
K <sup>+</sup>	73.5	1	5.37	2.68	0.76	55.93	0.030
Na <sup>+</sup>	50.1	1	143.15	71.58	0.76	38.12	0.546
HCO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	44.5	1	26.19	13.09	0.76	33.86	0.089
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0	1	0.61	0.31	0.76	0	0

**Tabelle A.2:** Berechnete Einzelwerte zur Ermittlung der Gesamtgleichstromleitfähigkeit  $\sigma_{\text{DC}}$ .

Die Gesamtionenstärke beträgt hierbei  $I = 158.93 \cdot 10^{-3}$ .

Die Berechnung ergibt somit eine Gesamtgleichstromleitfähigkeit von

$$\sigma_{\text{DC}} = 1.42 \text{ S/m.}$$

und schließlich eine Permittivität bei der Resonanzfrequenz des SAW-Chips mit  $\omega_{\text{res}} = 2\pi f_{\text{res}}$  nach *Gl. A.6* von

$$\underline{\epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega_{\text{res}})} = i124.21.$$

Die Einzelbeiträge nach Debye und Drude ergibt zusammengeführt nach *Gl. A.1* eine Permittivität des Nährmediums von:

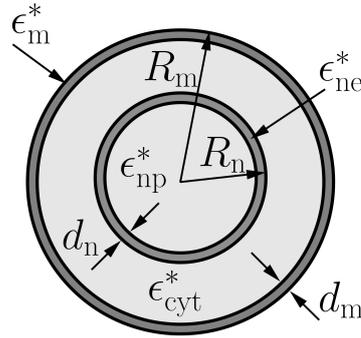
$$\underline{\epsilon_l^{\text{Drude}}(\omega_{\text{res}})} = 79.64 + i124.86.$$

## A.2. Berechnung der Permittivität von Zellen

Die Permittivität von Zellen kann theoretisch mittels der Maxwell-Wagner-Gleichung frequenzabhängig berechnet werden. Die hierzu notwendigen Grundlagen können aus der Literatur entnommen werden: [136].

Im Prinzip kann eine eukaryotische Zelle als ein Zwei-Schalen-System mit Schalen endlicher Dicke betrachtet werden. Hierbei repräsentiert die Außenschale die äußere Zellmembran und die innere

Schale des Modells die Hülle des Zellkerns. In *Abb. A.1.* ist die Modellzelle mit den berücksichtigten Zellkompartimenten und deren Kenngrößen dargestellt.



**Abbildung A.1:**  
Modelldarstellung einer eukaryotischen Zelle. Das Zwei-Schalen-System berücksichtigt sowohl die unterschiedlichen Permittivitäten des Zytoplasmas und des Zellkerns als auch der Membranen.  
(In Anlehnung an [136]).

Der Radius des Modells beträgt  $R_m$  und die äußere Zellmembran besitzt eine Dicke  $d_m$  mit der Permittivität  $\epsilon_m^*$ . Die anschließende Schicht berücksichtigt das Zytoplasma mit der Permittivität  $\epsilon_{\text{cyt}}^*$ . Die innere Schale beschreibt den Zellkern und ist aufgebaut aus der Zellkernhülle, welche gekennzeichnet ist durch die Dicke  $d_n$  bei einem Radius von  $R_n$  und die Permittivität  $\epsilon_{\text{ne}}^*$ , und aus dem Nukleoplasma mit der Permittivität  $\epsilon_{\text{np}}^*$ . Im Modell wird angenommen, dass die verschiedenen Kompartimente homogene Medien darstellen.

Die komplexe Permittivität  $\epsilon^*$  der einzelnen Bereiche berechnet sich über die relative Permittivität  $\epsilon_r$  und die Leitfähigkeit  $\sigma$ :

$$\epsilon^* = \epsilon_r \epsilon_0 + i \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega}. \quad (\text{A.12})$$

Durch Variation der Radien  $R_m$  und  $R_n$  kann das Volumenverhältnis „Zellkern zu Gesamtvolumen“  $v$  angepasst werden und wird wie folgt beschrieben:  $v = R_n^3 / R_m^3$ .

Der Aufbau des Modells besteht aus konzentrisch positionierten Sphären unterschiedlicher Radien, die den oben genannten Parametern entsprechen. Unabhängig von der Anzahl der Schalen wird sukzessiv die kombinierte Permittivität  $\epsilon_{\text{mix}}$  eines Kerns mit Schale auf Basis der *Gl. A.13* berechnet, beginnend vom Zentrum des mehrschichtigen Systems. Die berechnete kombinierte Permittivität  $\epsilon_{\text{mix}}$  stellt anschließend den Kern des nächsten Systems „Kern-Schale“ dar.

$$\epsilon_{\text{mix}} = \frac{(2\epsilon_2 + \epsilon_1)R_2^3 + 2(\epsilon_1 - \epsilon_2)R_1^3}{(2\epsilon_2 + \epsilon_1)R_2^3 - (\epsilon_1 - \epsilon_2)R_1^3} \epsilon_2. \quad (\text{A.13})$$

Hierbei besitzt der Kern den Radius  $R_1$  und die Permittivität  $\epsilon_1$ , welcher umschlossen ist von einer Schale mit dem Radius  $R_2$  und  $\epsilon_2$ .

Für die Berechnung der Permittivität  $\epsilon_{\text{cell}}$  in Abhängigkeit des Volumenverhältnisses  $v$  wurden die in der *Tab. A.3.* aufgelisteten Werte verwendet (entnommen aus [136]). Der Zellkernradius  $R_n$  wurde experimentell bestimmt.

	$\epsilon_r$	$\sigma$ [S/m]	$d$ [nm]	$R$
Nukleoplasma	52	1.35	-	$R_n = 13.4 \mu\text{m}$
Zellkernhülle	28	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$d_n = 40$	$R_{\text{ne}} = R_n + d_n$
Zytoplasma	50	0.8	-	$R_m = (R_n^3 / v)^{\frac{1}{3}}$
Zellmembran	6.33	$1.4 \cdot 10^{-9}$	$d_m = 7$	$R_{\text{me}} = R_m + d_m$

**Tabelle A.3:**

Die zur Berechnung der gesamten Zellpermittivität verwendeten Werte. Entnommen und ggf. angepasst aus [136].

# B. Geräte

## B.1. Multifunktionsgenerator

### B.1.1. Aufbau

Der Eigenbau-Multifunktionsgenerator wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und dient zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit eines SAW-Chips und der Erzeugung eines hochfrequenten Signals zur Anregung einer akustischen Oberflächenwelle. Der Generator kann ein Signal im Frequenzbereich von 60- 85 MHz und 120- 185 MHz mit einer maximalen Leistung von bis zu  $P = 30$  dBm erzeugen. Dieses kann durch Pulsweitenmodulation und Phasenverschiebung beliebig manipuliert werden. Durch einen integrierten Leistungsdetektor kann durch die konstante Ausgabe eines HF-Signals in einem ausgewählten Frequenzbereich die Rückflussdämpfung eines zu überprüfenden Bauteils ermittelt werden.

### B.1.2. Bedienungsanleitung

Die nachfolgende Bedienungsanleitung bezieht sich auf das aktuellste Softwareupdate *V8.7* des Multifunktionsgenerators.

Vor der Inbetriebnahme sind folgende Punkte zu beachten:

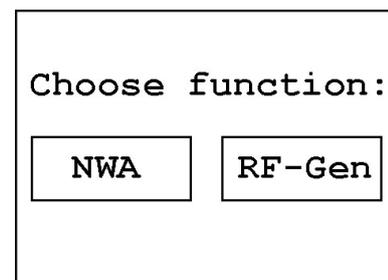
- Verwenden eines **7.5 V**-Festspannungsnetzteils.  
**Die Verwendung einer abweichenden Eingangsspannung führt zur Beschädigung des Generators!**
- Eingangsdämpfer müssen nicht verwendet werden.
- Der Betrieb kann ohne angeschlossene HF-Verbraucher erfolgen.
- Gerät nicht kurzschließen oder überlasten!
- Von Flüssigkeiten fernhalten!
- **Achtung**, bei der NWA-Funktion werden  $P_{\text{out}} = 20$  dBm ausgegeben!

## Beschreibung der Handhabung

Startbildschirm des Generators mit der Funktionsauswahl:

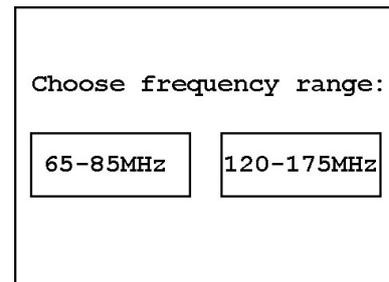
- Network-Analyzer (NWA)
- HF-Generator (HF-Gen)

Anwahl durch Drücken der entsprechenden Fläche.



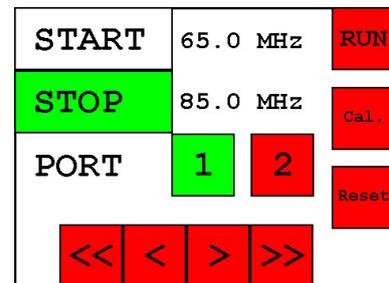
## NWA-Funktion

Nach Anwahl der NWA-Fläche erscheint eine Auswahlmöglichkeit des zu messenden Frequenzbereichs. Dies dient nur als Vorauswahl und der Frequenzbereich kann anschließend individuell angepasst werden.



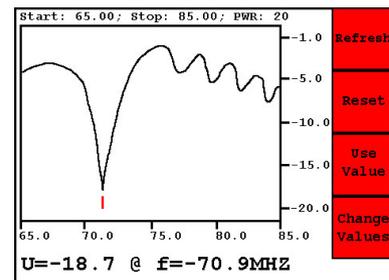
### Einstellung der NWA-Funktion

- Festlegung des Messintervalls über *START* und *STOP*. Nach Anwahl eines Feldes wird dieses grün hinterlegt und kann durch die Pfeiltasten eingestellt werden.
- *PORT* definiert den zu vermessenden HF-Ausgang, welcher grün hinterlegt ist.
- Über *Cal.* wird im Leerlauf (ohne Verbraucher!) das Signal kalibriert. Dementsprechend wird bei einer Messung die Kalibrationskurve abgezogen.
- Über *Reset* gelangt man zurück zur Start-Oberfläche.
- Durch die Betätigung von *RUN* erfolgt die Vermessung des Verbrauchers.



### Ausgabe der gemessenen reflektierten Leistung im gewählten Frequenzbereich

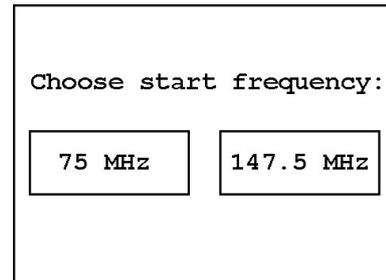
- **Achtung!** Der dargestellte Wert entspricht nicht exakt der Rückflussdämpfung  $S_{11}$ , daher kann die Analyse nur qualitativ erfolgen.
- Durch Berühren des Graphen wird der gemessene Wert an der markierten Position (roter Strich) ausgegeben. Die initiale Ausgabe ist stets der ermittelte Minimalwert.
- *Refresh* startet die Messung erneut.
- Über *Reset* gelangt man zurück zur Start-Oberfläche.
- *Use Value* startet die HF-Generator-Funktion und übernimmt die aktuell markierte Frequenz  $f$ .
- Mit *Change Values* gelangt man zurück zur NWA-Einstellungsseite.



## HF-Gen.-Funktion

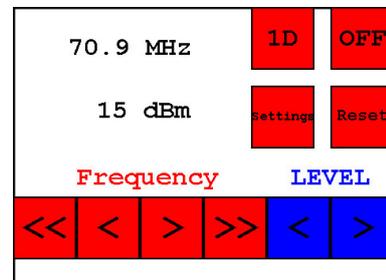
Nach Anwahl der *HF-Gen*-Fläche erscheint eine Auswahlmöglichkeit einer Startfrequenz.

Dies dient nur als Vorauswahl und die Arbeitsfrequenz kann anschließend individuell angepasst werden.



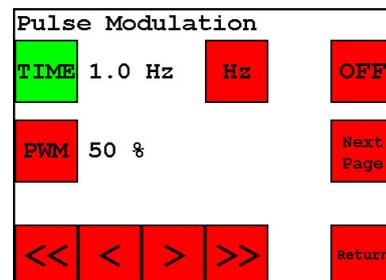
## Einstellung des HF-Generators

- Über die Pfeiltasten bei *Frequency* und *LEVEL* kann die Arbeitsfrequenz  $f$  und die Ausgangsleistung  $P_{\text{out}}$  eingestellt werden.
- Festlegung der Ausgabeports über *1D* (rot) - Port 1 und *2D* (grün) Port 1 und 2.  
**Achtung!** Bei *2D* wechselt die HF-Ausgabe zwischen Port 1 und 2 alle 30 ms, sodass jeweils nur ein Ausgang aktiv ist.
- *OFF* (rot) und *ON* (grün) zeigt an, ob die HF-Ausgabe aktiv ist. Bei einem HF-Signal leuchtet zudem die rote LED an der Generator-Front.
- Über *Settings* kann die Pulsfunktion (*Pulse Modulation*) und eine konstante Phasenverschiebung (*Constant Shift*) eingestellt und aktiviert werden.  
**Achtung!** für die Funktion *Constant Shift* ist ein angeschlossener Phasenschieber notwendig!
- Über *Reset* gelangt man zurück zur Start-Oberfläche.



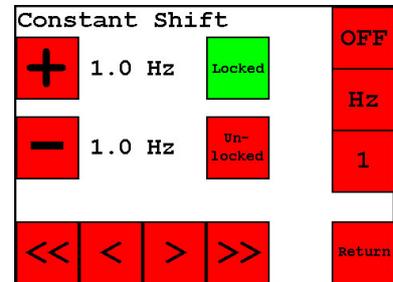
## Einstellung der Puls-Funktion

- Pulsfrequenz und Tastverhältnis werden über *TIME*, *Hz* und *PWM* eingestellt. Einstellung von *TIME* und *PWM* erfolgt durch Anwahl (grün) und die Pfeiltasten. Drücken von *Hz* wechselt die Zeiteinheit:  
Hz  $\rightarrow$  s  $\rightarrow$  min  $\rightarrow$  h  $\rightarrow$  Hz.
- *ON* (grün), *OFF* (rot) aktiviert bzw. deaktiviert die Puls-Funktion.
- Über *Next Page* gelangt man auf die Einstellungsseite der konstanten Phasenverschiebung (*Constant Shift*).
- Über *Return* gelangt man zurück zur HF-Gen.-Einstellungsseite.



### Einstellung der konstanten Phasenverschiebung

- Die Phasenverschiebung erfolgt stufenweise in  $\Delta\Phi = 60^\circ$ -Schritten. Die Schrittgeschwindigkeit wird durch Anwahl der Felder *Unlocked* (rot) zu *Locked* (grün) eingestellt. Über die Pfeiltasten werden die Zahlenwerte und über *Hz* die Zeiteinheit festgelegt.
- Drücken von *Hz* wechselt die Zeiteinheit:  
Hz  $\rightarrow$  s  $\rightarrow$  min  $\rightarrow$  h  $\rightarrow$  Hz.
- + und - definieren die Richtung der Phasenverschiebung.
- 1 gibt die Schrittweite der Phasenverschiebung an:  
1:  $60^\circ$ , 2:  $120^\circ$ , 3:  $180^\circ$ .
- Aktivierung der einzelnen Ports durch Anwahl *Unlocked* zu *Locked*.
- ON (grün), OFF (rot) aktiviert bzw. deaktiviert die konstante Phasenverschiebung.
- Über *Return* gelangt man zurück zur HF-Gen.-Einstellungsseite.



## B.2. Fluoreszenzmikroskop und Inkubationssysteme

### Mikroskopinkubator

Der Mikroskopinkubator sorgt für die Sicherstellung optimaler Kultivierungsbedingungen (wassergesättigte Atmosphäre bei einem CO<sub>2</sub>-Volumenanteil von 5%) während der Experimentdurchführung auf einem Mikroskop. Es stehen zwei verschiedene Inkubationssysteme zur Verfügung. Diese besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Einbauplätzen. Während das Komplettsystem *ibidi Heating & Gas Incubation System* (ibidi, Martinsried, Deutschland) vier Plätze für die Aufnahme von Proben zur Verfügung stellt weist das System *HT 200* (ibidi, Martinsried, Deutschland) mit dem Gasmischer *The Brick* (Live Image Services, Basel, Schweiz) nur einen Platz auf. Alle in den Experimenten entworfenen Probenabmessungen entsprechen in der Tiefe und Breite den Abmaßen eines Objektträgers, sodass diese in den Mikroskopinkubatoren aufgenommen werden können.

### In den Experimenten verwendete Filtersets:

Bezeichnung	Anregung	Emission	Strahlteiler	Herstellerbezeichnung
DAPI	350/50	460/50	400	AHF-F46-000-DAPI
FITC	475/35	530/43	500	MDF-FITC
Rhodamine	546/12	LP590	580	Zeiss Filter Set 15
AlxFl594	560/55	645/75	595	(F)41004-TxRed Alexa 594

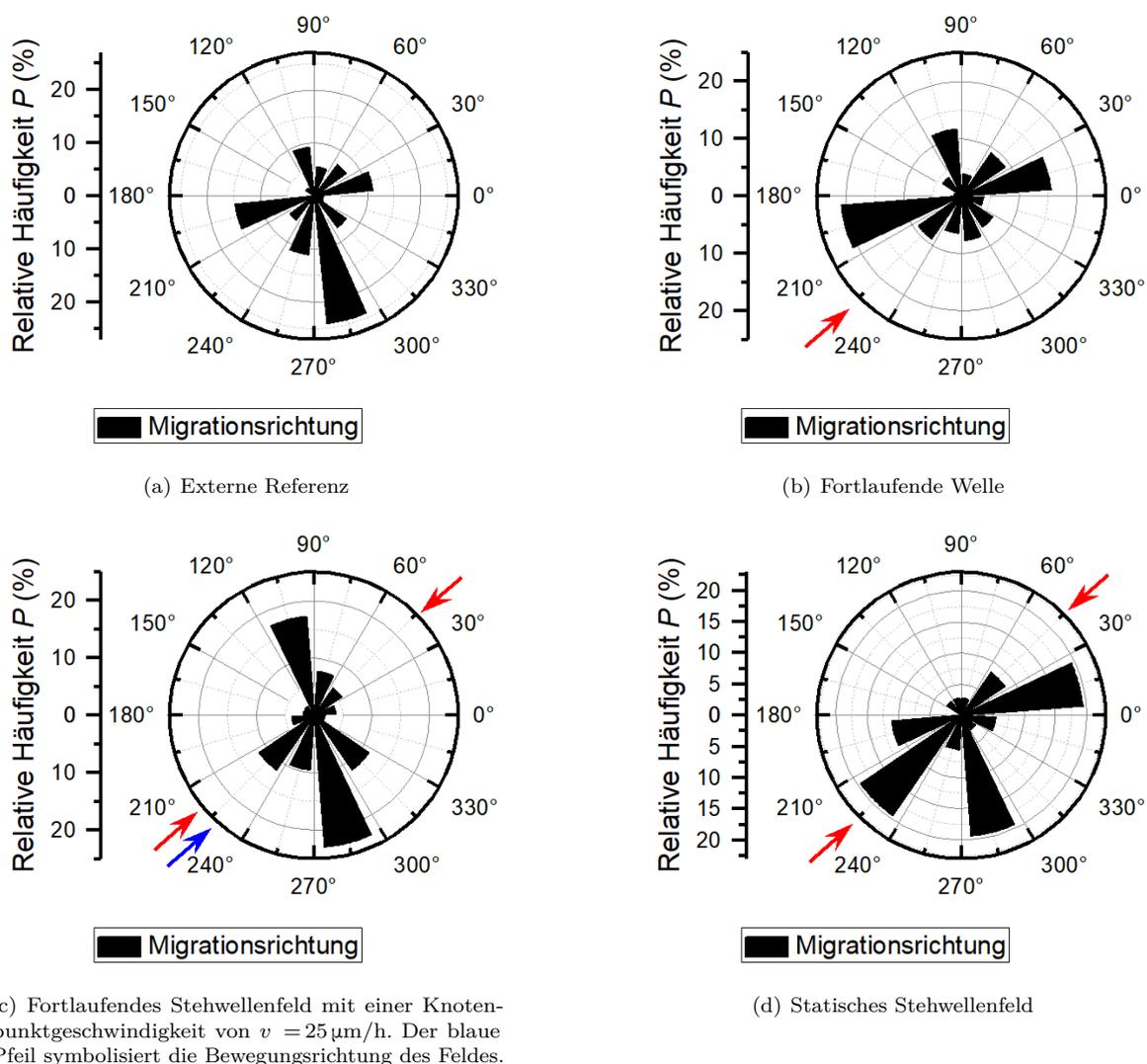
**Tabelle B.1:** Kenndaten der in den Experimenten verwendeten Filtersets für die Fluoreszenzmikroskopie.

# C. Messergebnisse

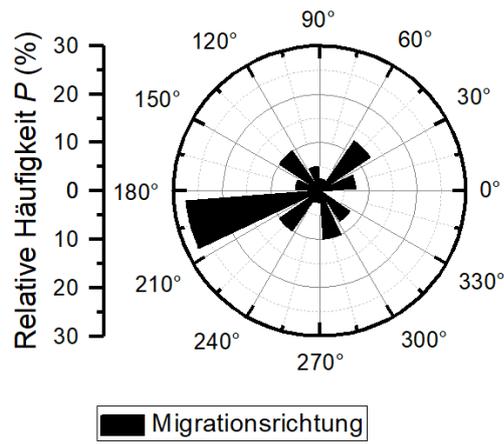
Im Folgenden werden ausgewählte Messergebnisse der in *Kap. 4.4.5.* erwähnten Manipulationsexperimente von B35-Zellen durch akustische Oberflächenwellen vorgestellt.

## C.1. Trajektorien

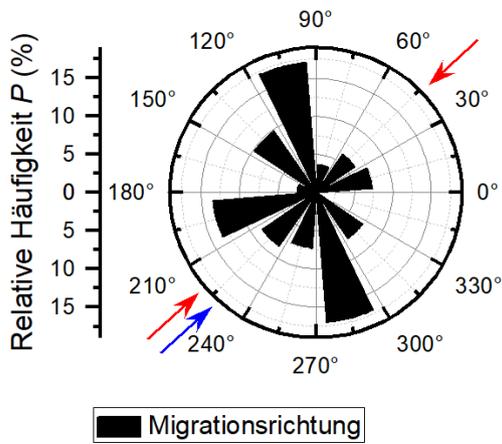
Beeinflussung der Migrationsrichtung durch verschiedene Potentiallandschaften, hervorgerufen durch akustische Oberflächenwellen. Die roten Pfeile markieren die Propagationsrichtung der SAW.



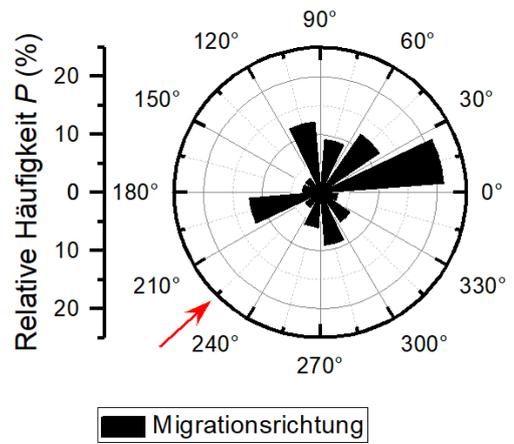
**Abbildung C.1:**  
Beeinflussung der Trajektorien mit einer Eingangsleistung von  $P_{IN} = 9 \text{ dBm}$ .  
(Erstellt in Zusammenarbeit mit Felix Palzer [188].)



(a) Externe Referenz



(b) Fortlaufendes Stehwellenfeld mit einer Knotenpunktgeschwindigkeit von  $v = 25 \mu\text{m/h}$ . Der blaue Pfeil symbolisiert die Bewegungsrichtung des Feldes.



(c) Statisches Stehwellenfeld

**Abbildung C.2:**

Beeinflussung der Trajektorien mit einer Eingangsleistung von  $P_{IN} = 12 \text{ dBm}$ .  
(Erstellt in Zusammenarbeit mit Felix Palzer [188].)

## D. Protokolle

In diesem Abschnitt sind die im Labor durchgeführten Prozesse und Protokolle aufgelistet. Kommerziell erwerbbar Produkte, bei denen ein Herstellerprotokoll vorliegt, werden nicht gesondert erwähnt. Alle Prozessschritte mit Kontakt zu Zellkulturen finden zur Sicherstellung der aseptischen Arbeitsweise unter einer Sicherheitswerkbank im Zellkulturlabor statt. Hierbei werden alle nicht-sterilen Materialien und Oberflächen vor der Benutzung mit einer 70/30-Ethanol/Wasser-Lösung und UV-Licht desinfiziert. Eine ausführliche Darstellung der einzelnen Protokolle kann aus [60] entnommen werden.

### D.1. Reagenzien und Materialien

Die Zulieferer der für die Prozessschritte benötigten Reagenzien werden wie folgt abgekürzt:

SA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TF	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
AT	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, DE
BS	Bio & Sell GmbH, Nürnberg, DE
VW	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
CO	Corning GmbH HQ, Wiesbaden, DE

#### Notwendige Reagenzien für die Zellkultur:

Reagenzien und Materialien	Katalog-Nr.	Zulieferer
<b>Zellkulturen</b>		
B35 Cell Line Rat	CRL-2754	AT
SaOs-2 Cell Line Human	89050205-1VL	SA
MDCK-II Cell Line Canine	00062107-1VL	SA
HeLa Cell Line Human	93021013-1VL	SA
T-REx <sup>TM</sup> -293 Cell Line Human	R71007	TF
<b>Nährmedien</b>		
MEM Earle's	FG0325	SA
DMEM / Ham's F-12 (1:1)	FG4815	SA
MEM Earle's	FG0325	SA
gibco DMEM (1X) + GlutaMAX <sup>TM</sup> -I	10566016	TF
ATCC DMEM	30-2002	AT
<b>Ablöselösungen</b>		
Accutase	A6964	SA
Trypsin 0.05 %	BS. L2143	BS
Trypsin 0.25 %	BS. L2163	BS
<b>Sonstiges</b>		
BioFreeze		SA
FBS (Fetal Bovine Serum)	F7524	SA
Pen-Strep-Lösung (10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin)	4186528.5	BS

## D.2. Zellpassagierung und Zellgewinnung

### Materialien

- Nunc™ EasYFlask™ 25 cm<sup>2</sup> (156367, TF)
- 15 ml- & 50 ml-Zentrifugenröhrchen (525-0400 bzw. 525-0610, VW)
- (D)PBS-Lösung (w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>) (BS.L 1825, BS)
- 200 µl- & 1000 µl-Pipettenspitzen (Z640581, SA)
- 5 ml- & 25 ml-Serologische Pipetten (356543 bzw. 356525, CO)

### Zellkultur-spezifische Reagenzien:

Zelllinie	Nährmedium	Ablösungslösung
B35	ATCC DMEM	Accutase
MDCK-II	MEM Earle's	Trypsin 0.25 %
SaOs-2	DMEM / Ham's F-12 (1:1)	Trypsin 0.05 %
HEK-293 TRex	gibco DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Trypsin 0.05 %
HeLa	MEM Eagle's (EMEM) (ATCC® 30-2003™)	Trypsin 0.05 %

Zu allen Nährmedien wurde 10 %-FBS (F7525, SA) und 1 %-Pen-Strep-Lösung (BS.A 2213, BS) hinzugefügt.

### Methode

1. Visuelle Begutachtung der Zellkultur am Mikroskop. Optische Sicherstellung des normalen Zellwachstums und Ausschluss einer Kontamination anhand des pH-Indikators (gelb = nährstoff- armes, übersäuertes Nährmedium oder bakterielle Kontamination / lila = Pilz- bzw. Hefe-Befall). Durchführung der Zellpassagierung bei 70- 80 % Konfluenz.
2. Überführen von 20 ml Nährmedium je Zellkulturflasche in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen.
3. Erwärmen der Ablösungslösung und des Nährmediums im Wärmebad auf  $T = 37^{\circ}\text{C}$ .
4. Vollständige Entnahme des alten Nährmediums mit einer Pipette (5 ml).
5. Zellrasen vorsichtig mit ca. 3 ml PBS überspülen, um restliches Nährmedium und abgestorbene Zellkörper zu entfernen. (Vorsichtig von einer Seite über die komplette Fläche strömen lassen und aus der unteren Ecke absaugen).
6. Zugabe von 1 ml Ablöselösung. Abhängig von der Zellkultur lösen sich die Zellen unterschiedlich schnell vom Substrat ab. B35 & HEK293 T-REx™: < 1 min; HeLa & SaOs-2:  $\approx 5$  min; MDCK-II:  $\approx 10$  min. Zellkultur ggf. in den Inkubator überführen, um Deadhäsionsprozess zu beschleunigen. Die maximale Inkubationszeit beträgt  $t = 15$  min.
7. Zwischenzeitlich neue Zellkulturflaschen vorbereiten und mit 5 ml frischem Nährmedium füllen.
8. Ablöschen der Ablöselösung durch Zugabe von 4 ml frischem Nährmedium.
9. Zellklumpen und adhärente Zellen durch mehrmaliges Überspülen (15- 20 mal) des Zellkulturfla- schenbodens auf- bzw. ablösen.
10. Überführen der Zelllösung in die neue Zellkulturflasche. Je nach Zellwachstum im Verhältnis 1:10 (500 µl) bis 1:20 (250 µl).
11. Zellkulturflaschen mehrmals vorsichtig schwenken und inkubieren. Nährmedium alle 48- 72 h erneuern.
12. Restliche Zellsuspension in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführen und ggf. zentrifugieren.

## D.3. Kryokonservierung

### Materialien

- 15 ml-Zentrifugenröhrchen (525-0400, VW)
- (D)PBS-Lösung (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ , w/o  $\text{Mg}^{2+}$ ) (BS.L 1825, BS)
- 1000  $\mu\text{l}$ -Pipettenspitzen (Z640581, SA)
- 5 ml-Serologische Pipetten (356543, CO)
- Kryo-Röhrchen 2.0 ml (89020)

### Methode

1. Durchführung der Zellpassagierung. Die Zellkonzentration sollte bei  $1 - 5 \cdot 10^6$  Zellen/ml liegen.
2. Zentrifugieren der Zellsuspension (100x G).
3. Überprüfung auf Sedimentation der Zellen und Entfernen des Überstandes.
4. Zugabe von 1.5 ml BioFreeze (kalt, direkt aus dem Kühlschrank) und homogenisieren.
5. Überführen der Zellsuspension in ein 2.0 ml-Kryo-Röhrchen.
6. Für zwei Stunden im Gefrierschrank lagern.
7. Überführen in Kryostat und lagern bei  $T = 77 \text{ K}$ .

## D.4. Zellkultur auftauen

### Materialien

- Nunc<sup>TM</sup> EasYFlask<sup>TM</sup> 75 cm<sup>2</sup> (156472, TF)
- 15 ml- & 50 ml-Zentrifugenröhrchen (525-0400 bzw. 525-0610, VW)
- (D)PBS-Lösung (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ , w/o  $\text{Mg}^{2+}$ ) (BS.L 1825, BS)
- 1000  $\mu\text{l}$ -Pipettenspitzen (Z640581, SA)
- 5 ml- & 25 ml-Serologische Pipetten (356543 bzw. 356525, CO)
- Zellkultur-spezifisches Nährmedium

### Methode

1. Nährmedium abfüllen und im Wärmebad temperieren.
2. Befüllen eines 15 ml-Zentrifugenröhrchens mit 5 ml Nährmedium.
3. Entnahme der tiefgefrorenen Zellkultur aus dem Kryostaten.
4. Auftauen der Probe in der Hand oder im Wasserbad bei  $T = 37^\circ\text{C}$ .
5. Sobald nur noch ein kleiner Eiskristall sichtbar ist, sterilisieren des Kryo-Röhrchens und homogenisieren der Zellsuspension mit einer Pipette.
6. Überführen der Zellsuspension in das mit Nährmedium befüllte 15 ml-Zentrifugenröhrchen.
7. Zentrifugieren für  $t = 15 \text{ min}$  bei 100x G.
8. Zwischenzeitlich befüllen der 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 15 ml Nährmedium.
9. Entnahme des Überstandes und resuspendieren in 1 - 2 ml frischem Nährmedium.
10. Überführen der Zellsuspension in Zellkulturflasche und inkubieren.

## D.5. Dissektion

Im Folgenden soll die Dissektion zur Gewinnung von Neuronen aus dem Hippocampus eines Rattenfötus schrittweise erklärt werden. Das hier vorgestellte Protokoll wurde an der Universität Santa Barbara, Kalifornien, USA durchgeführt und entspricht den dort geltenden Richtlinien.

### Materialien

- 6-8 Rattenföten, Alter 18 Tage (Sprague-Dawley-Rattenfötus E18)
- Trypsin 2.5 %
- Dissection Medium
- 10 %-Glial-MEM
- Pasteur-Pipetten
- 60 mm- und 100 mm-Petri-Schalen

### Methode

1. Das für die Dissektion benötigte Werkzeug in einer 70/30-Ethanol/Wasser-Lösung für 20 Minuten sterilisieren.
2. Trächtige Rattenmutter mit CO<sub>2</sub> narkotisieren. Abtrennen des Kopfes mit einer Guillotine. Waschen des Fells mit Ethanol und Entfernen der Rattenföten.
3. Zeitgleiches Verwenden von 2-3 Rattenföten. Durchtrennen des Nackens mit einer Schere. Öffnen der Schädeldecke durch einen Einschnitt am Ohr und über den Augen.
4. Herausnehmen des Gehirns mit einem Löffel und überführen in eine 100 mm-Petri-Schale mit Dissection-Medium.
5. Entfernen der Hirnhaut zwischen den Hirnlappen mit einem Spatel. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Hippocampus nicht beschädigt wird.
6. Restliche Hirnhaut mit einer Pinzette entfernen. Sicherstellen, dass kein Blut oder Reste der Hirnhaut zurückbleiben.
7. Herausschneiden des Hippocampus. Hierbei die Hirnlappen mit einer Pinzette fixieren und den Hippocampus mit einer Schere aus dem Kortex entfernen. Hierbei soll so wenig Gewebe vom Kortex wie möglich am Hippocampus zurück bleiben.
8. Hippocampus mit einer Pinzette in kaltes Dissection-Medium überführen.
9. Sobald alle Proben entnommen sind die Hippocampi mit einer Pasteur-Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführen.
10. Das Gesamtvolumen auf 4.5 ml erhöhen und 0.5 ml Trypsin 2.5 % hinzugeben. Inkubieren des Zentrifugenröhrchens in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad für  $t = 15$  min, ohne es hierbei zu schütteln.
11. Überstand entnehmen und die Hippocampi mit 5 ml Dissection-Medium für 5 Minuten waschen und zweimal wiederholen.
12. Homogenisieren der Hippocampi in 1.5 ml 10 % Glial-MEM durch mehrmaliges Ansaugen und Ausspülen in eine Pasteur-Pipette.
13. Wiederholen des vorherigen Vorgangs mit weiteren 1.5 ml 10 %-Glial-MEM.
14. Zellanzahl in einer Zählkammer bestimmen und auf das gewünschte Verhältnis verdünnen.

## D.6. SAW-Chip-Herstellung

Prozessschritte zur Herstellung eines SAW-Chips. Die IDT-Strukturen werden in der Software *Autodesk®AutoCAD®* gezeichnet und bei der Firma *JD Photo Data* (Hitchin, Herts, UK) als Chrommaske bestellt.

### Materialien

- Kristallsubstrate (LiNbO<sub>3</sub> oder LiTaO<sub>3</sub>) (The Roditi International Co. Ltd., London, GB)  
(L × B × T: 17.5 × 17.5 × 0.5 mm)
- Isopropanol und Aceton (jeweils MicroChemicals GmbH, Ulm, DE)
- Photolack: *AZ-Mir 701 Photoresist cP* (MicroChemicals GmbH, Ulm, DE)
- Entwickler: *AZ 726 MIF Developer* (Merck Performance Materials GmbH, Wiesbaden, DE)

### Geräte

- Flowbox (LOTUS Systems GmbH, Immendingen, DE)
- Heizplatte *CB160* (CB160, Stuart, Staffordshire, UK)
- ESTHER (*Electronbeam-RF-Sputtering and Thermal Evaporation*) *Auto 500 Thin Film Coating System* (BOC Edwards, Guildford, UK)
- Lackschleuderplatte *DELTA 10 BM* (SÜSS MicroTec Lithography GmbH, Garching, DE)
- Standard Mask Aligner *MJB 3* (SÜSS MicroTec Lithography GmbH, Garching, DE)
- Plasmaätzer „LabAsh“ *100E* (Technics Plasma GmbH, Kirchheim, DE)
- Ultraschallbad *Sonorex Super 10 P* (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE)

### Methode

#### Belichtung der IDT-Struktur

1. X-Richtung durch Diamantstift markieren.
2. Chips von Folie abziehen und kurz mit Aceton abspülen.
3. In 40 ml-Schale geben und mit Aceton für 5 min in einem Ultraschall-(US)-Bad (100%) reinigen.
4. Chips mit Isopropanol (IPA) abspülen.
5. Chips in 40 ml-Schale mit IPA geben für 5 min in einem US-Bad (100%) reinigen.
6. Chips mit Pinzette seitlich greifen und mit IPA abspülen (Ab sofort bei ALLEN Schritten NUR seitlich greifen).
7. Auf einem Reinraumtuch festhalten und mit Stickstoff (N<sub>2</sub>) trocknen.
8. Photolack vorbereiten: 5 ml-Becher Photolack (AZ-Mir 701 Photoresist cP) umfüllen (kippen).
9. Chip auf Drehteller ausrichten und Photolack auftropfen, bis die komplette Fläche benetzt ist (ca. 17 Tropfen).
10. Lackschleuder aktivieren (5 s: 500 rpm, Rampe 5; 30 s: 5000 rpm, Rampe 9).
11. Chips herunternehmen und auf einem mit Aceton getränkten Tuch reinigen.
12. Direkt auf Heizplatte legen ohne abzudecken für Pre-Exposure-Bake ( $t = 1:30$  min bei  $T = 90$  °C).
13. Kurz in einer Petrischale abkühlen lassen.

14. Belichten im Maskaligner (LiNbO<sub>3</sub> und LiTaO<sub>3</sub>;  $t = 15$  s).
15. Chips auf die Heizplatte legen. ( $t = 1:00$  min bei  $T = 110$  °C).
16. Abkühlen lassen auf einem Tuch.
17. Entwickeln (AZ 726 MIF Developer:  $t = 1:30$  min, H<sub>2</sub>O:  $t = 20$  s) und mit N<sub>2</sub> trocknen.

#### **Metallisierung mittels physikalischer Gasphasenabscheidung**

1. Reinigen im LabAsh:  $P = 200$  W,  $t = 20$  s bei  $p = 500$  mTorr.
2. Halteplatten mit IPA reinigen und mit N<sub>2</sub> trocknen.
3. Chips montieren, Platten in die ESTHER einbauen und abpumpen.
4. Nach dem Erreichen des Prozessdrucks ( $< 10^{-5}$  mbar) mit dem Aufdampfprozess beginnen: 5 nm Titan @ 1 Å/s, 50 nm Gold @ 1 Å/s (Durch das Verdampfen von Titan kann der Prozessdruck noch weiter reduziert werden.)
5. Lift-Off: 40 ml-Schale füllen mit 15 ml DMSO (D351) und über Nacht stehen lassen.
6. Chips aus Schale waagrecht herausnehmen, sodass weiterhin ein Flüssigkeitsfilm die Chips bedeckt und in eine 40 ml-Schale mit frischem DMSO überführen.
7. Entfernen des überschüssigen Metalls im US bei 40 % für  $t = 2$  min.
8. Chips waagrecht im DMSO und anschließend in dest. H<sub>2</sub>O schwenken. In 40 ml-Schale mit frischem H<sub>2</sub>O überführen.
9. Erneut im US-Bad bei 40 % für  $t = 2$  min reinigen.
10. Chips mit IPA absülen, verbleibende Metallreste mit Q-Tip entfernen und trocknen.
11. Optische Kontrolle und beseitigen eventueller Kurzschlüsse durch Anlegen einer 12 V-DC-Spannung.

#### **Thermisches Aufdampfen einer Schutzschicht**

1. SAW-Chips mit IPA im US-Bad bei 40 % für  $t = 2$  min reinigen und mit N<sub>2</sub> trocknen.
2. Reinigen im LabAsh:  $P = 800$  W für  $t = 5$  min.
3. Chips auf Probenhalter montieren. Kontaktstellen mit Niederhalter oder Alufolie abdecken.
4. Vorrat im Schiffchen überprüfen.
5. Proben in ESTHER einbauen und abpumpen lassen.
6. Thermisches Verdampfen des SiO und Erstellen einer 150 nm-SiO-Schicht.  
Richtwerte: Rate: 1.2 Å/s; I = 50 - 60 A;  $t = 30$  min.
7. Proben ausbauen und abschließende Schichtdickenmessung und Funktionskontrolle.

## D.7. PDMS-Master-Herstellung

Beschreibung der Herstellung der für die Soft-Lithographie benötigten Gussformen. Die zur Belichtung benötigte Photomaske wird in der Software *Autodesk®AutoCAD®* gezeichnet und bei der Firma *Cadlog* (Eching, Deutschland) bestellt. Die maximale Auflösung einer Folie beträgt 7  $\mu\text{m}$ .

### Materialien

- 3"-Silizium-(Si)-Wafer (MicroChemicals GmbH, Ulm, DE)
- Isopropanol und Aceton (jeweils MicroChemicals GmbH, Ulm, DE)
- Photolack *SU-8* (Microchem, Newton, MA, USA)
- Entwickler *mr-Dev 600* (micro resist technology GmbH, Berlin, DE)

### Geräte

- Flowbox (LOTUS Systems GmbH, Immendingen, DE)
- Heizplatte *CB160* (Stuart, Staffordshire, UK)
- Heizofen *UM 100* (Memmert GmbH + Co.KG, Büchenbach, DE)
- Lackschleuderplatte *DELTA 10 BM* (SÜSS MicroTec Lithography GmbH, Garching, DE)
- Standard-Mask-Aligner *MJB 3* (SÜSS MicroTec Lithography GmbH, Garching, DE)
- Ultraschallbad *Sonorex Super 10 P* (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE)

### Methode

Abhängig von der gewünschten Schichtdicke stehen mehrere verschiedene SU-8-Produkte zur Verfügung. Die notwendigen Prozessparameter können aus dem Herstellerprotokoll entnommen werden. Die nun aufgeführten Parameter werden für die Herstellung einer 40  $\mu\text{m}$ -Schicht durch SU-8-50 benötigt.

1. Reinigung der Si-Wafer in Aceton und IPA für  $t = 5$  min im Ultraschallbad (100 %) und mit Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) trocknen.
2. Si-Wafer auf der Lackschleuderplatte positionieren und Ausrichtung durch kurze Aktivierung des Drehtellers kontrollieren.
3. Aufgießen des Photolacks auf den Si-Wafer (Faustregel: Je Zoll Durchmesser, 1 ml Photolack).
4. Lackschleuder aktivieren ( $t = 10$  s: 500 rpm, Rampe 9;  $t = 30$  s: 3000 rpm, Rampe 9).
5. Während des Schleuderprozesses der zweiten Geschwindigkeitsstufe kann durch Aufpipettieren des Entwicklers am Rand des Si-Wafers die Bildung von Unebenheiten in der Lackschicht verhindert werden.
6. Zweistufiger Aushärtprozess durch *Soft-Bake*:  $t = 5$  min bei  $T = 65^\circ\text{C}$  auf der Heizplatte erwärmen und anschließend für  $t = 15$  min in den Ofen bei  $T = 95^\circ\text{C}$  geben und anschließend abkühlen lassen.
7. Photomaske auf Si-Wafer im Mask-Aligner ausrichten und Belichten (5x  $t = 23$  s mit jeweils  $t = 45$  s Wartezeit).
8. *Post-Exposure-Bake*:  $t = 5$  min bei  $T = 65^\circ\text{C}$  auf der Heizplatte und  $t = 10$  min bei  $T = 95^\circ\text{C}$  im Ofen und anschließend erneut abkühlen lassen.
9. Entwickeln der Strukturen für  $t = 5$  min in einem Entwickler: 1 min in eine mit Entwickler gefüllte Petrischale geben und unter stetigem leichtem Schütteln entwickeln. Überführen des Si-Wafers in eine neue Petrischale mit frischem Entwickler für weitere 4 min.
10. Entfernen des Entwicklers durch IPA und trocknen mittels Stickstoff.
11. Kontrolle der Strukturen unter dem Mikroskop.
12. *Hard-Bake* auf einer Heizplatte bei  $T = 150^\circ\text{C}$  für  $t = 45$  min, abgedeckt mit Alufolie.

## D.8. Soft-Lithographie

Herstellung der PDMS-Kammern und Mikrokanäle mittels Soft-Lithographie. Die für die Soft-Lithographie notwendigen Gussformen werden entweder durch den zuvor beschriebenen Prozess der *PDMS-Master-Herstellung* (siehe *Kap. D.7.*) produziert oder durch Anfertigung einer Metallgussform auf einer CNC-Fräse hergestellt.

### Materialien

- Belichteter Si-Wafer (Mirkokanäle)
- bzw. Metallgussform (PDMS-Kammer)
- Alufolie
- PDMS *Sylgard<sup>TM</sup> 184 Silicone* (DOW Europe GmbH, Wiesbaden, DE)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (525-0610, VW)
- Biopsiestanze ( $\varnothing$  1 ml,  $\varnothing$  1.5 ml) (PFM medical AG, Köln, DE)
- Scotch-Tape

### Geräte

- Waage
- Exsikkator
- Heizofen

### Methode

1. Reinigung der Gussform mit IPA und mit Stickstoff trocknen.
2. Si-Wafer in Alufolie einbetten bzw. Metallgussform vorbereiten.
3. Ansetzen der PDMS-Mischung (10/1) (w/w) im 50 ml-Zentrifugenröhrchen  
Gesamtvolumen: 30 ml für Mikrokanal, 5 ml für PDMS-Kammer.
4. Homogenisieren der Komponenten durch Vermengen (Stürzen der Röhrchen).
5. Entgasen des PDMS im Exsikkator für ca. eine Stunde.  
Hierbei kann nach erstmaligem Aufschäumen die Blasenbildung durch erneutes Belüften des Exsikkator verringert werden.
6. Aufgießen der PDMS-Mischung auf den Si-Wafer bzw. in die Metallgussform.
7. Erneutes Entgasen im Exsikkator für ca. eine Stunde.
8. Aushärten im Ofen bei  $T = 70^\circ\text{C}$  für vier Stunden.
9. Nach dem Abkühlen, Fertigstellung der PDMS-Kammern durch herauspressen aus der Gussform und Entfernen des überstehenden Materials.
10. Nach dem Abkühlen entfernen der Alufolie und vorsichtiges abziehen der PDMS-Schicht von dem Si-Wafer.
11. Zuschneiden des Mikrokanals mittels Skalpell.
12. Kontaktieren der Kanalstruktur durch eine Biopsiestanze.
13. Entfernen von PDMS-Resten durch Spülung mittels destillierten Wassers.
14. Trocknen durch Stickstoff.
15. Abschließendes Reinigen der Mikrokanalstruktur durch ein Scotch-Tape.

## D.9. PA-Gel-Anfertigung

Protokoll zur Bildung einer Poly-Acrylamid (PA) - Schicht zur Generierung physiologischer Randbedingungen durch Anpassung der Substratsteifigkeit.

### Materialien

– Isopropanol (IPA)	(20922.364, VWR)
– Analytischer Ethanol (EtOH)	(1.00983, SA)
– 40 %-Acrylamid-Stammlösung	
– 2 %-Bis-Acrylamid-Lösung	
– TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	(808742, SA)
– Trichlorooctadecylsilan	(104817, SA)
– Chloroform	(C2432, SA)
– APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane)	(741442, SA)
– 10 %-APS (Ammonium persulfat)	(215589, SA)
– 50 mM-HEPES-Puffer, pH = 8	(BS. L 1613, BS)
– 0.4 mM/l Sulfo-SANPAH in 50 mM HEPES Puffer	(803332, SA)
– 0.5 % Glutaraldehyde in PBS	(G7526, SA)
– (D)PBS-Lösung (w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup> )	(BS.L 1825, BS)
– 0.2 mg/ml-Kollagen I (rat tail) oder	(122-20, SA)
– 4 µg/ml-Poly-L-Lysin (PLL) in HEPES-Puffer	(P1274, SA)
– Reinstwasser dH <sub>2</sub> O	(EASYpure <sup>®</sup> II, TF)
– SAW-Chips oder Glasplättchen	
– Deckgläser 24 × 24 mm	(Menzel Gläser, VW)
– 35 mm-Petri-Schalen oder 6-well-Kulturschalen	(627102, VW)
– CleanTips <sup>®</sup> TX <sup>®</sup> 714A	(19-003-483, TF)
– Safe-Lock-Tubes 1.5 ml	(EP0030120086-1PAK, SA)

### Geräte

– Plasmaätzer <i>300 Autoload-PC Plasma Processor</i>	(PVA TePla Feldkirchen, DE)
– Ultraschallbad <i>Sonorex Super RK103H</i>	(BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE)
– Laborabzug	(Prutscher Laboratory Systems GmbH, Neudörfl, AU)

### Methode

#### Beschichtung der Proben mit Glutaraldehyd

1. SAW-Chips bzw. Glasplättchen in IPA einlegen und im Ultraschallbad-(US)-Bad (50 %) für 5 min reinigen.
2. Probenoberfläche im Plasmaätzer für  $t = 5$  min bei  $P = 800$  W behandeln.
3. Proben in EtOH ( $\approx 250$  ml) einlegen und für  $t = 5$  min im US-Bad (50 %) reinigen.
4. Überführen in APTES-EtOH-Lösung (1:50) ( $\approx 250$  ml) und für weitere 15 min im US-Bad (50 %).
5. Zweimaliges gründliches Überspülen mit Ethanol und dH<sub>2</sub>O.

6. Proben in 0.5 %-Glutaraldehyde-Lösung<sup>1</sup> geben und für  $t = 30$  min inkubieren.
7. Erneutes Reinigen der Proben im US-Bad (50 %) in dH<sub>2</sub>O für  $t = 15$  min.
8. Visuelle Kontrolle der Proben auf Schlieren.

### Herstellung der hydrophober Deckgläser

1. Deckgläser in IPA geben und im US-Bad (100 %) reinigen und mit Stickstoff (N<sub>2</sub>) trocknen.
2. 5 %-Silanisierungslösung in Chloroform herstellen.
3. 250 µl der Lösung jeweils auf die Deckgläser pipettieren und sorgfältig verteilen, bis die komplette Fläche bedeckt ist.
4. Unter der Dunstabzugshaube eintrocknen lassen.
5. Mit IPA abspülen und im US-Bad (100 %) für  $t = 5 - 15$  min reinigen. Hierbei hydrophobisierte Seite merken.
6. Mit CleanTips reinigen und eingetrocknete Reste entfernen.
7. Trocknen und Hydrophobizität testen.

### Herstellung der PA-Gele

1. 500 µl der vorgefertigten PA-Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß überführen.
2. 5 µl APS<sup>2</sup> und 0.5 µl TEMED hinzugeben und vermengen.
3. Abhängig von der gewünschten Schichtdicke des PA-Gels ca.  $\approx 20 - 40$  µl, PA-Lösung auf die mit Glutaraldehyd behandelten Proben aufbringen.
4. Verteilen der PA-Lösung auf der Oberfläche durch Auflegen des hydrophoben Deckglases.
5. Proben auf ein befeuchtetes Tuch legen und für  $t = 1 - 2$  h warten.
6. Deckglas vorsichtig durch Biegen abziehen.
7. Proben mit polymerisiertem PA-Gel zweimal in mit 3 ml PBS gefüllte Petri-Schalen geben und jeweils für  $t = 5$  min in Gefrierschrank stellen.
8. PBS entfernen und Proben dreimal mit HEPES-Puffer<sup>3</sup> spülen.
9. Proben in 3 ml HEPES-Puffer einlegen und erneut für 5 min in den Gefrierschrank stellen.
10. Proben entnehmen und vorsichtig an einer Ecke mit einem Tuch berühren, um die Flüssigkeit zu entfernen.
11. Auf Geloberfläche 200 µl Sulfo-SANPAH-Lösung pipettieren und für  $t = 10 - 15$  min im UV-Licht (365 nm) mit dem Gel reagieren lassen.
12. Sulfo-SANPAH-Lösung entfernen und mit HEPES-Puffer dreimal spülen und Proben kühlen ( $T = 0$  °C).
13. PLL oder Kollagen I aufbringen und über Nacht im Kühlschrank inkubieren.
14. Lösung entfernen und mit PBS überspülen.
15. Einlegen der Proben in PBS oder Nährmedium, um ein Austrocknen der Gele zu verhindern.
16. Aussäen der Zellen auf der Geloberfläche.

---

<sup>1</sup>1 ml 50 %-Glutaraldehyde in 49 ml PBS

<sup>2</sup>100 mg APS-Pulver auf 1 ml PBS

<sup>3</sup>pH-Wert wird mit 1 M NaOH eingestellt

## E. Abkürzungen

2D	=	Zweidimensional	3D	=	Dreidimensional
APS	=	Ammoniumpersulfat	BAW	=	Bulk Acoustic Wave, (engl.): akustische Volumenwelle
BSA	=	Bovine Serum Albumin	bspw.	=	beispielsweise
bzw.	=	beziehungsweise	CI	=	Culture Insert
DcAMP	=	Dibutyryl Adenosin-3,5-Monophosphat	DCNN	=	Deep convolutional neural network
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid, (engl.): Desoxyribonukleinsäure	DOX	=	Doxycyclin
equ.	=	contributed equally, (engl.): gleichermaßen beigetragen	exkl.	=	exklusive
EZM	=	Extrazelluläre Matrix	EZPK	=	Eine Zelle pro Knotenpunkt
FBS	=	Fetal Bovine Serum	FFT	=	Fast Fourier Transform, (engl.) Schnelle Fouriertransformation
FITC	=	Fluorescein-Isothiocyanate	fps	=	Frames per second, (engl.): Bilder pro Sekunde
GmbH	=	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	h	=	Stunden
HEK	=	Human Embryonic Kidney	HeLa	=	Henrietta Lacks
HF	=	High frequency, (engl.): Hochfrequenz	Hz	=	Hertz
IDT	=	Interdigital Transducer, (engl.): Interdigitaler Schallwandler	IL	=	Insertion Loss, (engl.): Einfügedämpfung
IPA	=	Isopropanol	MDCK-II	=	Madin-Darby Canine Kidney-II
MEM	=	Minimum Essential Medium	min	=	Minuten
NGF	=	Nervenwachstumsfaktoren	NWA	=	Vector Network Analyzer, (engl.) Netzwerkanalysator
PA	=	Polyacrylamid	PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PDMS	=	Polydimethylsiloxane	PI	=	Probidiumiodid Ready Probes™
PLL	=	Poly-L-Lysin	PS	=	Polystyrol
PTFE	=	Polytetrafluoroethylen	PWM	=	Pulsweitenmodulation
RhoB	=	Rhodamine B	RNA	=	Ribonucleic acid, (engl.): Ribonukleinsäure
ROS	=	Reaktive Sauerstoffspezies	rpm	=	rounds per minute, (engl.): Umdrehungen pro Minute
RW	=	Rayleigh-Welle	s	=	Sekunden
SA	=	Sigma Aldrich	SaOs	=	Sarcoma Osteogenic
SAW	=	Surface Acoustic Waves, (engl.): akustische Oberflächenwellen	SH	=	Scherwelle

SIDT	=	Standard Interdigital Transducer, (engl.): Standard-Interdigitaler- Schallwandler	sPIV	=	scanning Particle Image Velocimetry
SPPL3	=	Signal peptide peptidase like	SSAW	=	Standing Surface Acoustic Wave, (engl.): stehende akustische Oberflächenwelle
TF	=	Thermo Fisher	TGZ	=	Terg-a-zyme <sup>®</sup>
u. a.	=	unter anderem	US	=	Ultraschall
VL	=	Verzögerungsleitung	ZAM	=	Zelladhäsions-Moleküle

# Literaturverzeichnis

- [1] M. Brandt, *Implantate - Was am häufigsten implantiert wird*, 2018, <https://de.statista.com/infografik/16204/operationen-zum-einsetzen-von-implantaten-in-deutschland/>.
- [2] DGIFE, *Was die Deutsche Gesellschaft für Implantatforschung und Entwicklung macht*, <https://dgife.de/{#}ueber-dgife>.
- [3] S. Buchegger, C. Vogel, R. Herrmann, B. Stritzker, A. Wixforth and C. Westerhausen, *Journal of Materials Research*, 2016, **31**, 2571–2577.
- [4] A. Stejskalová, N. Oliva, F. J. England and B. D. Almquist, *Advanced Materials*, 2019, **31**, 1806380.
- [5] WHO, *Spinal cord injury*, 2013, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>.
- [6] T. M. Patz, A. Doraiswamy, R. J. Narayan, W. He, Y. Zhong, R. Bellamkonda, R. Modi and D. B. Chrisey, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006, **78B**, 124–130.
- [7] W. Z. Ray and S. E. Mackinnon, *Experimental Neurology*, 2010, **223**, 77–85.
- [8] M. Sarker, S. Naghieh, A. D. McInnes, D. J. Schreyer and X. Chen, *Biotechnology Journal*, 2018, **13**, 1–16.
- [9] J. Koch, M. Schuettler, C. Pasluosta and T. Stieglitz, *Journal of Neural Engineering*, 2019, **16**, 061002.
- [10] R. Avrahami, J. I. Rosenblum, M. I. Gazes, S. Rosenblum and L. Litman, *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 2015, **27 7**, 199–208.
- [11] T. K. Kristiansen, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey and L. R. Roe, *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 1997, **79**, 961–73.
- [12] E. Sackmann and R. F. Bruinsma, *ChemPhysChem*, 2002, **3**, 262.
- [13] A. A. Khalili and M. R. Ahmad, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**, 18149–18184.
- [14] S. Hong, E. Ergezen, R. Lec and K. A. Barbee, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5813–5820.
- [15] S. Miyamoto, B.-Z. Kathz, R. M. Lafrenie and K. M. Yamada, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, **857**, 119–129.
- [16] R. G. Lebaron and K. A. Athanasiou, *Biomaterials*, 2000, **21**, 2575–2587.
- [17] S. Nagahara and T. Matsuda, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, **32**, 677–686.
- [18] E. Sackmann and R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012, p. 958.

- [19] B. Hu, D. Finsinger, K. Peter, Z. Guttenberg, M. Barmann, H. Kessler, A. Escherich, L. Moroder, J. Bohm, W. Baumeister, S. F. Sui and E. Sackmann, *Biochemistry*, 2000, **39**, 12284–12294.
- [20] R. Simson, *Untersuchung der elastischen und plastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mittels mikrooptischer und mikromechanischer Methoden*, Herbert Utz Verlag, 1998, p. 124.
- [21] Z. Guttenberg, *Ph.D. thesis*, TUM, 2001.
- [22] S. F. Gilbert, *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2003, p. 838.
- [23] P. Friedl and K. Wolf, *Nature reviews. Cancer*, 2003, **3**, 362–74.
- [24] D. Critchley and A. Gingras, *Journal of Cell Science*, 2008, **121**, 1345–1347.
- [25] A. J. Ridley, M. Schwartz, K. Burridge, R. Firtel, M. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz, *Science (New York, N.Y.)*, 2003, **302**, 1704–9.
- [26] N. T. Bennett and G. S. Schultz, *American journal of surgery*, 1993, **165**, 728–37.
- [27] E. K. Paluch, C. M. Nelson, N. Biais, B. Fabry, J. Moeller, B. L. Pruitt, C. Wollnik, G. Kudryasheva, F. Rehfeldt and W. Federle, *BMC Biology*, 2015, **13**, 47.
- [28] B. Cortese, I. E. Palamà, S. D'Amone and G. Gigli, *Integrative Biology (United Kingdom)*, 2014, **6**, 817–830.
- [29] S. Li, N. F. Huang and S. Hsu, *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, **96**, 1110–1126.
- [30] V. Kumar, A. K. Abbas and J. C. Aster, *Robbins Basic Pathology*, Elsevier Saunders, 9th edn., 2012, p. 928.
- [31] S. G. Rhee, *Experimental & Molecular Medicine*, 1999, **31**, 53–59.
- [32] P. A. Hall and D. A. Levison, *Journal of Clinical Pathology*, 1990, **43**, 184–192.
- [33] C. Zhang and X. Zeng, *Cell Proliferation: Processes, Regulation and Disorders*, Nova Science Publishers Inc., 2013, p. 159.
- [34] D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646–674.
- [35] T. Vanden Berghe, N. Vanlangenakker, E. Parthoens, W. Deckers, M. Devos, N. Festjens, C. J. Guerin, U. T. Brunk, W. Declercq and P. Vandenabeele, *Cell death and differentiation*, 2010, **17**, 922–30.
- [36] A. Wyllie, V. Donahue, B. Fischer, D. Hill, J. Keesey and S. Manzow, *Apoptosis and Cell Proliferation*, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 2nd edn., 1998, p. 138.
- [37] J. Fogh and G. Trempe, in *Human tumor cells in vitro*, Springer, 1975, pp. 115–159.
- [38] S. B. Doty, *Calcified Tissue International*, 1981, **33**, 509–512.
- [39] J. D. Dukes, P. Whitley and A. D. Chalmers, *BMC Cell Biology*, 2011, **12**, 43.
- [40] A. Adey, J. N. Burton, J. O. Kitzman, J. B. Hiatt, A. P. Lewis, B. K. Martin, R. Qiu, C. Lee and J. Shendure, *Nature*, 2013, **500**, 207–211.
- [41] W. C. Russell, F. L. Graham, J. Smiley and R. Nairn, *Journal of General Virology*, 1977, **36**, 59–72.

- 
- [42] J. Dumont, D. Euwart, B. Mei, S. Estes and R. Kshirsagar, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, **36**, 1110–1122.
- [43] Life Technologies Corporation.
- [44] A. Benninghoff, in *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Urban u. Fischer, München, 1993, p. 622.
- [45] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick and E. Al., *Neuroscience*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 3rd edn., 2004, p. 832.
- [46] D. Schubert, S. Heinemann, W. Carlisle, H. Tarikas, B. Kimes, J. Patrick, J. H. Steinbach, W. Culp and B. L. Brandt, *Nature*, 1974, **249**, 224–7.
- [47] C. a. Otey, M. Boukhelifa and P. Maness, *Methods in cell biology*, 2003, **71**, 287–304.
- [48] L. Rayleigh, *Proceedings of the London Mathematical Society*, 1885, **s1-17**, 4–11.
- [49] R. M. White and F. W. Voltmer, *Applied Physics Letters*, 1965, **7**, 314–316.
- [50] T. Frommelt, *Ph.D. thesis*, Universität Augsburg, 2007.
- [51] J. Neumann, *Ph.D. thesis*, Universität Augsburg, 2009.
- [52] C. Strobl, *Ph.D. thesis*, LMU München, 2005.
- [53] S. Rupp, *Ph.D. thesis*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004.
- [54] D. Ballantine, A. Ricco, H. Wohltjen, E. Zellers, S. Martin, G. Frye and R. White, *Acoustic Wave Sensors*, Academic Press, San Diego, 1997, p. 436.
- [55] L. Landau, E. Lifschitz and H. Schöpf, *Elastizitätstheorie*, Akademie-Verlag, 1975.
- [56] G. Kovacs, M. Anhorn, H. Engan, G. Visintini and C. Ruppel, *IEEE Symposium on Ultrasonics*, 1990, 435–438.
- [57] F. J. R. Schüle, *Ph.D. thesis*, Augsburg, 2014.
- [58] K. Y. Hashimoto, *Surface Acoustic Wave Devices in Telecommunication: Modelling and Simulation*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2000, p. 330.
- [59] A. Slobodnik, R. Delmonico and E. Conway, *Microwave acoustics handbook*, L.G. Hanscom Field, Bedford, Mass., 2nd edn., 1973, vol. 73-0597.
- [60] M. Brugger, *Master-Thesis*, Universität Augsburg, 2016.
- [61] G. Farnell, *John Wiley & Sons*, 1977, **83**, 84.
- [62] M. Rotter, *Ph.D. thesis*, Augsburg, 1999.
- [63] T. Nomura, M. Takebayashi, S. Furukawa and M. Obana, 1995 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings. An International Symposium, 1995, pp. 547–550.
- [64] D. Morgan, *Surface Acoustic Wave Filters*, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn., 2007, p. 448.
- [65] G. S. Kino, *Acoustic waves: devices, imaging and analog signal processing*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1987, p. 688.
- [66] F. Strauß, *Grundkurs Hochfrequenztechnik*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 2012.

- [67] W. R. Smith, H. M. Gerard, T. M. Reeder, H. J. Shaw and J. H. Collins, *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 1969, **17**, 856–864.
- [68] W. Demtröder, *Experimentalphysik*, Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 514.
- [69] M. S. Brugger, S. Grundeen, A. Doyle, L. Theogarajan, A. Wixforth and C. Westerhausen, *Physical Review E*, 2018, **98**, 012411.
- [70] G. Destgeer and H. J. Sung, *Lab on a Chip*, 2015, **15**, 2722–2738.
- [71] X. Ding, P. Li, S.-C. S. Lin, Z. S. Stratton, N. Nama, F. Guo, D. Slotcavage, X. Mao, J. Shi, F. Costanzo and T. J. Huang, *Lab on a Chip*, 2013, **13**, 3626.
- [72] T. Dung Luong and N. Trung Nguyen, *Micro and Nanosystemse*, 2010, **2**, 217–225.
- [73] A. Wixforth, *2009 IEEE International Frequency Control Symposium Joint with the 22nd European Frequency and Time Forum*, 2009, 778–783.
- [74] H. Bruus, J. Dual, J. Hawkes, M. Hill, T. Laurell, J. Nilsson, S. Radel, S. Sadhal and M. Wiklund, *Lab on a Chip*, 2011, **11**, 3579.
- [75] L. D. Landau and E. Lifschitz, *Lehrbuch der theoretischen Physik VI, Hydrodynamik*, Verlag Europa-Lehrmittel, Dresden, 5th edn., 1991, p. 683.
- [76] K. DRANSFELD and E. SALZMANN, in *Physical Acoustics, Principles and Methods*, Academic Press, 1970, vol. VII, pp. 219–272.
- [77] M. J. Vellekoop, *Ultrasonics*, 1998, **36**, 7–14.
- [78] T. M. Gronewold, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **603**, 119–128.
- [79] J. Du, G. L. Harding, J. A. Ogilvy, P. R. Dencher and M. Lake, *Sensors and Actuators, A: Physical*, 1996, **56**, 211–219.
- [80] S. Martin and A. Ricco, *Proceedings., IEEE Ultrasonics Symposium*, 1989, pp. 621–625.
- [81] J. Kondoh and S. Shiokawa, *Electronics and Communications in Japan (Part II: Electronics)*, 1993, **76**, 69–82.
- [82] J. Kondoh, *Electronics and Communications in Japan*, 2013, **96**, 41–49.
- [83] M. Wiklund, R. Green and M. Ohlin, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 2438–2451.
- [84] J. Wu, *Fluids*, 2018, **3**, 108.
- [85] C. Eckart, *Physical Review*, 1948, **73**, 68–76.
- [86] S. Shiokawa, Y. Matsui and T. Ueda, *Ultrasonics Symposium Proceedings*, 1989, pp. 643–646.
- [87] T. Frommelt, D. Gogel, M. Kostur, P. Talkner, P. Hänggi and A. Wixforth, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 2008, **55**, 2298–2305.
- [88] L. Y. Yeo and J. R. Friend, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 2014, **46**, 379–406.
- [89] M. Travagliati, R. J. Shilton, M. Pagliazzi, I. Tonazzini, F. Beltram and M. Cecchini, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 10633–10638.
- [90] L. V. King, *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1934, **147**, 212–240.

- [91] K. Yosioka and Y. Kawasima, *Acta Acustica united with Acustica*, 1955, **5**, 167–173.
- [92] L. P. Gor'kov, *Soviet Physics Doklady*, 1962, **6**, 773.
- [93] W. L. Nyborg, *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1967, **42**, 947.
- [94] M. Wiklund, *Ph.D. thesis*, KTH Stockholm, 2004.
- [95] M. Wiklund and H. M. Hertz, *Lab on a Chip*, 2006, **6**, 1279–1292.
- [96] T. Laurell, F. Petersson and A. Nilsson, *Chemical Society reviews*, 2007, **36**, 492–506.
- [97] D. J. Collins, B. Morahan, J. Garcia-Bustos, C. Doerig, M. Plebanski and A. Neild, *Nature communications*, 2015, **6**, 8686.
- [98] V. F. K. Bjerknæs, *Die Kraftfelder*, Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1909.
- [99] M. A. H. Weiser, R. E. Apfel and E. A. Neppiras, *Acta Acustica united with Acustica*, 1984, **56**, 114 – 119.
- [100] L. E. Kinsler, A. R. Frey, A. B. Coppens and J. V. Sanders, *Fundamentals of Acoustics*, John Wiley & Sons, Ltd, 4th edn., 1999, p. 560.
- [101] D. J. Collins, O. Manor, A. Winkler, H. Schmidt, J. R. Friend and L. Y. Yeo, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2012, **86**, 1–9.
- [102] O. Manor, A. R. Rezk, J. R. Friend and L. Y. Yeo, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2015, **91**, 1–11.
- [103] P. B. Muller, R. Barnkob, M. J. H. Jensen and H. Bruus, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 4617.
- [104] B. Paschke, A. Wixforth, D. Denysenko and D. Volkmer, *ACS Sensors*, 2017, **2**, 740–747.
- [105] M. S. Brugger, L. G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth and C. Westerhausen, *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **173**, 112807.
- [106] A. Hartmann, M. Stamp, R. Kmeth, S. Buchegger, B. Stritzker, B. Saldamli, R. Burgkart, M. F. Schneider and A. Wixforth, *Lab on a Chip*, 2014, **14**, 542–546.
- [107] A. M. Jötten, S. Angermann, M. E. M. Stamp, D. Breyer, F. G. Strobl, A. Wixforth and C. Westerhausen, *RSC Advances*, 2019, **9**, 543–551.
- [108] M. Saitakis and E. Gizeli, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, **69**, 357–371.
- [109] Y. Fang, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2010, **24**, 1011–1021.
- [110] T. S. Hug, *Assay and Drug Development Technologies*, 2003, **1**, 479–488.
- [111] C. Tiruppathi, A. B. Malik, P. J. Del Vecchio, C. R. Keese and I. Glaever, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, **89**, 7919–7923.
- [112] D. M. Gryte, M. D. Ward and W. S. Hu, *Biotechnology Progress*, 1993, **9**, 105–108.
- [113] M. S. Lord, C. Modin, M. Foss, M. Duch, A. Simmons, F. S. Pedersen, B. K. Milthorpe and F. Besenbacher, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4529–4537.
- [114] J. Redepenning, T. K. Schlesinger, E. J. Mechalke, D. A. Puleo and R. Bizios, *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 3378–3381.
- [115] J. Wegener, A. Janshoff and H. J. Galla, *European Biophysics Journal*, 1998, **28**, 26–37.

- [116] J. Wegener, J. Seebach, A. Janshoff and H. J. Galla, *Biophysical Journal*, 2000, **78**, 2821–2833.
- [117] C. Modin, A. L. Stranne, M. Foss, M. Duch, J. Justesen, J. Chevallier, L. K. Andersen, A. G. Hemmersam, F. S. Pedersen and F. Besenbacher, *Biomaterials*, 2006, **27**, 1346–1354.
- [118] H. Wohltjen, *Sensors and Actuators*, 1984, **5**, 307–325.
- [119] J. Kondoh, K. Saito, S. Shiokawa and H. Suzuki, *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers*, 1996, **35**, 3093–3096.
- [120] G. Kovacs, G. W. Lubking, M. J. Vellekoop and A. Venema, *Proceedings - IEEE Ultrasonics Symposium*, 1992, **1992-October**, 281–285.
- [121] E. Gizeli, N. J. Goddard, C. R. Lowe and A. C. Stevenson, *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 1992, **6**, 131–137.
- [122] H. Wu, H. Zu, J. H.-C. Wang and Q.-M. Wang, *European Biophysics Journal*, 2019, **48**, 249–260.
- [123] J. Furniss, L. Qin, S. Ng, I. Voiculescu and F. Li, *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 2018, **37**, 172–179.
- [124] M. Saitakis, A. Tsortos and E. Gizeli, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, **25**, 1688–1693.
- [125] X. Zhang, J. Fang, L. Zou, Y. Zou, L. Lang, F. Gao, N. Hu and P. Wang, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **77**, 573–579.
- [126] K. Länge, B. E. Rapp and M. Rapp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **391**, 1509–1519.
- [127] P. K. Maini, D. S. McElwain and D. I. Leavesley, *Tissue Engineering*, 2004, **10**, 475–482.
- [128] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson and B. I. Shraiman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**, 739–744.
- [129] P.-F. Verhulst, *Correspondance mathématique et physique de l'Observatoire de Bruxelles*, 1838, **10**, 113–21.
- [130] S. M. Zehnder, M. Suaris, M. M. Bellaire and T. E. Angelini, *Biophysical Journal*, 2015, **108**, 247–250.
- [131] K. Saha, F. Bender, A. Rasmusson and E. Gizeli, *Langmuir*, 2003, **19**, 1304–1311.
- [132] A. Janshoff, J. Wegener and M. Sieber, *European Biophysics Journal*, 1996, **25**, 93–103.
- [133] S. J. Martin, A. J. Ricco, D. S. Ginley and T. E. Zipperian, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 1987, **UFFC-34**, 143–148.
- [134] J. Kondoh and S. Shiokawa, *Electronics and Communications in Japan (Part II: Electronics)*, 1995, **78**, 50–59.
- [135] J. Kondoh and S. Shiokawa, *Electronics and Communications in Japan (Part II: Electronics)*, 1995, **78**, 101–112.
- [136] R. Pethig, *Dielectric Properties of Cells*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 213–244.
- [137] F.-Y. Chu, S. C. Haley and A. Zidovska, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, **114**, 10338–10343.

- [138] P. Delsing, A. N. Cleland, M. J. A. Schuetz, J. Knörzer, G. Giedke, J. I. Cirac, K. Srinivasan, M. Wu, K. C. Balram, C. Bäuerle, T. Meunier, C. J. B. Ford, P. V. Santos, E. Cerda-Méndez, H. Wang, H. J. Krenner, E. D. S. Nysten, M. Weiß, G. R. Nash, L. Thevenard, C. Gourdon, P. Rovillain, M. Marangolo, J.-Y. Duquesne, G. Fischerauer, W. Ruile, A. Reiner, B. Paschke, D. Denysenko, D. Volkmer, A. Wixforth, H. Bruus, M. Wiklund, J. Reboud, J. M. Cooper, Y. Fu, M. S. Brugger, F. Rehfeldt and C. Westerhausen, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2019, **52**, 353001.
- [139] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter and J. Weis, *A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor.*, 1991.
- [140] R. Weis, B. Müller and P. Fromherz, *Physical Review Letters*, 1996, **76**, 327–330.
- [141] P. Bonifazi and P. Fromherz, *Advanced Materials*, 2002, **14**, 1190–1193.
- [142] P. Fromherz, *ChemPhysChem*, 2002, **3**, 276–284.
- [143] C. Xie, L. Hanson, W. Xie, Z. Lin, B. Cui and Y. Cui, *Nano Letters*, 2010, **10**, 4020–4024.
- [144] M. Merz and P. Fromherz, *Advanced Functional Materials*, 2005, **15**, 739–744.
- [145] L. Fan, C. Feng, W. Zhao, L. Qian, Y. Wang and Y. Li, *Nano Letters*, 2012, **12**, 3668–3673.
- [146] V. Gautam, S. Naureen, N. Shahid, Q. Gao, Y. Wang, D. Nisbet, C. Jagadish and V. R. Daria, *Nano Letters*, 2017, acs.nanolett.6b05288.
- [147] S. Zhang, Y. Wang, P. Onck and J. den Toonder, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2020, **24**, 1–20.
- [148] K. Sritharan, C. J. Strobl, M. F. Schneider, A. Wixforth and Z. Guttenberg, *Applied Physics Letters*, 2006, **88**, 1–3.
- [149] T. Franke, A. Abate, D. Weitz and A. Wixforth, *Lab on a chip*, 2009, **9**, 2625–7.
- [150] T. Franke, S. Braunmuller, L. Schmid, A. Wixforth and D. A. Weitz, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 789–794.
- [151] A. Ozcelik, J. Rufo, F. Guo, Y. Gu, P. Li, J. Lata and T. J. Huang, *Nature Methods*, 2018, **15**, 1021–1028.
- [152] F. Guo, P. Li, J. B. French, Z. Mao, H. Zhao, S. Li, N. Nama, J. R. Fick, S. J. Benkovic and T. J. Huang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **112**, 43–8.
- [153] A. Wixforth, *Superlattices and Microstructures*, 2003, **33**, 389–396.
- [154] I. Leibacher, S. Schatzer and J. Dual, *Lab on a Chip*, 2014, **14**, 463–470.
- [155] P. Tabeling and S. Chen, *Introduction to Microfluidics*, OUP Oxford, 2010, p. 301.
- [156] O. Kolosov and K. Yamanaka, *Japanese Journal of Applied Physics*, 1993, **32**, L1095–L1098.
- [157] T. Hesjedal and G. Behme, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 2001, **48**, 641–642.
- [158] E. Gerlach, P. Grosse and E. Gerstenhauer, in *Physik-Übungen für Ingenieure*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 1995, pp. 69–70.

- [159] Bangs Laboratories, *Material Properties of Polystyrene and Poly(methyl methacrylate) (PM-MA) Microspheres*, 2015, <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TSD0021MaterialPropertiesWeb.pdf>.
- [160] I. Sbalzarini and P. Koumoutsakos, *Journal of Structural Biology*, 2005, **151**, 182–195.
- [161] D. Hartono, Y. Liu, P. L. Tan, X. Y. S. Then, L.-Y. L. Yung and K.-M. Lim, *Lab on a Chip*, 2011, **11**, 4072.
- [162] A. J. Slobodnik Jr, P. H. Carr and A. J. Budreau, *Journal of Applied Physics*, 1970, **41**, 4380–4387.
- [163] S. Gopani, *Microwave Journal*, 1998, **41**, 1–5.
- [164] J. Kondoh, N. Shimizu, Y. Matsui and S. Shiokawa, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 2005, **52**, 1881–1883.
- [165] H. OKUMURA, Y. UDAGAWA, K. YAMADA, K. TSUKASAKI, Y. AZUMA and S. NOZAWA, *Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences*, 1979, **55**, 135–140.
- [166] J. L. Roti Roti, *International Journal of Hyperthermia*, 2008, **24**, 3–15.
- [167] C. Didelot, E. Schmitt, M. Brunet, L. Maingret, A. Parcellier and C. Garrido, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2006, **172**, 171–198.
- [168] S. Li, S. Chien and P. Brånemark, *Journal of Orthopaedic Research*, 1999, **17**, 891–899.
- [169] F.-h. Ko, L.-Y. Weng, C.-J. Ko and T.-C. Chu, *Microelectronic Engineering*, 2006, **83**, 864–868.
- [170] V. Romano, A. D. Zweig, M. Frenz and H. P. Weber, *Applied Physics B Photophysics and Laser Chemistry*, 1989, **49**, 527–533.
- [171] D. Ross, M. Gaitan and L. E. Locascio, *Analytical Chemistry*, 2001, **73**, 4117–4123.
- [172] R. Samy, T. Glawdel and C. L. Ren, *Analytical Chemistry*, 2008, **80**, 369–375.
- [173] K. H. Drexhage, *J Res Natl Bur Stand Sect A Phys Chem*, 1976, **80 A**, 421–428.
- [174] D. Erickson, X. Liu, R. Venditti, D. Li and U. J. Krull, *Analytical Chemistry*, 2005, **77**, 4000–4007.
- [175] J. Gordon, S. Amini and M. K. White, in *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, ed. S. Amini and M. K. White, Humana Press, Totowa, NJ, 2013, vol. 1078 of Methods in Molecular Biology, pp. 1–8.
- [176] Thermo Fisher Scientific, *Neurite Outgrowth Staining Kit*, 2012, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A15001>.
- [177] P. B. Sargent, *Trends in Neurosciences*, 1989, **12**, 203–205.
- [178] A. Caceres, G. Banker, O. Steward, L. Binder and M. Payne, *Developmental Brain Research*, 1984, **13**, 314–318.
- [179] K. Goslin, D. J. Schreyer, J. H. P. Skene and G. Banker, *Nature*, 1988, **336**, 672–674.
- [180] M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero and L. H. Boise, *BMC cell biology*, 2013, **14**, 32.
- [181] C. Sommer, C. Straehle, U. Kothe and F. A. Hamprecht, 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011, pp. 230–233.

- [182] R. E. Durand and P. L. Olive, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1982, **30**, 111–116.
- [183] K. Baumgartner, *Master-Thesis*, Universität Augsburg, 2021.
- [184] T. Scientific, *Click-iT EdU Imaging Kits (Manual)*, 2011, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10338.pdf>.
- [185] C. J. Cattin, M. Düggelin, D. Martinez-Martin, C. Gerber, D. J. Müller and M. P. Stewart, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, **112**, 11258–11263.
- [186] M. Tessier-Lavigne and C. S. Goodman, *Science*, 1996, **274**, 1123–1133.
- [187] M. Lienhart, *Bachelor-Thesis*, Universität Augsburg, 2020.
- [188] F. Palzer, *Bachelor-Thesis*, Universität Augsburg, 2020.
- [189] A. Kamkin and I. Kiseleva, in *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*, ed. A. Kamkin and I. Kiseleva, Academia Publishing House Ltd., Moskau, 2005, p. 14.
- [190] R. J. Pelham and Y.-l. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, **94**, 13661–13665.
- [191] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo and Y.-l. Wang, *Biophysical Journal*, 2000, **79**, 144–152.
- [192] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi and B. Geiger, *Nature Cell Biology*, 2001, **3**, 466–472.
- [193] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher, *Cell*, 2006, **126**, 677–689.
- [194] A. K. Denisin and B. L. Pruitt, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**, 21893–21902.
- [195] S. Budday, R. Nay, R. de Rooij, P. Steinmann, T. Wyrobek, T. C. Ovaert and E. Kuhl, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2015, **46**, 318–330.
- [196] I. N. Sneddon, *International Journal of Engineering Science*, 1965, **3**, 47–57.
- [197] K. J. Price, A. Tsykin, K. M. Giles, R. T. Sladic, M. R. Epis, R. Ganss, G. J. Goodall and P. J. Leedman, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, **427**, 343–348.
- [198] B. M. Baker and C. S. Chen, *Journal of Cell Science*, 2012, **125**, 3015–3024.
- [199] H. Huang, Y. Ding, X. S. Sun and T. A. Nguyen, *PloS one*, 2013, **8**, e59482.
- [200] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock and L. Yang, *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2014, **12**, 207–218.
- [201] J.-P. Frimat, S. Xie, A. Bastiaens, B. Schurink, F. Wolbers, J. den Toonder and R. Luttge, *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*, 2015, **33**, 06F902.
- [202] K. E. Sung, G. Su, C. Pehlke, S. M. Trier, K. W. Eliceiri, P. J. Keely, A. Friedl and D. J. Beebe, *Biomaterials*, 2009, **30**, 4833–4841.
- [203] F. Geiger, L. G. Schnitzler, M. S. Brugger, C. Westerhausen and H. Engelke, *in preparation*, 2021.
- [204] G. Fuhr, T. Schnelle and B. Wagner, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 1994, **4**, 217–226.

- [205] K. Lucas, G. Fuhr, T. Mueller, K. Reimer and B. Wagner, *Lagestabile Positionierung aktiv beweglicher Einzeller*, 1996, <https://patents.google.com/patent/DE19605830C1/de>.
- [206] H. Machemer and A. Ogura, *The Journal of Physiology*, 1979, **296**, 49–60.
- [207] L. G. Schnitzler, M. S. Brugger, A. Wixforth and C. Westerhausen, *in preparation*, 2021.
- [208] A. Patkunarajah, J. H. Stear, M. Moroni, L. Schroeter, J. Blaszkiewicz, J. L. Tearle, C. D. Cox, C. Fuerst, O. Sánchez-Carranza, M. D. Á. O. Fernández, R. Fleischer, M. Eravci, C. Weise, B. Martinac, M. Biro, G. R. Lewin and K. Poole, *eLife*, 2020, **9**, 1–25.
- [209] R. W. Gundersen and J. N. Barrett, *Journal of Cell Biology*, 1980, **87**, 546–554.
- [210] W. Zhou, J. Wang, K. Wang, B. Huang, L. Niu, F. Li, F. Cai, Y. Chen, X. Liu, X. Zhang, H. Cheng, L. Kang, L. Meng and H. Zheng, *Lab on a Chip*, 2017, **17**, 1725–1731.
- [211] M. S. Brugger, M. E. M. Stamp, A. Wixforth and C. Westerhausen, *Biomaterials science*, 2016, **4**, 1092–1099.
- [212] M. S. Brugger, K. Baumgartner, S. C. F. Mauritz, S. C. Gerlach, F. Röder, C. Schlosser, R. Fluhrer, A. Wixforth and C. Westerhausen, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, **117**, 202005203.
- [213] H. G. Knoch, *Schriften der Med. Akademie Dresden*, 1967, **6**, 81–87.
- [214] W. Klug, W.-G. Franke and H.-G. Knoch, *European Journal of Nuclear Medicine*, 1986, **11**, 494–7.
- [215] A. Binder, G. Hodge, A. M. Greenwood, B. L. Hazleman and D. P. Page Thomas, *British medical journal*, 1985, **290**, 512–514.
- [216] J. D. Heckman, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey and R. F. Kilcoyne, *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1994, **76**, 26–34.
- [217] D. P. Zachs, S. J. Offutt, R. S. Graham, Y. Kim, J. Mueller, J. L. Auger, N. J. Schuldt, C. R. W. Kaiser, A. P. Heiller, R. Dutta, H. Guo, J. K. Alford, B. A. Binstadt and H. H. Lim, *Nature Communications*, 2019, **10**, 951.
- [218] C. L. Tsai, W. H. Chang and T. K. Liu, *The Chinese journal of physiology*, 1992, **35**, 21–6.
- [219] R. Williams, *Physiotherapy*, 1987, **73**, 113–116.
- [220] D. L. Miller, N. B. Smith, M. R. Bailey, G. J. Czarnota, K. Hynynen and I. R. S. Makin, *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2012, **31**, 623–34.
- [221] M. S. Brugger, *Bachelor-Thesis*, Universität Augsburg, 2014.
- [222] M. E. M. Stamp, *Ph.D. thesis*, Augsburg, 2017.
- [223] N. Doan, P. Reher, S. Meghji and M. Harris, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1999, **57**, 409–419.
- [224] R. A. Luben, C. D. Cain, M. C.-Y. Chen, D. M. Rosen and W. R. Adey, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, **79**, 4180–4184.
- [225] D. Foley-Nolan, K. Moore, M. Codd, C. Barry, P. O’Connor and R. J. Coughlan, *Scand J Rehabil Med*, 1992, **24**, 51–59.

- [226] W. Thielicke and E. J. Stamhuis, *Journal of Open Research Software*, 2014, **2**, e30.
- [227] R. Lindken, M. Rossi, S. Große and J. Westerweel, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 2551.
- [228] F. G. Strobl, D. Breyer, P. Link, A. A. Torrano, C. Bräuchle, M. F. Schneider and A. Wixforth, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015, **6**, 414–419.
- [229] T. Frommelt, M. Kostur, M. Wenzel-Schäfer, P. Talkner, P. Hänggi and A. Wixforth, *Physical Review Letters*, 2008, **100**, 1–4.
- [230] S. C. Gerlach, *Bachelor-Thesis*, Universität Augsburg, 2017.
- [231] F. Röder, *Master-Thesis*, Universität Augsburg, 2018.
- [232] S. Datta, *Surface Acoustic Wave Devices*, Prentice-Hall, 1986, p. 252.
- [233] Fluxion, *Technical Note*, 2009, 1–2.
- [234] C. F. Dewey, S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone and P. F. Davies, *Journal of Biomechanical Engineering*, 1981, **103**, 177–185.
- [235] C. F. Dewey, *Journal of Biomechanical Engineering*, 1984, **106**, 31–35.
- [236] L. Flohé, in *Methods in enzymology*, Elsevier Inc., 2010, vol. 473, pp. 1–39.
- [237] Y. M. Janssen-Heininger, B. T. Mossman, N. H. Heintz, H. J. Forman, B. Kalyanaraman, T. Finkel, J. S. Stamler, S. G. Rhee and A. van der Vliet, *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, **45**, 1–17.
- [238] S. C. F. Mauritz, *Bachelor-Thesis*, Universität Augsburg, 2019.
- [239] T. Scientific, *CellROX® Oxidative Stress Reagents*, 2012, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10422.pdf>.
- [240] T. R. Hurd, M. DeGennaro and R. Lehmann, *Trends in Cell Biology*, 2012, **22**, 107–115.
- [241] C. Ribeiro, S. Moreira, V. Correia, V. Sencadas, J. G. Rocha, F. M. Gama, J. L. Gómez Ribelles and S. Lanceros-Méndez, *RSC Advances*, 2012, **2**, 11504–11509.
- [242] K. Rieken, *Fachpraktikum*, Universität Augsburg, 2019.
- [243] M. B. Esch, J. M. Prot, Y. I. Wang, P. Miller, J. R. Llamas-Vidales, B. A. Naughton, D. R. Applegate and M. L. Shuler, *Lab on a Chip*, 2015, **15**, 2269–2277.
- [244] G. Weder, J. Vörös, M. Giazxon, N. Matthey, H. Heinzelmann and M. Liley, *Biointerphases*, 2009, **4**, 27–34.
- [245] G. Greco, M. Agostini, I. Tonazzini, D. Sallemi, S. Barone and M. Cecchini, *Analytical Chemistry*, 2018, **90**, 7450–7457.
- [246] M. Voss, U. Künzel, F. Higel, P. Kuhn, A. Colombo, A. Fukumori, M. Haug-Kröper, B. Klier, G. Grammer, A. Seidl, B. Schröder, R. Obst, H. Steiner, S. F. Lichtenthaler, C. Haass and R. Fluhrer, *The EMBO Journal*, 2014, **33**, 2890–2905.
- [247] M. L. C. Albuquerque, C. M. Waters, U. Savla, H. W. Schnaper and A. S. Flozak, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2000, **279**, 293–302.
- [248] J. Bednarz, A. Thalmann-Goetsch, G. Richard and K. Engelmann, *German journal of ophthalmology*, 1996, **5**, 127–131.

- [249] B. L. Coomber, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1993, **52**, 289–296.
- [250] W. H. Reinhart, *Experientia*, 1994, **50**, 87–93.
- [251] C. R. White and J. A. Frangos, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007, **362**, 1459–1467.
- [252] H. Jo, K. Sipos, Y. M. Go, R. Law, J. Rong and J. M. McDonald, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 1395–1401.
- [253] S. Hsu, R. Thakar, D. Liepmann and S. Li, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **337**, 401–409.
- [254] A. Dardik, A. Yamashita, F. Aziz, H. Asada and B. E. Sumpio, *Journal of Vascular Surgery*, 2005, **41**, 321–331.
- [255] S. Dimmeler, J. Haendeler, V. Rippmann, M. Nehls and A. M. Zeiher, *FEBS Letters*, 1996, **399**, 71–74.
- [256] P. P. Hsu, S. Li, Y. S. Li, S. Usami, A. Ratcliffe, X. Wang and S. Chien, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **285**, 751–759.
- [257] C. A. Bassett, R. J. Pawluk and A. A. Pilla, *Science*, 1974, **184**, 575–577.
- [258] F. Sachs and C. E. Morris, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 1998, **132**, 1–77.
- [259] C. D. Cox, N. Bavi and B. Martinac, *Cell Reports*, 2019, **29**, 1–12.
- [260] D. Clapham, *Cell*, 2007, **131**, 1047–58.
- [261] L. L. Demer, C. M. Wortham, E. R. Dirksen and M. J. Sanderson, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 1993, **264**, 2094 – 2102.
- [262] R. V. Sharma, M. W. Chapleau, G. Hajduczuk, R. E. Wachtel, L. J. Waite, R. C. Bhalla and F. M. Abboud, *Neuroscience*, 1995, **66**, 433–441.
- [263] M. J. Ryan, K. W. Gross and G. Hajduczuk, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2000, **279**, 823–829.
- [264] E. J. Pettit and F. S. Fay, *Physiological Reviews*, 1998, **78**, 949–967.
- [265] R. A. Brundage, K. E. Fogarty, R. A. Tuft and F. S. Fay, *Science*, 1991, **254**, 703–706.
- [266] N. Prevarskaya, R. Skryma and Y. Shuba, *Nature Reviews Cancer*, 2011, **11**, 609–618.
- [267] A. K. Howe, *Current Opinion in Cell Biology*, 2011, **23**, 554–561.
- [268] R. T. Prajapati, B. Chavally-Mis, D. Herbage, M. Eastwood and R. A. Brown, *Wound Repair and Regeneration*, 2000, **8**, 226–237.
- [269] G. E. Hardingham and H. Bading, *Microscopy Research and Technique*, 1999, **46**, 348–355.
- [270] N. Wang and D. E. Ingber, *Biophysical Journal*, 1994, **66**, 2181–2189.
- [271] N. Wang, J. Butler and D. Ingber, *Science*, 1993, **260**, 1124–1127.
- [272] B. D. Matthews, D. R. Overby, R. Mannix and D. E. Ingber, *Journal of Cell Science*, 2006, **119**, 508–518.

- 
- [273] K. B. Daniel, A. Agrawal, M. Manchester and S. M. Cohen, *ChemBioChem*, 2013, **14**, 593–598.
- [274] A. Stett, B. Müller and P. Fromherz, *Physical Review E*, 1997, **55**, 1779–1782.
- [275] B. Eltzner, C. Wollnik, C. Gottschlich, S. Huckemann and F. Rehfeldt, *PLOS ONE*, 2015, **10**, e0126346.
- [276] H. Jin, J. Zhou, X. He, W. Wang, H. Guo, S. Dong, D. Wang, Y. Xu, J. Geng, J. K. Luo and W. I. Milne, *Scientific Reports*, 2013, **3**, 2140.
- [277] S. Li, S. Li, S. Anwar, F. Tian, W. Lu and B. Hou, *Progress in Electromagnetics Research Symposium*, 2014, 670–673.
- [278] P. J. W. Debye, *Polar molecules*, Dover, New York, 1945, p. 172.
- [279] R. Buchner, J. Barthel and J. Stauber, *Chemical Physics Letters*, 1999, **306**, 57–63.
- [280] Y. Poo, R.-x. Wu, X. Fan and J. Q. Xiao, *Review of Scientific Instruments*, 2010, **81**, 064701.
- [281] E. L. King, *Science*, 1964, **143**, 37–37.
- [282] Sigma-Aldrich, *Product Information - Minimum Essential Medium Eagle ( MEM )*, 2020, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/1/m0325for.pdf>.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vielmals und recht herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich sowohl beruflich als auch privat beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Achim Wixforth** bedanken, dass er mir ermöglicht hat, in diesem spannenden und interdisziplinären Umfeld zu forschen und zu arbeiten. Danke für die großartige Hilfsbereitschaft bei der Erstellung von Publikationen, Anträgen und Bewerbungen, dafür, dass ich bei Fragen immer ein offenes Ohr fand und für die spannende Zeit in Santa Barbara.

Meinen größten Dank möchte ich an **Dr. Christoph Westerhausen** aussprechen. Die einzigartige Betreuung, die spannenden und ideenreiche Diskussionen, die gemeinsamen Konferenzen und Auslandsreisen und die entdeckungsreichen Momente im Labor machten die vergangenen Jahre zu einer ganz besonderen Zeit! Danke für die großartige und vielfältige Unterstützung und dass du mir so viele Möglichkeiten eröffnet hast!

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Wolfgang Brütting** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen großen Dank auch an **Prof. Dr. Rainer Burgkart** für die Übernahme des Drittgutachtens.

Weiter möchte ich mich bei der **Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw)** bedanken sowohl für die Aufnahme in der Promotionsförderung, für die vielfältige ideelle Förderung und die finanzielle Unterstützung.

Meinen lieben Dank an meine Bachelor-, Master- und Austauschstudenten: **Stefan Gerlach, Florian Röder, Soha Essam, Sebastian Angermann, Sophie Mauritz, Kathrin Baumgartner, Michelle Lienhart** und **Felix Palzer** für die tolle Zusammenarbeit, euren sprudelnden Ideenreichtum und die lustigen Stunden im Zellkulturlabor. Danke für diese unvergesslichen Momente!

Einen großen Dank auch an all meine Kollegen, insbesondere an **Anna Jötten, Lukas Schnitzler, Tobias Petzak, Andrej Kamenac, Emeline Nysten** und **Matthias Weiß** für die gemeinsamen Diskussionen und Experimente, die großartige Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche und humorvolle Arbeitsklima.

Danke **Dr. Rudolf Hermann** für deine Hilfe bei allen chemischen Fragen und insbesondere für unsere kulinarischen Gespräche.

Ein liebes Dankeschön auch an **Sidonie Lieber**, für die stetige Fürsorge und Unterstützung, die großartige Hilfe in der Software-Entwicklung, für die Erfüllung meiner Bestellwünsche und dafür, dass im Labor nie etwas zur Neige ging.

Danke **Alexander Hupfer** für dein IT-Genie, sodass ein jedes Problem, ob Hardware- oder Software-seitiger Natur gelöst werden konnte und ich bei dir immer einen Ansprechpartner für CNC- oder IT-Fragen hatte.

Ein Vergelt's Gott auch an **Dr. Andreas Hörner** für deine Hilfe bei der Entwicklung des Multifunk-

tionsgenerators und für die Beschaffung und Herstellung der HF -Komponenten und - Leitungen.

Danke auch an **Andreas Spörhase** für die Unterstützung bei technischen Problemlösungen!

Lieben Dank an **Funda Cevik** für die Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten.

Danke an den gesamten Lehrstuhl EP 1, für die tolle Zeit, das super Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfsbereitschaft.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion abseits der Uni auf ihre Weise am meisten unterstützt haben. Meiner Familie und Freunden, insbesondere meinen Eltern und Schwiegereltern, danke dass ihr mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt und mir stets einen liebevollen Rückhalt gegeben habt. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Schwester **Ramona Schenk** und an **Stefan Ohm** für das aufwändige und sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dieser Dank gilt vor allem meiner Frau **Anja Brugger** für deine liebevolle Fürsorge, deine Geduld und Hilfsbereitschaft und dein immerwährendes Verständnis während meiner gesamten Promotionszeit.

**Danke!**

# Publikationsliste

1. M.S. Brugger\*, M.E.M. Stamp\*, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Acoustotaxis - in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves*, *Biomaterials science* 2016, **4**, 1092-1099. \* Authors contributed equally
2. M.S. Brugger, S. Grundeen, A. Doyle, L. Theogarajan, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Orchestrating cells on a chip: Employing surface acoustic waves towards the formation of neural networks*, *Physical Review E*, 2018, **98**, 012411.
3. P. Delsing, A.N. Cleland, M.J.A. Schuetz, J. Knörzer, G. Giedke, J.I. Cirac, K. Srinivasan, M. Wu, K.C. Balram, C. Bäuerle, T. Meunier, C.J.B. Ford, P.V. Santos, E. Cerda-Méndez, H. Wang, H.J. Krenner, E.D.S. Nysten, M. Weiß, G.R. Nash, L. Thevenard, C. Gourdon, P. Rovillain, M. Marangolo, J. Duquesne, G. Fischerauer, W. Ruile, A. Reiner, B. Paschke, D. Denysenko, D. Volkmer, A. Wixforth, H. Bruus, M. Wiklund, J. Reboud, J.M. Cooper, Y. Fu, M.S. Brugger, F. Rehfeldt, & C. Westerhausen, *The 2019 surface acoustic waves roadmap*, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2019, **52**, 353001.
4. M.S. Brugger, L.G. Schnitzler, T. Nieberle, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Shear-horizontal surface acoustic wave sensor for non-invasive monitoring of dynamic cell spreading and attachment in wound healing assays*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **173**, 112807.
5. M.S. Brugger, K. Baumgartner, S.C.F. Mauritz, S.C. Gerlach, F. Röder, C. Schlosser, R. Fluhrer, A. Wixforth & C. Westerhausen, *Vibration enhanced cell growth induced by surface acoustic waves*, *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 2020, **117**, 202005203.
6. F. Geiger, L.G. Schnitzler, M.S. Brugger, C. Westerhausen & H. Engelke, *Directed invasion of cancer cell spheroids inside 3D collagen matrices oriented by microfluidic flow in experiment and simulation*, *submitted to Soft Matter*, 2021.
7. L.G. Schnitzler, M.S. Brugger, A. Wixforth & C. Westerhausen *Reversible and irreversible single cell trapping of Paramecium caudatum*, *in preparation*, 2021.