

Untersuchungen PEG-basierter
thermo-responsiver Polymeroberflächen zur
Steuerung der Zelladhäsion

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Bioanalytik und Bioelektronik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Universität Potsdam

von
Katja Uhlig
geboren am 14.09.1981 in Zossen

Gutachter:

1. Prof. Frank F. Bier
2. Prof. Diethelm Johannsmann
3. Prof. Jürgen Rühle

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2010

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4778/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-47784>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-47784>

Zusammenfassung

Moderne Methoden für die Einzelzellanalyse werden dank der fortschreitenden Weiterentwicklung immer sensitiver. Dabei steigen jedoch auch die Anforderungen an das Probenmaterial. Viele Aufbereitungsprotokolle adhärenter Zellen beinhalten eine enzymatische Spaltung der Oberflächenproteine, um die Ablösung vom Zellkultursubstrat zu ermöglichen. Verschiedene Methoden, wie die Patch-Clamp-Technik oder eine auf der Markierung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen basierende Durchflusszytometrie können dann nur noch eingeschränkt eingesetzt werden. Daher ist die Etablierung neuer Zellablösemethoden dringend notwendig.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals PEG-basierte thermo-responsive Oberflächen erfolgreich für die Zellkultur eingesetzt. Dabei wird das zerstörungsfreie Ablösen verschiedener Zelllinien von den Oberflächen durch Temperatursenkung realisiert. Die Funktionalität der Oberflächen wird durch Variation der Polymerstruktur, sowie der Konzentration der Beschichtungslösung, durch Beschichtung der Oberflächen mit einem zelladhäsionsfördernden Protein (Fibronectin) und durch Adsorption zelladhäsionsvermittelnder Peptide (RGD) optimiert. Um den Zellablösungsprozess detaillierter zu untersuchen, wird hier zum ersten Mal der direkte Zellkontakt mit thermoresponsiven Oberflächen mittels oberflächensensitiver Mikroskopie (TIRAF) sichtbar gemacht. Mit dieser Technik sind die exakte Quantifizierung und die Analyse der Reduktion der Zelladhäsionsfläche während des Abkühlens möglich. Hierbei werden in Abhängigkeit von der Zelllinie Unterschiede im Zellverhalten während des Ablösens festgestellt: Zellen, wie eine Brustkrebszelllinie und eine Ovarzelllinie, die bekanntermaßen stärker mit ihrer Umgebung in Kontakt treten, vergrößern im Verlauf des Beobachtungszeitraumes den Abstand zwischen Zellmembran und Oberfläche, reduzieren jedoch ihre Zell-Substratkontaktfläche kaum. Mausfibroblasten hingegen verkleinern drastisch die Zelladhäsionsfläche. Der Ablösungsprozess wird vermutlich aktiv von den Zellen gesteuert. Diese Annahme wird durch zwei Beobachtungen gestützt: Erstens verläuft die Reduktion der Zelladhäsionsfläche bei Einschränkung des Zellmetabolismus durch eine Temperatursenkung auf 4 °C verzögert. Zweitens hinterlassen die Zellen Spuren, die nach dem Ablösen der Zellen auf den Oberflächen zurückbleiben. Mittels Kombination von TIRAF- und TIRF-Mikroskopie werden die Zelladhäsionsfläche und die Aktinstruktur gleichzeitig beobachtet. Die Verknüpfung beider Methoden stellt eine neue Möglichkeit dar, intrazelluläre Prozesse mit der Zellablösung von thermoresponsiven Oberflächen zu korrelieren.

Abstract

Modern methods for single-cell analysis are becoming increasingly sensitive. At the same time, requirements for the sample material are on the rise. Today, sample preparation of adherent cells usually includes steps of enzymatic treatment to digest surface proteins thus, inducing cell detachment from culture substrates. This strongly limits the application of different techniques like patch clamp or labelling of extracellular domains of membrane proteins for flow cytometry. Therefore, a new cell detachment method is urgently required.

In the present work, new PEG-based thermo-responsive polymers are used for cell culture for the first time. Here, non-destructive detachment of different cell lines from polymer-coated surfaces is realised by controlled temperature reduction. The surface functionality is systematically optimised by varying the concentration of the coating solutions, by artificial surface coating of a cell adhesion-mediating protein (fibronectin) and by co-adsorption of a cell adhesion-mediating peptide (RGD). For detailed analysis of the cell detachment process, TIRF microscopy is used to directly visualise the cell contacts on the thermo-responsive surfaces. Using this technique allows both the quantification and analysis of the reduction of the cell adhesion area during sample cooling. Furthermore, for several cell lines, different behaviours in cell detachment is observed. Cells that have close contact to their substrate like MCF-7 breast cancer cell line and CHO-K1 ovary cells increase the distance between cell membrane and surface, but there is only little decrease of cell-substrate adhesion area. In contrast, L929 fibroblasts reduce the cell adhesion area drastically. Furthermore, the hypothesis that the cell detachment is an active process is shown by lowering the cell metabolism by temperature reduction to 4 °C and by the cell traces that are left behind after rinsing the surfaces. A combination of TIRAF and TIRF enables visualising the cell adhesion area and actin structures. Measuring both parameters simultaneously opens up new possibilities to correlate intracellular and cell detachment processes on thermo-responsive surfaces.

Keywords:

thermo-responsive polymers, polyethylene glycol, TIRF, cell adhesion

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	<i>In Vitro</i> -Adhäsion und Ablösung adhärenter Zellen	5
2.2	Thermo-responsive Polymere	7
2.3	Variationen der Grenzflächeneigenschaften mittels Oberflächenfunktionalisierung	11
2.3.1	Self-Assembled Monolayer hoher Ordnung	11
2.3.2	Bürstenpolymere	13
2.4	Optische Analysemethoden auf Basis von Grenzflächeneigenschaften	15
2.4.1	Totalreflektion-Fluoreszenz-Mikroskopie	15
2.4.2	Oberflächenplasmonenresonanz	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Die thermo-responsiven Polymere P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)	18
3.2	RGD-Derivate	20
3.3	Oberflächenpräparation	20
3.3.1	Oberflächenreinigung	20
3.3.2	Evaporation von Gold	21
3.3.3	Chemisorption	22
3.3.4	Coadsorption	22
3.3.5	Fibronektinbeschichtung	23
3.4	Oberflächenanalytik	23
3.4.1	Kontaktwinkelmessung	23
3.4.2	Oberflächenplasmonenresonanz	23
3.5	Zellkultur	24
3.6	Transfektion	25
3.7	Durchflusszytometrie	25

INHALTSVERZEICHNIS

3.8	Phasenkontrastmikroskopie und Analyse	26
3.9	TIRF-Mikroskopie und Analyse	27
4	Ergebnisse	31
4.1	Charakterisierung der P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen	31
4.1.1	Kontaktwinkel	31
4.1.2	Oberflächenplasmonresonanz	32
4.1.3	Zellausbreitungszeit und Abrundungseffizienz	34
4.2	Optimierung der thermo-responsiven Oberflächen	36
4.2.1	Konzentration und Struktur von P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)	36
4.2.2	Wechselwirkung mit Fibronectin	39
4.2.3	Zugänglichkeit von Signalmolekülen	40
4.3	Langzeitstabilität und Wiederverwendbarkeit thermo-responsiver Oberflächen	45
4.4	Erhalt des Membranproteins Integrin nach der Zellablösung mittels thermo-responsiver Oberflächen und Trypsin	46
4.5	Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Zellabrundung	48
4.6	Verhalten unterschiedlicher Zelllinien auf thermo-responsiven Oberflächen	49
4.7	TIRAF-Mikroskopie auf thermo-responsiven Oberflächen	50
4.7.1	Zeitaufgelöste Untersuchung der Zelladhäsionsfläche von L929-Fibroblasten auf P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)	52
4.7.2	Zellablösung von MCF-7- und CHO-K1-Zellen auf P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)	54
4.7.3	Zellspuren auf P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)	58
4.7.4	Zelladhäsionsfläche und Cytoskelettbestandteile von MCF-7-Zellen	59
4.7.5	Untersuchung der Zelladhäsionsfläche während des Trypsinierens	59
5	Diskussion	63
5.1	Zusammenhang zwischen Zelladhäsion und Benetzbarkeit	64
5.2	Zellausbreitungszeit und deren Optimierung	66
5.3	Zellablösung unterschiedlicher Zelllinien von thermo-responsiven Oberflächen	74
6	Ausblick	82

INHALTSVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis	84
Abkürzungsverzeichnis	90
Veröffentlichungen	91
Danksagung	93

1 Einleitung

Stimuli-responsive Polymere sind molekulare Schalter, die durch eine Umgestaltung der molekularen Struktur ihre Eigenschaften ändern. Gesteuert wird dieser Prozess über Licht, Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration. Diese Materialien bieten daher ein breites Spektrum potentieller Einsatzmöglichkeiten, die besonders in der Biotechnologie von enormem Interesse sind. Beispielsweise werden Hydrogele als Ventil in Mikrokanäle integriert. Durch Stimulation ändert sich das Volumen des Polymers und der Kanal wird verschlossen [1]. Werden die schaltbaren Polymere an Reaktionszentren von Enzymen oder Rezeptoren gekoppelt, entstehen bio-hybride Objekte. Über die Steuerung der Konformation kann dann die Zugänglichkeit für Substrate oder Liganden beeinflusst werden [2]. Durch die Änderung der Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten und der wässrigen Umgebung kann die Viskosität des Mediums gesteigert [3] und so eine gezielte Medikamentenfreisetzung (Drug Release) ermöglicht werden [4]. Ein großes Forschungsgebiet sind das Tissue Engineering und die Zellkultivierung. Über die Kontrolle der Hydratisierung der auf Zellkultursubstraten immobilisierten Polymerketten wird hierbei die Protein- und Zelladhäsion gesteuert [5].

Warum die Entwicklung alternativer Methoden für die kontrollierte Zellablösung beim Tissue Engineering und der Zellkultur so dringend notwendig ist, wird durch die Auswirkungen der bisher genutzten Methode auf die Zellen klar. Um adhärente Zellen von ihren Zellkultursubstraten zu lösen, werden heute noch Peptidasen wie Trypsin verwendet. Diese verdauen unter anderem die extrazelluläre Domäne des für die Zelladhäsion verantwortlichen Proteins Integrin. Dadurch werden die Verbindungen zwischen den Zellen und dem Zellkultursubstrat gelöst. Da Trypsin jedoch unspezifisch stets hinter den Aminosäuren Arginin oder Lysin schneidet, werden nicht nur die Fokalkontakte der Zellen zerstört, sondern sämtliche Membranproteine sowie auch die von den Zellen synthetisierte extrazelluläre Matrix (ECM). Aus diesem Grund führen zahlreiche Prozesse wie etwa die Analyse von Membranrezeptoren mittels Durchflusszytometrie oder die Messung der Aktivität von Ionenkanälen mittels Patch-Clamp-Technik weitenteils zu mangelhaften

Ergebnissen. Außerdem verändern die Zellen durch die nun fehlenden funktionellen Integrine ihre Adhäsionseigenschaften, sie verlieren Antigenmaterial und zeigen Schwankungen in der Membranpermeabilität [6]. Darüber hinaus ändert sich kurzzeitig die Proteinbiosynthese, da die zerstörten Membranproteine erst wieder synthetisiert werden müssen.

Für die alternative Steuerung der Zelladhäsion werden thermo-responsive Hydrogele verwendet. Sie ändern ihre Konformation in Abhängigkeit von der Temperatur durch den Wechsel von Polymer-Wasser- zu Polymer-Polymer-Interaktionen. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur (lower critical solution temperature, kurz LCST) liegen die Polymere im hydratisierten Zustand vor und sind protein- und zellabweisend. Steigt die Temperatur über die Phasenübergangstemperatur, wird das gebundene Wasser freigesetzt und die Polymerketten wechselwirken verstärkt untereinander. Das Polymer befindet sich nun im kollabierten Zustand und ermöglicht die Adhäsion von Proteinen und Zellen. Das erste und bekannteste Polymer, das für die Zellablösung von Zellkultursubstraten verwendet wurde, ist Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAAm). Da die Oberflächeneigenschaften auch thermo-responsiver Polymer-substrate extrem von der Art der Immobilisierung abhängen, wurden unterschiedliche Zellverhalten während des Prozesses der Zellablösung identifiziert. Canavan et al. zeigte die Ablösung von Zellen inklusive der nahezu vollständigen Ablösung der extrazellulären Matrix (ECM) von thermo-responsiven Oberflächen [7]. Somit ist die Überführung einer kompletten Zellschicht möglich. Andere Beobachtungen zeigten, dass sich individuelle Zellen bestimmter Zelllinien aktiv von der Oberfläche ablösen und nicht in der ECM verbleiben [8]. Je nach Funktion und Lokalisation verschiedener Zelltypen im Organismus unterscheiden sich ihre Zelladhäsionseigenschaften. Durch die große Variabilität der Zelladhäsionsstärke ist die Ablösung aller etablierten Zelllinien von derselben schaltbaren Oberfläche bisher noch nicht möglich. Für einzelne Zelllinien wurden optimale Bedingungen gefunden, jedoch kann eine Universallösung nicht angeboten werden. Deshalb sind die Weiterentwicklung der thermo-responsiven Oberflächen und die Untersuchung des Zellverhaltens darauf essentiell für die zukünftige Biotechnologie. In der vorliegenden Arbeit wurde ein völlig neues schaltbares Polymer für die Oberflächenmodifikation eingesetzt, um das Anwendungspotential dieses thermo-responsiven Polymers zu erkunden.

Bei dem thermo-responsiven Polymer handelt es sich um ein Bürstenpolymer mit einem apolaren Rückgrat und teilweise polaren Polyethylenglykol-Seitenketten, das aus den Monomeren 2-(2-methoxyethoxy)ethyl Methacrylat (MEO₂MA) und Oligo(ethylenglycol) Methacrylat (OEGMA) zu einem statistischen Copolymer polymerisiert wurde. Die Balance zwischen den hydrophilen und hydrophoben Anteilen in der molekularen Struktur des Polymers

bestimmt im Wesentlichen dessen Löslichkeitseigenschaften. Mit steigender PEG-Kettenlänge steigt die Hydrophilie des Moleküls und die Phasenübergangstemperatur wird zu höheren Temperaturen hin verschoben. Das Homopolymer P(MEO₂MA) hat den Phasenübergang bei 26 °C, während das Homopolymer P(OEGMA) eine Phasenübergangstemperatur von 90 °C aufweist. Das Konzentrationsverhältnis dieser beiden Monomere während der Polymerisation entscheidet über die resultierende Phasenübergangstemperatur des Copolymers dieses Temperaturbereichs [9]. Aus linearen PEG-Ketten bestehende Beschichtungen sind etablierte und gut untersuchte Systeme mit protein- und zellabweisenden Eigenschaften. Diese Eigenschaften zeigen auch P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierte Oberflächen unterhalb ihrer Phasenübergangstemperatur. Im Gegensatz zum PNiPAAm ist der Phasenübergang bei P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) vollständig reversibel. Es tritt keine Hysterese während des Phasenübergangs auf [10], da hier keine Donatoren für Wasserstoffbrücken, wie zum Beispiel Aminogruppen, zur Verfügung stehen [11]. Ferner können über Wasserstoffbrücken mit diesen Aminogruppen des PNiPAAms auch Proteine in Wechselwirkung treten und so irreversible Bindungen herbeiführen [12].

Um in dieser Arbeit die Frage beantworten zu können, ob sich diese neuen thermo-responsiven Polymere für die Steuerung der Zelladhäsion eignen, wurde P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) als selbstorganisierende Monoschichten über eine kovalente Kopplung der Disulfidgruppe auf dünnen Goldschichten immobilisiert. Diese homogene und reproduzierbare Oberflächenmodifikation eignet sich darüber hinaus hervorragend dazu, die Oberflächenarchitektur über die Konzentration der Beschichtungslösung sowie die Einbettung weiterer Moleküle zu kontrollieren. So konnten die Oberflächen hinsichtlich wesentlicher Parameter wie der Vermittlung der Zelladhäsion optimiert werden. Zusätzlich werfen thermo-responsive Oberflächen die Frage auf, ob sich der Kontaktwinkel auf ihnen über und unter der Phasenübergangstemperatur ändert. Anhand dessen lässt sich klären, ob wirklich ein kausaler Zusammenhang von Oberflächenbenetzbarkeit und Zelladhäsion existiert. Ferner wurde hier geprüft, ob Zellen über die Konformationsänderung thermo-responsiven Oberflächen gezielt über Signalpräsentation adressiert werden können. Zu diesem Zweck wurden zelladhäsionsvermittelnde Peptide (RGD) mit P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) coadsorbiert und die Zellausbreitungszeit gemessen. Da in der Literatur aktive und passive Zellablösungsmechanismen beschrieben wurden, ist hier eine interessante Frage, ob sich die Zellen infolge des Schaltens der P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Oberflächen selbst ablösen oder abgelöst werden. Das Herabsetzen des Zellmetabolismus durch eine Temperatursenkung auf 4 °C ermöglichte den Vergleich der Zellablösung von den thermo-responsiven Oberflächen mit der Zellablösung bei

Raumtemperatur. Für eine spätere Kommerzialisierung ist zudem die Haltbarkeit der polymermodifizierten Oberflächen sehr essentiell. Deswegen wurden die Oberflächen über ein halbes Jahr hinweg gelagert und zwischendurch regelmäßig auf ihre Funktionalität hin überprüft. Da die neuen schaltbaren Oberflächen ein breites Anwendungsgebiet abdecken sollten, ist das Testen der Ablösungseffizienz verschieden stark adhärrierender Zelllinien obligatorisch. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher L929-Mausfibroblasten, MCF-7-Brustkrebszellen, U2OS-Osteosarkomzellen und CHO-Ovarzellen hinsichtlich ihrer Zellablösungseffizienz von P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Oberflächen untersucht. Die Hellfeldmikroskopie war jedoch für die verschiedenen Zelllinien nicht aussagekräftig genug. Ein mächtigeres Werkzeug für die Beobachtung der Zelladhäsion auf künstliche Oberflächen stellt hingegen die Totalreflektion-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRF-Mikroskopie) dar. Mit dieser Methode werden nur Informationen über die Wechselwirkung der Zelle mit der Oberfläche erfasst, indem die Eindringtiefe des anregenden Lichts auf einem dünnen Bereich von ca. 150 nm an der Oberfläche begrenzt wird. Ein Fluoreszenzfarbstoff im wässrigen Medium wird durch die adhärenen Zellen verdrängt, und es entstehen dunkle Bereiche, die die Zelladhäsionsflächen abbilden (TIRAF-Mikroskopie). Es stellt allerdings aus technischen Gründen eine besondere Herausforderung dar, die Zellen mit dieser Methode auf thermo-responsiven Oberflächen zu untersuchen. Diese Gründe, wie Temperierung, durch die Goldbeschichtung verursachtes Quenching und zusätzlich auftretende Absorption, sowie ihre Lösung werden in dieser Arbeit beschrieben. Durch die hoch aufgelöste Information über die Zellkontaktfläche konnte erstmalig die Dynamik der Zellablösung von thermo-responsiven Oberflächen bei den verschiedenen Zelltypen aufgeklärt werden. Dabei wurden wesentliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelllinien festgestellt. Durch den simultanen Einsatz von TIRAF- und TIRF-Mikroskopie wurden die Zelladhäsionsfläche und die Aktinfasern transfizierter MCF-7-Zellen während des Zellablösungsprozesses von thermo-responsiven Oberflächen dargestellt. Dieser Ansatz ermöglicht die Korrelation der Zelladhäsionsfläche mit oberflächennahen intrazellulären Prozessen. Anschließend wird dann am Ende dieser Arbeit das neue hier verwendete thermo-responsive Polymer hinsichtlich der beschriebenen Beobachtungen und Erfahrungen dem schon bekannten PNiPAAm gegenübergestellt und die Unterschiede und Gemeinsamkeiten werden diskutiert.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *In Vitro*-Adhäsion und Ablösung adhärenter Zellen

Für die Entwicklung und Optimierung von zellablösenden thermo-responsiven Oberflächen ist die Betrachtung des Ablaufs der Zelladhäsion, der verwendeten Zellablösungsmethoden und der Unterdrückung der Protein- und Zelladhäsion notwendige Voraussetzung.

Betrachten wir zunächst das Substrat: Zelladhäsion an künstlichen Oberflächen ist ein komplexer Prozess, der schon vor dem Zellkontakt viele Stufen durchläuft [13]. Wassermoleküle ordnen sich je nach chemischen und physikalischen Grenzflächeneigenschaften des Substrats auf der Oberfläche an und bilden eine Hydrathülle. Sie beeinflussen dadurch die Adsorption bestimmter Proteine und Moleküle und deren Orientierung über Van-der-Waals- oder elektrostatische Wechselwirkungen. In dem im Zellkulturmedium enthaltenen Serum befinden sich über 200 verschiedenen Proteine, die um die Adsorption an der Oberfläche konkurrieren. Albumin ist das bei weitem überwiegende Serumprotein, das allerdings die Zelladhäsion nicht unterstützt. Aufgrund seiner hohen Konzentration und der durch die geringe Molekülgröße schnellen Diffusion, adsorbiert zunächst Albumin auf der Oberfläche. Nach einigen Minuten bis Stunden wird Albumin von zelladhäsionsfördernden Proteinen, die eine größere Molekülmasse und aber auch eine deutlich höhere Affinität aufweisen, wie Fibronectin, ersetzt [14].

Zellen kommunizieren über Membranproteine mit ihrer Umgebung und erhalten aus der unmittelbaren Umgebung über spezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung Informationen. Eine bei der Adhäsion sehr wichtige Rezeptorklasse bilden die Integrine. Es handelt sich dabei um heterodimere Transmembranproteine, die aus der Assoziation von α - und β -Untereinheiten gebildet werden und auf der extrazellulären Seite spezifisch an das Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) binden. Diese Peptidsequenz wurde in zelladhäsionsfördernden Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Vitronectin und Laminin entdeckt [15, 16]. Binden Integrine an diese

Erkennungssequenz, so bilden sich intrazellulär Fokalkontakte aus. Dies sind Proteinkomplexe mit über 50 beteiligten Proteinen, die die β -Untereinheiten der Integrine über Adapterproteine kaskadiert mit dem Cytoskelettbestandteil Aktin verknüpfen. Zudem aktiviert die Assemblierung dieser Komplexe auch noch verschiedene Signalkaskaden [17].

Ein deutliches Beispiel für den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Zelladhäsion stellen die Zellspuren dar, wie sie migrierende Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten auf künstlichen Oberflächen hinterlassen [18]. Es handelt sich dabei um geschlossene Membranröhren von einigen Hundert Mikrometer Länge und mit einem Durchmesser von 70 bis 100 nm. Je nach der Oberflächenbeschaffenheit (und dem Zelltyp) wird die hoch organisierte Struktur dieser Spuren beeinflusst. Eine dendritische Struktur entsteht durch die Verzweigung der Zellspur. Dadurch lassen sie die Richtung der Migration erkennen (zwei Stränge verbinden sich zu einem Strang in Richtung der Zellbewegung). Das Zentrum der Verzweigung ist in der Regel höher (200 nm), als die restlichen Bereiche. So entsteht der Eindruck eines punktförmigen Musters [19]. Zellspuren enthalten Cytoplasma, an den Verzweigungen intrazelluläre Membran, kleine Organellen und Aktinfasern. Auf ihrer Außenseite wurden zum Beispiel Integrin und der Transferrinrezeptor CD71 nachgewiesen [20].

Um adhärenente Zellen wieder von Oberflächen abzulösen, werden überwiegend zwei verschiedene Methoden angewendet. Die bekannteste Methode ist der enzymatische Abbau von Membranproteinen und extrazellulären Matrixproteinen durch Trypsin. Diese Peptidase scheidet Aminosäuresequenzen nach Lysin und Arginin und löst somit alle Zell-Zell-Kontakte und Zell-Oberflächen-Kontakte auf. Neben den zelladhäsionsvermittelnden Membranproteinen werden allerdings auch alle anderen Membranproteine verdaut. Bei der zweiten Methode, der mechanischen Zellernte wird die Zellschicht mittels eines Zellschaber von der Oberfläche geschert. Dabei bleiben die Zell-Zell-Kontakte und die extrazelluläre Matrix weitestgehend erhalten. Durch die Scherung werden jedoch viele Zellen geschädigt.

Neben der gezielten Förderung der Zelladhäsion durch entsprechende Oberflächeneigenschaften werden solche eingesetzt, die Protein- und Zelladhäsion vermeiden. Derartige Oberflächen bestehen häufig aus dem nicht toxischen, wasserlöslichen Polymer Polyethylenglykol (PEG). Der Mechanismus für die geringe Proteinadsorption auf diesem Material ist noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Erklärungsansätze sind ein großes Ausschlussvolumen und der damit verbundene hohe Wassergehalt, die hohe Beweglichkeit der PEG-Seitenketten, die fehlenden Bindungsstellen auf Proteinen und die geringe freie Energie an der Grenzfläche zwischen PEG und Wasser [21]. Das große Ausschlussvolumen der PEG-Ketten entsteht durch die Anlagerung von

Wassermolekülen. Durch diese Hydrathüllen können Proteine nicht mehr mit der PEG-modifizierten Oberfläche wechselwirken. Zusätzlich sind die immobilisierten PEG-Ketten sehr mobil. Daher wird ein großer Bereich der Oberfläche abgeschirmt und der Protein-Oberflächen-Kontakt wird erschwert. Des Weiteren bevorzugen PEG-Ketten die Wechselwirkung mit Wasser anstatt Proteinen, da die Bindung von Wassermolekülen gegenüber der Bindung von Proteinen energetisch günstiger ist. Die freie Grenzflächenenergie ist somit geringer.

Diese Betrachtung der Proteinwechselwirkung und der Zelladhäsion auf Oberflächen zeigt die unterschiedlichen Prozesse auf zelladhäsionsfördernden bzw. -abweisenden Substraten. Wesentliches Ziel dieser Arbeit war nun, Oberflächen zu entwickeln, die in kontrollierter Weise beide Eigenschaften in sich vereinen. Dies gelang durch den Einsatz thermo-responsiver Polymere. Warum diese Polymere zwei unterschiedliche Zustände haben können und welche Eigenschaften sich daraus ergeben, wird im folgenden Abschnitt thematisiert.

2.2 Thermo-responsive Polymere

Polymere, die auf ein äußeres Signal hin ihre Konformation ändern und somit andere Eigenschaften annehmen können, nennt man stimuli-responsive Polymere. Diese Besonderheit erregt in der Forschung und Entwicklung großes Interesse. Daher werden die stimuli-responsiven Polymere in vielen Gebieten wie der Biosensorik, Chromatographie, Pharmatherapie, regenerativen Medizin und Zellkultur eingesetzt [22, 23]. Der Phasenübergang kann je nach Polymer über Licht, Temperatur, elektrisches Potential, pH-Wert oder Ionenstärke induziert werden. Die strukturelle Änderung kommt meist durch eine fortschreitende Ionisation oder durch den Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen zustande. Thermisch schaltbare Polymere gehören zu der größten und am besten untersuchten Gruppe der stimuli-responsiven Polymere. Das Prinzip des Phasenübergangs beruht auf der Änderung der Wechselwirkung von Polymerketten mit dem umgebenden Wasser bei einer bestimmten Temperatur (LCST = lower critical solution temperature). Unterhalb dieser Temperatur ist das Polymer wasserlöslich und liegt in einem expandierten Knäuel-Zustand vor. Steigt die Temperatur über die LCST, kollabiert das Polymer, wird wasserunlöslich und fällt aus (Abb. 2.1).

Es existieren zahlreiche Polymervariationen, die alle nach dem gleichen Prinzip funktionieren. Das bekannteste Polymer ist Poly N-isopropylacrylamid (PNiPAAm), das zu der Gruppe der Poly-N-substituierten Acrylamide gehört und als Homopolymer eine Phasenübergangstemperatur von 32 °C



Abbildung 2.1: A) Trübungsmessung in Abhängigkeit von der Temperatur einer $P(\text{MEO}_2\text{MA-co-OEGMA})$ -Lösung in PBS [24]. und B) Foto zweier PNiPAAm-Lösungen in Wasser bei Raumtemperatur (links) und unmittelbar nach dem Erhitzen auf $45\text{ }^\circ\text{C}$ (rechts).

besitzt. Da diese Temperatur nahe der Körpertemperatur liegt, wird PNiPAAm bevorzugt in der Biomedizin eingesetzt. Weitere Polymergruppen sind Polyisopropylloxazalin, die natürlich vorkommenden Elastin-ähnlichen Polypeptide und Polyether [25]. Einige Beispiele sind in Abb. 2.2 zusammengefasst.

P(MEO₂MA-co-OEGMA)

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges thermo-responsives Polymer verwendet. Es gehört zu der Gruppe der Polyethylenglykole und besteht aus zwei Komponenten, die den Phasenübergang maßgeblich beeinflussen. Über Atom Transfer Radical Polymerization wurden die zwei Monomere 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylat (MEO_2MA) und Oligo(ethyleneglycol) Methacrylat (OEGMA) zu einem statistischen Copolymer polymerisiert. Die molekularen Anteile der beiden Komponenten bestimmen die LCST des Copolymers: Das Homopolymer $P(\text{OEGMA})$ hat eine LCST von $90\text{ }^\circ\text{C}$ und das Homopolymer $P(\text{MEO}_2\text{MA})$ hat den Phasenübergang bei $26\text{ }^\circ\text{C}$. Durch das Verhältnis beider Monomere während der Polymerisation kann die LCST innerhalb dieser Temperaturgrenzen festgelegt werden [10]. Durch zahlreiche Untersuchungen an PEG-modifizierten Oberflächen wurden die Biokompatibilität und die protein- und zellabweisenden Eigenschaften mehrmals beschrieben [21]. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere wurden mit ATRP mittels disulfidtragenden Initiators synthetisiert. Dadurch konnte das Polymer anschließend über die Chemisorption an Gold als Polymerbürste immobilisiert werden [24].

Mechanismus des Phasenübergangs

Der Phasenübergang thermo-responsiver Polymere wird von dem Wechsel der

2. Theoretische Grundlagen

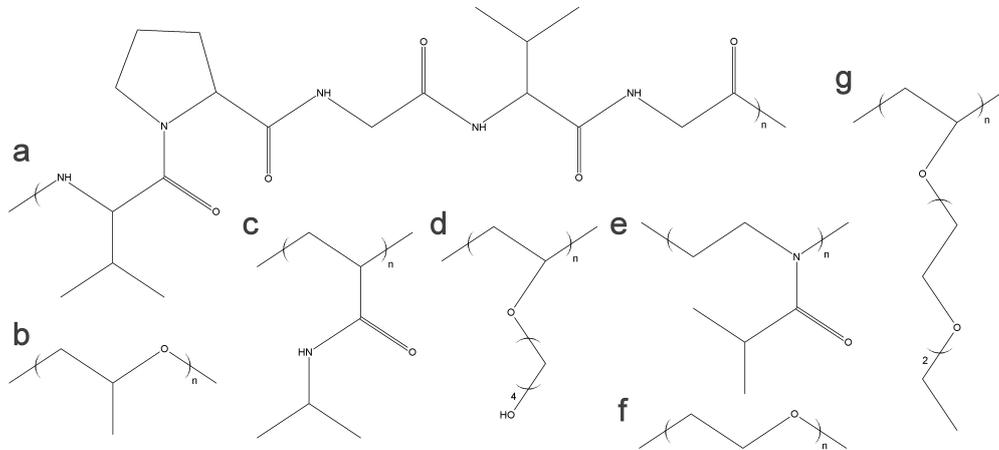


Abbildung 2.2: Strukturformeln verschiedener thermo-responsiver Polymere: a) Elastin-ähnliches Polypeptid $(VPGVG)_n$, b) Polypropylenglykol, c) Poly N-isopropylacrylamid, d) Polyhydroxybutylvinylether, e) Poly 2-isopropyl-2-oxazolin, f) Polyethylenglykol und g) Poly 2-2-ethoxyethoxyethylvinylether.

Interaktion von Seitenketten-Wasser zu Seitenketten-Seitenketten hervorgerufen und ist abhängig von der Temperatur. Unterhalb der LCST sind die funktionellen Gruppen der Seitenketten mit dem umgebenden Wasser über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft und das Polymer ist wasserlöslich. Das Wasser liegt somit im gebundenen Zustand vor und die Polymerketten können sich frei bewegen. Steigt die Temperatur über die Phasenübergangstemperatur an, kehrt sich das Verhältnis um. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten und den Wassermolekülen lösen sich auf und die gebundenen Wassermoleküle werden frei. Gleichzeitig verlieren die Polymerketten ihre Bewegungsfreiheit, weil die Anziehungskräfte zwischen den Seitenketten steigen. Das Polymer kollabiert, um die Anzahl der wechselwirkenden Seitenketten zu erhöhen [26]. Vom thermodynamischen Standpunkt lässt sich dieses Verhalten mit Hilfe der Entropie beschreiben. Einerseits sinkt zwar die Anzahl möglicher Konformationen der Polymerketten, gleichzeitig steigt aber die Anzahl möglicher Konfigurationen der nun freien Wassermoleküle. Dieser Effekt verstärkt sich weiterhin durch den verminderten Platzbedarf der kollabierten Polymere und des damit einhergehenden verringerten Ausschlussvolumens, wodurch die Konfigurationsentropie der Wassermoleküle weiter ansteigt [26].

Ein hypothetischer Phasenübergang von $P(\text{MEO}_2\text{MA-co-OEGMA})$ ist in Abb. 2.3 dargestellt. Hier ist der Sauerstoff der Ethylenglykol-Seitenketten über Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen verbunden. Das Polymer

2. Theoretische Grundlagen

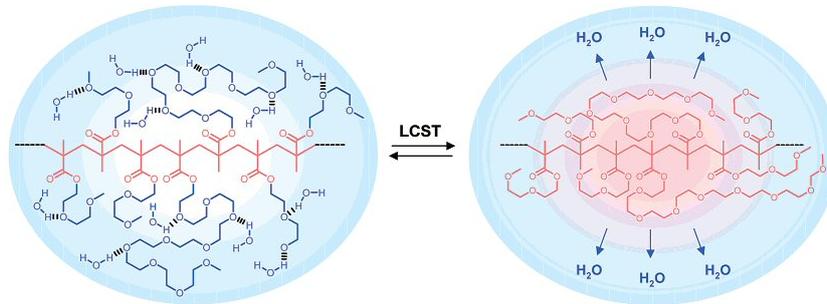


Abbildung 2.3: P(MEO₂MA-co-OEGMA): Möglicher Mechanismus des Phasenübergangs von P(MEO₂MA-co-OEGMA) in wässriger Umgebung [10].

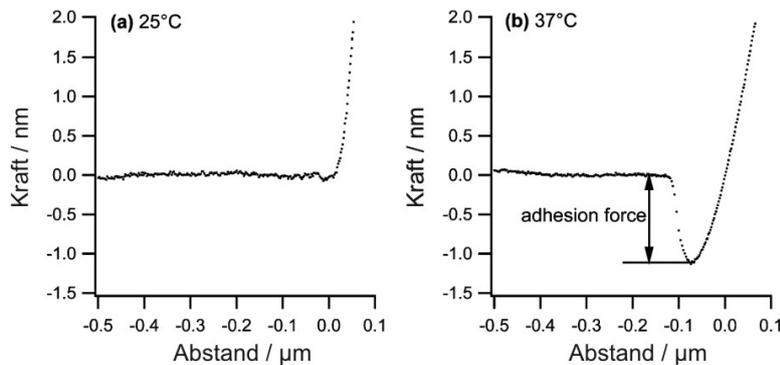


Abbildung 2.4: AFM-Kraft-Messung in Abhängigkeit vom Abstand eines Glaspartikels (20 µm - 50 µm) auf P(MEO₂MA-co-OEGMA)-modifizierten Oberflächen bei (a) 25 °C und bei (b) 37 °C [27].

ist wasserlöslich und liegt im zufälligen Knäuel-Zustand (random coil) vor. Nach Temperaturanstieg über die LCST steigen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Polymerseitenketten und dem apolaren Rückgrat des Polymers und die Wasserstoffbrückenbindungen werden gelöst. Das Polymer befindet sich nun in einer kompakten kollabierten Form.

Nach der Immobilisierung eines solchen thermo-responsiven Polymers auf einer Oberfläche treten in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedliche Adhäsionskräfte zwischen Glas und der schaltbaren Oberflächen auf. Diese können mit AFM-Messungen quantifiziert werden [27]. Bei Raumtemperatur wurde eine geringe Adhäsionskraft von $(0,3 \pm 0,2)$ nN detektiert. Wird die thermisch schaltbare Oberfläche auf 37 °C erwärmt, so erhöht sich die Adhäsionskraft auf $(1,2 \pm 0,4)$ nN (Abb. 2.4). Dies zeigt, dass die Polymere nicht nur in Lösung den Phasenübergang vollziehen, sondern auch nach der räumlichen Einschränkung durch die Fixierung an einer Oberfläche.

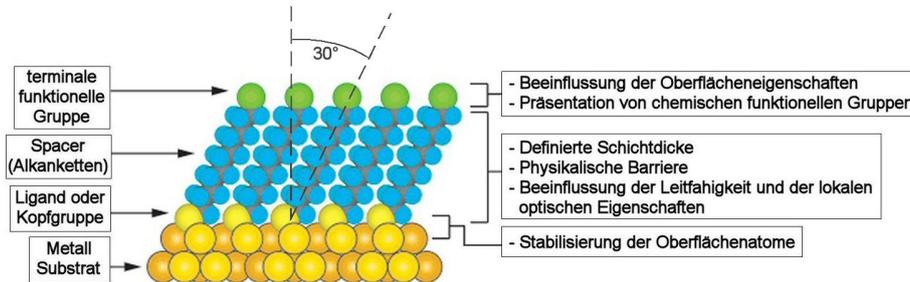


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines idealen einkristallinen SAMs aus Alkanthiolen auf einer Goldoberfläche mit einer (111)-Orientierung der Kristallstruktur (modifiziert nach [28]).

2.3 Variationen der Grenzflächeneigenschaften mittels Oberflächenfunktionalisierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Oberflächen zu funktionalisieren. Ein wichtiges Kriterium für eine systematische Untersuchung von Grenzflächeneigenschaften ist die reproduzierbare und homogene Oberflächenkopplung. Eine sehr gut untersuchte Oberflächenfunktionalisierung ist die Selbstorganisation von Molekülen an der Oberfläche (Self-Assembled Monolayer, SAM). Sind die Moleküle (wie z.B. Bürstenpolymere) sehr groß und nehmen ein großes Volumen an der Oberfläche ein, nimmt die hohe Ordnung der Moleküle an der Oberfläche ab. Beide Arten von Grenzflächen werden im Folgenden vorgestellt.

2.3.1 Self-Assembled Monolayer hoher Ordnung

Self-Assembled Monolayers (SAMs) sind durch ihre einfache Herstellung, der molekularen Ordnung und der Vielseitigkeit von großer Bedeutung. Durch den Einsatz von SAMs können die Grenzflächeneigenschaften verschiedener Materialien variiert werden. Sie ermöglichen somit die fundamentale Untersuchung von Selbstorganisation, Struktur-Eigenschaften-Beziehungen und Grenzflächenphänomenen, wie Adhäsion, Benetzung, Nukleation, Kristallwachstum, molekulare Erkennung und biologische Interaktion.

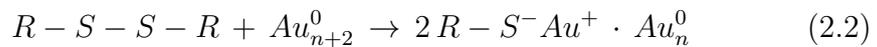
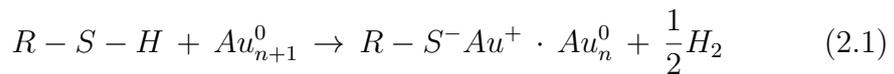
SAMs sind selbstorganisierende Oberflächenbeschichtungen (Abb. 2.5), die durch die Adsorption von Molekülen aus der Flüssig- oder Gasphase gebildet werden. Die Adsorbate arrangieren sich spontan zu einer zweidimensional geordneten Struktur. Die Moleküle besitzen z. B. eine Kopfgruppe mit einer chemischen Funktionalität, die eine hohe Affinität zu dem Substrat

besitzt. Aufgrund der Variabilität der Kopfgruppen können sich die Monofilme auf unterschiedlichen Oberflächen anordnen. So werden zum Beispiel Fettsäuren auf Aluminiumoxid oder Silber, organische Siliziumderivate, wie Alkylaminosilane unter anderem auf Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Quarz, Glas und Gold und organische Schwefelverbindungen auf Gold, Kupfer, Platin, Quecksilber, Eisen und Halbleitermaterialien immobilisiert [29]. Die hohe laterale Ordnung der SAMs wird neben den Kopfgruppen durch sogenannte Spacer erreicht. Diese bestehen aus organischen Komponenten, die durch Van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen lateral miteinander wechselwirken. Am Ende der Spacer befinden sich funktionelle Gruppen, die die Oberflächeneigenschaften maßgeblich bestimmen.

Mechanismus der Selbstorganisation

Die Adsorption von Alkanthiolen an (111)-Goldoberflächen ist die am intensivsten untersuchte und am besten verstandene Art von SAMs und wird deshalb hier als Beispiel für den Mechanismus der Selbstorganisation verwendet.

Die Adsorptionskinetik von Alkanthiolen an Gold läuft in zwei unterschiedlich schnellen Schritten ab. Zunächst erfolgt eine schnelle Adsorption von Thiol an Gold (wenige Minuten), wobei die Geschwindigkeit der Kopplungsreaktion konzentrationsabhängig ist. Die Moleküle ordnen sich vorübergehend flach auf der Goldoberfläche an (Striped Phase) und richten sich mit steigender Oberflächenbelegung auf. Es entsteht eine kovalente Bindung durch Chemisorption mit einer oxidativen Addition des Thiols (Gleichung 2.1) oder der Disulfidgruppe (Gleichung 2.2) an Gold.



Der zweite Schritt ist eine Art Oberflächenkristallisationsprozess, in dem die Alkanmoleküle in einen geordneten Zustand übergehen. Dieser Prozess dauert bis zu einigen Stunden und wird durch die Kettenorientierung, die Ketten-Ketten-Interaktionen (Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen) und die Kettenmobilität beeinflusst. Sterisch bedingt richten sich die Alkanketten in einem Winkel von 30° zu der Oberflächennormalen aus. Die Kinetik verläuft schneller, wenn die Alkanketten länger sind ($n > 9$), dies könnte in der Erhöhung der Van-der-Waals-Wechselwirkung begründet sein [30]. Obwohl sich auch Disulfide schnell zu einem dichten Monolayer anordnen, dauert der Ordnungsprozess hier wesentlich länger und kann einige Tage in Anspruch nehmen [31].

Enthält die Kette eine voluminösere Gruppe, kann nicht mehr zwischen zwei Stufen unterschieden werden. Einerseits ist die Chemisorption durch die Kettenunordnung beeinträchtigt und andererseits werden die Ketten durch verminderte Van-der-Waals-Interaktionen nicht mehr optimal stabilisiert [32].

Die Packungsdichte des SAMs wird von zwei Faktoren beeinflusst. In den meisten Fällen ist die Moleküldichte von der spezifischen Geometrie der Schwefel-Metall(Gold)-Bindung abhängig und definiert den frei verfügbaren Raum der Alkanketten. Die Anordnung der Ketten wird durch die Maximierung der gegenseitigen lateralen Anziehung und durch die Wechselwirkung der terminalen funktionellen Gruppe bestimmt. Ist die sterische Abstoßung der Gruppen groß, können sich die Schwefelatome nicht mehr optimal am Metallgitter anordnen und die molekulare Belegungsdichte sinkt [30].

Gold als Substrat

Gold gehört aus zahlreichen Gründen zu den meistuntersuchten SAM-Substraten. Gold ist ein inertes Metall, reagiert nicht mit atmosphärem Sauerstoff und bildet keine natürliche Oxidschicht. Darüber hinaus ist es zellverträglich und ermöglicht die Analyse der Oberflächen mittels bestimmter Methoden wie Oberflächenplasmonenresonanz und Quarzkristallmikrowaage. Außerdem haben Thiole eine hohe Affinität zu Gold und sind so in der Lage, konkurrierende Ablagerungen zu verdrängen.

2.3.2 Bürstenpolymere

Werden die zu immobilisierenden Moleküle komplexer, können sie in den meisten Fällen keine hohe Packungsdichte erreichen. Somit wird die Stabilisierung der Moleküle untereinander schwächer. Neben der Wechselwirkung der benachbarten Moleküle tritt hier die Wechselwirkung der Ketten eines Moleküls untereinander stärker in den Vordergrund. Durch verschiedene Seitengruppen können die Molekülketten untereinander zum Beispiel über ionische Wechselwirkung, Van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.

Bürstenpolymere sind langkettige Moleküle, die über wenige oder eine Ankergruppe an der Oberfläche adsorptiv oder kovalent immobilisiert werden [33]. Bei der adsorptiven Kopplung werden meist Blockcopolymere über einen funktionalen Block immobilisiert, der auf der Oberfläche physisorbiert [34]. Die kovalente Kopplung der Bürstenpolymere wird bevorzugt, da die resultierenden Oberflächen stabiler gegenüber Temperatur und Lösungsmitteln sind. Sie können über die Reaktion einer endständigen Ankergruppe des Polymers (grafting-to) oder durch die Kopplung eines Polymerisationsinitiators mit anschließender Oberflächenpolymerisation (grafting-from) herge-

stellt werden [35].

Die Polymere sollten ausreichend dicht auf der Oberfläche vorliegen, so dass eine definierte und gestreckte Konformation erlangt wird und eine Polymerbürste entsteht. Somit unterscheidet sich die Konformation von der zufälligen Anordnung der Polymerketten in Lösung oder in Lösung polymerisierter Schichten. Dabei hat das umgebende Lösungsmittel einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation der Bürstenpolymere.

Ein vereinfachtes Modell zur quantitativen Beschreibung und Erklärung der Konformation von Bürstenpolymeren wurde von Milner et al. gegeben. Voraussetzung ist die Annahme, dass flexible Polymerketten der Länge N und der Monomergroße a fest an eine Oberfläche mit einer Dichte σ (Ketten pro Flächeneinheit) gekoppelt und einem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Die Polymerketten unterliegen zwei gegensätzlichen Kräften. Zum einen wird eine Maximierung der Entropie angestrebt. Diese wird erreicht, in dem die Ketten mit jedem Glied einer Zufallsbewegung (engl.: random walk) folgen. Eine solche Konformation führt zu der Ausbildung von kurzen, dichten Bürsten. Zum anderen soll auch die Wechselwirkung mit dem umgebenden Lösungsmittel maximal werden. Diese Bedingung wird wiederum durch lange, weniger dicht gepackte Polymerketten erreicht. Somit stehen diese beiden Bedingungen im Widerspruch zueinander. Die räumliche Ausdehnung unregelmäßig geformter Polymerketten, die einer dreidimensionalen Zufallsbewegung folgen, wird durch den Trägheitsradius R_g (engl.: radius of gyration) bestimmt [36]:

$$R_g = a\sqrt{\frac{N}{6}} \quad (2.3)$$

Ist der Abstand $\sigma^{-1/2}$ zwischen den gebundenen Kettenteilen kleiner als der Trägheitsradius, können nicht beide Bedingungen gleichzeitig erfüllt werden. Dementsprechend stellt die resultierende Kettenlänge h eine Balance zwischen den beiden Anforderungen dar, wobei ein energetisches Minimum angestrebt wird. Aus der Minimierung des zugehörigen Potentials (Vgl.[33]) erhält man:

$$h \sim N(w\sigma a^2)^{1/3} \quad (2.4)$$

wobei über den Ausschlussvolumenparameter w die Stärke der Abstoßung zwischen den Ketten berücksichtigt wird. Das Überraschende an diesem Ergebnis ist, dass bei Bürstenpolymeren verschiedener Größe N , aber gleicher Oberflächendichte σ die Länge h der Ketten linear mit ihrer Größe N ansteigt, während ihr Trägheitsradius R_g und damit also die Länge der ungestreckten Ketten nur mit \sqrt{N} wächst. Für große Ketten N ist dementsprechend ihre Länge h viel höher als ihr Trägheitsradius R_g , was auf eine

stark gestreckte Konformation hinweist. Es ist also zu erwarten, dass die Eigenschaften einseitig an eine Oberfläche gebundener Polymere deutlich von denen frei in Lösung vorliegender, in der sie eine ungestreckte Konformation bevorzugen, abweichen.

In diesem Abschnitt wurde die Funktionalisierung von Oberflächen anhand von SAMs und der Adsorption von Bürstenpolymeren dargestellt. Die Bürstenpolymere bilden im Gegensatz zu den Selbstorganisierenden Oberflächen keinen geschlossenen Film, sondern liegen einzeln an der Oberfläche vor und haben einen bestimmten Wirkungsradius. Die thermo-responsiven Polymere sind solche Bürstenpolymere und werden über eine Disulfidgruppe an Goldoberflächen chemisorbiert. Für die Charakterisierung der modifizierten Goldoberflächen bietet sich die Oberflächenplasmonresonanz an. Diese und eine auf ähnlichen Prinzipien beruhende Methode für die Visualisierung des Oberflächen-Zellkontaktes werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

2.4 Optische Analysemethoden auf Basis von Grenzflächeneigenschaften

Totalreflektion-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) sind zwei sehr unterschiedlich eingesetzte Methoden, mit denen Grenzflächeninteraktionen in Form von Oberflächenadsorption visualisiert bzw. quantifiziert werden können. Beide Messprinzipien basieren auf der Entstehung evaneszenter Wellen im Fall der Totalreflexion eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche. Jedoch werden die dabei entstehenden elektromagnetischen Photonenfelder unterschiedlich genutzt.

2.4.1 Totalreflektion-Fluoreszenz-Mikroskopie

In der TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) wird das evaneszente Feld eingesetzt, um Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen [37, 38]. Die evaneszente Welle breitet sich parallel zur Oberfläche aus und fällt in Richtung des optisch dünneren Mediums exponentiell ab. Durch diese effektive Limitierung der Eindringtiefe des Feldes können so selektiv Informationen aus einem 150 nm bis 200 nm dicken Bereich an der Grenzfläche detektiert werden. Die Reichweite des evaneszenten Feldes hängt von dem Einfallswinkel, der Wellenlänge des Lichtes und dem Verhältnis beider Brechungsindices ab. Fluoreszenzfarbstoffe außerhalb dieses Bereichs werden nicht mehr angeregt und tragen somit nicht zum Signal bei.

Diese Methode wird für die Messung von Bindungsereignissen auf molekularer Ebene und für die Untersuchung der Zelldynamik in Verbindung mit

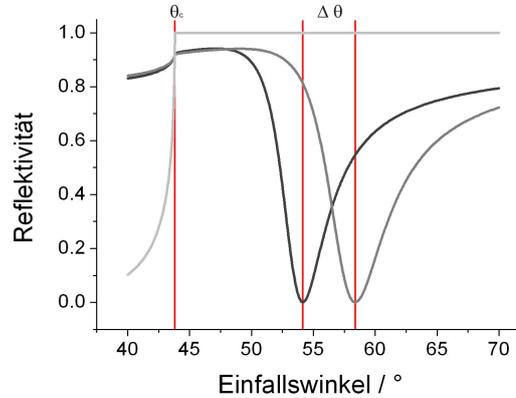


Abbildung 2.6: Reflektivität an verschiedenen Oberflächen als Funktion des Einfallswinkels θ . θ_c beschreibt den kritischen Winkel für Totalreflektion (TIR) an Glas (hellgraue Line). Wird das Glas mit 47 nm Gold beschichtet, fällt die Reflektivität bei einem bestimmten Einfallswinkel auf „null“ (schwarze Line). Ändert sich die Dielektrizitätskonstante der Oberfläche z. B. durch Adsorption einer 20 nm dicken Polymerschicht ($n = 1,5$), verschiebt sich das Minimum um $\Delta\theta$ (dunkelgraue Linie).

der Adhäsion eingesetzt. Um Zelladhäsionsmuster auf dem Zellkultursubstrat sichtbar zu machen, bietet sich die Fluoreszenzmarkierung der Membran oder die Zugabe eines polaren Fluoreszenzfarbstoffes in das Zellkulturmedium an (TIRAF, Total Internal Reflection Aqueous Fluorescence) [39, 40]. Durch eine Zugabe des Farbstoffes in das wässrige Medium wird ein aufwendiges und zellschädigendes Färbeprotokoll vermieden.

Bei der TIRAF-Mikroskopie entsteht ein Kontrastbild aus hellen und dunklen Arealen. Ein Areal ist hell, wenn das evaneszente Feld den Fluoreszenzfarbstoff uneingeschränkt anregen kann. Die dunklen Bereiche entstehen aufgrund der Verdrängung des farbstoffhaltigen Mediums durch den Zell-Oberflächen-Kontakt. Diese Adhäsionsmuster unterscheiden sich je nach Zelltyp und Oberfläche.

2.4.2 Oberflächenplasmonenresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) wird für die markierungsfreie Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt [41]. Es können an Metallgrenzflächen dünne Filme charakterisiert und Adsorptionsprozesse untersucht werden. Wird Licht an der Grenzfläche totalreflektiert, wird ein Teil der Energie des einfallenden Lichtes in eine Oszillati-

on der elektrischen Ladungsdichte absorbiert. Diese oberflächennahen Elektronengasschwingungen (Oberflächenplasmonen) können entstehen, wenn an der Grenzfläche zwei Medien mit Dielektrizitätskonstanten unterschiedlichen Vorzeichens aneinandergrenzen. Um diese Plasmonen zur Charakterisierung der Grenzfläche zu nutzen, werden üblicherweise 45 nm bis 50 nm dünne Metallfilme auf Glas abgeschieden, meist aus Gold oder Silber. Das Messprinzip beruht auf einer Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz bei Änderungen der dielektrischen Eigenschaften der Oberfläche durch das Bindungsereignis.

Für die Detektion von Bindungsereignissen wird die Reflektivität bei unterschiedlichen Einfallswinkeln gemessen. Die Intensität des reflektierten Lichtes fällt bei einem bestimmten Winkel auf ein Minimum. Hier wird der Anteil des einfallenden Lichtes, dessen Energie in Ladungsdichteoszillationen absorbiert wird, maximal. Nach Bindungsereignissen ändern sich die dielektrischen Eigenschaften der Oberfläche. Dies bewirkt eine Verschiebung des Reflektivitätsminimums zu höheren Einfallswinkeln (Abb. 2.6). Anhand der fresnelschen Formeln kann zum Beispiel die Schichtdicke, unter Voraussetzung der Kenntnis der Brechungsindices, ermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Die thermo-responsiven Polymere P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)

In dieser Arbeit wurden neuartige PEG-basierte thermo-responsive Polymere verwendet. Polyethylenglykol ist ein nicht toxisches, inertes Polymer, das in der Zellkultur als protein- und zellabweisende Beschichtung eingesetzt wird. Werden Oligoethylenoxidgruppen bestimmter Kettenlängen zu einem Polymer synthetisiert, kann die protein- und zellabweisende Eigenschaft über die Temperatur gesteuert werden. Ein Beispiel für eine Gruppe der PEG-basierten thermo-responsiven Polymere ist P(MEO₂MA-*co*-OEGMA). Diese Polymere wurden von dem Projektpartner Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung entwickelt und synthetisiert (Erik Wischerhoff, Fraunhofer IAP, Potsdam, Deutschland). P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) ist ein statistisches Copolymer aus den Monomeren 2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylat (MEO₂MA) und Oligo(ethylenglycol)methacrylat (OEGMA) und ist in Abb. 3.1 dargestellt. Um eine geringe Polydispersität zu erreichen, wurde die Copolymere über Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) synthetisiert. Bei dieser Methode entstehen die Polymere durch radikalische Kettenverlängerung, wobei die Konzentration der Radikale über die Zugabe von Übergangsmetallkomplexen kontrolliert wird und somit Kettenabbruchreaktionen unterdrückt werden. Das Verhältnis der Monomerkonzentrationen während der Polymerisation bestimmt das molekulare Verhältnis der Polymerkomposition. Die molekulare Zusammensetzung des thermo-responsiven Polymers beeinflusst die Phasenübergangstemperatur. Das Homopolymer P(MEO₂MA) hat eine LCST von 26 °C, und das Homopolymer P(OEGMA) hat eine LCST von ungefähr 90 °C. Durch Kombination zu einem Copolymer entsteht eine dazwischenliegende Phasenübergangstemperatur. Es wurden drei verschiedene P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) mit unterschiedlichen molekularen Zusammensetzungen und OEGMA-Längen synthetisiert, um das Zellverhalten auf diesen polymermodifizierten Oberflächen zu untersuchen: (1) EW17, (2) AH90 und (3) AL57.

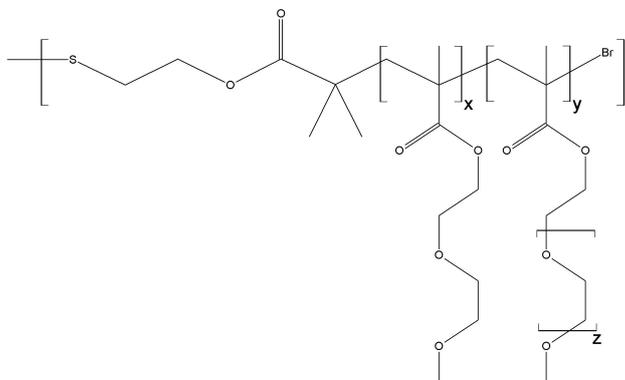


Abbildung 3.1: Allgemeine Strukturformel von P(MEO₂MA-*co*-OEGMA). Dieses thermo-responsive Polymer ist ein statistisches Copolymer und entstand durch ATRP über einen Disulfidinitiator und aus den Monomeren 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (MEO₂MA) und Oligo(ethylenglycol)methacrylat (OEGMA). Das Monomerverhältnis (x,y) und die Länge des OEGMA (z) wurden variiert (Tab. 3.1).

Die thermo-responsiven Polymere EW17 und AH90 bestehen aus den gleichen Monomeren MEO₂MA und OEGMA 475. Die PEO-Kette des OEGMA 475 hat statistisch 8,5 Einheiten. Das heißt, es handelt sich bei diesem Monomerbaustein nicht um ein aufgereinigtes Produkt, sondern um ein Monomer unterschiedlicher Kettenlänge. EW17 und AH90 unterscheiden sich in der molekularen Zusammensetzung, bedingt durch das Monomerverhältnis während der Polymersynthese. Durch die Polymerkomposition wird die Phasenübergangstemperatur bestimmt.

EW17 besteht zu 91,5% aus dem Monomer MEO₂MA und 8,5% aus OEGMA 475 und besitzt somit eine LCST von 37,5 °C in Wasser. AH90 ist mit 90% MEO₂MA und 10% OEGMA synthetisiert worden und hat eine LCST von 40,4 °C in Wasser. Das thermo-responsive Polymer AL57 besteht ebenfalls aus MEO₂MA, unterscheidet sich jedoch in der Länge des Monomers OEGMA. Hier wurde für die Synthese ein kürzerkettiges OEGMA 300 mit einer durchschnittlichen PEO-Kette von 3,5 Einheiten verwendet. Wie bei AH90 wurden 90% MEO₂MA und 10% OEGMA zu einem Copolymer zusammengeführt. Durch die kürzere PEO-Kette des OEGMA entstand eine deutlich geringere LCST von 30,3 °C (in Wasser). Werden die Polymere einer elektrolythaltigen Lösung wie dem Zellkulturmedium ausgesetzt, sinkt die LCST nochmals um 3 °C bis 4 °C.

Tabelle 3.1: Übersicht über die verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA), deren molekulare Zusammensetzung (x%,y%,z), Phasenübergangstemperatur (LCST) in Wasser und molekulare Masse (MW).

Polymer	x / %	y / %	z	LCST / °C	MW / g/mol
EW17	91,5	8,5	8,5	37,5	25000
AH90	90	10	8,5	40,4	20000
AL57	90	10	3,5	30,3	24000

3.2 RGD-Derivate

Die Peptide für die Coadsorption mit EW17 wurden von dem Projektpartner des MPI für Kolloid- und Grenzflächen über eine Festphasensynthese hergestellt (Hans Börner, MPIKG, Potsdam, Deutschland). RGD ist eine bekannte Sequenz aus den drei Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D), die mit der Zelladhäsion über die spezifische Bindung des Transmembranrezeptors Integrin assoziiert ist. Diese Peptidsequenz wurde in zelladhäsionsfördernden Proteinen wie Fibronectin, Vitronectin und Laminin entdeckt und kommt in der Extrazellulären Matrix (ECM) vor.

Es standen vier verschiedene Peptide zur Verfügung: Die ersten beiden Varianten bestanden ausschließlich aus Peptiden, die sich in der Anordnung der einzelnen Aminosäuren unterschieden. Das Peptid CGGRGDS (Cystein-Glycin-Glycin- Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin) wurde über die Thiol-seitengruppe des Cysteins an Gold chemisorbiert. Das zweite Peptid stellt durch den Austausch zweier Aminosäuren eine Abwandlung des ersten Peptids (CGGRDGS) dar. Dieses Motiv sollte als Kontrolle für die spezifische Integrin-RGD-Bindung eingesetzt werden. Um die Spacerlänge zu erhöhen, wurden weitere RGD-Motive mit Polymerkomponenten verbunden. Das dritte Peptid wurde mit drei in die Festphasensynthese eingebundenen Polyethylenoxidketten gekoppelt. So entstand ein C(PEO)₃GRGDS. Das vierte Peptid wurde an ein Homopolymer P(OEGMA)₁₃ gekoppelt (Erik Wischerhoff, Fraunhofer IAP, Potsdam, Deutschland). Dieses RGD-Derivat wurde über eine Disulfidgruppe in der Mitte des Polymers chemisorbiert.

3.3 Oberflächenpräparation

3.3.1 Oberflächenreinigung

Die Reinigung von Oberflächen ist eine Grundvoraussetzung für die Reproduzierbarkeit chemischer und physikalischer Modifikationen. Die in dieser

Tabelle 3.2: Hellmanex-Reinigungsprotokoll

1	10 x Spülen mit Wasser
2	15 min Ultraschall mit Wasser
3	10 x Spülen mit Wasser
4	15 min Ultraschall mit Hellmanex
5	20 x Spülen mit Wasser
6	15 min Ultraschall mit Wasser
7	20 x Spülen mit Wasser
8	15 min Ultraschall mit Hellmanex
9	20 x Spülen mit Wasser
10	15 min Ultraschall mit Wasser
11	20 x Spülen mit Wasser
12	15 min Ultraschall mit Wasser
13	20 x Spülen mit Wasser
14	10 min Ultraschall mit Ethanol
15	bis zum Einsatz Lagerung in Ethanol

Arbeit verwendeten Deckgläser (20 mm x 20 mm, Stärke #3, Menzel, Braunschweig, Deutschland) und Beschichtungsgefäße wurden nach einem Hellmanex-Protokoll gereinigt (Tab. 3.2). Das Protokoll besteht aus abwechselnder Ultraschallbehandlung (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) und Spülschritten mit verschiedenen Reagenzien: 2% Hellmanex-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland), Reinstwasser (Arium 611 VF, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und 99,9%igem Ethanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland).

3.3.2 Evaporation von Gold

Die Oberflächenmodifikationen mit P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) und den Peptidsequenzen wurde über die Chemisorption von Thiol- und Disulfidgruppen, die in den Molekülen vorhanden waren, an Gold durchgeführt. Deswegen war eine Goldabscheidung auf den Glassubstraten notwendig. Die zu beschichtenden Deckgläser wurden zuvor nach dem Hellmanex-Reinigungsprotokoll aus dem vorigen Kapitel gereinigt und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Danach wurden die Deckgläser in die Bedampfungsanlage (Auto 500 Vakuum Coating System, Edwards, England, Crawley) überführt. Bei einem Druck von 10⁻⁵ mbar wurde 3 nm Chrom mit einer Bedampfungsrate von 0,1 nm / s mittels Elektronenstrahlverdampfung abgeschieden. Das Chrom (Chromium Granules, 99,98%, ChemPur, Deutschland, Karlsruhe) stellt den Haftvermittler zwischen Glas und Gold dar. Anschließend wurden 47 nm Gold (Gold

Granules (99,99%), ChemPur, Deutschland, Karlsruhe) mit einer Rate von 0,2 - 0,25 nm / s aufgedampft. Die Verwendung der goldbeschichteten Deckgläser erfolgte stets unmittelbar nach der Evaporation.

3.3.3 Chemisorption

Die thermo-responsiven Polymere besitzen eine mittelständige Disulfidgruppe, welche unter Spaltung der Schwefelbindung kovalent an Gold koppelt. So entstanden aus einem Polymer zwei immobilisierte Polymerketten mit der Hälfte der molaren Masse des Gesamtmoleküls. Für die Chemisorption wurden die Polymere in verschiedenen Konzentrationen in reinem Ethanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Dann wurden die frisch bedampften Golddeckgläser jeweils 2 ml Polymerlösung ausgesetzt und für drei Stunden inkubiert. Um die Konzentration der Polymerlösungen über die Beschichtungszeit konstant zu halten, wurden die Beschichtungsgefäße (Glaspetrischalen, 40 mm x 12 mm, Schottglas, Mainz, Deutschland) in einem geschlossenen Metallbehälter mit ethanolischer Atmosphäre platziert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal mit Ethanol gespült und nochmals eine Stunde in Ethanol inkubiert. Nach nochmaligem Lösungsmittelwechsel wurden die modifizierten Deckgläser mit Stickstoff getrocknet und für Kontaktwinkelmessungen, weitere Beschichtungen oder Zellexperimente verwendet.

3.3.4 Coadsorption

Für die Coadsorption von RGD-Peptiden (CGGRGDS, CGGRDGS) oder RGD-Polymeren (CG-(PEO)₃GRGDS, P(OEGMA)-RGDS) und EW17 wurde aufgrund der Löslichkeit Reinstwasser als Lösungsmittel verwendet. EW17 und RGD-Derivate wurden in einer Konzentration von 25 μ M und 50 μ M in Wasser gelöst und anschließend in den entsprechenden Verhältnissen über die Variation der Volumina zusammengeführt. Da sich die Disulfidgruppe in der Mitte des EW17 befindet, wurde die Konzentration für die Coadsorption halbiert. Bei der Coadsorption von P(OEGMA)-RGDS und EW17 war dies nicht notwendig, da beide Polymere aus zweiarmigen Polymerketten bestehen, die über eine Disulfidgruppe miteinander verbunden sind. Deswegen wurden für dieses Experiment beide Polymere mit der gleichen Konzentration angesetzt. Das Spektrum der Konzentrationsverhältnisse reichte von: 1 zu 0 / 9 zu 1 / 6 zu 1 / 3 zu 1 / 1 zu 1 / 1 zu 9 / 0 zu 1. Wie auch bei der Chemisorption reiner Polymerlösungen wurden die frisch bedampften Golddeckgläser für drei Stunden den entsprechenden Lösungen ausgesetzt, gespült und getrocknet. Anschließend wurden die modifizierten Golddeckgläser für die

Zellexperimente verwendet.

3.3.5 Fibronektinbeschichtung

Humanes Fibronektin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde als Zelladhäsionsprotein auf den EW17-modifizierten Goldoberflächen adsorbiert. Die Fibronektinlösungen, Spüllösungen und die zu beschichtenden Oberflächen mussten zuvor 15 min bei 37 °C inkubiert werden. Die thermo-responsiven Oberflächen wurden dann mit drei Lösungen unterschiedlicher Fibronektinkonzentration (10 µg / ml, 1 µg / ml und 0,1 µg / ml) für eine Stunde bei 37 °C beschichtet. Unter den gleichen Bedingungen wurde zusätzlich eine Kontrolle (Glas-Deckglas) mit 10 µg / ml Fibronektin beschichtet. Anschließend wurden die Oberflächen im Inkubator zweimal mit Reinstwasser gespült und mit einer vorgewärmten Zellsuspension inkubiert. Für die Dokumentation der Zellausbreitungsgeschwindigkeit wurden nach 30 Minuten, 2 Stunden, 24 Stunden und nach 48 Stunden nach der Besiedlung Aufnahmen angefertigt.

3.4 Oberflächenanalytik

3.4.1 Kontaktwinkelmessung

Um die Hydrophilie der modifizierten und unmodifizierten Goldoberflächen zu bestimmen, wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt (G10, Krüss Surface Science, Deutschland). Mit einer Mikroskopheizplatte (MS 100, Linkam Scientific Instruments, Großbritannien) wurden die Proben auf 25 °C, 30 °C, 37 °C und 45 °C geheizt und die Kontaktwinkel mit Reinstwasser gemessen.

3.4.2 Oberflächenplasmonresonanz

Da der Kontrast der Brechungsindices von Ethanol und dem Menzel-Glas ($\Delta n = 0,1533$) zu gering ist, um eine Adsorption von Molekülen mit Oberflächenplasmonresonanz detektieren zu können, mussten die Messungen auf SF10-Gläsern (Präzisions Glas und Optik GmbH, Iserlohn, Deutschland) mit einem höheren Brechungsindex von 1,7227 ($\Delta n = 0,3613$) durchgeführt werden. Die Gläser wurden entsprechend dem Reinigungsprotokoll und dem Protokoll der Evaporation von Gold behandelt und gleich nach der Bedampfung für die Oberflächenanalyse verwendet. Für die Oberflächenplasmonresonanz wurde ein Multiskop (Optrel, Sinzing, Deutschland) verwendet. Das Gerät

beinhaltet im Lieferumfang eine Durchflusskammer, die während der Messung den Austausch von Lösungen erlaubt. Es handelt sich um eine Kammer, die durch das goldbeschichtete SF10-Glas geschlossen wurde. Auf dem Glas wurde ein 60° SF10-Glasprisma mittels Immersionsöl (Brechungsindex: 1,725, Cargille, Cedar Grove, U.S.A.) positioniert und der Laserstrahl justiert. Zunächst wurde ein Scan unter Variation des Einfallswinkels durchgeführt, um die Resonanzkurve im unbeschichteten Zustand in Ethanol (Brechungsindex: 1,3614) zu ermitteln. Basierend auf dieser Messung konnten die optischen Eigenschaften und die Schichtdicke des Goldes mit der geräteeigenen Auswertungssoftware (Surface Plasmons Spectroscopy: Data Evaluation and Simulation) errechnet werden. Weiterhin wurde der Einfallswinkel des Wendepunkts vor dem Minimum der Resonanzkurve bestimmt (Abb. 4.1). Bei diesem Einfallswinkel wurde die Intensitätsänderung im Verlauf der Zeit aufgenommen. Durch Moleküladsorption an der Oberfläche verschiebt sich die Resonanzkurve. Folglich ändert sich auch die Laserintensität bei dem eingestellten Einfallswinkel und die Oberflächenbelegung kann somit zeitabhängig dokumentiert werden. 30 Minuten nach dem Start der kinetischen Messung wurden 5 ml ethanolischer 50 μ M EW17-Lösung in die Messkammer eingespült. Nachdem die Intensität des reflektierten Strahls 30 Minuten konstant blieb, wurde mit Ethanol gespült, um die überschüssigen Moleküle zu entfernen. Nach dem Spülen wurde erneut eine Resonanzkurve aufgenommen. Mit der Auswertungssoftware des Multiskops konnten nun die Schichtparameter, unter der Voraussetzung eines Brechungsindex von 1,5 und basierend auf den fresnelschen Formeln, ermittelt werden.

3.5 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Maus-Fibroblasten (L929, ACC 2, DSMZ, Deutschland), Knochenkrebszellen (U2OS, U2OS-TagFP635-Actin, Marinpharm, Deutschland) und Epithelzellen (MCF-7, HTB-22, ATCC, USA) und CHO-K1, ACC 110, DSMZ, Deutschland) kultiviert. Die Zusammensetzungen der Zellkulturmedien und die Inkubation mit Trypsin unterschieden sich teilweise. Die Zelllinien L929 und CHO-K1 wurden mit dem gleichen Medium kultiviert. Es setzte sich aus DMEM/Hepes ohne Pyruvat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin / Streptomycin (alle Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zusammen. Für die Zelllinie U2OS wurde neben den eben genannten Bestandteilen lediglich 1 mM L-Glutamin verwendet. Für die MCF-7-Zellen wurde DMEM mit Pyruvat (Gibco / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS, 10 mM Hepes (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und

1% Penicillin / Streptomycin verwendet. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und alle drei bis vier Tage umgesetzt. Vor dem enzymatischen Ablösen der Zellen von den Zellkulturoberflächen wurden sie zwei Mal mit PBS ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurde für die enzymatische Ablösung der L929-Zelllinie eine Trypsinkonzentration (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) von 0,05% und für die restlichen Zelllinien eine Konzentration von 0,25% verwendet. Für die Probenbesiedlung wurden die modifizierten Goldoberflächen in eine Zellkulturpetrischale gelegt und 10⁴ Zellen / cm² darauf ausgesät.

3.6 Transfektion

Um den Cytoskelettbestandteil Aktin sichtbar machen zu können, wurde die MCF-7-Epithelzelllinie transient transfiziert. Die Zellen wurden genetisch verändert, indem ein fusionsproteincodierendes Plasmid mit 5,8 kb (pEGFP-Actin, BD Biosciences Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) in die Zellen eingeschleust wurde. Transfizierte Zellen transkribieren neben dem zelleigenen Erbgut das im Cytoplasma vorliegende Plasmid. Es codiert ein Fusionsprotein bestehend aus humanem β -Aktin und einer Variante des Green Fluorescent Proteins (Enhanced GFP). Für die Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 70% bis 80% in einer Zellkulturflasche mit einer Fläche von 25 cm² kultiviert. Dann wurde eine Lösung aus 16 μ g Plasmid-DNA, 32 μ l FuGene HD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 172 μ l Grundmedium in die Zellkulturflasche pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, und zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf den thermoresponsiven Oberflächen ausgesät.

3.7 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde die Epithelzelllinie MCF-7 verwendet. Die Zellen wurden auf insgesamt acht thermo-responsiven Oberflächen mit einer Zellkulturfläche von 32 cm² kultiviert. Nach vier Tagen waren die MCF-7-Zellen auf den thermo-responsiven Oberflächen konfluent. Die besiedelten modifizierten Deckgläser wurden sofort nach der Entnahme aus dem Inkubator in neue Petrischalen mit frischem Medium überführt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen durch leichtes Spülen von den Oberflächen abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. In der Zwischenzeit wurden Zellen einer Zellkulturflasche mit einer Fläche von 25 cm² fünf Minuten bei 37 °C trypsinisiert und in frisches Medium aufgenommen. Die Zellen beider Pro-

ben wurden jeweils mit einer Spritze durch Scherung vereinzelt. Danach wurden beide Zentrifugenröhrchen fünf Minuten bei 950 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit PBS gewaschen und wieder zentrifugiert. Dann erfolgte die Fixierung, indem beide Pellets 15 Minuten bei Raumtemperatur in 2 ml 4% Paraformaldehyd (Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland) inkubiert wurden. Anschließend wurden 3 ml PBS hinzugefügt und beide Röhrchen ebenfalls fünf Minuten bei 950 rpm zentrifugiert, wieder der Überstand abgenommen, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Beide Pellets wurden zum Blocken in je 2 ml 1% BSA-Lösung (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Die Suspension wurde in je zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Die jeweils zweite Probe wurde für die Isotypkontrolle verwendet. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden die vier Eppendorf-Reaktionsgefäße fünf Minuten lang bei 400 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Als nächstes erfolgte die Antikörperfärbung. Die Isotypkontrolle der trypsinisierten Zellen und der Zellen von den thermo-responsiven Oberflächen wurden ab diesem Zeitpunkt gleich behandelt. Als Kontrollantikörper wurde ein Rabbit IgG (Abcam, Cambridge, U.S.A.) verwendet. In je eine Isotypkontrolle wurde eine Antikörperlösung mit 1 µg Rabbit IgG, 50 µl PBS und 50 µl 1% BSA pipettiert, resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde jeweils eine Antikörperlösung mit 1 µg Rabbit Anti-Maus Integrin Alpha 5 Subunit (Boehringer Ingelheim Bioproducts Patnerchip, Heidelberg, Deutschland), 50 µl PBS und 50 µl 1% BSA auf die beiden anderen Proben pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml PBS zu allen Proben hinzugefügt, fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert, danach der Überstand abgenommen, 1 ml PBS hinzugefügt und nochmals zentrifugiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy2 Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden in je 100 µl einer Antikörperlösung mit 1 µg Cy2 Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper, 50 µl PSB und 50 µl 1% BSA für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml PBS zu allen Proben hinzu pipettiert, fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden für die Messung im Flowcytometer Cytomics FC 500 (Beckmann Coulter, Brea, U.S.A.) in 500 µl IsotonII (Beckmann Coulter, Brea, U.S.A.) aufgenommen und gleich vermessen.

3.8 Phasenkontrastmikroskopie und Analyse

Die Ausbreitungszeit und die Abrundungseffizienz von L929-Maus-Fibroblasten auf thermo-responsiven Oberflächen wurden mit einem Lichtmikro-

skop Leica DMIL (Leica, Wetzlar, Deutschland) über ein 10x/0,25 Phasenkontrastobjektiv beobachtet und mit einer angeschlossenen CCD-Kamera (Nikon Digital Sight DS-L1, Nikon, Melville, U.S.A.) dokumentiert. Als Zellausbreitungszeit einer Oberfläche wurde die Zeit definiert, die bis zur Bildung von Lamellipodien bei über 50% aller Zellen benötigt wird. Wurde dieser Zustand erreicht, erfolgte die Bestimmung der Abrundungseffizienz. Die zu untersuchende Oberfläche wurde unmittelbar nach der Entnahme aus dem Inkubator für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Mikroskop platziert. In dieser Zeit wurden alle zwei Minuten insgesamt 16 Bilder aufgenommen. Die Abrundungseffizienz wurde aus dem Quotienten der Differenz der *ausgebreiteten Zellen des ersten* (Z_{t0}) und des *letzten Bildes* (Z_{t30}) und *der ausgebreiteten Zellen des ersten Bildes* ($t = 0$ Minuten, 37°C) bestimmt:

$$\text{Zellabrundungseffizienz} = \frac{Z_{t0} - Z_{t30}}{Z_{t0}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

Die maximale Abrundungseffizienz beträgt demnach 100%. Das bedeutet, dass sich alle Zellen auf der Oberfläche innerhalb der dokumentierten 30 Minuten abgerundet haben. Die Auswertung der Zellabrundung im Verlauf der 30 Minuten wurde über die gleiche Methode bestimmt. Z_{t30} wurde in diesem Fall durch die ausgebreiteten Zellen aller zwei Minuten ersetzt.

3.9 TIRF-Mikroskopie und Analyse

Die TIRF- und TIRAF-Experimente wurden aufgrund des geringen Arbeitsabstandes des hochaperturigen Objektivs mit Deckgläsern der Stärke 1 (20 mm x 20 mm, Stärke #1, Menzel, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Diese wurden nach dem Hellmanex-Protokoll gereinigt, mit 2 nm Chrom und 20 nm Gold bedampft und mit 5 μM EW17 für drei Stunden chemisorbiert. Nach dem Spülen und Trocknen der Proben wurden selbsthaftende Polysiloxanringe (flexiPERM, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit einer 1 cm^2 großen Zellkulturoberfläche auf den Oberflächen positioniert. Anschließend wurden 5×10^4 Zellen in den Polysiloxanringen ausgesät und über mehrere Tage kultiviert. Waren die Zellen auf den thermo-responsiven Oberflächen ausgebreitet, wurde ein polarer Farbstoff Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor 568 hydrazide sodium salt, Invitrogen, USA) mit einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in das Zellmedium pipettiert. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen in einer vorgewärmten Metallkiste zum TIRF-Mikroskop transportiert. Der Versuchsaufbau für TIRF- und TIRAF-Mikroskopie bestand aus einem invertierten Mikroskop (IX71), welches mit einem 60 / 1,4-Ölimmersionsobjektiv

und einer gekühlten CCD-Kamera (F-View) ausgerüstet war. Die Datenerfassung erfolgte über die dazugehörige Software CellF (alles Olympus, Hamburg, Deutschland). Für die Fluoreszenzanregung von Alexa Fluor 568 und EGFP wurde ein Argon / Krypton-Laser (Omnichrome, Melles Griot Laser Group, Carlsbad, USA) an das Mikroskop angeschlossen. Die Proben wurden aus der Metallkiste entnommen und sofort unter dem Mikroskop positioniert. Unter Totalreflexion des Laserstrahls wurde für 30 Minuten in einem Zeitintervall von 1 Bild / min die Zelladhäsionsfläche und gegebenenfalls das oberflächennahe Aktin dokumentiert. Anschließend wurden die beobachteten Zellen unter Benutzung einer 1 ml Eppendorfpipette von der Oberfläche gespült.

Zeitlicher Temperaturverlauf

Da die Proben erst zum Messplatz transportiert werden mussten, war eine Messung der Ausgangstemperatur beim Beginn der TIRAF-Messung obligatorisch. Deswegen wurde die Temperaturabnahme während der Totzeit, die sich zwischen Probenentnahme aus dem Brutschrank bis zum Beginn der Messung erstreckt, mit einem Temperatursensor Pt100 unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt. Dieser Sensor ändert den Widerstand in Abhängigkeit von der Temperatur und wurde zuvor mit drei unterschiedlichen Temperaturen geeicht. Der Temperatursensor wurde innerhalb des Polysiloxanringes auf einem Deckgläschen fixiert und dem gleichen Volumen an Zellkulturmedium ausgesetzt. Der Temperaturverlauf ist in Abb. 3.2 dargestellt. In der Metallkiste blieb die Temperatur nahezu konstant und sank lediglich um 1 °C in der Transportzeit von zwei Minuten. Nach der Entnahme aus der Metallkiste sank die Temperatur der Probe rapide und erreichte bei Start der Messung einen Wert von 31 °C. Nach weiteren sechs Minuten erreicht die Probe Raumtemperatur.

Statistische Auswertung

Die aus den TIRAF-Aufnahmen gewonnenen Bilddaten bestehen aus Kontrastwerten mit 256 Graustufen. Die Areale maximaler Helligkeit im TIRAF-Bild zeigen das Fluoreszenzsignal des von keiner Zelle verdrängten Farbstoffes. In diesen Bereichen trat keine Wechselwirkung zwischen den Zellen und der Oberfläche auf. Sie werden im Folgenden als Hintergrund bezeichnet. Die dunklen bis schwarzen Bereiche zeigen die Adhäsionsfläche der Zellen auf den Oberflächen. Diese bildeten zum Hintergrund einen deutlichen Kontrast (Abb. 3.3 A). Die Bildverarbeitung und die Bildauswertung wurden mit der Grafiksoftware Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) durchgeführt. Als erstes wurde der Hintergrund auf eine durchschnittliche Helligkeit von 200 normiert. Dann wurde für jede Zelle manuell ein Schwellenwert für die

3. Material und Methoden

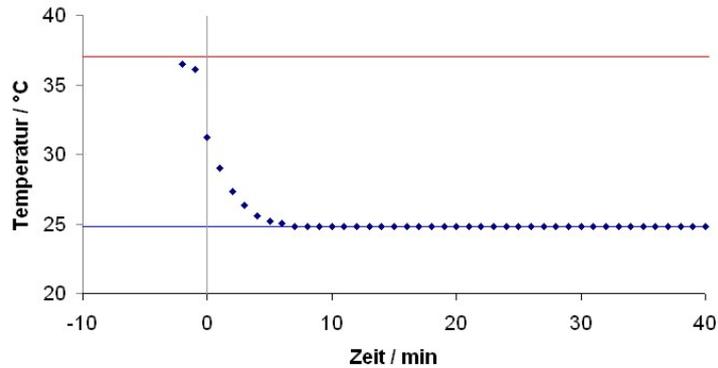


Abbildung 3.2: Temperaturverlauf während der Zeit des Proben­transports, der Positionierung und des Versuchs. Die rote Linie zeigt die Temperatur im Inkubator. Die blaue Linie stellt die Raumtemperatur dar. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Probe aus der Metallkiste entnommen und unter das Mikroskop gelegt.

Abgrenzung der Zellkontaktfläche zu der Umgebung ermittelt, indem der Grauwert des Schwellenwertes solange gesenkt wurde, bis der Hintergrund von der automatischen Pixelerfassung nicht mehr erkannt wurde. Die Anzahl und die mittlere Helligkeit der entsprechenden Pixel wurde für jedes Bild über ein Makro dokumentiert (Abb. 3.3B). Da ein Pixel eine Fläche von $0,05 \mu\text{m}^2$ einnahm, konnte die Summe der Pixel einer Zelladhäsionsfläche in den Flächeninhalt der jeweiligen Zelladhäsionsfläche umgerechnet werden.

Die Zelladhäsionsflächen wurden normiert, indem die maximale Adhäsionsfläche zu 100% gesetzt wurde. Die Zusammenfassung der prozentualen Abnahme der Zelladhäsionsflächen von L929-Maus-Fibroblasten und MCF-7-

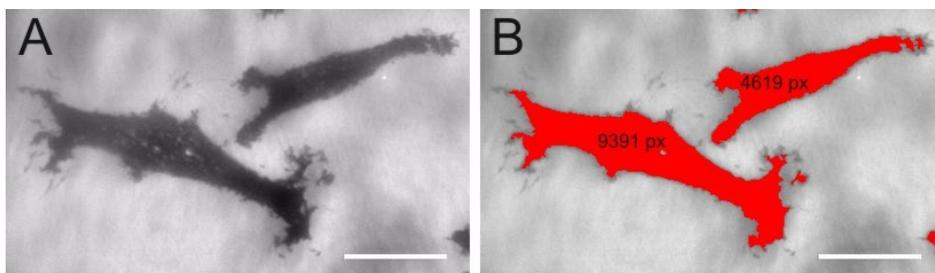


Abbildung 3.3: TIRAF-Aufnahme von L929-Maus-Fibroblasten auf EW17-modifizierter Goldoberfläche bei 37°C (A). Die entsprechende Detektion der einzelnen Zelladhäsionsflächen erfolgte über die Quantifizierung der dunklen Pixel mit einer Grafiksoftware (B). Maßbalken = $20 \mu\text{m}$.

Brustkrebszellen über die Zeit erfolgte zum einen durch die Mittelwertbildung jeder fünften Minute und zum anderen über folgende Fitfunktion:

$$A = (100 - p) \cdot 100e^{-kt} + p \quad (3.2)$$

mit p dem erreichten Plateau bei $t \rightarrow \infty$ und k der Zeitkonstanten, aus der die Halbwertszeit T als

$$T = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.3)$$

resultiert.

Für das Fitten wurde Origin 7 (OriginLab Coporation, USA) verwendet. Anhand der Abweichung der einzelnen Messkurven wurden die Daten gewichtet zusammengefasst. Für die CHO-K1-Zelllinie konnte die Fitfunktion nicht verwendet werden. Deswegen wurden diese Daten gesondert behandelt und mit einer linearen Funktion gefittet. Die mittlere Pixelhelligkeit des Zellkontaktsignals wurde zusätzlich erfasst. Auch diese Daten wurden mit einer linearen Funktion gefittet und gewichtet zusammengefasst. Zusätzlich wurden die Mittelwerte jeder fünfte Minute errechnet.

TIRAF-Mikroskopie der Zelladhäsionsfläche während des Trypsinierens

Für die Dokumentation der Zelladhäsionsfläche während der Trypsineinwirkung wurde der polare Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 568 in einer Finalkonzentration von 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ dem Zellmedium von L929-Maus-Fibroblasten zugesetzt. Anschließend wurden die initialen Zelladhäsionsflächen aufgenommen, die Zellen zweimal mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit einer 0,05% Trypsinlösung inklusive Alexa Fluor 568 versetzt. Die Zellen wurden in einem 60 Sekunden-Intervall fünf Minuten lang dem evaneszenten Feld ausgesetzt, um die Zelladhäsionsfläche im Verlauf der Zeit zu detektieren. Für die Beobachtung der Zellkontaktfläche einer einzigen Zelle wurde eine Blende eingesetzt (Abb. 4.19). So konnte sichergestellt werden, dass die umliegenden Zellen nicht dem Lichtstress exponiert wurden. Weiterführend wurden Untersuchungen zum Lichtstress durchgeführt, indem die Zellen mit und ohne Farbstoff einer Epifluoreszenz ausgesetzt und die initialen Zelladhäsionsflächen in Zellkulturmedium vor dem Trypsinieren und die zurückbleibende Zelladhäsionsfläche nach fünf Minuten unter Trypsineinfluss aufgenommen wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen

Untersuchungen der Funktionalität von Oberflächen erfordert genaue Kenntnis der Grenzflächeneigenschaften. In dieser Arbeit wurden Oberflächenanalysemethoden wie Kontaktwinkelmessungen und Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt. Die Kontaktwinkel geben Aufschluss über die Hydrophilie und die Homogenität der Oberflächen. Die Oberflächenplasmonresonanz hingegen ermöglicht die Bestimmung der Schichtdicke, die wiederum eine Abschätzung der molekularen Belegung erlaubt. Anhand einer Modellzelllinie (L929-Maus-Fibroblasten) wurde darüber hinaus eine Methode entwickelt, die eine qualitative Einschätzung der Funktionalität der Oberflächen liefert.

4.1.1 Kontaktwinkel

Die Hydrophilie und Homogenität von Grenzflächen sind für die Zelladhäsion von großer Bedeutung und geben Hinweise auf das Zelladhäsionsverhalten. Für diese Arbeit wurden drei unterschiedliche thermo-responsive Polymere synthetisiert, die über eine mittelständige Disulfidgruppe an goldbeschichteten Deckgläschen chemisorbiert wurden. Die drei Polymere EW17, AH90 und AL57 unterscheiden sich in Folge ihrer molekularen Zusammensetzung und zum Teil durch die Variation der Monomereinheiten hinsichtlich ihrer LCST. EW17 besteht zu 91,5% aus dem Monomer MEO₂MA und 8,5% aus OEGMA 475 und besitzt somit eine LCST bei 37,5 °C in Wasser. AH90 ist mit 90% MEO₂MA und 10% OEGMA 475 synthetisiert worden und hat eine LCST von 40,4 °C in Wasser. Das thermo-responsive Polymer AL57 besteht ebenfalls aus MEO₂MA, unterscheidet sich jedoch in der Länge des Monomers OEGMA. Hier wurde für die Synthese ein kürzerkettiges OEGMA 300 mit einer durchschnittlichen PEO-Kette von 3,5 Einheiten verwendet. Wie bei AH90 wurden 90% MEO₂MA und 10% OEGMA zu einem Copolymer zusammengeführt. Durch die kürzere PEO-Kette des OEGMA entstand eine

Tabelle 4.1: Kontaktwinkelmessung auf verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen und einer reinen Goldoberfläche bei 25 °C und 45 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte.

	25 °C	45 °C
Gold	70°±1°	68°±2°
EW17	54,3°±0,5°	55,0°±0,5°
AH90	55°±1°	55,5°±0,6°
AL57	56,0°±0,8°	57,0°±0,8°

deutlich geringere LCST von 30,3 °C (in Wasser).

Die Kontaktwinkel auf reiner Goldoberfläche werden den Kontaktwinkeln der P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Oberflächen in Tab. 4.1 gegenübergestellt. Bei 25 °C betrug der Kontaktwinkel auf Gold 70°. Die verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-beschichteten Oberflächen wiesen jeweils einen Kontaktwinkel von rund 55° auf. Werden die Oberflächen auf eine Temperatur über der LCST der drei Polymere erwärmt, ändern sich die Kontaktwinkel nicht wesentlich. Die Streuung der Kontaktwinkel auf einer Oberfläche liegt innerhalb der Messungenauigkeit. Dies lässt auf eine hohe laterale Homogenität schließen.

4.1.2 Oberflächenplasmonresonanz

Die Adsorptionskinetik und die Schichtdicke des PEG-basierten thermo-responsiven Polymers EW17 wurden mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. Um die Adsorptionskinetik während des Beschichtens und die abgeschiedene Schichtdicke zu bestimmen, wurde die Intensität des an der Goldgrenzfläche reflektierten Laserstrahls bei verschiedenen Einfallswinkeln in ethanolischer Umgebung aufgenommen (Abb. 4.1 A). Wird das einfallende Licht unter dem Resonanzwinkel an der Grenzfläche totalreflektiert, werden Oberflächenplasmonen angeregt. Dabei wird Energie absorbiert, was als Abfall der Intensität des reflektierten Strahls gemessen wird. Weiterhin wurde die Intensität des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit von der Zeit bei einem konstanten Einfallswinkel von 55,5° gemessen. War das Signal 30 Minuten stabil, wurde eine 50 µM ethanolische EW17 Lösung in die Messkammer eingespült. Nachdem die Intensität nicht mehr weiter anstieg, wurde die Messkammer mit Ethanol gewaschen und der neue Resonanzwinkel gemessen.

In Abb. 4.1 A sind die verschiedenen Resonanzkurven vor und nach der

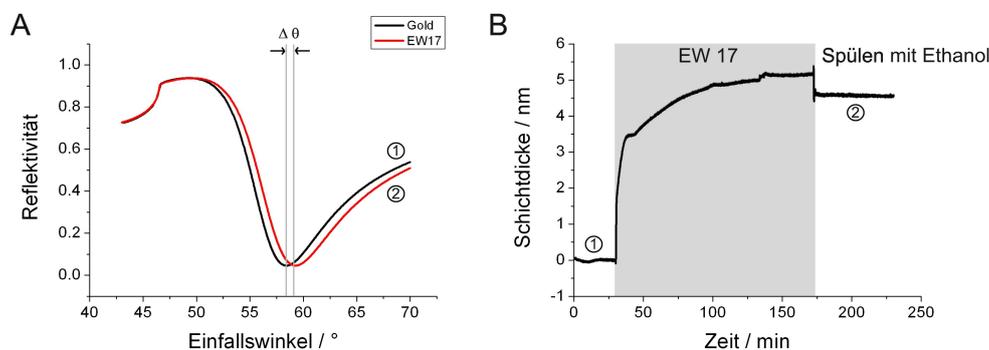


Abbildung 4.1: A) Messung der Oberflächenplasmonenresonanz auf (schwarz) Gold und (rot) EW17-modifizierter Goldoberfläche. Aus der Winkelverschiebung $\Delta\theta$ (hier: $0,8^\circ$) des Resonanzwinkels kann die Schichtdicke des EW17 bestimmt werden (4,5 nm). B) Kinetische Messung der Immobilisierung von EW17 auf einer Goldoberfläche mittels Oberflächenplasmonenresonanz bei einem konstanten Einfallswinkel von $55,5^\circ$.

Chemisorption des EW17 dargestellt. Die Position der Resonanzkurve verschob sich von einem Einfallswinkel von $58,4^\circ$ auf $59,2^\circ$ nach der Immobilisierung. Anhand dieser Winkelverschiebung wurde nun mit Hilfe der Auswertungssoftware (Optrel) die Schichtdicke bestimmt. Die Software basiert auf den Fresnelgleichungen und erfordert die Kenntnis des Schichtaufbaus. Unter Annahme eines Polymerbrechungsindex von 1,5 resultierte eine Schichtdicke von 4,5 nm in Ethanol. Dieser Wert diente als Grundlage für die nun folgende Darstellung der Adsorptionskinetik. Über die Winkelverschiebung $\Delta\theta$ wurde der Schichtdickenzuwachs über die Messung der Laserintensität am Detektor bei einem konstanten Einfallswinkel ermittelt (Abb. 4.1 B). Nach Zugabe von EW17 stieg die Intensität und somit die Schichtdicke der thermo-responsiven Polymerschicht in den ersten Minuten auf 3,5 nm an. Anschließend verlangsamte sich das Schichtdickenwachstum. Nach ungefähr zwei Stunden wurde eine Sättigung bei 5 nm erreicht. Dieser Wert blieb mindestens 30 Minuten konstant. Danach wurde die Reaktionskammer mit Ethanol gespült und die Intensität sank durch die Änderung des Brechungsindex aufgrund des Lösungsmittelaustauschs sofort auf einen konstanten Wert von 4,5 nm.

Die Messungen der Adsorptionskinetik des thermo-responsiven Polymers EW17 zeigten, dass nach zwei Stunden bereits eine Sättigung an der Oberfläche eintrat. Deswegen wurde in den folgenden Versuchen eine konstante Beschichtungszeit von drei Stunden verwendet, um die Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifizierung zu gewährleisten.

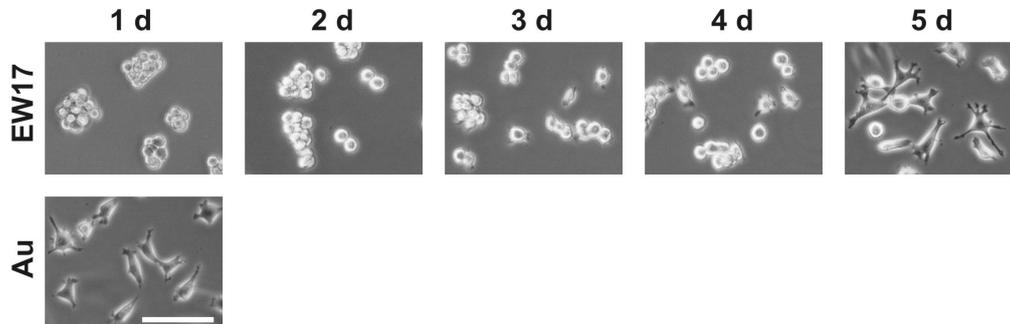


Abbildung 4.2: Phasenkontrastaufnahmen von L929-Maus-Fibroblasten an verschiedenen Zellkulturtagen auf EW17-modifizierten Oberflächen (Beschichtungskonzentration: 5 μM) und Gold. Maßbalken = 50 μm .

4.1.3 Zellausbreitungszeit und Abrundungseffizienz

Die Zellausbreitung ist ein wesentliches Kriterium in Hinblick auf die Anwendbarkeit der neuartigen PEG-basierten thermo-responsiven Oberflächen. Als Modellzelllinie wurden L929-Maus-Fibroblasten auf EW17-modifizierten Goldoberflächen kultiviert. Beispiele für die Zellmorphologie sind in Abb. 4.2 dokumentiert. Einen Tag nach der Aussaat haben sich die Fibroblasten auf den unmodifizierten Goldsubstraten ausgebreitet. Auf der thermo-responsiven Oberfläche bildeten sich Zellaggregate ohne Oberflächenkontakt. Dieser Zustand wurde auch am Tag zwei der Zellkultur beobachtet. Am dritten Tag adhärten die Zellen auf den thermo-responsiven Oberflächen und bildeten kleine Lamellipodien aus. Nach vier bis fünf Tagen Zellkultur vergrößerten die Zellen den Kontakt zur Oberfläche, bis sie vollständig ausgebreitet waren. Von dem Zeitpunkt des Aussäens bis zu dem Zeitpunkt, an dem 50% der Zellen auf den Oberflächen Lamellipodien ausgebildet hatten, wird im Folgenden als Zellausbreitungszeit bezeichnet.

Der zweite relevante Parameter thermo-responsiver Oberflächen ist die Induzierung der Zellablösung bei Verringerung der Umgebungstemperatur. Die Modellzelllinie L929 wurde auf EW17-modifizierten Goldoberflächen vier bis fünf Tage kultiviert, bis sich die Mehrheit der Zellen auf den Oberflächen ausgebreitet hatten (Zellausbreitungszeit). Dann wurden die besiedelten Oberflächen 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt (Abb. 4.3 A-C). Gleichzeitig wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt: Die Fibroblastenzelllinie wurde auf unmodifizierten Goldoberflächen kultiviert und nach zwei Tagen Zellkultur ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt (Abb. 4.3 D-F).

Um die Zellabrundung und somit die Qualität der Oberflächen bewer-

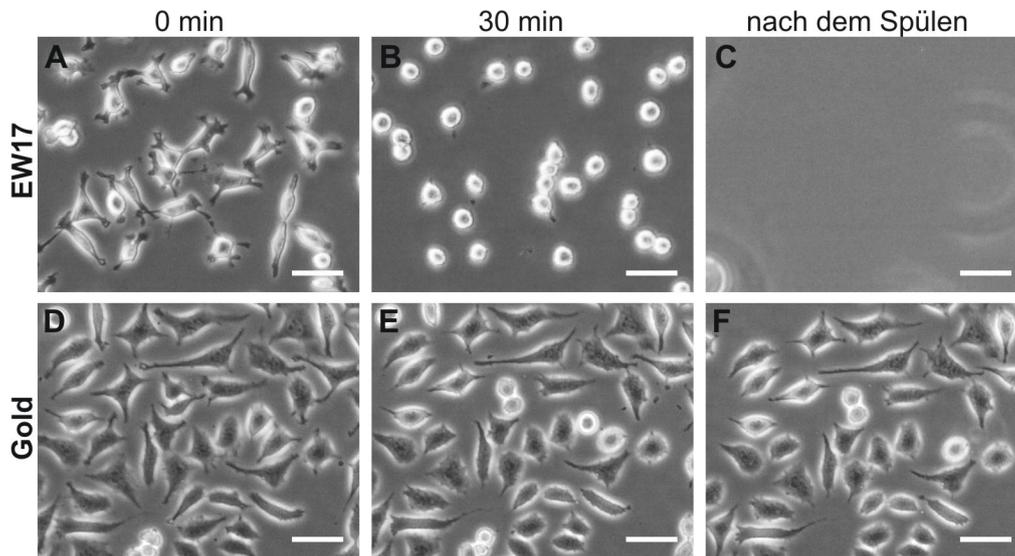


Abbildung 4.3: Phasenkontrastaufnahmen von L929-Maus-Fibroblasten bei 37 °C (A) auf EW17 modifizierter Goldoberflächen (Beschichtungskonzentration: 5 μ M) und (D) Goldoberfläche, nach 30 Minuten bei Raumtemperatur (B,E) und nach dem Abspülen der Zellen (C,F). Maßbalken = 50 μ m.

ten zu können, wurden alle Zellen mit Lamellipodien in dem beobachteten Bereich ($A = 0,74 \text{ mm}^2$) quantifiziert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden erneut alle Zellen mit Lamellipodien gezählt und das prozentuale Verhältnis der ausgebreiteten Zellen bei 37 °C und 30 Minuten an Raumtemperatur gebildet. Das so ermittelte Verhältnis wurde als Abrundungseffizienz bezeichnet. Das Maximum von 100% wurde erreicht, wenn sich alle ausgebreiteten Zellen in dem Beobachtungsbereich einer Oberfläche abgerundet haben.

Auf den thermo-responsiven Oberflächen verringerten die Zellen den Oberflächenkontakt. $(95 \pm 4)\%$ rundeten sich im Laufe der 30 Minuten ab und ließen sich anschließend durch leichtes Spülen mit 1 ml Zellmedium von den Oberflächen ablösen. Auf der gesamten EW17-modifizierten Goldoberfläche konnte die Abrundung nahezu jeder Zelle infolge des Abkühlens auf Raumtemperatur beobachten werden. Deswegen kann geschlussfolgert werden, dass die Oberflächenbeschichtung mindestens im Mikrometerbereich homogen war. Auf den Goldoberflächen rundeten sich die Zellen nur zu einem sehr geringen prozentualen Anteil von $(15 \pm 9)\%$ ab und ließen sich auch nach mehrmaligen Spülen nur sehr vereinzelt von den Oberflächen ablösen.

In diesem Kapitel konnte die homogene Oberflächenfunktionalisierung physikalisch und biologisch nachgewiesen und die Schichtdicke der PEG-

basierten thermo-responsiven Polymere ermittelt werden. Weiterhin wurden die Parameter Zellausbreitungszeit und Abrundungseffizienz für eine Bewertung des Zellverhaltens auf den Polymeroberflächen eingeführt. Für die Nutzung der Oberflächen bedarf es allerdings einer Anpassung der Zellausbreitungszeit auf kürzere, zellkulturrelevante Zeitspannen.

4.2 Optimierung der thermo-responsiven Oberflächen

Im folgenden Kapitel werden verschiedene Ansätze verfolgt, die Zellausbreitungszeit auf EW17-modifizierten Goldoberflächen zu verkürzen. Dabei wurden die Zellausbreitungszeit und die Abrundungseffizienz der Zellen berücksichtigt, da meist beide Parameter durch die Variationen beeinflusst wurden. Für die Optimierung der Zelladhäsion wurde die Konzentration der Beschichtungslösung während der Chemisorption variiert, die molekulare Zusammensetzung von P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) verändert, zusätzlich Fibronectin auf den EW17-modifizierten Goldoberflächen adsorbiert und EW17 mit einem zelladhäsionsvermittelnden Peptid (RGD) coadsorbiert.

4.2.1 Konzentration und Struktur von P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)

Die Konzentration der PEG-basierten Polymere in der Beschichtungslösung spielt eine entscheidende Rolle für die Belegungsdichte der Moleküle an der Oberfläche. Durch die Änderung der Belegungsdichte verändern sich auch die Oberflächeneigenschaften. Eine weitere Möglichkeit die Eigenschaften der P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen zu optimieren, ist die Variation der molekularen Zusammensetzung des P(MEO₂MA-*co*-OEGMA). Im Gegensatz zu den beiden P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) EW17 und AH90, welche aus den gleichen Monomeren unterschiedlicher Verhältnisse synthetisiert wurden, wurde für die Synthese des AL57 ein kürzeres OEGMA verwendet. In Abb. 4.4 werden L929-Maus-Fibroblasten auf unterschiedlichen PEG-basierten Polymeroberflächen an aufeinander folgenden Zellkulturtagen dargestellt. Alle Oberflächen wurden mit der gleichen Beschichtungskonzentration von 5 μ M hergestellt. Die Zellen auf den EW17-modifizierten Oberflächen benötigten die längste Zeit, um sich auszubreiten. Auf den AH90-modifizierten Goldoberflächen dauerte die Zellausbreitungszeit zwei Tage weniger, nämlich drei Zellkulturtag. Die AL57-modifizierten Goldoberflächen zeigten die geringste Zellausbreitungszeit von zwei Tagen. Auf der polymerfreien Kontrolloberfläche waren die Fibroblasten nach einem Tag vollständig ausgebreitet.

Im folgenden Experiment wurden die Zellausbreitungszeit und die Abrundungseffizienz von Oberflächen mit den drei verschiedenen thermoresponsiven Polymeren einander gegenübergestellt.

Werden die Polymere mit unterschiedlichen Konzentrationen von $1\ \mu\text{M}$ bis $100\ \mu\text{M}$ auf Gold chemisorbiert, ergeben sich für Maus-Fibroblasten folgende Ausbreitungszeiten und Abrundungseffizienzen (Abb. 4.5): Bei EW17 und AH90 stieg die Zellausbreitungszeit auf ein Maximum bei Beschichtungskonzentrationen von $5\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ und sank mit steigender Konzentration wieder. Die Zellausbreitungszeit von den Fibroblasten auf AH90-Oberflächen lag immer ein bis zwei Tage unter der Zellausbreitungszeit auf EW17-Oberflächen. Die Zellen auf AL57-modifizierten Oberflächen verhielten sich anders. Die Zellausbreitungszeit stieg mit höherer Konzentration von ein bis zwei Tagen auf drei bis vier Tage bei $50\ \mu\text{M}$ an. Bei einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ konnte keine Zellausbreitung in einem Bereich von sechs Tagen beobachtet werden. Aus diesem Grund konnte auch keine Abrundungseffizienz von Zellen auf der höchsten Konzentration ermittelt werden. Die Fibroblasten rundeten sich auf den Oberflächen niedrigerer Beschichtungskonzentration zu 90% bis 100% ab. Die Abrundungseffizienz von Zellen auf EW17-modifizierten Goldoberflächen war bei allen getesteten Konzentrationen immer sehr hoch und lag ebenfalls in einem Bereich von 90% bis 100%. Die Zellabrundungseffizienz auf AH90-modifizierten Oberflächen schwankte ab einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ im Vergleich zu den EW17-Oberflächen stärker und sank bei $50\ \mu\text{M}$ auf ca. 80%. Bei einer Beschichtungskonzentration von $100\ \mu\text{M}$ sank die Abrundungseffizienz der Zellen auf AH90 auf ungefähr 20%.

Die molekulare Zusammensetzung von P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) hat also einen entscheidenden Einfluss auf die Zellausbreitungszeit und die Abrundungseffizienz. EW17 und AH90 sind aus den gleichen Monomeren aufgebaut. Die Zellen benötigten bei einer Beschichtungskonzentration von $5\ \mu\text{M}$ bzw. $10\ \mu\text{M}$ für die Zellausbreitung am längsten, niedrigere und höhere Beschichtungskonzentrationen verkürzten die Zellausbreitungszeit. Da die Zellausbreitungszeit auf EW17-modifizierten Goldoberflächen im Vergleich zu AH90-modifizierten Goldoberflächen größer war, vermittelte AH90 die Zelladhäsion schneller. Die Zellabrundungseffizienz auf EW17-Oberflächen war jedoch im Gegensatz zu AH90 bei allen Beschichtungskonzentrationen sehr hoch. Das Zellverhalten auf AL57-modifizierten Goldoberflächen weicht von dem Zellverhalten auf den beiden anderen Polymeroberflächen ab. Die kürzeren OEGMA-Ketten des AL57 haben bei geringer Konzentration der Beschichtungslösung einen positiven Einfluss auf die Vermittlung der Zellausbreitung. Mit jeder Erhöhung der AL57-Konzentration brauchten die Zellen länger, um sich auf den Oberflächen auszubreiten, bis die Oberflächen schließ-

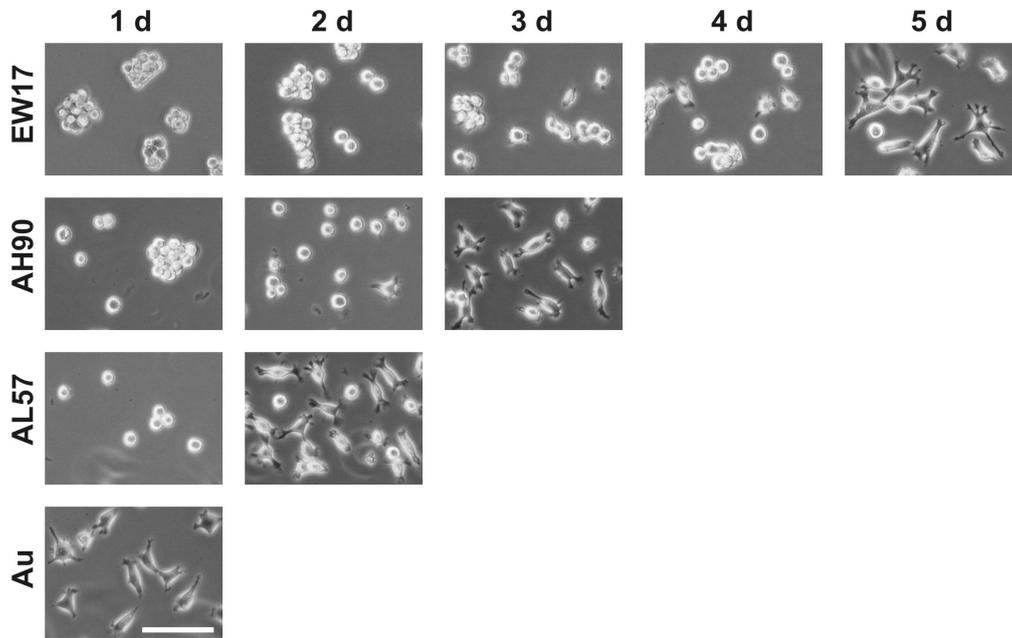


Abbildung 4.4: Phasenkontrastaufnahmen von L929-Maus-Fibroblasten an verschiedenen Zellkulturtagen auf verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Oberflächen (Beschichtungskonzentration: 5 μ M) und Gold. Maßbalken = 50 μ m.

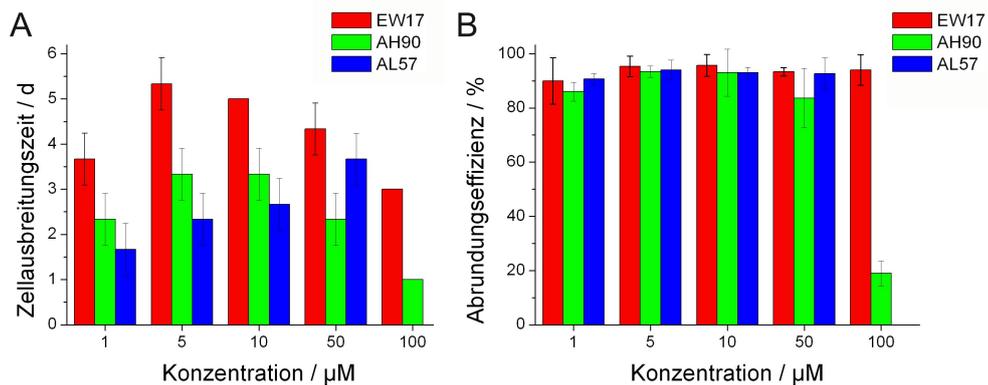


Abbildung 4.5: Ausbreitungszeit (A) und Abrundungseffizienz (B) von L929-Maus-Fibroblasten auf verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration während der Chemisorption.

4. Ergebnisse

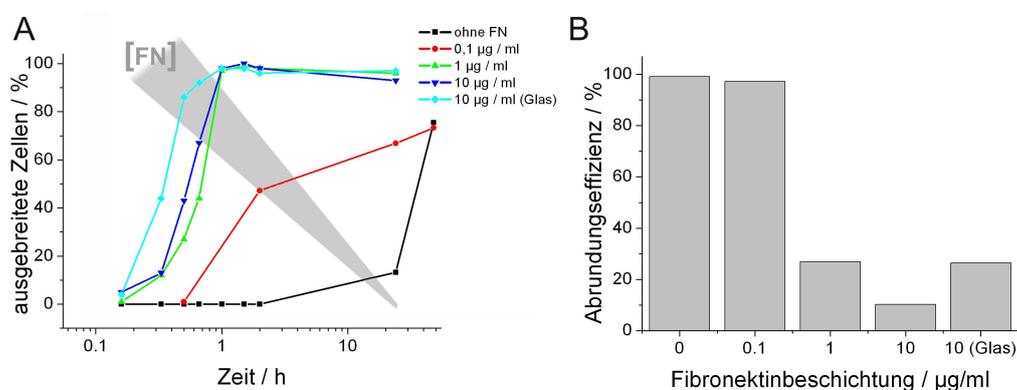


Abbildung 4.6: L929-Maus-Fibroblasten auf EW17-modifizierten Goldoberflächen mit anschließender Fibronektinbeschichtung aus Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. A) Prozentualer Anteil ausgebreiteter Zellen und (B) Abrundungseffizienz.

lich in dem untersuchten Zeitraum keine Zelladhäsion mehr vermitteln. Wichtig scheint also unter anderem die Verbindung aus der richtigen Konzentration der Polymerlösung und der Länge der PEO-Ketten des P(MEO₂MA-co-OEGMA). L929-Mausfibroblasten rundeten sich auf allen untersuchten EW17-modifizierten Goldoberflächen reproduzierbar und mit einem sehr hohen Prozentsatz zwischen 90% und 100% ab. Deswegen wurde dieses Polymer für alle folgenden Versuche verwendet.

4.2.2 Wechselwirkung mit Fibronektin

Im Folgenden wurde die Adsorption von Fibronektin auf den PEG-basierten thermo-responsiven Oberflächen und die Auswirkung auf die Zellausbreitungsgeschwindigkeit und die Abrundungseffizienz untersucht. Fibronektin ist ein zelladhäsionsförderndes Protein und sollte durch nachträgliches Immobilisieren bei 37 °C die Zellausbreitungszeit beeinflussen. Als Kontrolloberfläche diente mit Fibronektin beschichtetes Glas. L929-Zellen breiten sich auf Fibronektinoberflächen innerhalb von Minuten aus. Deswegen wurde der prozentuale Anteil der ausgebreiteten Zellen der Gesamtpopulation in kurzen Zeitintervallen ermittelt (Abb. 4.6). Dadurch konnte eine Halbwertszeit, nach der 50% der Zellen auf den Fibronektin-modifizierten Oberflächen ausgebreitet waren, berechnet werden (Tab. 4.2).

Betrachtet man die Halbwertszeiten der einzelnen Messkurven, so war die Reduktion der Zellausbreitungszeit durch die Fibronektinbeschichtung erfolgreich. Auf einer reinen EW17-modifizierten Goldoberfläche war nach

Tabelle 4.2: Halbwertszeit der Zellausbreitungszeit auf Fibronektinbeschichteten EW17-modifizierten Goldoberflächen und einer Glasoberfläche.

FN / $\mu\text{g} / \text{ml}$	$T_{1/2} / \text{h}$
0	40
0,1	1,6
1	0,7
10	0,5
10 (Glas)	0,3

40 h die Hälfte aller Zellen ausgebreitet. Diese Zeit verringerte sich durch eine Beschichtung mit einer Fibronektinlösung mit einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g} / \text{ml}$ auf 1,6 h. Wurde die Konzentration der Fibronektinlösung auf $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ erhöht, halbierte sich die Halbwertszeit der ausbreiteten Zellen auf 0,7 h (Abb. 4.6). Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ änderte sich die Halbwertszeit geringfügig auf 0,5 h. Auf der Kontrolloberfläche (Fibronektinbeschichtetes Glas mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g} / \text{ml}$) breiteten sich die Zellen am schnellsten aus. Die Halbwertszeit betrug hier 0,3 h (Tab. 4.2).

Auf den Oberflächen mit der höchsten Fibronektinkonzentration rundeten sich die Zellen kaum ab. So betrug die Zellabrundungseffizienz bei den drei Oberflächen mit $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ jeweils weniger als 30%. Die Zellen konnten von diesen Oberflächen auch nicht abgespült werden. Hingegen rundeten sich die Zellen auf der Probe mit der geringsten Beschichtungskonzentration etwa vergleichbar effizient ab wie auf der reinen EW17-modifizierten Goldoberfläche. Sie konnten nach der Temperatursenkung komplett von der Oberfläche abgespült werden.

4.2.3 Zugänglichkeit von Signalmolekülen

Der Oberflächenkontakt ist ein wesentlicher Bestandteil für die Kommunikation adhärenter Zellen wie den L929-Maus-Fibroblasten. Durch die spezifische und unspezifische Wechselwirkung von Zellen an Oberflächen werden unterschiedliche Signalkaskaden gestartet, die zum Beispiel Auswirkung auf das Proteom, den Zellzyklus und die Proliferation haben. Über die unspezifische Wechselwirkung an Oberflächen können diese Eigenschaften kaum kontrolliert werden. Werden jedoch Signalmoleküle eingesetzt, die spezifisch an Zellrezeptoren binden, können dann gezielt Signale auf Zellen übertragen werden. Ein einfaches Beispiel wird im folgenden Experiment eingesetzt. Die in Fibronektin vorkommende Peptidsequenz RGD ist für die Wechselwirkung mit dem Zellrezeptor Integrin bekannt und ist für die schnelle Zelladhäsion

4. Ergebnisse

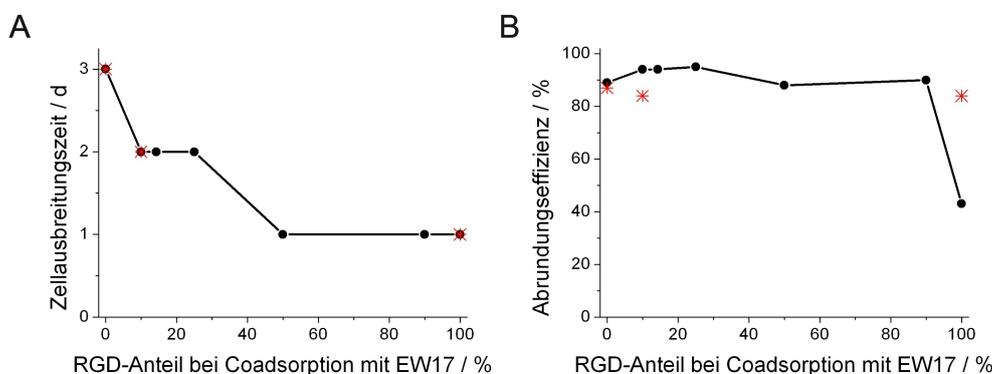


Abbildung 4.7: Ausbreitungszeit (A) und Abrundungseffizienz (B) von L929-Maus-Fibroblasten auf coadsorbierten Oberflächen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von EW17 mit (schwarz) RGD (zelladhäsionsförderndes Peptid) bzw. (rot) RDG (Kontrollpeptid). Gesamtkonzentration: 50 μ M.

verantwortlich. Die Präsentation von Signalmolekülen könnte über die Konformationsänderung von thermo-responsiven Polymeren gesteuert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Zugänglichkeit der adhäsionsfördernden Peptidsequenz RGD untersucht. Da die Zellausbreitungszeit auf der reinen EW17-modifizierten Goldoberfläche sehr lang war, wurde eine Beschleunigung der Zelladhäsion durch das RGD erwartet. Es wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse des thermo-responsiven Polymers EW17 und eines RGD-Peptids coadsorbiert und die Zellausbreitungsgeschwindigkeit und die Abrundungseffizienz untersucht (Abb. 4.7). Aufgrund von Lösungseigenschaften des RGDs wurde die Coadsorption in Wasser durchgeführt. Die Zellen auf der nur mit EW17 modifizierten Goldoberfläche benötigten drei Tage, um sich auszubreiten. Wurden 10% des EW17 während der Chemisorption durch RGD ersetzt, verringerte sich die Zellausbreitungszeit um einen Tag. Die Zellausbreitungszeit auf diesen Oberflächen lag immer noch bei zwei Tagen. Bei 50%, 90% und 100% RGD fiel die Zellausbreitungszeit auf einen Tag ab.

Die Abrundungseffizienzen der Maus-Fibroblasten bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von EW17 und RGD schwankten in einem Bereich von ungefähr 90% bis 95%. Auf der reinen RGD-Oberfläche wurde eine Zellabrundungseffizienz von ca. 40% erreicht.

Weiterführend wurde eine Coadsorption mit einem Kontrollpeptid durchgeführt. Das Peptid RDG besteht aus den gleichen Aminosäurebausteinen wie RGD, allerdings in vertauschter Reihenfolge. Es ist zu erwarten, dass diese Peptidsequenz nicht vom Integrinrezeptor erkannt wird und daher die

Zelladhäsion nicht wesentlich beeinflusst. Gegenübergestellt wurden (a) eine reine EW17-Oberfläche, (b) eine Coadsorption mit 10% RDG und 90% EW17 und (c) eine reine RDG-Oberfläche. Die Zellausbreitungszeit veränderte sich im Vergleich zu den Zellausbreitungszeiten des RGD-Experiments nicht: Die Zellen benötigten drei Tage auf einer reinen EW17-Oberfläche, zwei Tage auf der 10% RDG-Oberfläche und einen Tag auf der reinen RDG-Oberfläche.

Die Abrundungseffizienzen der RDG-coadsorbierten Oberflächen blieben mit 80% immer sehr hoch. Interessanterweise war die Zellabrundungseffizienz auf der reinen RDG-Oberfläche genauso hoch, wie unter Vorhandensein von thermo-responsiven Polymer EW17 während der Coadsorption.

Die Funktionalität des Peptides RGD und des Kontrollpeptides RDG wurde über einen Adhäsionsversuch ermittelt. Wenn gelöstes RGD spezifisch an die Integrine der Maus-Fibroblasten bindet, werden die Zellen an der Zellausbreitung gehindert, weil ihre Oberflächenmoleküle bereits abgesättigt sind [42]. Für diesen Zweck wurde 1 mM jedes Peptids in Zellkulturmedium gelöst. Anschließend wurden Zellen beiden Ansätzen ausgesetzt, auf einer Glasoberfläche ausgesät und die Zellausbreitung abhängig von der Zeit untersucht. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Peptidzusatz durchgeführt. In Abb. 4.8 wurden die prozentualen Anteile der ausgebreiteten Zellen in den drei verschiedenen Ansätzen dargestellt. Der Anteil der ausgebreiteten Zellen der Kontrolle und der in RDG kultivierten Zellen unterschieden sich kaum. Die unter Vorhandensein des RGDs kultivierten Zellen breiten sich deutlich langsamer auf der Glasoberfläche aus. Offenbar inhibierte die Inkubation im RGD-haltigen Medium erwartungsgemäß die Zelladhäsion. Die Halbwertszeit der Zellausbreitung lag bei (31 ± 4) h und war somit achtmal höher als die Halbwertszeiten auf der Glasoberfläche mit $(4,4 \pm 0,5)$ h und des RDG-Versuchs mit $(4,2 \pm 0,3)$ h. Nach zehn Stunden waren im Gegensatz zur Kontrolle und des RDG-haltigen Zellkulturmediums nur ein Viertel der Zellen mit RGD auf der Glasoberfläche ausgebreitet. (Die RDG-Lösung zeigte kleine Agglomerate. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich um Verunreinigungen des Peptides handelte oder das Peptid in Zellmedium schwer löslich war.)

Da die RGD-Peptidsequenz gemäß dieses Zelladhäsionsversuchs, im Gegensatz zum RDG, spezifisch an den Integrinrezeptor gebunden hat, war die Ursache für die beschleunigte Zellausbreitung auf den Coadsorptionsoberflächen wahrscheinlich eine Änderung der Oberflächenarchitektur (siehe Kapitel 5). Die Peptidimmobilisierung erfolgte über einen kurzen Spacer von drei Aminosäuren an der Oberfläche (CGG-RGDS). Dadurch könnte ein Teil der rezeptorbindenden Peptidsequenz durch die Überlagerung von EW17-Polymerketten für die Zellen „unsichtbar“ geworden sein. Deswegen wurde im Folgenden die Peptidsequenz über längere Spacer an die Goldoberflächen

4. Ergebnisse

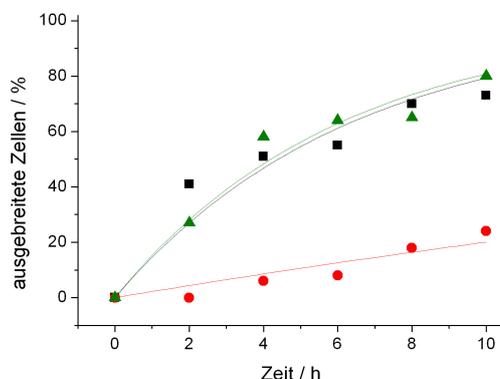


Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil ausgebreiteter L929-Maus-Fibroblasten auf Glas in Zellkulturmedium (schwarz), mit 1 mM RGD (rot) und 1 mM RDG (grün) in Lösung.

gekoppelt, um die Exposition an der Oberfläche zu verbessern. Es wurden ein Spacer mittlerer Länge bestehend aus drei Ethylenoxidketten und ein langer Spacer aus 13 OEGMA-Ketten für die Coadsorption mit EW17 verwendet.

In Abb. 4.9 wurde der Einfluss der Spacerlänge der adhäsionsfördernden RGD-Peptidsequenz auf die Zellausbreitungszeit und die Zellabrundungseffizienz dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt einen Auszug der bereits oben diskutierten Werte. Es handelt sich um ein Peptid mit einem kurzen Spacer, der drei Aminosäuren lang ist. Rot zeigt die Coadsorption von EW17 und PEO-RGD mit einem Spacer mittlerer Länge aus drei Ethylenoxidketten. Grün stellt die Coadsorption mit einer Variante des P(OEGMA) dar. Der Spacer dieses RGD-Polymers besteht aus 13 OEGMA-Ketten und ist somit der längste Spacer. Die Coadsorption wurde in fünf verschiedenen Konzentrationsverhältnissen durchgeführt: die reine EW17-Oberfläche, 10%, 50%, 90% und 100% RGD-Derivat. Bei der reinen EW17-modifizierten Goldoberfläche beanspruchten die Zellen drei Tage, bis sie sich auf den Oberflächen ausbreiteten. Wurden bei der Coadsorption 10% RGD-Derivat verwendet, sank die Zellausbreitungszeit bei dem kurzen und dem mittleren Spacer auf zwei Tage. Bei gleicher Konzentration (10%) erniedrigte die Verwendung des langen Spacers die Zellausbreitungszeit nicht. Bei einer Coadsorption von 50% EW17 und 50% RGD senkte lediglich das Peptid mit dem kurzen Spacer die Zellausbreitungszeit noch weiter auf einen Tag. Die Zellen auf den anderen beiden Derivaten benötigen wiederum zwei Tage, um sich auf den Oberflächen auszubreiten. Wurde die RGD-Konzentration auf 90% erhöht, sank die Zellausbreitungszeit bei dem mittleren Spacer auch auf einen Tag. Die Zellen

4. Ergebnisse

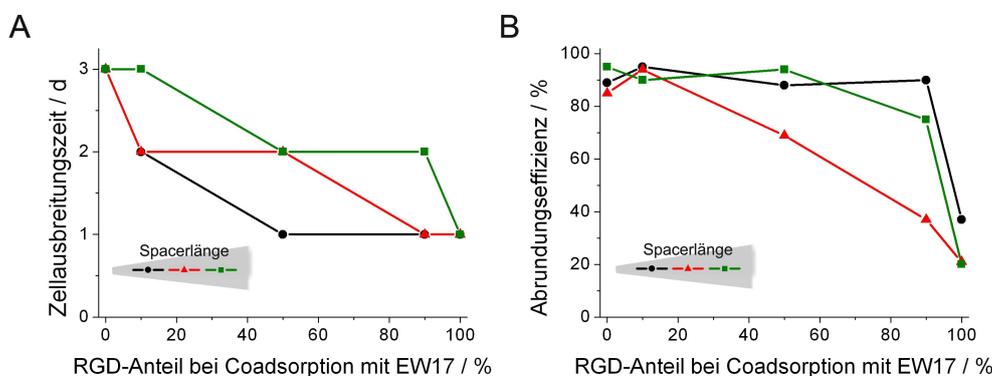


Abbildung 4.9: Ausbreitungszeit (A) und Abrundungseffizienz (B) von L929-Maus-Fibroblasten auf coadsorbierten Oberflächen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von RGD Peptidsequenzen und RGD. Die verschiedenen RGD Sequenzen haben unterschiedliche Spacerlängen. Schwarz stellt eine Peptidsequenz mit einem kurzen Spacer aus 3 Aminosäuren (CGG) dar. Rot symbolisiert die Peptidsequenz mit einem Spacer mittlerer Länge durch drei Polyethylenoxeinheiten ($C(\text{PEO})_3\text{GRGDS}$). Der längste Spacer besteht aus dem Polymer $(\text{OEGMA})_{13}$ und wird in dem Diagramm grün dargestellt.

auf den coadsorbierten Oberflächen mit dem langen Spacer beanspruchten weiterhin zwei Tage, um sich auszubreiten. Wurden Oberflächen ausschließlich mit RGD-Derivaten hergestellt, benötigten alle Zellen lediglich einen Tag für die Zellausbreitung.

Die Abrundungseffizienzen der Zellen auf den coadsorbierten EW17-Oberflächen mit kurzem und langem Spacer verhielten sich in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen ähnlich (Abb. 4.9). Die Fibroblasten rundeten sich auf diesen Oberflächen zu sehr hohen Anteilen ab und konnten von den Oberflächen gespült werden. Bei allen Proben, die ausschließlich aus RGD-Derivaten bestanden, wurden Abrundungseffizienzen unter 40% beobachtet. Auf diesen Oberflächen konnten die Zellen nicht mehr durch Spülen abgelöst werden. Die Abrundungseffizienz auf den coadsorbierten Oberflächen mit dem mittleren Spacer sank bei einem Konzentrationsverhältnis von 50% auf ungefähr 70%. Bei einer Konzentrationssteigerung auf 90% sank die Abrundungseffizienz weiter und erreicht einen Wert von ca. 40%.

In diesem Kapitel wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Oberflächen in Bezug auf das Zellverhalten zu optimieren. Im Vordergrund stand hierbei, die Zellausbreitungszeit zu senken und gleichzeitig die hohe Zellausbreitungseffizienz auf den thermo-responsiven Oberflächen zu erhalten. Eine Möglichkeit stellte die Variation der Beschichtungskonzentration dar. Hier

konnte gezeigt werden, dass die Zellausbreitungszeit auf EW17-modifizierten Oberflächen durch höhere oder niedrigere Polymerkonzentration trotz hoher Abrundungseffizienzen gesenkt wurde. Eine weitere Möglichkeit der Verkürzung der Zellausbreitungszeit konnte durch die nachträgliche Fibronektinbeschichtung auf EW17-modifizierten Goldoberflächen erreicht werden. Wenn die Fibronektinkonzentration nicht zu hoch war (0,1%), konnte die Zellausbreitungszeit auf einen Tag reduziert werden, ohne die Abrundungseffizienz negativ zu beeinflussen. Durch die Coadsorption des zelladhäsionsvermittelnden Peptids RGD konnte mit einem Anteil von 85% oder 90% RGD und 15% oder 10% EW17 die Zellausbreitungszeit, wenn auch nicht durch spezifische Rezeptorbindung, auf einen Tag reduziert werden. Die Abrundungseffizienz war auf beiden Oberflächen sehr hoch.

4.3 Langzeitstabilität und Wiederverwendbarkeit thermo-responsiver Oberflächen

Eine wichtige Frage bei der Anwendung thermo-responsiver Oberflächen ist die Stabilität der Funktionalität. Finden die Oberflächen Einsatz in der Zellkultur, müssen die thermo-responsiven Substrate über Wochen stabil bleiben. Aus diesem Grund wurde die Abrundungseffizienz von Maus-Fibroblasten auf unterschiedlich lange gelagerten EW17-modifizierten Goldoberflächen bestimmt (Abb. 4.10 A). Um die Stabilität bei unterschiedlichen Konformationen testen zu können, wurde die eine Hälfte der Oberflächen bei Raumtemperatur und die andere Hälfte bei 45 °C gelagert und sofort nach der Herstellung (Zeitpunkt $t=0$), nach einer Woche, zwei Wochen, zehn Wochen, 20 Wochen und 30 Wochen getestet. Die bei Raumtemperatur gelagerten Oberflächen zeigten über den Lagerzeitraum von 30 Wochen keine Beeinträchtigung der Fähigkeit, Zellen von den Oberflächen ablösen zu können. Die Abrundungseffizienz betrug immer 90% bis 100%. Die Fibroblasten konnten nach 30 Minuten bei Raumtemperatur von den Oberflächen gespült werden. Die Abrundungseffizienz auf den bei 45 °C gelagerten Oberflächen ging nach 20 Wochen deutlich zurück. Die oberflächenvermittelte Zellabrundung betrug lediglich noch 20%. Nach 30 Wochen sank die Abrundungseffizienz nochmals um 10%.

Ferner wurde getestet, ob die Oberflächen nach dem ersten Einsatz in der Zellkultur wieder verwendet werden können. Dazu wurde die Zellabrundungseffizienz des ersten Schaltzyklus, die als Referenz für die Oberfläche dient, mit den Abrundungseffizienzen zweier weiterer Schaltungen derselben Oberfläche verglichen (Abb. 4.10 B). L929-Maus-Fibroblasten wurden auf einer EW17-modifizierten Goldoberfläche kultiviert. Nach drei Tagen in der Zell-

4. Ergebnisse

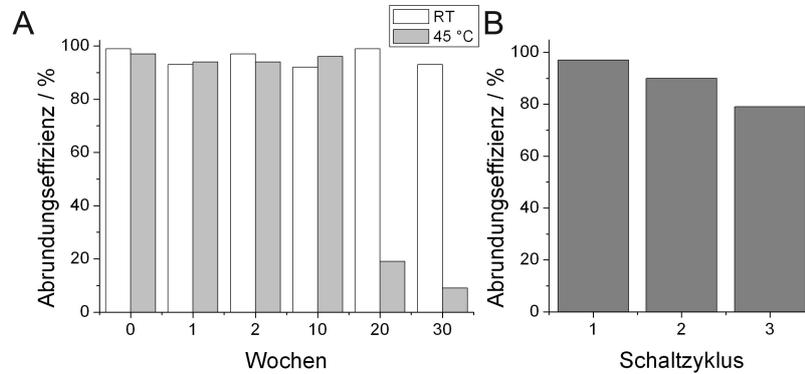


Abbildung 4.10: A) Einfluss der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur EW17-modifizierter Goldoberflächen auf die Abrundungseffizienz von L929-Maus-Fibroblasten. B) Auswirkung aufeinander folgender Schaltzyklen auf die Abrundungseffizienz von L929-Maus-Fibroblasten.

kultur breiteten sich die Zellen aus. Sie wurden dann auf Raumtemperatur abgekühlt und die Abrundungseffizienz nach 30 Minuten bestimmt. Während des ersten Schaltzyklus rundeten sich die Fibroblasten fast vollständig ab und konnten komplett von der Oberfläche gespült werden. Wurden die Zellen auf dieser Oberfläche weiter kultiviert, breiteten sie sich innerhalb eines Tages wieder aus. Bei dem zweiten Schaltzyklus rundeten sich ungefähr 90% aller Zellen ab und konnten ebenfalls vollständig von der Oberfläche gespült werden. Nach einem weiteren Tag der Zellkultur wurde der dritte Schaltzyklus durchgeführt. Hier sank die Abrundungseffizienz der Zellen auf 80%. Sie konnten trotz dieser hohen Abrundungseffizienz nicht mehr vollständig durch Abspülen von der Oberfläche abgelöst werden.

4.4 Erhalt des Membranproteins Integrin nach der Zellablösung mittels thermo-responsiver Oberflächen und Trypsin

Das herkömmliche Verfahren, das für die Zellablösung in der Zellkultur verwendet wird, funktioniert über den Verdau der adhäsionsvermittelnden Membranproteine. Bei dieser Methode werden neben den Adhäsionsrezeptoren unspezifisch alle anderen an der Membran exponierten Proteine zerstört. Dies macht häufig nachfolgende Analysen unmöglich. Die Verwendung thermo-responsiver Polymere stellt eine Alternative zu der enzymvermittelten Zellablösungsmethode dar. Hier werden die Zellen über die Änderung der Oberflächeneigenschaften durch Reduktion der Temperatur von 37 °C auf Raum-

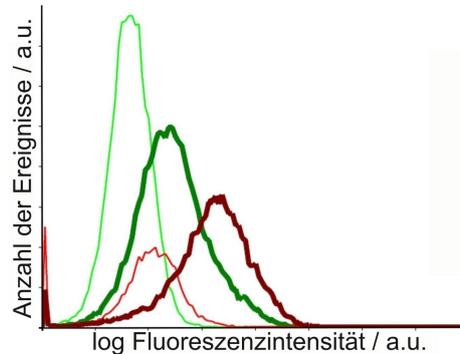


Abbildung 4.11: Histogramm einer Durchflusszytometermessung des Membranrezeptors α -5 Integrin von trypsinierten (grün) und durch P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierte Oberflächen abgelösten (rot) MCF-7-Brustkrebszellen. Die Isotypkontrolle wird jeweils durch hellgrün bzw. hellrot dargestellt. Die Mediane der Fluoreszenzsignale werden in Tab. 4.3 zusammengefasst.

temperatur abgelöst. Für den Nachweis des Erhalts von Membranproteinen wurden Durchflusszytometermessungen von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Transmembranrezeptoren (Integrine) nach der Zellablösung durch Trypsin und durch thermo-responsive Polymere durchgeführt (Abb. 4.11). Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität einzelner markierter Zellen der unterschiedlich behandelten Zellpopulationen. Die Ereignisse gleicher Fluoreszenzintensität wurden summiert und als Anzahl der Ereignisse über die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Stärke des Fluoreszenzsignals kann mit der Anzahl der funktionellen Integrinrezeptoren korreliert werden. Das heißt, je stärker das Signal einer Zelle, desto mehr Integrinrezeptoren sind vorhanden. Um unspezifische Antikörperbindungen ausschließen zu können, wurden für beide Zellablösungsmechanismen Isotypkontrollen durchgeführt. Die unspezifische Bindung des Isotypantikörpers an die untersuchten Zellen wurde über die Bindung eines sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers nachgewiesen.

Der Median des Fluoreszenzsignals der Isotypkontrolle trypsinierter Zellen lag bei 0,7 und der Median der Isotypkontrolle oberflächenvermittelter Zellablösung bei 1,0. Die unspezifische Bindung des Isotypantikörpers war demnach auf den Zellen, die über thermo-responsive Oberflächen abgelöst wurden, höher. Wurde als Primärantikörper ein spezifischer Antikörper gegen die α -Untereinheit des Integrinrezeptors verwendet, stieg der Median des Fluoreszenzsignals auf 1,6 bei trypsinierten Zellen und auf 4,0 bei durch schaltbare Oberflächen abgelöste Zellen. Wird jeweils die Differenz des Fluoreszenzmedians der unspezifischen Isotypantikörperbindung und dessen der

Tabelle 4.3: Mediane der Fluoreszenzintensitäten von Isotyp- und Integrin-Markierung enzymatischer und oberflächenvermittelter Zellablösung von MCF-7-Epithelzellen.

	Isotyp / Fluoreszenz	α -Integrin / Fluoreszenz	Δ / Fluoreszenz
Trypsin	0,7	1,6	0,9
EW17	1,0	4,0	3,0

spezifischen Integrinantikörperbindung gebildet, ergibt sich für die trypsinisierten Zellen eine mittlere Population mit der Fluoreszenz von 0,9. Bei der oberflächenvermittelten Zellablösung liegt die Fluoreszenz der mittleren Population dreifach höher (3,0). Das bedeutet, dass diese Zellen mehr Integrinrezeptoren auf der Oberfläche besitzen als die trypsinisierten Zellen.

4.5 Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Zellabrundung

Warum runden sich L929-Maus-Fibroblasten auf den thermo-responsiven Oberflächen ab und lassen sich danach einfach von der Oberfläche spülen? Handelt es sich um eine passive Zellreaktion, ausgelöst durch den Eigenschaftenwechsel infolge des Abkühlens auf Raumtemperatur, dann müsste der Prozess bei tiefen Temperaturen ebenso schnell oder gegebenenfalls sogar schneller ablaufen. Reagieren die Zellen hingegen aktiv auf den Eigenschaftenwechsel, dann wird die Zellabrundung langsamer verlaufen, da der Metabolismus der Zellen eingeschränkt wird. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden die Maus-Fibroblasten von 37 °C auf Raumtemperatur, 15 °C und 4 °C abgekühlt und die Anzahl der abgerundeten Zellen im Verlauf von 30 Minuten dokumentiert (Abb. 4.12). Um den Prozess auf P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)- und PNiPAAm-modifizierten Goldoberflächen vergleichen zu können, wurde das Experiment mit beiden thermo-responsiven Polymeren durchgeführt.

Die Kurven der abgerundeten Zellen verlaufen in Abhängigkeit von der Zeit bei 15 °C und Raumtemperatur sigmoidal. Auf den EW17-Oberflächen begannen die Zellen sich nach vier Minuten und auf den PNiPAAm-Oberflächen nach sechs Minuten abzurunden. Dann stieg der prozentuale Anteil schnell an und ging auf EW17 nach 22 Minuten und auf PNiPAAm nach 26 Minuten in eine Sättigung über. Im Gegensatz dazu rundeten sich die Zellen bei 4 °C auf beiden thermo-responsiven Oberflächen verzögert ab. Dadurch wird das Maximum erst nach ca. 30 Minuten erreicht. Auf den EW17-modifizierten Goldoberflächen wurde bei 4 °C lediglich ein Maximum von 80% abgerundeter Zellen nach 30 Minuten erreicht. Auf der PNiPAAm-

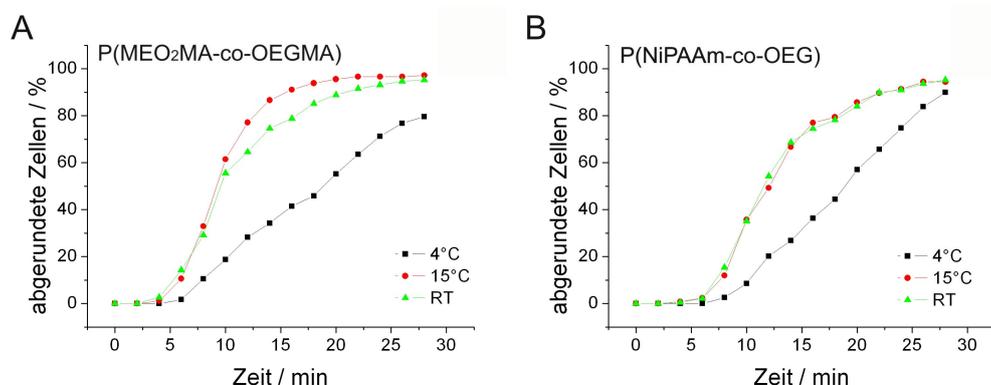


Abbildung 4.12: Zeitliche Entwicklung der Zellabrundung bei verschiedenen Umgebungstemperaturen während des Abkühlens auf P(MEO₂MA-co-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen (A) und P(NiPAAm-co-OEG)-modifizierten Goldoberflächen (B). Die Phasenübergangstemperaturen von P(MEO₂MA-co-OEGMA) und P(NiPAAm-co-OEG) liegen bei 35 °C.

modifizierten Goldoberfläche wurde bei 4 °C ein Maximum ähnlich des Maximums der PNiPAAm-Oberflächen bei 15 °C und Raumtemperatur gemessen. Es betrug jeweils 90%.

Die LCST der beiden Polymere in Wasser liegt bei ungefähr 37 °C. Wird der Kurvenverlauf der abgerundeten Zellen bei Raumtemperatur und 15 °C von beiden Polymeroberflächen verglichen, so reagierten die Zellen auf den P(MEO₂MA-co-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen früher auf die Temperatursenkung. Darüber hinaus scheint das Herabsetzen der Umgebungstemperatur auf 15 °C eine geringe Beschleunigung der Zellabrundung zu verursachen. Dies konnte bei den PNiPAAm-modifizierten Goldoberflächen nicht gezeigt werden. Hier verlaufen beide Zellabrundungen gleich schnell. Auf beiden Oberflächen kam es bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C zu einer verlangsamten Zellabrundung. Das legt den Schluss nahe, dass der Zellablösungsmechanismus nicht allein passiv verläuft, sondern die Zellen den Prozess mitbewirken und den Oberflächenkontakt aufgrund der Änderung der Oberflächeneigenschaften aktiv reduzieren.

4.6 Verhalten unterschiedlicher Zelllinien auf thermo-responsiven Oberflächen

Die L929-Maus-Fibroblasten dienten als Modellzelllinie, um die Effektivität der Zellablösung über die Zellabrundungsrate auf den PEG-basierten Oberflächen messen zu können. Diese Zellen waren in Bezug auf Zelladhä-

sion anspruchsvoller als andere Zelllinien, sie benötigten jedoch keine Zell-Zell-Kontakte und sind einzeln auf der Oberfläche vorzufinden (Abb. 4.13). Deshalb wurden die Zellen auf diesen Oberflächen nie bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die räumliche Trennung ist ein großer Vorteil bei der Identifizierung einzelner Zellen. Die Bestimmung der Zellabrundungseffizienz wurde somit erheblich erleichtert.

Da die thermo-responsiven Oberflächen in der Zellkultur eingesetzt werden sollen, sind die Kultivierung und die Untersuchung der Zellablösung anderer Zelllinien auf den P(MEO₂MA-co-OEGMA)-Oberflächen obligatorisch. Zelllinien wie die MCF-7-Epithelzellen, die U2OS-Knochenzellen und die CHO-K1-Epithelzellen zeigen eine deutlich höhere Wechselwirkung zu Zellkultursubstraten und sind schwer von Oberflächen ablösbar. Diese Zelllinien werden üblicherweise mit einer hoch konzentrierten Trypsinlösung (0,25%) inkubiert, um die Zellen von den Oberflächen zu separieren. Bei den L929-Zellen reicht eine schwache Trypsinkonzentration (0,05%) aus, um die Zellablösung zu induzieren.

Im Gegensatz zu den L929-Maus-Fibroblasten lagen die MCF-7-Epithelzellen, die U2OS-Knochenzellen und die CHO K1-Epithelzellen hauptsächlich in Zellaggregaten vor (Abb. 4.13). Wurden die besiedelten thermo-responsiven Oberflächen auf Raumtemperatur abgekühlt, rundeten sich die Maus-Fibroblasten wie oben beschrieben innerhalb von 30 Minuten auf der Oberfläche ab. Die Morphologie der anderen Zelllinien resultierte oft nicht in einer runden, sondern in einer länglichen Zellform. Die meisten Zellen befanden sich noch im Zellverband. Spülte man die Zellen nach 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Pipette, wurden trotzdem bis zu 80% aller Zellen, zum Teil als Zellverband, von der Oberfläche geschert.

Trotz der geringen morphologischen Änderung der Zellen war deren Wechselwirkung zu den thermo-responsiven Oberflächen nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur so gering, dass sie leicht von den Oberflächen abgespült werden konnten. Da hier offensichtlich die Phasenkontrastaufnahmen keine Information zu der Zellablösung beitragen kann, wurde im Folgenden Abschnitt eine Methode verwendet, die die Zelladhäsion an Oberflächen visualisiert.

4.7 TIRAF-Mikroskopie auf thermo-responsiven Oberflächen

Die TIRAF-Mikroskopie bildet die Möglichkeit, die Zelladhäsion auf Oberflächen zu untersuchen. Durch die limitierte Eindringtiefe des evaneszenten Feldes können so Informationen über direkte Wechselwirkung der Zelle mit

4. Ergebnisse

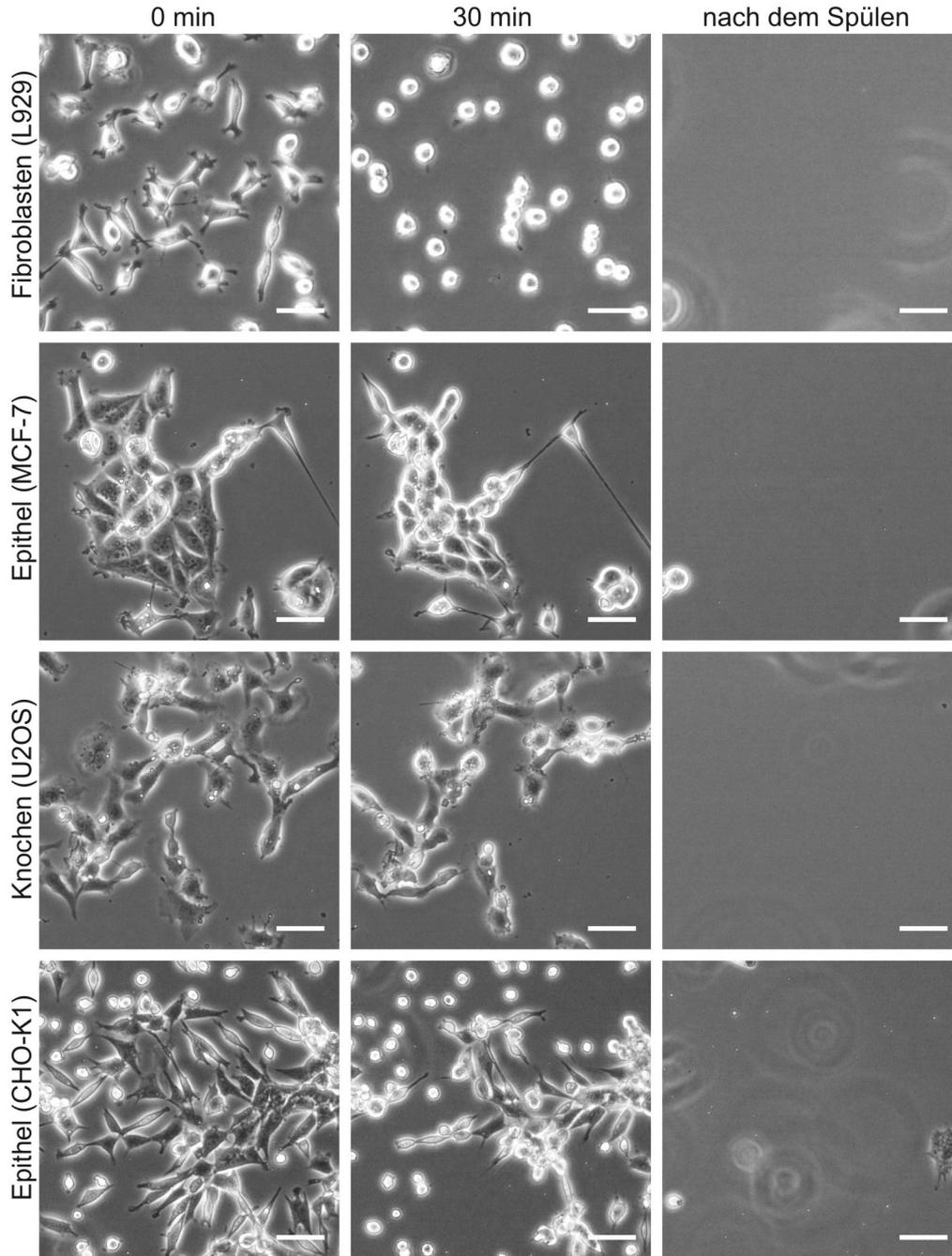


Abbildung 4.13: Phasenkontrastaufnahmen von L929 (Fibroblastenzelllinie), MCF7 (Epithelzelllinie), U2OS (Knochenkrebszelllinie) und CHO-K1 (Epithelzelllinie) bei 37 °C (linke Spalte) auf EW17-Oberflächen (Beschichtungskonzentration: 1 μ M), nach 30 Minuten bei Raumtemperatur (mittlere Spalte) und nach dem Abspülen der Zellen (rechte Spalte). Maßbalken = 50 μ m.

der Oberfläche gewonnen werden. Ein polarer Fluoreszenzfarbstoff wurde kurz vor dem Experiment in das Zellmedium appliziert. Die Verdrängung des Farbstoffes durch die adsorbierten Zellen wurde als schwarze und graue Areale im Mikroskopiebild sichtbar (Abb. 4.14). Die in dieser Arbeit verwendeten thermo-responsiven Polymere wurden auf dünnen Goldschichten chemisorbiert. Die Goldschicht musste von 47 nm auf 20 nm reduziert werden, um die Absorption des Lichtes durch das Gold zu senken. Allerdings wird hier gezeigt, dass die Goldschicht trotzdem hinreichte, um eine homogene L929-Zellabrundung zu gewährleisten.

4.7.1 Zeitaufgelöste Untersuchung der Zelladhäsionsfläche von L929-Fibroblasten auf P(MEO₂MA-co-OEGMA)

Mit der TIRAF-Mikroskopie ist es möglich, die Adhäsionsfläche und damit die Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Zellen zu visualisieren. Die Adhäsionsfläche erscheint als schwarzes und graues Areal und zeigt den Zelloberflächenkontakt in einem Bereich von ungefähr 150 nm über der Grenzfläche des Zellkultursubstrats zum Medium. Abb. 4.14 stellt TIRAF-Mikroskop-Aufnahmen von L929-Maus-Fibroblasten auf einer EW17-modifizierten Goldoberfläche (A) und auf einer Goldoberfläche (D) bei 37 °C dar. Die Zellen unterschieden sich durch die Größe der Adhäsionsfläche. Maus-Fibroblasten nahmen im Mittel eine Fläche von $(420 \pm 40) \mu\text{m}^2$ auf EW17-Oberflächen ($n=28$) und $(840 \pm 30) \mu\text{m}^2$ auf Goldoberflächen ($n=7$) ein. Die Adhäsionsfläche der Zellen war demnach auf P(MEO₂MA-co-OEGMA) nur halb so groß wie auf Gold. Wurde die Temperatur auf Raumtemperatur gesenkt, verringerten die Fibroblasten auf der EW17-modifizierten Goldoberfläche die Zelladhäsionsfläche drastisch (B). Wurden die Zelladhäsionsflächen von 28 Zellen auf den thermo-responsiven Oberflächen jede fünfte Minute gemittelt, so erhält man den in G dargestellten Verlauf (gefüllten Kreise). Die Zeitverläufe sämtlicher untersuchten Zellen wurden an eine monoexponentielle Funktion gefittet und jeweils die Halbwertszeit und das terminale Plateau berechnet (siehe Kapitel 3.9). Sie betragen im gewichteten Mittel $(6,4 \pm 0,1)$ Minuten bzw. $(17,6 \pm 0,1)\%$. Die entsprechende Kurve mit diesen Mittelwertparametern ist in G als durchgezogene Linie dargestellt. Der Rückgang der Adhäsionsfläche von der Zelllinie L929 sinkt also proportional zu der aktuellen Kontaktfläche. Analog wurde mit den Fibroblasten auf Goldoberflächen verfahren (offene Kreise). Nach dem Zusammenfassen dieser Daten durch Fitten mit der gleichen Funktion und anschließender Wichtung resultierte ein Kurvenverlauf (gestrichelte Linie) mit einer deutlich höheren

4. Ergebnisse

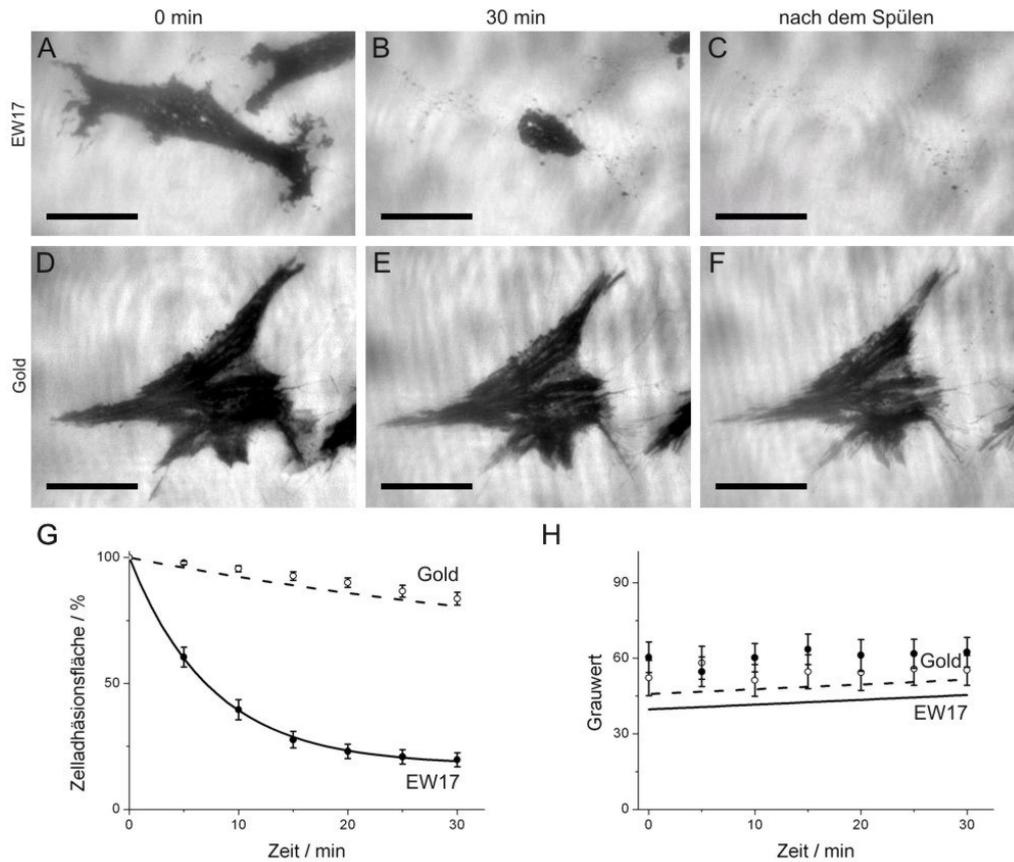


Abbildung 4.14: TIRAF-Aufnahmen von L929-Maus-Fibroblasten auf einer EW17-modifizierten Goldoberfläche (A-C) und Gold (D-E) bei 37 °C (A,D), nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (30 min) (B,E) und nach leichtem Spülen (C,F). Maßbalken = 20 μm. (G,H) Quantitative Analyse der Zelladhäsionsfläche (G) und des mittleren Grauwerts der Zelladhäsionsfläche (H) basierend auf TIRAF-Messungen von L929-Maus-Fibroblasten während der Temperatursenkung von 37 °C auf Raumtemperatur. Die durchgezogenen Linien stellen die gewichteten Mittelwerte auf EW17-modifizierter Goldoberfläche und die gestrichelten Linien die auf Gold dar. Die Kreise zeigen alle fünf Minuten die ungewichteten Mittelwerte der Zelladhäsionsfläche und Grauwerte auf EW17 (gefüllte Kreise) und Gold (offene Kreise).

Halbwertszeit von (37 ± 2) Minuten und einem Plateau von $(55 \pm 2)\%$. Nach 30 Minuten reduzierten die Zellen auf EW17-modifizierten Goldoberflächen ihre Adhäsionsfläche durchschnittlich auf 19,1% und konnten anschließend von den Oberflächen gespült werden (C). Auf der Kontrolloberfläche verringerten die Zellen die Adhäsionsfläche nach 30 Minuten lediglich auf 81% (D). Ein Ablösen durch Spülen war anschließend nicht möglich (F).

Neben der Verringerung der Zelladhäsionsfläche wurde auch die mittlere Helligkeit dieser Fläche ermittelt. Sie lieferte ein Maß über den relativen Abstand der Zelle zur Oberfläche innerhalb des evaneszenten Feldes. Ein Grauwert von 0 bedeutete einen direkten Zellkontakt. Der Hintergrund wurde auf den Grauwert 200 normiert. Dieser Wert zeigte demnach, dass kein Zellkontakt zur Oberfläche existierte. Die Messungen werden in Diagramm H zusammengefasst. Auch hier wurden die Mittelwerte jeder fünften Minute und die linear gefitteten und gewichteten Funktion der mittleren Helligkeit der Zelladhäsionsflächen auf EW17- (gefüllte Kreise, bzw. durchgezogene Linie) und auf Goldoberflächen (offene Kreise, bzw. gestrichelte Linie) dargestellt. Die relative Änderung, d. h. die Steigung der Geraden, unterscheidet sich in beiden Fällen nicht und liegt bei 0,2 Graustufen / min. Somit wurde die Adhäsionsfläche der Zellen auf EW17- und Goldoberflächen in 30 Minuten im Mittel um sechs Graustufen heller. Die Fibroblasten vergrößern also unabhängig von der thermo-responsiven Oberfläche ihren Abstand zur Oberfläche.

4.7.2 Zellablösung von MCF-7- und CHO-K1-Zellen auf P(MEO₂MA-co-OEGMA)

Da gezeigt werden konnte, dass verschiedene Zelltypen auf den thermo-responsiven Oberflächen unterschiedliche Ablösemechanismen während des Abkühlens an Raumtemperatur aufweisen (Kapitel 4.6), wurde die Zelladhäsion der Epithelzelllinien MCF-7 und CHO-K1 mit TIRAF-Mikroskopie näher untersucht. Die Zellen beider Linien konnten nach dem Abkühlen nur zum Teil von den EW17-modifizierten Goldoberflächen abgespült werden. Deshalb wurde im Folgenden der Ablösemechanismus abspülbarer und nicht abspülbarer Zellen eingehend untersucht. Die Zellablösung der U2OS-Knochenkrebszellen wurde nicht mit TIRAF-Mikroskopie untersucht, da die Adhäsionsfläche einzelner Zellen nicht von den umliegenden Zellen differenziert werden konnte.

Betrachten wir zunächst die MCF-7-Epithelzelllinie: Wie auch die L929-Maus-Fibroblasten hatten die MCF-7-Zellen eine initial kleinere Zelladhäsionsfläche auf EW17- $(360 \pm 30) \mu\text{m}^2$ als auf Goldoberflächen $(620 \pm 60) \mu\text{m}^2$. 78% ($n = 36$) der MCF-7-Zellen konnten von den thermo-responsiven Ober-

flächen nach dem Abkühlen abgespült werden (Abb. 4.15 A-C). Die restlichen Zellen verblieben nach dem Spülen auf den schaltbaren Oberflächen (D-F). Wurden die Zellen hinsichtlich der Reduktion (G) und der Änderung der mittleren Helligkeit (H) der Zelladhäsionsfläche untersucht, dann wurden bei beiden Parametern Unterschiede zwischen den ablösbaren und den verbleibenden Zellen festgestellt: Bei den abspülbaren MCF-7-Zellen wurde die Abnahme der Zelladhäsionsfläche aller Zellen mit einer exponentiellen Funktion gefittet und anschließend gewichtet. Die Analyse ergab eine Halbwertszeit von 8,5 Minuten und ein Plateau von $(75,9 \pm 0,2)\%$. Die Zunahme der mittleren Helligkeit der Zelladhäsionsfläche lag bei $(0,45 \pm 0,01)$ Graustufen / min. Bei den nicht abspülbaren Zellen wurde eine doppelt so hohe Halbwertszeit von (17 ± 2) Minuten und ein Plateau von $(79,0 \pm 0,6)\%$ ermittelt. Die mittlere Helligkeit nahm lediglich um $(0,22 \pm 0,02)$ Graustufen / min zu. Das heißt, nach 30 Minuten verringerten die abspülbaren Zellen die Zelladhäsionsfläche auf 78% und die mittlere Helligkeit der Adhäsionsflächen erhöhte sich um 13,5 Graustufen. Die nicht abspülbaren Zellen hingegen reduzierten nach 30 Minuten die Zelladhäsion auf 85,3%. Die Helligkeit der Adhäsionsfläche stieg nur um 6,6 Graustufen. Die ablösbaren Zellen unterscheiden sich demnach durch eine um 7,3% kleinere und rund sieben Graustufen hellere Zelladhäsionsfläche von den nicht abspülbaren.

Wir wenden uns nun der CHO-K1- Epithelzelllinie zu: Im Gegensatz zu den L929-Maus-Fibroblasten und den MCF-7-Epithelzellen konnte bei den CHO-K1-Epithelzellen (Abb. 4.16) die Verringerung der Adhäsionsfläche während des Abkühlens nicht mit einer exponentiellen Funktion gefittet werden. Stattdessen wurde eine lineare Funktion verwendet, um den Abfall bei abspülbaren und nicht abspülbaren Zellen miteinander zu vergleichen (D). Von den insgesamt 19 beobachteten CHO-K1-Zellen konnten 68% nach der Temperatursenkung von den thermo-responsiven Oberflächen durch Spülen abgelöst werden. Sie reduzierten bis dahin ihre Adhäsionsfläche um $(0,49 \pm 0,01)\%$ / min. Die Helligkeit der Zelladhäsionsfläche nahm um $(0,48 \pm 0,03)$ Graustufen / min zu. Die Zellen, die nach dem Spülen auf den Oberflächen zurückbleiben, verkleinern die Adhäsionsfläche nur um $(0,19 \pm 0,01)\%$ / min. Die Helligkeit stieg lediglich um $(0,32 \pm 0,02)$ Graustufen / min. Das bedeutet, dass nach 30 Minuten die Zelladhäsionsflächen ablösbarer Zellen auf durchschnittlich 85,3% sanken und die Helligkeit um 14,4 Graustufen stieg. Bei den verbleibenden Zellen sank die Fläche nur auf 94,3% und die Grauwerte wurden nur um 9,6 Stufen heller. Ablösbare CHO-K1-Zellen verkleinerten den Oberflächenkontakt demnach um 9% stärker als nicht ablösbare Zellen. Ihre Zelladhäsionsflächen wurden durchschnittlich um 4,8 Graustufen heller als die der nicht ablösbaren.

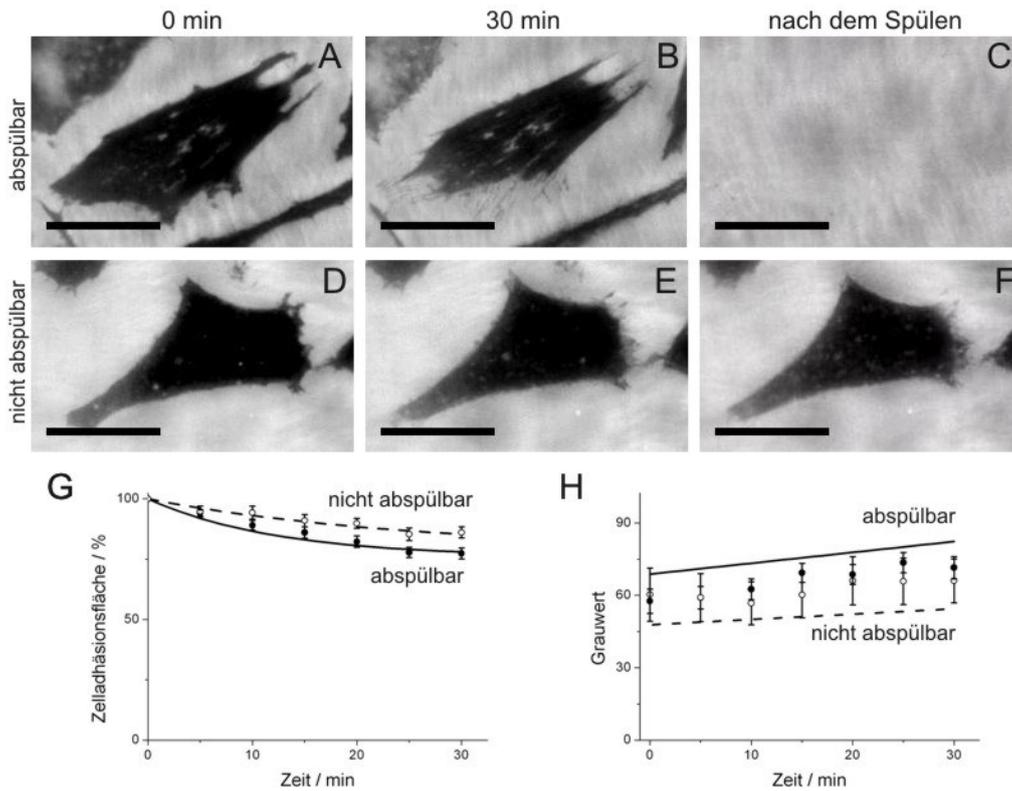


Abbildung 4.15: TIRAF-Aufnahmen von MCF-7-Brustkrebszellen auf einer EW17-modifizierten Goldoberfläche (A-C) und Gold (D-E) bei 37 °C (A,D), nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (30 min) (B,E) und nach leichtem Spülen (C,F). Maßbalken = 20 µm. (G,H) Quantitative Analyse der Zelladhäsionsfläche (G) und des mittleren Grauwerts der Zelladhäsionsfläche (H) basierend auf TIRAF-Messungen von MCF-7-Brustkrebszellen während der Temperatursenkung von 37 °C auf Raumtemperatur. Die Linien stellen die Kurven mit jenen Parametern dar, die sich bei gewichteter Mittelung der aus den Anpassungen der Einzelmessungen erhaltender Werte ergeben. (durchzogen: EW17-modifizierte Goldoberfläche, gestrichelt: Gold) Die Kreise zeigen alle fünf Minuten die ungewichteten Mittelwerte der Zelladhäsionsfläche und Grauwerte auf EW17 (gefüllte Kreise) und Gold (offene Kreise).

4. Ergebnisse

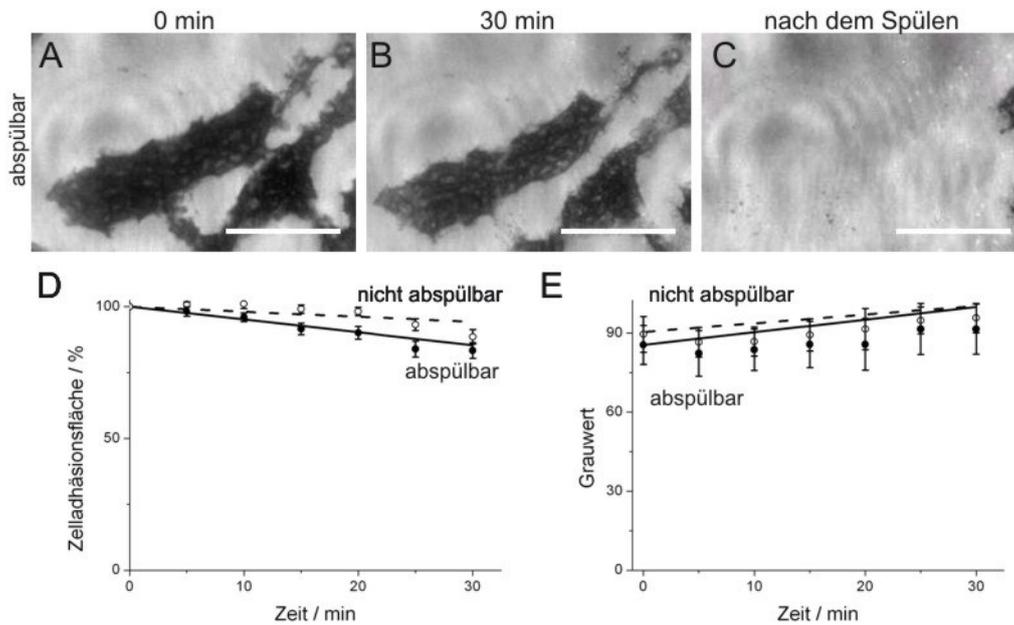


Abbildung 4.16: TIRAF-Aufnahmen von CHO-K1-Epithelzellen auf einer EW17-modifizierten Goldoberfläche (A-C) bei 37 °C (A), nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (30 min) (B) und nach leichtem Spülen (C). Maßbalken = 20 μm. (D,E) Quantitative Analyse der Zelladhäsionsfläche (D) und des mittleren Grauwerts der Zelladhäsionsfläche (E) basierend auf TIRAF-Messungen von CHO-K1-Epithelzellen während der Temperatursenkung von 37 °C auf Raumtemperatur. Die Linien stellen die Kurven mit jenen Parametern dar, die sich bei gewichteter Mittelung der aus den Anpassungen der Einzelmessungen erhaltender Werte ergeben. (durchgezogen: EW17-modifizierte Goldoberfläche, gestrichelt: Gold) Die Kreise zeigen alle fünf Minuten die ungewichteten Mittelwerte der Zelladhäsionsfläche und Grauwerte auf EW17 (gefüllte Kreise) und Gold (offene Kreise).

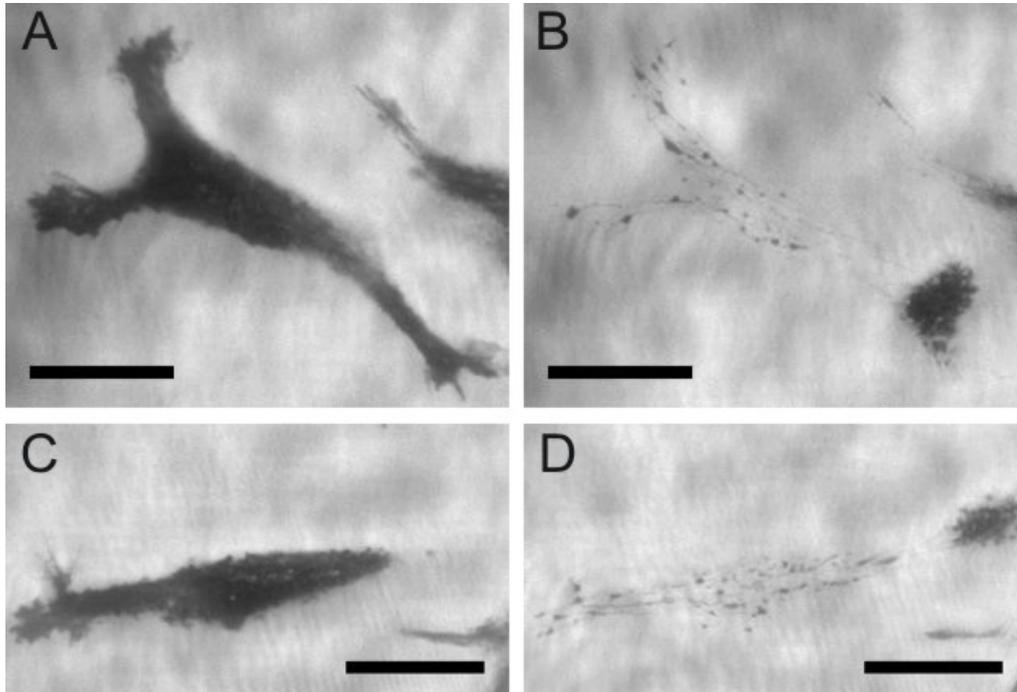


Abbildung 4.17: TIRAF-Aufnahmen von L929 Maus-Fibroblasten auf EW17 modifizierten Goldoberflächen bei 37 °C (A,C) und nach 30 Minuten bei Raumtemperatur (B,D). Die Zellen verlieren während der Zellablösung Material auf den thermo-responsiven Oberflächen. Maßbalken = 20 µm.

4.7.3 Zellspuren auf P(MEO₂MA-co-OEGMA)

Während der Untersuchung der Abnahme der Zelladhäsionsfläche auf den thermo-responsiven Oberflächen wurde beobachtet, dass die Zellen Material auf der Oberfläche hinterlassen (Abb. 4.17). Es handelte sich um Membranreste, die in einer verzweigten Struktur auf der Oberfläche vorlagen. Besonders an den Verzweigungen bildeten sich größere Areale von Membranresten, die als schwarze Flecken sichtbar wurden. Zwischen diesen Membranansammlungen bestanden dünne Verbindungen. Die Struktur der Membranreste änderte sich während des Beobachtungszeitraumes. Das hinterlassene Zellmaterial erinnert an Membranformationen, die als Zellspuren migrierender Zellen bekannt sind (siehe Kapitel 2.1). Die Positionen der Membranreste nach dem Schalten auf der thermo-responsiven Oberfläche entsprachen dem Adhäsionsmuster der Zellen. Migrierte die Zelle auf der „zellabweisenden“ Oberfläche, wurden keine weiteren Zellbestandteile auf den Oberflächen abgelegt (Abb. 4.17 D).

4.7.4 Zelladhäsionsfläche und Cytoskelettbestandteile von MCF-7-Zellen

Um den Mechanismus der zellablösenden Eigenschaften der thermo-responsiven Oberflächen besser zu verstehen, wurde parallel zur Zelladhäsionsfläche der Cytoskelettbestandteil Aktin untersucht. Die MCF-7-Brustkrebszellen wurden dazu mit einem Vektor transient transfiziert, der die genetische Information eines Fusionsproteins aus humanem β -Aktin und EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) trägt. Durch Zugabe eines polaren, roten Farbstoffes konnten simultan TIRF-Information des Aktins und TIRAF-Information der Zelladhäsionsfläche dokumentiert werden (Abb. 4.18). Viele MCF-7-Zellen zeigten, wie schon zuvor dokumentiert, während der Temperatursenkung kaum Änderungen in der Zelladhäsionsfläche. Auch die Aktinfasern änderten sich nur geringfügig. An den Enden, an denen die Zelle die Zelladhäsionsfläche um einige Mikrometer reduzierte, wurden gleichzeitig die Aktinfasern von außen nach innen abgebaut. Eine Beeinflussung des Aktins im Zentrum der Zelle wurde nicht festgestellt. In Abb. 4.18 ist eine MCF 7-Zelle dargestellt, die im Gegensatz zu den anderen Brustkrebszellen ein Zellablösungsverhalten wie das von L929-Maus-Fibroblasten zeigt. Die initiale Zelladhäsionsfläche von $470 \mu\text{m}^2$ verringerte sich nach 30 Minuten auf $65 \mu\text{m}^2$ (das heißt auf 14%). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Aktinfasern innerhalb dieser 30 Minuten wieder von außen nach innen abgebaut wurden (Abb. 4.18 2a,b). Am Ende konnte nur noch eine Aktinfaser beobachtet werden. Die restlichen Fasern wurden entweder depolymerisiert oder befanden sich oberhalb der Reichweite des evaneszenten Feldes. Während des Spülens löste sich die Zelle und hinterließ die schon zuvor beschriebenen Membranrückstände auf der Oberfläche (Abb. 4.18 1e). In der TIRF-Mikroskopaufnahme konnte in diesen Membranresten Aktin nachgewiesen werden (Abb. 4.18 2e).

4.7.5 Untersuchung der Zelladhäsionsfläche während des Trypsinierens

Um die verbreitete enzymatische Methode mit den thermo-responsiven Oberflächen zu vergleichen und den Zellablösungsmechanismus besser zu verstehen, wurden TIRAF-Mikroskopieaufnahmen während des Trypsinierens von L929-Maus-Fibroblasten durchgeführt. Die Messungen ergaben, dass die Funktionalität des Trypsins durch die Prozedur der TIRAF-Mikroskopie beeinflusst wurde. Das Trypsin konnte innerhalb des belichteten Bildausschnitts nur eingeschränkt die Zellabrundung herbeiführen. D. h. die Zelladhäsionsfläche der belichteten Zellen wurde nur begrenzt reduziert (Abb. 4.19). Im Ge-

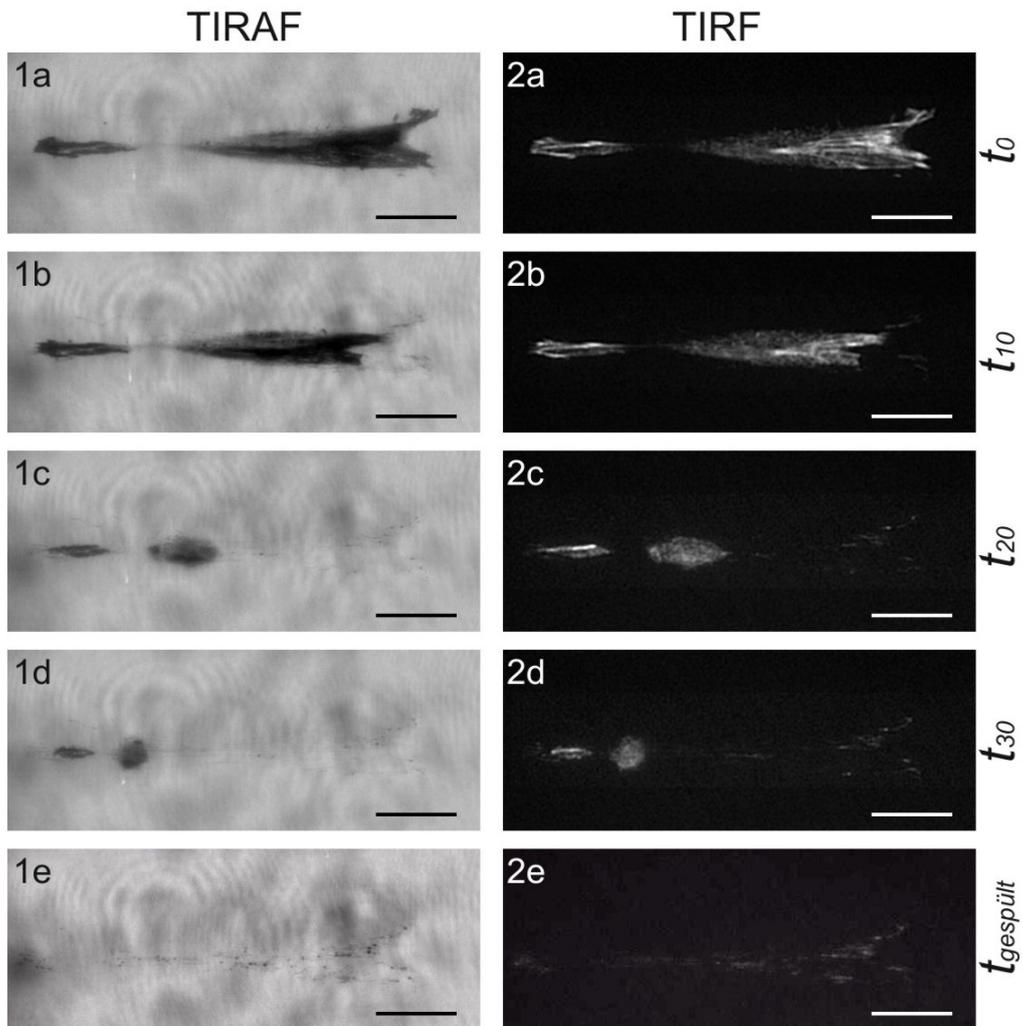


Abbildung 4.18: TIRAF- (1a-e) und TIRF-Aufnahmen (2a-e) EGFP-Aktin-transfizierter MCF-7-Brustkrebszellen auf EW17-modifizierter Goldoberfläche während Temperatursenkung von 37 °C (a) auf Raumtemperatur, nach 10 Minuten (b), 20 Minuten (c) und 30 Minuten (d). Nach dem Abkühlen wurden die Zellen durch Spülen entfernt (e). Die zurückgebliebenen Zellspuren enthielten Cytoskelettbestandteile (2e). Maßbalken = 20 µm.

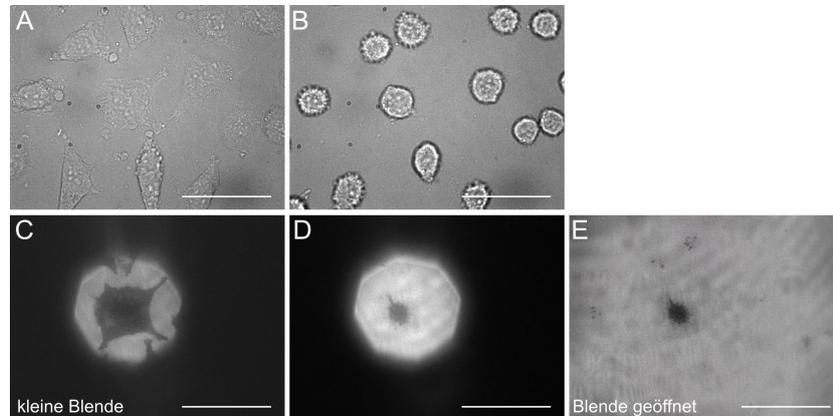


Abbildung 4.19: Durchlichtaufnahmen (A,B) und TIRAF-Aufnahmen (C-E) von L929-Maus-Fibroblasten vor dem Trypsinieren (A,C) und nach fünf Minuten Trypsinieren (B,D). Die TIRAF-Aufnahmen wurden mit einer kleinen Blende aufgenommen, um nur eine der Zellen dem evaneszenten Feld auszusetzen. Anschließend wurde die Blende geöffnet (E).

gensatz dazu wurden bei Durchlichtaufnahmen keine Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Bereichen festgestellt. In beiden Bereichen hatten die Zellen nach fünf Minuten eine runde Morphologie (Abb. 4.19 A,B). Vergleicht man die Adhäsionsfläche der im TIRAF-Mikroskop belichteten und unbelichteten Zellen, nahmen die belichteten Fibroblasten nach fünf Minuten Trypsineinwirkung eine Adhäsionsfläche von ungefähr $(110 \pm 8) \mu\text{m}^2$, also rund 13% der durchschnittlichen Adhäsionsfläche auf Gold, ein (Abb. 4.19 E). Die Adhäsionsflächen unbelichteter Zellen reduzierten sich hingegen auf rund 1%. Nach fünf Minuten Trypsineinwirkung konnten lediglich jene Zellen von den Oberflächen gespült werden, die nicht dem evaneszenten Feld ausgesetzt gewesen waren.

Um die Ursache der eingeschränkten Adhäsionsflächenabnahme zu finden, wurde folgende Kontrollexperimente unter verschiedenen Konfigurationen durchgeführt. Epifluoreszenz beeinflusste die Trypsinierung der Zellen gleichermaßen mit und ohne Farbstoff. Wurden die Zellen ohne Fluoreszenzfarbstoff dem evaneszenten Feld während der Enzymwesenheit ausgesetzt, wurde die Zelladhäsionsabnahme nicht beeinflusst und die Zellen rundeten sich vollständig ab. Wurde die Adhäsionsfläche der Zellen in Zellmedium mit Fluoreszenzfarbstoff visualisiert, anschließend die Zellen ohne Beobachtung trypsiniert und danach wieder die Zelladhäsionsflächen mittels Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht, wurde eine deutlich größere, verbleibende Fläche gemessen als bei Zellen, deren Zelladhäsionsflächen erst nach der Trypsinierung sichtbar gemacht wurden. Da der Effekt der eingeschränkten Zellad-

4. Ergebnisse

häsionsabnahme nicht verhindert werden konnte, wurden ausschließlich die terminalen Zelladhäsionsflächen nach fünf Minuten Zelltrypsinierung für die Auswertung dokumentiert. Die durchschnittlich verbliebene Zelladhäsionsfläche von L929-Mausfibroblasten betrug nach der fünfminütigen Trypsininkubation lediglich 1% (siehe oben) der durchschnittlichen initialen Adhäsionsfläche.

5 Diskussion

Ein wesentlicher Aspekt bei der Zellkultivierung ist die Notwendigkeit der Zellablösung, die bislang über einen sehr schonungslosen Einsatz von Proteasen durchgeführt wird. Die Idee, die Zellen hingegen über die Änderung der Zelladhäsionseigenschaften zu steuern, ist nicht neu. Es existieren zahlreiche Publikationen über die Kontrolle der Zelladhäsion verschiedener Zelllinien auf dem thermo-responsiven Polymer PNiPAAm. Inzwischen ist sogar ein kommerzielles Produkt auf dem Markt, das genau die angestrebte Nische bedient. Jedoch ist der Nutzen dieser Oberflächen limitiert, wenn stark adhärenente Zellen von den Zellkultursubstraten abgelöst werden sollen. Die Suche nach alternativen thermo-responsiven Polymeren, die durch höhere strukturelle Flexibilität eine Steuerung der Zelladhäsion möglichst aller Zelllinien zulassen, ist noch immer dringend geboten.

Das Polymer P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) verbindet die thermo-responsiven Eigenschaften des Polymers PNiPAAm und die zellabstoßenden Eigenschaften von PEG. Aus diesem Grund wurde das Potential dieses Polymers als sehr hoch eingeschätzt und im Rahmen dieser Arbeit auf seine möglichen Anwendungen hin untersucht. Ein wesentlicher Bestandteil war dabei die Untersuchung des Zellverhaltens, wie die Zellverträglichkeit, Zellausbreitungszeit und Zellablösungseffizienz, auf den neuen Polymeren. Um die Oberflächen zu optimieren und den Zellablösungsmechanismus besser zu verstehen, wurden verschiedene Methoden etabliert, um die Zellvorgänge genauer zu studieren. Dazu gehörte die TIRAF-Mikroskopie, die hoch aufgelöste Information über die Zellkontaktfläche auf thermo-responsiven Oberflächen erlaubt. In Kombination mit der Darstellung markierter Aktinfasern mittels TIRF-Mikroskopie wurde die Wechselbeziehung der Zelladhäsionsfläche und des Aktincytoskeletts gezeigt. Somit ist erstmalig die Untersuchung der Dynamik der Zellablösung für verschiedene Zelltypen auf thermo-responsiven Oberflächen möglich. Darüber hinaus wurden Methoden für eine Charakterisierung der thermo-responsiven Polymere verwendet, um z. B. die Belegungsdichte der Polymere und die Benetzbarkeit der Oberflächen zu bestimmen. Die Korrelation der Oberflächenbenetzbarkeit mit der Zelladhäsion ist allerdings nur scheinbar

und bedarf einer kritischen Interpretation, die im nächsten Abschnitt erfolgt.

5.1 Zusammenhang zwischen Zelladhäsion und Benetzbarkeit

Die Wechselwirkung von Proteinen und Zellen mit Oberflächen spielt in vielen Anwendungsgebieten der Biotechnologie und Bioanalytik eine wesentliche Rolle. Die Oberflächeneigenschaften beeinflussen die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen und dadurch auch die Zelladhäsion. Diese Eigenschaften werden durch Oberflächenmodifikationen gezielt variiert, um künstliche Materialien in biologischen Umgebungen durch gezielte Proteinadsorption zu integrieren oder durch das Unterbinden der Proteinadsorption „unsichtbar“ zu machen. Die Oberflächenmodifikationen wirken sich zum Einen auf die Benetzbarkeit der Oberfläche, also die Änderung des Kontaktwinkels, und zum Anderen auf die Proteinadsorption und die anschließende Zelladhäsion aus. Um die Protein- und Zellwechselwirkung vorherzusagen und zu analysieren, wurde in zahlreichen Veröffentlichungen die Zelladhäsion mittels verschiedener Grenzflächenmodifikationen variiert und mit der Oberflächenbenetzbarkeit verglichen. Durch diese Vereinfachung entstanden teilweise konträre Hypothesen über Kontaktwinkelbereiche, die die Zelladhäsion vermitteln oder verhindern [43–46]. Da die Oberflächeneigenschaften wesentlich durch die Art der Oberflächenmodifikation, die funktionellen Gruppen, deren Kopplungsdichte und die Oberflächenrauigkeit bestimmt werden [47], können die Kontaktwinkel bei verschiedenen modifizierten Oberflächen nicht sinnvoll miteinander verglichen werden.

Ein Beispiel für die Hypothese des Zusammenhangs zwischen Kontaktwinkel und Zelladhäsion wird immer wieder anhand des etablierten thermo-responsiven Polymers PNiPAAM beschrieben. Dieses besteht aus hydrophilen Aminogruppen und hydrophoben Isopropylgruppen. Steigt die Umgebungstemperatur über seine LCST, werden die hydrophilen Seitenketten durch die hydrophoben Seitenketten von der wässrigen Umgebung abgeschirmt. Dies wird durch den Anstieg des Kontaktwinkels auf einer PNiPAAM-modifizierten Oberfläche bestätigt [48]. Verschiedene Zelltypen adhärieren auf kollabierten hydrophoben PNiPAAM-Oberflächen. Sinkt die Temperatur unter die LCST, verringert sich die Zelladhäsion auf den nun hydrophil gewordenen Oberflächen und die Zellen können von ihnen abgespült werden. D. h., auch hier wurde in unabhängig voneinander gewonnene experimentelle Beobachtungen ein kausaler Zusammenhang zwischen der Benetzbarkeit und der Zelladhäsion hineininterpretiert.

In dieser Arbeit wurde ein neues thermo-responsives Polymer P(MEO₂MA-

co-OEGMA) über die Chemisorption einer Disulfidgruppe auf goldbeschichteten Deckgläsern immobilisiert und charakterisiert. Das thermisch schaltbare Polymer besteht aus unterschiedlich langen PEG-Ketten, die büstenartig über ein apolares Polymerrückgrat miteinander verbunden sind. Werden die Kontaktwinkel auf verschiedenen P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierten Goldoberflächen über und unter der Phasenübergangstemperatur gemessen (siehe Kapitel 4.1.1), kann keine Änderung des Kontaktwinkels festgestellt werden. D. h., dass die polaren Polymerseitenketten wahrscheinlich in gestreckten und kollabierten Konformationen an der Oberfläche exponiert sind. Es ändert sich lediglich die Wechselwirkung auf molekularer Ebene zwischen den gebundenen Wassermolekülen und den Polymerseitenketten, indem die Wasserstoffbrücken bei Temperaturerhöhung gelöst werden. Auf der makroskopischen Ebene ändert sich die Benetzbarkeit der Oberfläche hingegen nicht. Allerdings konnte die Zelladhäsion von L929-Mausfibroblasten über die Senkung der Temperatur gesteuert werden (siehe Kapitel 4.1.3). Die Zellen reduzierten den Oberflächenkontakt infolge einer Temperatursenkung von 37 °C Zellkulturtemperatur auf Raumtemperatur, indem sich 95% der Zellen nach 30 Minuten abrundeten.

Auf diesen thermo-responsiven Oberflächen wurde kein Zusammenhang zwischen den Kontaktwinkeln und der Temperatur festgestellt, dennoch konnte die Zelladhäsion gesteuert werden. Somit wurde hier der eindeutige Beweis erbracht, dass die Benetzbarkeit und die Steuerung der Zelladhäsion nicht direkt voneinander abhängig sind. Die neuartigen thermo-responsiven Polymeroberflächen ermöglichen also die Untersuchung der Zelladhäsion, ohne die Zellen dabei zusätzlich durch die Änderung der Benetzbarkeit zu beeinflussen.

Mögliche Gründe für den plötzlichen Wechsel der Zelladhäsionseigenschaften auf thermo-responsiven Oberflächen können von den Hypothesen der ursächlichen protein- und zellabweisenden Eigenschaften von PEG-Oberflächen abgeleitet werden (siehe Kapitel 4.2). Laut Gombotz et al. sind diese Eigenschaften unter anderem durch die Mobilität der PEG-Ketten und der Hydrathülle, die durch die Bevorzugung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasser und dem Polymer entsteht, begründet. Die PEG-Ketten des thermo-responsiven Polymers haben unter der Phasenübergangstemperatur die von Gombotz et. al. beschriebenen Eigenschaften des PEG: Die Polymerketten können sich frei bewegen und werden von Hydrathüllen umgeben. Steigt die Temperatur über die Phasenübergangstemperatur, werden die Wasserstoffbrückenbindungen zu den umgebenden Wassermolekülen und somit die Hydrathülle aufgelöst. Des Weiteren ist die Wechselwirkung zwischen den Molekülketten so stark, dass die PEG-Ketten kollabieren und dadurch ihre Mobilität stark eingeschränkt wird. Durch das Fehlen der Hydrathülle und

die Fixierung der Polymerketten wird schließlich die Proteinwechselwirkung über Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht.

5.2 Zellausbreitungszeit und deren Optimierung

Die Zellen benötigen auf den thermo-responsiven Oberflächen für die Zellausbreitung durchschnittlich fünf Tage (siehe Kapitel 4.1.3). Da die Zelladhäsion durch die Proteinadsorption erheblich beeinflusst wird, vermitteln die adsorbierten Proteine die anschließende Zelladhäsion anscheinend nicht optimal. Möglicherweise ist die Adsorption zelladhäsionshemmender Proteine im Vergleich zu der zelladhäsionsfördernder Proteine größer. Eine andere Vermutung ist der Verbleib einer zu hohen Polymerkettenmobilität auch oberhalb der Phasenübergangstemperatur, die die Adsorption zelladhäsionsfördernder Proteine verzögert. Um die Zellausbreitungszeit zu reduzieren, wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen mit dem Ziel durchgeführt, die Oberflächeneigenschaften zu optimieren. Die Modifikation erfolgte durch I. die Verwendung unterschiedlicher Beschichtungskonzentrationen während der Probenpräparation, II. die strukturelle Variation der thermo-responsiven Polymere, III. die anschließende Beschichtung schaltbarer Polymeroberflächen mit dem zelladhäsionsvermittelnden Protein Fibronectin und IV. die Coadsorption thermo-responsiver Polymere mit zelladhäsionsfördernden Peptiden.

I. Variation der Beschichtungskonzentration

Durch die Variation der Beschichtungskonzentration wurde die Dichte der immobilisierten thermo-responsiven Polymere (EW17) auf den Goldoberflächen gesteuert. Diese beeinflusste die Zellausbreitungszeit (siehe Kapitel 4.2.1). Im Extremfall niedriger Konzentrationen (50 nM) war die Beschichtung unzureichend (Daten nicht gezeigt). Hier verhielten sich die Zellen wie auf unbeschichteten Goldoberflächen: Sie breiteten sich innerhalb eines Tages auf den Oberflächen aus, aber lediglich 20% der Zellen rundeten sich ab. Mit steigender Konzentration der Beschichtungslösung erhöhten sich die Packungsdichte der Polymere und auch die Zellausbreitungszeit. Durch weitere Erhöhung der Packungsdichte verkürzte sich die Zellausbreitungszeit allerdings wieder. D. h., es existiert ein Pessimum der Zellausbreitungszeit in Abhängigkeit von der Packungsdichte des EW17. Die kürzere Zellausbreitungszeit bei hohen Packungsdichten könnte mit der größeren molekularen Interaktion benachbarter Polymere in Zusammenhang stehen. Diese steigen mit wachsender Belegungsdichte an und könnten dadurch die Molekülkonformation wesentlich beeinflussen. Eine geänderte Anordnung der

Polymerketten bietet vermutlich mehr Möglichkeiten der Ausbildung von Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten und zelladhäsionsfördernden Proteinen.

Die Belegungsdichte des Polymers wurde anhand der Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz bei Immobilisierung des thermo-responsiven Polymers EW17 mit einer Konzentration der Beschichtungslösung von 50 μM abgeschätzt (siehe Kapitel 4.1.2). Unter der Annahme eines Brechungsindex von 1,5 für das PEG-basierende Polymer wurde die mittlere Schichtdicke d von EW17 berechnet (4,5 nm). Für die Abschätzung der molekularen Dichte ist die Kenntnis des Brechungsindexinkrements notwendig. Das Brechungsindexinkrement gibt an, wie der Brechungsindex von der Konzentration des untersuchten Stoffes abhängt: dn/dc . Da dieser Wert für das neue Polymer nicht bekannt ist, wurde das Brechungsindexinkrement von PEG (0,13 cm^3/g), dem Hauptbestandteil des Polymers, verwendet [49, 50]. Nun kann die Massendichte c berechnet werden:

$$c = \frac{n_{\text{layer}} - n_{\text{medium}}}{\frac{dn}{dc}} = 1,077 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \quad (5.1)$$

um anschließend die Massenbelegung Γ

$$\Gamma = d \cdot c = 4,85 \cdot 10^{-7} \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \quad (5.2)$$

und die molekulare Dichte N_{mol}

$$N_{\text{mol}} = \frac{\Gamma}{\frac{Mw}{N_A}} = 0,232 \frac{1}{\text{nm}^2} \quad (5.3)$$

mit der Avogadro-Konstanten N_A und der molaren Masse Mw zu bestimmen. Die Fläche, die ein Molekül EW17 einnimmt, beträgt also ungefähr 4,3 nm^2 . Unter der Annahme des für die Berechnung des Trägheitsradius R_g gültigen Modells misst R_g des Polymerrückgrats ca. 0,8 nm [36]. Somit hat jedes Polymerrückgrat ohne Seitenketten einen Wirkungskreis von 2 nm^2 . Die Länge des Rückgrats beträgt im ausgestreckten Zustand rund 18 nm. Das Monomer OEGMA nimmt im ausgestreckten Zustand eine Länge von 3,5 nm ein. Da P(MEO₂MA-co-OEGMA) ein Bürstenpolymer ist und sich die PEG-Ketten vom Rückgrat aus ins Medium strecken, erhöht sich der Wirkungskreis des Polymers um die Kettenlänge des OEGMAs auf maximal 5,5 nm^2 . Das bedeutet, dass bei dieser Belegungsdichte (4,3 nm / Molekül) durchaus intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Polymeren auftreten, die eventuell eine Änderung der Polymerkonformation hervorrufen und die Zelladhäsion fördern. Cole et al. skizziert für das thermo-responsive

Polymer PNiPAAm ein solches Szenario in einem etwas anderen Zusammenhang (Abb. 5.1). Ist die Oberflächenbelegung so gering, dass der Abstand der Polymere größer ist als ihr Trägheitsradius, können die Polymerketten nur intramolekular miteinander wechselwirken. Steigt die Belegungsdichte an und der Abstand der Polymere ist geringer als der Trägheitsradius, dann ändern sich die Anordnung der Polymerketten und gegebenenfalls die Oberflächeneigenschaften. Das bedeutet, mit steigender Konzentration der Beschichtungslösungen steigt die Belegungsdichte der immobilisierten thermo-responsiven Polymere auf der Oberfläche an. Bei sehr geringen Belegungsdichten können große Proteine wie Fibronectin partiell zwischen den Polymeren adsorbieren und vermitteln dadurch eine schnellere Zelladhäsion. Werden diese Zwischenräume kleiner, können die zelladhäsionsvermittelnden Proteine nur noch auf dem kollabierten thermo-responsiven Polymer adsorbieren. Da diese Fibronectin-Polymerwechselwirkung nicht so stark ist wie zum Beispiel die Wechselwirkung von Fibronectin mit einer reinen Goldoberfläche, erhöht sich die Zellausbreitungszeit. Wird die Packungsdichte weiter erhöht, verändert sich die Konformation der Polymere aufgrund der intermolekularen Wechselwirkungen und die Exposition der PEG-Seitenketten wird gesenkt. Dieses Argument steht aber im Widerspruch zu den Kontaktwinkelmessungen, die keine Änderung der Exposition der PEG-Seitenketten infolge der Konformationsänderung durch einen Temperaturshift vermuten lassen. Möglicherweise wurde durch die höhere Belegungsdichte die Kettenmobilität weiter herabgesetzt. Dadurch wird die Adsorption zelladhäsionsfördernder Proteine beschleunigt und so die Zellausbreitungszeit verringert.

Die hohe Abrundungseffizienz der Zellen auf den EW17-modifizierten Oberflächen wurde durch die Variation der Beschichtungskonzentration in dem hier untersuchten Rahmen nicht beeinflusst. Also können die PEG-Seitenketten trotz der hohen Dichte des thermo-responsiven Polymers EW17 auf der Oberfläche ausreichend hydratisieren.

II. Strukturvariation der thermo-responsiven Polymere

Die vorhergehenden Ergebnisse legen nahe, dass die Konformation des kollabierten thermo-responsiven Polymers eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Zelladhäsion spielt. Deshalb wurden thermo-responsive Polymere unterschiedlicher Architektur synthetisiert (Fraunhofer-IAP) und gleichzeitig verschiedene Phasenübergangstemperaturen geschaffen, um den Effekt auf die Zellausbreitungszeit und die Abrundungseffizienz bei unterschiedlichen Beschichtungskonzentrationen zu untersuchen (siehe Kapitel 4.2.1). Die Polymere EW17 und AH90 bestehen aus den gleichen Monomerketten (MEO₂MA und OEGMA 475) in unterschiedlichen Verhältnissen, um die LCST von 37,5 °C auf 40,4 °C zu verschieben. EW17 besteht aus

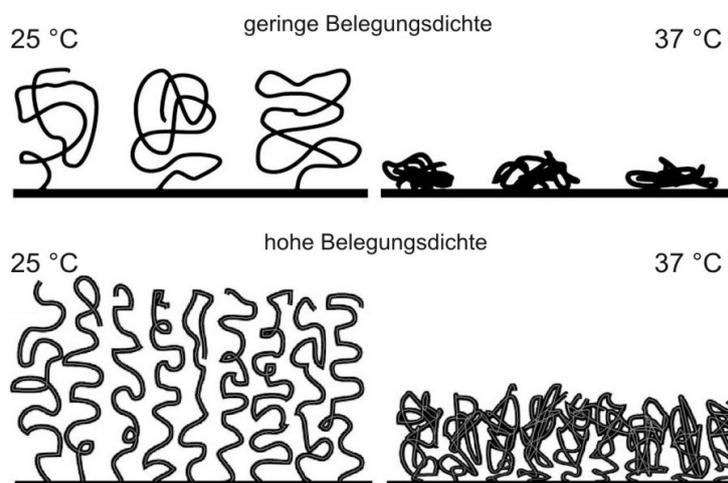


Abbildung 5.1: Schema immobilisierter Polymerketten mit zwei unterschiedlichen Belegungsdichten im hydratisierten (25 °C) und dehydratisierten Zustand (37 °C) (modifiziert [25]).

insgesamt 57 und AH90 aus 44 Monomerketten. Das Polymer AL57 besteht aus den Monomerketten MEO2MA und OEGMA 300, hat eine LCST von 30,3 °C und besitzt ca. 59 Monomerketten. Aufgrund des kürzeren OEGMAS (1,6 nm anstatt 3,5 nm im gestreckten Zustand), hat AL57 ein geringeres Volumen als die beiden anderen Polymere. Die Phasenübergangstemperaturen liegen effektiv alle zwischen Raumtemperatur und Zellkulturtemperatur, da sich die Phasenübergangstemperatur im Zellmedium noch um ungefähr 4 °C nach unten verschiebt.

Der Zusammenhang zwischen Beschichtungskonzentration und Zellausbreitungszeit ist auf EW17- und AH90-modifizierten Goldoberflächen ähnlich. Die Zellen adhären jedoch auf den AH90-Oberflächen ein bis zwei Tage schneller als auf den EW17-Oberflächen. Die Konformation des kürzerkettigen Polymers AH90 scheint die Zelladhäsion zu verbessern. Mit steigender Beschichtungskonzentration sinkt jedoch auf den AH90-Oberflächen die Zellabrundungseffizienz (ab 50 μM). Die Polymerketten können anscheinend bei Raumtemperatur nicht mehr in den gestreckten Zustand übergehen, um dadurch die Zellablösung zu induzieren. Eventuell ist die Belegungsichte der Polymere so hoch, dass die Hydratisierung der PEG-Seitenketten aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist. Anders verhält sich das Polymer AL57. Hier steigt die Zellausbreitungszeit mit steigender Beschichtungskonzentration immer weiter an, bis die Zelladhäsion im Beobachtungszeitraum schließlich ganz ausbleibt. Ein Abfall der Zellausbreitungszeit war in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht festzustellen. Dies könnte mit dem

geringen Volumen aufgrund der kürzeren Seitenketten im Zusammenhang stehen: Auf der Goldoberfläche kann aufgrund des geringeren Molekülvolumens eine höhere Dichte von AL57-Molekülen als von EW17- oder AH90-Molekülen erreicht werden, bis intermolekulare Kräfte zwischen den einzelnen Polymeren auftreten. Daher müssen wahrscheinlich höhere Konzentrationen der Beschichtungslösung eingesetzt werden, um ein Absenken der Zellausbreitungszeit zu erzielen. Auf den AL57-modifizierten Oberflächen wurden die besten und die schlechtesten Ergebnisse bezüglich der Zellausbreitungszeit beobachtet: Die kürzeste Zellausbreitungszeit von ein bis zwei Tagen wurde bei der niedrigsten Beschichtungskonzentration beobachtet. Die Oberflächen mit der höchsten Beschichtungskonzentration vermittelten hingegen gar keine Zelladhäsion. Das bedeutet, dass L929-Mausfibroblasten auf diesem thermo-responsiven Polymer empfindlicher auf Konzentrationsvariationen der Beschichtungskonzentrationen reagieren, als auf den beiden anderen Polymeren.

Durch die Verwendung strukturell verschieden aufgebauter thermo-responsiver Polymere wurde gezeigt, dass die Zellausbreitungszeit über die Architektur des Polymers gesteuert werden kann. Eine fast hundertprozentige Zellabrundung trat auf nahezu allen thermo-responsiven Oberflächen bei bestimmten Konzentrationen der Beschichtungslösungen auf. Die Zellausbreitungszeit konnte hingegen nicht auf unter einen Tag gesenkt werden. Nutzt man die Ergebnisse dieses Experiments, so könnte das Zellverhalten im Weiteren durch die Schaffung eines neuen thermo-responsiven Polymers optimiert werden. Aus den vorhergehenden Schlussfolgerungen ist die Ableitung nachstehender Empfehlungen möglich: Um die Unempfindlichkeit der Zellabrundungseffizienz gegenüber der Beschichtungskonzentration beizubehalten, empfiehlt sich die Orientierung am EW17-Polymer. Da die kürzere Kettenlänge von AH90 für die geringere Zelladhäsionszeit verantwortlich sein könnte, sollte die Kettenlänge nochmals reduziert, aber die molekulare Zusammensetzung von EW17 beibehalten werden, um die LCST zu erhalten. Die Anzahl der Monomereinheiten N könnte z. B. halbiert werden, um die möglichen Freiheitsgrade weiter einzuschränken. Der Trägheitsradius wird dadurch gering beeinflusst, da die Monomeranzahl dazu nur mit $\sqrt{N}/6$ beiträgt. Die Kettenlänge kann jedoch andererseits auch nicht beliebig verkleinert werden, da das Verhältnis von 91,5% MEO₂MA und 8,5% OEGMA eingehalten werden muss, um die LCST zu bewahren.

III. Einfluss des zelladhäsionsfördernden Proteins Fibronektin

In der Theorie ist die Zelladhäsion auf dafür geeigneten Oberflächen eine Folge der Proteinadsorption. Dabei spielt das Konzentrationsverhältnis der

verschiedenen in Medium enthaltenen Serumproteine eine entscheidende Rolle (siehe Kapitel 2.1). Die Gründe für die oberflächenvermittelte Zelladhäsion werden in den meisten Fällen durch die Adsorptionskonkurrenz der Proteine Albumin und Fibronectin beschrieben [14, 45, 51, 52]. In der Literatur wurde eine Korrelation der Fibronectinadsorption bzw. Albuminadsorption an zelladhäsionsvermittelnden und zelladhäsionsvermeidenden Oberflächen gezeigt. Die Konkurrenzsituation der im Serum befindlichen Proteine wird vermieden, wenn die Oberflächen initial mit Fibronectin beschichtet werden, bevor sie mit Serum in Kontakt kommen.

Im folgenden Abschnitt wird die Adsorption von Fibronectin auf den PEG-basierten Oberflächen untersucht. Die Wechselwirkung mit Fibronectin wurde indirekt über die Messung des prozentualen Anteils ausgebreiteter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (siehe Kapitel 4.2.2). Nach der Adsorption einer gering konzentrierten Fibronectinlösung ($0,1 \mu\text{g} / \text{ml}$) reduzierte sich die Halbwertszeit der Zelladhäsion auf 1,6 h. Sie lag somit weit unter der Halbwertszeit der thermo-responsiven Oberflächen ohne Fibronectinbeschichtung. Darüber hinaus ist diese Halbwertszeit vergleichbar mit der Halbwertszeit der Zelladhäsion auf unbeschichtetem Glas (siehe Kapitel 4.2.3). Über die zusätzliche Adsorption Fibronectins aus gering konzentrierten Lösungen wurde demnach die Zellausbreitungszeit in einen für die Zellkultur angemessenen Bereich gesenkt. Die Abrundungseffizienz wurde durch die geringe Belegungsdichte des Fibronectins nicht nachteilig beeinflusst und war vergleichbar mit der Abrundungseffizienz der thermo-responsiven Oberfläche ohne zusätzliche Fibronectinadsorption.

Die Fibronectinadsorption auf den thermo-responsiven Oberflächen aus höher konzentrierten Lösungen verkürzte zwar nochmals die Halbwertszeit der Zelladhäsion, aber die oberflächenvermittelten Zellabrundungseffizienzen unterschieden sich kaum von den fibronectinbeschichteten Glasoberflächen. Sie lagen im Bereich der unspezifischen, allein durch den Temperaturunterschied induzierten Zellabrundung (Vergleich Kapitel 4.1.3). Das hochkonzentriert adsorbierte Fibronectin schirmt demnach die thermo-responsiven Oberflächen vollständig von den Zellen ab.

Demzufolge konnte hier die Zellausbreitungszeit durch die gezielte Beschichtung erfolgreich mit einer bestimmten Fibronectinkonzentration gesenkt werden, ohne dabei die Abrundungseffizienz negativ zu beeinflussen. Fibronectin adsorbiert auf den thermo-responsiven Oberflächen, wenn die Adsorptionskonkurrenz durch z. B. Albumin ausgeschlossen werden kann. Jedoch muss die Höhe der Proteinkonzentration beachtet werden, da eine zu hohe Packungsdichte auf den thermo-responsiven Oberflächen die protein- und zellabweisende Wirkung unterbindet.

IV. Coadsorption thermo-responsiver Polymere und zelladhäsionsfördernder Peptide

Zellen können durch gezielte Wechselwirkungen über verschiedene Signale, die z. B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung oder Zellausbreitung auslösen, adressiert werden. Handelt es sich um eine zellrezeptorbasierende Kommunikation, können die Signale auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Bei Zell-Oberflächenkontakt binden die Rezeptoren an die Signalmoleküle, und intrazelluläre Signalkaskaden werden aktiviert. Die Steuerung des Zell-Oberflächen-Kontakts über die Konformation der thermo-responsiven Polymere könnte so verschiedene Signale „sichtbar“ oder „unsichtbar“ machen. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur liegen die thermo-responsiven Polymere als komprimierte Knäuel auf der Oberfläche vor. Werden gleichzeitig Signalmoleküle adsorbiert, so sind diese daher für die Rezeptoren der Zellen zugänglich. Sinkt die Temperatur unter die Phasenübergangstemperatur, dann werden die Polymere hydratisiert und nehmen durch die Konformationsänderung mehr Volumen auf der Oberfläche ein. Über die Steuerung der Konformation wird also die Zugänglichkeit der Liganden und somit die Signalübertragung gelenkt. Durch die Einbettung zelladhäsionsfördernder Signalpeptide wie RGD, mittels Coadsorption mit thermo-responsivem Polymer könnte zum Beispiel die unspezifische Zelladhäsion in eine spezifische Zelladhäsion umgewandelt werden. Die Integrinrezeptoren binden dann nicht mehr indirekt über zelladhäsionsfördernde Proteine auf der thermo-responsiven Oberfläche, sondern direkt an die Signalpeptide RGD. In diesem Fall müsste eine deutlich schnellere Zelladhäsion stattfinden.

Tatsächlich wurde die Zellausbreitungszeit auf mit EW17 und RGD coadsorbierten Oberflächen bei steigendem RGD-Gehalt gesenkt (siehe Kapitel 4.2.3). Allerdings wurde mittels eines Kontrollpeptids widerlegt, dass die Senkung der Zellausbreitungszeit spezifisch infolge einer Integrin-RGD-Wechselwirkung war. Hierbei wurde anstelle des RGD-Peptids ein Kontrollpeptid mit vertauschter Aminosäurereihenfolge verwendet, das nicht an die Integrinrezeptoren binden kann. Es wurde gezeigt, dass die Zellausbreitungszeit sowohl durch die Coadsorption von RGD als auch durch die Coadsorption des thermo-responsiven Polymers mit RDG sank. Warum sich die Zellausbreitungszeit auch bei dem Kontrollpeptid RDG verringert, kann möglicherweise durch folgende Annahmen begründet werden: Erstens wird die Anzahl der thermo-responsiven Polymere auf der Oberfläche durch Anwesenheit des kleinen Peptids RGD bzw. RDG (siehe I.) reduziert. Zweitens liegen neben den PEG-Ketten geladene Gruppen an der Oberfläche vor, die vermutlich die Serumproteinadsorption fördern. Da das hier zunächst verwendete RGD-Peptid einen sehr kurzen Spacer von nur drei Aminosäuren besaß, könnte seine sterische Erreichbarkeit zur Ausbildung einer spezifischen Integrinbin-

derung gering gewesen sein. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment RGD-Peptide mit unterschiedlichen Spacerlängen verglichen. Die Beobachtungen zeigten allerdings - im Gegensatz zu den Erwartungen -, dass die beiden Peptide mit mittlerem und längerem Spacer die Zellausbreitungszeit sogar verlängerten. Mit steigender Spacerlänge erhöhte sich der RGD-Anteil, der für die gleiche Zellausbreitungszeit wie auf einer coadsorbierten Oberfläche mit kurzem Spacer nötig war. Die Zugänglichkeit der Erkennungssequenz wurde demnach nicht verbessert. Da als Spacer eine PEG- und eine längere P(OEGMA)-Kette verwendet wurden, scheint hier nicht primär das Adhäsionssignal in Form des RGD-Peptids, sondern eher der Spacer bestimmenden Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften zu haben. Je länger der Spacer ist, desto wahrscheinlicher ist eine Molekülkonformation, die einen Teil des Peptids abschirmt. Darüber hinaus kann die Anzahl der RGD-Derivate unter den thermo-responsiven Polymeren auf den Goldoberflächen mit steigender Spacerlänge sinken, da die Adsorptionsgeschwindigkeit von der Molekülgröße abhängt. Eine Abnahme der RGD-Moleküle würde ebenfalls die Zellausbreitungszeit verlängern.

Durch die Coadsorption verschiedener RGD-Derivate und thermo-responsiver Polymere konnte die Zellausbreitungszeit erfolgreich gesenkt werden. Die Zellausbreitungszeit liegt bei einem RGD-Gehalt von 90% unter einem Tag und befindet sich somit in dem für Zellkulturanwendungen akzeptablen Bereich, ohne dabei die hohe Zellabrundungseffizienz negativ zu beeinflussen. Interessant ist das Ergebnis, dass nicht nur die thermo-responsiven Oberflächen hohe Abrundungseffizienzen induzieren. So wurde gezeigt, dass das Kontrollpeptid RDG scheinbar thermo-responsive Eigenschaften wie zum Beispiel elastin-ähnliche Proteine besitzt. Die Versuche mit dem Kontrollpeptid legen den Schluss nahe, dass keine spezifische Adressierung durch RGD erreicht wird. Mit dem derzeitigen Aufbau ist es noch nicht möglich, die Präsentation von Signalen über die Konformation der thermo-responsiven Polymere zu steuern. Da bisher jeweils nur ein Signalpeptid am Ende jedes RGD-Spacer-Derivats lokalisiert ist, könnte eine Vervielfachung des Signals an einem Molekül die Präsentation wahrscheinlicher machen.

Als entscheidender Schwachpunkt des Polymers gilt die lange Zellausbreitungszeit, um für die kommerzielle Anwendung akzeptabel zu sein. Daher bedarf die Verkürzung der Zellausbreitungszeit weiterer Optimierungsschritte: Um die Zellausbreitungszeit zu verringern, wurden hier z. B. die Konzentration der Beschichtungslösung und die Struktur der thermo-responsiven Polymere variiert. Beide Ansätze bewirkten eine Änderung der Zellausbreitungszeit, jedoch reichten die Strategien nicht aus, um die Zelladhäsion auf einen für die Zellkultur verträglichen Rahmen zu senken. Über die Ände-

rung der Struktur des thermo-responsiven Polymers könnte die Zellausbreitungszeit sicherlich nochmals weiter verkürzt werden. Eine sehr erfolgreiche Strategie ist die nachträgliche Beschichtung mit einer gering konzentrierten Fibronectinlösung. Dadurch wurde die Zellausbreitungszeit soweit gesenkt, dass die thermo-responsive Oberfläche mit einer Glasoberfläche im Bezug auf die Zelladhäsion konkurrieren kann. Jedoch ist die Probenpräparation sehr umständlich, da die Fibronectinschicht bei 37 °C immobilisiert wird und ein anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur den positiven Effekt zerstören könnte. Naheliegend ist die Einbettung geladener Moleküle in die thermo-responsive Oberfläche. Auch wenn hier durch die Coadsorption von thermo-responsivem Polymer EW17 und RGD nicht die gewünschte spezifische Bindung zwischen den Integrinrezeptoren der Zellen und dem zelladhäsionsfördernden Peptid RGD erzielt wurde, konnte auch auf diese Weise die Zellausbreitungszeit ohne Einfluss auf die Zellabrundungseffizienz auf unter einen Tag gesenkt werden. Da EW17 bei allen getesteten Belegungsdichten immer eine sehr gute Zellabrundungseffizienz vermittelte, ist dieses Polymer von den drei getesteten Molekülen am besten für die Coadsorptionsexperimente geeignet. Das Mischungsverhältnis thermo-responsiver Polymere muss hoch genug sein, um die Zelladhäsion steuern zu können, darf jedoch nicht zu hoch sein, um die schnelle Adsorption zelladhäsionsfördernder Serumproteine zu ermöglichen. Dies ist bei einem Konzentrationsverhältnis von 10% EW17 und 90% RGD gegeben.

5.3 Zellablösung unterschiedlicher Zelllinien von thermo-responsiven Oberflächen

Je nach Funktion und Lokalisation verschiedener Zelltypen im Organismus unterscheiden sich die Adhäsionseigenschaften in ihrer Umgebung. Bindegewebszellen wie Fibroblasten stehen vorwiegend über Zell-Substrat-Kontakte mit der ECM in Verbindung. Zellen des Epithels (MCF-7, CHO-K1) hingegen besitzen sowohl Zell-Substrat-Kontakte mit der Basallamina als auch zahlreiche Zell-Zell-Kontakte für die Festigung des Gewebes.

Die L929-Mausfibroblasten liegen *in vitro* so lange individuell auf einer Oberfläche vor, bis die Populationsdichte zu hoch und ein Zell-Zell-Kontakt dadurch unumgänglich wird. Es ist also möglich, die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz einzeln zu beobachten. Die Mausfibroblasten eignen sich deswegen hervorragend als Modellzelllinie, um die Effizienz der thermo-responsiven Oberflächen zu beurteilen. Die Zelladhäsion der Mausfibroblasten auf Zellkultursubstraten ist im Vergleich zu den meisten anderen Zelllinien geringer. Dies wirkt sich auf die enzymatische Zellablösung aus.

Um die Fibroblasten von der Zellkulturoberfläche zu trennen, werden fünf- bis sechsfach geringere konzentrierte Enzymlösungen verwendet als für die Ablösung anderer Zelllinien. MCF-7-Brustkrebszellen, U2OS-Knochenkrebszellen und CHO-K1-Ovarzellen treten z. B. stärker mit Zellkultursubstraten in Kontakt. Anhand von Phasenkontrastaufnahmen zeigten sich auch auf thermo-responsiven Oberflächen unterschiedlich starke morphologische Änderungen zwischen diesen drei Zelllinien und der L929-Modellzelllinie, wenn die Temperatur von 37 °C auf Raumtemperatur gesenkt wurde (siehe Kapitel 4.6). Die L929-Zellen reduzieren die Substratkontaktfläche, indem sie sich abrunden. Die anderen Zelllinien verkleinern den Kontakt zur Oberfläche durch leichte Kontraktion. Wahrscheinlich sind die stärkere Oberflächenwechselwirkung durch Zell-Substrat-Kontakte und die stabilisierenden Zell-Zell-Kontakte für diesen Effekt verantwortlich. Darüber hinaus konnten nur schätzungsweise 70% der Zellen nach der Temperatursenkung durch Spülen von den Oberflächen abgelöst werden. Da die Hellfeldmikroskopie in dieser Anwendung durch die begrenzte Information keine geeignete Methode für die Untersuchung der oberflächeninduzierten Ablösung aller Zelllinien darstellt, wurde hier erstmals die TIRAF-Mikroskopie auf thermo-responsiven Oberflächen verwendet. Mit dieser Methode ist eine Visualisierung und Quantifizierung der Zelladhäsionsfläche möglich.

Visualisierung und Quantifizierung der Zelladhäsionsfläche

Die Ablösungseffizienzen von L929-, MCF-7- und CHO-K1-Zellen nach der oberflächeninduzierten Zellablösung konnten anhand der TIRAF-Mikroskopiedaten durch die nun mögliche Identifizierung einzelner Zellen quantifiziert werden. Es ließen sich alle L929-Mausfibroblasten durch Spülen von den thermo-responsiven Oberflächen ablösen. Bei der Goldkontrolle war ein Ablösen der Zellen hingegen nicht möglich. Von den MCF-7-Zellen ließen sich 78% und von den CHO-K1-Zellen 68% nach der Temperaturabsenkung von den schaltbaren Oberflächen abspülen. Die Zellen dieser beiden Linien wurden jeweils in zwei Klassen, die abspülbaren und die nicht abspülbaren Zellen, unterteilt, um mögliche Unterschiede im Zelladhäsionsverhalten abzuleiten. Betrachtet man die durchschnittliche Reduktion der Zellkontaktfläche der drei abspülbaren Zelllinien auf EW17-modifizierten Oberflächen mit der Zellkontaktfläche von L929 auf unbeschichteten Goldoberflächen, so unterscheidet sich die Abnahme der Zelladhäsionsfläche von MCF-7 (78%) und CHO-K1 (85%) kaum von der bei L929 auf Gold erzielten Kontaktflächenabnahme (81%). Dies deutet darauf hin, dass der Grund für die Zellablösung nicht allein auf die Reduktion der Zellkontaktfläche zurückzuführen ist, sondern weitere Parameter wesentlich sind. In den überwiegenden Fällen lagen die MCF-7- und die CHO-K1-Zellen im Zellverband vor. Deswegen wäre es

möglich, dass sich die Adhäsionsflächen dieser Zellen aufgrund ihrer Zell-Zell-Kontakte und der wenigen verbleibenden Fokalkontakte nicht ändert. Möglich wäre z. B. eine Reduktion der Fokalkontakte, ohne dass sich dabei die Zelladhäsionsfläche ändert.

Höhe des subzellulären Spalts

Als Zellkontakt wird jegliche Interaktion im Bereich des evaneszenten Feldes (ca. 150 nm) gewertet. Die Zelladhäsion basiert auf Fokalkontakten zum Substrat. Der Membran-Substratabstand (40 bis 60 nm) zwischen den Fokalkontakten ermöglicht den Fluorophoren im Medium Zugang in das evaneszente Feld [53]. Aus diesem Grund erhält man bei Aufnahmen mit TIRAF-Mikroskopie ein Spektrum an Grauwerten, die als Zelladhäsionsfläche zusammengefasst werden. Analysiert man die mittlere Helligkeit der Zellkontaktfläche, kann ein Helligkeitsanstieg im Verlauf von 30 Minuten gezeigt werden (Abb. 4.14, 4.15, 4.16). Bei den L929-Zellen steigt die mittlere Helligkeit der Zelladhäsionsfläche auf den thermo-responsiven Polymeroberflächen und auf der unbeschichteten Goldoberfläche gleichermaßen. Hier verändert sich also der Abstand zwischen den Zellen und der Oberfläche unabhängig von der Polymerbeschichtung. Bei den MCF-7-Zellen und bei den CHO-K1-Zellen steigt jedoch der Abstand der abspülbaren Zellen auf den schaltbaren Oberflächen stärker an als bei den nicht abspülbaren Zellen. Das impliziert, dass sich die abspülbaren Zellen durch verstärktes Auflösen von Zell-Oberflächenbindungen weiter von der Oberfläche weg bewegen als die nicht abspülbaren Zellen und deshalb von den Oberflächen abgespült werden können. Dieses unterschiedliche Zelladhäsionsverhalten von Zellen auf thermo-responsiven Oberflächen hat sehr komplexe Ursachen und hängt vermutlich auch mit der Heterogenität der Zellpopulation zusammen.

Anhand der TIRAF-Mikroskopieaufnahmen ist ein qualitativer Vergleich zwischen den Zell-Substratabständen der drei Zelllinien möglich. Die mittlere Helligkeit der initialen Zelladhäsionsfläche auf thermo-responsiven Oberflächen von dunkel zu hell ergab folgende Reihenfolge: L929-Fibroblasten = MCF-7-Brustkrebszellen < CHO-K1-Ovarzellen. Das bedeutet, dass die Fibroblasten und die MCF-7-Brustkrebszellen aufgrund der geringeren Grauwerte einen durchschnittlich engeren Kontakt zur Oberfläche haben als die Ovarzellen. Da L929-Zellen allerdings als Zelllinie geringer Zelladhäsion bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Zellnähe zum Substrat nicht mit der Stärke der Zelladhäsion korreliert. Letztere wird unter anderem durch die Verteilung der Integine beeinflusst, die die Zelladhäsion als Rezeptorencluster stärker vermitteln als die Einzelrezeptoren. Die unterschiedliche laterale Verteilung der Fokalkontakte wird in Form von dunkleren und helleren Bereichen der Zelladhäsionsfläche in der TIRAF-Mikroskopieaufnahme

sichtbar. Die Grenze der optischen Auflösung der TIRAF-Aufnahmen liegt bei ca. 220 nm. Deshalb kann hier nicht zwischen einem Integrin-Clustering oder einzelnen Integrinen differenziert werden [54]. Darüber hinaus besitzen Epithelzelllinien wie MCF-7- und CHO-Zellen mehr Zell-Zell-Kontakte als die L929-Fibroblasten und verstärken somit zusätzlich die Zelladhäsion. Diese Kontakte tragen zur Stabilisierung der Zelladhäsion bei, indem die hydrodynamisch wirksame Angriffsfläche beim Abspülen im Zellverband sinkt und somit geringere Scherkräfte wirken, die die Zellen ablösen.

Entstehung von Zellspuren

Während sich die L929-Mausfibroblasten auf den thermo-responsiven Oberflächen abrunden, hinterlassen sie Membranreste in der Form des initialen Adhäsionsmusters (siehe Kapitel 4.7.3). Diese Membranreste erinnern durch ihre dendritische und an den Verzweigungen punktförmige Erscheinung an Zellspuren, die bereits bei verschiedenen Zellen auf unterschiedlichen Oberflächen beobachtet wurden [19]. Zusätzlich konnten Aktinfilamente in den Membranresten nachgewiesen werden, die ebenfalls in den Zellspuren von Zellen beobachtet wurden [20]. Migrieren die Zellen nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur auf den thermo-responsiven Polymeroberflächen, bleiben hingegen keine Membranreste zurück. Das Vorhandensein von Zellspuren ist auf thermo-responsiven Polymeroberflächen überraschend: Auf PNiPAAm-modifizierten Oberflächen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Zellen, sondern auch fast die gesamte ECM von den Oberflächen abgelöst wurde [7]. Im Gegensatz dazu liegt der Schluss nahe, dass auf den hier untersuchten thermo-responsiven Oberflächen große Teile der ECM inklusive der Zellspuren nach dem Schalten auf der Oberfläche zurückbleiben. Dies würde bedeuten, dass die Zellen nicht passiv durch die Konformationsänderung der Polymere abgelöst werden, sondern auch aktiv auf die Veränderung der Oberflächeneigenschaften reagieren. Ist die Proteinschicht, z. B. Fibronectin (siehe Kapitel 4.2.2), zwischen den Zellen und der thermo-responsiven Oberfläche zu dicht, so werden die Polymeroberflächen abgeschirmt und die Zellen können nicht mehr auf die Änderung der Polymerkonformation reagieren. Ein weiteres Indiz für einen aktiven Zellablösungsprozess zeigt das Ergebnis über die zeitliche Entwicklung der Zellabrundung bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (siehe Kapitel 4.5): Hier wurde gezeigt, dass eine Absenkung der Temperatur auf 4 °C die Zellabrundung maßgeblich verzögerte. Ähnliche Effekte wurden auch auf PNiPAAm-modifizierten Oberflächen beobachtet [55]. Die Zellen haben bei 4 °C einen extrem verlangsamten Metabolismus und können nicht so schnell auf die Änderung der Polymerkonformation reagieren wie Zellen bei Raumtemperatur. Bei einem passiven Prozess hingegen würde es bei den unterschiedlichen Temperaturen

nur einen unwesentlichen Unterschied in der Zellabrundungsgeschwindigkeit geben.

Cytoskelett während der Zellablösung

In dieser Arbeit wurden neben den TIRAF- gleichzeitig auch TIRF-Messungen durchgeführt, die erstmals die simultane Untersuchung der Zelladhäsionsfläche und intrazellulärer Prozesse erlaubten. Die Zellabrundung auf PNiPAAm-modifizierten Oberflächen kann durch eine Stabilisierung des F-Aktins verlangsamt werden [8]. Das Cytoskelett scheint den Zellablösungsprozess also entscheidend zu beeinflussen. Weil darüber hinaus die Aktinfasern als Cytoskelettbestandteil über Proteinkomplexe mit den Integrinrezeptoren assoziiert sind, wurde Aktin für die TIRF-Messungen markiert. So können die Aktinstrukturen mit der Zelladhäsionsfläche korreliert und so eventuelle Zusammenhänge aufgedeckt werden. Um die bei der Zellablösung ablaufenden intrazellulären Prozesse genauer zu untersuchen, wurden die MCF-7-Zellen mit einem F-Aktin-EGFP-tragenden Vektor transient transfiziert und mit TIRF- und TIRAF-Mikroskopie synchron untersucht (siehe Kapitel 4.7.4).

Wie schon zuvor erläutert, ändern die MCF-7-Zellen durch das Schalten der Oberfläche kaum ihre Zelladhäsionsfläche. Unter ihnen befanden sich jedoch Ausnahmen, die ein für L929-Zellen typisches Zellablöseverhalten zeigten. Die Zellabrundung einer dieser Zellen wird im Folgenden näher dargestellt, um das Potential der Kombination der TIRF- und TIRAF-Technik aufzuzeigen. Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Zellzyklus zusätzlich zu der Zellabrundung auf den thermo-responsiven Oberflächen beiträgt.

Die dunkleren Bereiche der Zelladhäsionsfläche der TIRAF-Aufnahmen zeigen einen besonders engen Zell-Substratkontakt. Dieser geringe Abstand basiert wahrscheinlich auf ausgebildeten Fokalkontakten zu der Oberfläche. Diese Bereiche niedriger Zell-Substratdistanz sind mit den Aktinfasern der TIRF-Aufnahmen colokalisiert (Abb. 4.18 1a und 2a). Da die Enden der Aktinfilamente über Adapterproteine mit den Integrinrezeptoren assoziiert sind, spannen die Aktinfilamente an diesen Verknüpfungspunkten in der Nähe des Substrates das Cytoskelett der Zelle auf. Kontrahiert die Zelle aufgrund des Wechsels der Substrateigenschaften infolge der Temperaturreduktion, dann verkürzen sich die Aktinfilamente und die Zelladhäsionsfläche wird gleichzeitig reduziert. Handelt es sich um einen aktiven Zellabrundungsprozess, so kann der Mechanismus eventuell mit dem Zellablösungsprozess während der Zellmigration verglichen werden. Die Zelle reduziert ihre Zelladhäsionsfläche von rechts nach links, obwohl die Aktinfilamente deutlich mehr Zell-Substrat-Kontakte vermuten lassen. Bei der Zellmigration wird ebenfalls von einer Anhäufung der Fokalkontakte von vorn nach hinten berichtet. Die-

se besitzen eine hohe Dynamik [56] und werden als Fokalfpunkte bezeichnet [57]. Einige wenige dieser Substratkontakte reifen durch weitere Proteinanlagerung und entwickeln sich zu stabileren fokalen Komplexen, die durch weitere Anlagerung noch stabilere fokale Adhäsionen bilden [57]. Unter der Annahme dieses vereinfachten Modells und dass es sich bei den TIRF- und TIRAF- Aufnahmen um eine migrierende Zelle handelt, ist die Reduktion der Zelladhäsionsfläche von rechts nach links, also entgegengesetzt der Migrationsrichtung, schlüssig. Die Anzahl an Zell-Substrat-Cluster sinkt zwar von rechts nach links, die starken fokalen Adhäsionen können aber vermutlich nicht so schnell von der Zelle gelöst werden wie die kleineren Kontaktflächen.

Das Zurückbleiben von Aktinbestandteilen in den Zellspuren auf den Oberflächen zeigt, dass ein Teil der mit Aktin assoziierten Integrin-Adapterproteine auf dem thermo-responsiven Polymer zurückbleiben. D. h., dass die Aktinfasern bis zur Trennung von den Zellspuren mit dem Integrin verbunden bleiben. Da Zellen auf künstlichen Oberflächen während des Migrierens ebenfalls Aktinbestandteile in den Zellspuren zurücklassen, ist dies kein unbekanntes Ereignis [20]. Warum die Zellen Zellspuren inklusive wesentlicher Membranproteine und Cytoplasmaproteine zurücklassen, ist noch nicht geklärt. Vermutlich ist die Dynamik der Zelle durch die Durchtrennung der Aktinfasern und das Zurücklassen von Membranbestandteilen höher, als es bei einer Migration mit der Auflösung der einzelnen Adapterproteine und der Lösung der Integrinbindungen möglich wäre. Der Verlust des Zellmaterials (Cytoplasma, Membranproteine usw.) durch die Entstehung von Zellspuren wurde im Vergleich zum Verhältnis des Zellvolumens und des Zellumfangs als vernachlässigbar eingeschätzt [58]. Integrinrezeptoren sind aber nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt, sondern liegen in erhöhter Konzentration auf der Unterseite der Zelle vor. D. h., dass wahrscheinlich die Minderung von Integrinrezeptoren im Vergleich zu anderen Membranrezeptoren höher ist. Trotz des Verlustes des Integrins über die zurückgelassenen Zellspuren wurde stellvertretend für alle Membranproteine der Nachweis des Erhalts dieses Transmembranrezeptors nach der Zellablösung von thermo-responsiven Polymeren erbracht (siehe Kapitel 4.4). Auch wenn vermutlich die Fluoreszenzsignaldifferenz der Durchflusszytometermessung bei der Wahl eines anderen Oberflächenrezeptors größer gewesen wäre, fluoreszierten die Zellen trotz des geringen Integrinverlusts stärker als trypsinisierte Zellen. Die Methode der oberflächenvermittelten Zellablösung ist demnach wie erwartet „zellschonender“ als die Zellablösung über den enzymatischen Verdau mittels Trypsin.

Vor- und Nachteile des Goldsubstrats

Die Immobilisierung der thermo-responsiven P(MEO₂MA-co-OEGMA) erfolgte über Disulfidgruppen an Gold. Dabei entstehen selbstassemblierende Monoschichten, die durch die hohe Affinität des Schwefels an Gold sehr robuste und einfach herzustellende Oberflächenbeschichtungen bilden. Diese Methode erlaubt die gezielte Beeinflussung der Oberflächenarchitektur durch die Steuerung der Belegungsdichte und die Einbettung anderer Moleküle über Coadsorption.

Die in dieser Arbeit verwendete Goldschicht betrug 47 nm. Diese Schichtdicke wurde aus folgenden Gründen gewählt: a) optimale Dicke für Oberflächenplasmonresonanz, b) Lichtausbeute ausreichend für Hellfeldmikroskopie und c) homogene Goldbedeckung. Goldoberflächen haben jedoch den Nachteil, dass sie einen Teil der Energie absorbieren, der für die Anregung der Fluorophore benötigt wird, sowie einen Teil des emittierten Lichtes. Darüber hinaus werden oberflächennahe Fluorophore durch einen Energieübertrag auf das Gold gequenchet. Deswegen musste für die TIRF-Untersuchung gewährleistet werden, dass die Fluoreszenz trotz Energieverlust infolge von Absorption und Quenching detektierbar ist. Um die Absorption zu senken, wurde die Goldschicht von 47 nm auf 20 nm reduziert. Die Absorption durch das Gold wurde so um den Faktor 2,3 reduziert. Ein Absorptionsspektrum hat ergeben, dass die dünnere Schichtdicke zu einem Intensitätsverlust von nur ungefähr 33% bei der entsprechenden Wellenlänge führt (Daten nicht gezeigt). Das Quenching durch Gold betrifft einen Bereich von bis zu 10 nm und spielt deshalb hier keine wesentliche Rolle [59]. Die Goldschichtdicke wurde nicht weiter verringert, um stabile Goldoberflächen homogener Beschichtung gewährleisten zu können.

Die Signalintensität der angeregten Fluorophore war trotz der unterschiedlichen Energieverluste hinreichend, um die Adhäsionsmuster verschiedener Zelllinien mittels TIRAF-Mikroskopie sichtbar zu machen.

P(MEO₂MA-co-OEGMA) versus PNiPAAm

Thermo-responsive Polymere wie z. B. PNiPAAm auf Oberflächen zu immobilisieren, um durch Änderung der Polymereigenschaften die Zelladhäsion zu beeinflussen, wurden zahlreich in der Literatur beschrieben. In der vorliegende Arbeit wird ebenfalls ein analoger Ansatz verfolgt, jedoch wurde ein neues, strukturell flexibleres thermo-responsives Polymer P(MEO₂MA-co-OEGMA) in Bezug auf die zukünftige Anwendbarkeit für eine schonende Zellablösung untersucht. Ein Vergleich zwischen dem bekannten PNiPAAm und dem neuen P(MEO₂MA-co-OEGMA) ist allerdings nicht sinnvoll möglich. Die Zellablösungseffizienz von diesen Oberflächen hängt sehr stark von der Polymerisationsart, der Oberflächenankopplung und dem verwendeten Zell-

system ab. Werden zum Beispiel Zellablösungen auf PNiPAAm-Oberflächen mit elektronenstahl- und plasmainduzierter Polymerisation einander gegenübergestellt, existieren sogar innerhalb der Polymerklasse deutliche Unterschiede im Bezug auf die Zellablösungseffizienz [60].

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass P(MEO₂MA-*co*-OEGMA) ebenso wie PNiPAAm die Zelladhäsion in Abhängigkeit von der Temperatur steuert. Die hohen Zellablösungseffizienzen auf den selbstassemblierenden P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-Oberflächen und die lange Haltbarkeit von über 30 Wochen zeigen das erfolversprechende Anwendungspotential dieses neuartigen Polymers. Jedoch hängt die Funktionalität einer thermo-responsiven Oberfläche maßgeblich von der Art der Immobilisierung und Polymerisation des Polymers ab. Aufgrund dessen ist ein Vergleich der beiden Polymersysteme von geringer Aussagekraft. Um das neue thermo-responsive Polymer konkurrenzfähig zu machen, müssen zukünftig verschiedene Oberflächenpolymerisationsmethoden in Kombination mit Zellexperimenten getestet werden. Im Vordergrund sollte dabei die kostengünstige Produktion für eine universelle Anwendung in der Zellkultur stehen. Die Anwendungsbereiche wie Tissue Engineering, Zellkultur und Analytik könnten durch thermo-responsive Zellkultursubstrate mit aktiver und passiver Zellablösung abgedeckt werden. Aktive und passive Zellablösung bezeichnet hier die treibende Kraft, die die Zellablösung bewirkt: Aktiv bedeutet, dass sich die Zellen aufgrund der Änderung der Substrateigenschaften aus eigener Kraft ablösen. Das ist z. B. für die Einzelanalyse essentiell, da die Zellen nicht in der adsorbierten ECM eingebettet sind. Passiv bedeutet, dass die Zellen aufgrund der Änderung der Substrateigenschaften inklusive der adsorbierten ECM-Bestandteile abgelöst werden. So können Zellen im Zellverband z. B. als Gewebe verwendet werden.

Mit der derzeitigen Entwicklungsstufe der thermo-responsiven Oberflächen wären neben dem Einsatz in der Zellkultur jetzt schon folgende Anwendungen denkbar:

P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-modifizierte Oberflächen mit unterschiedlichen Ablösungseffizienzen könnten Zellen nach ihren Adhäsionseigenschaften trennen. So unterscheiden sich z. B. metastasierende Krebszellen in ihrem Adhäsionsverhalten von den anderen Krebszellen. Somit wäre eine Abschätzung der Metastasierungswahrscheinlichkeit eines Krebses möglich. Denkbar wäre auch die Ablösung einzelner Zelle durch eine örtlich aufgelöste Ab-

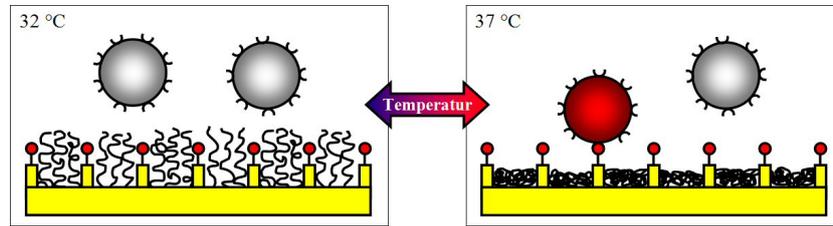


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Steuerung der Ligandenzugänglichkeit für Suspensionszellrezeptoren in Abhängigkeit von der Polymerkonformation, die über eine Temperaturänderung gesteuert wird.

kühlung. Diese Einzelzellen könnten dann gezielt in mikrofluidische Systeme aufgenommen werden, indem sie definierten Scherkräften ausgesetzt werden. Außerdem könnte mit derartigen Systemen der Durchsatz von Analysen in Mikrochips erhöht werden. Es wäre beispielsweise möglich, die chemotaktischen Eigenschaften größerer Zellmengen durch oberflächenvermittelte Zellablösung zu untersuchen. Nach Beendigung jedes Versuchsdurchlaufs müsste der Mikrochip abgekühlt werden, um die adhärenen Zellen abzulösen und mittels Hüllstrom in den Ausgang zu transportieren. Die nächsten Zellen würden dann in das System gespült, um eine neue Aufnahme zu starten.

Auf den P(MEO₂MA-*co*-OEGMA)-Oberflächen bleiben Zellspuren zurück. Da die Membranreste Membranproteine, Cytoplasma und Cytoplasmabestandteile beinhalten, könnten diese für die zerstörungsfreie Einzellanalyse genutzt werden. Durch den Einsatz von Massenspektroskopie könnten z. B. die Proteine der Zellspuren und dadurch das Proteom der Zelle zerstörungsfrei untersucht werden.

Leider war die Steuerung der Zugänglichkeit des Signalmoleküls RGD mittels Coadsorption trotz der Verwendung verschieden langer RGD-Moleküle nicht erfolgreich. Das Problem der Exposition könnte möglicherweise durch eine topographische Strukturierung in Kombination mit der Immobilisierung über Kontaktadsorption (Micro-Contact-Printing) umgangen werden. Die thermo-responsiven Polymere würden dabei in den Kavitäten und die Signale auf den Erhebungen der Oberfläche immobilisiert. So wären dann z. B. auch Oberflächensignale für Suspensionszellen, wie bei der T-Zell-Aktivierung oder Apoptoseinduzierung, möglich (Abb. 6.1) [61].

Literaturverzeichnis

- [1] D. J. Beebe, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss, and B-H. Jo. Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, 404(6778):588–590, Apr 2000.
- [2] Z. Ding, R. B. Fong, C. J. Long, P. S. Stayton, and A. S. Hoffman. Size-dependent control of the binding of biotinylated proteins to streptavidin using a polymer shield. *Nature*, 411(6833):59–62, May 2001.
- [3] N. Badi and J-F. Lutz. Peg-based thermogels: applicability in physiological media. *J Control Release*, 140(3):224–229, Dec 2009.
- [4] C. Ramkisson-Ganorkar, F. Liu, M. Baudys, and S. W. Kim. Modulating insulin-release profile from ph/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. *J Control Release*, 59(3):287–298, Jun 1999.
- [5] T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, and Y. Sakurai. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(n-isopropylacrylamide). *Journal of Biomedical Materials Research*, 27:1243–1251, 1993.
- [6] G. M. Hodges, D. C. Livingston, and L. M. Franks. The localization of trypsin in cultured mammalian cells. *J Cell Sci*, 12(3):887–902, May 1973.
- [7] H. E. Canavan, X. Cheng, D. J. Graham, B. D. Ratner, and D. G. Castner. Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: a surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *J Biomed Mater Res A*, 75(1):1–13, Oct 2005.
- [8] M. Yamato, M. Okuhara, F. Karikusa, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano. Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a

- temperature-responsive polymer. *J Biomed Mater Res*, 44(1):44–52, Jan 1999.
- [9] J-F. Lutz. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46:3459–3470, 2008.
- [10] J-F. Lutz, K. Weichenhan, Ö. Akdemir, and A. Hoth. About the phase transitions in aqueous solutions of thermoresponsive copolymers and hydrogels based on 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*, 40:2503–2508, 2007.
- [11] X. Wang, X. Qiu, and C. Wu. Comparison of the coil-to-globule and the globule-to-coil transitions of a single poly(n-isopropylacrylamide) homopolymer chain in water. *Macromolecules*, 31:2972–2976, 1998.
- [12] H. Bianco-Peled and S. Gryc. Binding of amino acids to “smart“ sorbents: where does hydrophobicity come into play? *Langmuir*, 20(1):169–174, Jan 2004.
- [13] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, and C. C. Perry. Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci Mater Med*, 18(7):1263–1277, Jul 2007.
- [14] K. B. McClary, T. Ugarova, and D. W. Grainger. Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self-assembled monolayer films of alkylthiolates on gold. *J Biomed Mater Res*, 50(3):428–439, Jun 2000.
- [15] M. C. Siebers, P. J. ter Brugge, X. F. Walboomers, and J. A. Jansen. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. a critical review. *Biomaterials*, 26(2):137–146, Jan 2005.
- [16] C. Bökel and N. H. Brown. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell*, 3(3):311–321, Sep 2002.
- [17] E. Zamir and B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114(Pt 20):3583–3590, Oct 2001.
- [18] E. Richter, H. Hitzler, H. Zimmermann, R. Hagedorn, and G. Fuhr. Trace formation during locomotion of I929 mouse fibroblasts continuously recorded by interference reflection microscopy (irm). *Cell Motil Cytoskeleton*, 47(1):38–47, Sep 2000.

- [19] H. Zimmermann, R. Hagedorn, E. Richter, and G. Fuhr. Topography of cell traces studied by atomic force microscopy. *Eur Biophys J*, 28(6):516–525, 1999.
- [20] H. Zimmermann, E. Richter, C. Reichle, I. Westphal, P. Geggier, U. Rehn, S. Rogaschewski, W. Bleiß, and G. R. Fuhr. Mammalian cell traces – morphology, molecular composition, artificial guidance and biotechnological relevance as a new type of bionanotube. *Applied Physics A*, 73:11–26, 2001.
- [21] W. R. Gombotz, G. H. Wang, T. A. Horbett, and A. S. Hoffman. Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J Biomed Mater Res*, 25(12):1547–1562, Dec 1991.
- [22] B. Nagel, A. Warsinke, and M. Katterle. Enzyme activity control by responsive redoxpolymers. *Langmuir*, 23(12):6807–6811, Jun 2007.
- [23] O. Ernst, A. Lieske, M. Jäger, A. Lankenau, and C. Duschl. Control of cell detachment in a microfluidic device using a thermo-responsive copolymer on a gold substrate. *Lab Chip*, 7(10):1322–1329, Oct 2007.
- [24] E. Wischerhoff, K. Uhlig, A. Lankenau, H. G. Börner, A. Laschewsky, C. Duschl, and J-F. Lutz. Controlled cell adhesion on peg-based switchable surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(30):5666–5668, 2008.
- [25] M. A. Cole, N. H. Voelcker, H. Thissen, and H. J Griesser. Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials*, 30(9):1827–1850, Mar 2009.
- [26] G. Graziano. On the temperature-induced coil to globule transition of poly-n-isopropylacrylamide in dilute aqueous solutions. *Int J Biol Macromol*, 27(1):89–97, Mar 2000.
- [27] S. Kessel, S. Schmidt, R. Müller, E. Wischerhoff, A. Laschewsky, J-F. Lutz, K. Uhlig, A. Lankenau, C. Duschl, and A. Fery. Thermoresponsive peg-based polymer layers: surface characterization with afm force measurements. *Langmuir*, 26(5):3462–3467, Mar 2010.
- [28] J. C. Love, L. A Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*, 105(4):1103–1169, Apr 2005.
- [29] A. Ulman. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev*, 96(4):1533–1554, Jun 1996.

- [30] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:321–335, 1989.
- [31] C. D. Bain, J. Evall, and G. M. Whitesides. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: Variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:7155–7164, 1989.
- [32] D. A. Offord, C. M. John, M. R. Linford, and J. H. Griffin. Contact angle goniometry, ellipsometry, and time-of-flight secondary ion mass spectrometry of gold supported, mixed self-assembled monolayers formed from alkyl mercaptans. *Langmuir*, 10:883–889, 1994.
- [33] S. T. Milner. Polymer brushes. *Science*, 251(4996):905–914, Feb 1991.
- [34] P. G. de Gennes. Conformations of polymers attached to an interface. *Macromolecules*, 13:1069–1075, 1980.
- [35] P. M. Mendes. Stimuli-responsive surfaces for bio-applications. *Chem Soc Rev*, 37(11):2512–2529, Nov 2008.
- [36] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, 1991.
- [37] D. Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol*, 89(1):141–145, Apr 1981.
- [38] N. L. Thompson and B. C. Lagerholm. Total internal reflection fluorescence: applications in cellular biophysics. *Curr Opin Biotechnol*, 8(1):58–64, Feb 1997.
- [39] P. Geggier and G. Fuhr. A time-resolved total internal reflection aqueous fluorescence (tiraf) microscope for the investigation of cell adhesion dynamics. *Appl. Phys. A*, 68:505–513, 1999.
- [40] D. Gingell and O. Heavens. Elimination of the effects of stray light in measurements by total internal reflection aqueous fluorescence (tiraf). *J Microsc*, 182(Pt 2):141–148, May 1996.
- [41] J. Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 377(3):528–539, Oct 2003.

- [42] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler. Rgd modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24):4385–4415, Nov 2003.
- [43] J. H. Lee, J. W. Lee, G. Khang, and H. B. Lee. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 18(4):351–358, Feb 1997.
- [44] N. Faucheux, R. Schweiss, K. Lützow, C. Werner, and T. Groth. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, 25(14):2721–2730, Jun 2004.
- [45] J. Wei, M. Yoshinari, S. Takemoto, M. Hattori, E. Kawada, B. Liu, and Y. Oda. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 81(1):66–75, Apr 2007.
- [46] J. Wei, T. Igarashi, N. Okumori, T. Igarashi, T. Maetani, B. Liu, and M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*, 4(4):045002, Aug 2009.
- [47] Yusuke Arima and Hiroo Iwata. Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers. *J. Mater. Chem.*, 17:4079–4087, 2007.
- [48] O. Ernst, A. Lieske, A. Holländer, A. Lanckenau, and C. Duschl. Tuning of thermo-responsive self-assembly monolayers on gold for cell-type-specific control of adhesion. *Langmuir*, 24(18):10259–10264, Sep 2008.
- [49] J. Brandrup. *Polymer Handbook*. John Wiley & Sons, 1991.
- [50] T. Tumolo, L. Angnes, and M. S. Baptista. Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, 333(2):273–279, Oct 2004.
- [51] Lorcan T Allen, Miriam Tosetto, Ian S Miller, Darran P O’Connor, Stephen C Penney, Iseult Lynch, Alan K Keenan, Stephen R Pennington, Kenneth A Dawson, and William M Gallagher. Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials*, 27(16):3096–3108, Jun 2006.

- [52] K. E. Michael, V. N. Vernekar, B. G. Keselowsky, J. C. Meredith, R. A. Latour, and A. J. García. Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir*, 19:8033–8040, 2003.
- [53] Y. Iwanaga, D. Braun, and P. Fromherz. No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing gfp-vinculin and fluorescence interference of dii. *Eur. Biophys. J.*, 30:17–26, 2001.
- [54] M. Arnold, V. C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmüller, P. Heil, J. Blümmel, E. A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger, and J. P. Spatz. Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing. *Nano Lett*, 8(7):2063–2069, Jul 2008.
- [55] T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, and Y. Sakurai. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, 16(4):297–303, Mar 1995.
- [56] J. A. Broussard, D. J. Webb, and I. Kaverina. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1):85–90, Feb 2008.
- [57] J. G. Lock, B. Wehrle-Haller, and S. Strömblad. Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol*, 18(1):65–76, Feb 2008.
- [58] G. Fuhr, E. Richter, H. Zimmermann, H. Hitzler, H. Niehus, and R. Hagedorn. Cell traces–footprints of individual cells during locomotion and adhesion. *Biol Chem*, 379(8-9):1161–1173, 1998.
- [59] T. Liebermann and W. Knoll. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 171:115–130, 2000.
- [60] K. Nagase, J. Kobayashi, and T. Okano. Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering. *J R Soc Interface*, 6 Suppl 3:S293–S309, Jun 2009.
- [61] M. Kirschbaum, M. S. Jaeger, T. Schenkel, T. Breinig, A. Meyerhans, and C. Duschl. T cell activation on a single-cell level in dielectrophoresis-based microfluidic devices. *J Chromatogr A*, 1202(1):83–89, Aug 2008.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Beschreibung
AFM	Atomkraftmikroskop (engl. atomic force microscope)
AH90	thermoresponsives Polymer P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)
AL57	thermoresponsives Polymer P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)
BSA	Bovines Serumalbumin
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EW17	thermoresponsives Polymer P(MEO ₂ MA- <i>co</i> -OEGMA)
LCST	Phasenübergangstemperatur (engl. lower critical solution temperature)
MEO ₂ MA	2-(2-methoxyethoxy)ethyl Methacrylat
OEGMA	Oligo(ethyleneglycol) Methacrylat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PNiPAAm	Poly-N-isopropylacrylamid
RDG	Peptidmotiv (Arginin, Asparaginsäure und Glycin)
RGD	zelladhäsionsvermittelndes Peptidmotiv (Arginin, Glycin und Asparaginsäure)
RT	Raumtemperatur
SAM	selbstorganisierende Monoschicht (engl. self-assembled monolayer)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. surface plasmon resonance)
TIRF	interne Totalreflexionsfluoreszenz (engl. total internal reflection fluorescence)
TIRAF	interne Totalreflexionsfluoreszenz im wässrigen Medium (engl. total internal reflection aqueous fluorescence)

Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge

1. „The microscopy cell (MicCell), a versatile modular flowthrough system for cell biology, biomaterial research, and nanotechnology“
Gast, F. U.; Dittrich, P. S.; Schwille, P.; Weigel, M.; Mertig, M.; Opitz, J.; Queitsch, U.; Diez, S.; Lincoln, B.; Wottawah, F.; Schinkinger, S.; Guck, J.; Käs, J.; Smolinski, J.; Salcher, K.; Werner, C.; Duschl, C.; Jäger, M. S.; **Uhlig, K.**; Geggier, P. and Howitz, S.
Microfluidics and Nanofluidics, 2006, 2, 21–36.
2. „Controlled cell adhesion on PEG-based switchable surfaces“
Wischerhoff, E.; **Uhlig, K.**; Lankenau, A.; Börner, H. G.; Laschewsky, A.; Duschl, C. and Lutz, J.-F.
Angew Chem, 2008, 47, 5666–5668.
3. „A biohybrid microfluidic valve based on forisome protein complexes“
Uhlig, K.; Jäger, M. S.; Lisdat, F. and Duschl, C
JMEMS, 2008, 17, 1322–1328.
4. „The structure and functionality of contractile forisome protein aggregates.“
Jäger, M. S.; **Uhlig, K.**; Clausen-Schaumann, H. and Duschl, C.
Biomaterials, 2008, 29, 247–256.
5. „Contact-free single-cell cultivation by negative dielectrophoresis“
Jäger, M. S.; **Uhlig, K.**; Schnelle, T. and Mueller, T.
J. Phys. D: Appl. Phys., 2008, 41, 175502.1–175502.8.
6. „Tuning the thickness of polymer brushes grafted from nonlinearly growing multilayer assemblies.“
Wischerhoff, E.; Glatzel, S.; **Uhlig, K.**; Lankenau, A.; Lutz, J.-F. and Laschewsky, A.
Langmuir, 2009, 25, 5949–5956.

7. „Thermoresponsive PEG-Based Polymer Layers: Surface Characterization with AFM Force Measurements.“
Kessel, S.; Schmidt, S.; Müller, R.; Wischerhoff, E.; Laschewsky, A.; Lutz, J.-F.; **Uhlig, K.**; Lankenau, A.; Duschl, C. and Fery, A.
Langmuir, 2010, 26, 3462–3467.
8. „Monitoring cell detachment on PEG-based thermoresponsive surfaces using TIRF microscopy“
Uhlig, K.; Wischerhoff, E.; Lutz, J.-F.; Laschewsky, A.; Jäger, M. S.; Lankenau, A.; Duschl, C. Soft Matter, 2010, submitted.

Konferenzbeiträge

1. „AFMing of Forisomes“
Jaeger, M. S.; **Uhlig, K.**; Clausen-Schaumann, H.; Bleiß, W. and Duschl, C.
Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin), 2004
Poster
2. „Untersuchungen zur elektrischen Ansteuerung funktioneller Proteinaggregate (Forisomen)“
Uhlig, K.; Jaeger, M. S. and Duschl, C.
Deutsches BioSensor Symposium (Regensburg), 2005
Poster
3. „Do proteins need time to make friends?“
Matschuk, M.; Heinrich, D.; Linke, S.; Werner, R.; **Uhlig, K.** and Krause, A.
German Conference on Bioinformatics (Hamburg), 2005
Poster
4. „Elektronische Speckle Pattern Interferometrie für Life Science“
Uhlig, K.; Münch, Y.; Chrzumnicka, E.; Inwersen, J.; Vogt, T. and Foitzik, A. H.
8. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz (Jena), 2007
Vortrag
5. „Realisation of microfluidic valves based on protein complexes“
Uhlig, K.; Jaeger, M. S.; Duschl, C. and Lisdat, F.
Deutsches BioSensor Symposium (Bochum), 2007
Poster

Danksagung

Durch eine gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft vieler Mitarbeiter ist das Arbeiten angenehm und gleichzeitig deutlich effizient. Deswegen möchte ich mich an dieser Stelle für diese bereichernde Zeit bei allen Kollegen des Fraunhofer IBMT Potsdam bedanken.

Für die Möglichkeit zu Promovieren möchte ich mich bei Herrn Prof. Frank Bier bedanken.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Claus Duschl für die Bereitstellung des Themas, die wertvolle inhaltliche Betreuung und das Vertrauen in meine Arbeit. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Magnus Jäger für die hervorragende Unterstützung bei experimentellen und theoretischen Fragestellungen. Ohne seine Ideen und seinen Einsatz würde diese Arbeit nicht so vielfältig sein.

Bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Andreas Lankenau möchte ich mich für die von ihm gewährten Hilfestellungen bedanken.

Den Mitgliedern des Campusprojektes „Bioaktive Oberflächen“ danke ich für den Input durch die zahlreichen Projekttreffen. Für die Synthese und die Bereitstellung der thermo-responsiven Polymere und der Peptide möchte ich Herrn Dr. Erik Wischerhoff sowie Herrn Dr. Hans Börner danken.

Alexander Christmann danke ich für die Unterstützung an der Aufdampfanlage, die immer wieder neue Problemchen bereitete.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zell-Assay-Entwicklung Björn Boysen, Armin Renner, Oliver Ernst, Friedrich Käß und Christian Baudis danke ich für die aufschlussreichen Gespräche, den Erfahrungsaustausch, sowie der Schaffung einer sehr angenehmen Atmosphäre. Besonders hervorheben möchte ich Beate Morgenstern, Christine Mißler und Narayanan Madaboosi.

Den treuen Mittwochsanhängern danke ich für die amüsanten Volleyballspiele und das anschließende gemütliche Grillen.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die für mich in den vergangenen Monaten sehr viel Verständnis aufgebracht haben. Besonders in schwierigen Zeiten haben sie mir gezeigt, dass sie immer für mich da sind.

Abschließend danke ich besonders Hendrik Glowatzki, denn ohne seinen Einfluss hätte ich nie den Entschluss gefasst zu promovieren.

Lebenslauf

Name: Katja Uhlig
geboren am: 14.09.1981
Geburtsort: Zossen

1994–2001 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Königs Wusterhausen
2001 Abitur

2001–2004 Studium an der Technischen Fachhochschule Wildau in
der Fachrichtung Biosystemtechnik/Bioinformatik
2004 Bachelor of Science

2004–2006 Studium an der Technischen Fachhochschule Wildau in
der Fachrichtung Biosystemtechnik/Bioinformatik

2004–2006 Studentische Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für Bio-
medizinische Technik (Berlin) in der Arbeitsgruppe Lab-
On-Chip Technologie

2006 Master of Science

10/2006–dato Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut
für Biomedizinische Technik (Potsdam) in der Arbeits-
gruppe Zell-Assay-Entwicklung

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze nicht einen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam.

Katja Uhlig
Potsdam, 03. Mai 2010