Fraunhofer
IBMT

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK IBMT

Thomas Velten (Hrsg.)

ROLLE-ZU-ROLLE PRODUKTIONSANLAGE UND -PROZESS ZUR EFFIZIENTEN UND STRUKTURIERTEN IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN AUF BIOKOMPATIBLEN FOLIENSUBSTRATEN

GEFÖRDERT VOM
Bundesministerium für Bildung und Forschung

innobasque
berrikuntzaren euskal agentzia
agencia vasca de la innovación

mnt-era.net

Rolle-zu-Rolle Produktionsanlage und -prozess zur effizienten und strukturierten Immobilisierung von Proteinen auf biokompatiblen Foliensubstraten

Ergebnisbericht des BMBF Verbundprojektes ERANET-MNT-BIOREEL

Dr. Thomas Velten (Hrsg.)

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, St. Ingbert

Die diesem Bericht zugrunde liegenden Arbeiten der deutschen Projektpartner wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) innerhalb des Rahmenkonzeptes „Forschung für die Produktion von morgen“ mit den Förderkennzeichen 02PO2880 und 02PO2881 gefördert und vom Projektträger Karlsruhe (PTKA) betreut.
Die diesem Bericht zugrunde liegenden Arbeiten der spanischen Projektpartner wurden mit Mitteln von Innobasque (la Agencia Vasca de la Innovación-Berrikuntzaren Euskal Agentzia) gefördert und von Innobasque betreut. Ein Teil der Arbeiten des spanischen Projektpartners Tekniker wurde zudem von der Europäischen Kommission im Rahmen des FP7 (EUMINAfab) gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Vorwort

Es ist bekannt, dass durch die Funktionalisierung von Zellkulturoberflächen (z.B. in Bioreaktoren) mit biologischen Faktoren wie Proteinen oder Wachstumsfaktoren das Verhalten von Zellen beeinflussbar ist. Neben der gesamtflächigen Oberflächenmodifizierung bietet eine gezielte kunden- und anwendungsspezifische Mikrostrukturierung vielfältigere Möglichkeiten der Steuerung von Zellen und ist dabei gleichzeitig ressourcenschonend.

Diese Tatsache wurde bisher erst in geringem Maß von der modernen biotechnologischen Industrie genutzt. Es besteht daher ein starker Bedarf an Produktionsausrüstungen, welche eine effiziente mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung im industriellen Maßstab erlauben. Heutzutage werden die notwendigen biologischen Materialien durch komplexe und teure Kulturmedien oder durch sogenannte Feeder-Zellen bereitgestellt. Letztere sind in ihrer Herstellung anfällig für virale Infektionen wodurch ihr Einsatz in der regenerativen Gewebeherstellung nicht möglich ist. Des Weiteren konnten Mikrostrukturen bisher nur auf spröden und starren Materialien und kleinflächig hergestellt werden. Eine hocheffiziente, großflächige, industrielle Fertigungsmethode wie das Rolle-zu-Rolle Verfahren mit flexiblen Materialien gab es nicht.

Ziel war es, einen großflächigen, rotativen Immobilisierungsprozess von biologischen Molekülen auf biokompatiblen Polymerfolien mit Eignung für In-Vitro-Zellkultivierungen zu entwickeln und eine effiziente Rolle-zu-Rolle Produktionslinie aufzubauen. Der Demonstrator sollte dabei die strukturierte Bio-Funktionalisierung von Polymerfolien in einem einzigen Prozessdurchlauf ermöglichen. Die biologischen Strukturen in mikrostrukturierter Anordnung sollten ihre dreidimensionale Struktur und somit ihre biologische Aktivität behalten und dabei eine laterale Strukturauflösung weniger als 10 Mikrometer aufweisen. Die biologische Effizienz und Wirksamkeit der Methode sollte beispielhaft durch die Einflussnahme der aufgebrachten Mikrostrukturen auf das Zellverhalten gezeigt werden.

Das Projekt BIOREEL verknüpfte die Wissensgebiete der Biotechnologie und Zellbiologie mit produktionstechnischen Rolle-zu-Rolle Prozessverfahren im Mikromaßstab. Erste Stempeldruckexperimente mit unterschiedlichen Mikrostrukturen an ausgewählten Folienmaterialien wurden unter anderem nach Zellmorphologie, -adhäsion, -migration und -proliferation bewertet. Diese Form des Tiefdrucks von Proteinen wurde versuchsweise in eine einfache Rolle-zu-Rolle-Anlage implementiert. Die aus den Vorarbeiten erarbeiteten Erkenntnisse flossen anschließend in den Aufbau einer demonstrativen Rolle-zu-Rolle Produktionslinie ein. Die mit diesem Demonstrator funktionalisierten Folien wurden schließlich bezüglich ihrer biologischen Wirkung auf das Verhalten Zellen in-vitro evaluiert.

Diese Ergebnisse werden zukünftig in fast alle Fachrichtungen der Biowissenschaften transferierbar sein, in denen mikrostrukturierte Biopolymere eingesetzt werden. Die Ergebnisse können beispielsweise in der Arzneimittelentwicklung, bei der Entwicklung von künstlichen Geweben und der Standardisierung von Transplantaten eingesetzt werden. Ein wichtiger Markt stellt die In-Vitro-Diagnostik und die damit verbundenen Point-of-Care Anwendungen dar. Die Projektergebnisse eröffnen neuartige Anwendungen für

Präge- und Druckwalzen mit verbesserten Mikrostrukturierungsprozessen sowie für die Herstellung von Sondermaschinen für den Biotechnologiemarkt.

Die deutschen Partner in diesem Verbundprojekt wurden im Rahmenkonzept „Forschung für die Produktion von morgen“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Allen sei an dieser Stelle gedankt, die mit ihrem Wissen, Engagement und ihren Erfahrungen an dieser grenzüberschreitenden Forschungs- und Entwicklungsarbeit mitgewirkt haben.

Projektträger Karlsruhe
Bereich Produktion und Fertigungstechnologien (PTKA-PFT)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Stefan Scherr
Oktober 2013

BETREUT VOM

Zuwendungsempfänger:	**Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik** Ensheimer Str. 48 66386 St. Ingbert, Deutschland
Förderkennzeichen:	02PO2880 ff
Vorhabenbezeichnung:	BIOREEL– Rolle-zu-Rolle Produktionsanlage und –Prozess zur effizienten Immobilisierung von Proteinen
Laufzeit des Vorhabens:	1. Februar 2010 - 31. Juli 2013
Koordinator:	Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik Ensheimer Str. 48, 66386 St. Ingbert, Deutschland
Koordinator	**Dr.-Ing. Thomas Velten** Telefon: +49 (0)6894 - 980 – 301 Fax: +49 (0)6894 - 980 – 152 E-Mail: thomas.velten@ibmt.fraunhofer.de
Projektpartner und Autoren	Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) Ensheimer Strasse 48, 66386 St. Ingbert, Deutschland *Thomas Velten, Thorsten Knoll, Erwin Gorjup, Axel Brenner* Saueressig GmbH + Co. KG (Matthews Brand Solutions) Gutenbergstrasse 1-3, 48691 Vreden, Deutschland *Gerald Jenke* Tekniker C/ Iñaki Goenaga,5, 20600 Eibar, Gipuzkoa, Spanien *Sabino Azcarate, Xabier Mendibil* Moldelan Tech, S.L. C/Antigua nº4, 20577 Antzuola, Gipuzkoa, Spanien

Inhalt

1 Ziel des Forschungsprojekts 6
1.1 Projektpartner 7
2 Stand der Technik zu Projektbeginn 8
2.1 Stand der Technik in den anvisierten biotechnologischen Anwendungsfeldern 8
2.2 Stand der Technik in den anvisierten Produktionstechniken 9
3 Erzielte Ergebnisse 11
3.1 Struktur- und Folienauswahl 12
3.2 Strukturierungsprozess für Druckwalzen 17
3.2.1 Herstellung polymerbasierter Druckformen für Flexo- und Tiefdruck 17
3.2.2 Herstellung von Flexodruckformen aus PDMS 19
3.2.3 Herstellung von Tiefdruckyzylindern 20
3.2.4 Herstellung eines Nickeleinsatzes für Tiefdruckzylinder 21
3.3 Prozess zur mikrostrukturierten Funktionalisierung von Polymerfolien 23
3.3.1 Druckanlagen zur Prozessetablierung im Flexo- und Tiefdruckverfahren 23
3.3.2 Versuche im Flexodruckverfahren 24
3.3.3 Versuche im Tiefdruckverfahren 25
3.4 Evaluierung der oberflächenfunktionalisierten Polymerfolien 27
3.5 Produktionsanlage zur Rolle-zu-Rolle Funktionalisierung von Folien 30
4 Bewertung der Ergebnisse 32
5 Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliche Anwendungsgebiete 33
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 33
5.2 Mögliche Anwendungsgebiete 34
6 Danksagung 36
7 Literaturverzeichnis 37

1 Ziel des Forschungsprojekts

Die in diesem Bericht beschriebenen Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten beziehen sich auf das Rahmenkonzept "Forschung für die Produktion von morgen" in der 27. Bekanntmachung vom 13. März 2009 „Effiziente Produktionsausrüstungen für die Herstellung von Mikro- und Nanokomponenten innerhalb transnationaler Forschungsprojekte des europäischen MNT ERA-Net“.

Das Vorhaben BIOREEL leistet einen Beitrag zum Gebiet der Mikro- und Nanotechnologie einschließlich deren Produktionstechnik und hier speziell zum Anwendungsfeld „Verarbeitung von Materialien (Oberflächenfunktionalisierung und -strukturierung)“.

BIOREEL ist ein interdisziplinäres Forschungsprojekt, welches neue Erkenntnisse aus den Wissensgebieten Biotechnologie und Zellbiologie sowie der Produktionstechnik und der Mikrotechnik übernimmt und vereint.

In BIOREEL gehen wir weit über den Stand der Technik in der Oberflächenfunktionalisierung hinaus. Dies betrifft vor allem die Effizienz der angestrebten Rolle-zu-Rolle Produktionsanlage, welche eine ressourcenschonende mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung mit hohem Durchsatz bei niedrigsten Kosten erlaubt. Die Vorteile der Softlithographie (hohe laterale Strukturauflösung) werden mit den Vorteilen industrieller Druckprozesse kombiniert, welche das Bedrucken großflächiger Substrate bei hoher Durchlaufgeschwindigkeit erlauben. Diese Kombination resultiert in einer hoch effizienten Produktionsausrüstung, die das mikrostrukturierte Immobilisieren von Proteinen auf Polymerfolien in einem rotativen Prozess ermöglicht. Der Rolle-zu-Rolle Immobilisierungsprozess ist hochinnovativ und die effizienteste Methode überhaupt, um Proteine in mikrostrukturierter Anordnung auf ein Substrat zu übertragen. Dieses Konzept erlaubt erstmals die kosteneffiziente Herstellung der angestrebten Zellkulturgefäße im industriellen Maßstab.

Bisher werden kommerziell erhältlich beschichtete Zellkulturgefäße vorwiegend durch Spin-Coating oder Elektrospinning hergestellt. Durch die hohe Durchlaufgeschwindigkeit der Materialien beim Rolle-zu-Rolle Prozess ist ein wesentlich höherer Durchsatz bei gleichzeitig geringeren Kosten zu erwarten. Da nur das benötigte Druckmedium aufgenommen und transferiert wird, ist das Rolle-zu-Rolle Verfahren wesentlich ressourcenschonender als die herkömmlich eingesetzten Techniken. Das geplante Verfahren erlaubt auch bei anderen Anwendungen eine im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren wesentlich höhere Flexibilität. Unter anderem lässt sich dieses kontinuierliche Verfahren sehr effektiv mit weiteren Prozessen (z.B. einer Plasmabehandlung) kombinieren. Vorteilhaft beim Rolle-zu-Rolle Prozess ist auch die Möglichkeit der strukturierten Proteinimmobilisierung, um z.B. optimierte Oberflächen für verschiedene Zelltypen in einem Kulturgefäß zu realisieren. Dabei lassen sich mechanische Strukturen, die im µm-Bereich das Zellwachstum beeinflussen, mit Proteinanordnungen kombinieren. Diese Anwendungen sind zurzeit nur manuell realisierbar und kommerziell nicht erhältlich. Durch Optimierungen und verschiedene Druckzylindergeometrien lässt sich erwarten, dass hochkomplexe Funktionalisierungen mit z.B. örtlich begrenztem Aufbringen von mehreren verschiedenen Proteinen möglich sein werden. Dies würde z.B. die Differenzierung von Stammzellen hin zu verschiedenen Zielzellen auf dem gleichen Substrat möglich machen und mittel- bis langfristig vielversprechende Ansätze für Anwendungen in der regenerativen Medizin erlauben.

Vorstellbar ist auch die einfache Effizienzsteigerung des Druckprozesses und damit der Produktion durch eine Vergrößerung der Druckzylinder. So kann eine kontinuierliche und damit sehr kostengünstige Herstellung von Oberflächen erreicht werden. Existieren-

de Verfahren und Produktionsprozesse sind diskontinuierlich und höhere Stückzahlen können nur über die Einrichtung neuer Anlagen realisiert werden.

BIOREEL ist stark marktorientiert und strebt letztendlich die Entwicklung einer hocheffizienten Produktionslinie für die Massenproduktion großflächiger biofunktionalisierter Polymerfolien an. Die funktionalisierten Oberflächen bieten optimale Bedingungen bei In-vitro-Zellkulturen und adressieren direkt an den Biotechnologiemarkt. Im Detail hat das Projekt folgende Ziele:

- Identifikation geeigneter Polymermaterialien für die angestrebte mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung im Rolle-zu-Rolle Verfahren,
- Herstellung von Druckzylindern mit einer lateralen Strukturauflösung von weniger als 10 µm,
- Entwicklung eines Rolle-zu-Rolle Prozesses und einer hocheffizienten Rolle-zu-Rolle Produktionslinie für die mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung großflächiger biokompatibler Folien mit Eignung für die In-vitro-Zellkultivierung,
- Nachweis der biologischen Effizienz der mit dem Rolle-zu-Rolle Verfahren hergestellten funktionalisierten Polymerfolien,
- Aufbau eines Demonstrators in Form einer voll funktionstüchtigen Rolle-zu-Rolle Produktionsanlage für die effiziente Oberflächenfunktionalisierung.

1.1 Projektpartner

Das Projektkonsortium umfasst vier Partner, zwei aus Deutschland und zwei aus Spanien. Die grenzüberschreitende Zusammenarbeit im Rahmen des MNT ERA-NET, einem Netzwerk aus regionalen und nationalen Förderorganisationen im Bereich der Mikro- und Nanotechnologien in Europa, mit spanischen Projektpartnern erlaubt dabei einen Zugang zur Entwicklung von neuen Mikrofertigungstechnologien und zu kleineren Walzenstrukturen. Konkret entwickeln die baskischen Projektpartner Prozesse, um Druckwalzen mit Mikrostrukturen zu versehen, die im Bereich <10 µm liegen.

Das Fraunhofer IBMT wird zu druckende Mikrostrukturen auswählen, Methoden entwickeln um Proteine auf vorstrukturierten Polymerfolien zu fixieren und um Proteine direkt zu drucken. Weiterhin ist die biologische Effektivität der immobilisierten Proteine zu evaluieren. Die Tests zur Evaluation der produzierten Folien erfolgen unter Verwendung bereits etablierter Zellkulturmethoden wie Proliferations- und Vitalitätsmessungen.

Basierend auf den Ergebnissen des Fraunhofer IBMT sowie auf dem firmeninternen Know-How im Bereich von Rolle-zu-Rolle Produktionsanlagen wird Fa. SAUERESSIG eine Produktionslinie aufbauen, welche in der Lage ist die Oberflächenfunktionalisierung mit Proteinen in einem Rolle-zu-Rolle Prozess durchzuführen.

2 Stand der Technik zu Projektbeginn

2.1 Stand der Technik in den anvisierten biotechnologischen Anwendungsfeldern

Bereits früh in der Geschichte der In-vitro-Zellkultur war klar, dass die Kultivierung von Zellen egal ob tierischen, pflanzlichen oder menschlichen Ursprungs auf Glas- oder später auf Plastikoberflächen (Polystyrol) eine künstliche und unphysiologische Weise der Kultivierung darstellt. Beginnend in den frühen neunziger Jahren, wurden Effekte untersucht, die auftreten, wenn künstliche Strukturen extrazelluläre Matrixkomponenten von Geweben imitieren (Wood, 1988, Clark et al., 1991). In vivo besteht die extrazelluläre Matrix vornehmlich aus einem Gemisch aus Proteinen (Elastin, Kollagen, Fibronektin, Laminin) und Polysacchariden (Glykosaminoglykane). Seither wurde gezeigt, dass fast alle untersuchten Gewebezellen durch mikro- und nanostrukturierte Oberflächen dergestalt beeinflusst werden, dass es zu Änderungen in der Zellmorphologie, der Adhäsion und der Organisation des Zytoskeletts kommt. Indem man das Augenmerk nur auf Struktureffekte richtet, wird die Tatsache außer Acht gelassen, dass die extrazelluläre Matrix, als prominenteste In-vivo-gewebeentwickelnde-Komponente, ebenso als zellulärer Informationsvorrat dient wie auch als Reservoir für Wachstumsfaktoren und andere Proteine, den Zellen zusätzlich zum strukturellen also auch einen chemischen Effekt liefert. Bei der In-vitro-Kultivierung werden diese notwendigen Stoffe durch komplexe und teure Supplemente in den Kulturmedien oder durch sogenannte Feeder-Zellen bereitgestellt. Weil Feeder-Zellen gewöhnlich von Tieren stammen und anfällig für virale Infektionen sind, ist der Gebrauch dieser im regenerativen Tissue-Engineering nicht möglich. Publikationen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Ankopplung von Proteinen an strukturierte Substrate eine mögliche Alternative darstellt und in ersten Zellkulturexperimenten führte die Kopplung spezifischer Proteine an Substrate zu einer reproduzierbareren und steuerbaren Zellkultur (Cetinkaya et al., 2007, Nagaoka et al., 2006). Im Bereich der Stammzellforschung konnte durch die Modifikation des Substrates mit Proteinen oder Gelen unterschiedlicher Steifigkeit das Differenzierungsverhalten der Stammzellen gesteuert werden (Lutolf et al., 2009, Stevens et al., 2005, Rowlands et al., 2008).

Die bekannten Methoden zur Substratstrukturierung und zum Koppeln der Proteine erfordern bisher die Durchführung komplexer Prozesse, wie z.B. das Spin-Coating, welches zudem zeitaufwändig und wenig ressourcenschonend ist, da das meiste Material abgeschleudert wird und somit verloren ist. Weiterhin bekannt ist das Micro-Contact-Printing, welches zwar in der Lage ist beliebige Strukturen im Mikrometerbereich zu transferieren, aber für großflächige Anwendungen, wie sie in der Biotechnologie benötigt werden, nicht geeignet ist. Die genannten Nachteile verhindern, dass diese Methoden als geeignete Standardverfahren für die Strukturierung von Wachstumsoberflächen mit z. B. Proteinen in der Biotechnologie eingesetzt werden (Klenkler et al., 2006, Pins et al., 2006).

2.2 Stand der Technik in den anvisierten Produktionstechniken

Die Herstellung von Mikrostrukturen lässt sich produktionstechnisch grob in zwei Bereiche mit unterschiedlichen Strukturauflösungen und unterschiedlich hohem Durchsatz unterteilen:

1) Die meisten heute hergestellten Mikrostrukturen werden auf Silizium- oder Glaswafern strukturiert. Diese spröden Materialien sind sehr starr und die Substratabmessungen sind sehr beschränkt. Der Vorteil bei der Strukturierung flexibler Materialien ist hingegen, dass das Material geknickt und gerollt werden kann, was die Möglichkeit der Nutzung dieser Materialien in hocheffizienten industriellen Fertigungsprozessen eröffnet.

Im Bereich der Biotechnologie erfordern die bisherigen Methoden zur Herstellung strukturierter Oberflächen mit fixierten Proteinen (z. B. Wachstumsfaktoren) eine Reihe einzelner Schritte. Oft muss das Protein in einem separaten Schritt chemisch modifiziert werden, bevor eine Fixierung auf der Oberfläche möglich ist. Zwei Beispiele von chemischen Modifikationen von Proteinen beinhalten die Kopplung von Biotin mit anschließender Reaktion mit Streptavidin-funktionalisierten Oberflächen (Wilde et al., 2006) oder die Fotoimmobilisierung (Bossi et al., 2004). Zweifellos ändern die verschiedenen Modifikationsschritte, die für die Herstellung funktionalisierter Oberflächen benötigt werden (Einsetzen von Biotin oder fotovernetzbaren Gruppen), die 3-D-Ausrichtung der Proteine und die biologische Aktivität. Außerdem limitieren die hohen Kosten mancher Proteine die Realisierbarkeit eines separaten chemischen Modifikationsschritts. Bei den derzeit eingesetzten Produktionsprozessen limitiert die große Anzahl der Produktionsschritte (Strukturierung, selektive chemische Funktionalisierung der Strukturen durch z. B. selbstassemblierende Monolayer-Technologie, chemische Proteinmodifikation, chemische Ankopplung der Proteine an die Oberflächen) die Durchführung der Prozesse in Zellkulturlaboratorien.

2) Die Rolle-zu-Rolle Technik wird kommerziell beim Prägen von Kunststofffolien und anderen Materialien (z.B. Papier oder Leder) und beim Drucken (Printmedien, Verpackungen) eingesetzt. Mit diesen Produktionsverfahren ist eine kostengünstige Herstellung von geprägten oder bedruckten Oberflächen bei hohem Durchsatz möglich.

Beispielsweise werden Bezugsstoffe für die Automobil- und Möbelindustrie in großen Mengen mit rotativen Heißprägeanlagen gefertigt. Die Prägestrukturen liegen dabei in der Größenordnung von einigen Millimetern bis hin zu einigen zehn Mikrometern. Die Prägewerkzeuge werden unter anderem mit Hilfe von Lasern strukturiert. Die Heißprägung eignet sich aber auch zur Herstellung von Sub-Mikrometerstrukturen, wie Prägeanlagen für holographische Strukturen zeigen. Eine verfeinerte Gravurtechnik zur Herstellung der Prägewalzen erlaubt die industrielle Herstellung von Mikrostrukturen auf Folienmaterial und dient somit der kostengünstigen und effizienten Herstellung strukturierter Oberflächen mit fixierten Proteinen.

Beim Rolle-zu-Rolle Drucken wird zwischen drei grundsätzlichen Methoden unterschieden: Offset, Rotogravur und Flexografie. Vor allem beim Bedrucken von Kunststofffolien wird hauptsächlich der Rotogravurdruck angewendet. Druckzylinder zur Rotogravur haben kleine, in den Druckzylinder geätzte Löcher, welche das Druckmuster vorgeben. Die Löcher werden mit einer Färbelösung gefüllt, die zu einer Papier- oder Plastikendlosrolle

weitergeleitet wird. Der Nachteil dieser verfügbaren Technologien ist die begrenzte laterale Auflösung der gedruckten Strukturen, was wiederum auf die begrenzte Auflösung der Löcher im Druckzylinder zurückzuführen ist. Heutzutage liegen die kleinsten kommerziell verfügbaren Strukturen auf Druckzylindern im Bereich von ≥ 10 µm.

Neben diesen Rolle-zu-Rolle Technologien mit hohem Durchsatz gibt es andere Technologien, mit denen im Mikro- und Submikrometer-Bereich Druckstrukturen produziert werden können und die derzeit vor allem im Bereich der Forschung und hier speziell auf dem Gebiet der Biotechnologie zum Einsatz kommen. Solche Technologien sind z. B. die Soft-Lithografie (Xia et al. 1998, Rogers et al., 2005) oder die Nano-Imprint-Lithografie (NIL). Soft-Lithografie ist eine Methode zur Herstellung einer Molekül-Monolage auf einem Substrat. Der in diesem Prozess eingesetzte Stempel wird aus dem Elastomer PDMS durch Abformen eines mikrostrukturierten Siliziumwafers hergestellt. Die erreichbare Auflösung liegt unter 100 nm. Im Gegensatz dazu produziert NIL keine Einzelmolekül-Schichten, sondern ein dreidimensionales Muster. Da der Stempel üblicherweise durch einen Elektronenstrahl strukturiert wird, kann die erreichbare laterale Auflösung unter 100 nm betragen. Alle diese Technologien, die eine sub-µm Auflösung erlauben, stellen sequenzielle Prozesse dar, bei denen eine kleine Fläche nach der anderen in einem Stempelprozess hergestellt wird. Solche Prozesse sind deshalb aufgrund der Limitierung der bearbeiteten Fläche und der Zykluszeiten nicht für Großserienproduktionen oder für das Strukturieren großflächiger Substrate geeignet. Daher ist der Einsatz derartiger Stempel momentan auf den Forschungsbereich beschränkt.

3 Erzielte Ergebnisse

Die Etablierung des rotativen Druckverfahrens zur Funktionalisierung großflächiger Kunststofffolien mit mikrostrukturierten Proteinmustern erforderte die Berücksichtigung einer ganzen Reihe von Faktoren, die in Abbildung 1 in gelber Farbe dargestellt sind. Die genannten technischen und biologischen Parameter des Druckprozesses mussten auf geeignete Weise aufeinander abgestimmt werden, um den geforderten Materialübertrag und die biologische Funktionalität der gedruckten Strukturen zu erreichen.

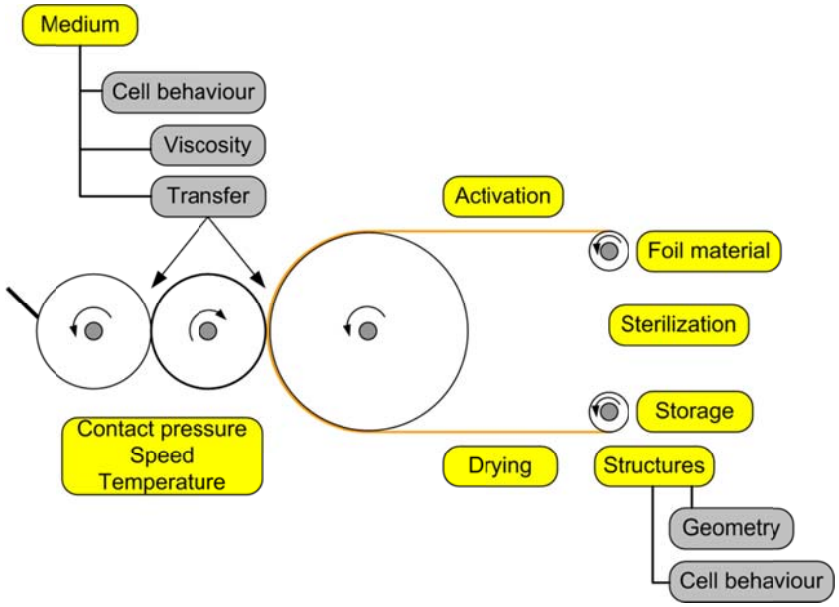


Abbildung 1 Übersicht über die bei der Etablierung des Druckprozesses zu berücksichtigenden Parameter

Das Projekt BIOREEL war in folgende Arbeitspakete untergliedert:

AP1: Struktur- und Folienmaterialauswahl

AP2: Strukturierungsprozess für Präge- und Druckwalzen

AP3: Prozess zur mikrostrukturierten Funktionalisierung von Polymerfolien

AP4: Evaluierung der oberflächenfunktionalisierten Polymerfolien

AP5: Demonstrator: Produktionsanlage zur Rolle-zu-Rolle Funktionalisierung von Folien

3.1 Struktur- und Folienauswahl

Für die Etablierung des Druckprozesses und die anschließende biologische Nutzung der gedruckten Proteinmuster wurden zunächst die zu druckenden Strukturen definiert und grundsätzliche Untersuchungen zur Auswahl geeigneter Bedruckstoffe und zur Zusammensetzung des Druckmediums durchgeführt.

Strukturauswahl

Bei der Auswahl der Mikrostrukturen wurden unterschiedliche Kreis- und Linienmuster definiert, deren Einfluss auf die Kultivierung von Zellen im weiteren Verlauf des Projekts untersucht werden sollte. Die lateralen Abmessungen der Strukturen beziehungsweise der Abstände zwischen den einzelnen Kreisen oder Linien lagen zwischen 0,5 und 50 µm. Für die angestrebte Verwendung der bedruckten Folien in Zellkulturanwendungen sollten zunächst besonders auch Strukturen kleiner als 10 µm untersucht werden. Dies wiederum stellten besondere Anforderungen an die Fertigungstechnologien zur Herstellung der Druckformen. Im Zuge der biologischen Evaluierung der gedruckten Strukturen wurden im weiteren Verlauf des Projekts leicht geänderte Strukturen definiert, bei denen die ersten Erfahrungen mit den gedruckten Proteinstrukturen berücksichtigt wurden. Ausgehend von den ersten Druckergebnissen wurde für diese zweite Designversion die minimal benötigte Größe der Linien- und Kreisstrukturen auf 5 µm festgelegt.

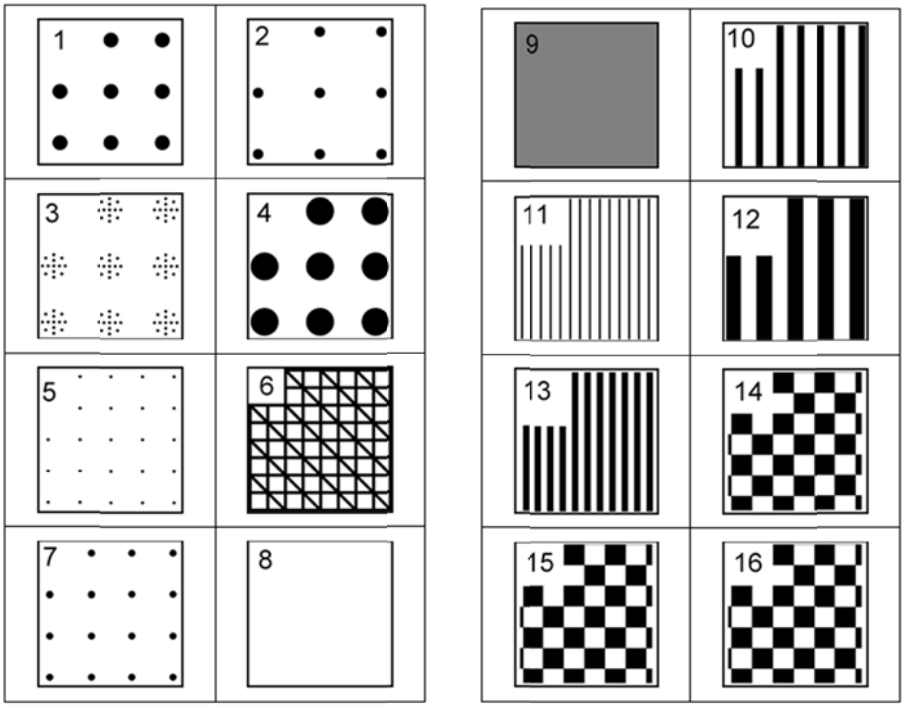


Abbildung 2 Übersicht über die ausgewählten Strukturen für das Design der Druckwalze, minimale Linienbreite: 10 µm, minimale Kreisdurchmesser: 5 µm

Folienauswahl

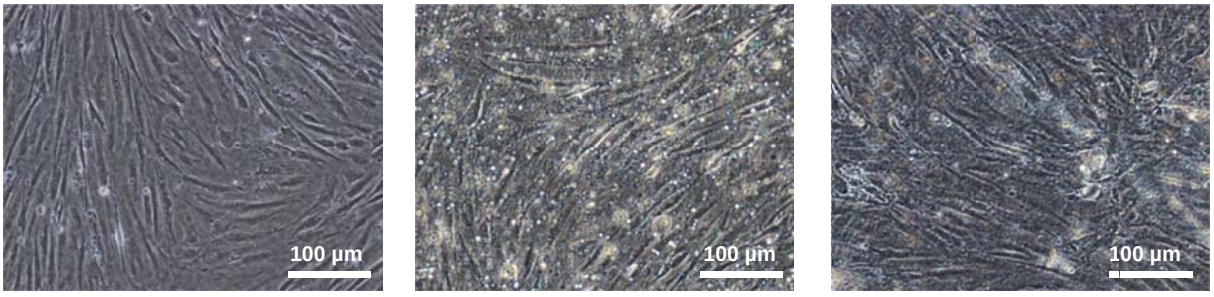
Verschiedene Folienmaterialien wurden vor allem hinsichtlich ihres Einflusses auf Zellen sowie ihrer Oberflächeneigenschaften (Oberflächenenergie) aber auch bezüglich ihrer physikalischen Eignung (Materialstärke) für das angestrebte Rolle-zu-Rolle Druckverfahren überprüft. Ausgehend von in der Medizin sowie in der Lebensmittel- und Biotechnologie gebräuchlichen Materialien kamen Polystyrol (PS), Cycloolefin-Copolymer (COC), Polyethylenterephtalat (PET) und Polypropylen (PP) als Folienmaterialien für die Druckversuche in Betracht. Die Oberflächenenergien der Folien wurden mit Hilfe von Testtinten und Kontaktwinkelmessungen ermittelt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Folienmaterialien, Ergebnisse der Messungen zur Oberflächenenergie

Material	**Dicke**	**Oberflächenenergie**
COC	300 µm	30 mN/m
PS	190 µm	33 mN/m
PET	50 µm	38 - 42 mN/m
PP	57 µm	36 mN/m

Für einen erfolgreichen Übertrag des Druckmediums auf den Bedruckstoff muss der Bedruckstoff eine höhere Oberflächenenergie als das Druckmedium aufweisen. Wegen dieser Voraussetzung mussten Folien mit möglichst hoher Oberflächenenergie ausgewählt werden. Die Werte von 38 – 42 mN/m bei PET werden durch eine vorherige Plasmaaktivierung beim Hersteller erreicht. Aufgrund der höheren Oberflächenenergien wurden PET und PP als Materialien für die Druckversuche ausgewählt. Folien aus COC und PS kamen auch aufgrund der verfügbaren Dicken nicht für die Druckversuche in Betracht.

Eine hohe optische Qualität der Folien ist vor allem bei der Evaluierung der immobilisierten Proteine in der In-vitro-Zellkultur wichtig. Daher erfolgte die Untersuchung der optischen Qualität der verschiedenen Materialien nach Besiedelung mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) mittels eines inversen Durchlichtmikroskops. Dabei zeigte COC die beste optische Qualität, die mit der von Standardkulturgefäßen aus Polystyrol vergleichbar war. Folien aus PET und PS zeigten produktionsbedingte Einschlüsse, die das Licht streuten und dadurch die optische Qualität verringerten. Aufgrund der benötigten Oberflächenenergien und der Verfügbarkeit der Folienmaterialien wurde trotzdem PET für die Oberflächenmodifikation mittels Rolle-zu-Rolle Druckverfahren ausgewählt.



COC PET PS

Abbildung 3 Optische Qualität der verschiedenen Folienmaterialien: Mikroskopische Darstellung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) auf den verschiedenen Folienmaterialien.

Druckmedien

Bei der Zusammensetzung der Druckmedien waren sowohl technische als auch biologische Randbedingungen zu berücksichtigen. Aus technischer Sicht musste die Zusammensetzung des Druckmediums hinsichtlich der Viskosität, der Oberflächenenergie und der Trocknungseigenschaften erfolgen. Herkömmliche in der Druckindustrie verwendete Tinten und Farben kamen wegen ihrer Materialeigenschaften für den geplanten Druckprozess mit Proteinen und die spätere Anwendung in der Zellkultur nicht in Betracht, sodass im Rahmen des Projekts BIOREEL eine geeignete Formulierung für ein Druckmedium erarbeitet werden musste. Bezüglich der Eignung für die spätere Zellkultivierung wurde die Verträglichkeit der Komponenten mit den zu druckenden Proteinen und der anschließenden Kultivierung von Zellen untersucht. Wie auch schon bei den Folienmaterialien wurden die Oberflächenspannungen der potenziellen Druckmedien mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen ermittelt. Die Untersuchung der Zellverträglichkeit erfolgte mit HaCaT-Zellen (Keratinozyten-Zelllinie), die über Nacht auf eingetrockneten Proben der jeweiligen Testsubstanzen inkubiert und am darauf folgenden Tag unter dem Lichtmikroskop charakterisiert wurden.

Ausgehend von üblicherweise in der Soft Lithografie verwendeten Substanzen wurden zunächst unterschiedliche Puffermedien hinsichtlich ihrer Eignung als Trägerlösung für die zu druckenden Proteine im Rolle-zu-Rolle Druck getestet. Als geeignete Puffermedien wurden drei verschiedene Substanzen ermittelt: Ammoniumacetat, Natriumhydrogenphosphat und phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).

Anders als bei den in der Soft Lithografie angewendeten Methoden zum Materialübertrag muss die Trocknung beim rotativen Druck innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums (ca. 1 s) erfolgen, da die bedruckte Seite des Substrats aufgrund der Bahnführung in der Druckanlage direkt nach dem Druck bereits wieder mit anderen Anlagenkomponenten in Berührung kommt beziehungsweise aufgewickelt wird. Entgegen der Vorgehensweise in kommerziellen Druckanlagen muss auf eine Heißlufttrocknung entweder völlig verzichtet werden oder die Trocknung muss so eingestellt werden, dass die thermisch sensitiven Proteine auch nach der Trocknung noch funktional sind. Daher muss auf Temperaturen > 42 °C verzichtet werden. Alternativ muss anlagentechnisch eine längere Trock-

nungsstrecke vorgesehen werden. Diese Option ist allerdings konstruktiv nicht beliebig umsetzbar.

Aus diesen Gründen war es notwendig, bei der Zusammensetzung des Druckmediums Substanzen auszuwählen, die eine Trocknung der gedruckten Strukturen beschleunigten. Verschiedene Trockenstoffe wurden auf ihre Verträglichkeit mit Proteinen und Zellen getestet. Es wurde ein Trockenstoff ausgewählt, der keine negativen Auswirkungen auf die Funktionalität der gedruckten Proteine hatte.

Da es sich bei der aus Puffer, Protein und Trockenstoff bestehenden Substanz um eine nahezu transparente Flüssigkeit handelte, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die gedruckten Strukturen sichtbar zu machen, um sie bezüglich der Strukturtreue zu charakterisieren. Zum einen konnten hinsichtlich der zu druckenden Proteine sogenannte Konjugate eingesetzt werden. Bei den Proteinkonjugaten liegen die Proteine in Verbindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff vor. In der Regel handelt es sich dabei um Fluorescein (FITC) oder andere, meist grün fluoreszierende Fluoreszenzmarker. Eine vom verwendeten Protein unabhängige Möglichkeit zur optischen Charakterisierung der gedruckten Strukturen konnte durch Verwendung eines Farbstoffs aus dem Bereich der Lebensmitteltechnik realisiert werden.

Bei den Kontaktwinkelmessungen wurden zunächst die einzelnen Puffer und nachfolgend die mit Farbstoff und Trockenstoff angesetzten Lösungen untersucht. Exemplarische Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Oberflächenenergie durch die beiden Additive (Farbstoff und Trockenstoff) deutlich reduziert werden konnte. Damit wirkte sich die Verwendung dieser beiden Substanzen nicht nur auf die Trocknung und die Visualisierung der gedruckten Strukturen aus. Zusätzlich zu diesen beiden gewünschten Effekten konnte die geforderte Differenz in den Oberflächenenergien von Folie und Druckmedium durch die beiden Zusatzstoffe vergrößert beziehungsweise überhaupt erst erzielt werden.

Tabelle 2 Oberflächenenergien der Pufferlösungen mit und ohne Zusätze

Pufferlösung	**Zusatz**	**Oberflächenenergie**
PBS		48,9 mN/m
PBS	Trockenstoff + Farbstoff	31,5 mN/m
Ammoniumacetat		49,1 mN/m
Ammoniumacetat	Trockenstoff	41,5 mN/m
Ammoniumacetat	Trockenstoff + Farbstoff	31,9 mN/m
Natriumhydrogenphosphat		42,5 mN/m

Hinsichtlich der Verwendung der im Rolle-zu-Rolle Druckverfahren modifizierten Oberflächen in der In-vitro-Zellkultur erfolgte die Überprüfung der Biokompatibilität des Folienmaterials PET, der Pufferlösungen Natriumhydrogenphosphat und Ammoniumacetat sowie des Farbstoffs (Pigment). Dafür wurden von den Folien, die mit dem entsprechenden Puffer bedruckt waren, Extrakte hergestellt, die mit murinen Fibroblasten kultiviert

wurden. Nach 24 stündiger Inkubationszeit wurde der Einfluss des Extrakts auf die Stoffwechselaktivität und die Proliferation untersucht (Abbildung 4). Die Werte wurden gegen die Werte von unbehandelten Zellen normiert. Dabei konnte die Biokompatibilität der PET-Folie, der beiden verwendeten Puffer sowie des Pigments gezeigt werden. Somit sind die getesteten Stoffe für das Rolle-zu-Rolle Druckverfahren und die anschließende Nutzung in der in-vitro-Zellkultur geeignet.

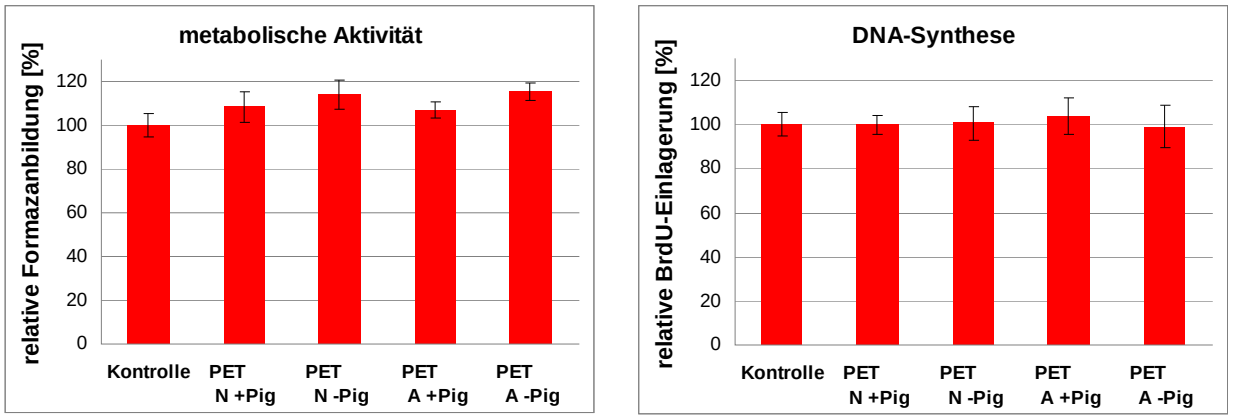


Abbildung 4 Einfluss des Materials, der Pufferlösungen und des Pigments auf murine Fibroblasten: PET-Folien mit Natriumhydrogenphosphat-Puffer (N) oder Ammoniumacetat-Puffer (A) und mit (+Pig) oder ohne (-Pig) Pigment mit dem Rolle-zu-Rolle Druckverfahren modifiziert wurden mittels quantitativen Zytotoxizitätstests (WST-1- und BrdU-Assay) auf ihre Zytotoxizität untersucht.

3.2 Strukturierungsprozess für Druckwalzen

3.2.1 *Herstellung polymerbasierter Druckformen für Flexo- und Tiefdruck*

Kommerzielle Klischees für den Flexodruck sind in ihren Strukturgrößen auf laterale Abmessungen von minimal 30 µm beschränkt. Der am Fraunhofer IBMT im Rahmen der ersten Projektphase verfolgte Ansatz nutzte daher mikrotechnologische Fertigungsverfahren zur Strukturierung von Polyimidfolie, um polymerbasierte Druckformen mit Strukturen bis in den Bereich kleiner als 10 µm herzustellen. Die Vorteile dieses Verfahrens sind die geringeren Kosten sowie der geringere Zeitaufwand verglichen mit konventionellen Herstellungsverfahren für Druckzylinder. Mittels Lithographie und Trockenätzverfahren wurden in einer Polyimidfolie Mikrostrukturen mit lateralen Abmessungen von 2,5 bis 50 µm und Höhen von bis zu 9 µm erzeugt (Abbildung 5), die anschließend entweder direkt als Flexoklischee oder als Tiefdruckform verwendet werden können. Zusätzlich wurden die Polyimidfolien mit erhabenen Strukturen in einem rotativen Heißprägeverfahren in eine 190 µm dicke Folie aus COC übertragen (Abbildung 6). Die Tiefen der geprägten Strukturen lagen dabei in einem Bereich von ca. 1 bis 4 µm.

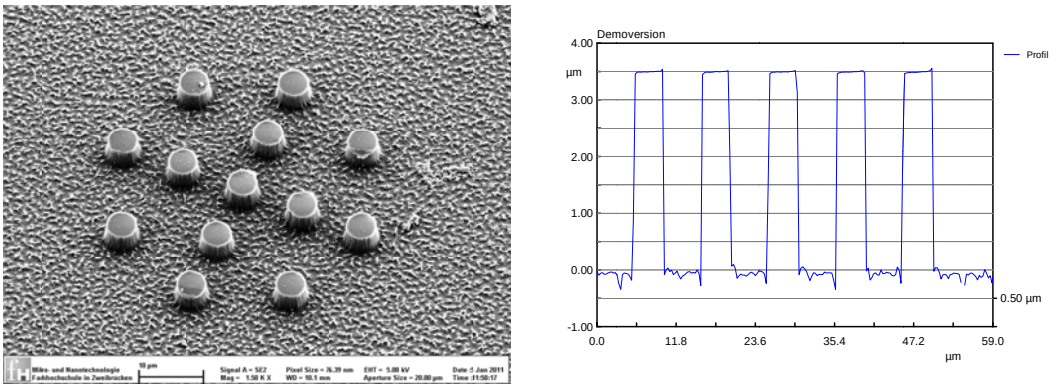


Abbildung 5 PI-Mikrostruktur, Breite und Abstand je 5 µm, Höhe 3,5 µm; links: REM-Aufnahme, rechts: Profilmessung

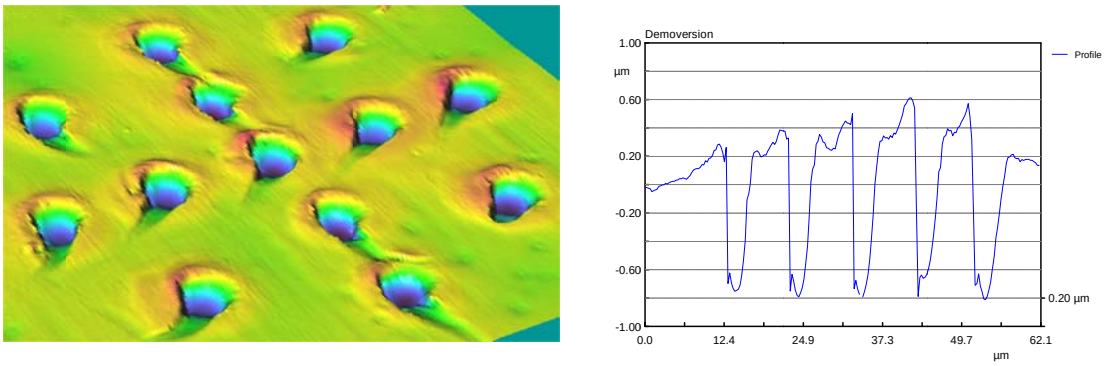


Abbildung 6 geprägte COC-Mikrostruktur, Breite und Abstand je 5 µm, Tiefe 1 µm, links: 3-D-Ansicht, rechts: Profilmessung

Die geprägte Folie wiederum wurde mit einer Klebefolie (ARclad 7876, Adhesives Research) auf einem Edelstahlblech fixiert und dieses anschließend auf einen Zylinder gespannt (Abbildung 7). Es sei schon hier erwähnt, dass die Versuche mit geprägten COC-Folien als Tiefdruckform nicht erfolgreich verliefen. Obwohl die Technologie der Mikro-

strukturierung von Polyimidfolie grundsätzlich ein großes Potenzial im Blick auf die erreichbaren Strukturgrößen besitzt, erschwert die Limitierung der bearbeitbaren Substratfläche auf Durchmesser von maximal 100 mm allerdings eine Verwendung der strukturierten Folien als Tiefdruckform. Da der gesamte Umfang des Druckzylinders nicht von der strukturierten Folie bedeckt werden kann, kommt es beim Abrakeln des Druckmediums infolge des sogenannten „Rakelsprungs“ zu Schwierigkeiten. Aus diesem Grund und wegen der Verfügbarkeit anderer Druckformen in den geforderten Dimensionen wurde die Variante mit den strukturierten Polyimidfolien im weiteren Projektverlauf nicht weiter verfolgt.

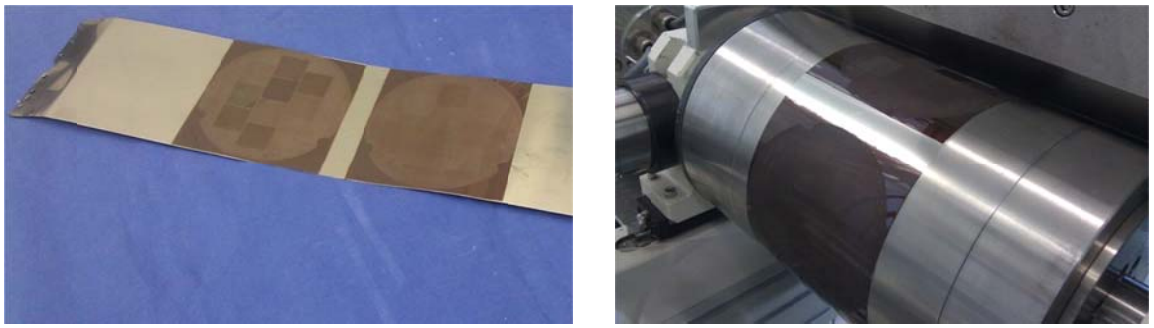


Abbildung 7 links: PI-Folie auf Edelstahlblech aufgeklebt
rechts: Blech mit PI-Folie auf Walze fixiert, Prägung in COC-Folie

3.2.2 Herstellung von Flexodruckformen aus PDMS

Auf der Grundlage der im AP1 definierten Mikrostrukturen wurden flexible Druckformen aus dem Silikonelastomer Sylgard 184 (Dow Corning) hergestellt. Die Fertigung der Silikonmaster erfolgte mittels eines Replikationsverfahrens, bei dem mikrostrukturierte Siliziumwafer mit einem Durchmesser von 100 mm als Formwerkzeug zum Einsatz kamen. Nach der Mikrostrukturierung der Siliziumwafer durch Lithografie und reaktives Ionenätzen (RIE bzw. DRIE) wurden diese Substrate in eine Gießform integriert, die mit dem flüssigen Elastomer gefüllt wurde. Nach dem Aushärten wurde das vernetzte PDMS aus der Gießform entnommen und mit Hilfe eines für den Einsatz im Flexodruck spezifizierten doppelseitigen Klebebandes auf einem Druckzylinder fixiert (Abbildung 8). Die Fertigung der Negativstrukturen in Silizium sowie die Abformung der PDMS-Druckformen erfolgte dabei sowohl beim spanischen Projektpartner TEKNIKER als auch teilweise am Fraunhofer IBMT. In der zweiten Phase des Projekts fand die Kooperation mit dem spanischen Projektpartner im Rahmen des EUMINAfab-Programms statt. Dabei wurden beim Design der Strukturen die Erkenntnisse aus den ersten Versuchsreihen zum Flexo- und Tiefdruck berücksichtigt.

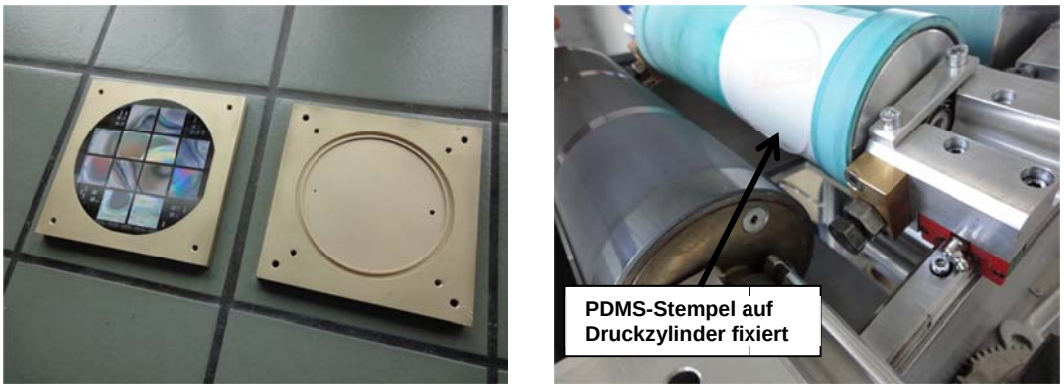


Abbildung 8 links: Gießform zur PDMS-Abformung mit mikrostrukturiertem Siliziumwafer, rechts: abgeformter PDMS-Stempel, auf Druckzylinder befestigt

3.2.3 Herstellung von Tiefdruckyzylindern

Die in AP1 spezifizierten Mikrostrukturen (siehe Abschnitt 3.1) dienten der Saueressig GmbH als Basis für die Fertigung eines mikrostrukturierten Tiefdruckzylinders. Unterschiedliche Kreis- und Linienmuster mit lateralen Abmessungen im Bereich zwischen ca. 10 und 50 µm wurden mit dem Rotogravurverfahren in einem Druckzylinder realisiert. Die Näpfchen beziehungsweise die Gräben waren, abhängig von den lateralen Abmessungen der Strukturen, zwischen 1 und 5 µm tief. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse von Oberflächenmessungen an drei Strukturen der Tiefdruckwalze dargestellt. Die mit einem Konfokalmikroskop durchgeführten Profilmessungen belegten die Limitierung der verfügbaren Fertigungstechnologie bei Strukturgrößen im Bereich von < 10 µm. Speziell bei den Kreisstrukturen konnten in diesen Dimensionen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden.

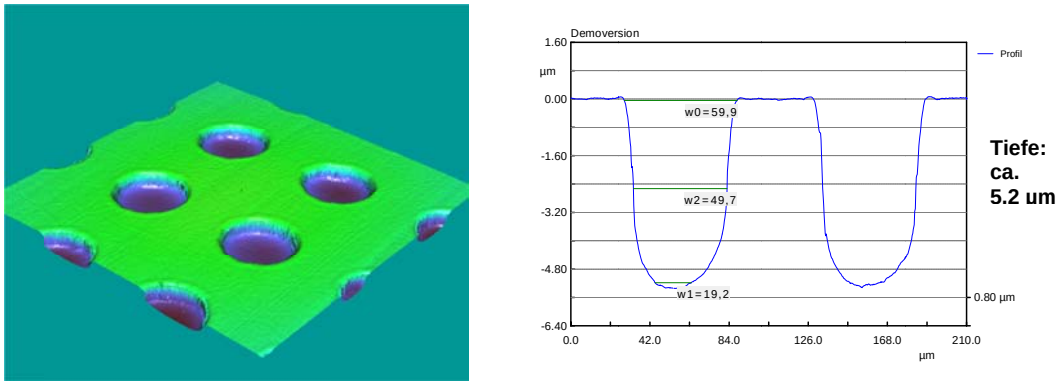


Abbildung 9 Tiefdruckzylinder, Sollbreite: 50 µm, Abstand: 50 µm

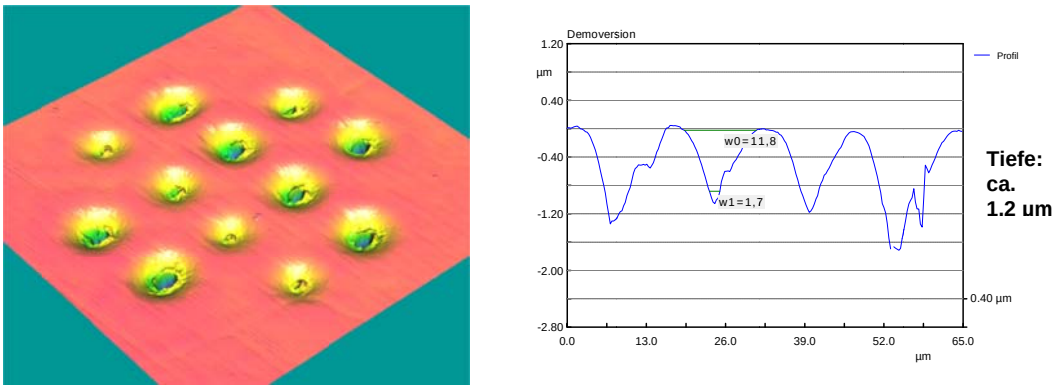


Abbildung 10 Tiefdruckzylinder, Sollbreite: 5 µm, Abstand: 5 µm

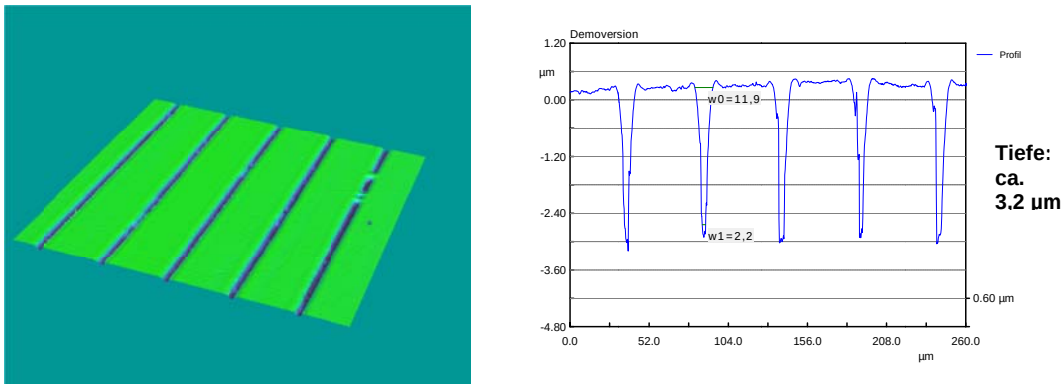


Abbildung 11 Tiefdruckzylinder, Sollbreite: 1 µm, Abstand: 50 µm

Während der Projektlaufzeit konnte dann auf eine neu entwickelte Strukturierungstechnik bei der Firma Saueressig zurückgegriffen werden, die die Strukturierung von Näpfchen im sub-10 µm Bereich erlaubte. Eine neuartige Lasergravuranlage mit einem Pikosekundenlaser (Wellenlänge 1064 nm, Leistung 80 W) ermöglicht die Direktgravur ultrafeiner Strukturen in die Kupferschicht des Druckzylinders. Mit dieser Technologie wurde in der zweiten Projektphase eine weitere Tiefdruckwalze gefertigt.

3.2.4 Herstellung eines Nickeleinsatzes für Tiefdruckzylinder

Zusätzlich zu den mittels Rotogravur und Laserstrukturierung gefertigten Tiefdruckwalzen wurden in Zusammenarbeit mit den spanischen Partnern TEKNIKER und Moldelan Formeinsätze aus Nickel hergestellt, die in Verbindung mit einem eigens dafür gefertigten Stahlzylinder auf ihre Eignung für den Tiefdruck getestet werden sollten. Hintergrund dieses Ansatzes war die beabsichtigte kosteneffiziente Herstellung mikrostrukturierter Tiefdruckformen, bei denen die Vorteile der Mikrofertigungsverfahren bei der Realisierung von Strukturen kleiner 10 µm genutzt werden sollten. Der Stahlzylinder sollte so gefertigt werden, dass die dünnen Nickelfolien mit den zu druckenden Strukturen in entsprechenden Vertiefungen des Zylinders fixiert werden konnten.

Die Entwicklung dieser speziellen Druckform war dabei in zwei Hauptaufgaben aufgeteilt: Die Herstellung einer mikrostrukturierten flexiblen Nickelfolie und das Design des Zylinders, der als Aufnahme für die flexible Folie dienen sollte.

Der Stahlzylinder wurde zunächst für die Aufnahme von 16 rechteckigen Nickelfolien ausgelegt, für die Testphase wurden dann allerdings nur 4 Aufnahmen für Nickelfolien realisiert. Unterschiedliche mögliche Varianten für die Fixierung der Nickelfolien wurden in Betracht gezogen, darunter unter anderem eine mechanische Klemmung oder auch eine magnetische Fixierung (Abbildung 12). Da diese beiden Lösungsansätze in ihrer Umsetzung sehr komplex und bezüglich der Zuverlässigkeit im Druckprozess nicht eindeutig zu beurteilen waren, wurde schließlich die Verwendung eines geeigneten beidseitigen Klebers (PSA-tape) als am besten geeignete Befestigungsmethode für die Nickelfolien ausgewählt.

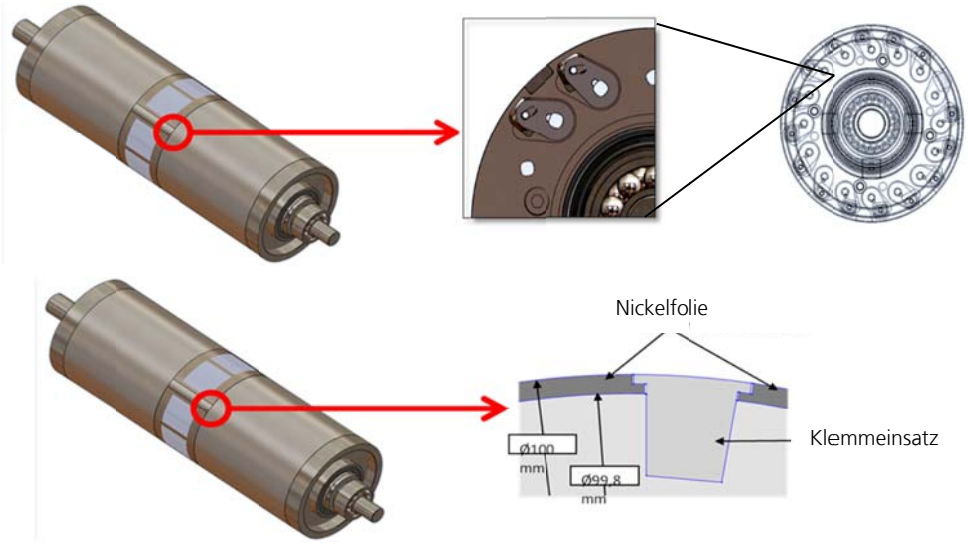


Abbildung 12 Optionen zur Befestigung der Nickelfolie auf dem Zylinder; oben: Fixierung mit Permanentmagneten, unten: Fixierung mittels Klemmeinsätzen

Aufgrund der verfahrensbedingten Limitierung der Bearbeitungsfläche auf einen Durchmesser von 100 mm wurden zwei jeweils 30 x 30 mm² große Bereiche mit Mikrostrukturen entworfen. Die Mikrostrukturen für diese beiden Bereiche wurden dabei aus den in AP1 festgelegten Strukturen ausgewählt: Kreise und Linien mit einem Durchmesser beziehungsweise einer Breite von 5 µm. Der Abstand zwischen den einzelnen Strukturen betrug jeweils 5 µm. Zunächst wurden 100 mm Siliziumwafer mittels Lithografie und Trockenätzverfahren (Deep Reactive Ion Etching, BOSCH-Prozess mit SF_6 und C_4F_8) strukturiert und für den nachfolgenden galvanischen Prozess vorbereitet. Die im Silizium erzeugten Strukturen waren dabei ca. 7 µm tief. Während der galvanischen Abformung wurden die Vertiefungen im Silizium mit Nickel aufgefüllt, und der Abscheideprozess wurde so lange fortgesetzt, bis sich eine durchgehende Nickelschicht gebildet hatte. Diese wurde schließlich von dem Siliziumwafer abgenommen. Mittels Drahterodieren wurde dann die rechteckige Tiefdruckform aus der Folie ausgeschnitten und konnte in die auf dem Stahlzylinder vorgesehene Vertiefung eingesetzt werden (Abbildung 13).

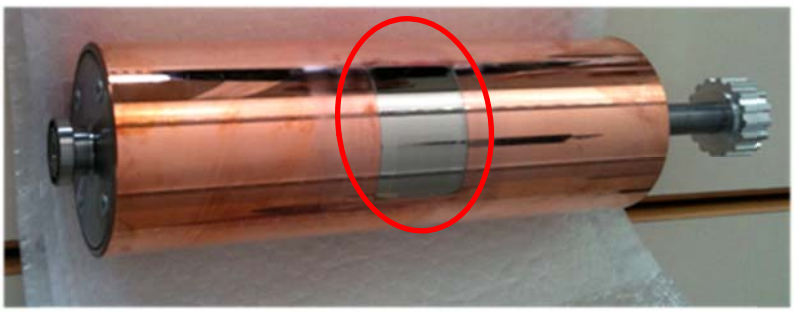


Abbildung 13 Tiefdruckzylinder mit eingesetzter Nickelfolie (Mitte)

3.3 Prozess zur mikrostrukturierten Funktionalisierung von Polymerfolien

3.3.1 Druckanlagen zur Prozessetablierung im Flexo- und Tiefdruckverfahren

Für die ersten Versuchsreihen mit den ausgewählten Folienmaterialien und Druckmedien wurden bereits existierende Farbprüfgeräte der SAUERESSIG GmbH eingesetzt. Bei diesen Laboranlagen handelt es sich um das Rolle-zu-Rolle Flexo-Laborprüfgerät FP 100-300 sowie um das Flachbett Tiefdruck-Laborgerät CP 90-200 (Abbildung 14). Das Laborprüfgerät FP 100-300 wurde so modifiziert, dass sowohl Versuche im Flexo- als auch im Tiefdruckverfahren durchgeführt werden konnten. Für die Tiefdruckversuche wurde die Andruckanlage umgebaut, indem anstelle der Rasterwalze ein Tiefdruckzylinder eingesetzt und das Flexoklischee gegen eine Gummiwalze getauscht wurde. Daneben wurde die Bahnführung angepasst, sodass die Anlage mit der genannten Walzenkombination für Tiefdruck genutzt werden konnte (Abbildung 15 links). Zusätzlich wurde eine Vorrichtung konstruiert, an die eine Koronastation der Firma TIGRES GmbH (maximale Leistung 600 W) zur Vorbehandlung der Kunststofffolien montiert wurde (Abbildung 15 rechts).

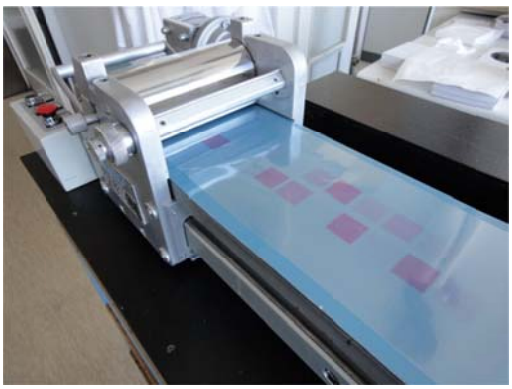


Abbildung 14 links: Flexo-Laborprüfgerät FP 100-300,
rechts: Tiefdruck-Laborgerät CP 90-200

Abbildung 15 links: Modifiziertes Laborprüfgerät für Rolle-zu-Rolle Tiefdruck,
rechts: Koronastation

3.3.2 Versuche im Flexodruckverfahren

Eine Rasterwalze mit Rasterweiten von 160, 240 und 315 l/cm wurde in Kombination mit einem kommerziellen Flexodruckklischee mit unterschiedlichen Teststrukturen für die ersten Druckversuche eingesetzt. Sowohl die Geometrie der Näpfchen in der Rasterwalze als auch die Strukturgrößen des Klischees lagen dabei weit oberhalb des angestrebten Bereiches von < 10 µm. Nach den ersten grundlegen Versuchen wurden dann anstelle des Flexodruckklischees die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen elastischen PDMS-Druckformen mit den für die späteren Anwendungen spezifizierten Mikrostrukturen verwendet.

Einige der hinsichtlich ihrer Zellverträglichkeit grundsätzlich geeigneten Substanzen mussten nach den ersten Druckversuchen wegen negativer Ergebnisse beim Übertrag, bei der Haftung oder bei der Trocknung ausgeschlossen werden. Vor allem die Trocknung erwies sich für viele Substanzen als problematisch, da die Zusammensetzung der Druckmedien weder eine Heißlufttrocknung (aufgrund des Proteins als Komponente) noch eine Trocknung mit UV-Bestrahlung erlaubt. Als geeignet erwiesen sich zwei Druckmedien, Ammoniumacetatpuffer sowie PBS, bei denen jeweils ein Trockenstoff zugesetzt wurde. Zur besseren Charakterisierung der Ergebnisse wurde den Lösungen zusätzlich ein Farbstoff zugegeben, sodass die gedruckten Strukturen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert werden konnten. Sowohl mit dem Ammoniumacetatpuffer als auch mit PBS konnte ein Strukturübertrag auf PET-Folie erzielt werden. Dabei war der Strukturübertrag mit der Ammoniumacetat-Lösung deutlicher als mit der PBS-Lösung, weshalb die nachfolgenden Versuche mit der Ammoniumacetat-Lösung durchgeführt wurden.

Die Druckbeistellung erwies sich als ein entscheidender Faktor für den erfolgreichen Übertrag mit dem Flexodruck-Verfahren. Ein zu hoher Beistelldruck führte dazu, dass der elastische PDMS-Stempel zu stark an die Folie gedrückt wurde („sagging effect"), was in einem Übertrag des Druckmediums auch in den Zwischenräumen der zu druckenden Mikrostrukturen resultierte (Abbildung 16). Aufgrund der geringen Höhe der PDMS-Strukturen (< 10 µm) musste daher die Druckbeistellung sehr genau eingestellt werden.

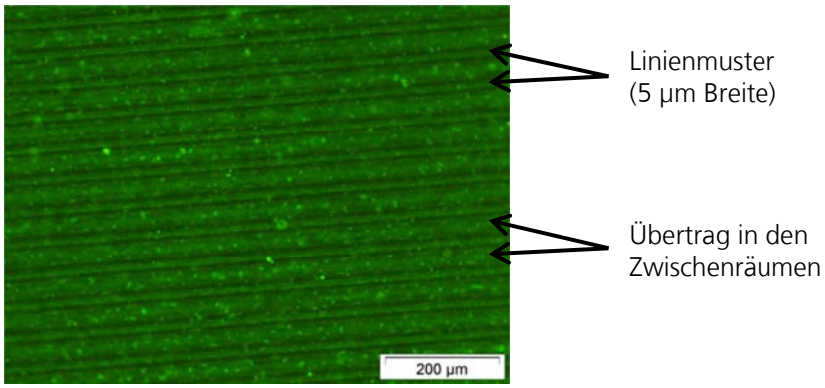


Abbildung 16 Flexodruck mit BSA, PDMS-Stempel (Strukturhöhe 5 µm), Übertrag in den Zwischenräumen wegen zu hohem Beistelldruck

Nach Etablierung der Zusammensetzung der Druckmedien und der geeigneten Einstellung der Prozessparameter, die teilweise mit dem Flexo-Laborprüfgerät und später mit der Spezialdruckanlage von Saueressig möglich war, konnten mit dem Flexodruckverfahren erfolgreich Strukturen bis zu minimalen Linienbreiten von 10 µm übertragen werden (Abbildung 17). Als Proteine wurden dabei bovines Serumalbumin (BSA) und Kollagen IV eingesetzt.

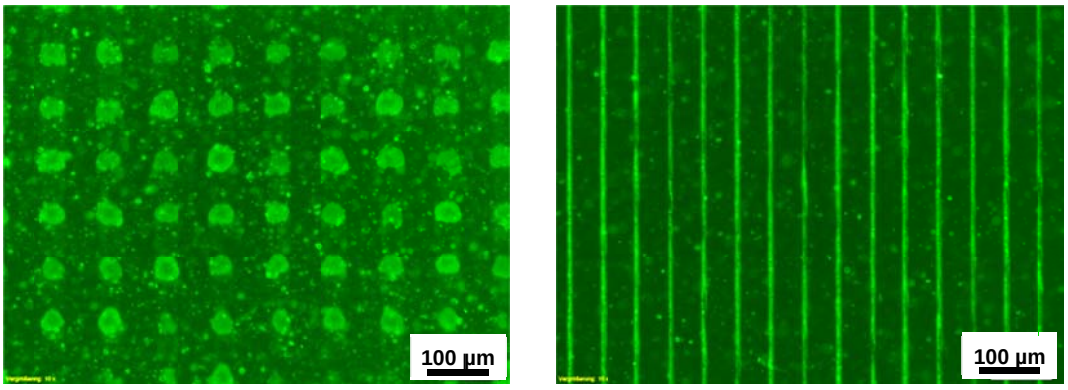


Abbildung 17 Flexodruck mit Kollagen IV, PDMS-Stempel,
links: Quadrate mit Seitenlänge 20 µm, rechts: Linien mit Breite 10 µm. Die grünen Bereiche zwischen den Strukturen sind auf die Eigenfluoreszenz der PET-Folie zurückzuführen.

3.3.3 Versuche im Tiefdruckverfahren

Die ersten Versuchsreihen im Tiefdruck wurden mit dem umgebauten Flexo-Laborprüfgerät und dem Tiefdruck-Laborprüfgerät durchgeführt. Als Druckform wurden von Saueressig gefertigte Tiefdruckzylinder mit den spezifizierten Mikrostrukturen eingesetzt. Mit den beiden Anlagen konnten im Tiefdruck keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, da keine Einstellungen für einen erfolgreichen Übertrag des Druckmediums auf die Folie etabliert werden konnten. Die Geometrie der Näpfchen, die Viskosität des Druckmediums und die Oberflächenenergien von Druckmedium und Folie waren die kritischen Faktoren, die mit den beiden Anlagen zunächst nicht erfolgreich erarbeitet werden konnten.

Mit der im Laufe des Projekts in Zusammenarbeit mit Saueressig entwickelten Spezialdruckanlage (siehe Kapitel 3.5) konnten dann erste erfolgreiche Versuche im Tiefdruck durchgeführt werden. Anders als bei den Versuchen im Flexodruck, wo mit einer Ammoniumacetatlösung gearbeitet wurde, erwies sich Natriumhydrogenphosphat beim Tiefdruck als geeignete Trägerlösung. Das Druckmedium bestand bei dieser Versuchsreihe aus dem Puffer, dem Farbstoff sowie Zellulose. Mithilfe der Zellulose konnte die Viskosität des Druckmediums reguliert werden, sodass ein Übertrag der Mikrostrukturen auf die PET-Folie erzielt werden konnte.

Durch die Verwendung der Zellulose konnten erste erfolgreiche Resultate hinsichtlich des Zusammenwirkens der für den Tiefdruckprozess relevanten Faktoren Viskosität und Näpfchengröße erzielt werden.

Grundsätzlich mussten beim Flexo- wie auch beim Tiefdruck die Prozessparameter jeweils für bestimmte Mikrostrukturen angepasst werden. Unterschiedliche Formen (Linien, Kreise) mit unterschiedlichen Abmessungen erforderten entsprechende Modifikationen bei den Druckeinstellungen (Abbildung 18).

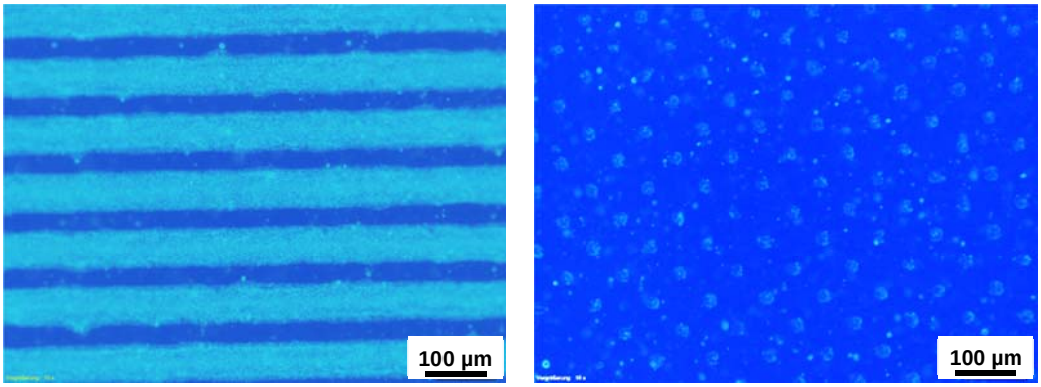


Abbildung 18 Tiefdruck mit Zellulose/Natriumhydrogenphosphat;
links: Linien mit Breite 75 µm, rechts: Kreise mit Durchmesser 25 µm.

3.4 Evaluierung der oberflächenfunktionalisierten Polymerfolien

Die Evaluierung der oberflächenmodifizierten Folien erfolgte durch die Kultivierung verschiedener humanen und tierischen Zellen in vitro auf den Folien. Neben den Zelllinien 3T3 (murine Fibroblasten) und HaCaT (humane Keratinozyten) kamen humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zum Einsatz. Diese verschiedenen Zelltypen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und für verschiedene Zeiten auf den mit unterschiedlichen Proteinen und Peptiden modifizierten Folien kultiviert.

Mit dem Rolle-zu-Rolle Druckverfahren wurden die Folien mit dem Homopolymer der essentiellen Aminosäure L-Lysin, poly-L-Lysin, mit bovinem Serum Albumin (BSA) und mit dem wichtigsten strukturellen Protein der Basalmembran, Kollagen Typ IV, modifiziert.

In ersten Versuchen mit den umgebauten Laborprüfgeräten konnten mittels Flexodruck erfolgreich BSA-Strukturen auf PET-Folie gedruckt werden (Abbildung 19B). Auf diesen Strukturen adhärierten teilweise HaCaT-Zellen und richteten sich an den Strukturen aus (Abbildung 19C). Die Anzahl der adhärierten Zellen war bei diesen Versuchen allerdings sehr gering.

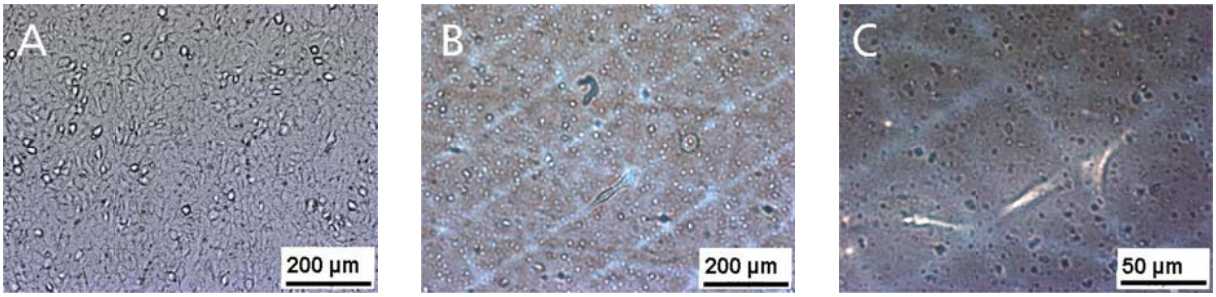


Abbildung 19 Zellen auf im Rolle zu Rolle Druckverfahren aufgebrachten BSA-Strukturen; A: Auf unbehandelter Folie gewachsene HaCaT-Zellen (Kontrolle), B: Folie mit BSA-Strukturen,
C: HaCaT-Zellen sind auf BSA-Strukturen angewachsen und haben sich daran ausgerichtet.

Ein deutlich besseres Ergebnis konnte bei Experimenten mit der im weiteren Projektverlauf entwickelten Spezialdruckanlage im Flexodruck mit Kollagen Typ IV erzielt werden (Abbildung 20B). Auf den im Rolle-zu-Rolle Druckverfahren aufgebrachten Kollagen-Linien hafteten die hMSC an und die meisten richteten sich, morphologisch deutlich zu sehen, an den gedruckten Linien aus (Abbildung 20B und C).

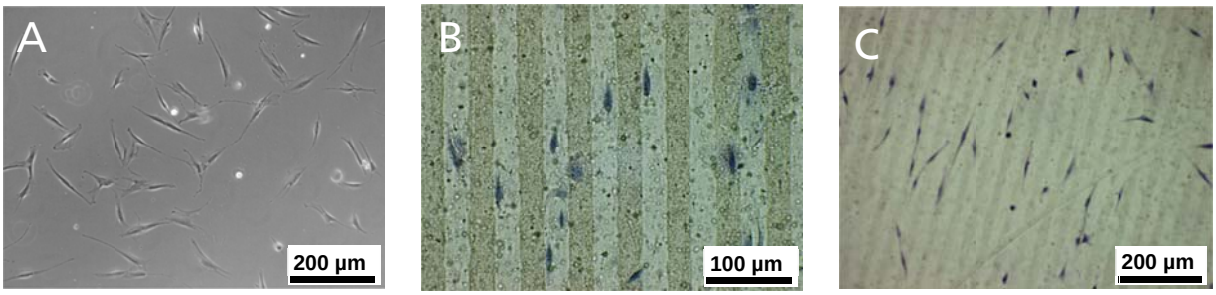


Abbildung 20 Auswirkung von im Rolle-zu-Rolle Druckverfahren gedruckten Kollagen Typ IV-Strukturen; A: Auf Polystyrol gewachsene hMSC (Kontrolle), B und C: Folie mit Kollagen Typ IV-Strukturen (Linien) und daran angewachsenen und ausgerichteten hMSC (Färbung mit Hämatoxylin)

Auch auf Kollagen-Strukturen, welche im Tiefdruck-Verfahren auf die PET-Folie aufgebracht wurden adhärierten die mesenchymalen Stammzellen und richteten ihre spindelförmige langgestreckte Form an den Protein-Linien aus (Abbildung 21B + C).

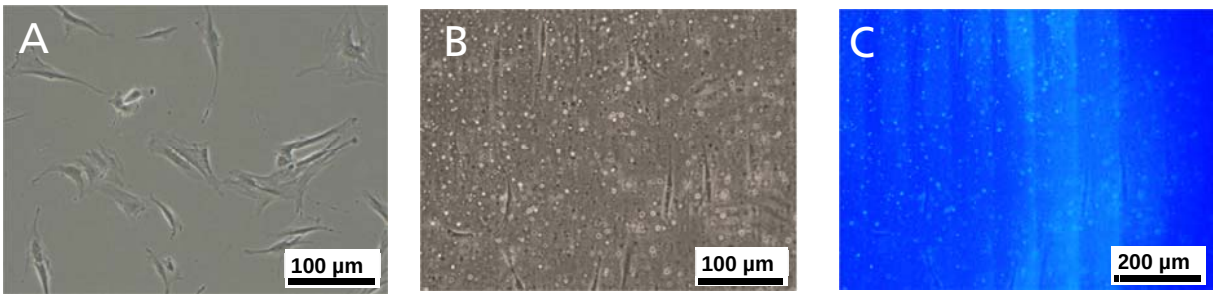


Abbildung 21 Auswirkung von im Rolle-zu-Rolle Druckverfahren aufgebrachten Kollagen Typ IV-Strukturen auf Zellen;
A: Auf Polystyrol gewachsene hMSC (Kontrolle), B: Auf Kollagen Typ IV-Strukturen angehaftete und ausgerichtete hMSC (Phasenkontrastaufnahme), C: Overlay der fluoreszierenden Kollagen Typ IV-Strukturen (Linien) im blauen Fluoreszenzkanal und den daran ausgerichteten hMSC

Wegen der Koronaaktivierung der Folie vor dem Druckvorgang und der daraus resultierenden höheren Oberflächenenergie hatten die Zellen auch eine starke Tendenz, auf den nichtbedruckten aber aktivierten Bereichen zu haften. Um dies zu verhindern oder zu minimieren, wurde untersucht, inwieweit ein Beschichten der gesamten Folienoberfläche vor dem Druckvorgang zu einer verminderten Adhärenz der Zellen führt und damit ein Anhaften auf dem Protein sichergestellt werden kann.

Dazu wurde die PET-Folie vor dem Rolle-zu-Rolle Drucken mit dem Tensid Pluronic ® (BASF) beschichtet und anschließend die Adhärenz von hMSC untersucht (Abbildung 22). Die Stammzellen zeigten dabei eine kugelförmige Morphologie und eine sehr stark verminderte Adhärenz. Dementsprechend verhindert eine flächige Beschichtung der zu bedruckenden Folie mit Pluronic ® das Anhaften der Zellen und erhöht damit den Anteil der auf dem Druck angehafteten Zellen.

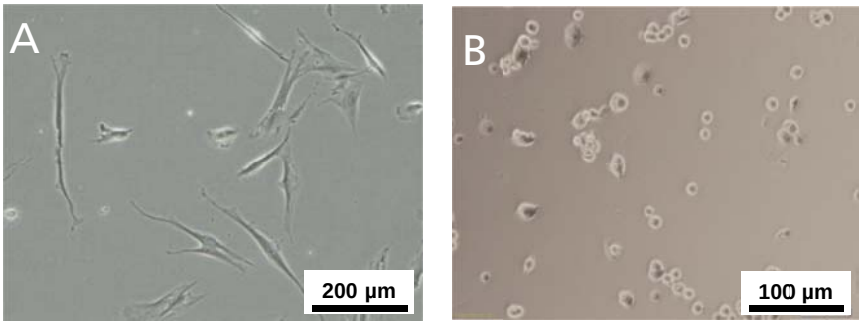


Abbildung 22 Auswirkung von Oberflächenbehandlungen mit dem adhäsionsverhindernden Stoff (Pluronic ®);
A: Auf Polystyrol gewachsene hMSC (Kontrolle), B: Nicht angehaftete hMSC auf Pluronic ®-beschichteter Oberfläche

3.5 Produktionsanlage zur Rolle-zu-Rolle Funktionalisierung von Folien

Die in der ersten Projektphase mit den Laborprüfgeräten der Saueressig GmbH durchgeführten Versuche zeigten, dass es nicht möglich war, reproduzierbare Druckergebnisse beim Drucken von Proteinen in den geforderten Strukturgrößen im Bereich von 10 µm oder kleiner zu erzielen. Dies lag vor allem an den hohen Anforderungen an die Rundlaufgenauigkeit und die mechanische Stabilität, welche durch die bei der Saueressig GmbH verfügbaren Laborprüfgeräten nicht erfüllt werden konnten. Eine FEM-Analyse verdeutlichte weiterhin, dass das zunächst eingesetzte Flexo-Farbprüfgerät vom Typ FP 100-300 auch nach einem weiteren Umbau den Anforderungen im Projekt nicht genügt hätte.

Auf der Grundlage der in der ersten Projektphase erzielten Ergebnisse erfolgte daher die Entwicklung einer neuen Druckanlage, die speziell für die Anforderungen des angestrebten Übertrags von Proteinmustern mit Strukturgrößen im Bereich von 10 µm konzipiert wurde.

Die Anlage verfügt über zwei separate Druckwerke, die ein Bedrucken der Folien sowohl im Flexo- als auch im Tiefdruck ermöglichen. Durch Variation der Bahnführungen können die Druckwerke einzeln als auch nacheinander durchlaufen werden. Eine Korona-Aktivierungseinheit erlaubt die Erhöhung der Oberflächenenergie der zu bedruckenden Folie direkt vor dem Druckprozess, sodass der Transfer des wässrigen Druckmediums von der Druckform auf die Folie verbessert wird.

Die in der Temperatur einstellbare Lufttrocknung ermöglicht ein Trocknen des Druckmediums, ohne die darin enthaltenen Proteine zu denaturieren. Durch die digitalen Antriebe in Verbindung mit der Bahnzugskontrolleinheit ist eine präzise Kontrolle der Druckbedingungen möglich. Mikrometerantriebe und Linearführungen in den Druckwerken erlauben ein präzises Einstellen von Anpressdruck oder Druckspalt. Alle Prozessparameter können über ein Touchpanel digital eingestellt werden.

Abbildung 23 Neu entwickelte Flexo- und Tiefdruckmaschine mit integrierter Korona-Aktivierungseinheit

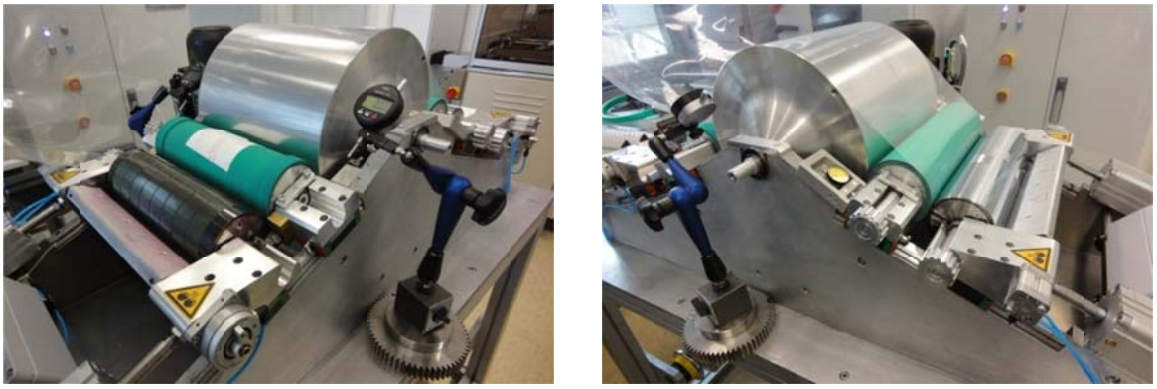


Abbildung 24 Flexodruckeinheit (links) und Tiefdruckeinheit (rechts)

Die auf der Grundlage der in der ersten Projektphase neu entwickelte Labordruckanlage (Abbildung 23) wurde im Dezember 2012 in Betrieb genommen. Nach den ersten Versuchen mit der Flexodruckeinheit erfolgten zusätzliche Anpassungen an der Maschine, um vor allem die Druckbeistellung möglichst genau einzustellen. Dafür wurden zwei digitale Messuhren installiert, mit deren Hilfe der Abstand zwischen Druckwalze und Presseur und weiterhin die Rundlaufgenauigkeit überprüft werden konnte. Zusätzliche Stellschrauben zur Einstellung des Abstands zwischen Rasterwalze und Druckwalze wurden ebenfalls nachgerüstet, sodass der Übertrag des wässrigen Druckmediums von der Rasterwalze auf die elastische Druckform optimiert werden konnte.

Im Tiefdruck konnte der Rakeldruck durch den nachträglichen Einbau eines Druckminderers eingestellt werden, was zu einem verbesserten Abrakeln des wässrigen Druckmediums führte. Unterschiedliche Rakel wurden ebenfalls getestet, um die geeignete Kombination aus Rakel, Druckmedium und Tiefdruckwalze herauszufinden. Mit den durchgeführten Modifizierungen konnten dann sowohl im Flexo- als auch im Tiefdruck wesentlich bessere Druckergebnisse als mit den in der ersten Projektphase eingesetzten Laborprüfgeräten erzielt werden.

4 Bewertung der Ergebnisse

Die in der Vorhabensbeschreibung (siehe Abschnitt 1) genannten Ziele wurden während des Projektzeitraums erreicht. Nach Abschluss der Projektarbeiten im Projekt BIOREEL steht der Demonstrator einer Rolle-zu-Rolle Produktionsanlage zur Verfügung, mit dem die großflächige Biofunktionalisierung von Polymerfolien durchgeführt werden kann.

Mehrere für die späteren Anwendungen im Bereich der Biotechnologie relevanten Polymermaterialien (COC, PS, PET und PP) wurden untersucht und für die Verwendung als Substratmaterial für die angestrebte mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung als geeignet eingestuft. Mit den im Projekt angewendeten Methoden der Oberflächenvorbehandlung mittels Koronaaktivierung sowie dem Bedrucken der Folie mit speziellen Block-Copolymeren (Pluronic ®) können die genannten Folienmaterialien für das Bedrucken mit wässrigen Proteinlösungen und auch anderen biologischen Druckmedien vorbereitet werden. Die im Projekt auf PET-Folie etablierten Verfahren können daher bei entsprechender Anpassung der nötigen Oberflächenparameter auf andere Materialien übertragen werden.

Im Bereich der Druckformherstellung konnten durch die Arbeiten der baskischen Partner und ebenso durch den Einsatz der bei Saueressig neu entwickelten Lasergravurtechnik Strukturen im Bereich von 10 µm und kleiner erzeugt werden. Für beide Druckverfahren, Flexo- und Tiefdruck, wurden Druckformen hergestellt, mit denen erfolgreiche Rolle-zu-Rolle Druckversuche durchgeführt wurden.

Der Rolle-zu-Rolle Druckprozess konnte erfolgreich etabliert werden. Auf dieser Etablierung lag der Schwerpunkt der Projektarbeiten, da eine komplexe Abstimmung zwischen unterschiedlichen Teilbereichen (Druckmedium, Bedruckstoff, Anlagenparameter, biologische Anforderungen) gefordert war. Speziell im Blick auf das Druckmedium waren Neuentwicklungen nötig, da die standardmäßig in der Druckindustrie verwendeten Substanzen in Drucktinten nicht mit den späteren Anwendungen im Bereich der Kultivierung von Zellen kompatibel sind. Diese Aufgabe wurde im Projekt BIOREEL erfolgreich gelöst.

Mit beiden Druckverfahren (Flexo- und Tiefdruck) konnten Proteine im Rolle-zu-Rolle Verfahren auf eine PET-Folie übertragen werden. Die nachfolgenden Versuche in der In-vitro Zellkultur zeigten die biologische Effizienz der gedruckten Strukturen für die in der Vorhabensbeschreibung genannten Anwendungen in der Biotechnologie. Auf den bedruckten Folien konnten verschiedene Zelltypen kultiviert werden, und die Zellen zeigten eine deutliche morphologische Ausrichtung an den Proteinmustern.

Der im Laufe des Projekts entwickelte Demonstrator einer Rolle-zu-Rolle Spezialdruckanlage ermöglicht nun den definierten großflächigen Übertrag von Proteinlösungen auf Polymerfolien. Mit den beiden Druckeinheiten für Flexo- und für Tiefdruck ist eine größtmögliche Flexibilität hinsichtlich unterschiedlicher biologischer Druckmedien und Strukturen gegeben, die mit der Spezialdruckanlage übertragen werden können.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliche Anwendungsgebiete

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Etablierung des Rolle-zu-Rolle Druckverfahrens mit Proteinlösungen war die passende Abstimmung der in Abbildung 1 dargestellten Faktoren aufeinander von grundlegender Bedeutung. Im Verlauf des Projekts BIOREEL konnten die unterschiedlichen Teilaspekte des Rolle-zu-Rolle Prozesses erfolgreich miteinander verknüpft werden. Dies geschah zunächst mit den Laborprüfgeräten der Saueressig GmbH, mit denen sowohl im Flexo- als auch im Tiefdruckverfahren erste Versuchsreichen durchgeführt wurden. Diese Experimente dienten dazu, grundsätzliche Erfahrungen mit den neuartigen (biologischen) Substanzen, die im Rolle-zu-Rolle Verfahren übertragen werden sollten, zu gewinnen. Parallel dazu erfolgte die Fertigung von Druckformen, die die geforderten Strukturen im Bereich bis kleiner 10 µm zur Verfügung stellten.

Als Druckmedien wurden zwei unterschiedliche Pufferlösungen als Trägermedium für die zu druckenden Proteine verwendet. Die Zugabe eines Trockenstoffs sowie eines fluoreszierenden Farbstoffs ermöglichte die erforderliche schnelle Trocknung der gedruckten Strukturen sowie die spätere Charakterisierung der gedruckten Strukturen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Weiterhin konnte durch diese beiden Additive die Oberflächenenergie des Druckmediums herabgesetzt werden. Zur Erhöhung der Oberflächenenergie der Polymerfolie diente eine Koronastation, durch die die Oberfläche direkt vor dem Druckvorgang aktiviert wurde.

Mit den Labordruckanlagen konnte die grundsätzliche Machbarkeit des Übertrags des in wässriger Form vorliegenden Druckmediums auf die verwendete PET-Folie gezeigt werden. Die geforderten Genauigkeiten und reproduzierbare Druckergebnisse waren allerdings mit den beiden Anlagen, auch nach konstruktiven Änderungen an dem Flexo-Laborprüfgerät, nicht zu erreichen.

Ausgehend von den Ergebnissen der ersten Projektphase wurde der Demonstrator einer neuen Spezialdruckanlage von der Saueressig GmbH in enger Kooperation mit dem Fraunhofer IBMT entwickelt und aufgebaut. Mit diesem Demonstrator konnten dann erfolgreich Versuche im Flexo- und im Tiefdruck durchgeführt werden.

Die biologischen Versuche im Anschluss an das Rolle-zu-Rolle Drucken zeigten, dass die mit den Peptiden und Proteinen bedruckten Polymerfolien für die In-vitro Zellkultivierung geeignet waren und erfolgreich genutzt werden konnten. Die Zellen hafteten auf den Mikrostrukturen auf den bedruckten Folien an und richteten sich an den Proteinmustern aus.

Aufgrund der vorherigen Aktivierung der Folie kam es teilweise auch zu einem Anhaften von Zellen auf nicht bedruckten Stellen. Die mögliche Verwendung eines Block-Copolymers wie z.B. Pluronic ® eröffnet hier allerdings eine Möglichkeit, um die Selektivität der bedruckten Oberfläche hinsichtlich des geforderten definierten Anhaftens von Zellen mit deren anschließendem gerichtetem Wachstum zu erhöhen. Beispielsweise kann die Kunststofffolie per Koronavorbehandlung aktiviert, dann aber zunächst – ganz

flächig oder auch nur in bestimmten Bereichen – mit dem zellabweisenden Tensid bedruckt werden. In einem zweiten Schritt können dann die Proteinmuster zwischen oder auf die Tensidstrukturen gedruckt werden. Damit wird das unerwünschte Anhaften von Zellen außerhalb der Proteinmuster vermieden.

5.2 Mögliche Anwendungsgebiete

Die in BIOREEL zu entwickelnde Rolle-zu-Rolle Produktionslinie zur effizienten Oberflächenfunktionalisierung mit hohem Durchsatz soll vor allem Märkte für standardisierte und reproduzierbare Zellkulturtechniken, selektive Zellkulturen und auch kostengünstige Produkte für das Tissue-Engineering erschließen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Funktionalisierung von Zellkulturbehältern (Bioreaktoren), deren Oberflächen eine In-vivo-Situation nachbilden, zu einem Zellverhalten führt, das mit dem eines natürlichen Gewebes vergleichbar ist. Diese Tatsache wird bisher erst in geringem Maß von der modernen biotechnischen Industrie zur Herstellung vieler wichtiger Produkte, wie z.B. künstlicher Haut, künstlicher Organe oder künstlichen Gewebes, genutzt. Der Umsatz des deutschen Biotechnologiemarktes betrug 2012 2,9 Milliarden EURO (Ding et al., 2013) und wurde von 565 Firmen erwirtschaftet. Fast die Hälfte der Firmen ist dabei der „roten", das heißt der medizinischen Biotechnologie zuzuordnen, die sich auf die Entwicklung von Therapeutika, die Erforschung neuer Diagnostika und die Entwicklung von Technologieplattformen konzentriert.

Obgleich bereits erste Zellkulturprodukte mit homogen funktionalisierten Oberflächen am Markt erhältlich sind (z.B. von den Firmen Greiner, Nunc, Oligene, MINUCELLS und MINUTISSUE GmbH, Synthecon, Empa), gibt es bisher keine solchen Produkte mit mikrostrukturierter Funktionalisierung. Das liegt daran, dass die industrielle Massenfertigung solch funktionaler Oberflächen heute entweder nicht möglich oder zu teuer ist.

Es besteht daher ein starker Bedarf an Produktionsausrüstungen, welche eine effiziente mikrostrukturierte Oberflächenfunktionalisierung im industriellen Maßstab erlauben. Das heißt zur Verwertung der in BIOREEL angestrebten Ergebnisse ist ein großes Marktpotenzial im Bereich Tissue-Engineering vorhanden.

Obwohl BIOREEL hauptsächlich auf Tissue-Engineering als Einsatzgebiet abzielt, können die Projektergebnisse in fast allen Fachrichtungen der Biowissenschaften transferiert werden, in denen mikrostrukturierte Biopolymere eingesetzt werden. Die Ergebnisse können Anwendung finden in der Arzneimittelentwicklung, künstlichem Gewebe für die Erforschung von Krankheiten, Standardisierung von Transplantaten/Transplantationen und in Testsystemen durch selektive sowie reproduzierbare Zellkulturen. Ein wichtiges Gebiet ist beispielsweise die selektive und dadurch effiziente Kultur verschiedener Zellen, z.B. zur selektiven Differenzierung von Stammzellen.

Ein weiterer wichtiger Markt ist die In-vitro-Diagnostik, und hier insbesondere die Point of Care Anwendungen, bei denen günstige Einwegartikel benötigt werden. Zusammen mit anderen europäischen Forschungsinstituten hat das Fraunhofer IBMT die Idee „Microfluidics on foil" entwickelt (Velten et al., 2008). Rolle-zu-Rolle Methoden zum Heißprägen mikrofluidischer Strukturen auf Polymerfolien sind bereits verfügbar. Was noch fehlt, ist eine Rolle-zu-Rolle Methode zur Oberflächenfixierung von Rezeptormole-

külen auf mikrofluidischen Einwegfolien. In diesem Sinn werden die Ergebnisse von BIO-REEL dazu beitragen, vom Point-of-Care Markt geforderte kostengünstige Einwegartikel zu entwickeln.

Die geplante Herstellung von Folien mit einer Kollagen IV und EGF Beschichtung ist eine erste Vorarbeit zur Herstellung von optimierten Wundauflagen und zur Herstellung von Hautersatz in der regenerativen Medizin. Hier kommen die Vorteile der Rolle-zu-Rolle Produktionsausrüstung voll zum Tragen, da nur so großflächige Wundauflagen bei geringen Herstellungskosten produziert werden können.

6 Danksagung

Dieses Projekt wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) innerhalb des Rahmenkonzeptes „Forschung für die Produktion von morgen“ gefördert und vom Projektträger Karlsruhe (PTKA) betreut.
Die Projektpartner danken dem BMBF für die Förderung des Projekts und dem Projektträger für die Betreuung.
Projektarbeiten zur Entwicklung von neuen Mikrofertigungstechnologien erfolgten in Zusammenarbeit mit spanischen Partnern im Rahmen des MNT ERA-NET, einem Netzwerk aus regionalen und nationalen Förderorganisationen. Während der ersten Projektphase wurden die Projektarbeiten der spanischen Partner mit Mitteln des Baskenlandes gefördert und von Innobasque (la Agencia Vasca de la Innovación-Berrikuntzaren Euskal Agentzia) betreut. In der zweiten Phase des Projekts fand die Kooperation mit dem spanischen Projektpartner Tekniker im Rahmen des von der Europäischen Kommission im 7. EU-Forschungsrahmenprogramm geförderten Projekts EUMINAfab- (EUMINAfab Project ID 1075) statt. Die Projektpartner bedanken sich für die Förderung und die Betreuung.

7 Literaturverzeichnis

Bossi, A.; Guizzardi, L.; D'Acunto, M.R. & Righetti, P.G. (2004), 'Controlled enzyme-immobilisation on capillaries for microreactors for peptide mapping', Anal Bioanal Chem 378(7), 1722--1728.

Cetinkaya, G.; Türkoglu, H.; Arat, S.; Odaman, H.; Onur, M.A.; Gümüsderelioglu, M. & Tümer, A. (2007), 'LIF-immobilized nonwoven polyester fabrics for cultivation of murine embryonic stem cells', J Biomed Mater Res A.

Clark, P.; Connolly, P.; Curtis, A.S.; Dow, J.A. & Wilkinson, C.D. (1991), 'Cell guidance by ultrafine topography in vitro', J. Cell Sci 99 (Pt 1), 73--77.

Ding, S.; Mannhardt, B.; Wirsching, S.; Graf, P.; Kaltwaßer, B.; Laqua, M.; Finnis, T.; Röbig, B. (2013), 'Die deutsche Biotechnologie-Branche 2013', biotechnologie.de, Berlin

Klenkler, B.J. & Sheardown, H. (2006) , 'Characterization of EGF coupling to aminated silicone rubber surfaces', Biotechnol Bioeng 95(6), 1158--1166.

Lutolf M.P., Gilbert P.M. & Blau H.M., 'Designing materials to direct stem-cell fate' (2009), NATURE, Vol 462, doi:10.1038/nature08602

Nagaoka, M.; Koshimizu, U.; Yuasa, S.; Hattori, F.; Chen, H.; Tanaka, T.; Okabe, M.; Fukuda, K. & Akaike, T. (2006), 'E-Cadherin-Coated Plates Maintain Pluripotent ES Cells without Colony Formation', PLoS ONE 1, e15.

Pins, G.D.; Bush, K.A.; Cunningham, L.P. & Campagnola, P.J. (2006), 'Multipho-ton excited fabricated nano and micro patterned extracellular matrix proteins direct cellular morphology', J Biomed Mater Res A 78(1), 194--204.

Rogers, J.A. & Nuzzo, R.G. (2005), 'Recent progress in soft lithography ', Materials today 8, 50-56.

Rowlands, A.S.; George, P.A and Cooper-White, J.J. (2008), 'Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation', Am J Physiol Cell Physiol 295: C1037–C1044

Stevens M.M. and George J.H. (2005), 'Exploring and Engineering the Cell Surface Interface', Science 310, 1135

Velten, T.; Schuck, H.; Richter, M.; Klink, G.; Bock, K.; Khan Malek, C.; Polster, S.; Bolt, P (2008), 'Microfluidics on foil', Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Journal of Engineering Manufacture, Vol. 222 No B1, pp. 107-116

Wilde, L.M.; Farace, G.; Roberts, C.J.; Davies, M.C.; Sanders, G.H.; Tendler, S.J. & Wil-

liams, P.M. (2001), 'Molecular patterning on carbon based surfaces through photobiotin activation.', Analyst 126(2), 195--198.

Wood, A. (1988), 'Contact guidance on microfabricated substrata: the response of teleost fin mesenchyme cells to repeating topographical patterns', J Cell Sci 90 (Pt 4), 667--681.

Xia, Y. and Whitesides, G.M. (1998), 'Soft Lithography', Angew Chem Int Ed Engl 37, 551—575

Link zum Datensatz in der Datenbank Fraunhofer-Publica
http://publica.fraunhofer.de/dokumente/N-264796.html
urn:nbn:de:0011-n-2647964