



Jahresbericht 2007

caesar

center of advanced
european studies
and research



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

www.caesar.de

Inhaltsverzeichnis

1. Vorworte	
Vorsitzender des Stiftungsrates - Peter Gruss.....	5
Vorstand - Ulrich Benjamin Kaupp und Hartwig Bechte.....	7
2. Berichte	
Hans-Dieter Royer	
Therapie-Resistenz bei Krebserkrankungen.....	9
Michael Thie	
Stammzellen aus Zähnen - neue Möglichkeiten für den Gewebeersatz aus dem Labor.....	13
Hanjo Hennemann	
Protein-Interaktionsanalyse.....	17
Hermann Seitz	
Individualisierung in der Medizintechnik am Beispiel des patientenindividuellen Knochenersatzes.....	23
Michael Giersig	
Nanoparticle Technology.....	29
Stephan Irsen	
Neue Möglichkeiten der analytischen Elektronenmikroskopie.....	41
Manfred Lacher	
Technologie im Reinraum der Stiftung caesar.....	49
3. Personal / Finanzen.....	58
4. Organe der Stiftung.....	63

caesar



center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2007



Vorwort des Stiftungsratsvorsitzenden



Prof. Dr. Peter Gruss
Präsident der Max-Planck-Gesellschaft

caesar ist auf einem guten Weg. Für das Forschungszentrum war das Jahr 2007 geprägt von wichtigen Weichenstellungen, die das Institut auf seine wissenschaftliche Neuausrichtung vorbereitet haben. Mit der neuen Satzung, die der Stiftungsrat caesar im November 2006 beschlossen hatte, waren hierfür die notwendigen Voraussetzungen geschaffen worden.

Ein wesentlicher Schritt war zweifellos die Bestellung von Herrn Professor Dr. Ulrich Benjamin Kaupp zum wissenschaftlichen Direktor von caesar durch den Stiftungsrat am 16. Juli 2007. Einen Monat zuvor hatten die zuständigen Gremien der Max-Planck-Gesellschaft Professor Kaupp bereits zum Wissenschaftlichen Mitglied berufen. Kurz darauf wurde Professor Kaupp an die Medizinische Fakultät und an die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Bonn kooptiert. Damit ist die Basis gelegt für die gewünschte enge Verzahnung von caesar mit den Wissenschaftseinrichtungen in der Region.

Mit Herrn Professor Kaupp konnten wir einen international renommierten Forscher gewinnen, der mit seinem Profil sowohl den Anforderungen der wissenschaftlichen Neuausrichtung

als auch den Herausforderungen in hervorragender Weise gerecht wird, denen sich ein Gründungsdirektor stellen muss. Mit Forschungsschwerpunkten in den Bereichen der Sinnes- und Neurobiologie wird Professor Kaupp das neue Konzept von caesar in die Tat umsetzen.

Er hat zum 1. Januar 2008 seine Arbeit aufgenommen.

Somit konnte die kommissarische wissenschaftliche Leitung ihre Arbeit beenden. Der Stiftungsrat und das Forschungszentrum sind Professor Erwin Neher, Direktor am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, und Professor Herbert Waldmann, Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, für ihre Tätigkeit als kommissarische Direktoren im Jahr 2007 außerordentlich dankbar. Beide haben die schwierige Aufgabe gemeistert, behutsam die bestehende Forschung bei caesar umzugestalten und gleichzeitig die Arbeit des ersten Direktors für den Bereich der Neurowissenschaften vorzubereiten.

Unterdessen sind die Gremien der Max-Planck-Gesellschaft damit befasst, weitere hochrangige Berufungen an das Forschungszentrum



caesar vorzubereiten. Für die Neuausrichtung von caesar sind aber nicht nur Berufungen von Bedeutung - im Gesamtkonzept spielt auch die Etablierung eines Life Science Inkubators eine wesentliche Rolle: Ausgewählte Gründerteams sollen mit umfassender Unterstützung des Life Science Inkubators ihre Projekte aus dem Bereich der Lebenswissenschaften so weit entwickeln, dass sie reif für eine anschließende Firmengründung und Finanzierung werden. Wesentliche Voraussetzungen wurden in 2007 geschaffen, damit jetzt die ersten Projekte gefördert werden können.

Es besteht aller Grund zu Optimismus, dass sich das Forschungszentrum caesar hervorragend entwickelt, sowohl in der Forschung als auch im Hinblick auf die künftige Anwendung.

Prof. Dr. Peter Gruss
Vorsitzender des Stiftungsrates caesar

Vorwort des Vorstandes



Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp
Wissenschaftlicher Direktor



Dr. Hartwig Bechte
Kaufmännischer Geschäftsführer

Das center of advanced european studies and research (caesar) wurde in den vergangenen Jahren sowohl organisatorisch als auch thematisch umgestaltet. caesar, eine Stiftung des privaten Rechts, ist jetzt eng mit der Max-Planck-Gesellschaft (MPG) assoziiert. Die Direktoren der einzelnen Forschungsabteilungen werden zu wissenschaftlichen Mitgliedern der MPG berufen und die Nachwuchsgruppen werden nach bewährten Verfahren der MPG ausgesucht. Das Motto „Außen caesar, innen Max-Planck“ trifft den Kern dieser Partnerschaft.

Die Forschung bei caesar wird sich zukünftig den Neurowissenschaften widmen; insbesondere sollen biomedizinische Aspekte der Hirnforschung, z.B. die molekularen Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen, erforscht werden. In den kommenden Jahren werden drei neue Abteilungen aufgebaut und mehrere Nachwuchsgruppen eingerichtet. Die erste Abteilung „Molekulare Neurosensorik“ hat ihre Arbeit schon aufgenommen. Sie beschäftigt sich mit grundlegenden Fragen der zellulären Signalwandlung: Wie werden Signale von Zellen aufgenommen und in biochemische oder elektrische Antworten umgewandelt? Die beiden anderen Abteilungen für „Neurodegenerative Erkrankungen“ und „Neurophotonik“ werden, so ist zu hoffen, ihre Arbeit im Laufe des Jahres 2009 aufnehmen.

Der vorliegende Jahresbericht kann diese jüngste Entwicklung naturgemäß nicht widerspiegeln. Stattdessen gibt er eine Rückschau auf einzelne Forschungsprojekte der vergangenen 5 Jahre, die jetzt weitgehend abgeschlossen worden sind. Die zurückliegenden Forschungsarbeiten bei caesar waren in verschiedener Hinsicht sehr erfolgreich. Mehrere Gruppenleiter wurden auf Professorenstellen an die Universitäten in Essen, Bochum, Kiel, Berlin und Dresden berufen. Für viele wissenschaftliche Mitarbeiter bildete die anwendungs-

orientierte Forschung bei caesar eine gute Basis für eine Tätigkeit in der Industrie. Ein junger Nachwuchswissenschaftlicher wurde auf eine Heisenberg-Professur berufen. Außerdem

mündeten die Forschungsarbeiten in mehrere erfolgreiche Firmengründungen. Die bisherigen Forschungsarbeiten bei caesar umfassten sowohl die Material- als auch die Lebenswissenschaften. Eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung so unterschiedlicher Forschungsthemen spielten dabei der Reinraum und die Elektronenmikroskopie. Diese beiden Technologien sollen zukünftig für neurowissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt werden. Die Beiträge in diesem Bericht veranschaulichen das große Potential auch für die biomedizinische Forschung dieser beiden Hochtechnologien. Jene Arbeitsgruppen, die sich den Material- und Nanowissenschaften gewidmet haben, verließen - mit einer Ausnahme - caesar schon in den vergangenen Jahren. Der Schwerpunkt des Jahresberichts 2007 liegt deshalb auf den Lebenswissenschaften und der Medizintechnik.

Auch in diesen Bereichen hatte caesar sehr unterschiedliche Spezialthemen, die jetzt an verschiedenen Stellen weiter bearbeitet werden.

So wird beispielsweise das Rapid Prototyping für patientenindividuellen Knochenersatz im akademischen Umfeld der Universität Rostock fortgesetzt, während die Technik der Protein-Interaktionsanalyse zur Wirkstoffidentifizierung in einer Ausgründung von caesar-Mitarbeitern, der Nexigen GmbH, weiter entwickelt wird.

Damit wird die bei caesar erfolgte Forschung und Entwicklung nicht abgebrochen. Viele ehemalige Mitarbeiter setzen ihre Arbeiten woanders fort. Dabei nutzen sie ihr Know-how, die Patente und zum Teil auch die Infrastruktur von caesar. caesar konnte damit in vielen Fällen eine Kontinuität der bisherigen Forschungsthemen über die Neuausrichtung hinaus unterstützen und so das bisher Erreichte sichern.


Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp
Dr. Hartwig Bechte

Therapie-Resistenz bei Krebserkrankungen

Dr. Hans-Dieter Royer
Arbeitsgruppenleiter Breast Cancer Research

Die Chemotherapie spielt eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Es zeigt sich jedoch, dass Krebszellen in der Lage sind, die toxischen Effekte von Zytostatika abzuwehren, was dazu führt, dass die Krebszellen weiter wachsen. Die Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz ist ein Hauptproblem bei der Behandlung von Krebserkrankungen, da es für solche Tumoren keine weiteren Behandlungsmöglichkeiten gibt.

Bösartige Neubildungen sind auch weiterhin, nach den Krankheiten des Kreislaufsystems, die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter in Deutschland. Alleine in den USA werden im Jahr 2008 1.437.100 neue Krebserkrankungen erwartet [1]. In Deutschland stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Krankheit des Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Krebserkrankung [2]. Zur chemotherapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen steht eine Vielzahl verschiedener Wirkstoffe mit antineoplastischen Eigenschaften aus unterschiedlichen Substanzklassen zur Verfügung. Diese unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Herkunft, ihres Wirkmechanismus und ihrer Nebenwirkungen. Klinische Beobachtungen zeigen, dass ungefähr 50% aller neoplastischen Gewebe nicht oder nur geringfügig auf eine Chemotherapie ansprechen. In dieser Kategorie befinden sich Karzinome der Niere, der Nebenniere, dem Kolon, der Pankreas, der Leber, der Gallenwege sowie maligne Melanome und Hirntumoren wie z. B. das Glioblastom. Man spricht hier von primärer oder intrinsischer Resistenz gegenüber Zytostatika. Im Gegensatz dazu sprechen z.B. Mammakarzinome, Ovarialkarzinome oder akute myeloische Leukämien zunächst gut auf eine Chemotherapie an. In der Klinik wird die Chemotherapie in Zyklen durchgeführt, die im Abstand von mehreren Wochen verabreicht werden. Nach erfolg-

reicher Chemotherapie zeigt sich meist eine vollständige Rückbildung des Tumors, die auch als Remission bezeichnet wird. Sehr häufig jedoch wird ein erneutes Auftreten des Tumors beobachtet. Bei der Behandlung von Tumorpatienten erfolgen weitere Therapiezyklen, in deren Verlauf die Therapie mehr und mehr ihre Wirkung verliert. Letztlich entwickeln sich vollständig chemotherapie-resistente Tumore, die zum Tod der Patienten führen. Die Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz kann somit als ein zeitabhängiger biologischer Prozess angesehen werden.

Mechanismen der Chemotherapie-Resistenz

Im Verlauf der letzten 40 Jahre wurde intensiv daran gearbeitet, Mechanismen der Chemotherapie-Resistenz aufzuklären [3]. Es zeigte sich, dass Krebszellen in der Lage sind, genetische, biochemische und zellbiologische Prozesse zu aktivieren, die dafür verantwortlich sind, dass die toxischen Eigenschaften von Zytostatika neutralisiert werden. So können Krebszellen die Aufnahme von Krebsmedikamenten gezielt hemmen oder deren Ausscheidung durch die Aktivierung von sogenannten Efflux-Pumpen ermöglichen (Abb. 1). Die Familie der Efflux-Pumpen wird auch als Familie der Multidrug-Transporter bezeichnet, die eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Chemotherapie-Resistenz spielen [4].

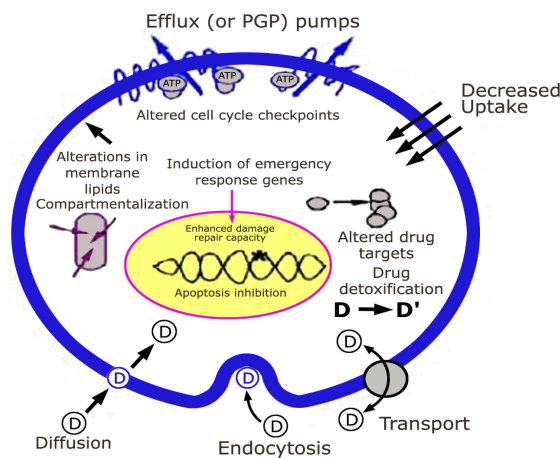


Abb. 1: Mechanismen der Chemotherapie-Resistenz von Krebszellen. Zytostatika werden von Krebszellen durch passive Diffusion oder aktiven Transport aufgenommen. Resistente Zellen erlangen die Fähigkeit die Aufnahme von Zytostatika zu hemmen oder diese durch Efflux-Pumpen wieder zu entfernen. Die DNA ist ein Target vieler Wirkstoffe, die bei der Krebstherapie eingesetzt werden. Therapieresistente Krebszellen Zellen aktivieren Mechanismen mit denen die toxischen Auswirkungen der Chemotherapeutika abgewehrt werden. Dies beinhaltet zum Beispiel eine Entgiftung durch Metabolisierung, erhöhte Reparatur von DNA Schäden und Hemmung der Apoptose. Die genauen Abläufe bei der Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz von Krebszellen sind weitgehend unbekannt.

Die Efflux-Pumpen werden auch als ABC-Transporter bezeichnet, da sie eine intrazelluläre ATP-Bindungsstelle aufweisen, welche für die Aktivität des Transporters wichtig ist. P-Glycoprotein ist ein intensiv untersuchter ABC-Transporter, der bei der Ausbildung der Chemotherapie-Resistenz eine wichtige Rolle spielt. Da man angenommen hatte, dass P-Glycoprotein eine Schlüsselrolle bei der Chemotherapie-Resistenz spielt, haben sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern und die Pharmaindustrie sehr eingehend mit diesem Molekül beschäftigt [5]. Es ist bekannt, dass P-Glycoprotein in verschiedenen Tumoren überexprimiert wird. Es gelang uns zu zeigen, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 die Expression von P-Glycoprotein in Mammakarzinomen steuert, und es wurde beobachtet, dass eine erhöhte YB-1 Expression bei Brustkrebs-Patienten mit einer Chemotherapie-Resistenz

assoziiert ist [6,7]. Interessanterweise führt eine Expression von YB-1 in transgenen Mäusen zur Entwicklung von Mammakarzinomen [8]. Dies bedeutet, dass Resistenzfaktoren ursächlich mit der Tumorentstehung verknüpft sein können. Ursprünglich wurde P-Glycoprotein als ein erfolgversprechendes Target für die Therapie angesehen und deshalb intensiv erforscht.

Allerdings gelang es nicht, mit diesen Ansätzen klinische Erfolge zu erzielen. Dies ist nicht überraschend, da bekannt ist, dass viele verschiedene Faktoren für die Ausbildung der Chemotherapie-Resistenz eine Rolle spielen (Abb. 1), wie z.B. Veränderungen der Apoptose, Reparaturmechanismen, Veränderungen von Drug-Targets durch Mutation und Änderung der „copy number“, Veränderungen der Zellzykluskontrolle und der Lipid-Zusammensetzung von Membranen und Entgiftung der antineoplastischen Wirkstoffe durch Metabolisierung [3]. Da die grundlegenden Mechanismen der Chemotherapie-Resistenz kaum verstanden sind, konnten bisher noch keine wesentlichen Durchbrüche bei der Therapie erzielt werden. Dieser Umstand erklärt, dass trotz enormer Anstrengungen, den Krebs zu besiegen, die Mortalitätsraten bei den meisten Krebserkrankungen seit fünfzig Jahren unverändert sind.

Systembiologische Ansätze zur Erforschung der Chemotherapie-Resistenz

Krebszellen reagieren auf Chemotherapeutika mit vielfältigen Abwehrstrategien. Im National Cancer Institute (NCI) in den USA wurde die Genexpression von 60 verschiedenen Zelllinien als Antwort auf eine Vielzahl von Zytostatika gemessen (NCI-60 Studie). Diese Untersuchungen erforschten die zelluläre Antwort von Krebszellen auf eine kurzzeitige Behandlung mit Zytostatika [9]. Die Chemotherapie-Resistenz Entwicklung dagegen ist ein lang-

fristiger Prozess. Es gibt bis heute keine systematischen Studien, die diesen Prozess zeitaufgelöst untersucht haben. Es muss angestrebt werden, die Mechanismen, die der Chemotherapie-Resistenz zugrunde liegen, durch eine systembiologische Vorgehensweise aufzuklären. Das Forschungsfeld der Systembiologie wird durch gezielte Förderprogramme des Bundesministeriums für Bildung und Forschung in Deutschland aufgebaut [10]. Die Systembiologie ist darauf ausgerichtet, biologische Phänomene unter einem neuen Blickwinkel zu analysieren und dadurch neues Wissen zu generieren. Dies bedeutet, dass experimentelle Daten in mathematischen Modellen analysiert werden und es möglich wird, Vorhersagen zu machen, die dann experimentell überprüft werden können. Diese iterative Vorgehensweise ist ein zentrales Element für die Analyse komplexer biologischer Systeme. Für die mathematische Modellierung wurde eine Kooperation mit Prof. ED Gilles vom Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme (Magdeburg) begonnen. Im experimentellen Bereich wurde versucht, die Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz in der Gewebekultur nachzuvollziehen. Für die Etablierung dieses Forschungsansatzes wurde Cisplatin und eine Brustkrebszelllinie (MCF-7) gewählt, da Cisplatin derzeit verstärkt bei der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird [11]. In der Klinik werden Zytostatika in Behandlungszyklen verabreicht. Um dies in der Gewebekultur nachzuvollziehen, wurden MCF-7 Zellen in wöchentlichen Abständen für einen Zeitraum von 8 Stunden mit einer Dosis von Cisplatin behandelt, die auch bei Patienten eingesetzt wird. Die Cisplatin Behandlung wurde über einen Zeitraum von 24 Wochen durchgeführt, und die Entstehung der Cisplatin-Resistenz wurde zeitaufgelöst durch einen Vitalitätstest (MTS-Assay) gemessen. Parallel dazu wurden Gen-

expressionsprofile erstellt und die Aktivitäten verschiedener Signalwege mit Hilfe von Antikörper-Mikroarrays analysiert [12]. Die Untersuchungen zeigten, dass die Expression von Amphiregulin nach dem 12. Behandlungszyklus aktiviert wird und danach kontinuierlich ansteigt (Abb. 2A).

Amphiregulin bindet an den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und führt zu einer Aktivierung des EGFR Signalwegs [12]. Die Bedeutung von Amphiregulin für die Cisplatin-Resistenz wurde durch eine gezielte Funktionshemmung mittels neutralisierender Anti-

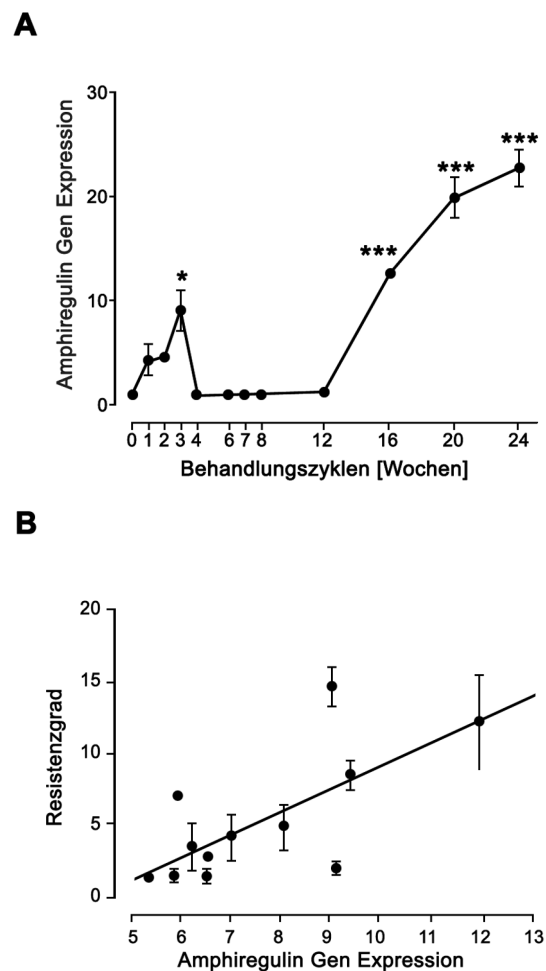


Abb. 2: Amphiregulin ein Schlüsselfaktor für die Ausbildung der Cisplatin-Resistenz beim Brustkrebs. (A) Amphiregulin mRNA Expression im Ablauf der Entwicklung der Cisplatin-Resistenz in MCF-7 Brustkrebszellen. Das Ansteigen der mRNA Konzentrationen korreliert direkt mit dem Ausmaß der Cisplatin-Resistenz [12]. (B) Die Amphiregulin Expressionsstärke korreliert mit der Cisplatin-Resistenz verschie-

körper und einer Amphiregulin-spezifischen siRNA nachgewiesen. Es lässt sich also feststellen, dass die Cisplatin-Resistenz von MCF-7 Brustkrebszellen durch eine gesteigerte Expression von Amphiregulin vermittelt wird, die mit einer Aktivierung des EGFR Signalwegs assoziiert ist [12]. Dieses Ergebnis wird erhärtet durch die Beobachtung, dass die Menge der Amphiregulin mRNA in verschiedenen Brustkrebszelllinien mit dem Ausmaß der Cisplatin-Resistenz korreliert (Abb. 2B). Dies bedeutet, dass die Modellierung der Cisplatin-Resistenz-Bildung in der Gewebekultur als neue Strategie angesehen werden kann, mit der grundlegende Mechanismen der Chemotherapie-Resistenz aufgeklärt werden können. In einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme werden neue systembiologische Ansätze entwickelt, die für das Verständnis der Chemotherapie-Resistenz nützlich sind.

Literatur

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., and Thun M. J., Cancer statistics, 2008. CA Cancer J. Clin. 58 (2008), 71-96.
2. www.krebsatlas.de
3. Gottesman M. M., Annu. Rev. Med. 53 (2002), 615-627.
4. Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., and Varadi A., Physiol. Rev. 86 (2006), 1179-1236.
5. Szakacs G., Paterson J. K., Ludwig J. A., Boothh-Genthe C., and Gottesman M. M., Nature Reviews Drug Discovery 5 (2006), 219-234.
6. Bargou R. C., Jürchott K., Metzner S., Wagener C., Dietel M., Guski H., Dörken B. and Royer H.-D., Nature Medicine 3 (1997), 447-450.
7. Janz M., Harbeck N., Dettmar P., Berger U., Schmidt A., Jürchott K., Schmitt M., and Royer H.-D., Int. J. Cancer 97 (2002), 278-282.
8. Bergmann S., Royer-Pokora B., Fietze E., Jürchott K., Hildebrandt B., Trost D., Leenders F., Chang-Claude J., Bargou R., Theuring F., Dietel M., and Royer H.-D., Cancer Res. 65 (2005), 4078-4087.
9. Staunton J. E., Slonim D. K., Collier H. A., Tamayo P., Angelo M. J., Park J., Scherf U., Lee J. K., Reinhold W. O., Weinstein J. N., Mesirov J. P., Lander E. S., and Golub T. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 10787-10792.
10. Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Referat Öffentlichkeitsarbeit. Systeme des Lebens. Systembiologie. www.bmbf.de/pub/systembiologie.pdf
11. <http://clinicaltrials.gov>
12. Eckstein E., Servan K., Girard L., Cai D., von Jonquieres G., Jaehde U., Kassack M. U., Gazdar A. F., Minna J., and Royer H.-D., J. Biol. Chem. 283 (2008), 739-750.

Stammzellen aus Zähnen – neue Möglichkeiten für den Gewebeersatz aus dem Labor

PD Dr. Michael Thie
Arbeitsgruppenleiter Dentale Zellbiologie

Zähne dienen gemeinhin dem Kauen und sorgen für den richtigen Biss. Strahlend weiß und gleichmäßig geformt gehören sie zum Markenzeichen eines jeden Gesichts. Beschäftigt man sich abseits von Ästhetik und Zahnerhaltung mit der Entwicklung der Zähne, so kommt man zu überraschenden Einsichten mit weitreichenden Konsequenzen für die moderne Medizin.

Zähne als Abkömmlinge der Neuralleiste

Schon weit vor der Geburt und dem sichtbaren Durchbruch der Zähne beginnt ihre eigentliche Entstehung. In der Zahnleiste der Ober- und Unterkieferanlagen bilden sich in einem komplizierten Wechselspiel zwischen wenigen Zellen Zahnkeime heraus, die als Ausgangspunkt für die Zahnentwicklung dienen. Die ersten Zellen, die für die Entwicklung von entscheidender Bedeutung sind, entstammen dem Ektoderm der Mundbucht und der Neuralleiste der Kopfanlage. Während aber die ektodermalen Zellen mit der Ausbildung der Zahnkrone wieder verschwinden, bleiben die Neuralleistenzellen ein Leben lang erhalten und sorgen für den Bestand von Zahnwurzel und Zahnhalteapparat.

Weisheitszähne erlauben das Herstellen neuer Gewebe

Am Beispiel des menschlichen Weisheitszahnes hat die Arbeitsgruppe Dentale Zellbiologie zeigen können, dass die ursprünglichen Neuralleistenzellen in einem apikal gelegenen Gewebe der Zähne in Form adulter Stammzellen überdauern. Mit einem speziellen Verfahren können diese Zellen aus ihrer Nische isoliert und in Kultur genommen werden. Die Stammzellen, die aufgrund ihrer Herkunft als dentale Stammzellen (dNC-PCs, dental neural crest-derived progenitor cells) bezeichnet werden

und eine charakteristische molekulare Signatur besitzen, haben ein sehr großes Differenzierungspotential [1,2].

dNC-PCs sind multipotent. Sie entfalten ihr Potential, sobald man sie außerhalb ihrer angestammten Nische kultiviert und neuen Wachstumsfaktoren aussetzt. So konnte gezeigt werden, dass sich dNC-PCs im Einklang mit ihrer Entwicklungskompetenz als Derivat der embryonalen kranialen Neuralleiste in Zellen mit einem chondrogenen, osteogenen oder neurogenen Phänotyp umwandeln lassen. Für die medizinische Anwendung der dentalen Stammzellen ergeben sich somit zahlreiche Möglichkeiten. So ist neben den knöchernen Elementen des Kopfes und der Zähne auch eine Anwendung für Nervenzellen der Spinalganglien, Schwannzellen und peripheren Glia sowie für Hirnhautersatz denkbar. Diese Anwendungsmöglichkeiten liegen in der Biologie der dentalen Stammzelle selbst, d.h. in ihrem embryologisch vorgegebenen Entwicklungspotential zur Ausbildung der Kopfgregion (Viszerokranium). Aus diesem Grund ist die Stammzelle ektomesenchymalen Ursprungs, wie sie im Zahngewebe vorkommt, für die Therapie von Hart- und Weichgewebedefekten im Kopfbereich auch besser geeignet als die Stammzelle mesodermalen Ursprungs, wie sie aus dem Knochenmark des Beckenkamms isoliert werden kann.

Mit dem Einsatz der dentalen Stammzellen hat die Arbeitsgruppe einen neuen Behandlungsansatz gewählt, um funktionsgestörtes Gewebe der Kopfregion wiederherzustellen. Der Behandlungsansatz nutzt den durch die Natur gegebenen Vorteil, dass die eingesetzten Stammzellen aus dem zu regenerierenden Gewebetyp selbst stammen und örtlich und geweblich passen.

Ein innovatives Stammzell-Vorhaben

Die Arbeitsgruppe hat sich bei ihren Arbeiten auf die Anwendung der dNC-PCs im Bereich Knochenaufbau konzentriert und an der Schnittstelle von Stammzellbiologie, Biomedizin und Medizintechnik einen entsprechenden Projektplan konzipiert. Im Mittelpunkt des Projektplans steht ein spezielles biomedizinisches Anwendungspotential dieser Stammzellen, das auf den gemachten wissenschaftlichen Beobachtungen aufbaut. Der Kerngedanke ist, eine therapeutische Heilsubstanz herzustellen, die aus osteogen stimulierten dentalen Stammzellen – den hier etablierten dNC-PCs – hervorgegangen ist.

Das osteogene Potential von dentalen Stammzellen

Hinsichtlich der Zellkultivierung von dNC-PCs werden spezialisierte Verfahren eingesetzt, die zur Isolierung von multipotenten, undifferenzierten Stammzellen mit hoher Entwicklungskapazität führen. Das isolierte Gewebe der Zahnkeime (Weisheitszähnen; Abb. 1) wird in Form von adhären wachsenden Zellen in Kultur genommen. Diese Zellen sind nach unseren neu formulierten Kulturbedingungen hochproliferativ, was eine gute Expandierbarkeit im späteren Herstellungsprozess erlaubt (Abb. 2). Die Güte der kultivierten Zellen wird über eine qualitative und quantitative Bestimmung von Markern erfasst. Die Bestimmung der Marker



Abb. 1: Weisheitszahn eines 15-jährigen Patienten, nachdem der Zahn operativ gezogen und anschließend der Länge nach aufgeschnitten wurde. Die bevorzugte Nische von dNC-PCs ist mit „pad“ markiert.

auf RNA- und auf Proteinebene ermöglicht es, die isolierten Zellen objektiv zu beurteilen und den Therapieerfolg bei späterer Anwendung abzuschätzen und dies zu einem Zeitpunkt, zu dem morphologische Anzeichen der Zelldifferenzierung noch nicht sichtbar sind [2].

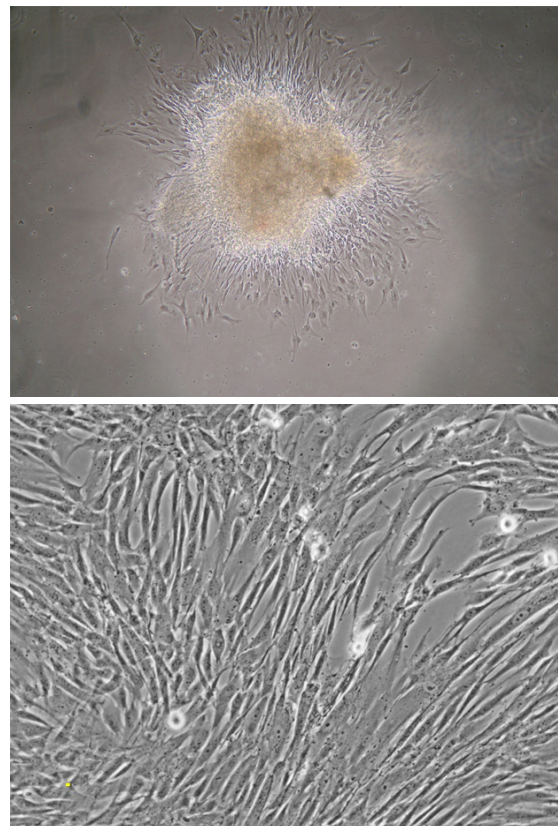


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahmen von isolierten dNC-PCs in der Zellkultur. Es sind Primärkulturen (oben) und Vermehrungskulturen (unten) abgebildet.

Ergebnisse aus Zellkulturversuchen mit neuen, optimierten Aufarbeitungsprotokollen zeigen, dass eine kontrollierte osteogene Differenzierung der adhären wachsenden Zellen besonders leicht gelingt. Nach Stimulation mit einem entsprechenden Cocktail aus pharmakologisch wirksamen Substanzen lässt sich die Mineralisation der Zellkulturen beobachten und ihr Kalziumgehalt als Maß für den Erfolg dieser Behandlung quantitativ bestimmen.

Das Potential von dNC-PCs zur Knochenbildung wurde in einem Tiermodell (Nacktmaus) nach ektopter Implantation der Zellen detailliert untersucht. Die beobachteten Ergebnisse bestätigen das Auftreten von Knochengewebe und damit die Differenzierung der dentalen Stammzellen zu Osteoblasten (Abb. 3). Untersuchungen zur Natur der abgelagerten Knochenmatrix und dem Prozess der Umwandlung der Stammzellen zu von Knochen eingeschlossenen Osteozyten schließen sich an. Damit werden die notwendigen Grundlagen geschaffen, um die dentalen Stammzellen zur Behandlung von Knochendefekten, zur Knochenheilung oder zum Knochenaufbau erstmals auch therapeutisch einzusetzen [2].

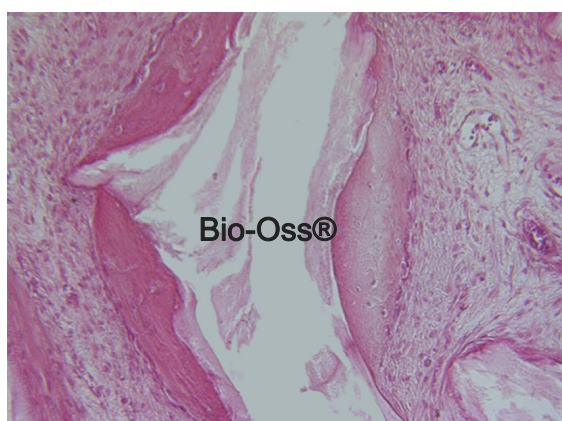


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme von Knochengewebe, dass in der Maus aus dNC-PCs gewachsen ist. Im Experiment wurden die Zellen auf Granulat (Bio-Oss) aufgetragen und unter die Haut verpflanzt.

Schritte auf dem Weg zur Heilsubstanz

Zur Herstellung der angestrebten Heilsubstanz werden dentale Stammzellen in einem dreidimensionalen Kultursystem extrakorporal vermehrt und dazu angeregt, einen dem jungen Knochen ähnlichen Gewebeverband zu entwickeln (Abb. 4). Damit wird die spezielle Eigenschaft dieses Systems genutzt, aufgrund ihrer Zusammensetzung den komplexen Knochenaufbau physiologisch korrekt zu stimulieren.

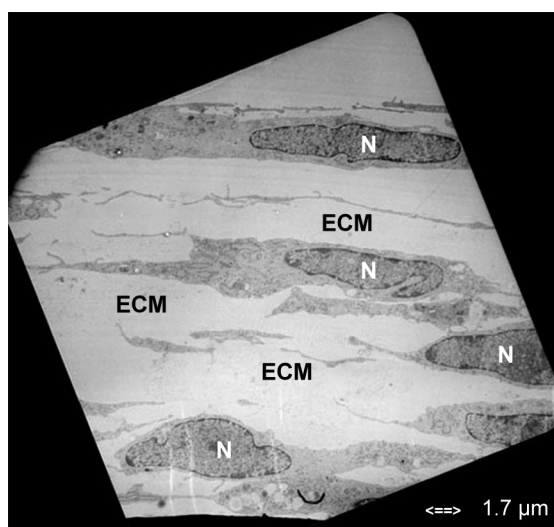


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem künstlich gewachsenen Gewebeverband, der aus dNC-PCs entstanden ist. Die Kerne der Zellen sind mit „N“ markiert, ihre extrazelluläre Matrix mit „ECM“.

Die Zellen im Kultursystem werden nach dessen Differenzierung zur Herstellung einer Heilsubstanz abgetötet und/oder zumindest teilweise entfernt, wobei eine für die therapeutische Verwendung geeignete Substanz entsteht. Die Heilsubstanz, die aus stimulierten Stamm- und/oder Vorläuferzellen hervorgegangen ist bzw. produziert wurde, wird direkt in eine therapeutische Anwendungsform gebracht, ohne sie erneut mit Stammzellen zu besiedeln. Die Heilsubstanz kann also unabhängig von der Herkunft der Stamm- und/oder Vorläuferzellen universell zur Therapie eingesetzt werden und ihre natürliche regenerative Potenz für den Gewebeersatz, beispiels-

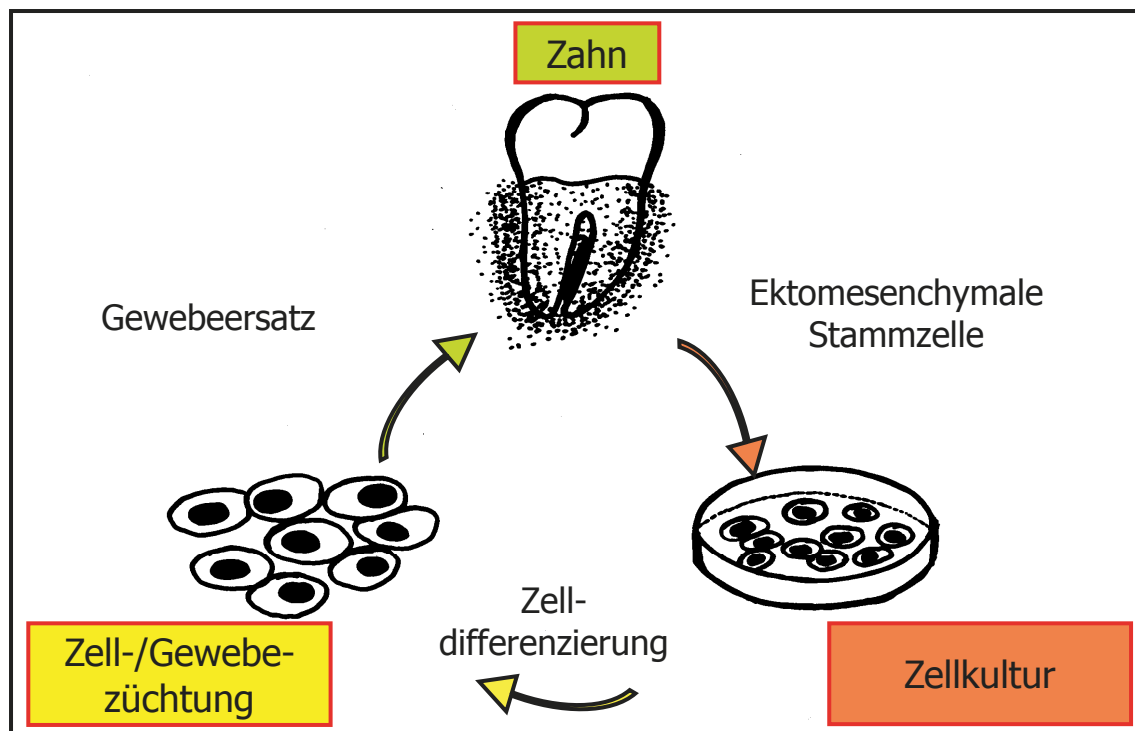


Abb. 5: Eine Schemazeichnung, die den Kreislauf der Stammzellen vom Spender (Zahn) über die Zellkultur, die Zell-/Gewebezüchtung bis hin zum Empfänger (Zahn) beschreibt. Zum Projektschutz gegenüber Dritten ist ein Patentportfolio von 6 Patentanmeldungen erstellt.

weise einen geeigneten Knochenaufbau, hoch-effizient nutzen. Die Heils substanz enthält dabei keine antigenen Zellbestandteile und kann somit bei allen Patienten ohne das Risiko immunogener Reaktionen angewandt werden. Dies ermöglicht eine industrielle Produktion des Präparats und sichert somit ständige Verfügbarkeit.

Ein Blick in die Zukunft

Im Projekt der Arbeitsgruppe wird die Etablierung eines Verfahrens und die Entwicklung eines Präparats innerhalb der Zahnmedizin/Kieferorthopädie/Kiefer- und Oralchirurgie zur Behebung von Defiziten im Knochenaufbau bei Patienten aufgezeigt, die derzeit nicht oder nur unter Schwierigkeiten mit Zahn-Implantaten versorgt werden können (Abb. 5). Dadurch soll diesen Patienten ein neuartiges Präparat angeboten werden, das seine natürliche regenerative Potenz für einen geeigneten Knochenaufbau nutzt. Darüber hinaus ergeben sich nahelie-

gende Optionen der Anwendung der dNC-PCs bzw. der Einsatz von Produkten daraus bei der Wiederherstellung von Gaumen- und Schädeldefekten in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie bzw. der Plastischen Chirurgie [3,4].

Literatur

1. Degistirici Ö., Jaquiere C., Schönebeck B., Siemonsmeier J., Götz W., Martin I., and Thie M., Tissue Engineering (Part A) 14 (2008), 317-330.
2. Schoenebeck B., Hartschen H. J., Schindel M., Degistirici Ö., Siemonsmeier J., Goetz W., and Thie M., Cells Tissues Organs, (2008) (in press)
3. Correa-Duarte M. A., Wagner N., Rojas-Chapana J., Morscheck C., Thie M., and Giersig M., Nano Letters 11 (2004), 2233-2236.
4. Fierz F. C., Beckmann F., Huser M., Leukers B., Irsen S., Degistirici Ö., Witte F., Andronache A., Thie M., and Müller B., Biomaterials (2008) (submitted).

Protein Interaktions-Analyse

Dr. Hanjo Hennemann
Arbeitsgruppenleiter Protein Interaction Analysis (PIA)

Proteine, die Arbeitsmaschinen der Zelle, können ihre Arbeit nur in hoch geordneter Weise und im Konzert mit anderen Proteinen erfüllen. Dies wird erst durch selektive Wechselwirkungen der Proteine untereinander ermöglicht. Die Identifizierung und Modulation von Proteinnetzwerken für therapeutische Zwecke ist das Ziel der Gruppe Protein-Interaktionsanalyse. Dazu entwickelte die Gruppe Screeningsysteme für Protein-Protein Interaktionen und für Peptide. In Kooperationen mit Pharma- und Biotechnologie-Unternehmen wurden die Grundlagen für marktfähige Technologien und eine eigene Wirkstoffpipeline gelegt. Die erfolgreiche Entwicklung des Projekts mündete im August 2007 in die Gründung der Nexigen GmbH als Spin-off aus dem Forschungszentrum caesar.

Die Zelle, ein „Melting Pot“ für Makromoleküle Seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms ist klar, dass es zwischen 25.000 und 30.000 humane Gene gibt. Diese Gene dienen als Blaupause für mehr als 100.000 verschiedene Proteine der menschlichen Zelle, die außerdem noch durch vielfältige chemische Modifikationen verändert sein können. Damit diese

Vielfalt der Proteine spezifische Aufgaben in der menschlichen Zelle abdecken kann, muss das Zusammenspiel der Proteine präzisen Regeln folgen. Tatsächlich sind die Wechselwirkungen von Proteinen untereinander und mit anderen Molekülen sehr selektiv. Die präzisen Erkennungsmechanismen, die sich Proteine zu Nutzen machen, erlauben die Zusammenlagerung von Proteinen und anderen Molekülen zu sog. molekularen Maschinen, die mehrere Dutzend Proteine umfassen können [1].

Protein-Protein Interaktionen spielen nicht nur bei molekularen Maschinen eine Rolle, sondern auch bei mechanisch belasteten Proteinkomplexen, z.B. dem Cytoskelett der Zelle oder auch vorübergehenden Proteinkomplexen, die sich z.B. bei der Signalwandlung in der Zelle bilden. Die Signalwandlung spielt eine zentrale

Rolle bei Wachstumsvorgängen und ist bei einer Reihe von Krankheiten, wie Krebs, gestört. Um die Mechanismen wichtiger zellulärer Vorgänge und ihre Störung bei Krankheiten besser verstehen zu können, benötigen Grundlagen- und Pharmaforschung daher leistungsfähige Detektionssysteme für Protein-Protein Interaktionen.

Interaktions-Screeningsysteme

Über die letzten Jahre wurde eine Reihe von Detektionssystemen für Protein-Protein Interaktionen entwickelt. Dazu zählen *in vitro* Methoden, die Proteine durch biophysikalische Methoden testen (z.B. durch Plasmonresonanz) oder die Aufreinigung von Proteinkomplexen aus Zellen mit anschließender massenspektrometrischer Erkennung der Proteinbestandteile. Es gibt aber auch *in vivo* Systeme, die Interaktionen in lebenden Zellen detektieren können, wie genetische Screeningsysteme, von denen das klassische Zweihybridsystem am gebräuchlichsten ist.

Genetische Screeningsysteme für Protein-Protein Interaktionen exprimieren interagierende Proteine in einem Modellsystem, wie z.B. eukaryontischen Hefezellen, und nutzen damit

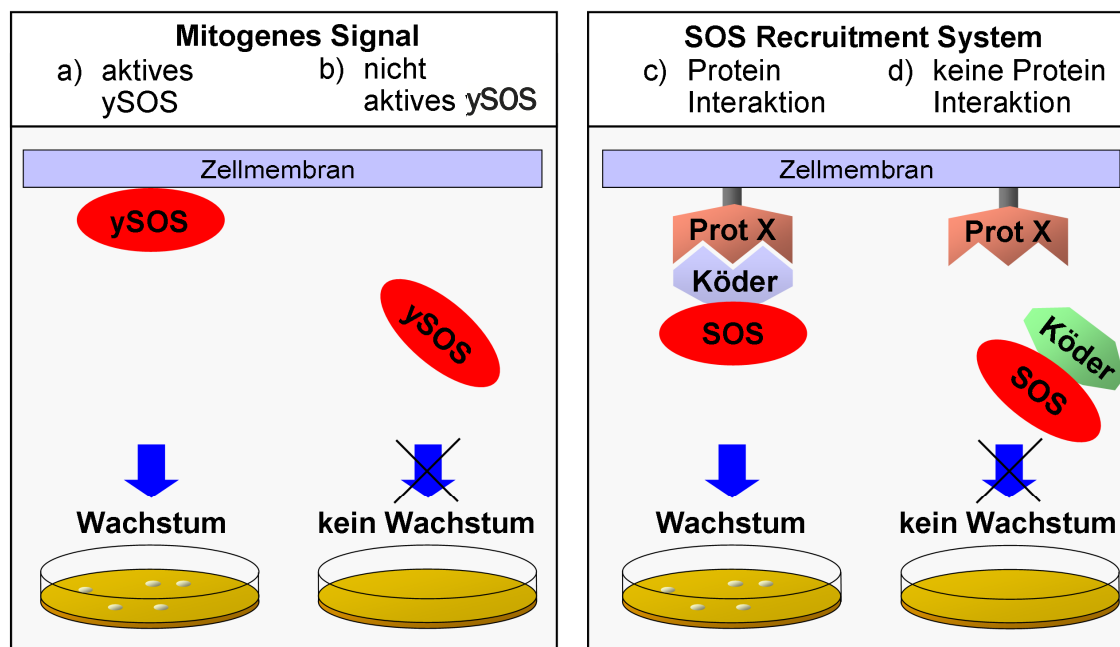


Abb. 1: Selektionsmechanismus eines cytoplasmatischen Interaktions-Screeningsystems. Das Sos Recruitment System ist ein Beispiel für ein cytoplasmatisches Screeningsystem. Linker Teil der Abbildung: a) Das Hefe SOS-Protein (ySOS) ist Teil des RAS-Signalwegs und ist als aktives Protein membranständig. B) Unterbleibt diese Membranständigkeit von SOS, so kann das SOS-Protein an der Signalweiterleitung nicht mehr teilnehmen und das Wachstumssignal wird unterbrochen. Rechter Teil der Abbildung: c) das SOS Protein wird durch Protein-Protein Interaktion an die Membran gebracht. Dazu wird ein Interaktionspartner („Köder“) mit SOS fusioniert und der andere („Prot X“) über einen Lipidrest an der Membran verankert. Eine ProtX-Köder Interaktion bringt das fusionierte SOS Protein an die Membran, wo es das Wachstumssignal auslösen kann. Es wachsen Hefezellen, die ein interagierendes Proteinpaar enthalten. d) können Prot X und Köder nicht interagieren unterbleibt die Membranlokalisierung von SOS und das Wachstumssignal bleibt aus.

die natürlichen zellulären Bindungsbedingungen. Durch die kontrollierte, rekombinante Expression der Proteine aufgrund ihrer Gensequenzen können auch Proteine untersucht werden, die in menschlichen Zellen in nur geringer Menge vorkommen.

Diese *in vivo* Screeningsysteme unterliegen jedoch einer natürlichen Variabilität und speziell das ursprüngliche Zweihybridsystem hat Einschränkungen bezüglich der Relevanz der identifizierten Interaktionen (hohe Rate falsch-positiver Signale) und weist Limitierungen bei der Detektierbarkeit von Interaktionen auf. Aus diesem Grund wurden alternative Screeningsysteme für Protein-Protein Interaktionen entwickelt, die diese Nachteile umgehen.

Cytoplasmatische Screeningsysteme

Das erste alternative Screeningsystem für Protein-Protein Interaktionen, das im Cytoplasma von Hefezellen funktioniert, wurde von Ami Aronheim zusammen mit dem Autor im Labor von Michael Karin (University of California, San Diego) entwickelt [2]. Dieses System, das sog. SOS Recruitment System (SRS), nutzt als Selektionsmechanismus die Aktivierung des RAS-Signalwegs, der für das Hefewachstum essenziell ist. Entscheidende Komponenten dieses Signalwegs (z.B. SOS und RAS) müssen sich in der Nähe der Zellmembran befinden, damit der Signalweg aktiviert werden kann. Diese Tatsache macht sich das SRS zu Nutze. Bei einem Paar interagierender Proteine wird ein Protein über einen Membrananker an die Membran gebracht. Der andere Partner wird

an eine Signalkomponente, in diesem Fall das Protein SOS gekoppelt. Interagieren die beiden zu testenden Proteine miteinander, so wird das fusionierte SOS-Protein in Membrannähe gebracht und aktiviert den Signalweg. Als Folge wachsen diejenigen Hefezellen, die ein interagierendes Proteinpaar enthalten.

Durch diese neuartigen Selektionssysteme ist es möglich auch Proteininteraktionen zu untersuchen, die für das Zweihybridssystem nicht zugänglich sind, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die selbst das Selektionssystem dieses Screeningsystems aktivieren können. In einer Reihe von Interaktionsscreenings verschiedener Arbeitsgruppen sowie in Test-Screenings unserer Forschungsgruppe zeigte sich außerdem, dass das SRS eine sehr geringe Häufigkeit von falsch-positiven Signalen erzeugt und damit hoch signifikant Bindungspartner identifizieren kann. Außerdem konnten mit diesem System Interaktionspartner identifiziert werden, die trotz vorangegangener intensiver Analyse mit Zweihybrid Screeningssystemen nicht identifiziert worden waren. Dies zeigt, dass genetische Interaktions-Screeningsysteme, die einen cytoplasmatischen Selektionsmechanismus nutzen, eine Reihe von Vorteilen gegenüber klassischen Screeningssystemen besitzen. Dies führte zu einer Reihe von Weiterentwicklungen, wie dem Ras-Recruitment-System [3] und Variationen dieser beiden Systeme [4].

Anwendung im Vordergrund

Die Gruppe Protein-Interaktionsanalyse hat die Erfahrung mit genetischen Screeningsystemen genutzt und eigene, neue Screeningverfahren entwickelt. Dabei stand immer im Vordergrund, dass die entwickelte Technologie einen hohen Kundennutzen aufweist und ausgeprägte Alleinstellungsmerkmale aufweisen sollte. Es wurden intensive Gespräche mit potenziellen Kunden

aus der Pharmaforschung geführt und durch frühe Kooperationsprojekte die Nähe zur Anwendung im Pharmabereich gesucht. Mit diesem Feedback gerüstet konnte die Forschungsgruppe Protein-Interaktionsanalyse zielgerichtete Technologieentwicklung betreiben, die ungedeckte Bedürfnisse in der Pharmaforschung deckt. Diese Vorgehensweise begann anfangs mit der Entwicklung von Screeningsystemen zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen und wurde dann ausgedehnt auf das *in vivo* Peptid-Screening, mit dem es möglich war Wirkstoff-Vorstufen zu identifizieren. Diese eigene Technologieplattform konnte dann in der letzten Forschungsphase am Forschungszentrum caesar für den Aufbau einer eigenen Drug Discovery Pipeline im Bereich Anti-Infektiva genutzt werden.

Automatisierung

In vivo Screeningsysteme nutzen lebende Zellen, um das Bindungsverhalten von Proteinen und Peptiden unter natürlichen Bedingungen zu analysieren und relevante Bindungspartner aus Millionen von Kandidaten herauszufinden. Dieser Vorteil wird allerdings gemindert durch die natürliche Variabilität von Zellen, die unterschiedlich stark auf verschiedenartige Umwelteinflüsse reagieren. Wichtig für zuverlässige Screeningergebnisse sind daher kontrollierte Bedingungen und die strikte Beachtung von Methoden des Qualitätsmanagements, um während der verschiedenen Phasen eines Screenings reproduzierbare Bedingungen aufrecht zu erhalten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden eine Reihe neuer experimenteller Protokolle entwickelt, standardisierte Ablaufprozeduren (Standard Operating Procedures, SOPs) entworfen und eingehend getestet. In den entwickelten Screeningverfahren werden in jedem Einzel-Screening mehrere Millionen Interaktionskandidaten gleichzeitig getestet,

und über mehrere Stufen werden die Kandidaten „ausgesiebt“, die definierte Spezifitätskriterien erfüllen. Dazu ist es erforderlich, dass jederzeit die einzelnen Kandidaten und ihre Datenprofile verfolgt, verwechslungssicher aufgenommen, abgespeichert und elektronisch verarbeitet werden. Für diese Aufgabe wurde ein eigenes Datenverarbeitungssystem entwickelt, ein sogenanntes Laboratory Information Management System (LIMS). Dieses LIMS erlaubt das Datenmanagement mehrerer gleichzeitig durchgeführter Screenings und hat Schnittstellen zu den menschlichen Bedienern (Netzwerk-Client) und zu den robotischen Geräten und Datenaufnehmern (z.B. Strichcode-Scanner).

Um eine lückenlose Datenaufnahme vom Beginn bis zum Ende eines jeden Screenings zu erreichen und fehlerbehaftete menschliche Interventionen zu minimieren, wurden halb und vollautomatische Schritte eingeführt, die von spezialisierten Robotern durchgeführt werden. Dabei war ebenfalls eine enge Zusammenarbeit mit den jeweiligen Robotherstellern notwendig. Ergebnis ist ein Screeningsystem mit ausgefeilten biologischen Protokollen, leis-



Abb. 2: Robotik für konsistente Ergebnisse. Um reproduzierbar und Ressourcen-schonend Interaktions-Screenings durchführen zu können setzt die Gruppe Protein-Interaktionsanalyse Robotik ein. Der gezeigte Picking- und Stempelroboter kann unter sterilen Bedingungen Kulturen aufnehmen und mit hohem Parallelisierungsgrad übertragen. Dazu dient ihm ein Arbeitskopf mit rasterförmig angeordneten Stiften (Bildmitte).

tungsfähiger Datenverarbeitung und modularer Robotik, die auch für zukünftige Bedürfnisse gerüstet ist.

Kundenprojekte

Der Bezug zur Anwendung wurde über die gesamte Laufzeit der Forschungsgruppe dadurch aufrecht erhalten, dass Kooperationen mit großen pharmazeutischen Unternehmen und einer Reihe von Biotech-Firmen durchgeführt wurden. In der ersten Kooperation mit der Schering AG (Start 2004), wurde eine Proteinkinase aus dem onkologischen Bereich untersucht. Die Analyse dieser Proteinkinase ergab ein Netzwerk aus Interaktionskandidaten, die ihrerseits funktionell verknüpft waren. Mehrere Interaktionspartner konnten mit bioinformatischen Methoden funktionellen Gruppen zugeordnet werden (funktionelles Clustering), die nahelegen, dass diese Proteine in gleichen oder nahe verwandten Proteinkomplexen vorliegen.

Doch auch andere Projekte mit Top20 Pharmaunternehmen, wie Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development (Beerse, Belgien) konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Auch hier war die Analyse eines onkologischen Targetproteins erfolgreich. Die Entwicklung des Peptid-Screeningsystems erfolgte hingegen mit zwei innovativen Biotechnologie-Unternehmen. Mit der Ligand Pharmaceuticals (San Diego, USA) wurde ein *in vivo* Peptid-Assay entwickelt. Darauf folgte die Entwicklung eines eigenen Peptid-Screening Systems, dessen Validierung ebenfalls in einer Kooperation (mit Phylogica Ltd, Perth, Australien) stattfand. In dieser Kooperation wurde mit einem Target der Phylogica ein Peptidscreening durchgeführt. Das Ergebnis der Kooperation mit der Phylogica waren Peptid-Liganden, von denen einer eine starke biologische Aktivität zeigte (Neuroprotektion in einem zellulären Apoptose-Test). Das erfolgreiche Peptid-Screening soll

jetzt in einer strategischen Allianz mit der Phyllogica gemeinsam vermarktet werden.

Eigene Projekte

Der Entwicklung des *in vivo* Screeningsystems für Peptide kommt deswegen besondere Bedeutung zu, weil sich damit das Tor zu eigenen Wirkstoffkandidaten auftut. Peptide unterscheiden sich von den häufig verwendeten kleinen Verbindungen („small molecules“) dadurch, dass sie für die Bindung an ein krankheitsrelevantes Protein keine tiefen Taschen benötigen. Dies ist besonders dann interessant, wenn Proteine moduliert werden sollen, die allgemein als „undruggable“ gelten, also nicht durch kleine Verbindungen angreifbar sind. Besonderer Bedarf an innovativen Wirkstoffen besteht bei der Therapie von viralen Infektionskrankheiten. Hier kommt es aufgrund der großen Wandlungsfähigkeit von Viren schnell zur Ausbildung resistenter Stämme. Der Grund liegt in der hohen Mutationsrate des Virusgenoms und der Tatsache, dass Einzelmutationen am entsprechenden Targetprotein zum Verlust der Medikamentenwirksamkeit führen können. Derzeit wird in der HIV-Therapie versucht, durch Kombination mehrerer Wirkstoffe dieses Problem in den Griff zu bekommen [5].

Die eigene Wirkstoffforschung konzentriert sich auf Wirkstoffe, die die Periode der Resistenzfreiheit signifikant verlängern können. Da HIV nur 9 Proteine besitzt, nutzt das Virus eine Reihe von Wirtsmechanismen, um sich zu vermehren und die Wirtsabwehr zu unterlaufen. Der Ansatz zur Verlängerung der Resistenzfreiheit zielt auf die Schnittstelle zwischen viralen Proteinen und essenziellen Wirtsproteinen, die mit den viralen Proteinen interagieren. In eigenen Interaktionsscreenings wurden über 20 humane Wirtsproteine identifiziert, die mit einem viralen HIV-Protein interagieren können.

Die Bindung der meisten Wirtsproteine an das virale Protein konnte durch unabhängige biochemische Interaktionstests bestätigt werden.

Diese potenziellen humanen Targets zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich nicht verändern, da das menschliche Genom sehr stabil ist. Das weitere Vorgehen zielt nun auf funktionelle Bestätigung der neuen Wirtsfaktoren durch HIV-Proliferationstests.

In einem zweiten Ansatz wurden mehrere Peptide identifiziert, die das virale Target spezifisch binden können. Hierzu wurde das eigene *in vivo* Peptid-Screeningsystem verwendet. Die identifizierten Peptide werden gegenwärtig auf ihr Hemmpotenzial für die Virusvermehrung getestet.

Ausgründung und Finanzierung

Neben der Entwicklung der technologischen Plattform und der Erreichung wissenschaftlicher Ziele war die Erarbeitung eines tragfähigen Geschäftskonzeptes eine wesentliche Voraussetzung für die Gründung des Start-Up Unternehmens Nexigen. Deshalb wurde im Mai 2007 mit der Erstellung eines Business-Planes durch eine Gruppe von Wissenschaftlern begonnen. Diese Arbeiten wurden durch einen erfahrenen Business-Berater unterstützt. In Übereinstimmung mit den durchgeführten Forschungsaktivitäten der Arbeitsgruppe wurde ein Konzept erarbeitet, dass auf der Durchführung von eigenen Wirkstoffprojekten und der Nutzung der patentgeschützten Technologie für Dienstleistungsprojekte beruht. Neben der detaillierten Analyse des Marktes und Wettbewerbes für die Wirkstoff- und Dienstleistungsprodukte, sowie einer belastbaren Finanzplanung erfolgte im Rahmen dieser Planungsphase auch die kritische Diskussion von Geschäftsrisiken des Projektes sowie die Suche nach strategischen Lösungen. Insgesamt kann festgestellt werden, dass dieser Abschnitt ganz

wesentlich dazu beigetragen hat, dem Team **Literatur**

an Wissenschaftlern grundlegende unternehmerische Voraussetzungen für die Durchführung eines Gründungsvorhabens zu vermitteln. Im August 2007 erfolgte die Gründung der Nexigen GmbH durch ein Team von vier Wissenschaftlern der Arbeitsgruppe Protein-Interaktionsanalyse und dem Business-Angel. Auf der Grundlage des Businessplanes wurde Investoren angesprochen, um die finanziellen Voraussetzungen für die operative Geschäftstätigkeit der Firma für die ersten zwei Jahre sicherzustellen. Die Vorstellung des Projektes und die Gespräche mit Investoren der Branche führten in wichtigen Punkten zur weiteren Verbesserung und Optimierung des Geschäftsmodells. Aufgrund des Finanzbedarfes wurden verschiedene Möglichkeiten geprüft, geeignete Investorenkonsortien zusammenzustellen. Im November 2007 gelang als Ergebnis intensiver Bemühungen der entscheidende Kontakt zur Santo Holding Deutschland GmbH. Zusätzlich konnte als wichtiger Meilenstein die 4SC AG als strategischer Partner für das Ausgründungsprojekt gewonnen werden. In der zukünftigen Zusammenarbeit liegen für beide Firmen entscheidende Vorteile in der Nutzung der komplementären Technologieplattformen. Darüber hinaus stellt die Möglichkeit der Kooperation mit diesem erfolgreichen Biotech-Unternehmen einen besonders großen Gewinn für die Nexigen GmbH dar. Die Anwerbung der genannten Investoren konnten nach Vertragsverhandlungen mit der Unterzeichnung eines Investment- und Beteiligungsvertrages im April 2008 erfolgreich abgeschlossen werden. Damit wurden die wesentlichen Voraussetzungen für den operativen Start der Firma als Ausgründung der Stiftung caesar geschaffen, und das Ziel des im Jahr 2002 begonnenen Projektes konnte vollständig erreicht werden.

1. Steitz T. A., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9 (2008), 242-53.
2. Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge S. J., and Karin M., Molecular and Cellular Biology 17 (1997), 3094-3102.
3. Broder Y. C., Katz S., and Aronheim A., Curr. Biol. 8 (1998), 1121-1124.
4. Kruse C., Hanke S., Vasiliev S., and Hennemann H., Signal Transduction 6 (2006), 198-208.
5. Lagnese M., and Daar E. S., Expert. Opin. Pharmacother. 9 (2008), 687-700.

Individualisierung in der Medizintechnik am Beispiel des patientenindividuellen Knochenersatzes

Prof. Dr. Hermann Seitz
Arbeitsgruppenleiter Rapid Prototyping
Lehrstuhl für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik, Universität Rostock

Moderne generative Fertigungsverfahren ermöglichen die Herstellung dreidimensionaler Modelle, Komponenten und Produkte direkt aus CAD-Daten. Speziell im Bereich der Medizintechnik bietet sich der Einsatz dieser Verfahren zur Herstellung von patientenspezifischen Hilfsmitteln und Medizinprodukten wie Hörgeräten oder Bohrschablonen für die Implantat-Setzung an. Mit Hilfe der 3D-Drucktechnologie lassen sich maßgeschneiderte Knochenimplantate herstellen, die als Stützgerüst für das Tissue Engineering von Knochen eingesetzt werden können.

Vom Rapid Prototyping zum Rapid Manufacturing

Das so genannte *Rapid Prototyping* entwickelte sich vor mehr als 15 Jahren. Dreidimensionale Bauteile werden dabei direkt auf Basis von CAD-Modellen aus formlosem Stoff schichtweise aufgebaut. Zu den bis heute entwickelten und verwendeten hochtechnisierten RP-Verfahren gehören unter anderem das Stereolithografische Verfahren (STL), das (selektive) Lasersintern (SLS), das Laminated Object Manufacturing (LOM), das Fused Deposit Modeling (FDM), das Solid Ground Curing (SGC), das 3D-Printing sowie Multi Jet Modeling [1]. Sämtlichen Verfahren ist der generelle Ansatz des schichtweisen, d. h. generativen Aufbaus von Bauteilen gemeinsam.

Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich in der Art der Schichtgenerierung, in dem Material, aus dem das Bauteil gefertigt wird, in der Art der Verbindung der aufeinander folgenden Schichten und darin, wie komfortabel der gesamte Prozess per CAD und Steuerrechner bedient werden kann.

Das Einsatzgebiet der Rapid Prototyping Verfahren hat sich in den letzten Jahren erheblich erweitert. Wurden diese Verfahren ursprünglich zur Herstellung von Anschauungsmodellen

und Funktionsprototypen verwendet, so finden sie heute zunehmend Einsatz bei der direkten

Herstellung von Einzelstücken und Kleinserien. Für dieses Einsatzgebiet hat sich der Begriff *Rapid Manufacturing (RM)* etabliert. Die Gesamtheit der Rapid Prototyping und Rapid Manufacturing-Verfahren wird heute unter dem Begriff der Generativen Fertigungsverfahren bzw. Rapid Technologien zusammengefasst.

Die Stärken des Rapid Manufacturing kommen insbesondere in der Medizintechnik zum Tragen. Dort wird häufig ein individuelles, auf den Kunden oder Patienten abgestimmtes Produkt verlangt. Die Hörgeräteindustrie hat eine Vorreiterrolle beim Einsatz von Rapid Manufacturing Verfahren zur Herstellung von Ohrpassstücken für Hörgeräte. Mittlerweile wird mehr als 40% der Weltproduktion an Hörgeräteschalen mittels RM-Verfahren hergestellt. So setzten die Firmen Siemens und Phonak das Lasersintern (SLS) und die Firma Widex das Stereolithografische Verfahren (STL) zur Produktion von Hörgerätegehäusen ein.

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Etablierung der RM-Verfahren im Bereich der Medizintechnik stellt die Fertigung von Bohrschablonen für die rechnergestützte Planung von Implantaten dar. Die Firma Materialise stellt diese

passgenauen Bohrschablonen auf Grundlage von computertomografischen Aufnahmen des Patienten mit Hilfe des Stereolithografischen Verfahrens her.

Die Einsatzmöglichkeiten der RM-Verfahren zur Einzel- und Kleinserienfertigung von Medizinprodukten gehen über die besprochenen Beispiele weit hinaus. So wird derzeit beispielsweise intensiv an dem Einsatz der RM-Verfahren zur Herstellung von patientenindividuellen Knochenersatzimplantaten gearbeitet.

Rekonstruktion knöcherner Defekte

Um Knochendefekte nach Unfällen oder Tumoroperationen zu überbrücken, gilt immer noch die Verwendung von körpereigenem Knochen als Gold-Standard. Eine andere Möglichkeit der Defektfüllung ist die Verwendung von humanen Spenderknochen, Knochen tierischen Ursprungs oder synthetischen Materialien. Bei humanen oder tierischen Knochen kann jedoch eine Krankheitsübertragung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Verwendung eigenen Knochengewebes zieht immer die Risiken einer zweiten Operation nach sich.

Daher werden von medizinischer Seite zunehmend synthetische Knochenersatzmaterialien gefordert. Diese sind jedoch bisher nur in Standardformen und -größen erhältlich. Bei größeren Defekten, speziell im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, ist eine individuelle Formgebung der Implantate zur Rekonstruktion der ursprünglichen Funktion und Ästhetik erforderlich.

Aus diesem Grund besteht ein hoher klinischer Bedarf an neuartigen, stabilen, resorbierbaren *Scaffolds* als Knochenersatz, die aus synthetisch hergestellten Rohstoffen gefertigt werden [8]. Um eine ideale Defektrekonstruktion zu ermöglichen, sollten diese Scaffolds an die Defektstelle des Patienten angepasst sein. Diese

Scaffolds sollen mit körpereigenen Zellen besiedelt werden und nach Einbringung in einen Knochendefekt als osteokonduktive Leitstruktur dienen. Während die Leitschiene langsam abgebaut wird, soll sich an dieser Stelle gleichzeitig neuer Knochen ausbilden.

Knochenersatz aus dem 3D-Drucker

Im Bereich der Generativen Fertigungsverfahren gewinnen in letzter Zeit in zunehmendem Maße 3D-Druck-Verfahren an Bedeutung, die auf den bekannten Tintendrucktechniken basieren. Dies hat verschiedene Gründe: zum einen lassen sich im 3D-Druck-Verfahren verschiedenste pulverförmige Materialien verarbeiten und somit neue 3D-Druck-Prozesse relativ einfach gestalten, zum anderen sind Tintenschreibwerke gegenüber der bei RP-Verfahren häufig eingesetzten Lasertechnik sehr preiswert.

Beim 3D-Druck-Verfahren handelt es sich um einen pulverbasierten Prozess zur Herstellung von Modellen direkt aus Computerdaten [3]. Dabei werden dünne Schichten eines Pulvers auf eine Grundplatte aufgebracht, die dann durch gezielte Binderzugabe entsprechend des aktuellen Bauteilquerschnitts verfestigt werden. Der Binder wird tröpfchenweise mittels eines Druckkopfs aufgetragen. Das Baumaterial besteht aus dem gebundenen Pulver. Das lose Pulver übernimmt die Stützfunktion und wird nach dem Prozessende entfernt. Bei dem bei der Stiftung caesar etablierten 3D-Druckprozess zur Herstellung keramischer Implantate [2] resultiert aus dem 3D-Druckverfahren ein Rohling (Grünteil), der in einem weiteren Schritt bei einer Temperatur von ca. 1.250 °C gesintert wird. Dadurch wird eine hohe Endfestigkeit erreicht. Zudem werden bei diesem Schritt die beim 3D-Drucken eingesetzten organischen Binderkomponenten vollständig ausgebrannt.

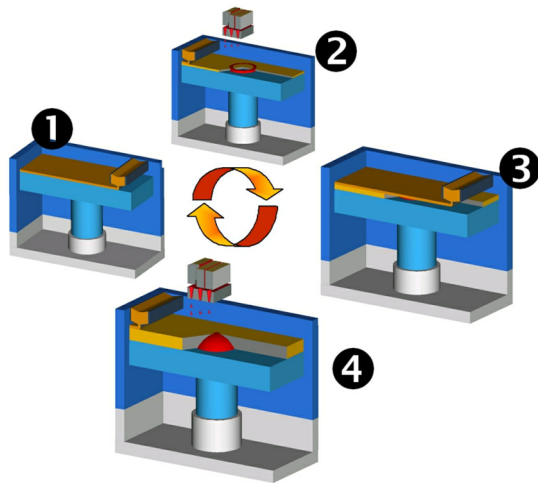


Abb. 1: 3D-Druck-Prozessschema.

Materialien

Als Ausgangsmaterial im 3D-Druckprozess wird derzeit Hydroxylapatit (HA) verwendet, das sich bereits in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie zum Ersatz von Knochenarealen bewährt hat. Hydroxylapatit ist der mineralische Hauptbestandteil des Knochens. Dieser Ausgangsstoff ist bekannt für seine gute Biokompatibilität und besitzt eine hohe Osteokonduktivität. HA-Werkstoffe werden aus boviner Spongiosa oder Korallen durch Pyrolyse und Sinterprozesse gewonnen oder synthetisch hergestellt. Für den Einsatz beim 3D-Drucken wird synthetisches HA verwendet, das in Pulver- oder Granulatform vorliegen muss. Um die für den Prozess benötigte Fließfähigkeit zu erhalten, wird das Hydroxylapatit mittels Granulierungsverfahren modifiziert [7]. Als Binderflüssigkeit für das 3D-Drucken kommt eine Polymerlösung zum Einsatz.

Datenaufbereitung

Ein wichtiger Aspekt bei der Herstellung patientenindividueller Implantate für das Tissue Engineering von Knochen ist die Generierung des Datensatzes für das herzustellende Implantat (siehe Abb. 2). Da speziell bei Schädel-Rekonstruktionen komplexe Formen vorliegen,

können keine vordefinierten Standardgeometrien verwendet werden. Deshalb muss hier auf medizinische Patientendaten zurückgegriffen werden. Dazu wird der Schädel des Patienten in einem Computertomographen gescannt. Der resultierende zweidimensionale Datensatz wird mit Hilfe einer speziellen Segmentierungssoftware in ein dreidimensionales Oberflächenmodell umgewandelt. Die einzelnen Objektregionen können durch Auswahl des entsprechenden Schwellwertes für die Segmentierung unterschieden werden.

Nach der Segmentierung der knöchernen Strukturen werden die Daten in ein weiteres Software-Tool mit CAD-Funktionalität eingeladen. Dort kann z.B. durch Spiegelung eines gesunden knöchernen Bereichs auf den entsprechenden Defektbereich und anschließender Subtraktion der beiden Bereiche die zu fertigende Leitschiene berechnet werden. Zudem eignen sich diese Tools auch zur Konstruktion von Kanalstrukturen in den Leitschienen. Auf Basis des dreidimensionalen Datensatzes kann die Leitschiene mit Hilfe der Rapid Prototyping-Technik gefertigt werden.

Aktueller Stand beim 3D-Drucken von Knochenersatz

Anhand verschiedener Testbauteile lässt sich das Potential des 3D-Druckens zur Herstellung von Leitschienen charakterisieren. Massive, zylinderförmige Bauteile wurden zur Bestimmung der Druckfestigkeit und des Sinterschrumpfs gefertigt. Die Druckfestigkeit der gesinterten Testgeometrie wurde mit $21,2 \pm 2,2$ MPa gemessen. Sie liegt damit zwischen den Druckfestigkeitswerten von humaner Spongiosa und kortikalem Knochen [4]. Durch die Einbringung von Kanalstrukturen verringert sich die erreichbare Festigkeit der Leitschienen. Die hergestellten Konstrukte weisen allerdings genügend mechanische Stabilität auf, um als

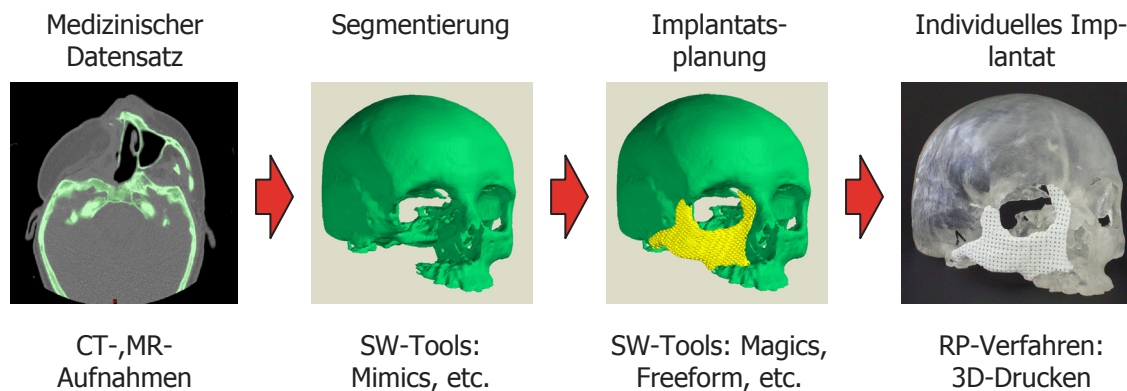


Abb. 2: Datenkette zum Design patientenindividueller Implantate.

Leitschienen für das Tissue Engineering von einem Durchmesser von 565 μm wurde in einen Knochen und als Implantat für Knochenersatz zu dienen. Die Leitschienen sind jedoch nicht ausreichend mechanisch stabil, um große Kräfte an stark beanspruchten Stellen des menschlichen Skeletts aufzunehmen. Bei Einsatz der Leitschienen in stark belasteten Bereichen muss die Stabilität mittels Metallplatten hergestellt werden.

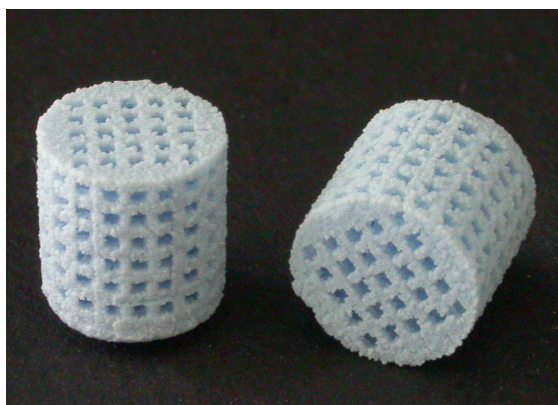


Abb. 3: Testbauteil mit interkonnektierender Kanalstruktur. Die Kanalgeometrien liegen im Bereich von 450 μm .

Um das Einwachsen von Knochenzellen zu erleichtern und die Einheilungszeit der Leitschienen zu verkürzen, sollten die Leitschienen interkonnektierende Kanalstrukturen und bestimmte Porositäten aufweisen. Abb. 5 zeigt ein Testbauteil mit definierten inneren Kanälen. Die mittels der 3D-Druck-Prozesskette erreichbaren minimalen Kanaldimensionen liegen in einem Bereich von 450 μm . Bei Kanälen mit

einer früheren Studie eine gute Knochenintegration festgestellt. Die erreichbare Kanalauföffnung beim 3D-Drucken liegt in diesem Bereich und bietet somit die Voraussetzungen für eine gute Knochenintegration [5].

In Abb. 4 ist ein Beispiel einer patientenindividuellen Leitschiene für einen Defekt im Schädelbereich samt Kunststoff-Schädelmodell zu sehen. Die Außenkontur der Leitschiene wurde auf Basis medizinischer Daten eines Patienten entworfen. Dazu wurde ein Computertomographie-Datensatz entsprechend der beschriebenen Datenkette aufbereitet und die Leitschiene mittels 3D-Drucken gefertigt. Das dargestellte Beispiel zeigt sehr gut die Möglichkeiten zur Herstellung individueller, passgenauer Leitschienen mittels 3D-Drucken auf. Voraussetzung für den Einsatz solcher Leitschienen im menschlichen Körper ist der Abschluss aller derzeit laufenden und geplanten Voruntersuchungen im Labor und im Tier.

Biologische Untersuchungen

Für den Einsatz der Leitschienen als Knochenersatzimplantat im menschlichen Körper ist der Nachweis der Biokompatibilität der Leitschienen von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurden entsprechende Versuche (Zytotoxizitätsassay) durchgeführt [6]. Dabei wurde auch das Wachstumsverhalten der Zel-



Abb. 4: Beispiel einer patientenindividuellen Leitschiene für einen Defekt im Schädelbereich samt passendem Kunststoff-Schädelmodell.

len auf den Leitschienen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die keramischen Leitschienen keine Toxizität aufweisen, und es konnte eine deutliche Zunahme der Zellen über den Kultivierungszeitraum festgestellt werden. Laufende Untersuchungen beschäftigen sich mit der Differenzierung von menschlichen mesenchymalen Stammzellen in Richtung der osteoblastären Zelllinie. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Etablierung eines geeigneten Tiermodells zur Untersuchung der Knochenheilung von großen Defekten [9] und die entsprechende Untersuchung des Verhaltens der Leitschienen im autologen System.

Ausblick

Die Fertigung von Leitstrukturen für das Tissue Engineering mittels Rapid Prototyping-Verfahren bietet ein großes Potential. Die Vielfalt an bekannten Rapid Prototyping-Verfahren und die breite Auswahl an einsetzbaren Materialien aus dem Bereich Keramik und Polymer bilden dabei die wesentlichen Merkmale. Darüber hinaus gibt es jedoch noch weitere Ansätze zur Optimierung der Prozesskette zur Her-

stellung von Leitschienen. So können durch Aufbringen von spezifischen Peptiden und Wachstumsfaktoren auf die gefertigten Leitstrukturen und durch biomimetische Oberflächenveränderungen das Differenzierungsverhalten und die Syntheseleistung der aufgebrachtten Zellen verbessert werden. Somit können einerseits die Gewebequalität verbessert und andererseits die Kultivierungszeit verkürzt werden.

Diese Bereiche wurden speziell im Zusammenhang mit Leitschienen, die mittels Rapid Prototyping-Verfahren gefertigt wurden, bislang nur unzulänglich untersucht und bilden einen Schwerpunkt zukünftiger Forschungsaktivitäten.



Literatur

1. Wohlers T., Wohlers report 2007. Fort Collins, CO, Wohlers Associates, (2007).
2. Seitz H., Rieder W., Irsen S., Leukers B., and Tille C. J., Biomed. Mater. Res. 74B (2005), 782–788.
3. Sachs E., Cima M., Williams P., Brancazio D., and Cornie J., J. Eng. Ind. 114 (1992), 481–488.
4. An Y. H., in: An Y. H., Draughn R. A., eds. Mechanical testing of bone and the bone–implant interface. Boca Raton, FL: CRC Press, (2000), 41–63.
5. Gauthier O., Bouler J.-M., Aguado E., Pilet P., and Daculsi G., Biomaterials 19 (1998), 133–139.
6. Leukers L., Güllkan H., Irsen S., Milz S., Tille C., Schieker, M., and Seitz H., J. Materials Science: Materials in Medicine 16 (2005), 1121–1124.
7. Irsen S., Leukers B., Höckling C., Tille C., and Seitz H., Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 37 (2006), 533–537.
8. Schieker M., Seitz H., Drosse I., Seitz S., and Mutschler W., European Journal of Trauma, 32 (2006) 114–124.
9. Drosse I., Volkmer E., Seitz S., Seitz H., Zahn K., Penzkofer R., Matis U., Mutschler W., Augat P., and Schieker M., Tissue Engineering, (2008) (in print).

Nanoparticle Technology

Prof. Dr. Michael Giersig

Arbeitsgruppenleiter Nanoparticle Technology
 Helmholtz Center Berlin for Materials and Energy

One main goal of nanotechnology is the preparation of nanometer-sized semiconductor, metallic, magnetic, and organic particles followed by the creation of periodically-ordered nanostructures (1-D, 3-D) based on single nanoparticles. A small particle size implies high sensitivity and selectivity. These new effects and possibilities are mainly due to the increasing ratio of surface to volume atoms in low-dimensional systems. One important factor was and is the realization of components, new functionalities and characteristics for the improvement of existing products or the development of new products and application options in magnetics, electronics, and medicine, based solely on the nanoscale.

Inorganic Colloids

Scaling down devices of technological interest

while preserving their full capacities is one of the challenges nanotechnology faces. Colloid chemistry allows for the production of sophisticated nanoparticles that can be used as building blocks for the development of advanced devices.

The preliminary requirement for the successful development of sophisticated nanoparticles is the control over size, shape, and crystalline modification of the nanoparticles, as well as

their composition in the case of alloys. Many transition metal particles tend to be highly sensitive towards surface oxide formation. A proper understanding of the electronic and magnetic properties of nanoscale objects is impossible without adequately considering their

surface and, in particular, their surface chemical state.

Many colloid chemical routes have been developed in recent years. Syntheses of different metallic particles have been successfully performed by electrochemical reduction, chemical reduction by Li, hydroborides, or polyols of metal salts, and by thermal decomposition of zero-valent metal-organic compounds in organic solvents. The following figure shows one example of metal nanoparticles with a narrow size distribution.

Monodisperse concentrated nanoparticle fluids can easily be assembled into highly-ordered 2- and 3-dimensional structures (Figure 2). The assembling can be improved by the use of external forces, e.g. magnetic forces in the case of magnetic nanoparticles. The influence

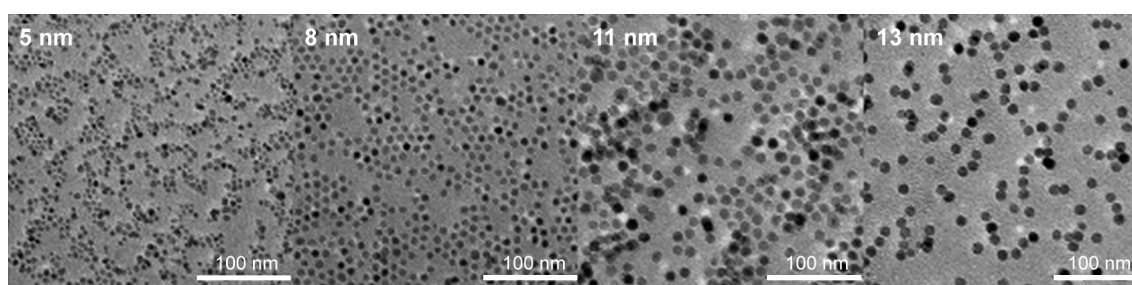


Figure 1: TEM image of spherical monodisperse iron nanoparticles with sizes of 5, 8, 11 and 13 nm, respectively, obtained by colloid chemistry. Scale bar is 100 nm.

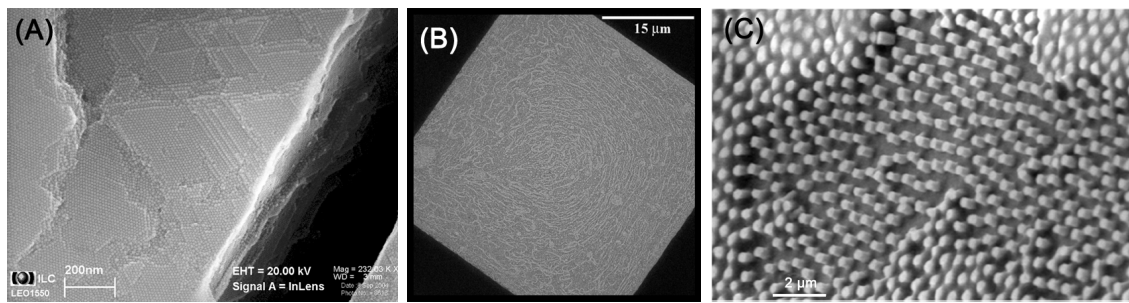


Figure 2: (A) SEM image of a self-assembled 3-dimensional crystal of monodisperse Co particles. (B) TEM image of a Co particle film dried in a rotating magnetic field. (C) SEM images of pillars obtained by drying a Co colloid in an external magnetic field applied perpendicular to a substrate.

of external magnetic forces, applied rotating or perpendicular to a substrate, on the assembled structure is depicted in Figures 2B and 2C, respectively [1].

Superstructures by Nanosphere Lithography (NSL)

There are some applications that cannot be realized by the assembly of inorganic colloids. One reason is the limitation of perfectly ordered nanostructures to about one micron squared. Another reason results from the question: "How can we arrange highly-ordered nanoparticles on substrates having a distance larger than 100 nm?" To overcome those problems, a lithographical technique applying organic colloids – the so-called Nanosphere Lithography (NSL) – has been further optimized.

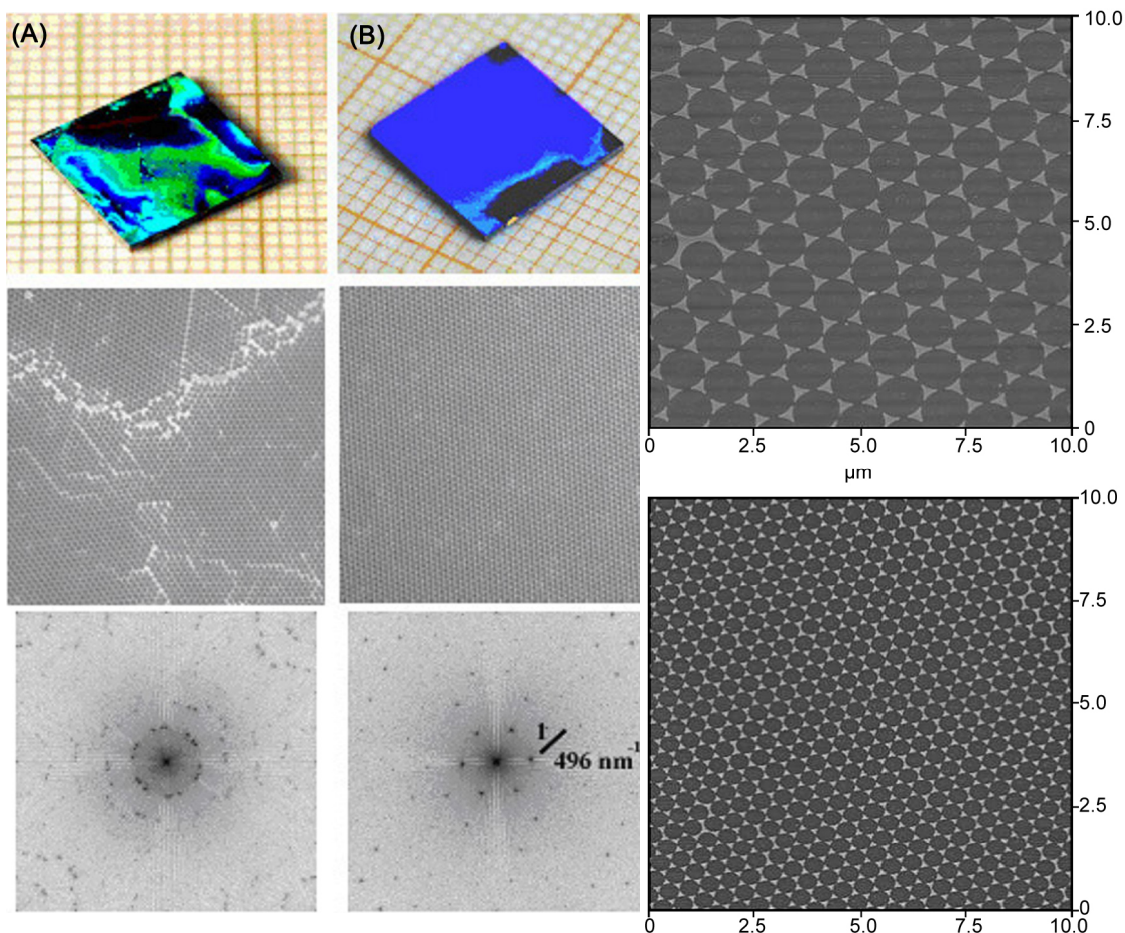


Figure 3: Defect-rich (A) and defect-free (B) particle masks (left). Metal islands after evaporation and mask removal (right).

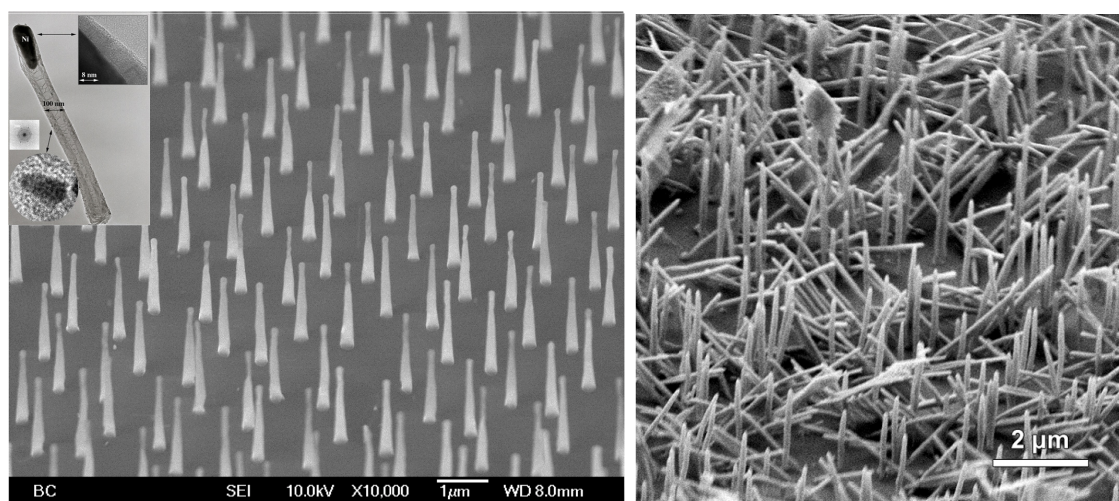


Figure 4: SEM images of CNTs (left) and ZnO rods (right) grown perpendicular on a substrate.

The formation of monolayers of self-assembled mechanical force-improved LB-assembly), colloidal particles (mainly polystyrene and silica submicron-sized, monodisperse spheres) is well-established and has been widely used in various fields of research. Well-ordered latex particle films were used, among others, as masks that allow the production of regularly-arranged triangular-shaped structures on almost any substrate. Through the evaporation of different materials through the mask, it is possible to prepare nanosized particles with diverse optical and/or magnetic properties. There are many different monolayer fabrication methods based on electrophoresis, electrostatic deposition, the Langmuir-Blodgett technique, spin-coating, the controlled evaporation of solvents from a solution containing latex particles on a hydrophilic substrate, or non-photolithographic methods.

The main prerequisite for obtaining highly symmetric nanostructured surfaces of large areas by use of NSL is the successful preparation of ordered monolayers of submicron spheres that are free of grain boundaries. To achieve this, we have developed a modified preparation technique based on the deposition of latex particles similar to an LB-film on water. This method, involving surfactant-improved self-assembly on a liquid-gas interface (instead of a

lowed us to obtain large monolayers (a few cm^2) that could be applied directly onto various surfaces. Using this simple fabrication technique, it became possible to prepare monolayers as large as a few cm^2 with grain sizes of 1 mm^2 and above (using latex particles with diameters between 1000 nm and 500 nm) and areas of even $50 \mu\text{m}^2$ without other structural defects (such as point defects). Figure 3 (left) shows one typical result of our modified method (B) in comparison to typical results of other methods (A). The AFM-images (right) show nanostructured surfaces after evaporation of Ni through different masks and further removal of the latex particles by dissolution in

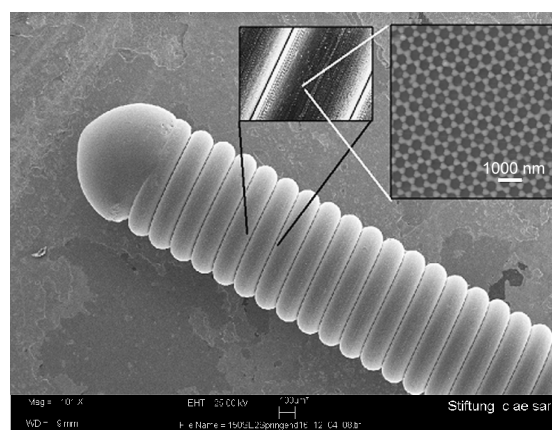


Figure 5: SEM images showing a catheter provided with an array of gold nano-structures (see insets) for further biofunctionalization.

mPEG 2000-urea

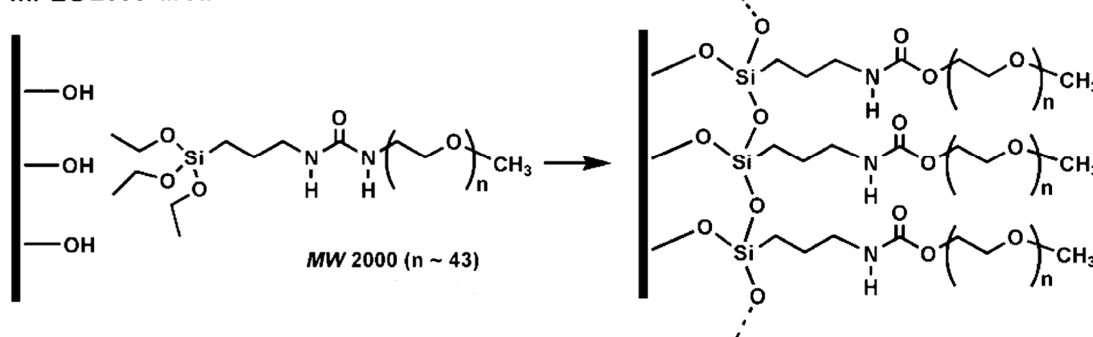


Figure 6: One-step PEGylation of hydrophilic surfaces with triethoxysilane-terminated anchor (according to Blümmel et al., *Biomaterials* (2007) 28, 4739 doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.038).

THF. The hexagonal symmetry of triangular-shaped Ni-islands is clearly visible [2].

Those nanostructured substrates have been successfully used for the growth of hexagonally ordered carbon nanotubes (Figure 4, left) and ZnO rods (right) grown perpendicular on a 1 cm² substrate.

Another component of our studies is the development of new biosensors using nanostructured substrates. This research is mainly focused on the detection of targets by means of bioactive interfaces (nanosensors) designed at the nanoscale. Our goal is to create minimal-invasive interfaces that allow fast diagnosis of organics and cells with a high specificity and sensitivity. This includes the preparation and bio-functionalization of noble metal nanoparticles as detection devices.

Here, we describe a nanobiosensor device conceived to detect the presence of a substance on a metal surface by determining changes in light absorption. When a target molecule binds to a gold nano-island, the metal island changes its optical properties and, thereby, it can act as a sensor. The nanobiosensor design essentially consists of a periodic array of gold nano-“islands” that are equipped with anchor molecules having a –SH tail that bonds to the gold islands and a –COOH head pointing upwards from the surface, to which a macromolecule

(e.g., human IgG) can be attached (see Figure 6).

To prevent/minimize unspecific and unwanted interactions between proteins and inorganic surfaces, it is necessary to passivate the free space between the nanostructures. For our particular experiments, PEG (Polyethylene glycol) is a suitable material because it is biologically inert. For adsorption on the surface, PEG has to be anchored with triethoxysilane.

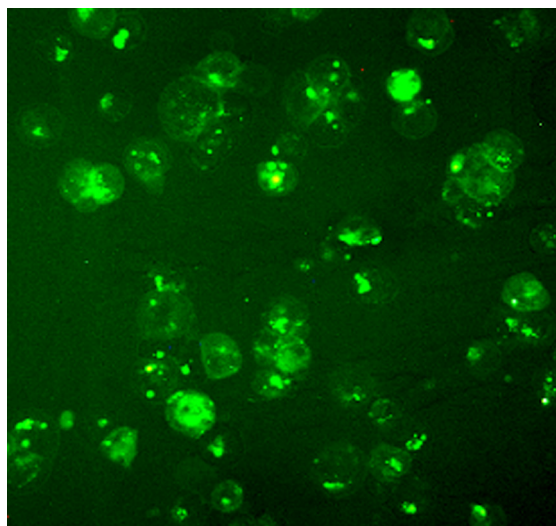


Figure 7: Region of a fluorescence microscopy image showing fetal cells immobilized onto the nanostructured surface of the device depicted in Figure 1. The latter is possible due to the use of antibodies tethered to gold nanostructures via heterofunctional linkers.

To this end, an mPEG-urea solution was prepared as follows: A dry solution of mPEG-amine2000 and 3-IPTS was stirred in DMF for

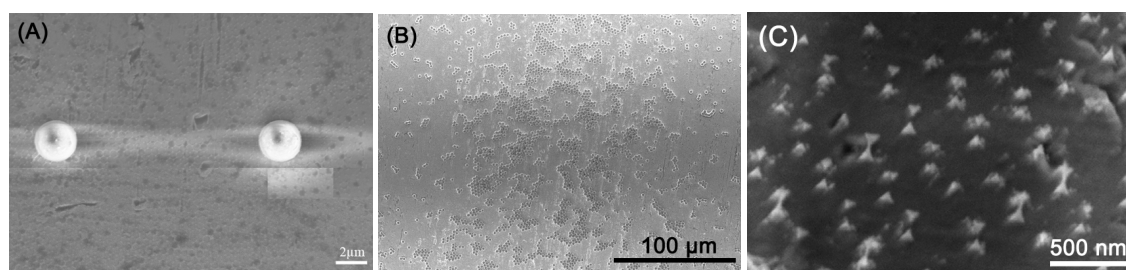


Figure 8: SEM images of magnetic beads attached to the surface of the catheter: (A) Dynabeads Oligo (dT)₂₅ on 5nm-thick Fe nanotriangles, very rare distribution of the magnetic beads, (B) Dynabeads Oligo (dT)₂₅ on a 25nm-thick Fe nanotriangles, very good distribution of the magnetic beads, (C) Anti-FITC Microbeads – triangle thickness: 25 nm.

72 h under N₂-atmosphere. After distillation, based on non-invasive and painless early detection of diseases, priority will be placed on the simplification of the current diagnosis solution was prepared by diluting mPEG2000- methods. Regarding our technology expertise, urea powder in toluol containing triethylamine, we intend to expand into the area of early diagnosis of Alzheimer's disease and other degenerative diseases of the nervous system. Substrates were placed in this solution and heated overnight, allowing the mPEG-urea to self-assemble in a monolayer.

Gold was chosen as the substrate material for another example of an application for the three reasons: (1) its stability in a physiological nanostructured catheter. The main idea of this environment, (2) its well-known surface plasmon resonance (SPR) activity and (3) our experience with gold thiol chemistry and nanosphere lithography (NSL). Depending on the desired target, the application, and the type of particular experiment is to exchange the island-material (gold) against ferromagnetic iron and to attach magnetic beads (previously sensing technique to be used, the sensor can take on any number of configurations - from bonded with antibodies on their surfaces) to the catheters. Three types of commercially-available magnetic beads were used for this experiment: Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (2,8 µm), minimal-invasive devices (catheter/cannula) to Anti-FITC Microbeads (50 nm), Bug Trap noninvasive chips (see Figure 5). Basically, this (various sizes, up to 3 µm).

novel nanobiosensor construction affords bio-sensing, cell trapping and cell immobilization. In the first phase of this project, the main focus was on the detection of markers for prenatal diagnosis (see Figure 7). After having completed a successful prototype, a spin-off company (GILUPI GmbH) was co-founded in 2006.

As we previously stated, our current research focus is on nano-biotechnology with a major emphasis on nano-biomedicine. Since a significant part of tomorrow's medicine will be

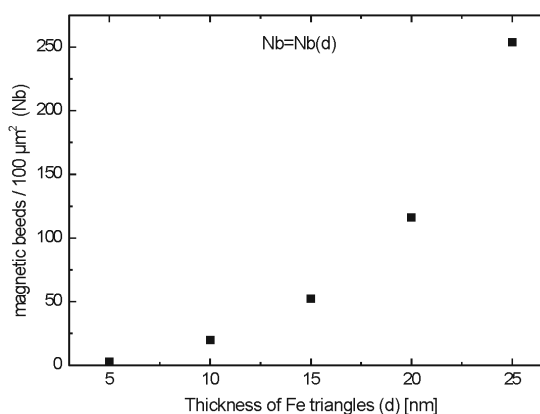


Figure 9: Graph presenting the number of the magnetic beads attached to the nanostructure as a function of the thickness of the nanotriangles.

The dilution of the beads was prepared by re-suspending the native bead solution in 2.5 ml PBS (pH 7.4) with 2 mM EDTA and 0.5 % BSA. Subsequently, catheters were incubated in the bead suspension of the beads at room temperature. The time of incubation was chosen on the basis of the mobility of the particles in a strong magnetic field. Afterwards, the catheters were dried and analyzed using a scanning electron microscope. It was found that the magnetic beads attach to the nanostructured catheter, as shown in Figure 8.

It is obvious from Figure 8C that the magnetic beads tend to attach to the surface of the Fe nanotriangles. They do not stick to the surface of the catheter, which is not covered with the nanostructure. This emphasizes the role of the passivation process and excludes interaction of the beads with the structure by interactions other than magnetic ones.

It has been measured that the number of the attached particles strongly depends on the thickness of the nanotriangles (see Figure 9). This dependency was investigated for five different thicknesses of the deposited material (5, 10, 15, 20, and 25 nm), from which the nanostructure was made.

The Shadow Approach

The structures obtained by NSL can become much more complex by varying the shadows below the microspheres of masks during evaporation. We first developed computer simulations that predicted the structures resulting from the variation of the angle between the evaporation beam and the sample by tilting and/or rotating the sample being processed. Subsequently, a variety of predicted complex morphologies, ranging from cup-like structures to rods and wires, were successfully prepared by using this technique. Figure 10 gives examples of simulation (left) and realization (right) for one experimental setup, respectively [3].

Fine Tuning of Interstices

The shadow approach was further improved by changing the mask morphology, i.e. by decreasing the size and by changing the form of the interstices between the spheres through temperature processing. Figure 11 (left) demonstrates the changes in size and form of interstices and the change of the interferometric color of a 540-nm PS-latex mask annealed in 25 mL water/ethanol/acetone mixture by (A) 1,

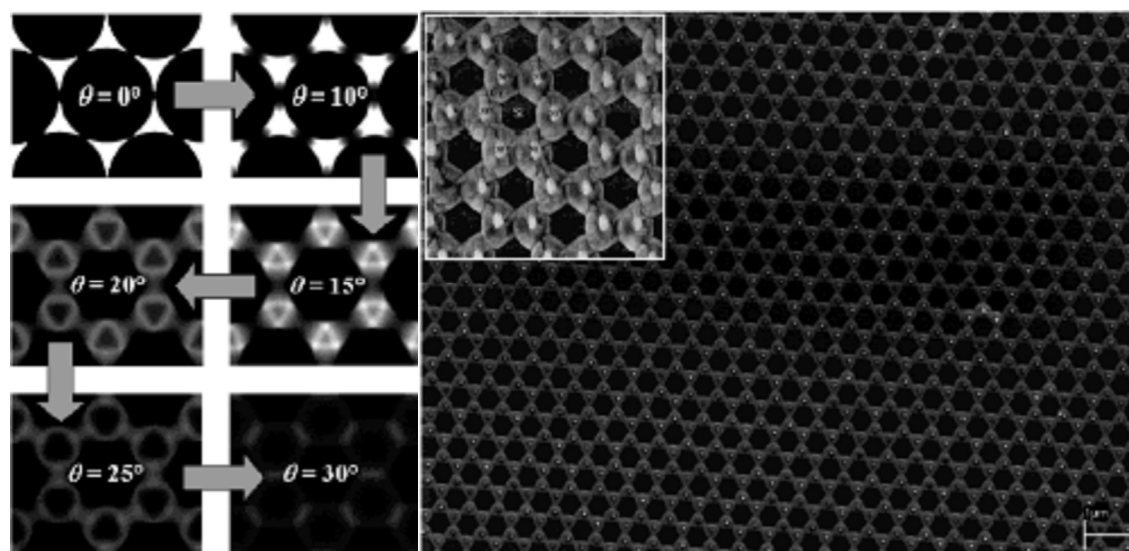


Figure 10: Simulation results for evaporation through a mask of ordered spheres, with evaporation angles varying from 0° to 30° (left); SEM image of a bimetallic structure that was obtained by a two-step evaporation process (right).

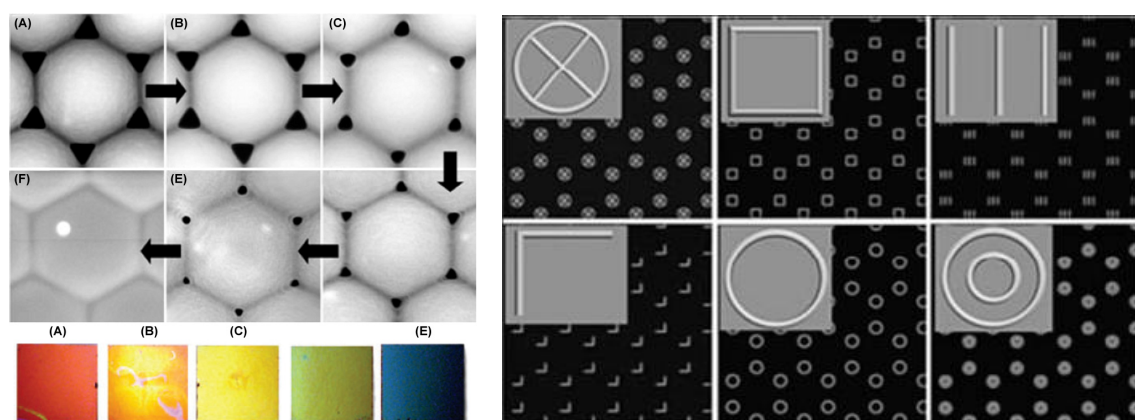


Figure 11: Change of interstices and interferometric color of a mask by annealing (left). Simulation of theoretically-possible structures (right).

(B) 2, (C) 4, (D) 6, (E) 7, and (F) 10 micrometers long and less than 50 nm thick wave pulses [4].

Applying temperature-treated masks in the shadow approach allowed for the preparation of particles with morphologies such as rings and rods. The combination of both processes affords an outstanding control of the size and morphology of the particles deposited on substrates. This efficient way was shown to scale down the size of metallic nanoparticles from 200 nm to 30 nm, while preserving the original nanosphere spacing and order. Computer simulations that showed the possibility of creating periodic arrays of various geometrical shapes are given in Figure 11 (right). Reactive ion etching (RIE) is a method to increase the size of interstices (Figure 12, left). If combined with plasma etching of the masks, the NSL shadow approach can be extended to produce arrays of holes or nanowires hundreds of micrometers long and less than 50 nm thick (right).

In another study we prepared goldlines (width ~ 400 nm, height ~ 50 nm, distance ~ 800 nm) on sapphire by means of Nano-sphere Lithography. The space between the gold islands was passivated with methoxy-polyethyleneglycol to prevent unspecific attachment (see Figure 6). On these substrates SH-SY5Y neuroblastoma cells were cultured for 2 days, followed by a 2-day cell differentiation period. We were able to successfully demonstrate that gold nanowires arranged in a parallel array provide both a permissive and directive substratum for neuron growth *in vitro*. Scanning electron microcopy (SEM) studies revealed cell spreading initiated by the growth of cell elongations guided by the underlying gold nanowires. This indicates a strong interaction

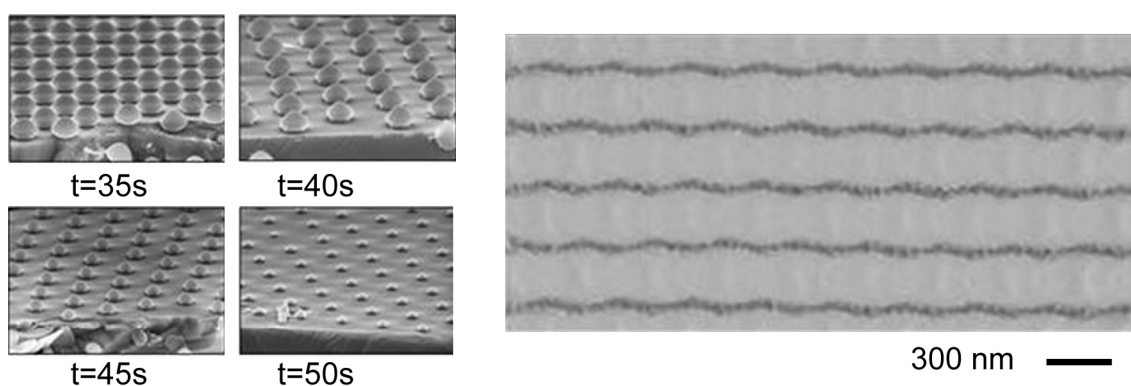


Figure 12: SEM images of etched masks (left) and of Au lines on Al_2O_3 (right).

between cell and gold support surfaces at the nanoscale. The functional groups attached to the nanowires play an important role in assisting cells to sense changes in their environment. Thus, the gold nanowires are considered to act as anchoring sites that enhance the adhesion of neurons as well as the development of cell elongation, thus promoting neuron outgrowth.

In a subsequent step, the experiments will be repeated using broader distances in-between goldwires, preventing cells from overgrowing the passivated space and forcing their growth into a specific direction eventually resulting in the formation of pre-defined neuronal networks.

Combining NSL with Carbon Nanotubes (CNTs)

The unique mechanical, electrical and optical properties of multiwall carbon nanotubes (MWNTs) make them very promising for the fabrication of new advanced materials, particularly polymer composites with improved performance, or with new properties.

CNTs have been combined with Nanosphere Lithography to prepare synthetic architectures having a well-defined topography (geometry and surface roughness), as well as suitable biocompatibility. In the Nanoparticle Technology Group research has been done to engineer cell surface interaction on CNT-based architectures and to investigate the response of

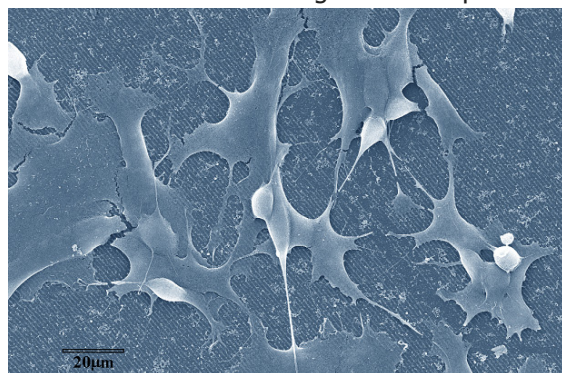


Figure 13: Enhanced growth and extensive differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells.

osteoblast-like cells (CAL-72) to a tactile environment intentionally modified by nanoscaled patterns (see Figure 15) [5].

The obtained results show enhanced cell growth on nanoscaled surfaces (Figure 15A) and growth guidance by the spatial periodicity of a particular nano-pattern (see Figure 16)[6]. These results demonstrate that osteosarcoma cells do sense and respond to physical micro- and nanofeatures (topographic and mechanical) in their environment. They favor the nanostructured surface which allows efficient cell attachment, growth and spreading as the substrate offers a high number of cell contacts.

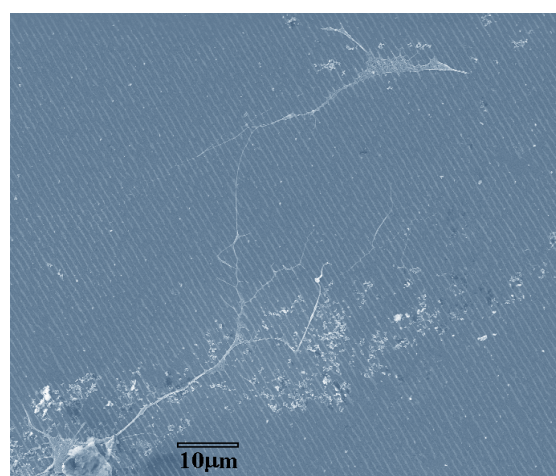
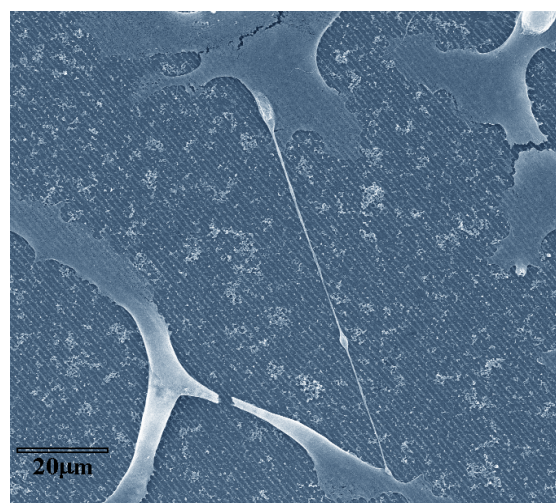


Figure 14: (Top) Scanning electron microscopy (SEM) image revealing a directional coalescence of axons/dendrites of two adjacent neuroblastoma cells converging in a synapse, (Bottom) SH-SY5Y cells show a high affinity to gold - nanostructured areas on the substrate while avoiding mPEG-urea-passivated areas in between.

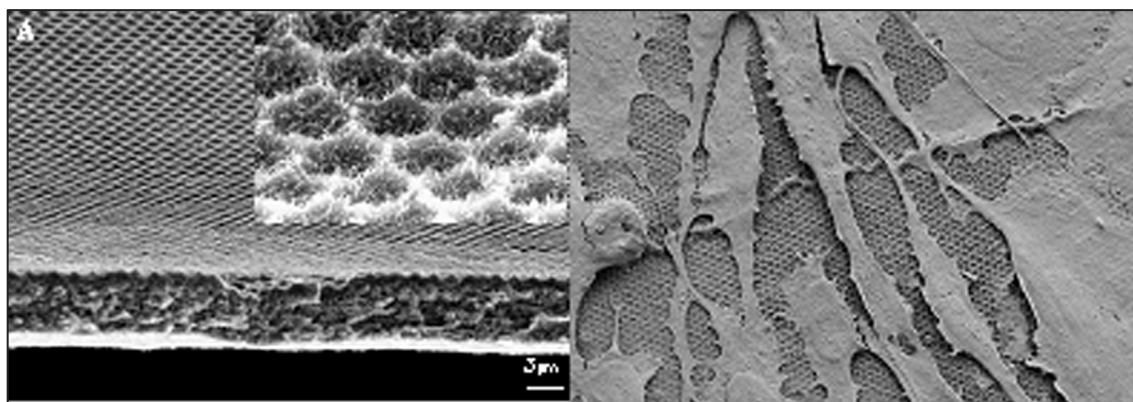


Figure 15: SEM Image depicting a micro/nano periodic pattern of a CNT-based free-standing film. (A) The film is characterized by cavities having an average diameter of about 2 μm , scale bar 1 μm . (B) CAL-72 cells attaching and spreading onto the free-standing film.

Physical spreading of cells on a substrate differentiation. Our previous results have confirmed that surface chemistry and topography of the substrate are undoubtedly responsible for the variation in cell morphology, cytoskeleton organization, and proliferation. Since the quality of this phase plays an important role in the modulation of cell functions, such as morphology, proliferation, protein production and

for the variation in cell morphology, cytoskeleton organization, and proliferation. Since the cytoskeleton is believed to be responsible for the mechanical properties of the cell, the alteration in its architecture upon adhesion to di-

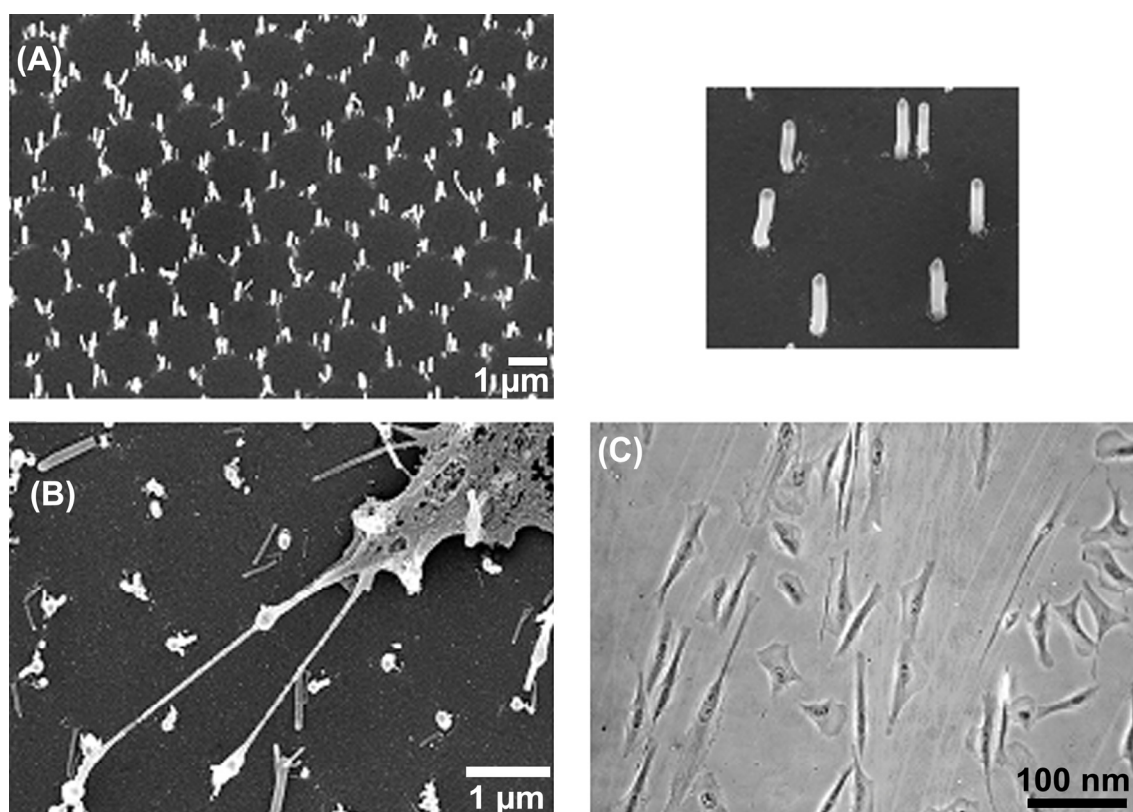


Figure 16: SEM image of a platform containing a periodic array of aligned CNTs. (A) This platform was tested as a physical support for studying the biomechanical interaction of osteoblast-like cells (CAL-72) with nanostructured components (CNTs). (B) The cells develop elongations that anchor to the tips of individual CNTs, thereby adopting a typical arborized shape. (C) Lightmicroscopic image of CAL-72 osteoblast-like cells following aligned CNTs.

verse substrates may lead to changes in the mechanical stiffness of the cell. This fact assumes that a high value of Young's modulus is directly correlated with good cell adhesion [1]. We have used atomic force microscopy (AFM) as a tool to study the biocompatibility of various substrates by investigating the adhesion behavior of osteoblast cells *in vitro*. This technique allowed the examination of cyto-mechanical properties of living cells on a sub-micrometer scale.

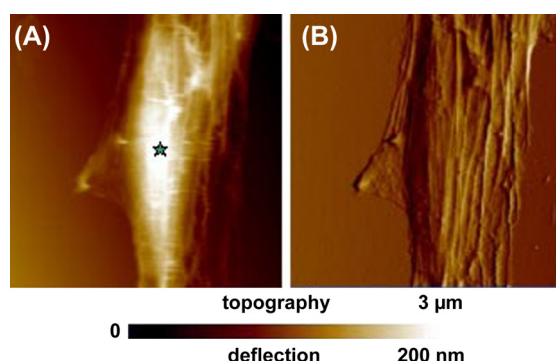


Figure 17: Representative height (A) and deflection (B) image of a living osteoblast cell on a gold triangular honeycomb structure. The star-shaped mark shows a typical area of elastic measurements.

Osteoblast cell adhesion has been investigated on CNT-based matrices and quasi-triangular gold clusters. The elastic properties of cells adhered to these substrates have been compared to those of osteoblasts cultured on glass. The Young modulus of the osteoblasts has been extracted from the force-curves recorded in the nucleus region of the cell (Figure 17).

Figure 18 shows a representative force-curve recorded on a living cell. The obtained force-curves were fitted with the Hertz (theoretical) model, which describes the indentation of an elastic sample using a stiff conical indenter. The fitted theoretical force-curve is superimposed on top of the experimental one and, as can be seen, fits the experimental curve over the whole range of analysis.

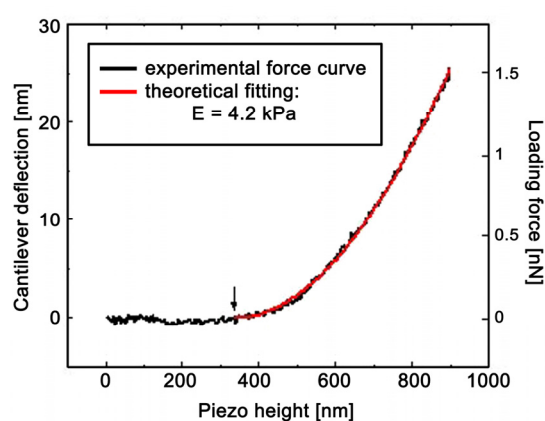


Figure 18: The Hertz model applied to one experimental force-curve taken on the living cell in the area of its nucleus (osteoblast cultured on glass). Calculated Young's modulus: 4.2 kPa.

We have found that Young's modulus of osteoblast cells is substrate dependent. The stiffness of the cells is altered by adhesion to different substrates (Table 1). In general, CNT-based substrates exhibit good biocompatibility to osteoblast cells reflected by the strong cell adhesion to these substrates.

SUBSTRATE TYPE	F [nN]	E [kPa]
GLASS	1.2	3.90(68)
CNT MATRIX		5.45(93)
CNT LbL FILM		4.73(50)
HONEYCOMB STRUCTURE		7.10(1.47)

Table 1: Mean elastic modulus of living osteoblast-like cells seeded on various substrates.

Literature

1. Leapman R. D., Current Opinion in Neurobiology 14 (2004), 591-598.
2. Hilgendorff M., and Giersig M., Eur. J. Inorg. Chem. 18 (2005), 3571-3583.
3. Rybczynski J., Hilgendorff M., and Giersig M., In: NATO Science Series II, Low-Dimensional Systems: Theory, Preparation, and Some Applications, L.M. Liz-Marzán, M. Giersig, eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 91 (2003), 163-172.
4. Kosiorek A., Kandulski W., Chudzinski P., Kempa K., and Giersig M., Nano Lett. 4 (2004), 1359-1363.
5. Kosiorek A., Kandulski W., Glaczynska H., Giersig M., Small 1 (2005), 439-444.
6. Firkowska I., Olek M., Pazos-Perés N., Rojas-Chapana J., and Giersig M., Langmuir 22 (2006), 5427-5434.
7. Giannona S., Firkowska I., Rojas-Chapana J., and Giersig M., J. Nanosci. Nanotechnol. 7 (2007), 1679-1683.



Neue Möglichkeiten der analytischen Elektronenmikroskopie

Dr. Stephan Irsen
 Leiter Electron Microscopy and Analytics Labs (EMA)

Die analytische Elektronenmikroskopie korreliert Bilder und chemische Informationen der untersuchten Proben. Der Einsatz moderner Mikroskope mit korrigierter Elektronenoptik und monochromatisiertem Elektronenstrahl ermöglicht diese Untersuchungen mit atomarer Auflösung.

Die fortschreitende Miniaturisierung in nahezu allen Zweigen der Natur- und Ingenieurwissenschaften machen den Einsatz bildgebender Untersuchungsmethoden für den sub-Nanometerbereich immer wichtiger. So kommen z.B. in der Halbleiterindustrie routinemäßig Strukturen zum Einsatz, die nur noch aus wenigen Atomlagen bestehen. Aber auch in den Lebenswissenschaften wächst der Bedarf an entsprechender Nanoanalytik stetig [1].

Das Elektronenmikroskop ist schon seit längerem kein reines Abbildungsinstrument mehr. Es gibt eine Vielzahl von Signalen, die bei der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der untersuchten Materie erzeugt werden und die wertvolle strukturelle und chemische Informationen über das untersuchte Material enthalten [2]. Das Labor für Elektronenmikroskopie und Analytik der Stiftung caesar (EMA@caesar)

Ausstattung bei EMA@caesar.de*		
Transmissions-elektronenmikroskop	ZEISS LIBRA200 CRISP	Hochauflösendes (S)TEM mit FEG, Monochromator, abbildendem Energiefilter und CS-Korrektur
Transmissions-elektronenmikroskop	ZEISS LEO922A	Analytisches TEM
Rasterelektronenmikroskop	ZEISS Supra55	Hochauflösendes FEG REM mit großer Probenkammer
FIB-Rasterelektronen-mikroskop	ZEISS XB1540	Fokussiertes Ionenstrahl Mikroskop zum Bearbeiten von Proben im Nanometerbereich
Auger-Rasterelektronen-mikroskop	PH690	Hochauflösendes Rasterelektronenmikroskop mit Augerelektronen Spektrometer und Ar-Ionenkanone
Röntgenbeugung	Bruker D8	Röntgendiffraktometer mit Flächendetektor

*Eine vollständige Liste der Geräte ist unter [www. caesar.de](http://www.caesar.de) zu finden.

Tabelle 1: Überblick der wichtigsten Geräte bei EMA@caesar.

Aberrationskorrektur in der Elektronenmikroskopie

Um mit einem Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM) eine Auflösung zu erreichen, die eine direkte Abbildung einzelner Atomsäulen erlaubt, muss der konvergente Elektronenstrahl am Probenort auf einen Durchmesser von ungefähr 0.1 nm fokussiert werden. Auflösungslimitierend wirken im STEM hauptsächlich Aberrationen der magnetischen Linsen des Beleuchtungssystems. Der Öffnungsfehler (CS) bewirkt, dass axnahe und axferne Strahlen nicht in einem Punkt fokussiert werden und so den Elektronenstrahl verbreitern. Im Gegensatz zur Lichtoptik, wo der Öffnungsfehler durch asphärische Linsen einfach eliminiert werden kann, existieren in der Elektronenoptik ausschließlich Rundlinsen. Bei konventionellen TEMs hat das zur Folge, dass mit sehr kleinen Öffnungswinkeln gearbeitet wird, üblicherweise im Bereich von 10 mrad im Rasterbetrieb oder 2 mrad bei paralleler Beleuchtung. Die Möglichkeit der Auflösungssteigerung mittels elektronenoptischer Elemente zur Aberrationskorrektur wurde schon 1947 von Scherzer postuliert [3], es dauerte jedoch bis in die 1990er Jahre, dass solche Korrektoren technisch realisiert werden konnten. Der Elektronenstrahl wird beim Durchlaufen des symmetrisch aufgebauten CS-Korrektors zunächst entfaltet, mit einer Kombination aus Hexapol- und Quadrupollinsen korrigiert und anschließend wieder zu einem Spot zurück transformiert. Die Linsenströme für diese Prozedur lassen sich durch die Auswertung sog. Zemlin-Tableaus bestimmen (siehe Inset) [4]. Dabei wird der Strahl um die optische Achse verkippt und die Frequenzspektren der bei unterschiedlichen Foki und Kippwinkeln gemessenen Bilder ausgewertet. Mit einer computerunterstützten Routine lassen sich so Linsenfehler bis zur 3. Ordnung korrigieren und bis zur 5. Ordnung optimieren. Nach erfolgreicher CS-Korrektur erhält man aberrationsfreie Bereiche bis zu 40 mrad, so dass Untersuchungen mit einem bis zu 4fach größeren Öffnungswinkel durchgeführt werden können. Alle hier beschriebenen Untersuchungen wurden bei 200 kV an einem ZEISS Libra200 (CRISP) (S)TEM mit Monochromator, CS-Korrektor im Beleuchtungssystem und 90° incolumn Energiefilter durchgeführt.

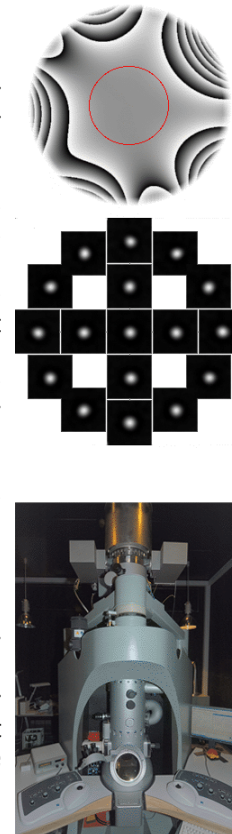


Abb. 1: Funktionsweise eines CS-Korrektors im Raster-Transmissionselektronenmikroskop.

Eine elegante und einfacher zu interpretierende Methode, Bilder mit atomarer Auflösung zu erzeugen, ist die hochaufgelöste Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (HRSTEM). Dabei durchstrahlt man die Probe mit einem konvergenten Elektronenstrahl (Sonde) über die Probe. An der jeweiligen Strahlposition wird die Sonde durch Wechselwirkung mit der Probe gestreut und die entstehenden Streukegel können mit einem Ringdetektor aufgezeichnet und abgebildet werden. Verwendet man dabei ausschließlich mit hohen Winkeln (> 50 mrad) gestreute Elektronen für die Bildgebung – man spricht dann von einem sog. High-Angle Annular Dark-Field (HAADF) Detektor – hängt der Bildkontrast nur noch von der Ordnungszahl Z der wechselwirkenden Atome ab (Z-Kontrast). Besitzt der Elektronenstrahl bei der Untersuchung zusätzlich einen Durchmesser im Bereich von 0.1 nm, lassen sich auch im STEM die Atomsäulen der untersuchten Probe auflösen. Da der Kontrast solcher HRSTEM Bilder in erster Linie von der Ordnungszahl der wechselwirkenden Atome abhängt, lassen sich HRSTEM Bilder in der Regel wesentlich einfacher interpretieren als entsprechende HRTEM Aufnahmen.

Ein weiterer Vorteil der Raster-Transmissionselektronenmikroskopie liegt darin, dass sich laterale und chemische Information mit hoher Auflösung korrelieren lassen. Chemische oder spektroskopische Informationen über die Probe erhält man dabei aus der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit den Elektronenhüllen der durchdrungenen Atome. Die resultierenden Röntgen- (EDX) oder Elektronen-Energie-

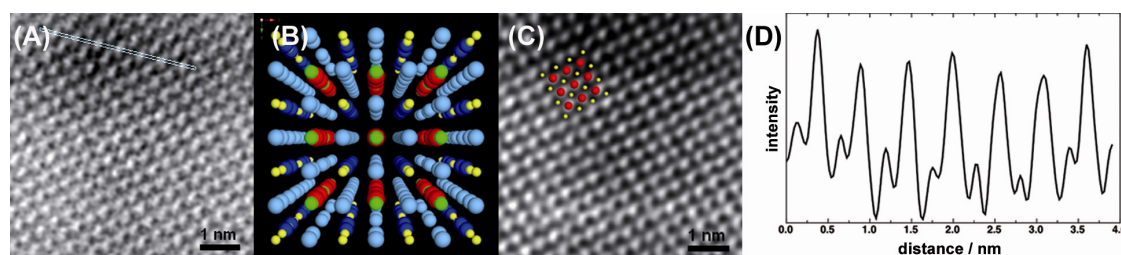


Abb. 2: STEM Untersuchung an einem Hochtemperatursupraleiter ($\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x} = \text{YBCO}$). (A) Z-Kontrast-Abbildung mit atomarer Auflösung entlang der c-Achse des Kristalls. Bei den Daten handelt es sich um Rohdaten. Die hellen Kreise repräsentieren die Ba/Y Atomsäulen. Die Auflösung beträgt ca. 0.2 nm. (B) Kristallstruktur von YBCO entlang der c-Achse. Die einzelnen Atomsorten sind farblich gekennzeichnet. Rot = Ba, grün = Y, gelb = Cu, blau = O. (C) Fourier-gefilterte Darstellung von A. Zur besseren Veranschaulichung sind die sichtbaren Atomlagen farblich markiert. Rot = Ba/Y, gelb = Cu/O. Die Atomsäulen, die ausschließlich aus O-Atomen bestehen, wurden aufgrund der besseren Übersicht nicht dargestellt. (D) Linienprofil des in A blau markierten Bereichs: Die unterschiedliche Intensität der beiden Atomsorten Ba/Y und Cu/O aufgrund der unterschiedlichen Atommassen ist gut zu erkennen.

verlustspektren (EELS) geben u.a. Auskunft Y Atomsäule geschnitten. In Abb. 2b ist diese über die chemische Zusammensetzung aber Säule rot/grün dargestellt. Die Ecken der Ein- auch über die Koordination der untersuchten heitzelle bilden gemischte Cu/O Säulen (gelb/ Atomsorte. Bei Verwendung monochroma- blau), während die Kantenmitten von reinen tisierten Elektronenquellen lassen sich leicht O-Säulen besetzt sind (blau). Die Abstände spektroskopische Auflösungen von ca. zwischen zwei Ba/Y Säulen entlang der kristal- 150 meV erreichen, ausreichend, um auch op- lographischen a- und b-Achse betragen 0.38 tische Eigenschaften von Materialien zu un- und 0.39 nm. Entlang der Diagonalen beträgt tersuchen. Um sinnvoll solche spektroskopi- der Abstand zwischen zwei Ba/Y-Atomsäulen schen Methoden mit atomarer Auflösung nut- 0.55 nm. Der nächste Abstand entlang dieser zen zu können, benötigt man einen atomar Diagonalen liegt allerdings zwischen einer Ba/Y auflösenden Elektronenstrahl mit einem Strahl- und einer Cu/O Säule und beträgt 0.27 nm. strom im Bereich von 5 – 20 pA. Dies ist in Das Linienprofil in Abb. 2D zeigt einen Scan konventionellen Elektronenmikroskopen nicht entlang der eben beschriebenen Diagonalen. realisierbar. Durch den Einsatz eines Die Position des Scans ist in Abb. 2A als blaue CS-Korrektors und die dadurch mögliche Kor- Linie dargestellt. Die hellen Bildpunkte reprä- rektur der Linsenfehler bis zur 3. Ordnung las- sentieren die Ba/Y Atomsäulen. Die Informatio- sen sich Elektronenstrahlen mit den geforder- nen der Cu/O Säulen lassen sich dagegen mit ten Eigenschaften erzeugen. Die Funktions- bloßem Auge nicht eindeutig identifizieren. Das weise eines solchen Korrektors ist in Abb. 1 Linienprofil bringt diese Informationen aller- kurz beschrieben. dings zweifelsfrei zutage. Abb. 2C zeigt eine Abb. 2 zeigt eine Untersuchungsserie an einem Fourier-gefilterte Darstellung der Rohdaten in YBCO Hochtemperatursupraleiter ($\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$) Abb. 2A. Zum besseren Verständnis ist das [5]. Der untersuchte Kristall wurde entlang der Strukturmotiv der Ba/Y und der Cu/O Atom- kristallographischen c-Achse ausgerichtet. Die säulen in die Struktur eingezeichnet. Die reinen Kristallstruktur von YBCO besteht aus drei O-Atomlagen lassen sich in den Bildern nicht verschiedenen Atomsäulen. Die Flächenmitte eindeutig nachweisen. der Einheitszelle wird von einer gemischten Ba/

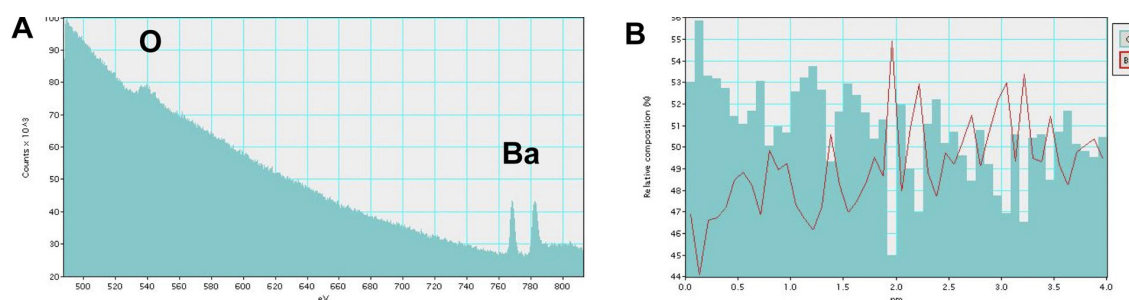


Abb. 3: Elektronen-Energieverlustspektrum von YBCO. (A) Ausgewähltes Spektrum, das beide untersuchten Signale – O und Ba – zeigt. Das Sauerstoffsignal ist nur sehr schwach ausgeprägt, da das Spektrum im Bereich einer Ba-Atomsäule aufgezeichnet wurde. (B) Linienprofil entlang der in Abb. 2A gezeigten Linie. Dargestellt ist der Verlauf des O und des Ba Signals. Die chemischen Signale der beiden Elemente verlaufen antiphasisch.

Als Beispiel für eine spektroskopische Untersuchung mit atomarer Auflösung zeigt Abb. 3 ein Spektren-Linienprofil, das im STEM-Spektroskopiemodus mit atomarer Auflösung gemessen wurde. Abb. 3A zeigt ein ausgewähltes EEL-Spektrum aus dem untersuchten Bereich. Durch inelastische Wechselwirkung zwischen dem Primärelektronenstrahl und der Probe, kommt es zu elementcharakteristischen Absorptionskanten. In Abb. 3A sind die Absorptionskanten des Sauerstoffs sowie des Bariums gezeigt. Aus dem Intensitätsverhältnis der beiden Signale lassen sich Rückschlüsse über die Stöchiometrie des Materials ziehen, aus der Form der Signale können Informationen über die Koordination der einzelnen Atome abgeleitet werden. Die Korrelation der lateralen und chemischen Information ist in Abb. 3B dargestellt. Die grüne Kurve ist ein Maß für die Konzentration des Elements Ba, wohingegen die rote Kurve den Anteil von O repräsentiert. Der untersuchte Bereich ist in Abb. 2A mit einer blauen Linie markiert. Der Graph zeigt eindrucksvoll, dass die beiden Elementsignale antiphasisch verlaufen. Somit lassen sich die Atomlagen aus Abb. 2A eindeutig zuordnen und spektroskopische Informationen mit atomarer Auflösung messen.

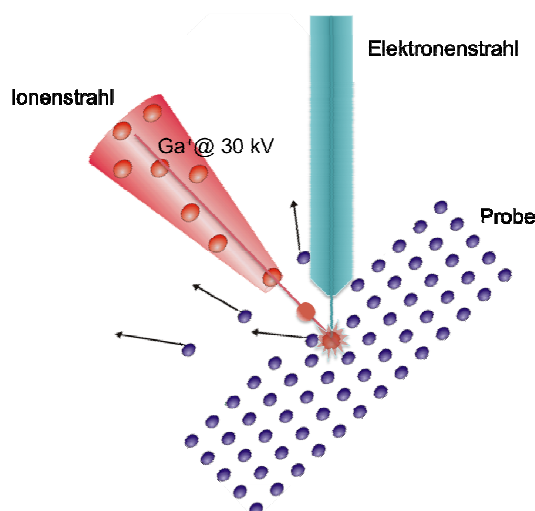
Elektronentomographie einmal anders

Die Elektronentomographie zur 3-dimensionalen Untersuchung von Proben im Nanometerbereich ist seit einigen Jahren als Standardmethode etabliert. Üblicherweise werden dazu im Transmissionselektronenmikroskop Aufnahmen der Probe unter unterschiedlichen Kippwinkeln angefertigt. Diese Kippserien umfassen in der Regel einen Winkelbereich von ca. $\pm 70^\circ$. Im Anschluss an die Untersuchung werden die einzelnen Durchstrahlbilder aufeinander abgeglichen mit dem Ziel, die Proben-drift, die im Verlauf der Untersuchung stattgefunden hat, zu korrigieren. Anschließend wird der Datensatz analog zur Computertomographie im Computer zu einem 3-dimensionalen Datensatz rekonstruiert.

Ein interessanter neuer Ansatz, 3-dimensionale Datensätze mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zu generieren, kann mit einem FIB-Mikroskop durchgeführt werden. Eine kurze Erläuterung der zugrunde liegenden Technologie wird in Abb. 4 gegeben. Im FIB-Mikroskop lässt sich mittels eines fokussierten Ionenstrahls die Probe selektiv schichtweise abtragen und gleichzeitig mit dem Elektronenstrahl beobachten. Auf diese Art lassen sich sehr einfach Schichtdatensätze erzeugen, die anschließend im Computer zu einem 3-dimensionalen Modell rekonstruiert werden können. Da bei dieser Me-

Fokussiertes Ionenstrahl Mikroskop (FIB)

In einem FIB- (Zweistrah-) Mikroskop werden zusätzlich zum Elektronenstrahl Ga^+ -Ionen verdampft, auf maximal 30 kV beschleunigt und als fokussierter Ionenstrahl über die Probenoberfläche gerastert. Aufgrund der verglichen mit Elektronen größeren Masse der Ga^+ -Ionen werden bei diesem Vorgang Oberflächenatome aus der Probe heraus geschossen (siehe nebenstehende Abb.). In modernen FIB-Mikroskopen können beide Strahlenquellen gleichzeitig betrieben werden und der Ionenätzvorgang mit dem Elektronenstrahl beobachtet werden. Mit dieser Technik können so sehr einfach Querschnittsanalysen angefertigt werden, indem die Probe schichtweise abgetragen und nach jeder Schicht eine Aufnahme abgepeichert wird. Aus den resultierenden Bildserien lassen sich anschließend im Computer 3-dimensionale Datensätze rekonstruieren. Darüber hinaus gibt es für ein FIB Mikroskop eine Vielzahl weiterer Einsatzmöglichkeiten, u.a. die schnelle Herstellung von Dünnschnitten für die TEM Analyse.



Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit einer ZEISS 1540XB Workstation durchgeführt. Die einzelnen Schritte wurden mit einem Ionenstrahlstrom von 5 nA angefertigt. Die Bilder wurden bei 5 kV Beschleunigungsspannung mit dem in der Elektronensäule eingebauten inlens Sekundärelektronendetektor aufgezeichnet. Für die Rekonstruktion wurden die Daten zunächst geometrisch korrigiert und anschließend mit Hilfe des Computerprogramms VG-Studio zu 3-dimensionalen Datensätzen rekonstruiert.

Abb. 4: Funktionsweise eines FIB Mikroskops.

thode die Probe während der Untersuchung ge Methode, quantitative Aussagen über die nicht verkippt werden muss, ist die Anfälligkeit Porosität in einem weiten Größenbereich zu für Probendrift deutlich geringer als im Trans- treffen, liegt in der Bildanalyse 3-dimensio- missionselektronenmikroskop. Aufgrund der naler Bildstapel. Durch die Berechnung von hohen Auflösung moderner FIB-Geräte lassen Distanzkarten, die den Voxelabstand zum Ma- sich die rekonstruierten Daten auch für quanti- terial anzeigen, lassen sich Abschätzungen von tative 3-dimensionale Untersuchungen, wie Porenvolumina und -verteilungen treffen. z.B. die Bestimmung der Porosität, verwenden. Während die Porositäten im Milli- und Mikro- Eine solche Untersuchung soll am folgenden meterbereich gut mittels Synchrotron-Mikro- Beispiel demonstriert werden. Bei der Herstel- Computertomographie zugänglich sind, reicht lung resorbierbarer Implantate ist die Porosität die Auflösung dieser Methoden (Voxelgröße ca. der Materialien von entscheidender Bedeutung 3 μm) für die quantitative Untersuchung der für das spätere biokompatible Verhalten [6]. In Nanoporosität der einzelnen Keramikgranalien dem hier beschriebenen Beispiel einer Bioke- nicht mehr aus [8]. Für die hier vorgestellte ramik, spielen Porositäten auf einer Größen- Untersuchung wurden von ausgewählten Kera- skala von Millimeter - durch in das Implantat mikkugeln mittels fokussiertem Ionenstrahl- eingebrachte Kanäle - bis hin zu Nanometer ätzen Querschnitte angefertigt und diese an- großen Poren im Inneren einzelner Kera- schließend im Computer zu 3-dimensionalen mikgranalien eine Rolle [7]. Eine leistungsfähi- Datensätzen rekonstruiert.

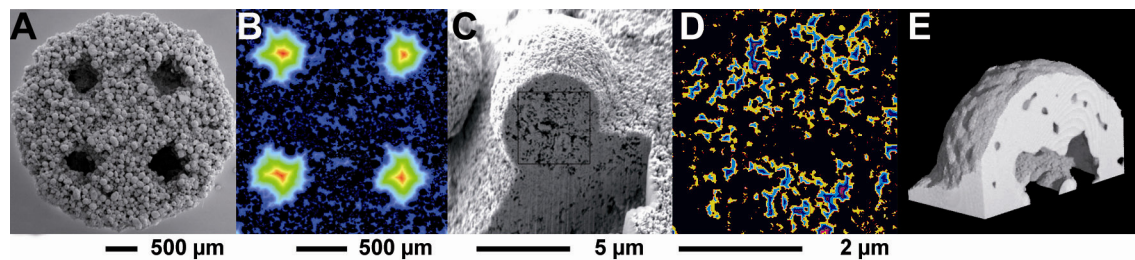


Abb. 5: Anwendung der FIB-Tomographie zur Porositätsuntersuchung keramischer Granulate. (A) Sekundärelektronenbild einer porösen Biokeramik für den Knochenersatz. (B) 3-dimensionale Abstandskarte (Synchrotron-µComputertomographie). Dargestellt ist der Abstand jedes Voxels zum Material (schwarz). (C) FIB-Querschnitt durch eine einzelne Keramikugel an der Oberfläche des Implantats. Der Rahmen markiert den Bereich, der für die Abstandskartenberechnung verwendet wurde. (D) 3-dimensionale Abstandskarte einer ausgewählten Schicht der in C beschriebenen FIB-Untersuchung. Die Falschfarbendarstellung zeigt den Abstand jedes Voxels zum Material (schwarz). (E) 3-dimensionale Rekonstruktion der in C gezeigten Granalie. Zur besseren Darstellung der inneren Struktur wurde das Objekt angeschnitten.

Abb. 5 zeigt eine REM Aufnahme eines Beispielimplantats aus synthetischem Hydroxylapatit. Die Kanalstruktur mit einem Durchmesser im Bereich von einem Millimeter ist gut zu erkennen. Ferner sind auch die einzelnen Granalien des verwendeten Keramikmaterials abgebildet. Die granulare Struktur der Biokeramik erzeugt im Implantat eine zusätzliche Mikroporosität, die auf der einen Seite den Material-Zell-Kontakt verbessert, andererseits aber die mechanische Stabilität der Implantate verschlechtert. Die Granalien selbst besitzen eine eigene Porosität im Bereich unter 1 µm, wie in Abb. 5C zu erkennen ist. Dieses Bild zeigt exemplarisch einen FIB-Querschnitt durch die untersuchte Keramikugel. 320 dieser Schnitte wurden für die Rekonstruktion der Granalie verwendet. Abb. 5E zeigt das Ergebnis der Rekonstruktion. Zur besseren Visualisierung der Innenstruktur wurde die rekonstruierte Kugel aufgeschnitten. Bemerkenswert und ein Beweis für das Funktionieren dieser Methode ist die Darstellung der Kornstruktur an der Kugeloberfläche. Die durch den Sinterprozess entstandenen Hydroxylapatitkörner lassen sich im rekonstruierten Datensatz eindeutig identifizieren. Die Bilder B und D in Abb. 5 zeigen Distanzkarten, die aus den Bildstapeln berechnet wurden [8]. Ausgehend von diesen Datensätzen lassen sich in einem weiteren Schritt durch numerische Anpassung eines Kugelmodells an die Abstandskarten Aussagen über die Porosität der untersuchten Materialien treffen [9]. Die beiden hier gezeigten Untersuchungen repräsentieren eindrucksvoll die analytischen Möglichkeiten moderner Elektronenmikroskope, die weit über die reine Bildgebung hinausgehen. Dank moderner Computersteuerung und besseren Elektronenoptiken sind heute Untersuchungen im Routinebetrieb möglich, die in der Vergangenheit spezialisierten Geräten vorbehalten waren. Mit den Möglichkeiten wächst gleichzeitig allerdings auch der Anspruch an den Operateur, der ein immer umfangreicheres Repertoire an Untersuchungsmethoden beherrschen muss. Denn trotz aller Computerunterstützung hängt die Qualität der Ergebnisse nach wie vor von der Qualität der gemessenen Daten und deren Interpretation ab.

Darstellung der Kornstruktur an der Kugeloberfläche. Die durch den Sinterprozess entstandenen Hydroxylapatitkörner lassen sich im rekonstruierten Datensatz eindeutig identifizieren. Die Bilder B und D in Abb. 5 zeigen Distanzkarten, die aus den Bildstapeln berechnet

Literatur

1. Leapman R. D., Current Opinion in Neurobiology 14 (2004), 591-598.
2. Williams D. B., Transmission Electron Microscopy. A Textbook for Material Science, Kluwer Academic (1996).
3. Haider M., and Zach J., Ultramicroscopy 81 (2000), 163-175.
4. Zemlin F., Schiske P., Kunath W., and Herrmann K. H., Ultramicroscopy 3 (1978), 49-60.
5. Calestani G., and Rizzoli C., Nature 328 (1987), 606-607.
6. Gauthier O., Bouler J. M., Aguado E., Pilet P., and Daculsi G., Biomaterials 19 (1998), 133-139.
7. Irsen S., Leukers B., Tille C., Beckmann F., Müller B., Buzug T., and Seitz H., Advances in Medical Engineering, Springer Series: Proceedings in Physics 114 (2007), 121-126.
8. Müller B., Beckmann F., Huser M., Maspero F., Szekely G., Ruffieux K., Thurner P., and Wintermantel E., Biomol. Engin. 19 (2002), 73-78.
9. Irsen S., Leukers B., Bruckschen B., Tille C., Seitz H., Beckmann F., and Müller B., Proceedings of SPIE 6318 (2006), 631809-631810.



Technologie im Reinraum der Stiftung caesar

Manfred Lacher
Leiter Reinraum

Mikrosysteme sind aus der Forschung, der Entwicklung und dem Alltag nicht mehr wegzudenken. Bekannte Beispiele sind der Airbag Sensor, das KFZ-Stabilisierungssystem, die CCD-Kamera und aus der Medizintechnik das Cochleaimplantat und der Herzschritt-macher. Im F&E-Bereich wird aktuell z.B. an Bio-Sensoren, bionischen IR-Sensoren, Mikroschaltern für die Telekommunikation und mikrofluidischen Bioprozessoren gearbeitet.

caesar hat einen Reinraum mit einer hochwertigen Mikroprozesstechnologie und ein Team mit dem notwendigen Know-how, um neue, wissenschaftliche Ideen umzusetzen.

Der Reinraum der Stiftung caesar bietet eine und meist bilaterale, anwendungsorientierte hochwertige, technologische Infrastruktur für Kooperationsprojekte mit der Industrie. In den letzten Jahren wurde insbesondere in den Bereichen Biologische Sensoren nach dem Akustischen Oberflächenwellen-Prinzip (SAW), fluidische Mikrostrukturen für Bioreaktoren, Mikroheizplatten, Magnetische Sensoren und Aktoren nach Funktionsprinzipien der Formgedächtnismaterialien (Mikrogreifer, taktiles Display für die Blindenschrift) und der Thermomechanik (bistabiler Mikroschalter) gearbeitet. Die breit gefächerte Technologie des Reinraumes in Verbindung mit den weiteren wissenschaftlich-technischen Möglichkeiten des Hauses (Feinmechanische und Elektronische Werkstatt, Zentrale Analytik) lässt eine effiziente Entwicklung von Mikro- und Nanosystemen mit unterschiedlichsten Prozesskombinationen zu. Durch diese Synergie besteht die Möglichkeit, bereits in der Forschungs- und Entwicklungsphase sowohl die Funktion als auch die Herstellungstechnologie zu optimieren. Dies ist insbesondere bei einer späteren Überführung der Mikrosysteme in die wissenschaftliche Anwendung sehr wichtig.

die Entwicklung und Herstellung von mikro- und nanotechnologischen Sensor- und Aktorsystemen. Prozesstechnologisch werden die Gebiete Mikrosystemtechnologie (MST), Dünnschichttechnologie (DST), UV-LIGA-Technologie, Integrierte Optik auf Silizium, Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS) und Surface Micromachining abgedeckt. Die potentiellen Anwendungsfelder reichen von Mikroreaktionstechnik über Kfz- und Kommunikationstechnik, Biotechnologie und minimalinvasiver Chirurgie bis hin zum Bau eines Interfaces für Mensch-Maschine Interaktionen. Von der ersten Idee eines Mikrosystems bis hin zur technologischen Umsetzung steht den Forschern und Entwicklern bei caesar ein erfahrenes Reinraumteam mit breitem Technologie-Know-how und speziellem, anlagenspezifischem Prozess-Know-how zur Verfügung. Erfahrungen liegen auf nahezu allen der oben genannten Gebiete vor. Das Reinraumteam ist entweder als Partner in die Projekte direkt eingebunden oder bearbeitet selbstständig technologische Service-Aufträge für externe und interne Arbeitsgruppen. Zudem akquiriert und bearbeitet das Team eigene, öffentlich geförderte wissenschaftlich-technologische Projekte

Prozessbereiche des Reinraums

Der Reinraum ist je nach Funktion in unterschiedliche Reinheits-Klassen eingeteilt. Diese erstrecken sich von der Klasse 10 (Fotolithographie), über die Klasse 100 (nasschemische Strukturierung, Galvanik, Beschichtung, Diffusion und trockenchemisches Ätzen) bis hin zur Klasse 1000 (Schicht- und Oberflächencharakterisierung). Klasse 10 bedeutet z.B., dass maximal 10 Partikel größer oder gleich 0,5 Mikrometer pro Kubikfuß erlaubt sind. Zum Vergleich sind z.B. in einem normalen Wohnzimmer etwa 200.000 Partikel pro Kubikfuß enthalten.

Die Größe des caesar-Reinraumes beträgt insgesamt 460 m² (Weiß- und Graubereich). Als Weißbereich bezeichnet man den saubersten Bereich, in dem die Substrate bearbeitet werden, als Graubereich die Peripherie der Arbeitsbereiche, in dem auch die Prozess-Geräte untergebracht sind. Bei caesar hat der Graubereich die Reinraumklasse 10.000.

Mikroprodukte werden analog der Halbleiterindustrie in sogenannter Planartechnologie hergestellt. Das bedeutet, dass dreidimensional aufgebaute Funktionsstrukturen durch die Abfolge der Prozesse Erzeugung einer Schicht (Isolator, Metall etc.), Strukturierung dieser Schicht mittels Fotolithographie und Ätzverfahren und wiederum Erzeugung / Strukturierung der nächsten Schicht usw. erzeugt werden.

Die Kunst der Mikrotechnologen besteht darin, die Idee eines Wissenschaftlers oder Ingenieurs so in eine Prozessabfolge umzusetzen, dass das gewünschte Mikroprodukt, z.B. ein mikrotechnologischer Sensor oder Aktor, mit den entsprechenden Funktionen entsteht.

Der Reinraum bei caesar ist in die folgenden Prozessbereiche eingeteilt:

Fotoraum („Gelbraum“, RR-Klasse 10)

Im Fotoraum werden die Strukturen mit Fotomasken im Schattenwurfverfahren mittels Maskalignern (Abb. 1) und UV-Licht auf die mit Fotolack beschichteten Substrate (Wafer) aus Silizium, Glas oder Keramik übertragen. Wir arbeiten überwiegend mit Standard Positiv- und Negativ-Fotolacken (typische Schichtdicken von 0,3 bis 5 Mikrometer), SU 8 (Schichtdicken bis ca. 2 Millimeter möglich), Polyimid und elektronenstrahlsensitive Lacken.



Abb. 1: Fotolithographie: Mask-/Bondaligner (Mitte), Bonder (rechts).

Die gewünschten Strukturen werden von uns per CAD entworfen und an einen externen Maskenhersteller gegeben.

Ätzen (RR-Klasse 100)

Im nasschemischen Ätzbereich sind Arbeitsbänke zum Ätzen von z.B. Silizium, Siliziumoxid (Abb. 2), Siliziumnitrid, Metallen und Metalloxiden, Ultraschallbecken für die Substratreinigung und Mikrogalvanikbänke zur elektrochemischen Herstellung von z.B. Kupfer-, Nickel-, Nickel/Eisen- und Gold-Strukturen (UV-LIGA-Technik) aufgebaut.

Weiterhin sind in diesem Bereich die Wafersäge zur Vereinzelung der Bauelemente und Rinser-Dryer zur rückstandsfreien Trocknung der Substrate installiert.

Beschichtung, Plasmaätzen (RR-Klasse 100)

In dem Bereich Beschichtung (Abb. 3) werden Funktionsschichten zum einen mit physikalischen (Aufdampfen, Sputtern) und chemischen (PECVD, LPCVD, thermische Oxidation) Methoden hergestellt. Funktionsschichten können z.B. Isolationsschichten (Siliziumoxid, Siliziumnitrid, Siliziumcarbit, Titanoxid etc.), Opferschichten (hochdotierte Oxide), metallische Schichten (Aluminium, Gold, Platin, Nickel, Chrom etc.) oder Polysilizium sein.



Abb. 2: Nasschemisches Ätzen: Flusssäurebank, Rinser/Dryer (Mitte, oben).

Im Bereich Plasma-Ätzen werden die Standard Ätzverfahren wie z.B. Reaktives Ionenätzen (RIE), Tiefenätzen von Silizium (ICP-ASE) und Ionenstrahlätzen (IBE) eingesetzt.



Abb. 3: Beschichtungsbereich: Diffusionsöfen (thermische Oxidation, LPCVD; rechts), Aufdampfanlage (links).

Technische Infrastruktur des Reinraumes (Untergeschoß)

Die technische Infrastruktur des Reinraumes mit Klimaanlage, Vakuumvorpumpen, Abgasbrenner, DI-Wasseraufbereitung, Prozessgase, Prozesskühlwasser etc. ist ortsnahe zu den Prozessanlagen, direkt unter dem Reinraum, untergebracht (Abb. 4). Dadurch erreicht man kurze Ver- und Entsorgungswege, kurze Vakuum-Pumpwege sowie eine deutlich geringere Partikel- und Lärmbelastung im Graubereich des Reinraumes.

Mikrosystemprodukte

Anhand von konkreten Beispielen mikrosystemtechnologischer Entwicklungen mit internen und externen Kooperationspartnern soll das wissenschaftlich-technologische Potential der Technologie im caesar-Reinraum aufgezeigt werden.



Abb. 4: Vakuumvorpumpen.

Biosensor S-sens: Vom innovativen Forschungsprojekt zur erfolgreichen Unternehmensgründung

Als typisches caesar Projekt vereinte das Forschungsprojekt „S-sens“ ingenieur- und naturwissenschaftliche Arbeitsgruppen in einem interdisziplinären Ansatz. Ziel war es, verschiedene, bei caesar entwickelte Technologien zur Herstellung eines innovativen Produktes - ei-

nen sog. Biosensor – zu verwenden und dieses im Rahmen einer Unternehmensgründung auch zu vermarkten.

Biosensoren umfassen ein breites Feld wissenschaftlich interessanter und kommerziell attraktiver Anwendungen, wie z.B. Untersuchungen in der Medizin- und Pharmaforschung, medizinische Diagnostik, Qualitätskontrolle von Lebensmitteln sowie Detektion von Gift- und Gefahrstoffen im Bereich der öffentlichen Sicherheit.

Im Mittelpunkt der technischen Entwicklung stand die Kopplung hochsensitiver physikalischer Messtechnologien mit modernsten biochemischen Analyseverfahren. In Dünnschichttechnologie gefertigte, mikrostrukturierte Sensorchips wurden mit biomolekularen Analyseassays kombiniert. So wurde ein Gerät entwickelt, das unter Anwendung eines Hochfrequenzmessverfahrens geringste Mengen biologisch aktiver Moleküle (z.B. Proteine, DNA) oder mikrobiologischer Objekte (z.B. Viren, Bakterien) detektieren und Aussagen über deren Eigenschaften (z.B. Menge, Größe und Struktur, Wechselwirkung untereinander oder mit der Umgebung) gewinnen kann.

Die Detektionstechnik nutzt dabei das Prinzip akustischer Oberflächenwellen (SAW). Für eine Messung wird die lateral oszillierende Oberfläche des Sensorchips mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht. Die interessierenden Objekte binden spezifisch an die Chipoberfläche und ändern so deren Schwingungsverhalten. Um die Bindungsspezifität zu gewährleisten, sind an der Sensoroberfläche biomolekulare Rezeptoren fixiert, an welche, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, ausschließlich die gesuchten Objekte/Analyte binden können. Die patentgeschützte Technik ermöglicht die Integration multipler, miniaturisierter Einzelsensoren auf einem einzelnen Sensorchip. Dieser hochsensible Sensorchip

(Abb. 5 und 6) wurde im Reinraum von caesar entwickelt und wird inzwischen für die neugegründete Firma produziert.

Nach einer mehr als zweijährigen Phase von Tests wurde im Frühjahr 2006 das Biosensorsystem „S-sens K5“ (Abb. 7) offiziell vorgestellt. Das Gerät stellt ein kompaktes Laborsystem dar, das sich vorrangig an Interessenten in Forschung und Entwicklung wendet. Das Gerät wurde an mehrere Universitäten und Fachhochschulen im In- und Ausland, beispielsweise das Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Borstel, verkauft. Zur Optimie-

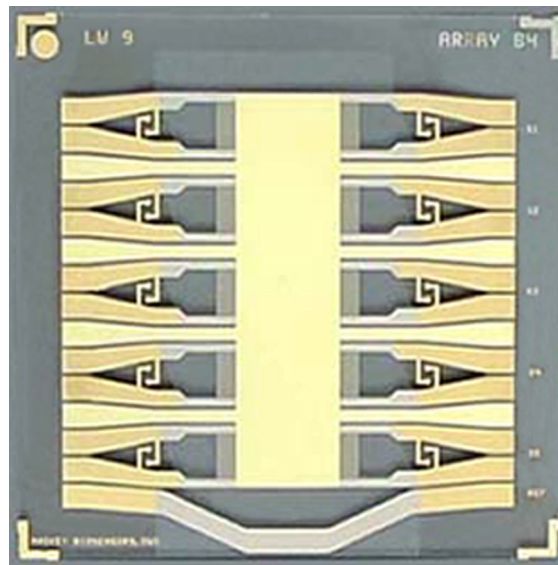


Abb. 5: Sensorchip.

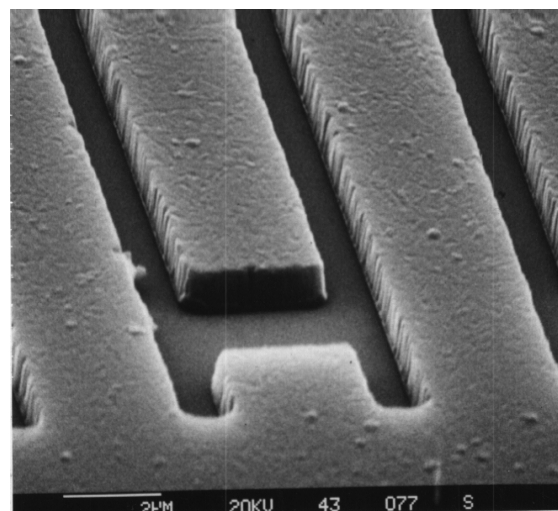


Abb. 6: Interdigitalstrukturen.

Die Vermarktung wurde das gesamte Spektrum potenzieller Märkte analysiert. Erfolgspotenziale wurden identifiziert und systematisch eingegrenzt. Ausgehend von den Ergebnissen wurde ein optimal ausgerichtetes Unternehmenskonzept ausgearbeitet, das die gezielte Ansprache von Investoren ermöglichte. Mit dem Gewinn des ersten Preises beim bundesweiten Businessplan-Wettbewerb „start2grow“ Ende 2006 ging die Suche nach zusätzlichen Partnern in die entscheidende Phase. Im Frühjahr 2007 wurde die schwedische Aktiengesellschaft Biosensor Applications AB als Investor gewonnen.

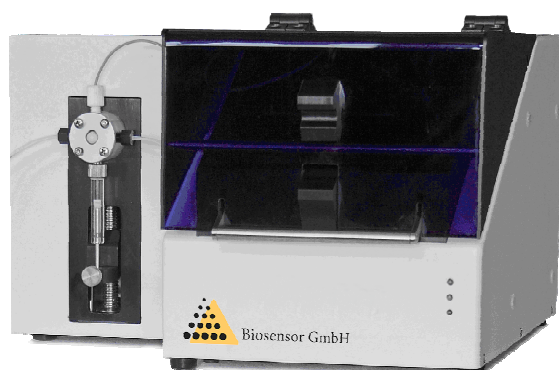


Abb. 7: Biosensor-System S-sens K5.

Im Juli 2007 wurde schließlich das neue Unternehmen Biosensor GmbH gegründet, das seit November 2007 als Joint Venture zwischen caesar, Biosensor Applications AB und mehreren ehemaligen caesar Mitarbeitern tätig ist. Den Schwerpunkt der Unternehmensaktivitäten bildet der stark wachsende Markt „Nachweis von Drogen und Sprengstoffen“.

Im Sinne des ehemaligen caesar-Konzepts steht S-sens damit beispielgebend für ein multidisziplinäres Forschungsprojekt, das durch den konsequenten Einsatz der einzigartigen caesar-Infrastruktur und einer Verzahnung der darauf aufbauenden Teilprojekte erfolgreich in die Unternehmensgründung geführt wurde.

Mikrofluidischer Bioprozessor: Entwicklung programmierbarer, mikrofluidischer Systeme zur gezielten digitalen Manipulation und Optimierung von komplexen Biomolekülsystemen

Hybride, elektrisch aktive Mikrofluidik-Chips mit programmierbaren Mikroelektrodenarrays eröffnen neue Möglichkeiten zur Manipulation und Detektion von Molekülen für Anwendungen sowohl in der Biotechnologie und Mikroreaktionstechnik als auch in der neurobiologischen und biomolekularen Informationsverarbeitung. Inzwischen ist es in Diagnostik, Genetik und Pharmaentwicklung unabdingbar geworden, winzige Volumina von Probelösungen auf Biochips gezielt bewegen, aufkonzentrieren oder orts aufgelöst detektieren zu können.

Hierfür werden u.a. programmierbare chemische Bioprozessoren (Abb. 8, links) bei der von Professor John McCaskill geleiteten Forschergruppe Biomolekulare Informationsverarbeitung (BioMIP) an der Ruhr-Universität Bochum entwickelt und die hochkomplexen elektrischen Chipkomponenten per Auftrag im Reinraum von caesar hergestellt. Diese sog. aktiven Biochips bestehen aus einer Vielzahl elektronisch ansteuerbarer Mikroelektroden sowie einem komplexen Netzwerk aus Mikrokanälen und winzigen Reaktionskammern im Bereich von wenigen Mikrometern. Damit lassen sich geladene Moleküle, supramolekulare Systeme wie Liposomen und Vesikel aber auch Mikro- und Nanopartikel mit Hilfe von digital gepulsten, elektrischen Feldern gezielt mischen, aufkonzentrieren und zu geeigneten Reaktionspartnern an vorgesehene Areale auf dem Mikroanalysesystem bewegen.

Die Abb. 9 zeigt den experimentellen, konfokalen Mikroskopaufbau zur Fluoreszenzdetektion von Molekülen in diesem einzigartigen „Lab-on-a-chip“ System. Die Technologie eröffnet ein breites Portfolio an Anwendungsmöglichkeiten in der Prozessoptimierung biochemischer Reak-

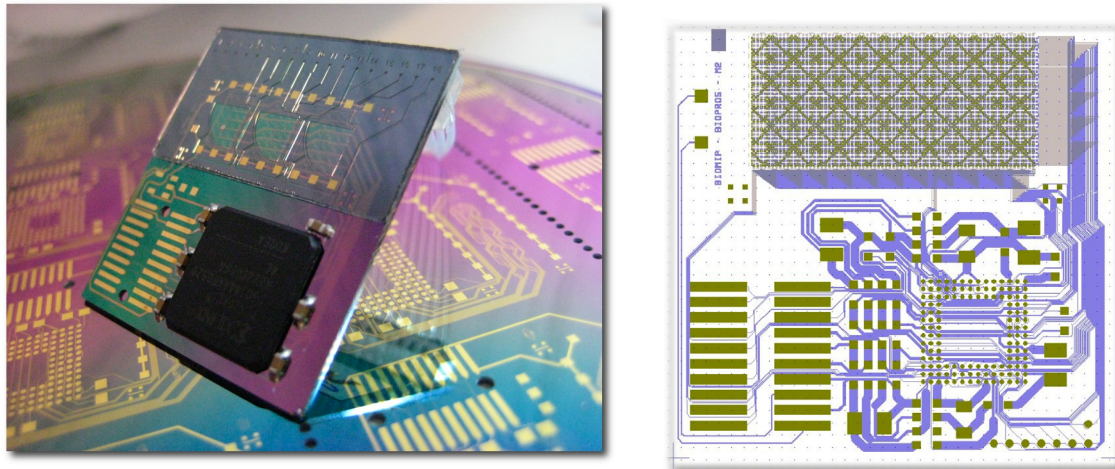


Abb. 8: Links: Chemischer Mikroprozessorchip: Hybride „Lab-on-a-chip“-Plattform mit einer elektrischen Ebene aus Siliziumbasis, der mikrofluidischen Ebene aus einem softlithographisch erzeugtem PDMS-Substrat und einem integrierten Field Programmable Gate Array (FPGA) zur Adressierung der Elektroden. Im Hintergrund ist der bei caesar prozessierte 6“-Siliziumwafer mit den integrierten Mikroelektrodenstrukturen dargestellt. Rechts: Neues Multilayermaskendesign. Auf der grau unterlegten Chipfläche von 1,5 cm² sind 5.338 Mikroelektroden konzipiert, welche sich online-digital ansteuern lassen.

tionen auf der Mikroskala. Beispiele dafür sind talelektroniksteuerung eine neue Qualität der die räumlich und zeitlich aufgelöste Verfolgung Steuerung biochemischer Prozesse.

enzymkatalysierter Reaktionen oder die Ein weiteres Anwendungspotential bieten die Erzeugung lokaler Konzentrationsgradienten in hybriden Mikrofluidiksystemsysteme bei der der miniaturisierten Analyseumgebung. Unter Entwicklung lebensnaher selbstorganisierender anderem lassen sich damit chemische und programmierbarer Systeme im Mikro- und Reaktionen sowohl gezielt starten, beenden Nanobereich, z.B. nichtbiologischer, lebender oder hinsichtlich der gewünschten Reak- Zellen. BioMIP ist Koordinator des EU-Projekts tionsprodukte optimieren. Diese neuartigen, "PACE" (Programmable Artificial Cell Evolution; programmierbaren Bioprozessoren verkörpern www.istpace.org), welches mit einem Konsor- durch ihre integrierte, rekonfigurierbare Digi- tium aus 13 Partnern und kooperierenden

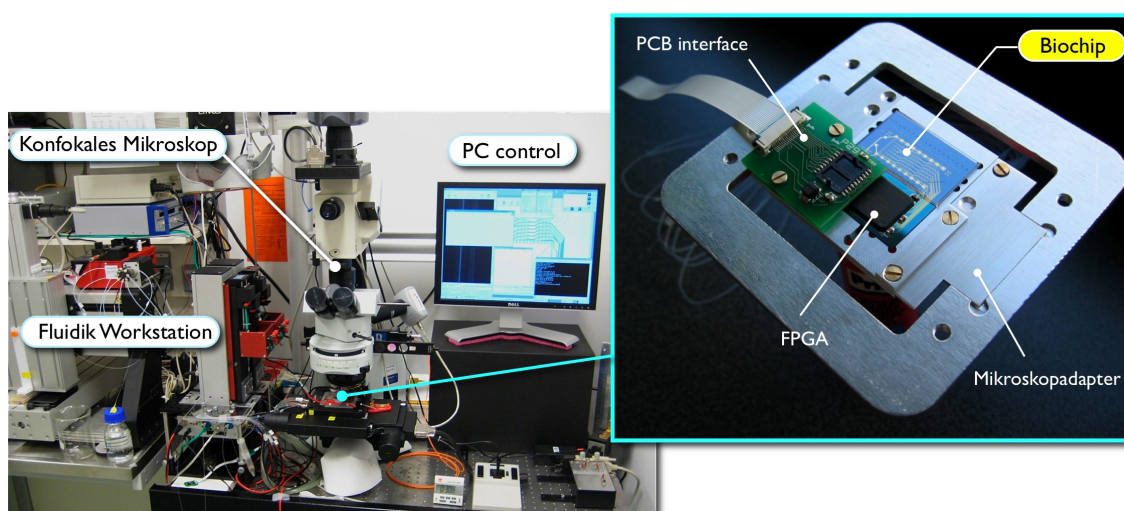


Abb. 9: Experimentelle Plattform: Konfokaler Mikroskop Aufbau mit einem elektronisch steuerbaren Mikrofluidikchip zur Fluoreszenzdetektion von Biomolekülen mittels PC-Steuerung.

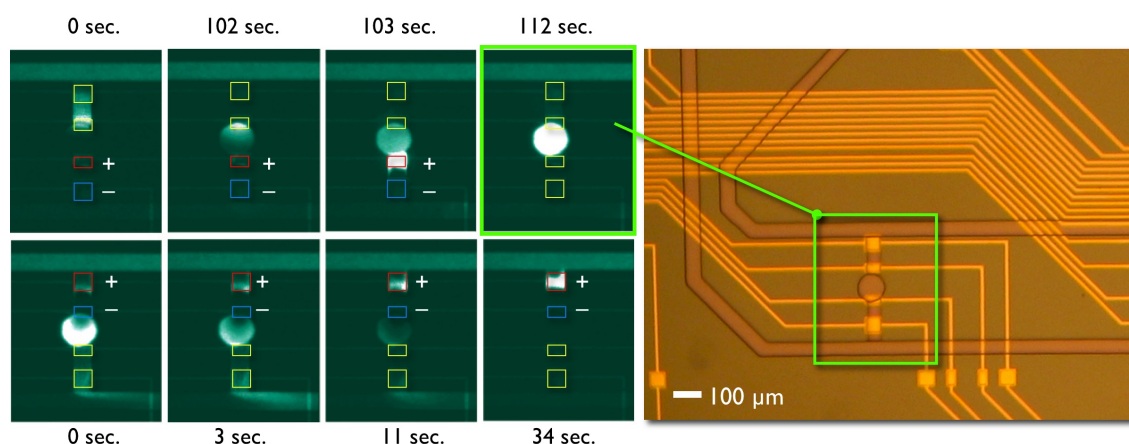


Abb. 10: Elektronische Molekülbarrieren: Gezeigt ist hier das programmierbare Befüllen und Entleeren eines mikrofluidischen Zellkompartiments durch elektro-osmotischen Volumentransport am Beispiel der Fluoreszenzdetektion einer mit Rhodamine-6G markierter ssDNA (22 bp).

Gruppen aus Europa und Los Alamos (USA) einen entscheidenden Beitrag für die zukünftige Entwicklung künstlicher Zellen liefert. So können die elektrischen Felder neben der gezielten Bildung von Kompartimenten auch andere Zellfunktionen, wie z.B. die Molekülsortierung und die Bildung von Konzentrationsgradienten, bewirken. Daraus folgt wiederum eine Vielzahl von Anwendungen, wie z.B. Reaktionskontrolle in chemischen Replikationssystemen, Bildung von elektronischen Barrieren bzw. Membranen zur Kontrolle der Diffusion (Abb. 10), kontrollierte Dosierung katalytisch aktiver Substanzen und Optimierung von stark konzentrationsabhängigen Systemen, wie z.B. die Bildung von Mizellen.

Derzeit arbeiten Ingenieure und Wissenschaftlern von BioMIP und caesar in enger Kooperation an der Entwicklung eines neuen Multi-elektrodenlayerdesigns des dynamisch programmierbaren Biochips, um die Integrationsdichte um ein Vielfaches zu erhöhen. Auf einer Fläche von etwa 1,5 Quadratcentimetern werden dann weit über 5000 einzelne Mikroelektroden untergebracht sein, welche in einem gleichmäßigen Raster angeordnet sind (Abb. 8, rechts). Damit lassen sich zukünftig kombinatorische Untersuchungen und die Optimierung komplexer biochemischer Reaktionen on-chip effizient verfolgen.

Bistabiler Mikroschalter: UV-LIGA-Technik für MEMS-Mikroschalter auf Basis von Mikrogalvaniktechnologie

UV-LIGA-Technik und Mikrogalvanik bieten eine hohe Flexibilität und eine große Materialvielfalt für die Herstellung von MEMS-Produkten - beispielsweise für die Realisierung von Mikroschaltern. Elektrische Kontaktmaterialien, Funktionsschichten für Aktoren wie auch Opferschichten zur Freisetzung der beweglichen Elemente können geeignet mittels strukturierbarer galvanischer Metallabscheidung hergestellt werden.

NB Technologies hat in Zusammenarbeit mit Instituten und der Industrie einen thermisch aktivierbaren, bistabilen MEMS-Schalter entwickelt, der in der Telekommunikation vorteilhaft für flexibel konfigurierbare Punkt-zu-Punkt-Verbindungen eingesetzt werden kann. Der Schalter muss Lastanforderungen von einigen 100mA erfüllen und für Spannungen von bis zu 400V ausgelegt sein. Stabile thermomechanische Funktionselemente werden aus Nickel/Mangan (NiMn)-Legierungen und Kontaktmaterialien aus Gold/Paladium (Au/Pd) hergestellt.

stellt. Das hermetische Verkapseln erfolgt mittels eutektischem Bonden mit ebenfalls galvanisch abgeschiedenen, metallischen Bondpartnern.

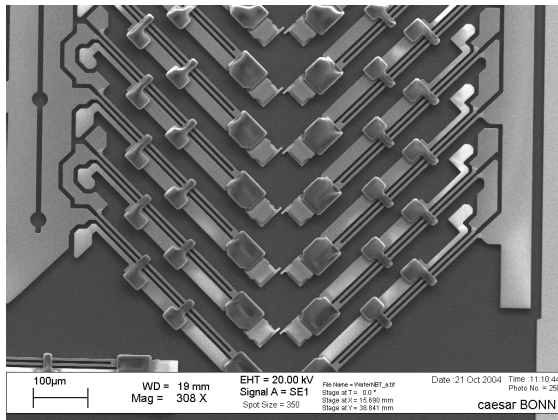


Abb. 11: Mikroschalterarray (Bildmitte: Au/Pd-Schalterkontakte).

In der Kooperation NB Technologies und caesar wurde zuerst das „alte“ Herstellungskonzept verifiziert und Mikroschalterarrays für weitergehende Tests unter Einsatzbedingungen realisiert (Abb. 11). Aus diesen Ergebnissen ergab sich ein technologischer Optimierungsbedarf, der insbesondere durch die Kombination der galvanischen Funktionsschichten (Schalterbalken) mit Bulk-Silizium-Elementen erreicht wurde. Zu diesem neuen und sehr innovativen Technologiekonzept gehören weiterhin die Entwicklung einer metallischen Waferdurchkontaktierung und - auf der Rück-

seite des Wafers - die galvanische Herstellung einer mehrlagigen elektrischen Verdrahtung mit Isolationszwischenschichten aus Polymeren.

Das Forschungsinstitut caesar hat mit den Mustern des optimierten MEMS-Schalter-Arrays einen langzeitstabilen Funktionsnachweis erbracht und wesentliche Meilensteine bei der Umsetzung der Wafer-Durchkontaktierung und Rückseiten-Verdrahtung erreicht.

Mikroheizplatte

Von der caesar-Arbeitsgruppe „Kombinatorische Materialwissenschaften“ wurde mit Unterstützung des Reinraumteams eine Mikroheizplatte in Dünnschichttechnologie für Anwendungen im „High Throughput Screening“ entwickelt. Die Mikroheizplatten bestehen in erster Linie aus einer Siliziumoxid/Siliziumnitrid ($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$)-Membrane in die eine Platin (Pt)-Heizmäander und Pt-Elektroden zur Widerstandsmessung der zu charakterisierenden Schichten als dünne Filme eingebettet sind (Abb. 12). Die Platinmäander der Heizung funktioniert gleichzeitig als Temperaturfühler und erlaubt damit die Regelung der Heizung. Die Heizplatte erreicht sehr schnell und exakt kontrolliert Temperaturen von bis zu 1.200 °C. Aufheizzeiten liegen im Bereich von 10.000 °C/s.

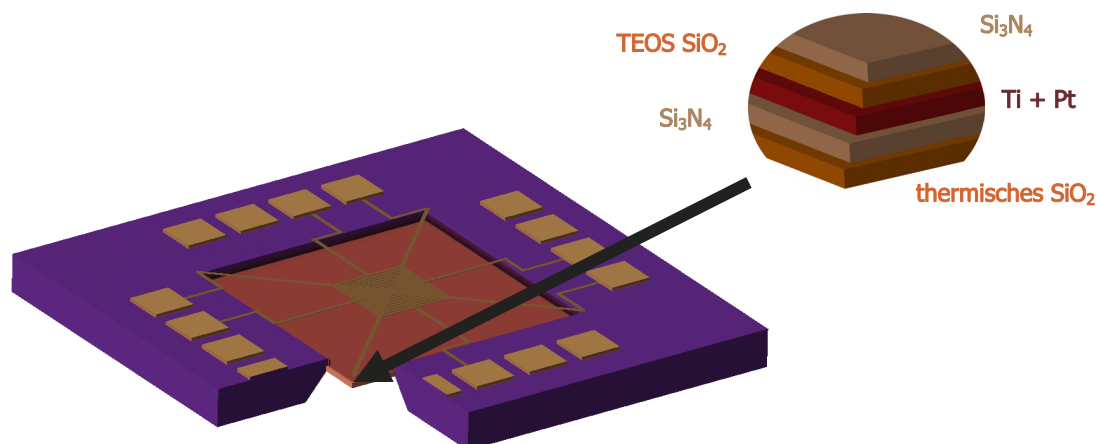


Abb. 12: Schematischer Aufbau der Mikroheizplatte: Links: Membran und elektrische Kontaktierung, Rechts (oben): Schichtaufbau der Membran.

Die Mikroheizplatte hat folgenden Abmessungen (typischerweise):

Membran	3000 x 3000 μm^2
Heizfläche	1000 x 1000 μm^2
Membrandicke	1,13 μm

Mit der Mikroheizplatte kann ein gut kontrollierter Ausheilprozess (Annealing) des abgeschiedenen Materials vorgenommen und die Temperatur während der Abscheidung (Aufdampfen, Sputtern) gezielt variiert werden. Mit dieser in-situ Temperatur-Steuerung und -Messung können wissenschaftlich-technologische Rückschlüsse auf Morphologie, Phasenübergänge und weitere physikalische Eigenschaften der neu hergestellten Materialkombinationen gezogen werden. Damit steht für die Materialwissenschaft ein extrem schnelles und höchst präzises Instrument für die Material-Charakterisierung und die -Modifizierung zur Verfügung.

Quellen

1. Perpeet M., Biosensor GmbH, Bonn (2007).
2. Wagler P., BioMIP Ruhr-Universität Bochum, Dortmund (2007).
3. Becker M., NB Technologies GmbH, Bremen / Bonn (2007).
4. Ludwig A., Ehmann M., Ruhr-Universität Bochum / caesar Bonn (2007).

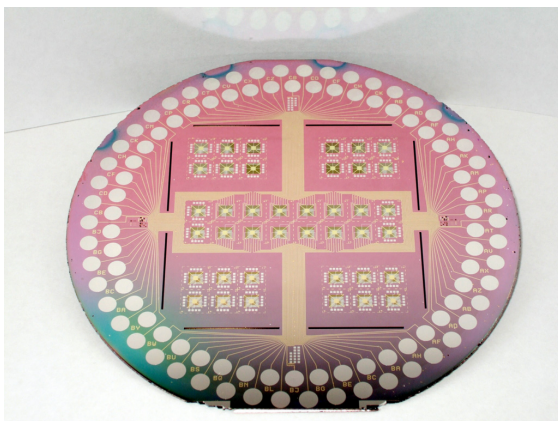


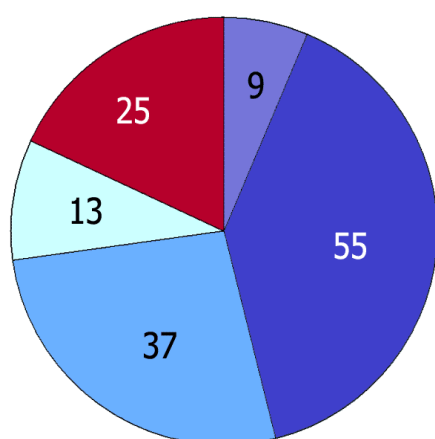
Abb. 13: Mikroheizplatten-Array auf einem 4"-Si-Wafer.

Die Anordnung eines Mikroheizplatten-Arrays auf einem 4"-Si-Wafer zeigt Abb. 13. Die elektrische Kontaktierung wird über die Pads am Waferrand per Federkontakte oder gebondeten Drähten gemacht.

Personal - Finanzen

Mitarbeiterstruktur

Bei der Stiftung caesar waren bis Ende 2007 insgesamt 177 Mitarbeiter angestellt, davon 143 im wissenschaftlich-technischen Bereich und 25 in der Verwaltung.



- Arbeitsgruppenleiter
- Mitarbeiter in Arbeitsgruppen
- wiss.-techn. Dienste
- wiss. Dienste einschließlich IT/Netze
- Verwaltung (Finanzen, Personal, Einkauf, Facility Management, etc.)

Personalentwicklung

Die Personalentwicklung bei caesar ist durch die Neuausrichtung des Forschungszentrums geprägt. 32 Mitarbeiter aus dem wissenschaftlich-technischen Bereich, die in auslaufenden Arbeitsgruppen arbeiteten, haben caesar 2007 verlassen. Diese Tendenz wird sich 2008 fortsetzen. Gleichzeitig werden in 2008 Wissenschaftler für den Bereich Neurowissenschaften eingestellt, sodass eine starke Fluktuation herrschen wird.

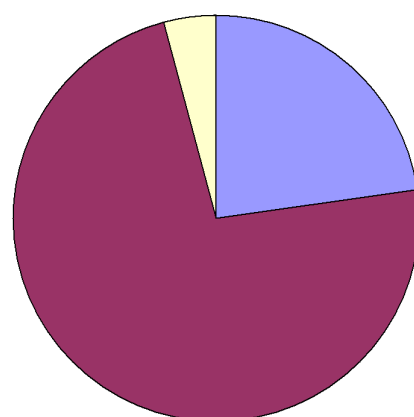
Vermögen der Stiftung

Die Bundesrepublik Deutschland und das Land Nordrhein-Westfalen haben caesar mit einem Stiftungskapital in Höhe von 383.400 T€ ausgestattet. Von der Stadt Bonn hat die Stiftung weitere 6.681 T€ im Zuge des Grundstückserwerbes erhalten.

Gemäß Stiftungsgeschäft hat caesar aus dem Kapital das Gebäude und die Erstausrüstung des Forschungszentrums finanziert.

Die Stiftung hat 286.323 T€ des Stiftungskapitals langfristig am Kapitalmarkt angelegt. Dieses Kapital ist in 3 Spezialfonds angelegt, die vom Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft verwaltet werden. Die Erträge aus der Kapitalanlage werden als Grundfinanzierung der Forschungstätigkeit verwendet.

Das Vermögen der Stiftung caesar gliedert sich wie folgt:

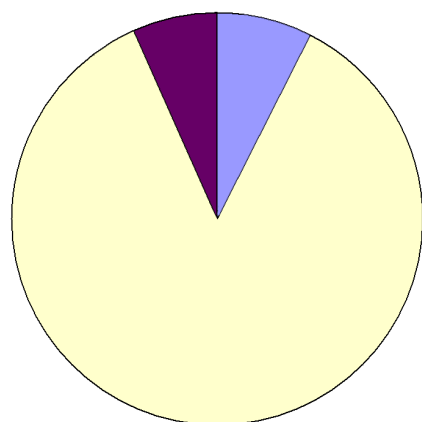


- Sachanlagen
- Finanzanlagen
- Sonstige

Sachanlagen	90.500.051
Finanzanlagen	288.525.332
Sonstige	16.463.350
Bilanzsumme	395.488.733

Einnahmen

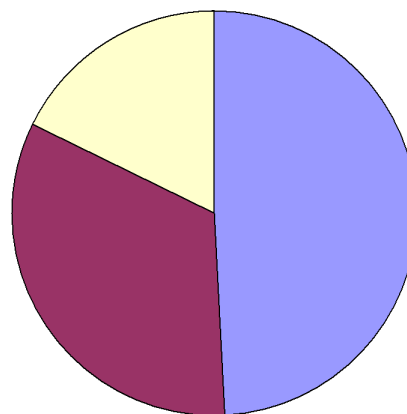
Insgesamt lassen sich die Einnahmen der Stiftung wie folgt gliedern:



- Umsatzerlöse
- Erträge aus Förderprojekten
- Erträge aus Wertpapieren und Zinsen

Ausgaben

Für 2007 ergibt sich folgende Ausgabenstruktur:



- Personalaufwand
- Sachaufwand
- Abschreibungen

Umsatzerlöse	1.536.387	Personalaufwand	8.628.618
Erträge aus Förderprojekten	885.639	Sachaufwand	5.819.273
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	14.836.137	Abschreibungen	3.119.390
Gesamteinnahmen	17.258.163	Gesamtausgaben	17.567.282

Jahresbilanz 2007

Abschluss zum 31. Dezember 2007 (Angaben in €)

Aktiva	01.01.07	Zugänge	Umgliederungen	Abgänge	Abschreibungen	31.12.07	31.12.06
A. Anlagevermögen							
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	123.230	34.841		1.269	88.678	68.124	123.230
II. Sachanlagen							
Grundstücke & Bauten *)	71.327.848	10.139			0	71.337.987	71.327.848
Andere Anlagen	21.984.709	343.181	16.634	278.424	3.030.713	19.035.388	21.984.709
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	74.507	679	-16.634		0	58.552	74.507
Summe aus II.	93.387.064	353.999	0	278.424	3.030.713	90.431.927	93.387.064
III. Finanzanlagen							
Beteiligungen	61.110	16.032				77.142	61.110
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögens	287.698.307					287.698.307	287.698.307
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung		749.884				749.884	0
Summe aus III.	287.759.417	765.916	0	0	0	288.525.332	287.759.417
Summe für A.	381.269.711	1.154.755	0	279.693	3.119.390	379.025.383	381.269.711
B. Umlaufvermögen							
I. Vorräte	497.225					388.577	497.225
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände							
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	772.941					752.543	772.941
Sonstige Vermögensgegenstände	1.176.684					1.121.984	1.176.684
Summe aus II.	1.949.624					1.874.527	1.949.624
III. Wertpapiere	6.487.750					8.973.750	6.487.750
IV. Sonstige Wert-papiere	5.479.711					4.999.294	5.479.711
Summe für B.	14.414.310					16.236.148	14.414.310
C. Rechnungsabgrenzungsposten						227.202	216.227
Gesamtes Vermögen						395.488.733	395.900.247

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen wird eine Instandhaltungsrücklage gebildet.

Passiva	31.12.07	31.12.06
A. Eigenkapital		
I. Stiftungsvermögen		
Finanzierungskapital	286.323.453	286.323.453
Investitionskapital	97.145.457	97.145.457
Zustiftung Stadt Bonn	6.681.051	6.681.051
Zuführung Rücklage	1.283.956	1.283.956
Summe aus I.	391.433.918	391.433.918
II. Rücklagen		
Freie Rücklage gemäß § 58 Nr. 7a AO	1.963.179	929.277
III. Ergebnis		
Jahresfehlbetrag /-überschuss	-309.119	1.033.902
Summe für A.	393.087.978	393.397.097
B. Rückstellungen		
Instandhaltungsrücklage *)	949.800	500.000
Sonstige Rückstellungen	160.018	224.739
Summe für B.	1.109.818	724.739
C. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	961.443	1.449.826
Sonstige Verbindlichkeiten	306.423	262.948
Summe für C.	1.267.866	1.712.775
D. Rechnungsabgrenzungsposten	23.072	65.637
Gesamtes Vermögen	395.488.733	395.900.247



Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2007 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

- ... Prof. Dr. Peter Gruss, Präsident der Max-Planck-Gesellschaft (MPG)
Vorsitzender
- ... Prof. Dr. Herbert Jäckle, Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft (MPG)
stellvertretender Vorsitzender
- ... Prof. Dr. Ulrich Hartl, Max-Planck-Institut für Biochemie
- ... Prof. Dr. Florian Holsboer, Max-Planck-Institut für Psychiatrie
- ... Prof. Dr. Wieland B. Huttner, Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik
- ... Prof. Dr. Martin Stratmann, Max-Planck-Institut für Eisenforschung GmbH
- ... Prof. Dr. Joachim Spatz, Max-Planck-Institut für Metallforschung
- ... Prof. Dr. Heinz Wässle, Max-Planck-Institut für Hirnforschung
- ... Staatssekretär Prof. Dr. Frieder Meyer-Krahmer, Bundesministerium für Bildung und Forschung
- ... MinDir Dr. Christian D. Uhlhorn, Bundesministerium für Bildung und Forschung
- ... Uwe Schummer, Mitglied des Deutschen Bundestages
- ... Staatssekretär Dr. Michael Stückradt, Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen
- ... Helmut Stahl, Mitglied des Landtages von Nordrhein-Westfalen
- ... Dr. Andreas Barner, Boehringer Ingelheim GmbH
- ... Bärbel Dieckmann, Oberbürgermeisterin der Stadt Bonn
- ... Prof. Dr. Matthias Winiger, Rektor der Universität Bonn

Vorstand

Bis zum 31.12.2007 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

- ... Prof. Dr. Herbert Waldmann, Geschäftsführender Direktor
- ... Prof. Dr. Erwin Neher, Wissenschaftlicher Direktor
- ... Dr. Hartwig Bechte, Kaufmännischer Geschäftsführer

Seit 01.01.2008 ist der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

- ... Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp, Wissenschaftlicher Direktor
- ... Dr. Hartwig Bechte, Kaufmännischer Geschäftsführer

Herausgeber	Stiftung caesar Ludwig-Erhard-Allee 2 D-53175 Bonn
Redaktion und Konzept	Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp Dr. Jürgen Reifarth
Textlayout und Umschlagfoto	Dr. Corinna Bernsdorff
Umschlag	Heike Sieber

© 2008	Stiftung caesar Ludwig-Erhard-Allee 2 D-53175 Bonn Tel.: +49 (0)228 9656 - 0 Fax: +49 (0)228 9656 - 111 E-mail: office@caesar.de http://www.caesar.de
--------	--