

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin Viktoria Schaufler geb. Riedel  
aus Rot am See

Tag der mündlichen Prüfung  
04. Mai 2016



AUFKLÄRUNG DER  $\alpha_5\beta_1$ - UND  $\alpha_v\beta_3$ -  
INTEGRINFUNKTIONEN MITTELS  
INTEGRINSELKTIVER MIMETIKA AUF  
GOLDNANOSTRUKTURIERTEN SUBSTRATEN

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Joachim Spatz**

Physikalisch-Chemisches Institut

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme, Stuttgart

**apl. Prof. Dr. Reiner Dahint**

Physikalisch-Chemisches Institut

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg



Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

**Viktorija Schaufler**, Helmi Czichos-Medda, Vera Hirschfeld-Warnecken, Stefanie Neubauer, Florian Rechenmacher, Rebecca Medda, Horst Kessler, Benjamin Geiger, Joachim P. Spatz, E. Ada Cavalcanti-Adam. Selective binding and lateral clustering of  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  integrins: Unraveling the spatial requirements for cell spreading and focal adhesion assembly. (2016) Cell Adhesion and Migration. Accepted



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Mizellare Blockcopolymer Nanolithographie</b>	<b>8</b>
3.1.1	Einführung in die Nano(bio)technologie	8
3.1.2	Generelle Strukturierungsmethoden auf Oberflächen im Nanometerbereich	9
3.1.3	Grundlagen der Selbstassemblierung	10
3.1.4	Amphiphile Diblockcopolymer	11
3.1.5	Mizellenbildung	13
3.1.6	Beladung der Mizellen mit Metallsalzen	14
3.1.7	Strukturierung der Substratoberflächen	16
3.1.8	Einflussfaktoren der Partikelabstände	17
3.1.9	Ordnungsparameter	19
<b>3.2</b>	<b>Funktionalisierung von Oberflächen</b>	<b>22</b>
3.2.1	Selbstorganisierende Monolagen (SAM)	22
3.2.2	Thiolmonolagen auf Gold	23
3.2.3	Silanisierung von hydroxyterminierten Substraten	24
3.2.4	Polyethylenglykol	25
3.2.5	Proteinabweisende Eigenschaft von Polyethylenglykol	26
<b>3.3</b>	<b>Zelladhäsion und Wechselwirkung der Zellen mit biomimetischen Substraten</b>	<b>27</b>
3.3.1	Die extrazelluläre Matrix	27
3.3.2	Transmembranrezeptoren	29
3.3.3	Integrine	30
3.3.4	Fokale Adhäsionen	33
3.3.5	Vinculin	34
3.3.6	Paxillin	36
3.3.7	Synthetische Integrinbindende Moleküle	37
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendete Geräte und Methoden</b>	<b>42</b>
4.1.1	Homogene Goldsubstrate	42
4.1.2	Sputter Coater	42
4.1.3	Plasma Systeme	42
4.1.4	Rasterelektronenmikroskop	43
4.1.5	Phasenkontrastmikroskopie	47

4.1.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	49
4.1.7	Datenauswertung .....	52
<b>4.2</b>	<b>Oberflächenherstellung .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Reinigung und Aktivierung der Substrate.....	52
4.2.2	Herstellung der mizellaren Goldlösung.....	53
4.2.3	Nanostrukturierung mit Hilfe des Tauchbeschichtungsprozesses .....	53
4.2.4	Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen .....	54
4.2.5	Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit selektiven Liganden .....	55
4.2.6	Funktionalisierung der Glassubstrate mit Fibronectin und Vitronectin .....	56
<b>4.3</b>	<b>Zellexperimente .....</b>	<b>56</b>
4.3.1	Die Zelllinie.....	56
4.3.2	Kultivierung der Zellen .....	56
4.3.3	Aufnahmen lebender Zellen zur Auswertung des Zellspreitens.....	57
4.3.4	Aussähen der Zellen auf funktionalisierten Oberflächen.....	57
4.3.5	Fixierung und Immunozytochemische Färbung.....	57
4.3.6	Transiente Transfektion der U2OS-Zellen .....	58
4.3.7	Blockierungsexperimente .....	59
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Zellspreiten auf unterschiedlichen Goldnanopartikel Abständen für <math>\alpha_5\beta_1</math>- und <math>\alpha_v\beta_3</math>-Mimetika .....</b>	<b>60</b>
5.1.1	Zellflächenprogression mit der Zeit.....	60
5.1.2	Spreitgeschwindigkeit der U2OS-Zellen .....	62
5.1.3	Maximale projizierte Zellfläche .....	63
<b>5.2</b>	<b>Untersuchung der Fokaladhäsionen.....</b>	<b>65</b>
5.2.1	Vinculinclustergröße auf verschiedenen Goldnanopartikelabständen .....	65
5.2.2	Phosphopaxilinclustergröße auf verschiedenen Goldnanopartikelabständen .....	67
5.2.3	Zyxin und Aktin.....	69
<b>5.3</b>	<b>Untersuchung der <math>\alpha_5\beta_1</math>- und <math>\alpha_v\beta_3</math>-Integrine .....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Screening der Antikörper.....	71
5.3.2	Kontrollexperimente auf Fibronectin und Vitronectin .....	72
5.3.3	$\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrinmuster auf Goldnanopartikeln funktionalisiert mit selektiven Mimetika .....	73
5.3.4	Blockierungsexperimente .....	77
5.3.5	$\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum immobilisiert auf einem Substrat .....	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>83</b>

<b>I. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>V. Danksagung .....</b>	<b>106</b>

### **1 Abstrakt**

Die Kenntnis der spezifischen Aufgaben des  $\alpha_5\beta_1$ - und des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ist entscheidend für Studien der Zelladhäsion, des Zellspreitens sowie der Zellmigration. Solche Prozesse spielen eine große Rolle bei vielen pathologischen und physiologischen Vorgängen wie der Metastasenbildung, der embryonalen Entwicklung oder der Wundheilung. Bislang bleibt die Aufklärung der Funktion einzelner Integrine während dieser Prozesse aufgrund fehlender spezifischer Molekülwerkzeuge, die jedes einzelne Integrin selektiv ansprechen, eine Herausforderung. Erst vor einiger Zeit wurden selektive Liganden entwickelt, die im Stande sind einzelne Integrine zu erkennen.

Im Fokus dieser Arbeit stand ein biomimetisches System, welches die Untersuchung der bestimmten Funktionen der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  ermöglichte. Dazu wurden hochselektive integrinspezifische Mimetika auf Goldnanopartikeln immobilisiert und als Imitation der extrazellulären Matrix den Zellen geboten.

Die Adhäsion der menschlichen Osteosarkomazellen U2OS, die beide Integrintypen exprimieren, wurde auf drei verschiedenen Goldnanopartikeln von 30, 60 und 90 nm für beide Mimetika untersucht. Dazu wurde die projizierte Adhäsionsfläche für alle Abstände ausgemessen und quantifiziert. Ein signifikanter Unterschied wurde nicht nur zwischen der maximalen Zellfläche sondern auch in der Progression der Zellfläche mit der Zeit festgestellt. Mit zunehmendem Abstand der Goldnanopartikel nahm die maximale Zellfläche für beide Liganden ab. Jedoch zeigte sich auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum eine höhere maximale Zellfläche im Vergleich zum  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum. Weiterhin wurde mittels kinetischer Untersuchungen ein Unterschied in der Spreitgeschwindigkeit festgestellt. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat konnten U2OS-Zellen sich immer schneller verankern und zusätzlich war der Anstieg der Zellfläche mit der Zeit deutlich rascher als auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat. Die schnellere Zellflächenprogression auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum wurde für alle drei Abstände festgestellt, je größer die Abstände jedoch wurden, desto kleiner fiel der Unterschied zwischen beiden Mimetika aus.

Die Analyse der Clustergröße unterschiedlicher Adhäsionsproteine zeigte ebenfalls Unterschiede zwischen der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelten Zelladhäsion, die zusätzlich von der Ligandendichte des Substrats abhängt. Es wurden Cluster der Adhäsionsproteine Vinculin und phospho-Paxillin auf unterschiedlichen Goldnanopartikelabständen für beide Mimetika zur quantitativen Auswertung herangezogen.

## Abstrakt

Vinculincluster besaßen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum eine größere Fläche im Vergleich zum  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum für alle drei Abstände. Für 30 und 60 nm unterschied sich die Fläche signifikant. Für 90 nm war die Clusterfläche auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat nur leicht erhöht. Die Phosphorylierung des Paxillins wird für beide Integrinmimetika durch die Ligandendichte auf dem Substrat dirigiert. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat wurde für die Tyrosinphosphorylierung des Paxillins ein signifikanter Unterschied zwischen den Abständen 30 und 90, sowie 60 und 90 nm festgestellt. Im Gegensatz dazu ergab sich für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ein signifikanter Unterschied beim Übergang von 60 auf 90 und von 30 auf 60 nm.

Bei der immunozytochemischen Untersuchung der Integrine wurde auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat sowohl das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin als auch das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nachgewiesen. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat befanden sich ausschließlich  $\alpha_v\beta_3$ -Integrincluster. Die Anwesenheit der beiden Integrintypen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat ist höchstwahrscheinlich auf einen Rho-GTPasen-abhängigen Crosstalk zwischen den beiden Integrinen zurückzuführen. Bei Inhibierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins mittels thioalfreien Mimetikums wurde die Zelladhäsion auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat blockiert, während auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat die Adhäsion weiterhin ungehindert stattfand. Dagegen wurde bei Inhibierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins die Zelladhäsion auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat verhindert und auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat erfolgte diese einwandfrei. Bei der immunozytochemischen Integrinfärbung nach der Inhibierung wurde nun auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat ausschließlich das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin mit fibrillären Strukturen festgestellt, die vorzugsweise im Zellzentrum lokalisiert sind. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat wurden dagegen nur  $\alpha_v\beta_3$ -Integrincluster detektiert. Demzufolge führt die Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zwar nicht zu einer Verhinderung der Zelladhäsion, jedoch wird die Ausbildung von stabilen  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinclustern unterbunden. Resultierend aus den experimentellen Beobachtungen lassen sich deutliche Funktionsunterschiede zwischen dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  und dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  schlussfolgern. So scheint das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin eher eine größere Rolle bei der anfänglichen Zellanhaftung an das Substrat zu spielen, während das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin für die Ausbildung stabiler Fokaladhäsionen verantwortlich ist.

## Abstract

## Abstrakt

The integrins  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  have specific functions in a number of cell processes including cell adhesion, cell spreading and cell migration. These processes play a key role in many pathological and physiological processes like metastasis, embryogenesis and wound healing. Currently, it is challenging to elucidate the distinct role of integrins  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  in the above mentioned process because of lack of specific tools which address either integrin type. Only recently highly selective ligands have been designed to target either integrin  $\alpha_5\beta_1$  or integrin  $\alpha_v\beta_3$  for potential therapeutic applications.

In this work we present a biomimetic system, which allowed to elucidate the specific functions of integrins  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  during cell adhesion. For this purpose, highly selective and active integrin peptidomimetic ligands were immobilized on gold nanoarrays and used to characterize cell adhesion.

The glass substrates were (i) patterned with gold nanoparticles by using block copolymer micelle nanolithography (BCMN), (ii) passivated with a layer of polyethylene glycol (PEG) between the gold nanoparticles, and (ii) functionalized with highly selective integrin ligands coupled to the gold nanoparticles. The BCMN technique is based on the self assembly of inverse micelles, which are made of amphiphilic block copolymers and which are loaded with gold salt. The micelles are transferred to the glass substrate by dip coating and form a quasi hexagonally arranged array of micelles. The following plasma treatment removes the polymer from the substrates and reduces the gold salt to metallic gold. By varying of the retraction velocity the distances between gold nanoparticles are adjusted to 30, 60 and 90 nm. To avoid an unspecific adhesion, the substrates are passivated with a polyethylene glycol coating between the gold nanodots. Afterwards, the gold nanodots serve as anchor points for the immobilization of the integrin ligands through thiol groups.

Human osteosarcoma cells (U2OS cells), which express both integrin types were seeded on the nanopatterned surfaces presenting three different gold nanoparticle spacing, namely 30, 60 and 90 nm, functionalized with either peptidomimetic. The projected cell area was quantified for all spacings. A significant difference is not only detected in the maximal cell spreading area, but also for the progression of the cell area overtime. As the gold nanoparticle spacing increased, the maximal cell area decreases for both ligands. However, the maximal cell area is higher for the  $\alpha_5\beta_1$  mimetic. Furthermore, spreading kinetics shows a higher velocity for the  $\alpha_5\beta_1$  mimetic in comparison to  $\alpha_v\beta_3$  mimetic. U2OS cells spread faster for all spacings on the  $\alpha_5\beta_1$  mimetic, but the difference between the mimetics decreases with increasing distances.

## Abstrakt

Analysis of adhesion protein clustering in focal contacts as well shows differences in the  $\alpha_5\beta_1$ - and  $\alpha_v\beta_3$ -mediated adhesion, which additionally depends on the gold nanoparticle distances. For the quantification of focal adhesion size, vinculin and phospho-paxillin were labeled by indirect immunofluorescence. Vinculin clusters exhibit an increased area on the  $\alpha_v\beta_3$  mimetic in comparison to  $\alpha_5\beta_1$  mimetic for all three distances. At distances of 30 and 60 nm the vinculin cluster area is significantly increased for  $\alpha_v\beta_3$  mimetic in comparison to  $\alpha_5\beta_1$  mimetic, whereas for 90 nm spacing only a slight increase is observed. The phosphorylation of paxillin is influenced by the ligand density on the substrate for both mimetics. For the  $\alpha_v\beta_3$  substrate the tyrosine phosphorylation of paxillin shows a significant difference between 30 and 90, as well between 60 and 90 nm. In the case of  $\alpha_5\beta_1$  mimetic there is a significant difference only between 60 and 90 nm.

Immunocytochemical staining revealed that both integrins are present in focal contacts on surfaces with the  $\alpha_5\beta_1$  mimetic and that only  $\alpha_v\beta_3$  integrin clusters are formed on the  $\alpha_v\beta_3$  mimetic. The presence of both integrins on  $\alpha_5\beta_1$  mimetic surfaces is presumably due to a Rho-GTPase dependent crosstalk between the two types of integrin. Blocking the  $\alpha_v\beta_3$  integrin with a thiol free peptidomimetic, completely hinders adhesion on  $\alpha_v\beta_3$  substrates whereas adhesion is observed on  $\alpha_5\beta_1$  substrates. Conversely, when  $\alpha_5\beta_1$  integrin is blocked, adhesion is inhibited on  $\alpha_5\beta_1$  substrate and still occurs on  $\alpha_v\beta_3$  substrate. After blocking, staining for integrins on  $\alpha_5\beta_1$  substrate shows exclusively  $\alpha_5\beta_1$  integrin, with fibrillar structures which are preferentially located towards the center of the cells, and on  $\alpha_v\beta_3$  substrate only  $\alpha_v\beta_3$  integrin clusters. Thus, blocking  $\alpha_v\beta_3$  integrin does not hinder the adhesion but affects the formation of stable  $\alpha_5\beta_1$  integrin clusters.

## 2 Einleitung und Motivation

Die Wechselwirkung der Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM) stellt einen unentbehrlichen Vorgang aller multizellulären Systeme dar. Die Forschung auf diesem Gebiet übt somit einen großen Einfluss auf das biologische und medizinische Verständnis der Zelladhäsion aus.

Durch den Kontakt der Zelle mit der extrazellulären Matrix kommuniziert diese mit der unmittelbaren Mikroumgebung und reagiert auf die äußeren Signale entsprechend. Dabei ist diese Wechselwirkung essentiell z.B. bei der Ausbildung der Organe während der Embryogenese.<sup>1</sup> In einem ausgereiften Organismus ist der Prozess der Zell-EZM Wechselwirkung entscheidend bei der Gewebeintegrität aber auch bei der Organfunktion.<sup>2</sup> Eine Fehlfunktion bei der Erkennung der EZM durch die Zelle führt daher zu pathologischen Zuständen. Diese Tatsache führte in den letzten Jahrzehnten zu etlichen Studien, die das Zustandekommen der Wechselwirkung zwischen Zelle und EZM und die Regulation dieses Vorganges aufzuklären versuchten.

<sup>3-5</sup> Insbesondere wird auch die Aufklärung des Zellverhaltens, welches durch die Zell-EZM Wechselwirkung beeinflusst wird, angestrebt. Es wurden vor allem in den letzten drei Jahrzehnten Durchbrüche auf diesem Gebiet geschafft. Zu den wichtigsten Entdeckungen gehören hier unter anderem die Identifikation der Integrine als transmembrane Rezeptoren für Adhäsionsproteine sowie ihre Funktion als bidirektionale Signalübertragungsapparate. Natürlich sind hier zytoplasmatische und membranassoziierte Proteine, die eine Schlüsselrolle als Regulatoren und Effektoren spielen, auch von großer Bedeutung. Ebenso wurden mehrere Signalübertragungswege, über die die empfangene Information von den Integrinen zu den zytoplasmatischen Strukturen gelangt, aufgedeckt und voneinander abgegrenzt<sup>6</sup>.

Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Sie stellen heterodimere Transmembranrezeptoren dar, die die EZM mit den zytoplasmatischen Proteinen verbinden und Außensignale an die Zelle weiterleiten. Umgekehrt ist genauso eine Signalweiterleitung von innen nach außen möglich. Eine Aktivierung der Integrine findet nach der Bindung eines EZM-Liganden statt. Dabei erkennt das Integrin meistens eine kurze Aminosäuresequenz des Liganden, wie z.B. die RGD-Sequenz, welche in natürlich vorkommenden EZM-Proteinen wie Fibronectin oder Vitronectin erscheinen.<sup>7</sup>

## Einleitung und Motivation

Integrin vermittelte Adhäsion ist ein hochkomplexer Vorgang der ebenfalls mit der Bindung eines extrazellulären Liganden an das Integrin beginnt. In diesen Prozess ist auch die Wechselwirkung mit mehreren Bindungspartnern nach der Aktivierung miteinbezogen. Nach der Ligation des EZM-Proteins assoziieren Integrine zu Clustern und führen zur Ausbildung fokaler Kontakte bestehend aus mehreren Fokaladhäsionsproteinen<sup>8</sup>.

Integrine spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung, der Organisation, Aufrechterhaltung und Reparatur unterschiedlichen Gewebes indem sie eine Verankerung zur EZM bieten. Störungen der Integrinfunktion werden häufig mit Pathologien wie Blutgerinnungs- oder Wundheilungsdefekten in Verbindung gebracht. Ferner sind Integrine unentbehrliche Regulatoren der Zell- und Wirtsantwort bei Implantation körperfremder Objekte und sind verantwortlich für biologische Integration von Biomaterialien und „Tissue Engineering“-Produkten.

Die Imitation der EZM nimmt eine wichtige Stellung in der Entwicklung biokompatibler Materialien sowie für die Aufklärung der Wechselwirkungsmechanismen zwischen der EZM und der Zelle ein. Zu diesem Zwecke wurde im Rahmen dieser Arbeit ein nanostrukturiertes Substrat verwendet, welches mit Hilfe der mizellaren Nanolithographie<sup>9</sup> erzeugt wird. Dessen Ankerpunkte bestehen aus Goldnanopartikeln und bieten die Möglichkeit zur Biofunktionalisierung mit spezifisch wirkenden Integrinliganden. Die Ankerpunkte bilden eine quasi hexagonale Anordnung und können in gewünschten Abständen auf dem Substrat erzeugt werden. Die Möglichkeit der präzisen Abstandsgenerierung erlaubt die Regulierung der Ligandenkonzentration auf dem biokompatiblen System und somit die Aufklärung unterschiedlicher Mechanismen in Abhängigkeit der Ligandendichte. Z. B. kann die oben erwähnte Clusterbildung der Integrinrezeptoren nur bei einem bestimmten minimalen Abstand der gebotenen Liganden stattfinden. Unterschiedliche Ligandendichten lösen somit unterschiedliches Zellverhalten aus. Es ist bekannt, dass die Bildung von Integrinclustern einen bestimmten Abstand zwischen den einzelnen Integrinen erfordert. In der Literatur wird ein optimaler Abstand von 58 nm für die stabile Clusterbildung beschrieben. Bei einem Abstand von 73 nm<sup>10</sup> und höher bilden sich stets dynamische Fokalkontakte aus. Sie sind deswegen nicht im Stande eine starke Zellanhaftung an das Substrat zu gewährleisten.

In Säugetieren existieren 19 unterschiedliche  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten. Insgesamt wurden bislang 24 unterschiedliche Integrintypen aus diesen Untereinheiten nachgewiesen<sup>11</sup>, die sich alle in der Struktur ihrer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sehr ähneln, jedoch unterschiedliche

## Einleitung und Motivation

Aufgaben in der Zelle besitzen. Oft werden Integrine nach ihrer Fähigkeit an unterschiedliche EZM-Proteine zu binden klassifiziert, es binden z.B. 8 Integrine an die RGD-Sequenz des Fibronektins<sup>12</sup>. Unter den Fibronektin-bindenden Integrinen befinden sich die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  - und  $\alpha_v\beta_3$ , die in die Embryogenese, die Angiogenese und in unterschiedliche Pathologien<sup>13-15</sup> involviert sind und in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Vorallem wegen ihrer Beteiligung an der Angiogenese<sup>16,17</sup> wurden die beiden Integrine in den letzten Jahrzehnten immer attraktiver für die Pharmaforschung. Diese versuchte Antagonisten<sup>18</sup> für die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  zu entwickeln und in klinischen Studien zu testen. Obwohl bereits eine Informationsfülle über alle Integrineigenschaften besteht, bleibt dennoch unklar wie jedes einzelne Integrin die Zellfunktion und -antwort selbstständig reguliert. Um diesem Problem nachzugehen, wurden hochselektive und aktive Peptidomimetika<sup>19</sup> für die beiden Integrine entwickelt und mit Thiolgruppen funktionalisiert, die eine Immobilisierung auf Goldnanopartikeln erlaubten. Es wurde zwar bereits versucht, die Funktion der beiden Integrine mit dem unselektiven zyklischen RGD-Protein und anderen mimetischen EZM-Proteinen aufzuklären<sup>20-22</sup>, jedoch bleibt die Rolle der  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine bei der Zelladhäsion und der Ausbildung von fokalen Kontakten immer noch undeutlich. In der Natur vorkommende Integrinliganden sind aufgrund ihrer mangelnden Subtypselektivität hierfür ungeeignet<sup>7</sup>. Die Literatur stellt ferner Oberflächensubstrate vor, die mittels peptidischer Integrinliganden funktionalisiert sind und biophysikalischen Studien zur Entwicklung von Implantatmaterialien oder zur Untersuchung der Bindungsmotive von Zellen dienen<sup>23-25</sup>. Jedoch wiesen die Peptide im Gegensatz zu Peptidomimetika eine geringere Aktivität und eine unzureichende Selektivität auf.

Basierend auf diesen Kenntnissen war das Ziel dieser Arbeit spezifische Funktionen der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  während der Zelladhäsion und des Aufbaus fokaler Kontakte aufzuklären. Dabei wurde ihre Bedeutung während der Anhaftung an das Substrat, während des Zellspreitens sowie des Integrinclusters untersucht. Es wurden hoch selektive Mimetika verwendet, die jedes Integrin einzeln ansprechen. Ferner wurde das Verhalten des Integrinclusters ohne und mit Inhibierung entweder des  $\alpha_5\beta_1$ - oder des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins beobachtet.

## **3 Theoretischer Hintergrund**

### **3.1 Mizellare Blockcopolymer Nanolithographie**

#### **3.1.1 Einführung in die Nano(bio)technologie**

Sowohl Nano- als auch Nanobiotechnologie werden in Zukunft viele Technologiefelder grundlegend verändern und ein enormes Innovationspotenzial bieten. Die Nanotechnologie beschäftigt sich mit Materialien im Nanobereich d.h. zwischen 0,1 und 100 nm.<sup>26</sup> Nanoteilchen besitzen andere Eigenschaften als herkömmliche Materialien und bieten daher neue Möglichkeiten für etliche Forschungsgebiete.

Nanotechnologie spielt nicht nur in der Medizin und der Forschung eine große Rolle, sondern wird auch im Alltag immer präsenter. In der Halbleiterindustrie werden mittlerweile sehr häufig Nanodrähte und Nanoröhren für die Herstellung elektronischer Chips verwendet.<sup>27</sup> Viele Plastikverpackungen und sogar Sportbekleidung enthalten Silbernanopartikel als antibakteriellen Schutz. Sonnenschutzcremes beinhalten Titandioxid- oder Zinkoxidnanopartikel die die Absorption der ultravioletten Strahlen auf der Haut verhindern.

Eine Richtung in der die Nanotechnologie ein vielversprechendes Verfahren darstellt ist die Nanobiotechnologie, wo biologische Prozesse und Funktionseinheiten unter Einbezug nanoskaliger Instrumente oder nanostrukturierter und biofunktionalisierter Grenzflächen verstanden werden können.<sup>28</sup> Im Bereich der Pharmakologie und der therapeutischen Medizin verspricht die Nanobiotechnologie hervorragende Methoden zum Transport von Medikamenten (Drug Delivery) an den gewünschten Wirkungsort im Körper. Dabei sollen Nanopartikel, die als Wirkstoffträger dienen, das Medikament schnell und zielgerecht an das betroffene Gewebe ausliefern und dort freisetzen, ohne unnötige Wechselwirkungen mit unbetroffenen Stellen einzugehen. Auf diese Weise werden Effektivität und Verträglichkeit der traditionellen Therapieverfahren verbessert. Therapiemöglichkeiten auf nanotechnologischer Basis sind vor allem in der Onkologie besonders gefragt, da dort aggressive Präparate gegen krankhaft veränderte Zellen wirken müssen, ohne die gesunden Zellen des Organismus anzugreifen. Außerdem sind auch nanostrukturierte Oberflächen zur Herstellung von bioaktiven Prothesen in den letzten Jahren erfolgreich erforscht worden.<sup>29-31</sup> Herkömmliche Implantate, die zum Beispiel bei Knochenbrüchen eingesetzt werden, besitzen einige Nachteile, wie beispielsweise schnelles Altern und schlechte Biokompatibilität. Solche Implantate sollten am besten mit dem umgebenden Gewebe gut verträglich sein das heißt

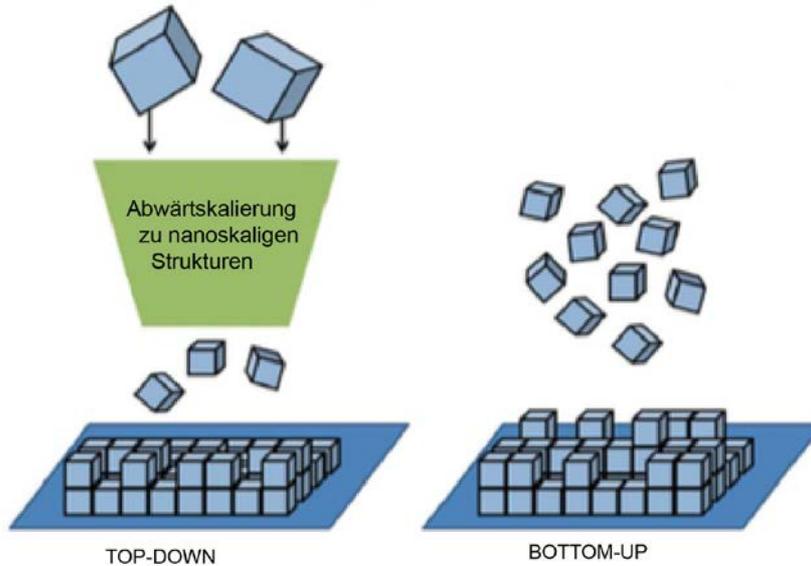
## Theoretischer Hintergrund

keine Abstoßungsreaktion auslösen und im Idealfall zusätzlich die Differenzierung der Knochenzellen fördern. Da Eigenschaften wie Nanotopographie und Oberflächenchemie der einzupflanzenden Implantate das Zellverhalten bestimmen, werden diese mittels nanotechnologischer Verfahren verändert. Somit wird die Verträglichkeit orthopädischer Implantate erhöht und die Lebensqualität der Patienten verbessert.<sup>32</sup>

### **3.1.2 Generelle Strukturierungsmethoden auf Oberflächen im Nanometerbereich**

Es wird generell zwischen zwei verschiedenen Methoden zur Erzeugung von Strukturen im Nanometerbereich auf Oberflächen unterschieden (Abb.1). In dem „top down“-Ansatz werden Verfahren benutzt, die eine Herabskalierung ermöglichen. So wird in der konventionellen Lithographie das benötigte Material mit einer Maske bedeckt und anschließend das abzutragende Material entweder einem chemischen oder physikalischen Ätzprozess ausgesetzt. Das chemische Ätzen funktioniert mit Säuren, das physikalische dagegen mit UV-Licht, Röntgenstrahlung oder Elektronenstrahlung. Die Auflösung und Größe der fertigen Nanostrukturen hängt hier von der verwendeten Strahlungswellenlänge ab.<sup>33</sup> Mit modernen nanolithographischen Methoden können Strukturen im Bereich von 10-50 nm erreicht werden.<sup>34</sup>

Der sogenannte „bottom up“-Ansatz nutzt die Fähigkeit atomarer und molekularer Baublöcke aus, sich selbst in komplexere Strukturen organisieren zu können. Dieses Verfahren beruht auf chemischen Synthesen und verlangt deshalb Optimierung in der Oberflächenvorbereitung, genaue Einstellung der Umgebungsvariablen, um eine kontrollierte Molekülabscheidung zu ermöglichen sowie Vermeidung von Verunreinigungsablagerungen.<sup>33</sup>



**Abbildung 1: Top-down und bottom-up-Ansatz. Bei der Top-down Methode werden Techniken wie Lithographie oder Stempeln verwendet, um Strukturen auf Oberflächen aufzubringen. Die Bottom-up Technologie nutzt dagegen spontane Selbstanordnungsprozesse zur Herstellung von Strukturen aus. Adaptiert nach [35].<sup>35</sup>**

### 3.1.3 Grundlagen der Selbstassemblierung

Selbstassemblierung stellt einen Prozess dar, bei dem sich einzelne Komponenten spontan zu einem vereinigten System anordnen. Meistens sind die wechselwirkenden Kräfte nicht kovalenter Natur. Die generierten Strukturen befinden sich gewöhnlich im Gleichgewicht oder zumindest in einem metastabilen Zustand.<sup>36</sup>

Selbstassemblierung wird in zwei verschiedene Typen unterteilt, die statische und die dynamische. Statischer Selbstassemblierung unterliegen Systeme, die ein globales oder lokales Gleichgewicht besitzen und keinen Zerfall verbunden mit Energieabgabe eingehen. Dieser Assemblierungstyp verbraucht zwar Energie, um die Strukturen zu bilden, sobald aber diese gebildet sind zerfallen sie nicht mehr. Bei der dynamischen Selbstassemblierung können die für die Bildung der Strukturen verantwortlichen Wechselwirkungen nur dann stattfinden, falls das System Energie aufnimmt. Die entstandenen Strukturen bleiben auch nur im Falle ständiger Energieaufnahme bestehen.<sup>37</sup>

Der Ordnungsparameter des entstehenden Systems hängt vom Verhältnis der Diffusionsrate zur Adsorption der involvierten Atome, Moleküle oder Aggregate ab. Liegt eine schnelle Diffusion und eine langsame Adsorption vor, so bildet sich ein im Gleichgewicht befindendes System, da jedes Molekül genug Zeit besitzt, um sich in ein energetisches Minimum zu

## Theoretischer Hintergrund

begeben. Bei langsamer Diffusion und schneller Adsorption bevorzugt das System dagegen kinetisch stabile Strukturen und begibt sich in ein metastabiles energetisches Minimum, falls dieses leichter zu erreichen ist als ein globales energetisches Minimum.<sup>38</sup>

### **3.1.4 Amphiphile Diblockcopolymer**

Diblockcopolymer sind Makromoleküle bestehend aus zwei Arten von Monomeren, welche in Blöcken miteinander kovalent verbunden sind. Sie werden mittels anionischer Polymerisation, die eine „lebende“ Polymerisation darstellt, hergestellt. Diese Polymerisationsart weist keine Abbruchs- oder Übertragungsreaktion auf, das heißt die Kettenenden bleiben nach Verbrauch des Monomers aktiv. Nach der Bildung des ersten Polymerblocks wird das zweite Monomer hinzugefügt und die Polymerisation kann fortgesetzt werden. Nachdem der zweite Block angewachsen ist, wird ein Abbruchsreagenz hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden.

Das Mischungsverhalten zweier Polymere kann thermodynamisch durch Gleichung 1, in der  $\Delta G_m$  die Freie Mischungsenthalpie,  $\Delta H_m$  die Mischungsenthalpie und  $\Delta S_m$  die Mischungsentropie darstellen, beschrieben werden.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

#### **Formel 1: Mischungsverhalten zweier Polymere**

Eine komplette Mischung zweier Polymere kann nur bei negativem  $\Delta G_m$  stattfinden. Bei Diblockcopolymeren wirken aufgrund zweier verschiedener Blöcke unterschiedliche intermolekulare Kräfte. Treten zwischen den beiden Blöcken keine starken Wechselwirkungen auf, so nimmt die Mischungsenthalpie positive Werte an.

Bevorzugt finden dann Wechselwirkungen zwischen chemisch ähnlichen Blöcken statt während Wechselwirkungen zwischen chemisch verschiedenen Blöcken minimiert werden. Es ist jedoch keine makroskopische Phasentrennung der Blockcopolymer möglich, da die einzelnen Blöcke kovalent miteinander verbunden sind. Der Beitrag von  $\Delta S_m$  zur Freien Mischungsenthalpie ist relativ klein, somit ist der Term  $T\Delta S_m$  nicht in der Lage die positive Mischungsenthalpie zu kompensieren. Die Phasenseparation wird bei Blockcopolymeren als Mikrophasenseparation bezeichnet, da die ausgebildeten Phasen im 10-100 nm Bereich liegen.<sup>39</sup>

Das Phasenverhalten von Diblockcopolymeren hängt von den Volumenbrüchen  $f_a$  und  $f_b$  sowie von dem Term  $\chi N$  ab. Dabei ist  $\chi$  der Flory-Huggins Parameter, der die Wechselwirkung zwischen den beiden Blöcken angibt und  $N$  ist der Polymerisationsgrad. Im Falle von  $\chi N \gg 10,5$  spricht man vom „Strong Segregation Limit“, dabei überwiegen die

## Theoretischer Hintergrund

enthalpischen Kräfte im Gegensatz zu entropischen. Die Phasen der einzelnen Blöcke liegen getrennt voneinander vor, was mit einer Streckung des Polymers verbunden ist. Für große  $\chi N$  Werte nimmt die Phasenstruktur in Abhängigkeit des Volumenbruchs  $f$  bestimmte Strukturen an (Abb.2).

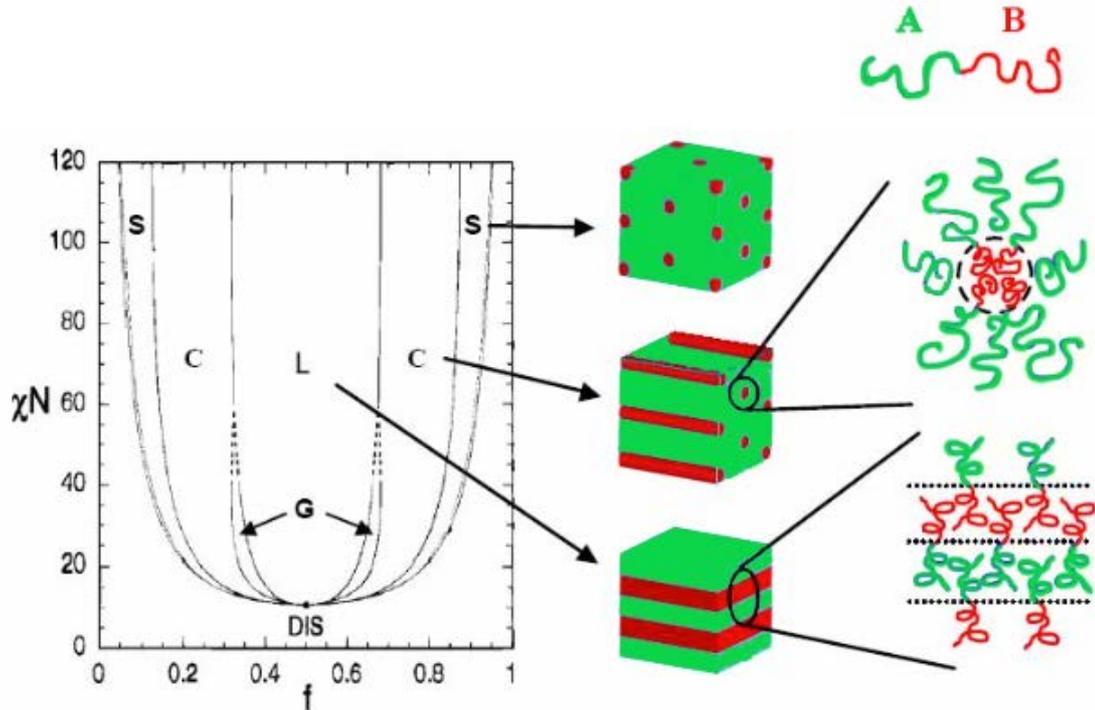


Abbildung 2: Phasendiagramm eines Diblockcopolymeren und die dazugehörigen Morphologien: S = sphärische Morphologie, C = zylindrische Morphologie, G = gyroide Morphologie, L = lamellare Morphologie.  $\chi N$  stellt dabei den Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter,  $f$  den Volumenbruch eines Blocks und  $N$  den Polymerisationsgrad des Blockcopolymeren. In dem mit DIS gekennzeichneten Bereich findet man keine Phasenseparation vor. Abbildung nach [39].<sup>39</sup>

Der Flory-Huggins Parameter verhält sich reziprok zur Temperatur und sinkt mit steigender Temperatur, die entropischen Effekte steigen dagegen an und das ganze System gewinnt an Unordnung. Dabei nimmt die Abgrenzung der einzelnen Phasen ab. Ist das Produkt  $\chi N < 10,5$  kann das Phasenverhalten durch das „Weak Segregation Limit“ beschrieben werden. Hier dominieren die entropischen Effekte über die enthalpischen und die Polymere liegen ungeordnet vor.<sup>40,41</sup>

In dieser Arbeit wurde das amphiphile Polystyrol-b-Poly(2-vinylpyridin) (PS-b-P2VP) als Diblockcopolymer verwendet (Abb.3).

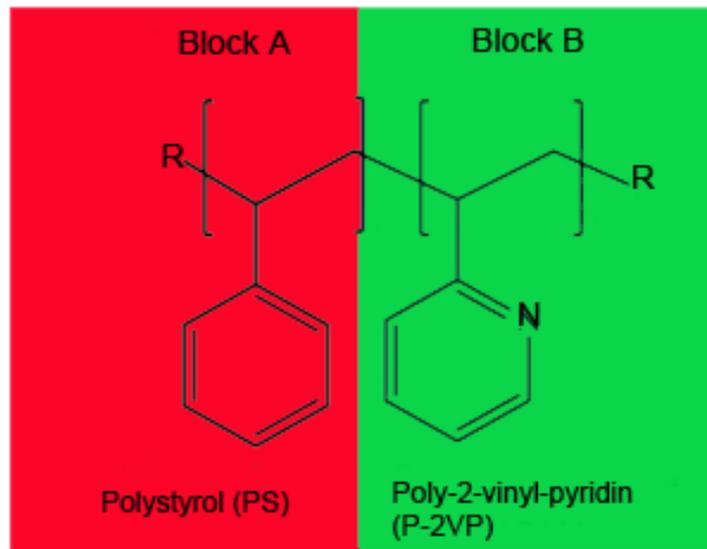


Abbildung 3: Das amphiphile Polystyrol-b-Poly-(2-vinylpyridin) (PS-b-P2VP) besitzt einen unpolaren Polystyrol-Block und einen polaren Poly-(2-vinylpyridin)-Block.

### 3.1.5 Mizellenbildung

Aufgrund ihrer unikal Struktur besitzen amphiphile Moleküle die Tendenz sich in unpolaren Lösungsmitteln in inversen Mizellen anzuordnen. Dabei bilden sie eine Kern-Schale-Struktur aus, bei der sich die polaren Reste im Innern der Mizelle befinden und durch eine unpolare Mizellenhülle vom Lösungsmittel abgeschirmt werden. Diese Anordnung erlaubt dem Polymer thermodynamisch ungünstige Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zu reduzieren. Die Bildung der Mizellen wird durch die Unverträglichkeit der Blöcke A und B beeinflusst, sterische Einschränkungen verhindern jedoch ein unendliches Zusammenwachsen der einzelnen Polymere.

Generell kann angenommen werden, dass der Prozess der Mizellenausbildung stark von der kritischen Mizellenkonzentration abhängt. Liegt die gesamte Polymerkonzentration unter der kritischen Mizellenkonzentration, so befinden sich nur einzelne Polymere in Lösung. Sobald die kritische Mizellenkonzentration überschritten wird, liegen polymolekulare Mizellen vor, welche sich im Gleichgewicht mit Einzelpolymeren befinden (Abb. 4).<sup>42,43</sup>

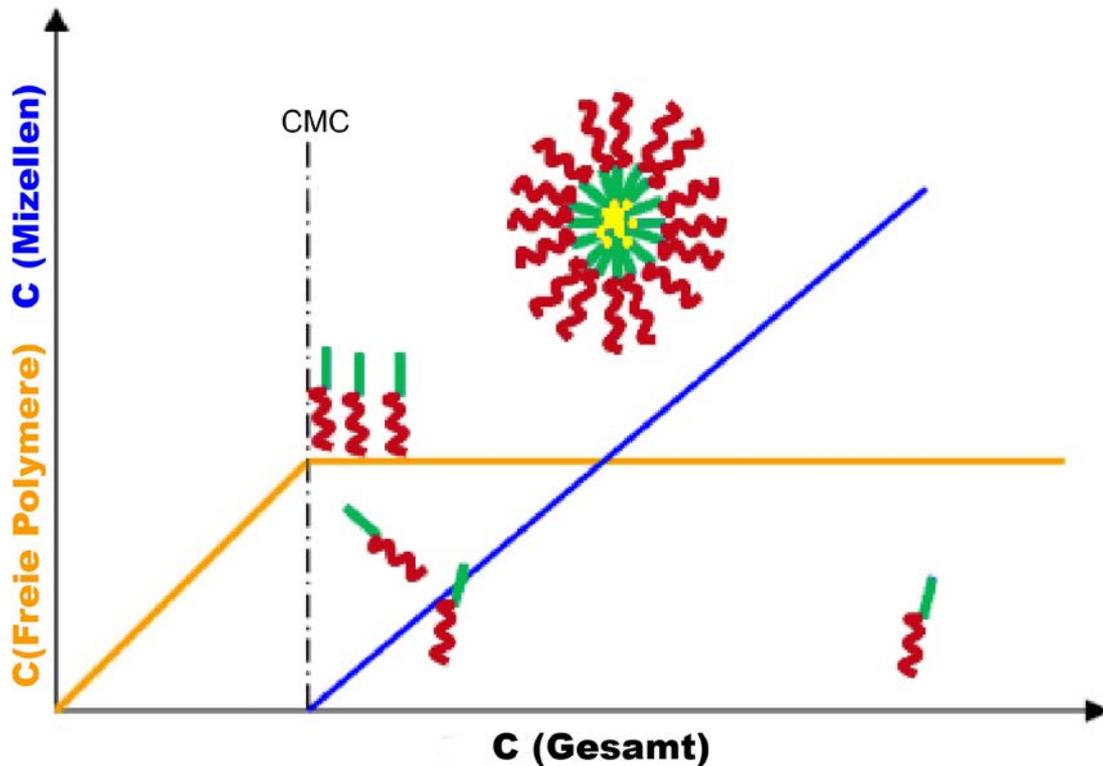


Abbildung 4: Kritische Mizellenkonzentration (CMC). Bildung der Mizellen eines Diblockcopolymers in Abhängigkeit der Polymerkonzentration.

Die Größe der Mizellen wird durch die Aggregationszahl, die Wechselwirkung zwischen der Hülle und dem Lösungsmittel sowie die Wechselwirkung der beiden Polymerblöcke beeinflusst. Die Aggregationszahl ist die Anzahl der Polymere in einer Mizelle und hängt wiederum vom Molekulargewicht des Polymers ab. Sie wird durch das sogenannte Skalengesetz beschrieben:

$$Z = Z_0 N_A^2 N_B^{-0,8}$$

Formel 2: Skalengesetz

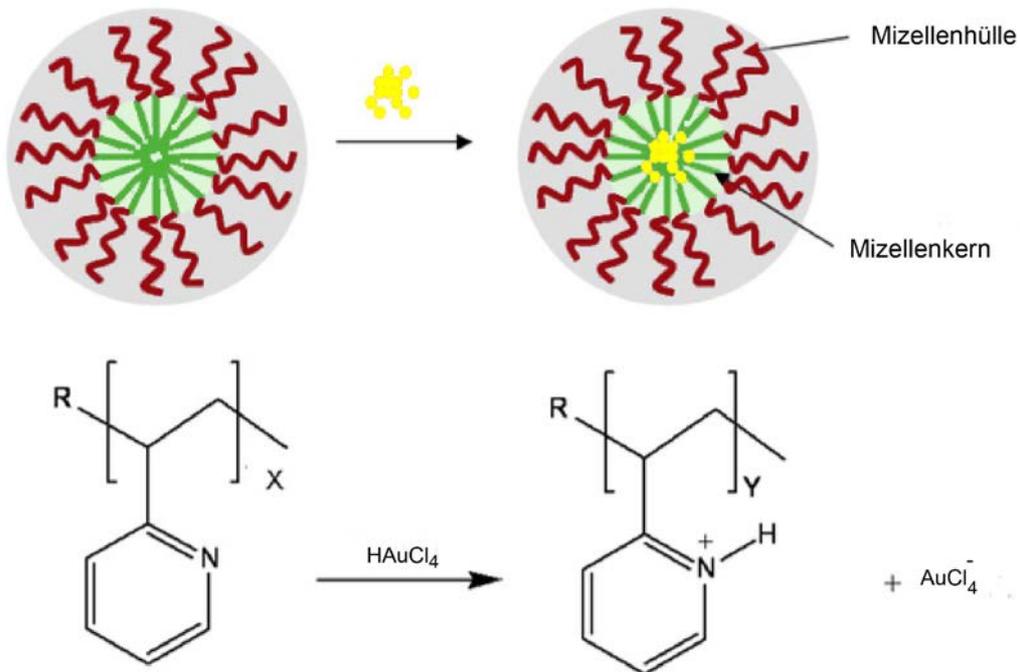
$Z_0$  hängt von der Mischungsenthalpie des unlöslichen Polymerblockes und des Lösungsmittels ab.  $N$  stellt den Polymerisationsgrad der einzelnen Blöcke dar.<sup>44</sup>

### 3.1.6 Beladung der Mizellen mit Metallsalzen

Das in dieser Arbeit verwendete Polystyrol-b-Poly-(2-vinylpyridin) bildet in unpolarem Lösungsmittel wie z.B. Toluol inverse Mizellen, wobei die 2-VP Einheiten den Kern der Mizelle ausbilden.

## Theoretischer Hintergrund

Die Kern-Hülle-Struktur einer Mizelle eignet sich hervorragend dazu mit einem Metallsalz beladen zu werden. Das Hinzufügen eines Metallsalzes, wie  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  oder  $\text{AgOAc}$ , zu der Mizellenlösung löst eine Säure-Base Reaktion zwischen dem 2-VP Kern und dem Salz aus (Abb.5.).<sup>45,46</sup>



**Abbildung 5: Beladung der Mizellen mit Tetrachlorgoldsäure.**

Die Reaktion der Polymereinheiten im Mizellenkern mit dem Salz stabilisiert die Mizelle durch Erhöhung der Polarität. Die Metallsalzbeladung steigert die Unverträglichkeit des Mizellenkerns mit unpolarem Lösungsmittel und der Mizellenhülle. Durch diese Stabilisierung wird die kritische Mizellenkonzentration deutlich herabgesetzt.<sup>47</sup>

Die Beladung  $L$  des Mizellenkernes ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl  $n$  der mit Tetrachlorgoldsäure neutralisierten 2-Vinylpyridineinheiten zur Gesamtzahl  $m$  der 2-Vinylpyridineinheiten:

$$L = n(\text{HAuCl}_4)/m(2\text{VP})$$

**Formel 3: Beladung des Mizellenkernes**

Mit Hilfe der Beladungszahl kann die Anzahl der beladenen 2-Vinylpyridineinheiten bestimmt werden. Wählt man beispielsweise  $L=0,5$  so wird jede zweite 2-Vinylpyridineinheit mit Tetrachlorgoldsäure beladen.

## Theoretischer Hintergrund

### **3.1.7 Strukturierung der Substratoberflächen**

Es existieren mehrere Methoden zur Strukturierung und Beschichtung von Substratoberflächen. Die sogenannte Rotationsbeschichtung (spin coating) wird des Öfteren in der Industrie verwendet und dient zum Auftragen verschiedener Lösungen auf flache Substrate. Dazu wird das Substrat in einer Rotationsbeschichtungsmaschine fixiert und die aufzubringende Lösung wie z.B. Polymerlösung oder Nanopartikelsuspension auf die Substratoberfläche getropft. Durch wirkende Zentrifugalkräfte bildet sich eine dünne und gleichmäßige Schicht auf der Oberfläche aus. Die Schichtdicke kann über die Rotationsgeschwindigkeit variiert werden.<sup>48</sup> Eine andere Methode stellt die Langmuir Blodgett Beschichtung dar. Dabei werden in Wasser unlösliche Substanzen, wie langkettige Fettsäuren, Amphiphile oder Alkohole, aus einem Lösungsmittel auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Dabei bilden diese Substanzen eine Monolage auf der Grenzschicht zwischen Wasser und Luft aus. Diese sogenannten Langmuir Blodgett Filme können dann auf feste Substrate transferiert werden.<sup>49</sup>

In dieser Arbeit wurde zur Bedeckung der Glassubstrate mit mizellarer Lösung das Tauchbeschichtungsverfahren (dip coating) verwendet. Bei diesem Verfahren werden die Substrate in die aufzubringende Suspension eingetaucht und anschließend mit konstanter Geschwindigkeit aus dieser wieder herausgezogen. Beim Herausziehen des Substrats bildet sich eine quasi hexagonal geordnete Monoschicht aus Mizellen auf der Oberfläche.<sup>50</sup> Dieser Prozess wird durch den konvektiven Fluss und durch laterale Kapillarkräfte während des Trocknungsprozesses dirigiert, außerdem spielen repulsive elektrostatische sowie sterische Wechselwirkungen während der Mizellenadsorption eine Rolle. Die treibende Kraft stellt dabei die Verdampfung des Lösungsmittels an der Eintauchstelle dar. Durch den konvektiven Fluss werden während des Herausziehens Partikel durch das Verdampfen bewegt und bilden eine geordnete Schicht. Durch die wirkenden attraktiven Kapillarkräfte wird die gebildete mizellare Monolage stabilisiert (Abb.6).

## Theoretischer Hintergrund

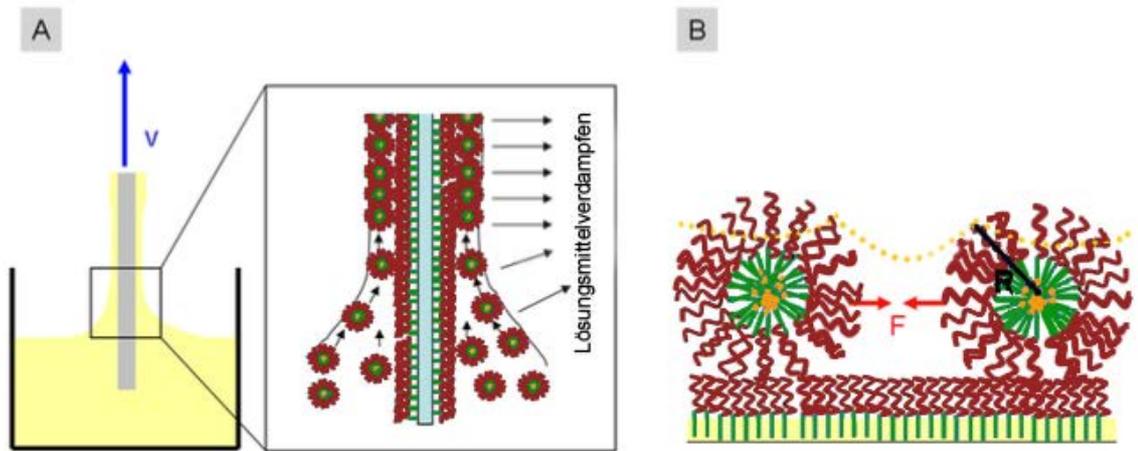


Abbildung 6: Auftretende Kräfte beim Tauchbeschichtungsverfahren: A) Konvektionsfluss aufgrund des Herausziehens. B) Kapillarkräfte zwischen den Mizellen;  $F$  = Kraft,  $R$ =Radius.

Durch die elastischen Eigenschaften der Mizellen bilden diese auch bei sehr hohen Konzentrationen Monolagen auf der Oberfläche aus. Nicht-deformierbare Partikel lassen sich dagegen nicht komprimieren und bilden bei hohen Konzentrationen Multilagen aus.<sup>47</sup>

In dieser Arbeit wurden die so generierten Oberflächen anschließend mit einem reaktiven Plasma behandelt. Das Plasma entfernt vollständig das Polymer und reduziert die Tetrachloraurationen zu elementarem Gold. Somit verbleiben nach der Plasmabehandlung hexagonal angeordnete Goldnanopartikel auf der Oberfläche.

### 3.1.8 Einflussfaktoren der Partikelabstände

Für viele Anwendungen von strukturierten Nanopartikeloberflächen ist der Abstand zwischen den einzelnen Nanopartikeln von Bedeutung.<sup>51,52</sup> Unterschiedliche experimentelle Faktoren können dabei zum Einstellen der Abstände ausgenutzt werden.

Durch die Molekulargewichtvariation des Blockcopolymers kann der Radius der Mizellen eingestellt werden. Bei Verwendung von längeren Polymeren kann ein größerer Mizellenradius erzielt werden. Größere Mizellen dienen als größere Abstandshalter für die Partikel und resultieren im Endeffekt in höheren Partikelabständen. Der Radius einer trockenen Mizelle kann durch folgende Formel beschrieben werden<sup>47</sup>:

$$M_{Mizelle} = \frac{Z M_w}{N_A} = \rho_{Mizelle} \frac{4}{3} \pi R^3$$

Formel 4: Gewicht einer Mizelle

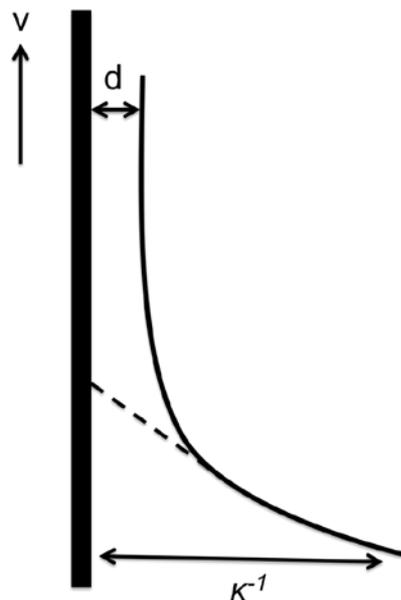
Dabei stellt  $M_{Mizelle}$  das Gewicht einer Mizelle,  $Z$  die Aggregationszahl (Anzahl der Polymerketten pro Mizelle),  $M_w$  das Molekulargewicht des Polymers und  $N_A$  die Avogadro Konstante dar. Ist die Mizellendichte idealerweise gleich der Polymerdichte, so lässt sich der Radius für eine bestimmte Aggregationszahl bestimmen. Aufgrund von Deformationen, welche

## Theoretischer Hintergrund

die Mizellen nach der Adsorption auf der Oberfläche eingehen, weicht der theoretisch berechnete vom realen ab. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Formel weder Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel<sup>52</sup> noch die Beladung mit Tetrachlorgoldsäure einbezieht. Diese Interaktionsarten beeinflussen jedoch den Radius zusätzlich.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, den Nanopartikelabstand durch die Mizellenkonzentration zu justieren. Dies hat den Vorteil, dass auf diese Weise ein und dasselbe Polymer zur Herstellung bestimmter Partikelgröße mit unterschiedlichen Nanopartikelabständen verwendet werden kann. Dabei ergibt eine höhere Polymerkonzentration kleinere Abstände, da die Mizellen auf der Oberfläche dichter gepackt werden als bei niedrigeren Konzentrationen.

Ein zusätzliche Option zum Regulieren der Partikelabstände besteht in der Schichtdicke der aufzubringenden Suspension.<sup>53</sup> Die Schichtdicke hängt mit der Anzahl der Mizellen pro Fläche zusammen und wird durch Viskosität und Kapillarität bestimmt. Abbildung 7 zeigt den Meniskus, der beim Herausziehen des Substrats aus einer Newtonschen Lösung entsteht.



**Abbildung 7: Meniskus eines vertikal eintauchenden Substrates. Gestrichelte Linie veranschaulicht den Meniskus einer ruhenden Oberfläche. Die durchgezogene Linie dagegen den Meniskus vertikal nach oben bewegten Oberfläche.**

Die gestrichelte Linie zeigt dabei den Meniskus einer vertikal still stehenden Oberfläche, welcher entsteht wenn die Adhäsion innerhalb der Lösung größer ist als die Kohäsion. Die durchgezogene Linie veranschaulicht den Meniskus einer Probe, die vertikal nach oben bewegt

## Theoretischer Hintergrund

wird. Durch langsames Herausziehen entsteht ein dünnerer Film auf dem Substrat, da weniger Flüssigkeit von diesem mit hochgezogen wird. Durch höhere Rückzugsgeschwindigkeit entsteht somit ein dickerer Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche. Die maximale Schichtdicke kann durch folgende Formel beschrieben werden <sup>54</sup>:

$$h_{\infty} = 0,94 \cdot \kappa^{-1} \cdot C_a^{\frac{2}{3}}$$
$$h_{\infty} = 0,94 \cdot \sqrt{\frac{\sigma}{\rho g}} \cdot C_a^{\frac{2}{3}}$$

**Formel 5: Maximale Schichtdicke**

Hierbei bezeichnet  $h_{\infty}$  die Schichtdicke in großer (unendlicher) Entfernung vom Meniskus,  $\kappa^{-1}$  die Kapillarlänge,  $\sigma$  die Oberflächenspannung,  $\rho$  die Dichte,  $g$  die Erdbeschleunigungskonstante,  $C_a$  die Kapillaritätszahl. Die Kapillaritätszahl wird durch das Verhältnis von Kapillaritätskräften zu Oberflächenspannung an Flüssig-Gas Phasengrenze definiert:

$$C_a = \frac{\eta V}{\sigma}$$

**Formel 6: Kapillaritätszahl**

wobei  $\eta$  die dynamische Viskosität,  $V$  die Rückzugsgeschwindigkeit und  $\sigma$  die Oberflächenspannung darstellen. Damit lässt sich die Formel 5 wie folgt umschreiben:

$$h_{\infty} = 0,94 \cdot \frac{(\eta V)^{\frac{2}{3}}}{\rho g^{\frac{1}{2}} \sigma^{\frac{1}{6}}}$$

**Formel 7: Maximale Schichtdicke umgeformt mit Hilfe der Kapillaritätszahl**

Der beschriebene Zusammenhang für die maximale Schichtdicke gilt nur für sehr kleine Kapillaritätszahlen ( $C_a \ll 1$ ), für das hier verwendete System kann dies angenommen werden. Laut der Gleichung 7 hängt die Schichtdicke somit von der Viskosität und der Rückzugsgeschwindigkeit ab.

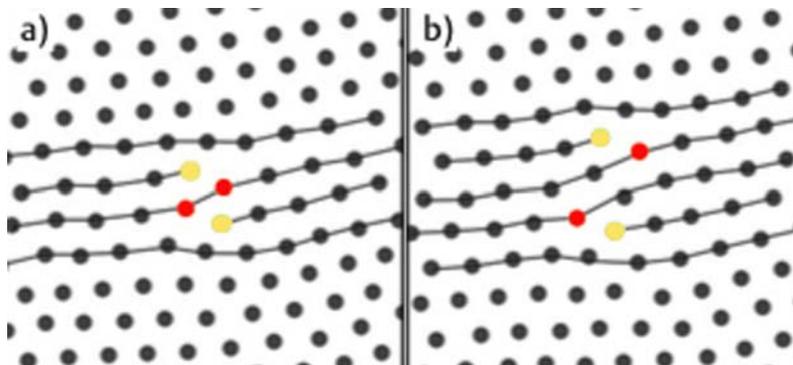
### **3.1.9 Ordnungsparameter**

Die Ablagerung der Goldnanopartikel mit Hilfe der mizellaren Blockcopolymer-Nanolithographie (BCMN) resultiert in einer quasi hexagonalen Anordnung auf der Oberfläche. Um die Ordnung des gebildeten Musters zu charakterisieren, wurde eine quantitative Beschreibung der Qualität des Musters eingeführt. Um ein mögliches Modell auf das quasi hexagonale Muster anwenden zu können, vergleicht man es mit einer Kristallgitterstruktur. Ein kristalliner Feststoff besitzt zwei Ordnungsarten. Eine davon ist die

## Theoretischer Hintergrund

translatorische Ordnung, bei der alle Partikel in einem ausgewählten Bereich über eine große Distanz gleiche Abstände zu ihren Nachbarpartikeln besitzen. Dies wird durch eine radiale Verteilungsfunktion  $g(r)$  ermittelt, welche die gemittelte Packungsdichte als Funktion der Radialdistanz  $r$  ausgehend von einem Partikelzentrum angibt. Die zweite ist die orientierte Ordnung, die zwei Partikel mit einem großen Abstand zueinander beschreibt. Alle Nachbarn dieser zwei Partikel liegen in gleicher Orientierung bezüglich definierter Achsen.

Flüssigkeiten besitzen dagegen keinerlei Fernordnung jeglicher Art. Die Abnahme der Ordnung in einem kristallinen Feststoff beim Schmelzen wird durch die Theorie von Kosterlitz, Thouless, Halperin, Nelson und Young (KTHNY) beschrieben.<sup>55</sup> Sie schlagen eine sogenannte hexatische Phase zwischen einem Kristall und einer isotropen Flüssigkeit vor. Thermische Verschiebungen der Partikel führen dabei zu lokalen elastischen Verzerrungen in der kristallinen Phase. Diese thermische Auslenkungen können vier benachbarte Teilchen so verschieben, dass zwei Teilchen davon fünffach und zwei siebenfach statt sechsfach koordiniert sind. Somit entstehen zwei gebundene 5-7 Dislokationspaare mit entgegengesetzter Richtung. Mit steigender Temperatur wächst die Anzahl der Dislokationspaare bis schließlich die Schmelztemperatur erreicht ist und die Dislokationspaare sich voneinander trennen Abbildung 8.



**Abbildung 8: Partikel mit 5 nächsten Nachbarn sind gelb und Partikel mit 7 nächsten Nachbarn sind rot dargestellt. a) Ein Dislokationspaar b) bei steigender Temperatur trennt sich das Dislokationspaar**

Jetzt haben sie die Möglichkeit im Kristall frei zu diffundieren. Durch die freien Dislokationspaare wird die Translationsordnung zerstört. Die Orientierungsordnung bleibt dabei global erhalten, denn die Dislokationen verschieben lediglich die Gitterlinien, ihre Orientierung bleibt dabei erhalten. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur können die freien Dislokationen dissoziieren und bilden fünffach und siebenfach koordinierte Teilchen, die als Disklinationen bezeichnet werden. Da die Disklinationen keine Vorzugsrichtung aufweisen, zerstören sie die Orientierungsordnung und bilden damit eine isotrope Flüssigkeit.<sup>56</sup>

## Theoretischer Hintergrund

Die Formel 8 stellt einen Ordnungsparameter für eine Partikelanordnung dar, mit dessen Hilfe die Translationsordnung beschrieben werden kann.<sup>57</sup>

$$\Psi_{\vec{G}}(\vec{r}) = \exp(i\vec{G} \cdot \vec{r})$$

### **Formel 8: Ordnungsparameter**

$\vec{G}$  ist hier der reziproke Gittervektor der Anordnung. Sowohl für Disklinationen als auch für Dislokationen geht der Ordnungsparameter  $\Psi_{\vec{G}}(\vec{r})$  gegen Null. Jedoch beeinflusst die Disklination in einem hexagonal geordneten zweidimensionalen System zusätzlich die lokale Orientierung der Bindungen zwischen den nächsten Nachbarn. Aus diesem Grund wird zur Quantifikation dieser lokalen Orientierungsordnung ein zusätzlicher Ordnungsparameter  $\Psi_6(r_j)$  eingeführt.

$$\psi_6(r_j) = \frac{1}{N_j} \sum_{k=1}^{N_j} \exp(i6\theta_{jk})$$

### **Formel 9: Ordnungsparameter in Abhängigkeit des Winkels der Bindungsseiten j und k**

$\theta_{jk}$  ist dabei der Winkel der durch die Bindungsseiten j und k in Bezug auf eine Referenzseite  $r_j$  gebildet wird.  $N_j$  stellt die Gesamtzahl der Partikel durch welche die lokale Ordnung bestimmt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen der KTHNY Theorie zur Bestimmung des Ordnungsparameters der quasi hexagonal angeordneten Goldnanopartikel verwendet. Der gemittelte Ordnungsparameter aller hexagonal orientierten Partikel in einer REM Aufnahme wird mittels Formel 10 berechnet:

$$\psi_6(r_j) = \frac{1}{N(t)} \sum_{j=1}^{N(t)} \sum_{k=1}^{N_j} \exp(i6\theta_{jk})$$

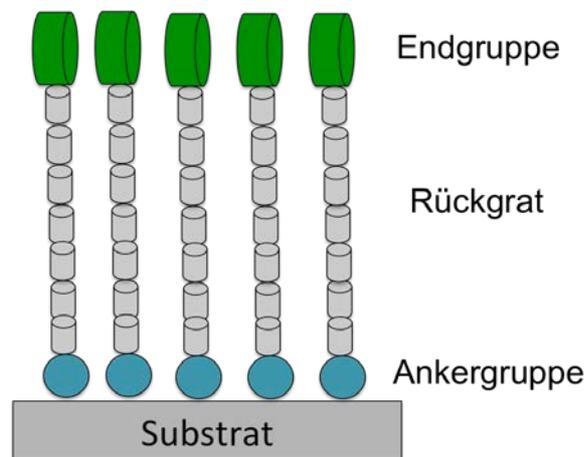
### **Formel 10: Gemittelter Ordnungsparameter aller hexagonal orientierten Partikel**

$N_t$  steht für alle Partikel in einem Bild ( $t=1$ ). Der Ordnungsgrad kann Werte zwischen Null und Eins  $0 < \Psi_6 < 1$  annehmen.  $\Psi_6=0$  gilt für komplette Unordnung und  $\Psi_6=1$  für perfekte Ordnung. Gleichung 10 wurde in ein ImageJ Plugin eingebaut und ermöglicht es, den Ordnungsparameter von Gold-Nanopartikeln auf Oberflächen zu bestimmen, welche durch REM-Aufnahmen visualisiert wurden.

## 3.2 Funktionalisierung von Oberflächen

### 3.2.1 Selbstorganisierende Monolagen (SAM)

SAMs (self assembled monolayers) sind geordnete Ansammlungen von Molekülen, die spontan durch Adsorption auf einer festen Oberfläche entstanden sind. Moleküle, die fähig sind solche hochgeordnete Monolagen auszubilden, bestehen aus einer oberflächenaktiven Ankergruppe, einem Rückgrat und einer Endgruppe Abbildung 9.



**Abbildung 9: Aufbau einer selbstorganisierten Monolage**

Am häufigsten werden zur Ausbildung von geordneten Monolagen Alkylthiole, Arylthiole, Organosilane, Fettsäuren sowie Alkylamine auf Metallen wie Gold, Silber, Platin, Kupfer oder Silizium eingesetzt.<sup>58</sup> Durch den Einsatz unterschiedlicher Adsorptionsmoleküle können unterschiedliche Oberflächeneigenschaften wie z.B. Benetzbarkeit oder Reaktivität generiert werden. Unter anderem finden SAMs Anwendung als chemische Bindungsgruppen für weitere Moleküle. In der Biologie spielen selbstorganisierte Monolagen ebenfalls eine große Rolle. Hier dienen sie als Ankermoleküle für biologisch aktive Substanzen oder verhindern unspezifische Proteinadsorption auf Oberflächen.

Generell werden SAMs entweder aus einer Lösung oder einer Gasphase abgeschieden.<sup>59</sup> Meistens ist die Sättigungsbedeckung der Oberfläche schon nach wenigen Minuten erreicht. Der vollständige Selbstordnungsprozess findet jedoch nachfolgend in mehreren Stunden statt.<sup>60</sup> Der Wachstumsprozess einer Monolage beginnt mit der Physisorption, bei der die Moleküle zuerst zur Oberfläche diffundieren und an ihr mittels van-der-Waals-Kräfte haften bleiben. Am Ende dieses schnell stattfindenden Prozesses sind 80-90 % der Oberfläche mit den Molekülen bedeckt. Im weiteren Schritt erfolgt die Chemisorption, wobei es zur Ausbildung chemischer

## Theoretischer Hintergrund

Bindungen zwischen der Oberfläche und den Molekülen kommt. Eine günstige Ausrichtung der Rückgratketten wird zur Minimierung der sterischen Abstoßung und Erhöhung der van-der-Waals-Kräfte angestrebt.

Bei der Bildung einer organisierten Monoschicht spielen mehrere Energiearten eine Rolle. Die treibende Kraft stellt bei der Bildung einer geordneten Monoschicht die Adsorption dar, somit erfolgt der wichtigste Energiegewinn bei der Anbindung der Ankergruppe an das Substrat. Die Rückgratketten wechselwirken miteinander über van-der-Waals-Kräfte und gewinnen somit an Energie je dichter sie aneinander gepackt sind. Wechselwirkungen zwischen den Endgruppen können abhängig von ihrer Größe und chemischen Eigenschaften ebenfalls energiegewinnend ablaufen. Bei dem Physisorptionsschritt hängt der Energiegewinn von der Kettenlänge und ihrer chemischen Eigenschaft ab. Sehr lange Alkanketten bringen z.B. einen hohen Energiegewinn ein, jedoch liegt dann zwischen Physisorption und Chemisorption eine höhere Energiebarriere, die anschließend überwunden werden muss (Abb. 10).<sup>59</sup>

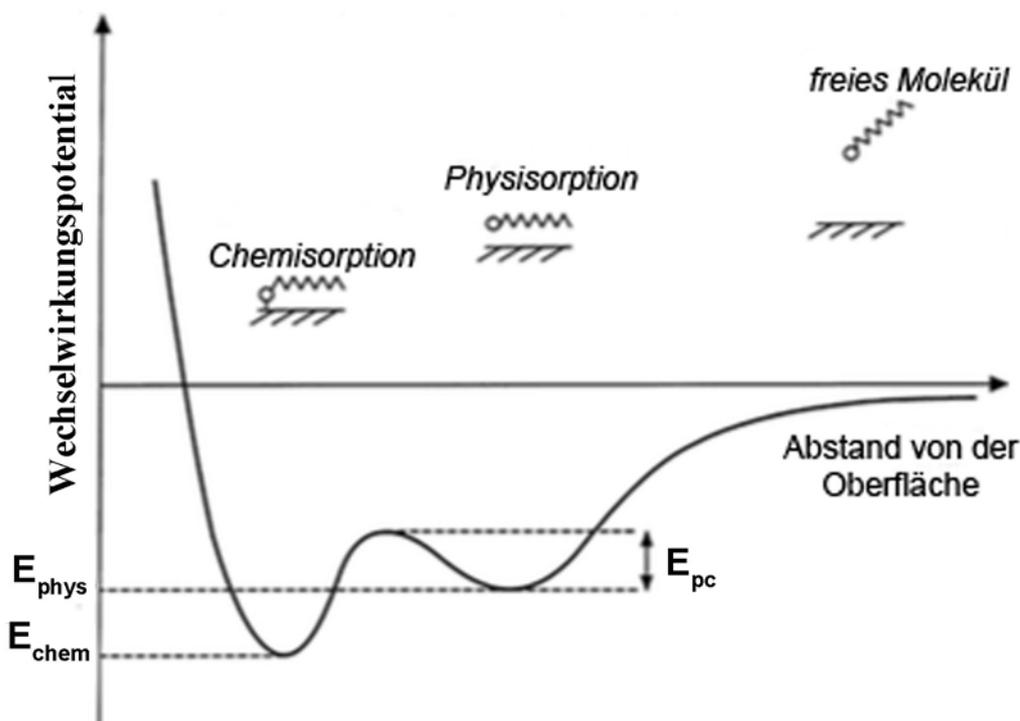


Abbildung 10: Wechselwirkungspotential einer Adsorption in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Molekül und Oberfläche. Nach [31]

### 3.2.2 Thiolmonolagen auf Gold

Selbstorganisierte Monolagen aus Thiolverbindungen auf Goldsubstraten, werden in der Forschung sehr häufig aufgrund ihrer hohen Stabilität, hervorgerufen durch die starke Gold-Schwefel-Bindung (120-180 kJ/mol),<sup>61</sup> verwendet. Sie bilden schon bei Raumtemperatur hochgeordnete und stabile Monolagen aus. Am häufigsten werden dabei Alkanthiole eingesetzt,

## Theoretischer Hintergrund

aber auch Moleküle wie Thioether, Thioacetate, Thiocyanate und Thiocarbamate spielen eine Rolle bei der Bildung der SAMs. Die Bindung des Thiols an die Goldoberfläche kann als oxidative Addition mit anschließender reduktiver Eliminierung des Wasserstoffs dargestellt werden.<sup>58</sup>

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt, läuft der erste Adsorptionsschritt innerhalb weniger Minuten ab und die Substratoberfläche ist danach fast vollständig bedeckt. Die Kinetik ist dabei stark von der Konzentration des Thiols in der Lösung abhängig.<sup>60</sup> Des Weiteren ist die Kettenlänge des Thiols für Dynamik der Reaktion verantwortlich. Für längere Alkanthiole sind dabei 2-12 Stunden ausreichend um geordnete Monolagen zu bilden, bei kürzeren Molekülen dauert es dagegen ungefähr 24 Stunden.<sup>62</sup>

Die Adsorption der Organothiole erfolgt in einem minimalen Abstand, der durch den Platzbedarf der Ketten bedingt wird. Um einen optimalen Abstand auf der Oberfläche zu erreichen, werden die Ketten der Thiolmoleküle um  $30^\circ$  zu der Oberflächennormalen geneigt und das Schwefelatom liegt hier in der  $sp^3$ -Hybridisierung vor. Diese Anordnung erlaubt es den Molekülen eine möglichst dichte Monolage auszubilden (Abb. 11).<sup>63</sup>

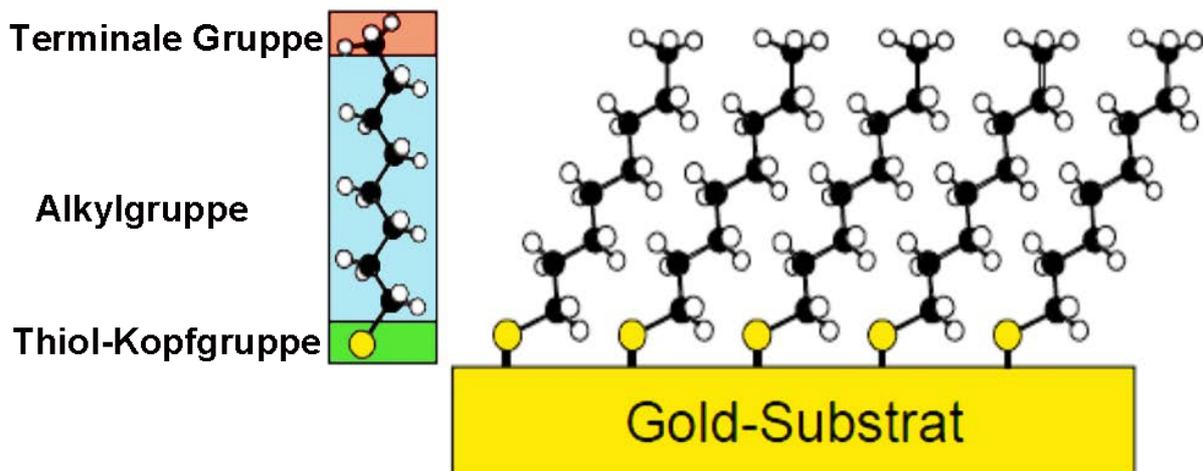


Abbildung 11 : Selbst assemblierte Monolagen eines Octanthiols auf einem Goldsubstrat.

### 3.2.3 Silanisierung von hydroxyterminierten Substraten

Zur Bildung von Monolagen auf hydroxyterminierten Oberflächen wie Glas oder Silizium bieten sich besonders Alkylsilanverbindungen an. Dabei werden Moleküle wie Trichloro-Trimethoxy- oder Triethoxysilane eingesetzt, die kovalente Bindungen mit der festen Oberfläche ausbilden. Der Selbstordnungsprozess hängt von mehreren Parametern, wie Wasseranwesenheit im System, Lösungsmittel oder Reaktionstemperatur und -zeit, ab.<sup>64</sup>

## Theoretischer Hintergrund

Auf Glas oder Siliziumoberflächen entstehen schon bei der Herstellung und beim Kontakt mit der Umgebungsluft Hydroxylgruppen.<sup>65</sup> Diese Hydroxylgruppen ermöglichen im Allgemeinen die Reaktion mit Silanen. Dabei wird die Oberfläche unter Alkoholabspaltung verestert, die dabei ablaufende Reaktion kann in drei Schritte unterteilt werden (Abb. 12). Im ersten Schritt hydrolysieren die Silane zu den entsprechenden Silanolen. Diese scheiden sich auf der aktivierten Oberfläche ab und physisorbieren dort im zweiten Schritt. Anschließend folgt eine Chemisorption der Silanole, die danach miteinander Kondensationsprodukte ausbilden können. Silanole können auch schon vor der Physisorption in Lösung zu polymeren Aggregaten kondensieren und sich in einer Konkurrenzreaktion zu den monomeren Silanolen auf der Oberfläche absetzen. Adsorption polymerer Aggregate resultiert in inhomogener Topographie und kann durch die richtige Wahl der Reaktionsbedingungen vermindert werden.<sup>66</sup>

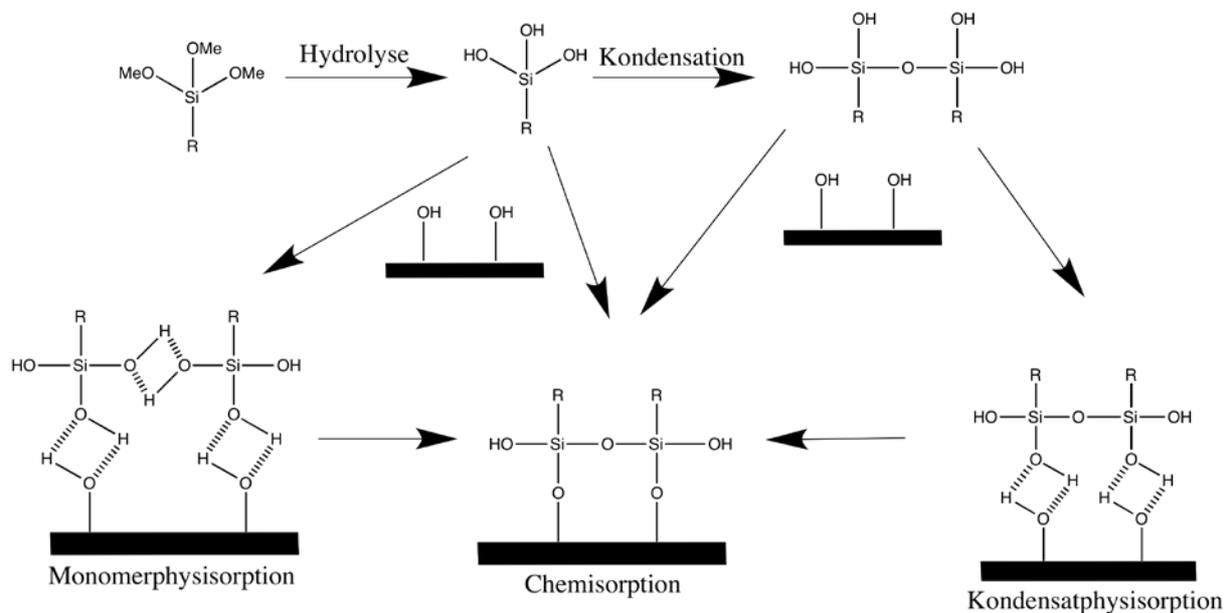


Abbildung 12: Schema der Silanreaktion mit hydroxyterminierten Oberflächen. Nach [37]

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Passivierung verwendete Silan-Verbindung ist in Abbildung 34 Abschnitt 3.2.4 dargestellt.

### 3.2.4 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) ist ein lineares oder verzweigtes Polyethermolekül, welches in den Molmassenbereichen von 200 bis mehreren Millionen g/mol erhältlich ist. Seine hohe Wasserlöslichkeit beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ethersauerstoff und den Wassermolekülen. Aufgrund seiner nicht toxischen Wirkung wird PEG bevorzugt auf dem biomedizinischen Gebiet eingesetzt.<sup>67</sup> Zur Herstellung von

## Theoretischer Hintergrund

Polyethylenglykol kommt das Ethylenoxid zum Einsatz, welches durch kontrollierte Oxidation bei 300 °C und erhöhtem Druck aus Ethylen hergestellt wird. Das Polyethylenglykol wird dann durch einen ringöffnenden Polymerisationsmechanismus des Ethylenoxids gewonnen. Es sind sowohl anionische wie kationische Polymerisationen möglich, jedoch wird die anionische Strategie bevorzugt. Diese verläuft ohne Nebenreaktionen und lässt sich besser kontrollieren, was eine engere Polydispersität erlaubt.

Der Aggregatzustand des PEGs hängt stark von seinem Molekulargewicht ab. Bei einem Molekulargewicht unter 400 g/mol liegt das PEG in flüssiger Form vor, ab einem Molekulargewicht von 600 g/mol weist es eine pastenartige Konsistenz auf und ab 2000 g/mol findet man PEG als feste Substanz vor.<sup>68</sup>

### **3.2.5 Proteinabweisende Eigenschaft von Polyethylenglykol**

Polyethylenglykol hat in den letzten Jahren aufgrund seiner proteinabweisenden Wirkung immer mehr an Bedeutung im Bereich der Biomedizin gewonnen.<sup>69</sup> Es existieren verschiedene Theorien, die das hohe Potential unspezifische Proteinadsorption abzuweisen, erklären.<sup>70,71</sup>

Das Modell der sterischen Repulsion setzt eine maximale PEG-Dichte voraus und postuliert, dass es bei Annäherung des Proteins an die Oberfläche zu einer sterischen Abstoßung des Proteinmoleküls durch die PEG-Ketten kommt. Diese Theorie beruht auf den Phänomenen der Volumeneinengung und dem Volumenausschluss. Beim Ersteren bewirkt die Annäherung eine Kompression der PEG-Ketten. Durch die Kompression, die mit der Volumeneinengung einhergeht, wird eine Entropieabnahme der Makromoleküle verursacht, da diese im entspannten Zustand mehr Konformationsmöglichkeiten als im komprimierten Zustand besitzen (Abb. 13). Der Zustand der komprimierten PEG-Schicht ist entropisch ungünstig und somit für die Adsorption der Proteine energetisch unvorteilhaft. Beim Volumenausschluss wird dagegen ein Durchdringen der PEG-Schicht angenommen, was ebenfalls zur konformativen Entropieabnahme führt. Jedoch findet zusätzlich ein Verdrängen der Wassermoleküle aus der Kontaktzone statt. Das Verdrängen der Wassermoleküle bringt eine Enthalpieänderung mit sich. Insgesamt führt der ganze Prozess zu einer Zunahme der freien Enthalpie und ist für die Proteinadsorption thermodynamisch ungünstig.

Des Weiteren wirkt sich die Mobilität der PEG-Ketten auf die Proteinresistenz aus. Da PEG-Moleküle keine sperrigen Seitenketten besitzen, sind sie im Stande, sich frei auf der Oberfläche zu bewegen. Aufgrund der schnellen Fluktuation der Polymerketten auf der Oberfläche wird ein Absetzen des Proteins auf dieser verhindert. Längere PEG-Moleküle weisen eine schnellere Bewegung auf der Oberfläche auf und besitzen aufgrund dessen eine höhere Proteinabstoßung (Abb. 13).<sup>70</sup>

## Theoretischer Hintergrund

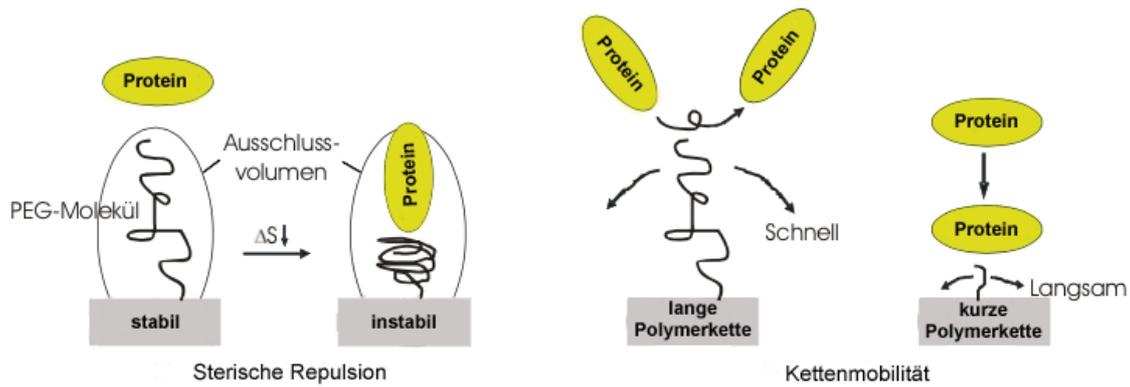


Abbildung 13: Mechanismen der Proteinresistenz einer PEG-Schicht. Links: Durch Kompression verlieren PEG-Moleküle Freiheitsgrade. Rechts: Proteinresistenz durch Kettenmobilität. Längere Polymerketten besitzen eine höhere proteinabweisende Wirkung. Nach [41]

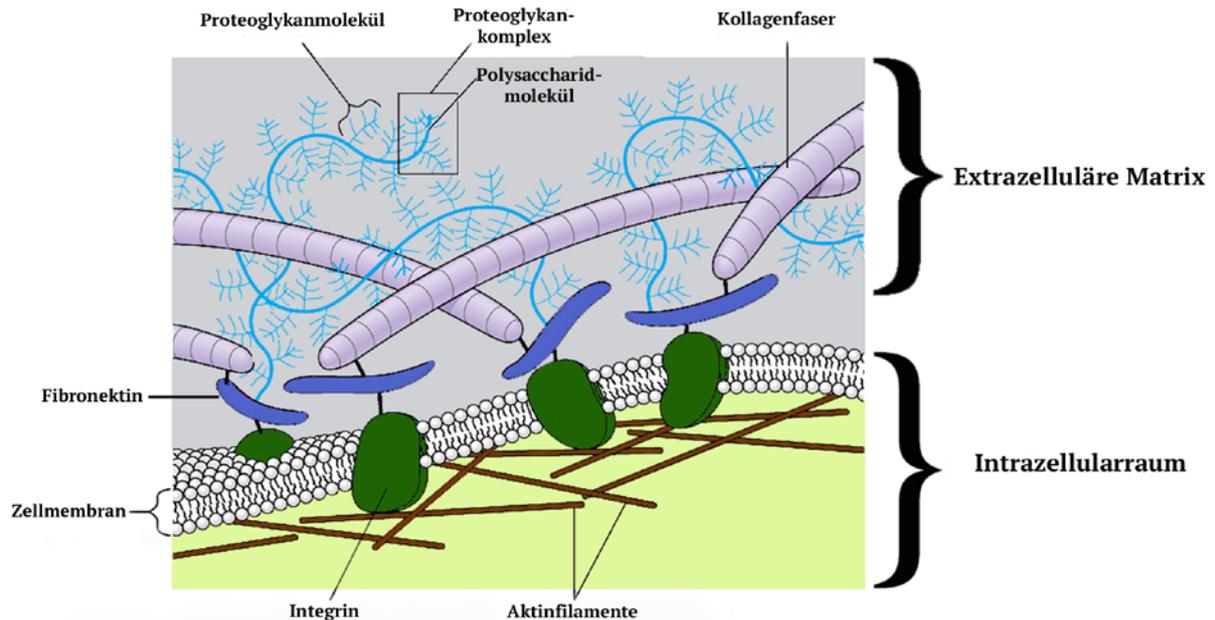
## 3.3 Zelladhäsion und Wechselwirkung der Zellen mit biomimetischen Substraten

### 3.3.1 Die extrazelluläre Matrix

Im Gewebe stehen Zellen in engem Kontakt mit komplexen extrazellulären Makromolekülen, die in der Gesamtheit die extrazelluläre Matrix (EZM) bilden. Somit ist die extrazelluläre Matrix ein Netzwerk aus verschiedenartigen Molekülen, die Zellen untereinander verbindet. Sie sorgt für strukturelle Organisation der Zellen und die mechanische Stabilität von Geweben. Außerdem spielen diese Verbindungen eine signifikante Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie der embryonalen Entwicklung, Entzündungen oder Wundheilung von Geweben. Eine grundlegende Aufgabe der EZM besteht darin, Signale zwischen Zellen und ihrer Umgebung zu übermitteln. Dabei wechselwirken die Makromoleküle der EZM mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren der Zelle und lösen dadurch entsprechende Signalkaskaden aus.<sup>72</sup>

Die Hauptbestandteile der EZM setzen sich aus zwei Klassen zusammen: den sogenannten Faserproteinen und den Glycosaminen. Die Faserproteine, wie Kollagen, Fibronectin und Elastin, sind für die mechanische Stabilität und Struktur der extrazellulären Matrix verantwortlich, bilden aber auch die Adhäsionskomponenten für Zellen. Die Glykosaminoglykane hingegen kommen, meistens in der Form der Proteoglykane, kovalent an ein Protein gebunden, vor (Abb. 14).

## Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 14: Struktur der Extrazellulärmatrix.** (Adaptiert nach Pearson Education, Inc., publishing Benjamin Cummings)

Glykosaminoglykane (GAGs) sind nicht verzweigte Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen. Da die meisten GAGs stark negativ geladen sind durch substituierte Aminozucker, tendieren sie dazu Natriumionen anzuziehen und besitzen so eine ausgeprägte hygroskopische Wirkung. Aufgrund ihrer voluminösen gelartigen Eigenschaft, bilden GAGs einen Quelldruck aus und bieten somit der EZM hohe Standhaftigkeit gegen Druckbelastungen.

Kollagene besitzen meist eine lange starre dreisträngige Helixstruktur, bestehend aus drei Kollagenpolypeptidketten, die seilartig umeinander gewickelt sind. Einzelne Kollagenmoleküle bilden nach der Sekretion in den Extrazellulärraum hochpolymere Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 10-300 nm und einigen hundert Mikrometern in der Länge aus. Im Gegensatz zu GAGs, die Druckbelastungen gegenwirken, weisen Kollagenfibrillen eine hohe Beständigkeit gegen Zugkräfte auf. In unterschiedlichen Geweben besitzen Kollagenfibrillen unterschiedliche Strukturen. In der Säugetierhaut bilden sie meist ein komplexes Flechtwerk aus, welches Zugkräfte in mehrere Richtungen aushalten kann. Im Sehngewebe dagegen sind die Fibrillen in parallelen Bündeln entlang der Hauptachse der Zugkraft angeordnet.

Viele Wirbeltiergewebe, wie Haut, Blutgefäße oder Lungen, müssen je nach Funktion nicht nur Belastungen aushalten, sondern auch elastisch sein. Die Hauptkomponente des elastischen Gewebes besteht aus Elastin, dem hoch hydrophoben Protein, welches reich an Glycin und

## Theoretischer Hintergrund

Prolin ist und nur einige Hydroxyprolin- und Hydroxylysingruppen enthält. Der biosynthetische Vorgänger des Elastins Proelastin wird in den extrazellulären Raum abgesondert und lagert sich in der Nähe der Zellmembran zu elastischen Fasern zusammen. Nach der Sekretion werden Tropoelastin Moleküle miteinander zur Ausbildung eines komplexen Netzwerks verknüpft.<sup>72</sup>

Die EZM enthält zahlreiche nicht kollagene Proteine, die typischerweise unterschiedliche Domänen, z.B. zur Bindung anderer EZM Makromoleküle oder Oberflächenrezeptoren der Zelle, besitzen. Somit tragen diese Proteine nicht nur zur Organisation der Matrix bei, sondern helfen den Zellen auch an diese anzubinden. Das Erste entdeckte Protein dieser Klasse war das Fibronektin, ein großes Glykoprotein, welches in allen Wirbeltieren vorkommt. Fibronektin ist ein Dimer bestehend aus zwei Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 15). Fibronektin gehört zu den Multiadhäsionsproteinen und besitzt unter anderem eine Bindungsstelle für Integrine. Diese Bindungsstelle enthält die RGD Tripeptidsequenz, welche sich aus den Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D) zusammensetzt. Dabei bietet die RGD Sequenz keine spezifische Bindungsstelle für ein bestimmtes Integrin, sondern ist in der Lage an verschiedene Integrine zu binden.<sup>72</sup>

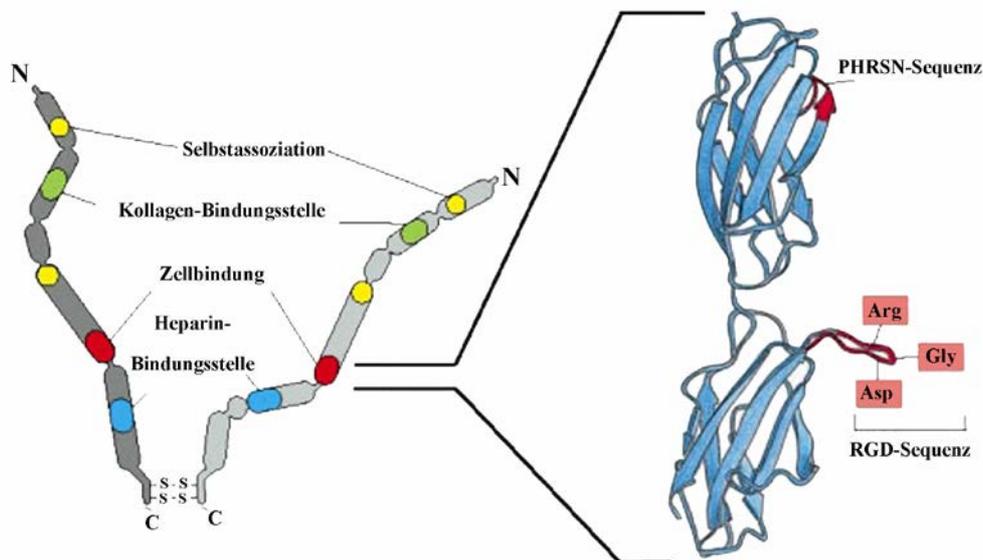


Abbildung 15: Fibronektinstruktur. Links: Die zwei Polypeptidketten sind über Disulfidbrücken verbunden. Rechts: RGD Sequenz. Nach [42]

### 3.3.2 Transmembranrezeptoren

Die Zelladhäsion spielt in vielen physiologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose eine große Rolle. Sie ist darüberhinaus auch in pathologische Prozesse wie der Metastasierung involviert. Die Adhäsions- und Kommunikationsvorgänge der Zelle werden dabei durch Zelladhäsionsmoleküle bzw. -rezeptoren vermittelt. Dabei wird zwischen Zell-

## Theoretischer Hintergrund

Zell-Adhäsion, die Kontakte zwischen mehreren Zellen herstellt und Zell-Matrix-Adhäsion, die Zellen in die extrazelluläre Matrix einbindet, unterschieden.

Zelladhäsionsmoleküle durchspannen die Zellmembranoberfläche und lassen sich aufgrund ihrer Struktur in vier Hauptfamilien und zwei Kleingruppen einteilen.<sup>73</sup> Zu den Hauptgruppen gehören die Selektine, die Immunoglobulin-Superfamilie, die Cadherin-Superfamilie und die Integrine. Die beiden kleineren Gruppen stellen die Syndekane<sup>74</sup> und die Disintegrine<sup>75</sup> dar. Abgesehen von ihrer Struktur werden Zelladhäsionsmoleküle bezüglich ihres Adhäsionsmechanismus abgegrenzt. Da zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  die Funktion einiger Adhäsionsmoleküle beeinflussen, wird zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiger und  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängiger Adhäsion unterschieden.<sup>76</sup>

### 3.3.3 Integrine

Die Bezeichnung Integrin wurde nach der ersten Charakterisierung der Membranproteinkomplexe 1986 vorgeschlagen und deutet daraufhin, dass das Protein die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbindet.<sup>77</sup> Integrine sind Heterodimere, die aus einer nicht kovalent miteinander verbundenen  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit bestehen. In Wirbeltieren wurden 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten entdeckt die miteinander 24 verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften bilden können (Abb. 16).<sup>78</sup>

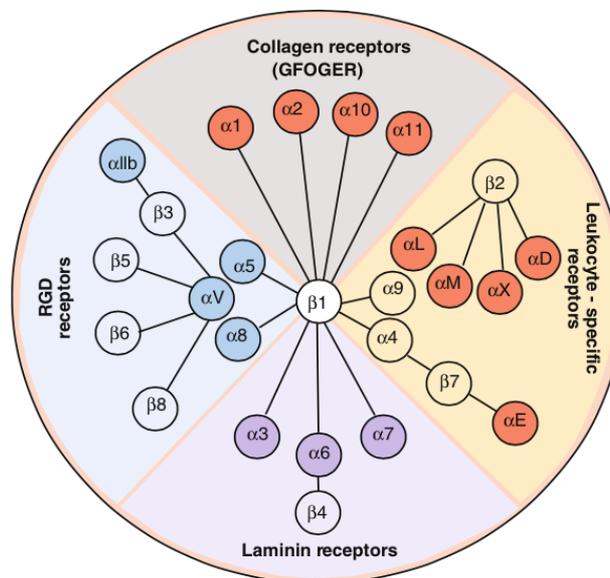
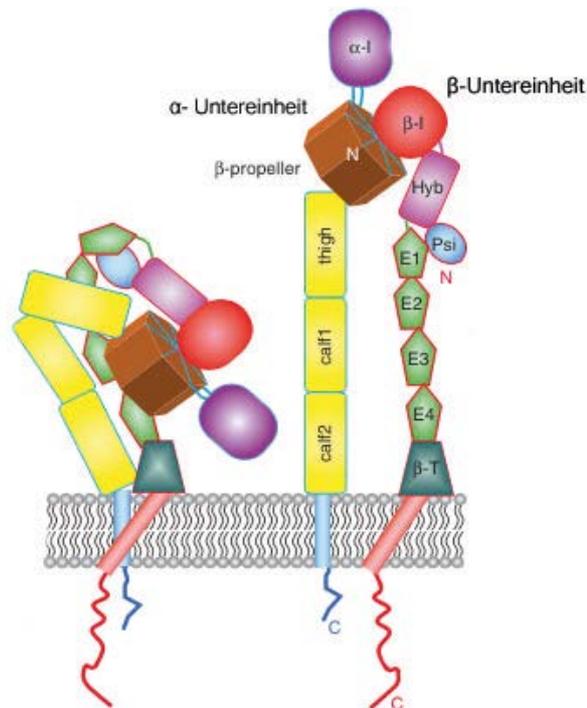


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Integrinfamilie. Es existieren 24 unterschiedliche Integrintypen die verschiedene EZM Proteine binden können. Nach [49]

## Theoretischer Hintergrund

Die Untereinheiten bestehen aus mehreren Domänen die durch flexible Bindungen miteinander verlinkt sind. Die Integrine besitzen einen großen extrazellulären Anteil, durchqueren die Membran und weisen ein kleines zytoplasmatisches Ende auf. Die Größe der einzelnen Untereinheiten variiert je nach Integrintyp und beinhaltet etwa 1000 Aminosäuren in der  $\alpha$ - und etwa 750 Aminosäuren in der  $\beta$ -Untereinheit. Die allgemeine Struktur der Ektodomäne eines Integrins ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der abgelenkten und aufrechten Konformation des Integrins.**  
Nach [53]

Die  $\alpha$ -Kette besteht aus vier bis fünf unterschiedlichen Domänen, dazu gehören der siebenblättrige  $\beta$ -Propeller, die Tigh-Domäne, die Calf1- und Calf2-Domänen, sowie eine  $\alpha$ -I-Domäne, die in 9 Integrinen enthalten und zwischen dem dritten und zweiten Blatt des  $\beta$ -Propellers platziert ist (Abb. 17). Drei oder vier der letzten  $\beta$ -Propellerblätter weisen auf der entgegengesetzten Seite zur Ligandenbindung  $\text{Ca}^{2+}$  Bindungsstellen auf. Somit spielt die  $\text{Ca}^{2+}$  Bindung eine entscheidende Rolle bei der Bindung eines EZM-Liganden. Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus 7 flexibel miteinander verbundenen Domänen, wobei die  $\beta$ -I Domäne eine Kopie der  $\alpha$ -I Domäne darstellt. Des Weiteren ist eine Pexin-Semaphorin-Integrin Domäne, eine

## Theoretischer Hintergrund

Hybriddomäne und vier cysteinreiche EGF (Epidermal Growth Factor) Module in der  $\beta$ -Untereinheit enthalten. Die  $\beta$ -I Domäne besitzt eine  $Mg^{2+}$  Bindungsstelle, MIDAS (metal ion dependent adhesion site) und direkt in Nachbarschaft eine Bindungsstelle für inhibitorisches  $Ca^{2+}$ , die ADMIDAS (adjacent MIDAS) genannt wird. Außerdem findet man noch eine Bindungsstelle für  $Mn^{2+}$ , die nach der Bindung des Ions zu einer Konformationsänderung führt und das Integrin in seine aktive Form überführt.

Die Kristallstruktur eines heterodimeren Integrins konnte seine kompakte, geknickte Konformation belegen.<sup>79</sup> Spätere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dieser Konformation, um eine inaktive Form handelt.<sup>80,81</sup> Bei der Aktivierung verursacht ein inside-out Signal, dass sich das Integrin am Stelzenknie aufrichtet und wie ein Klappmesser aus seiner geknickten, inaktiven in die aktive, gestreckte Konformation übergeht (Abb. 17). In der geknickten Form ist der Integrinkopf (bestehend aus dem  $\beta$ -Propeller und der  $\beta$ -I Domäne) zur Zellmembran abgesenkt und somit unfähig einen EZM Liganden zu binden.<sup>82</sup> Die Ligandenbindungsstelle befindet sich an der Schnittstelle des  $\beta$ -Propellers und der  $\beta$ -I Domäne, wobei Integrine, welche eine  $\alpha$ -I Domäne besitzen auch über diese den Liganden binden.<sup>78</sup>

Ein Drittel der Integrine binden an die RGD-Sequenz, die zum Beispiel in Fibronectin enthalten ist (Kapitel 2.3.1). Dabei bindet das RGD an der Verbindungsstelle zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Die RGD-Einheit passt dabei perfekt in den Spalt zwischen einer  $\beta$ -Propeller-Untergruppe und dem Säurerest in der  $\beta$ -I Domäne, der ein Kation bindet. RGD-bindende Integrine sind fähig auch andere EZM Moleküle zu binden, jedoch ist die Affinität dabei deutlich geringer: Diese Tatsache spiegelt die Genauigkeit der Passform zwischen RGD-Sequenz und Bindungstasche wider.<sup>82</sup>

Die Anbindung der EZM Moleküle leitet ein Agglomerieren (Clustern) der einzelnen Integrine und eine anschließende Bindung unterschiedlicher Fokaladhäsionsproteine sowie Aktinfilamente ein (Abb. 18). Dadurch ist die Zelle im Stande Signale an ihre Umgebung weiterzuleiten und diese auch aus der Außenwelt zu empfangen (inside-out und outside-in signaling).

## Theoretischer Hintergrund

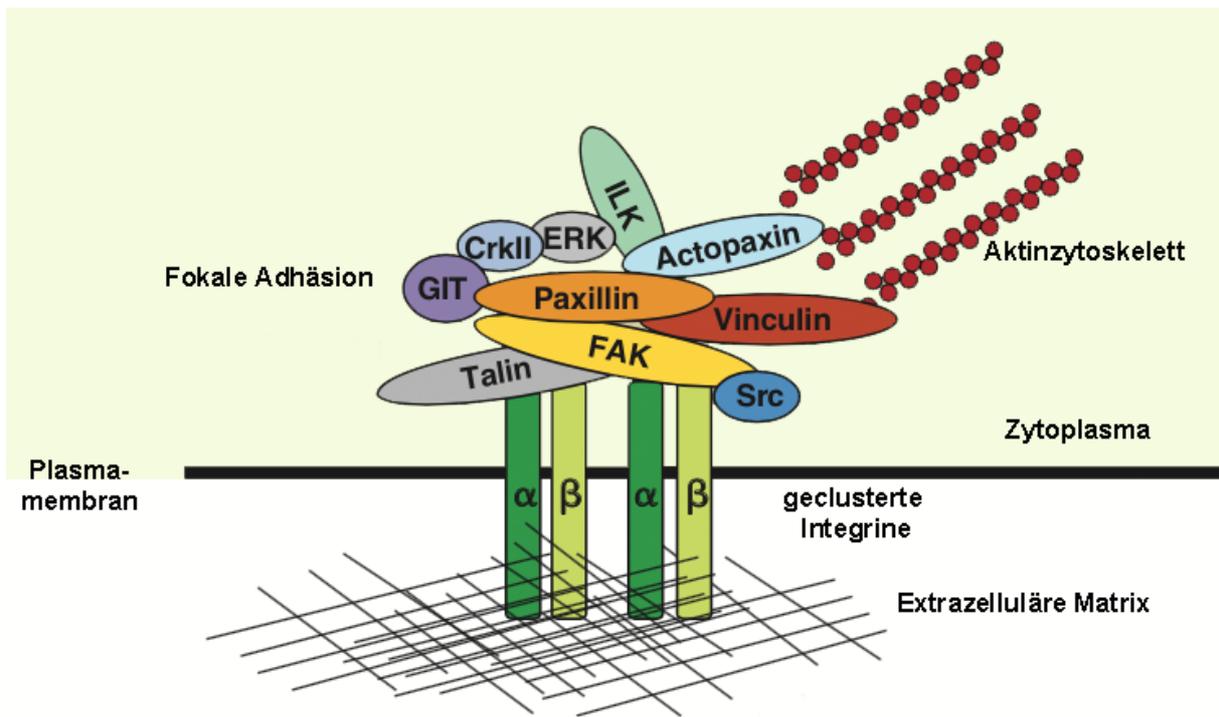


Abbildung 18: Integrinvermittelte Adhäsion leitet das Clustern der Integrine, Rekrutierung unterschiedlicher Fokaladhäsionsproteine sowie die Anbindung an das Aktin ein. Nach [66]

### 3.3.4 Fokale Adhäsionen

Zellen besitzen die Fähigkeit ihre Mikroumgebung zu erkennen und sich dieser anzupassen, indem sie ihre Morphologie und ihre Motilität ändern. Durch integrinvermittelte Adhäsion bilden sich fokale Komplexe aus, die an das Aktinzytoskelett binden und somit nicht nur die biochemische Zusammensetzung der näheren Umgebung erkennen, sondern auch z.B. ihre Elastizität, Topographie oder den Abstand der Liganden.<sup>8</sup> Fokale Komplexe entwickeln sich mit der Zeit zu fokalen Adhäsionen, die durch lokale Anhäufung der Integrine entstehen und eine Großzahl an Fokaladhäsionsproteinen enthalten (Abb. 18,19).

## Theoretischer Hintergrund

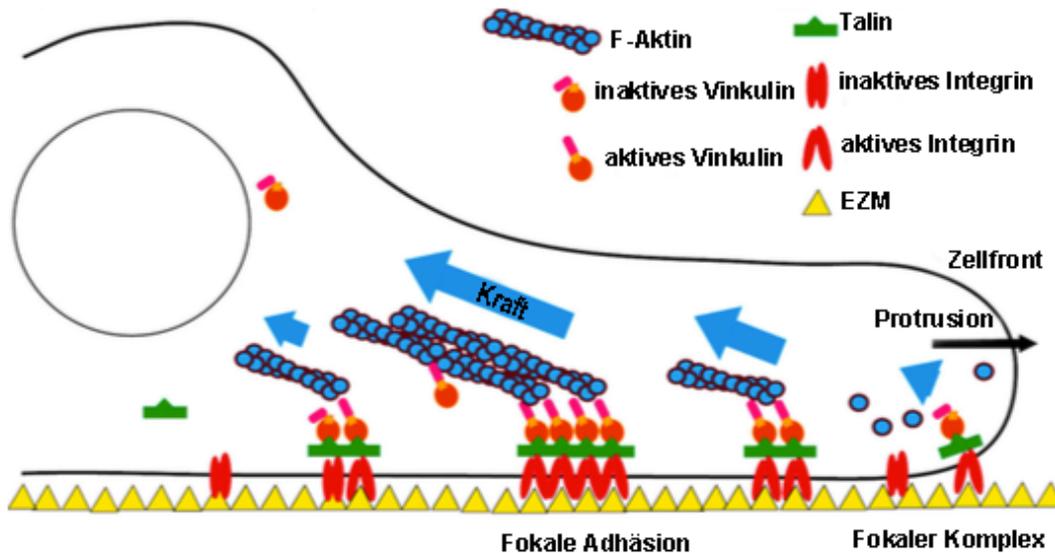


Abbildung 19: Das Clustern der Integrine, sowie Anlagerung von fokalen Adhäsionsproteinen und Anbindung an das Aktinzytoskelett reifen fokale Komplexe zu fokalen Adhäsionen. Nach [59]

Sie können nicht nur die Integrine innerhalb des Zytoplasmas mit den Aktinfasern verbinden, sondern auch diverse Signalkaskaden aktivieren.<sup>83</sup> Die Komponenten der fokalen Adhäsionen können sehr unterschiedlich sein und bestehen aus Gerüstproteinen, GTP-asen<sup>84</sup> und Enzymen, wie Kinasen, Phosphatasen oder Proteasen und Lipasen. In den Fokaladhäsionen existieren mehrere Protein-Protein Wechselwirkungen, die es der Zelle erlauben, unterschiedliche Signalkomplexe zu generieren und ihr Verhalten dementsprechend anzugleichen.

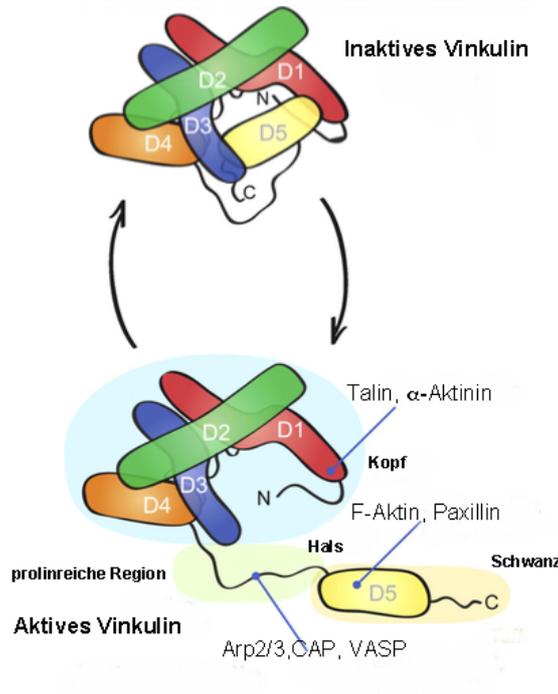
### 3.3.5 Vinculin

Wie oben schon erwähnt, werden zur Bildung stabiler fokaler Adhäsionen mehrere Adhäsionsproteine rekrutiert. Dabei spielt das Adapterprotein Vinculin eine wichtige Rolle bei der Regulation der fokalen Adhäsionen. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, wiesen Zellen mit einer reduzierten Vinculinexpression verminderte Adhäsion von EZM-Proteinen, eine erhöhte Migrationsrate und nur wenige schwache Adhäsionskontakte auf.<sup>85,86</sup>

Die Struktur des Vinculins beinhaltet drei verschiedene Domänen: einen N-terminalen Kopf, einen flexiblen prolinreichen Hals und die C-terminierte Schwanzdomäne (Abb. 20). Aktivierung des Vinculins resultiert aus den konformationellen Änderungen dieser drei Domänen. Dabei finden intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der Kopf- und der Schwanzdomäne statt, die das Vinculin in seine inaktive Form überführen. Wird nun Vinculin rekrutiert um an den fokalen Adhäsionen teilzunehmen, geht es in seine aktivierte offene Form über. Das Vinculin ist nur in der Lage fokale Adhäsionen auszubilden, wenn eine Bindung des Talins an die geöffnete aktivierte Form erfolgt. Die Wechselwirkung mit Talin führt zum

## Theoretischer Hintergrund

Zusammenschluss der Integrine und somit zur Vergrößerung der fokalen Adhäsionen (Abb. 18,19).<sup>87</sup>



**Abbildung 20: Schematische Darstellung des Vinculinaufbaus und seiner aktiven und inaktiven Form. Nach [60]**

Die Aktivierung des Vinculins ermöglicht es, mehreren Interaktionspartnern an dieses zu binden. Bis dato wurden 19 verschiedene Bindungspartner für das Vinculin identifiziert,<sup>88</sup> unter anderem gehören dazu  $\alpha$ -Aktinin, Talin und Paxillin (Abb. 21). Diese direkt bindenden Proteine sind wiederum in der Lage an andere Proteine zu binden und somit das Vinculin an ein ganzes Signalsystem zu koppeln.<sup>89</sup>

Das Vinculin ist in der Lage sowohl direkt als auch über andere Proteine an das Aktinzytoskelett zu binden. Die direkte Wechselwirkung wird über zwei Stellen in der Schwanzdomäne vermittelt. Nach der Aktivierung des Vinculins wird die Bindung zum Aktin ausgebildet und die Aktinpolymerisation eingeleitet. Durch diese Bindung ist es dem Vinculin möglich, die Weiterleitung der Signale zwischen Zellmatrix und dem Zytoskelett zu vermitteln. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Menge des rekrutierten Vinculins an den Adhäsionsstellen, mit den ausgesetzten Kräften an der Zellmatrix korreliert.<sup>90</sup>

## Theoretischer Hintergrund

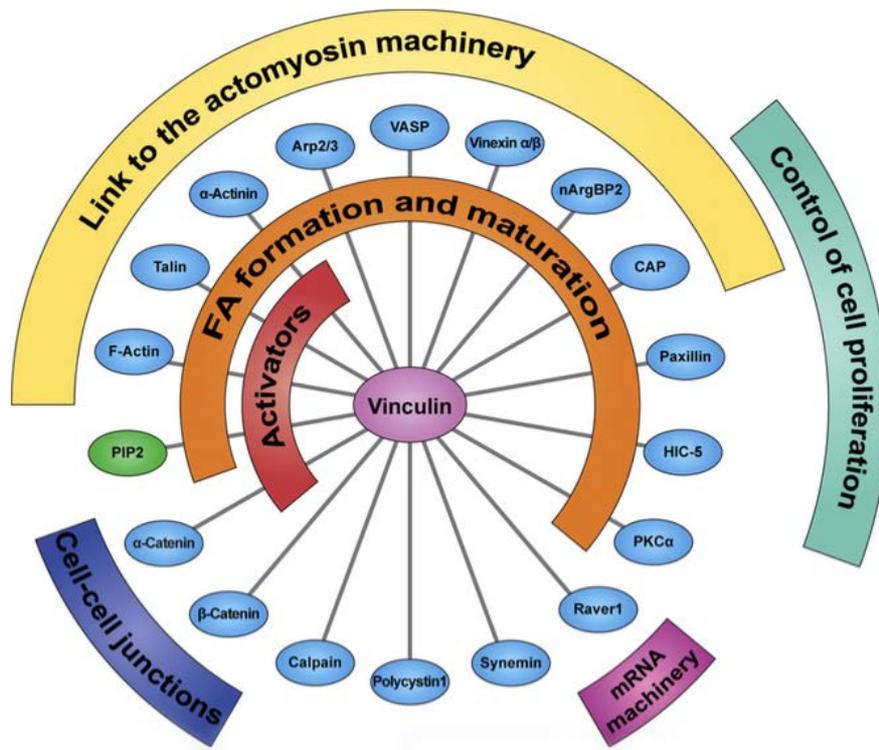


Abbildung 21: Direkte Bindungspartner von Vinculin und ihre weitergehenden Funktionen. Nach [60]

### 3.3.6 Paxillin

Paxillin ist ein relativ kleines Fokaladhäsionsprotein, welches mehrere Bindungsstellen für verschiedene Struktur- und Signalmoleküle besitzt. Es besteht aus zwei grundlegenden Strukturdomänen, dem Aminoterminus und dem Carboxyterminus, welches wiederum aus 4 aneinandergereihten LIM-Domänen zusammengesetzt ist (Abb. 22). Die sogenannten LIM-Domänen sind doppelte Zinkfinger, wobei jede aus 50 Aminosäuren besteht. Diese besitzen unter anderem die Funktion das Paxillins mit der Membran zu verbinden.<sup>91</sup> Die meisten Bindungspartner von Paxillin stammen aus den Gruppen der Kinasen und Phosphatasen mit der Hauptfunktion die Paxillinrekrutierung zu regulieren und die allgemeine Organisation der fokalen Adhäsionen zu steuern. Phosphorylierung durch FAK und SRC einiger Einheiten am Aminoterminus ist wichtig für die Weiterleitung externer Signale, die zur Zellmotilität und zur Regulation der Genexpression durch MAP-Kinase Kaskaden beitragen.<sup>92</sup>

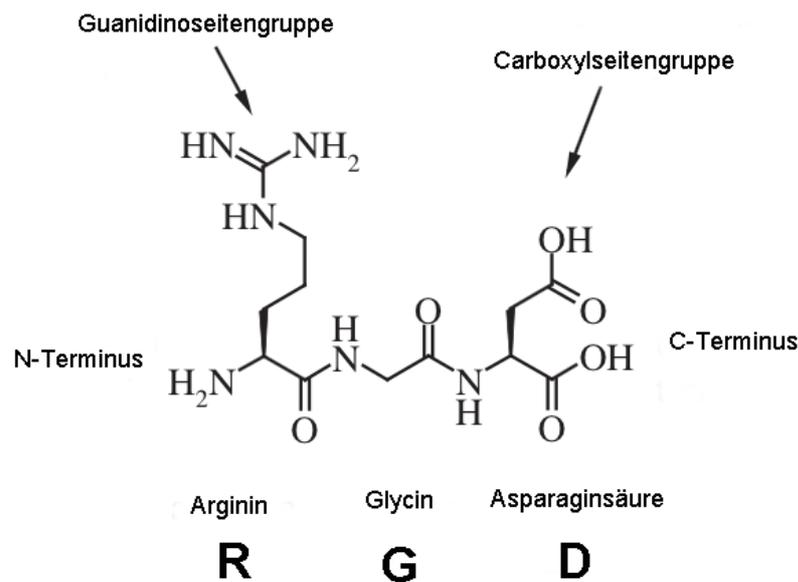


## Theoretischer Hintergrund

Proteins durch Oberflächeneigenschaften wie Benetzungsverhalten, Topographie oder Ladung beeinträchtigt.<sup>98,99</sup> Auf hydrophoben Oberflächen tendieren Proteine hauptsächlich zur Wechselwirkung durch hydrophobe Aminosäuren, was zur Denaturierung oder zumindest einer anderen Präsentation des Bindungsmotivs für die Zelle führt.<sup>100,101</sup>

Die oben erwähnten Probleme können durch Verwendung kurzer, synthetischer Peptide, die Zellbindungsmotive repräsentieren, vermieden werden. Kurze Peptide bieten auch die Möglichkeit nur ein einziges Bindungsmotiv zu tragen, während EZM-Proteine meistens mehrere Bindungsmotive beinhalten und somit nicht nur einen einzigen transmembranen Rezeptor aktivieren.<sup>23</sup>

Bei dem Versuch makromolekulare Peptide zu kleinen Sequenzen zu reduzieren, wurde die RGD-Sequenz (Abb. 23) als die kürzeste zelladhäsionsfördernde Peptidsequenz in Fibronectin entdeckt.<sup>12</sup> Einerseits kann dieses RGD-Peptid als Inhibitor für Zelladhäsion eingesetzt werden, andererseits fördern sie diese, wenn das Peptid auf der Substratoberfläche immobilisiert wird.

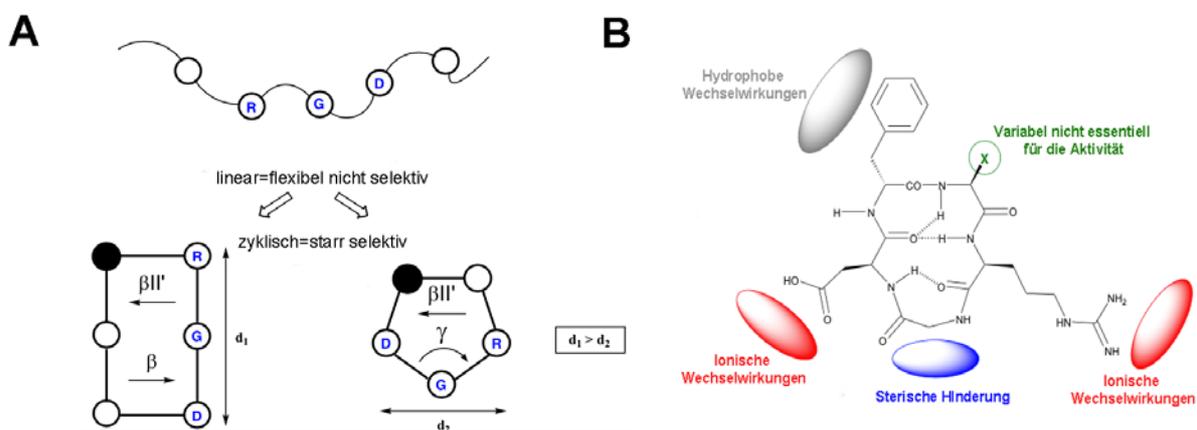


**Abbildung 23: Die in natürlichen EZM-Molekülen vorkommende RGD-Sequenz bestehend aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Nach [68]**

Fast die Hälfte aller Integrine bindet an die RGD-Sequenz, wie z.B. das  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.<sup>23</sup> Die Affinität zu unterschiedlichen Integrinen wird durch die Konformation der RGD-bildenden Schleife und der sie umgebenden Aminosäuren in dem entsprechenden EZM-Protein begründet. Wird die RGD-Sequenz aus dem EZM-Protein isoliert, so verliert es seine Affinität und Selektivität.<sup>12</sup> Die Funktion des RGD-Tripeptids kann entweder durch Blockierung der C-terminalen Carboxygruppe oder durch Verbindung mit flankierenden

## Theoretischer Hintergrund

Aminosäuren gemäß der natürlichen Umgebung im Protein wiederhergestellt werden.<sup>102</sup> Weil lineare Peptide einer langsamen enzymatischen Degradation unterliegen und außerdem aufgrund ihrer Flexibilität nicht selektiv mit den Rezeptoren wechselwirken, werden cyclische Peptide für die Synthese zelladhäsiver Sequenzen verwendet (Abb. 24).<sup>103</sup> Vor allem zyklische Pentapeptide basierend auf der RGD-Sequenz in unterschiedlicher Konformation haben sich bewährt. Die Stereochemie der zusätzlichen Aminosäuren übt einen großen Einfluss auf die Konformation der RGD-Sequenz und somit auch auf seine Selektivität aus.<sup>104</sup> Peptide sind üblicherweise, wie oben erwähnt, sehr flexible Moleküle und können viele Konformationen in Lösung eingehen. Durch Einführung sterischer Einschränkungen können sie dazu ausgenutzt werden, Modelle mit einer rezeptorpassenden relativ starren Konformation zu entwickeln. Einschränkungen in der konformativen Freiheit verbessern die Bindung an den Rezeptor, wenn das biologisch aktive Molekül ohne große Anstrengung in die Bindungstasche anbinden kann. Deswegen ist es von Vorteil das Rückgrat eines Peptides zu zyklisieren um die „Bindungsfläche“ zu minimieren. Vor einigen Jahren haben Kessler *et al.* systematisch eine *L*-Aminosäure nach der anderen in einem RGDFV-Pentapeptid durch eine identische *D*-Aminosäure ausgetauscht und dabei eine aktive und selektive Verbindung gegen das  $\alpha\beta3$ -Integrin entdeckt (Abb. 24).<sup>104</sup>



**Abbildung 24: A: Durch Zyklisierung des linearen RGD kann die Selektivität erhöht werden. B: Das Cyclopentapeptid c-RGDFV. Nach [80]**

Da die *D*-Aminosäure in dem Molekülring nicht jede beliebige Position einnehmen kann, zwingt sie das RGD-Tripeptid in eine bestimmte starre Konformation. Ein RGD-Peptid mit einer mehr geknickten Konformation bindet zum Beispiel bevorzugt an das  $\alpha\beta3$ -Integrin, während eine mehr lineare Form eine höhere Affinität zum  $\alpha II\beta3$ -Integrin besitzt.<sup>105</sup>

## Theoretischer Hintergrund

Weitere Studien zur Aktivitätsabhängigkeit von der Struktur zeigten, dass die Anwesenheit des Phenylalanins und des Wasserstoffatoms der Amidbindung zwischen Asp und *D*-Phe (Position 3 und 4) essentiell für die Aktivität sind. Dagegen übt die Aminosäure in Position 5 keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Peptids aus. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung für die weitere Entwicklung der Integrinliganden gewesen, denn die Aminosäure in Position 5 kann durch Einführung einer neuen funktionellen Gruppe weiter funktionalisiert werden, um die Liganden für verschiedene Anwendungen zu modifizieren.<sup>105,106</sup>

In jüngster Zeit wurde es zur Herausforderung selektive Liganden für  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ - Integrine zu synthetisieren, denn diese beiden Rezeptoren besitzen eine 53 % Übereinstimmung in der  $\alpha$ -Domäne und 55 % in der Kopfgruppe der  $\beta$ -Domäne. Um die Selektivität der Liganden zu erhöhen, wurden zunächst die Bindungstaschen der beiden Integrinrezeptoren untersucht und die Unterschiede festgestellt. Es konnten dabei zwei Regionen lokalisiert werden, die dafür sorgen, dass die Bindungstasche des  $\alpha_5\beta_1$  Integrins etwas breiter ist. Diese Tatsache kann zur Mutation genutzt werden, um eine höhere Selektivität zwischen den Liganden herbeizuführen. Zusätzlich wurde in der  $\alpha_5$ -Domäne im Gegensatz zur  $\alpha_v$ -Domäne eine schwächer saure Bindungsstelle gefunden. Dieser Unterschied könnte ebenfalls zur Selektivität beitragen.<sup>107</sup>

Ausgehend von einem Tyrosingerüst und unter Einbezug gewonnener Erkenntnisse der Bindungstaschenmodelle, wurden unterschiedliche Liganden synthetisiert und einem Selektivitätstest unterzogen. Die Liganden tragen ein Carboxylat und eine basische funktionelle Gruppe in einem Abstand von 13 Å. Das Carboxylat koordiniert an Metallionen in der MIDAS-Region der  $\beta$ -Untereinheit, während die basische Gruppe Wasserstoffbrücken zu bestimmten Aminosäuren ausbildet. Die Liganden wurden einem kompetitiven ELISA-Test mit Einbezug natürlicher immobilisierter EZM-Liganden Vitronectin und Fibronectin sowie der entsprechenden gelösten Integrine unterzogen. Bei diesem Test haben sich zwei Liganden besonders aktiv und selektiv gegenüber den Integrinen  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  herausgestellt (Abb. 25).<sup>107</sup>

## Theoretischer Hintergrund

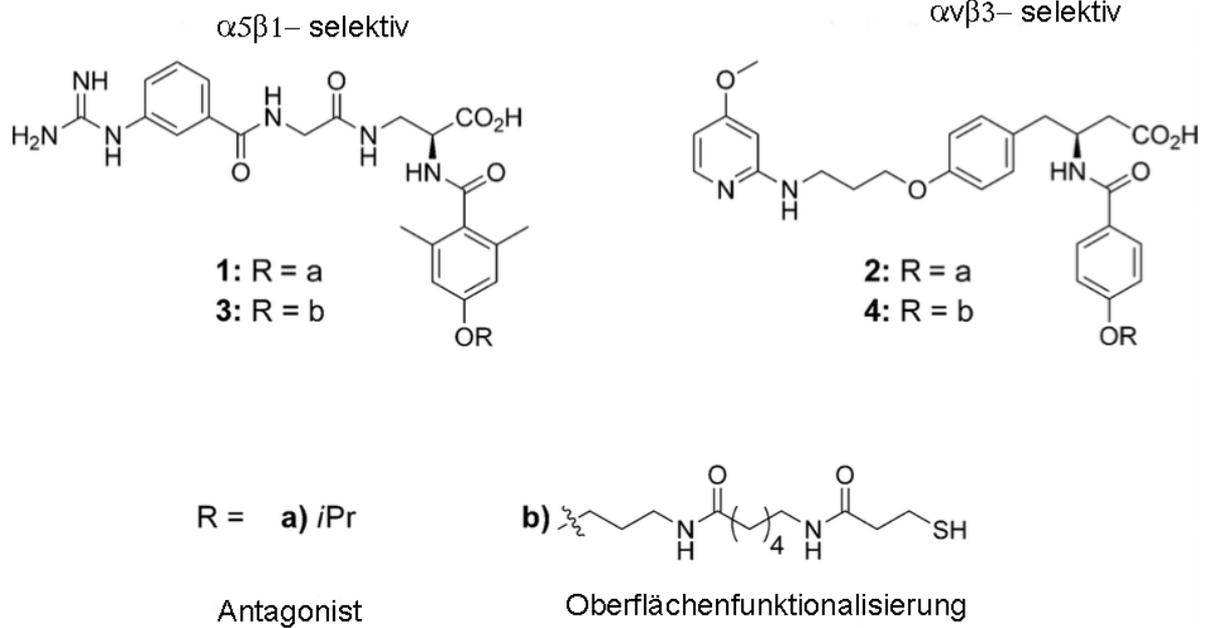


Abbildung 25:  $\alpha\beta 1$ - und  $\alpha\beta 3$ -Integrin selektive Liganden. 1 und 2 Antagonisten, 3 und 4 thiolgruppetragend für die Oberflächenfunktionalisierung. Nach [82]

Um die Liganden in vivo testen zu können, wurden diese für die Funktionalisierung von Goldnanooberflächen modifiziert. Um die beste Position für die Funktionalisierung zu finden, ohne dabei die biologische Aktivität zu stören, wurden Dockingstudien von Peptidmimetika mittels Kristallstrukturen des  $\alpha\beta 3$ - und des  $\alpha\beta 1$ - Integrins durchgeführt. Bei diesen Studien hat sich ergeben, dass die Isopropoxygruppe (Abb. 25) aus der Bindungstasche der Integrine herausragt und somit für die Funktionalisierung bestens geeignet ist. Die beiden Mimetika wurden in mehreren Syntheseschritten mit einer Thiolgruppe funktionalisiert und danach auf ihre Bioaktivität mittels eines kompetitiven Integrinbindungsassays untersucht.<sup>108</sup>

## **4 Materialien und Methoden**

### **4.1 Verwendete Geräte und Methoden**

#### **4.1.1 Homogene Goldsubstrate**

Glasplättchen (20 x 20 mm, Carl Roth & Co GmbH, Deutschland) wurden im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 102H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) in einer 1:1 Mischung aus Ethylacetat (p.a., AppliChem GmbH, Darmstadt) und Methanol (p.a. Merck, Deutschland) 5 min lang gereinigt. Anschließend wurden die Plättchen mit Methanol abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Saubere Oberflächen wurden anschließend mit einer 3 nm dicken Titanschicht ( $1,5 \cdot 10^{-2}$  mbar, 120 mA, 30 s) und einer 8 nm dicken Goldschicht ( $5 \cdot 10^{-2}$  mbar, 60 mA, 20 s) bedeckt. Dazu wurde das MED 020 Coating Systems der Firma Bal Tec verwendet.

#### **4.1.2 Sputter Coater**

Um die strukturierten Glassubstrate ohne Aufladungseffekte unter dem Rasterelektronenmikroskop untersuchen zu können, ist es notwendig diese vorher mit einer leitenden Schicht zu bedecken. Dazu wurde eine dünne Graphitschicht (ca. 5 nm) mit Hilfe des MED 020 Coating Systems der Firma Bal Tec aufgedampft. Zum Bedampfen der Glasproben wird ein Karbonfaden zwischen zwei Elektroden gespannt und unter Hochvakuum Spannung angelegt. Nun erhitzt sich der Karbonfaden und hinterlässt beim Verdampfen eine dünne Schicht auf der Oberfläche.

#### **4.1.3 Plasma Systeme**

Plasmabehandlungen wurden in den Plasma Systemen 100-E der Firma TePla ( $p_{O_2} = 0,4$  mbar, 150 W, 45 min) und 100 der Firma PVA TePla ( $p_{H_2} = 0,3$  mbar, 600 Watt, 45 min). Zur Generierung des Plasmas wird eine Mikrowellenentladung des Reaktionsgases bei einem bestimmten Druck erzeugt. Die entstehenden Elektronen besitzen genügend Energie, um an Gasmolekülen, mit welchen sie kollidieren, verschiedene Prozesse wie Anregung, Zerfall oder Ionisierung auszulösen<sup>109</sup>. Auf diese Weise entsteht eine reaktive Mischung aus Atomen, Ionen und Radikalen. Diese reaktiven Spezies sind in der Lage mit den sich in der Reaktionskammer befindenden Proben zu reagieren. Das Plasma ist besonders geeignet, um organische Verbindungen von

## Materialien und Methoden

Substratoberflächen zu entfernen. Verwendet man Sauerstoff als Reaktionsgas, so werden Kohlenstoffbindungen aufgebrochen und in CO und CO<sub>2</sub> überführt. Beide Gase sind leichtflüchtig und werden durch den Gasstrom entfernt. Im Plasma finden neben chemischen Reaktionsprozessen auch physikalische Vorgänge statt. Durch das Auftreffen der Teilchen auf der Substratoberfläche werden Atome aus dieser herausgeschlagen. Somit wird das physikalische Ätzen durch die Masse und die mittlere kinetische Energie der Teilchen bestimmt. Folglich finden in einem Plasmareaktionsraum chemische und physikalische Reaktionsprozesse parallel statt. Um den physikalischen Ätzanteil zu reduzieren, können verschiedene Parameter variiert werden. Da die mittlere kinetische Energie von der mittleren freien Weglänge und dem Ionisierungsgrad der Gasmoleküle abhängt, können diese z.B. durch Erhöhung des Gasdruckes oder Erniedrigung der Plasmadichte verringert werden.

### **4.1.4 Rasterelektronenmikroskop**

Ein Rasterelektronenmikroskop ermöglicht es, Probenoberflächen mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls abzurastern. Mit dieser Methode sind Auflösungen bis zu einigen Nanometern erreichbar.

In Abbildung 26 ist der Aufbau eines herkömmlichen REMs dargestellt. Die Elektronenquelle emittiert im Hochvakuum Elektronen, die mit einer Spannung bis zu 30 keV zur Anode beschleunigt werden. Dort werden sie mithilfe des Wehneltzylinders zu einem feinen Strahl fokussiert. Die weitere Fokussierung erfolgt mit elektromagnetischen Linsen, die aus einer stromdurchflossenen Spule und einem ferromagnetischen Kern bestehen. Ein Rastergenerator sorgt dafür, dass die Probenoberfläche Zeile für Zeile mit dem Elektronenstrahl abgetastet wird. Das auf diese Weise gewonnene Signal wird verstärkt und auf dem Bildschirm, der zeitgleich vom selben Rastergenerator angesteuert wird, als Helligkeitswert angezeigt (siehe Abb.26).<sup>110</sup>

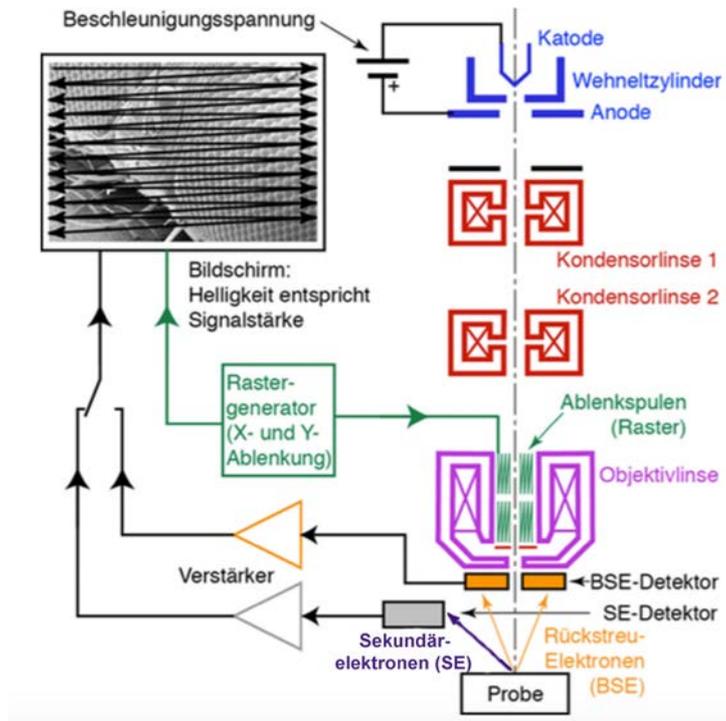
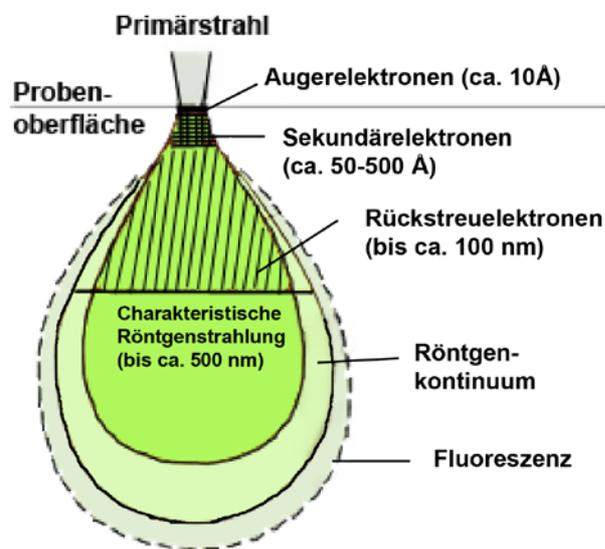


Abbildung 26: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops nach [111] <sup>111</sup>

Trifft der Elektronenstrahl (Primärelektronen, PE) auf die Probenoberfläche kommt es zu einer Reihe von Wechselwirkungen. Prinzipiell kann zwischen der elastischen und der unelastischen Streuung der Elektronen an Festkörpern unterschieden werden. Bei der elastischen Streuung werden die PE ohne Energieverlust vom Coulombfeld des Atomkerns der Probe abgelenkt und ändern lediglich ihre Bahn. Die von der Probe gestreuten Elektronen werden dann Rückstreuelektronen genannt. Bei der inelastischen Streuung wird das Elektron nicht nur abgelenkt, sondern gibt auch einen Teil seiner Energie an die Atome der Probe weiter. Diese Wechselwirkungsart führt unter anderem zu sogenannten Sekundärelektronen (SE). Dies sind Elektronen, die aus der äußeren Schale der Probenatome herausgeschlagen werden.<sup>110</sup> Für die Erzeugung eines Abbildes der Probenoberfläche sind ausschließlich diese beiden Wechselwirkungsarten ausschlaggebend. Zusätzlich können auch Elektronen aus der inneren Schale herausgeschlagen werden was zur Entstehung der charakteristischen Röntgenstrahlung führt. Diese Art von Strahlung wird zum Beispiel bei der XPS Analyse zur Zusammensetzungsaufklärung von Festkörpern und Oberflächensubstraten verwendet. Ferner kann ein durch das Auftreffen des

## Materialien und Methoden

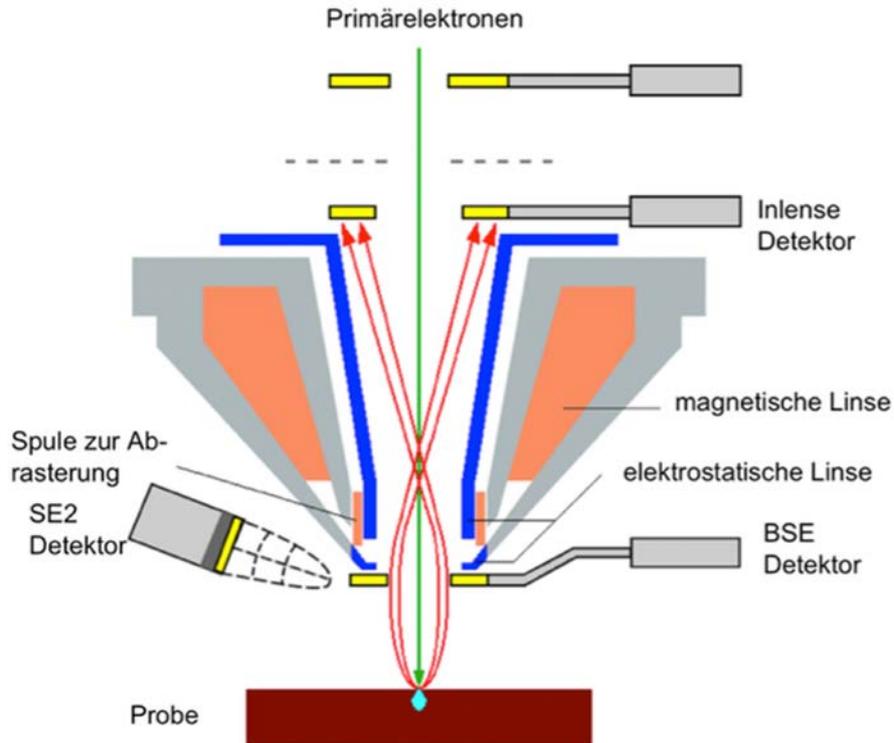
Primärstrahl entstandener unbesetzter Elektronenzustand auf einer inneren Elektronenhülle durch ein Elektron aus dem Äußeren der Elektronenhülle besetzt werden. Die Energie des nachrückenden Elektrons kann auf ein Elektron desselben Atoms übertragen werden, welches dann das Atom verlässt. Dieser Vorgang wird Augereffekt genannt und kann bei der Augerelektrospektroskopie zur Charakterisierung von Materialoberflächen eingesetzt werden. Die Größe des Wechselwirkungsvolumens (Abb. 27) hängt von der Beschleunigungsspannung ab, seine Form von der mittleren Ordnungszahl. Besteht die Probe vorwiegend aus leichten Atomen, so ist das Wechselwirkungsvolumen birnenförmig, bei einer Probe mit hauptsächlich schweren Atomen ist ein halbkugelförmiges Wechselwirkungsvolumen zu beobachten.



**Abbildung 27: Wechselwirkungsvolumen eines Elektronenstrahls und einer Substratoberfläche.**

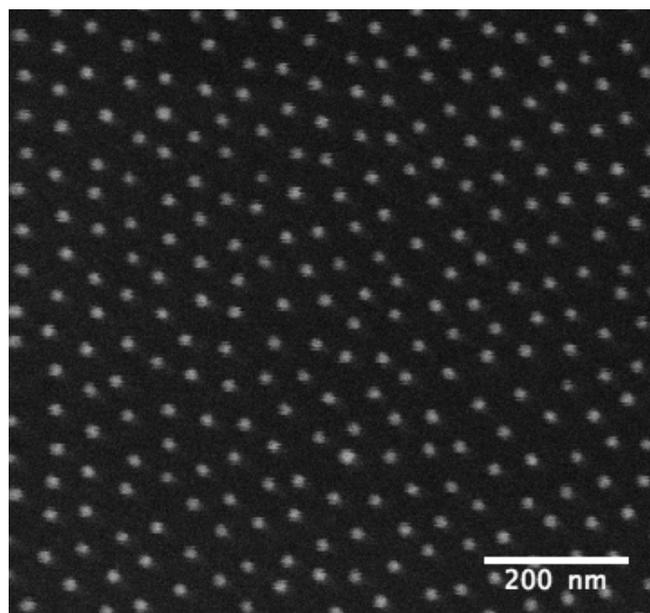
Die Rückstreuelektronen werden mittels eines über der Probe positioniertem InLens Detektors (Abb.27) erfasst. Somit kann der Materialkontrast visualisiert werden, wobei Elemente mit höheren Ordnungszahlen heller erscheinen. Sekundärelektronen werden in SE1- und SE2 – Elektronen unterteilt: SE1 – Elektronen verlassen die Probe im Bereich der Einstrahlzone des PE während mehrfach gestreute SE2 – Elektronen die Probe in einem bestimmten Abstand zum Einstrahlbereich verlassen.

SE2-Elektronen werden mit einem SE2 Detektor (Abb. 28), der meistens seitlich über der Probe platziert ist, detektiert. Diese Detektionsart ermöglicht einen hohen Topographiekontrast.<sup>110</sup>



**Abbildung 28: Unterschiedliche Detektorarten eines REMs**

In dieser Arbeit wurden die Aufnahmen (Abb. 29) an einem Rasterelektronenmikroskop (LEO 1530, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt, bei dem der Elektronenstrahl mittels einer Feldemissionskathode (Schottky Emitter) erzeugt wird. Typisches Arbeitsvakuum betrug dabei  $<5 \cdot 10^{-6}$  mbar und es wurde eine Beschleunigungsspannung von 5 keV verwendet. Vor den Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop wurden die Oberflächensubstrate mit einer dünnen Graphitschicht bedampft (siehe Abschnitt 3.1.1).



**Abbildung 29: REM-Aufnahme einer goldnanostrukturierten Oberfläche**

### **4.1.5 Phasenkontrastmikroskopie**

Ungefärbte Zellen können mit der Hellfeldmikroskopie nicht untersucht werden, da durchsichtige Objekte die Phase, nicht aber die Amplitude des einfallenden Lichts ändern. Für das menschliche Auge sind nur Amplitudenänderungen wahrnehmbar, da diese in Helligkeitsunterschieden resultieren. Bei einem Phasenkontrastmikroskop werden Phasen- in Amplitudenänderungen umgewandelt. Durch das Auftreffen der Wellenfront an einer Probe wird diese in zwei Teile zerlegt. Ein Anteil passiert die Probe, ohne mit ihr Wechselwirkungen einzugehen, der andere Teil wird in alle Richtungen gestreut. Beide Wellenanteile werden dann an der Objektivlinse gesammelt und in der Bildebene fokussiert. Dort interferieren sie und ergeben wieder eine gemeinsame Welle. Die Phasenverschiebung zwischen den beiden Wellenanteilen lautet dann,

$$\delta = 2\pi\Delta/\alpha$$

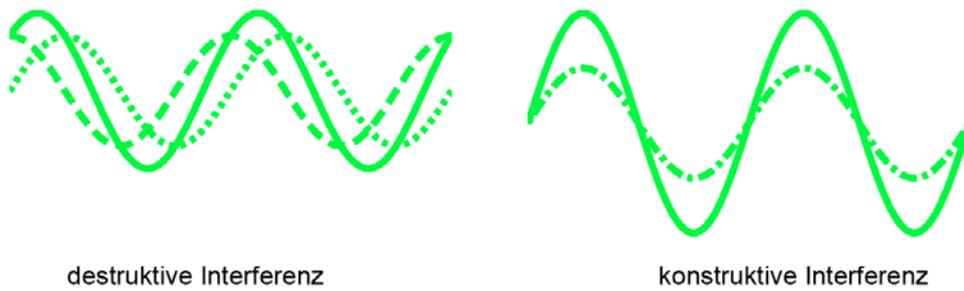
**Formel 11: Phasenverschiebung**

wobei  $\Delta$  der optische Gangunterschied ist,

$$\Delta = (n_2 - n_1)t$$

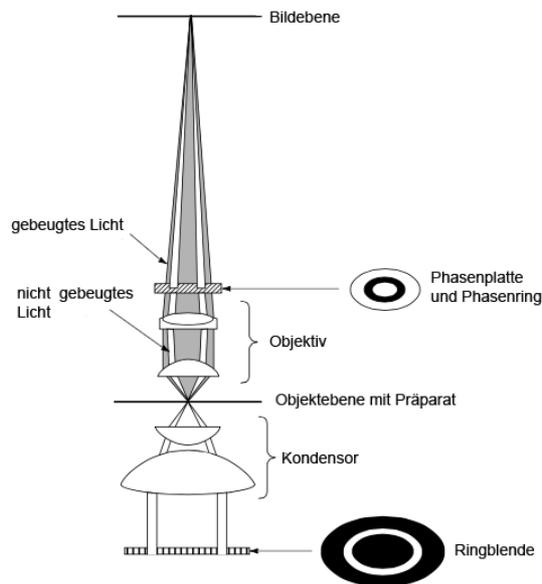
**Formel 12: Phasenverschiebung**

$t$  ist die Dicke der Probe,  $(n_2 - n_1)$  ist der Unterschied der Brechungsindizes zwischen der Probe und dem umgebenden Medium und  $\alpha$  die Wellenlänge. Die Phasenverschiebung zwischen den beiden Wellenanteilen wird durch ein  $\alpha/4$  Plättchen entweder um eine halbe Wellenlänge vergrößert oder aufgehoben. Die Vergrößerung führt zu destruktiver Interferenz der beiden Wellenanteile und wird positiver Phasenkontrast genannt. Die Auslöschung der Phasenverschiebung verursacht konstruktive Interferenz und heißt somit negativer Phasenkontrast (Abb. 30).



**Abbildung 30: Destruktive und konstruktive Interferenz**

Um die Phasenkontrastmikroskopie zu ermöglichen, müssen in den Mikroskopaufbau, zusätzlich zu Objektiven, Phasenring und Ringblende eingebaut werden (Abb.31). Der Phasenring manipuliert Phase und Intensität des ungebeugten Lichtanteils. Das Objekt wird durch eine Ringblende beleuchtet, dadurch wird vom Mikroskopierlicht nur ein geringer Teil benutzt. Der Phasenring ist auf der Phasenplatte aufgedampft und überdeckt in der Objektivbrennebene das Bild der Ringblende. Damit Phasenring und Ringblende zur Deckung gebracht werden können, ist eine Zentriervorrichtung notwendig.<sup>112</sup>



**Abbildung 31: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Phasenkontrastmikroskops. Adaptiert nach [112]<sup>112</sup>**

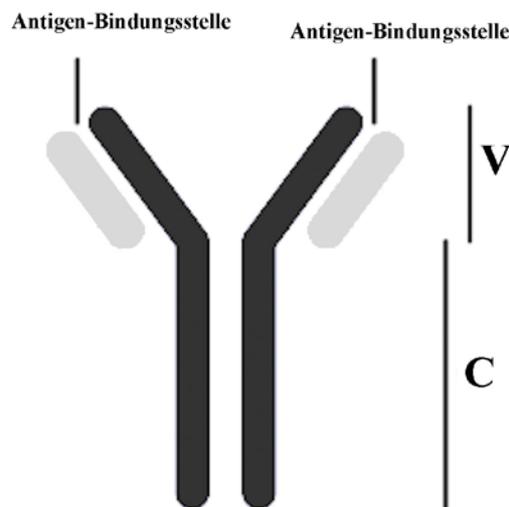
## Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden die Aufnahmen an einem inversen Mikroskop des Typs Olympus IX 71 (Olympus, Hamburg, Deutschland), ausgestattet mit einem Delta Vision RT und Spectris System (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, USA), gemacht. Für Versuche mit lebenden Zellen ist das System mit einer Inkubatorkammer ausgestattet, die es erlaubt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zu arbeiten. Dabei wurden die folgenden Objektive verwendet: 10x/0.25 Ph1 A-Plan (Zeiss) und 20x/0.5 Ph1U-PlanF1 (Olympus).

### **4.1.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Fluoreszenzmikroskopie ist eine der effektivsten Methoden, um Proteine in einer Zelle zu lokalisieren oder auch relative Lokalisation mehrerer Proteine zueinander zu bestimmen. Um bestimmte Proteine in der Zelle zu visualisieren, werden diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt.

Die Injektion immunogener Substanzen in lebende Organismen führt zu einer Immunantwort mit Antikörperbildung. Nach der Isolierung der Antikörper können sie zur Detektion von Proteinen in Zellen verwendet werden. Die Antikörper besitzen eine Y-artige Form (Abb. 32) und bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten und besitzen dabei eine C- und eine V-Region. Die C-Region ist bei allen Antikörpern sehr ähnlich die V-Region stellt dagegen die Bindungsstelle für das Antigen dar. Die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung funktioniert nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip und findet in der V-Region des Antikörpers statt. Dort bildet sich eine Bindungstasche zwischen der leichten und schweren Kette aus, die von der Form und der Größe nur an ein bestimmtes Antigen binden kann. Die dabei stattfindende Wechselwirkung ist nicht kovalenter Natur und daher reversibel.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung eines Antikörpers**

Es kann zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenzfärbung unterschieden werden. Bei der direkten Methode bindet ein fluoreszenzmarkierter Antikörper direkt an das Antigen des Zielproteins in der Zelle und wird mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Bei der vorwiegend verwendeten indirekten Methode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Der anschließend eingesetzte Sekundärantikörper erkennt die wirtsspezifische  $F_C$  – Region des Primärantikörpers und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.<sup>72</sup>

Als fluoreszierende Stoffe werden meistens Moleküle eingesetzt, die konjugierte Doppelbindungen in aromatischen Systemen enthalten. Durch Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge emittieren diese Moleküle Licht, dieser Effekt wird Lumineszenz genannt. Lumineszenz wird in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterteilt, die sich in der Leuchtdauer unterscheiden. In den oben genannten Molekülen werden Elektronen aus den bindenden  $\pi$ -Orbitalen durch Absorption eines Photons in  $\pi^*$ -Orbitale befördert. Allgemein beginnt der Prozess damit, dass ein Elektron aus dem Grundzustand  $S_0$  durch Absorption eines Photons  $h \cdot \nu$  in den angeregten Zustand  $S_1$  angehoben wird (Abb.33).

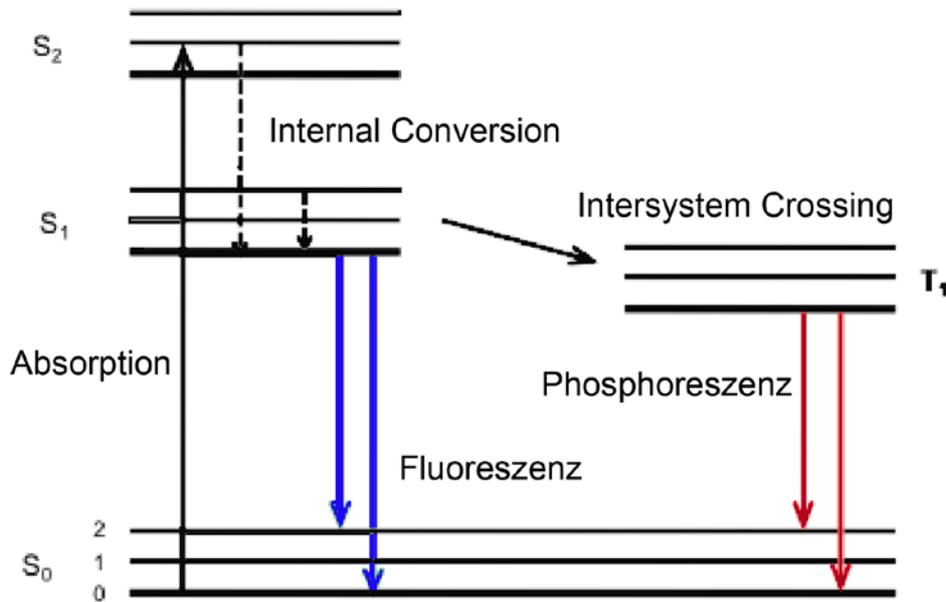


Abbildung 33: Jablonski Diagramm

Aus diesem angeregten Zustand hat das Elektron mehrere Möglichkeiten Energie abzugeben um wieder in den Grundzustand zurückzukehren. Fällt es aus dem Singulettzustand S<sub>1</sub> wieder in den Zustand S<sub>0</sub>, so emittiert es fluoreszentes Licht. Gelangt es dagegen über das „intersystem crossing“ in den Triplettzustand T<sub>1</sub> emittiert es ein phosphoreszierendes Photon und relaxiert dann in den S<sub>0</sub> Zustand zurück. Der Übergang zwischen dem S<sub>0</sub> und dem S<sub>1</sub> Zustand ist spinerlaubt und findet innerhalb von Nanosekunden statt. Dagegen ist der T<sub>1</sub> zu S<sub>0</sub> Übergang spinverboten und findet daher im Bereich von Millisekunden bis Sekunden statt. Die emittierte Wellenlänge ist immer länger als die absorbierte, da es durch strahlungslose Übergänge ohne Spinumkehr innerhalb des Systems (internal conversion) zu sogenannter Stokes-Verschiebung (Abb.34) kommt. <sup>112</sup>

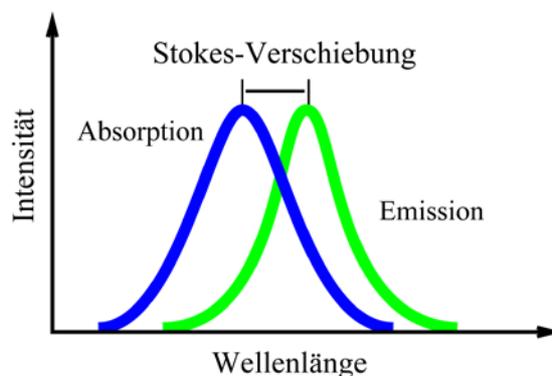


Abbildung 34: Stockes-Verschiebung

## Materialien und Methoden

Standardmäßig wird als Lichtquelle eine Xenon- oder Quecksilberdampfampe verwendet, die ein kontinuierliches Spektrum aussenden. Das ausgesandte Licht trifft dann auf den Anregungsfilter, welcher alle Wellenlängen herausfiltert, bis auf die zur Anregung benötigte. Diese eine Wellenlänge regt die Probe zur Fluoreszenz an. Das von der Probe ausgesandte Licht kann nun durch ein Emissionsfilter betrachtet werden, der vor allem die Anregungsfrequenz herausfiltert.

Fluoreszenzbilder wurden hier an einem DeltaVision RT System (Applied Precision) mit einem 60x/1.4 Uplan Apo Ölimmersionsobjektiv (Olympus) aufgenommen.

### **4.1.7 Datenauswertung**

Zum Auslesen der Zellfläche sowie der Vinculin- und Paxilinclustergröße wurde ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Version 1.48v) verwendet. Um die Spreitgeschwindigkeit der Zellen zu messen wurde das MultipleKymograph Plugin (J. Rietdorf FMI Basel + A. Seitz EMBL Heidelberg) für ImageJ verwendet. Die Software wurde ebenfalls verwendet, um den Kontrast und die Helligkeit der Bilder einzustellen. Die mit ImageJ ausgelesenen Daten wurden weiterhin mit OriginlabPro 9.1 (OriginLab, Northampton, MA) ausgewertet und graphisch dargestellt.

Um den Ordnungsparameter der hexagonalen Struktur und die Abstände der Goldnanopartikel zu bestimmen, wurde das von Dr. Philippe Girard (Universität Heidelberg) spezialangefertigte ImageJ Plugin „dot\_analysis.jar“ verwendet.

## **4.2 Oberflächenherstellung**

### **4.2.1 Reinigung und Aktivierung der Substrate**

Zur Reinigung und Aktivierung wurden die Glassubstrate (Deckgläser, 20 x 20 mm, Carl Roth & Co GmbH, Deutschland) in einem Teflonhalter fixiert und für mindestens 60 min in Caroscher Säure, bestehend aus einer 1:3 Mischung aus Wasserstoffperoxid (30 %, p.a., AppliChem) und konzentrierter Schwefelsäure (95 %, AppliChem) inkubiert. Danach wurden sie mehrmals mit MilliQ-Wasser gespült, dreimal für je 10 min im Ultraschallbad behandelt und erneut gespült. Vor dem Strukturieren wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet.

### 4.2.2 Herstellung der mizellaren Goldlösung

Polystyrol(x)-block-poly(2-vinylpyridin)(y) (Polymer Source Kanada), PS(x)-b-P2VP(y) wurde in ein mit Caroscher Säure gereinigtes Glasgefäß eingewogen und in einer entsprechenden Menge Toluol (p.a., Merck, Deutschland) 24 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Anschließend wurde Tetrachlorgoldsäure  $\text{HAuCl}_4$  (Gold(III)chloridtrihydrat, 393,83 g/mol Sigma Aldrich, Deutschland) zu der Lösung hinzugefügt und unter Lichtausschluss weitere 24 h bis zur vollständigen Auflösung der Goldsäure gerührt. Die Menge der Tetragoldchlorsäure wurde in Abhängigkeit der Anzahl der P2VP-Einheiten und der Beladung L nach folgender Gleichung berechnet.

$$m(\text{HAuCl}_4) = \frac{m(\text{Polymer}) * L * M(\text{HAuCl}_4) * \text{Anzahl}(\text{PVP}_{\text{Einheiten}})}{M(\text{Polymer})}$$

#### Formel 13: Menge der Tetragoldchlorsäure in Abhängigkeit der Anzahl der P2VP-Einheiten

Für die meisten Lösungen wurde dabei  $L = 0,5$  verwendet. In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Diblockcopolymere mit entsprechendem Molekulargewicht und der Anzahl der P2VP-Einheiten dargestellt.

Polymer	PS Einheiten	P2VP Einheiten	$M_w/M_n$
PS(110000)-b-P2VP(70500)	1056	671	1,09
PS(30000)-b-P2VP(12500)	288	119	1,06
PS(190000)-b-P2VP(55000)	1824	523	1,10

**Tabelle 1: Verwendete Diblockcopolymere**

### 4.2.3 Nanostrukturierung mit Hilfe des Tauchbeschichtungsprozesses

Die gereinigten Glassubstrate wurden mittels des Tauchbeschichtungsprozesses („dip coating“) strukturiert.<sup>9</sup> Dazu wurden die Deckgläser bei RT mit Hilfe einer extra angefertigten Vorrichtung senkrecht in die mizellare Lösung getaucht und bei einer konstanten Geschwindigkeit wieder herausgezogen. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft war, wurden die Oberflächen für 45 min im Plasma behandelt (siehe Abschnitt 3.1.2). Das

## Materialien und Methoden

Wasserstoffplasma (600 W;  $p(\text{H}_2)=0,3$  mbar)(PS210 Microwave Plasma System; TePla, Deutschland) entfernt die organischen Mizellreste und reduziert das Tetrachloroaurat zu elementarem Gold. Anschließend wurden die Substrate 24 h in einem Ofen bei 500 °C getempert.

### 4.2.4 Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen

Um Proteinadsorption und unspezifische Zelladhäsion an der Substratoberfläche zwischen den Goldnanopartikeln zu vermeiden, wurden die Glassubstrate entweder mit mPEG-triethoxysilan-2000urea<sup>1</sup> oder mit PLL-PEG passiviert. Das mPEG-triethoxysilan-2000urea wird kovalent an die Oberfläche gebunden (Abb. 35). Vor der Anbindung des mPEG-triethoxysilan-2000urea wurden die Substrate für 10 Minuten im Plasma ( $p_{\text{H}_2}=0,4$  mbar, 150 W) (PS 100-E; TePla, Deutschland) aktiviert. Danach wurden die Glassubstrate mit Hilfe eines Teflonhalters in einem Schlenkkolben platziert und unter Schutzgasatmosphäre ( $\text{N}_2$ ) bei 80 °C mit einer 0,25 mM mPEG-triethoxysilan-2000urea Toluol<sup>2</sup> Mischung in Gegenwart katalytischer Mengen Triethylamin (p.a. Fluka, Schweiz) 20 h im Ölbad zur Reaktion gebracht.

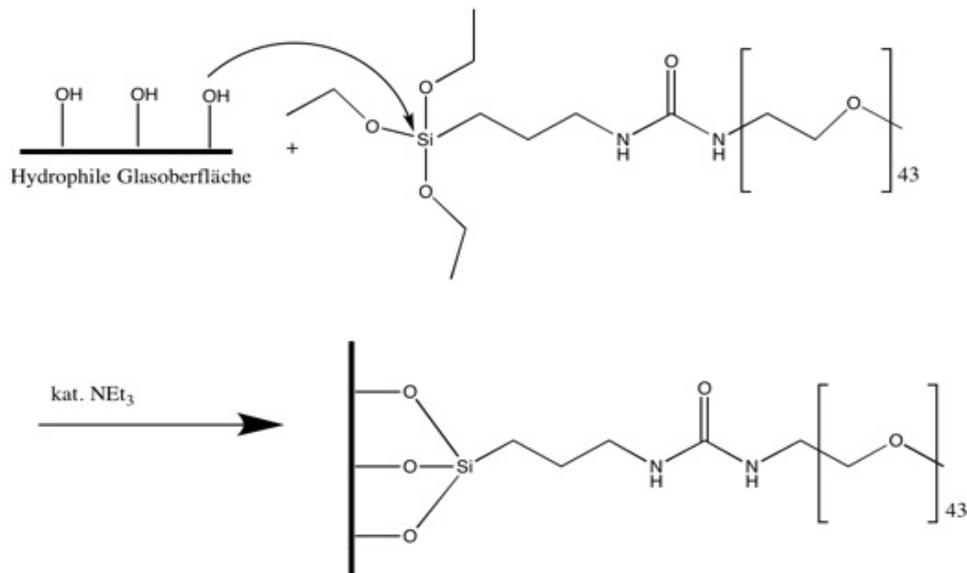


Abbildung 35: Reaktionsschema der Anbindung des Triethoxysilans an das Glassubstrat

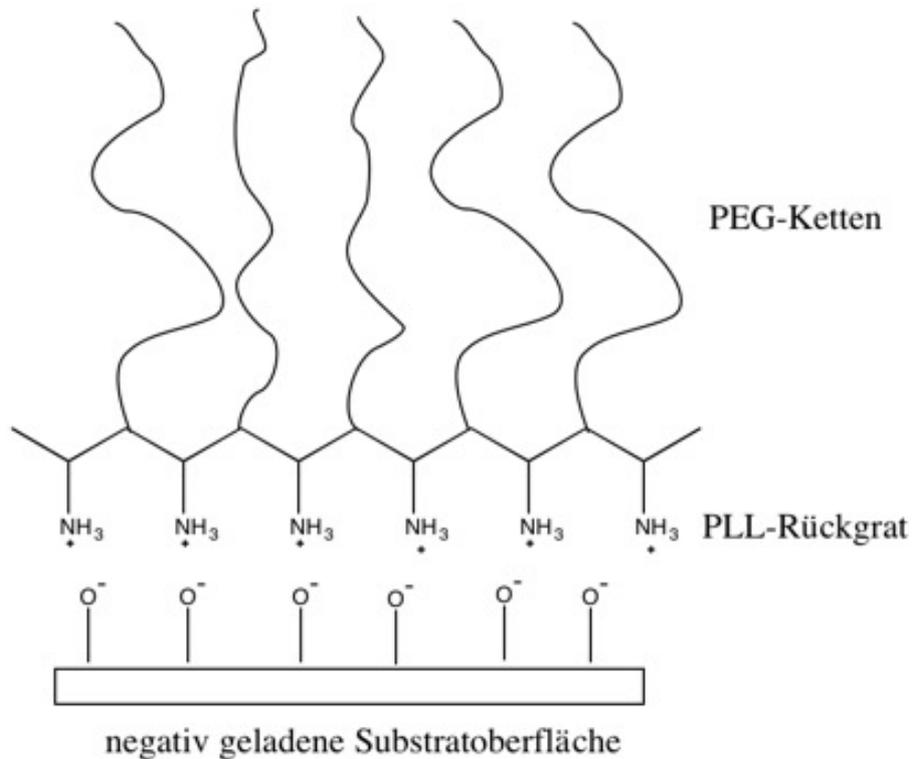
Um das physisorbierte PEG-silan zu entfernen wurden die passivierten Plättchen nach der Reaktion dreimal mit Ethylacetat (p.a., AppliChem GmbH, Darmstadt) gespült und 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde jedes einzelne Substrat mit Ethylacetat und Methanol (p.a. Merck, Deutschland) abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

<sup>1</sup> Synthetisiert von Dr. Nicole Plath und Dr. Nadine Perschmann

<sup>2</sup> Getrocknet über einem 3Å Molekularsieb (Carl Roth, Deutschland)

## Materialien und Methoden

Die Anbindung des PLL-g-PEG an die Glasoberfläche erfolgt elektrostatisch. Das polykationische Poly-(L-Lysin)-Poly(ethylenglykol)-Copolymer (PLL-g-PEG) (PLL(20kDa)-g-[3,5]-PEG(2kDa); [3,5]=Lysine pro PEG Kette; Surface SolutionsS, Schweiz) ist in der Lage an die negativ geladene Glasoberfläche zu binden (Abb. 36).



**Abbildung 36: Anbindung des PLL-PEGs an eine negativ geladene Substratoberfläche**

Vor der Anbindung des PLL-g-PEG an die nanostrukturierten Substrate, wurden diese erst 10 min im Sauerstoffpalsma ( $p(\text{O}_2)=0,4$  mbar, 150 W; PS 100-E TePLa, Deutschland) aktiviert. Im zweiten Schritt erfolgte dann die einstündige Inkubation mit 150  $\mu\text{l}$  PLL-g-PEG Lösung (10 mM HEPES, 6 M NaOH in destilliertem Wasser) pro Oberfläche. Nach der Inkubation wurden die Oberflächen mit MilliQ-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

### **4.2.5 Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit selektiven Liganden**

Zur Biofunktionalisierung der Goldnanopartikel wurden Thiol-funktionalisierte  $\alpha 5\beta 1$ - und  $\alpha \nu \beta 3$ - integrinselektive Mimetika<sup>19</sup> verwendet. Die Mimetika wurden durch die Synthese auf Tyrosinbasis bestehender Gerüste in mehreren Reaktionsschritten hergestellt. Die Stockkonzentration betrug 5 mM in MilliQ-Wasser und wurde bei -20 °C aufbewahrt. Für die Funktionalisierung wurden die Lösungen auf Arbeitskonzentration von 25  $\mu\text{M}$  verdünnt. Die frisch passivierten Substrate wurden mit den Mimetika 4 h lang in einer mit Parafilm

## Materialien und Methoden

ausgelegten Petrischale inkubiert. Um das Verdunsten der Lösung zu vermeiden wurde die Petrischale mit Parafilm versiegelt. Nach der Reaktion wurden die Oberflächen je dreimal 20 Minuten mit MilliQ-Wasser und unmittelbar vor den Zellexperimenten einmal mit sterilem PBS gewaschen.

### **4.2.6 Funktionalisierung der Glassubstrate mit Fibronectin und Vitronectin**

Als Kontrolle dienten homogene Proteinbeschichtungen der Deckgläser. Es wurde Fibronectin als  $\alpha_5\beta_1$ - und Vitronectin als  $\alpha_v\beta_3$ -Kontrolle gewählt. Dazu wurden die Glasplättchen zuerst in Ethanol (p.a. Merck, Deutschland) im Ultraschallbad 10 Minuten gereinigt und danach im Sauerstoffplasma für 10 Minuten aktiviert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Inkubation mit Fibronectin (plasma human Fibronectin, Sigma Aldrich, Deutschland) oder Vitronectin (human vitronectin, Sigma Aldrich, Deutschland) beides 5  $\mu\text{g/ml}$  in MilliQ-Wasser. Nach der Inkubation wurden die Proben dreimal mit MilliQ-Wasser und unmittelbar vor den Zellexperimenten nochmals mit sterilem PBS gewaschen.

## **4.3 Zellexperimente**

### **4.3.1 Die Zelllinie**

U2OS Zellen (ATCC, HTB-96™) sind menschliche Osteosarkomazellen, welche aus dem Knochengewebe eines 15 jährigen Mädchens 1964 isoliert wurden. Dabei wurden die Zellen aus dem mäßig differenzierten Sarkom am Schienbein entnommen und kultiviert.

### **4.3.2 Kultivierung der Zellen**

Die Zellkultivierung erfolgte komplett steril, das Splitten der Zellen und sämtliche Zellexperimente wurden unter einer Sterilbank (Heraeus Kendro, VWR International GmbH, Deutschland) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden ebenfalls steril angesetzt und das Laborwerkzeug steril gehalten. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Thermo Scientific, USA) bei 5 %  $\text{CO}_2$  und 37 °C kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage bis die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreichten. Als Kultumedium diente DMEM (Dulbecco's modifiziertes essentielles Medium, Gibco, Deutschland) versetzt mit 10 % FBS (Fötale Rinderserum, Life Technologies, Deutschland), 1 % L-Glutamin (2 mM, Gibco, Deutschland) und 1 % Penicilin Streptomycin (Gibco, Deutschland). Zum Ablösen der Zellen wurde zuerst das Medium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PAA, Österreich) gewaschen. Danach wurde 1,5 ml Accutase (Gibco, Deutschland) zugegeben und für 2 Minuten im Inkubator platziert. Nachdem sich alle Zellen vom Boden der

## Materialien und Methoden

Zellkulturflasche gelöst hatten wurden 5 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert (5702 R, Eppendorf Deutschland). Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und für Experimente sowie für weitere Kultivierung verwendet.

### **4.3.3 Aufnahmen lebender Zellen zur Auswertung des Zellspreitens**

Die funktionalisierten Oberflächen wurden mit sterilem PBS unter sterilen Bedingungen gewaschen und in einer Petrischale mit einer passenden Aussparung mit Hilfe des Dentalklebers (picodent twinsil® 22) befestigt. Im Anschluss wurden die Proben mit 3 ml Kulturmedium bedeckt und  $3 \cdot 10^4$  Zellen pro Oberfläche/Petrischale zugegeben. Die Proben wurden sofort unter das Mikroskop (Abschnitt 3.1.5) gebracht und mit den Aufnahmen begonnen. Pro Oberfläche wurden jeweils 20 einzelne Zellen alle 2 min über einen Zeitraum von 4 h aufgenommen. Die Aufnahmen fanden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt.

### **4.3.4 Aussähen der Zellen auf funktionalisierten Oberflächen**

Die funktionalisierten Oberflächen wurden steril mit PBS gewaschen und mit 3 ml Kulturmedium bedeckt. Anschließend wurden auf jede Oberfläche  $1 \cdot 10^4$  Zellen gesetzt und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> platziert. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert und die Fokalkontakte untersucht.

### **4.3.5 Fixierung und Immunozytochemische Färbung**

Vor der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach für 20 Minuten mit 3,7 % Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, Deutschland) in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Proben nochmals mit PBS gewaschen und mit 0,1 % TritonX/PBS (Triton™X 100, Sigma Aldrich, Deutschland) 5 Minuten permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Proben für 1 h in einer 1 % BSA/PBS (Rinder Serumalbumin, MP Biomedicals LLC, Frankreich) Lösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindung zu vermeiden. Zur Färbung wurde der primäre Antikörper (siehe Tabelle 2) 1:100 in 0,1% BSA/PBS verdünnt und für 1 h auf die fixierten Proben gegeben.

<b>Epitop</b>	<b>Host und Spezifität</b>	<b>Katalognummer und Hersteller</b>
$\alpha_v\beta_3$ -integrin	mouse anti human	MAB1976, Millipore
$\alpha_5$ -integrin	rat anti human	MABII, Humphries Labor
vinculin	mouse anti human	V9131, Sigma
zyxin	rabbit anti human	307011, Synaptic Systems

## Materialien und Methoden

$\alpha_5\beta_1$ -integrin	mouse anti human	MAB1969, Millipore
$\alpha_5$ -integrin	rabbit anti human	AB1949, Millipore
$\alpha_5$ -integrin	rabbit anti human	AB1928, Millipore
$\beta_1$ -integrin	mouse anti human	MAB1981, Millipore
$\alpha_5$ -integrin	mouse anti human	GTX26131, GenTex
$\alpha_5$ -integrin	rat anti human	mabII, Humphries Labor
$\alpha_v$ -integrin	mouse anti human	BD 611013, Bioscience
$\beta_3$ -integrin	mouse anti human	MAB2023Z, Millipore

**Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper**

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 3) 1:100 verdünnt in 0,1 % BSA/PBS für weitere 45 Minuten bei RT inkubiert.

<b>Epitop und Host</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Katalognummer und Hersteller</b>
mouse IgG, goat	Alexa 647	A-21236, Invitrogen
rat IgG, goat	Alexa 488	A-11006, Invitrogen
mouse IgG, goat	Alexa 488	A-11001, Invitrogen
rabbit IgG, goat	Alexa 488	A-11078, Invitrogen

**Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper**

Zum Anfärben von F-Aktin diente TRITC-konjugiertes Phalloidin (Sigma Aldrich, Deutschland), welches mit einer Konzentration 1 mg/ml in DMSO aufgelöst und 1:200 für die Färbung verdünnt wurde. Im Falle der Aktinfärbung zusammen mit einem anderen Protein wurde das Phalloidin-TRITC zusammen mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und in Mowiol 488 (Sigma Aldrich, Deutschland) eingebettet.

### **4.3.6 Transiente Transfektion der U2OS-Zellen**

Die Zellen wurden auf einer 6-Wellplate mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Für ein Well

## Materialien und Methoden

wurden in einem Eppendorfgefäß 100 µl OptiMeM (Gibco 31985-062) und 8 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen 11668027) gemischt. In einem anderen Eppendorfgefäß wurden 100 µl OptiMem und 2 µg des  $\alpha_v$ -mApple Plasmids (Addgene 54866 ) gemischt. Anschließend wurde der Inhalt der einzelnen Gefäße gut gemischt, miteinander vermengt und einer 15 minütigen Inkubationszeit unterzogen. Vor der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium ausgetauscht und das Plasmid-Lipofectamin 2000-Gemisch zu den Zellen tropfenweise zugefügt. Nach einer 32 h Einwirkzeit wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Accutase abgelöst und auf funktionalisierte Substrate ausgesetzt.

### **4.3.7 Blockierungsexperimente**

Zur Durchführung der Blockierungsexperimente wurden die abgelösten Zellen in einem Medium mit 1 % FBS und 1% BSA resuspendiert. Zu 100 µl Zellsuspension wurden 10 µl thioalfreies Mimetikum zugegeben und eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf funktionalisierte Substrate ausgesät und nach 4 h fixiert und angefärbt wie vorher beschrieben (Abschnitt 3.3.5).

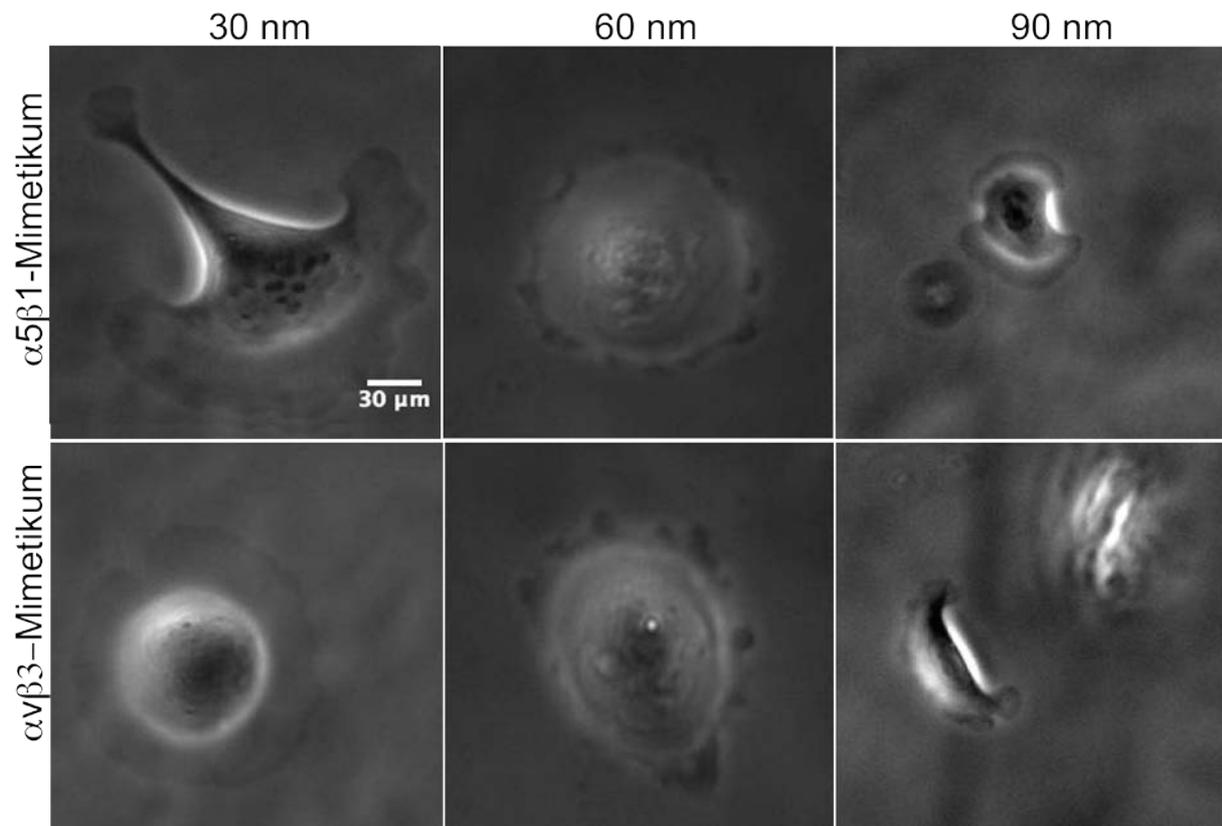
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Zellspreiten auf unterschiedlichen Goldnanopartikel Abständen für $\alpha_5\beta_1$ -und $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika

#### 5.1.1 Zellflächenprogression mit der Zeit

Zur Untersuchung der Zellflächenprogression und des kinetischen Zellspreitens wurden Goldnanopartikelsubstrate mittel der BCMN-Technologie hergestellt und jeweils mit den selektiven Mimetika funktionalisiert.

Die U2OS-Zellen zeigen auf großen und kleinen Goldnanopartikel Abständen unterschiedliches Verhalten. Auf 36 nm Abständen spreiten sie sehr schnell auf beiden Mimetika und erreichen dabei ihre maximale Zellfläche innerhalb von 30 Minuten (Abb. 37).

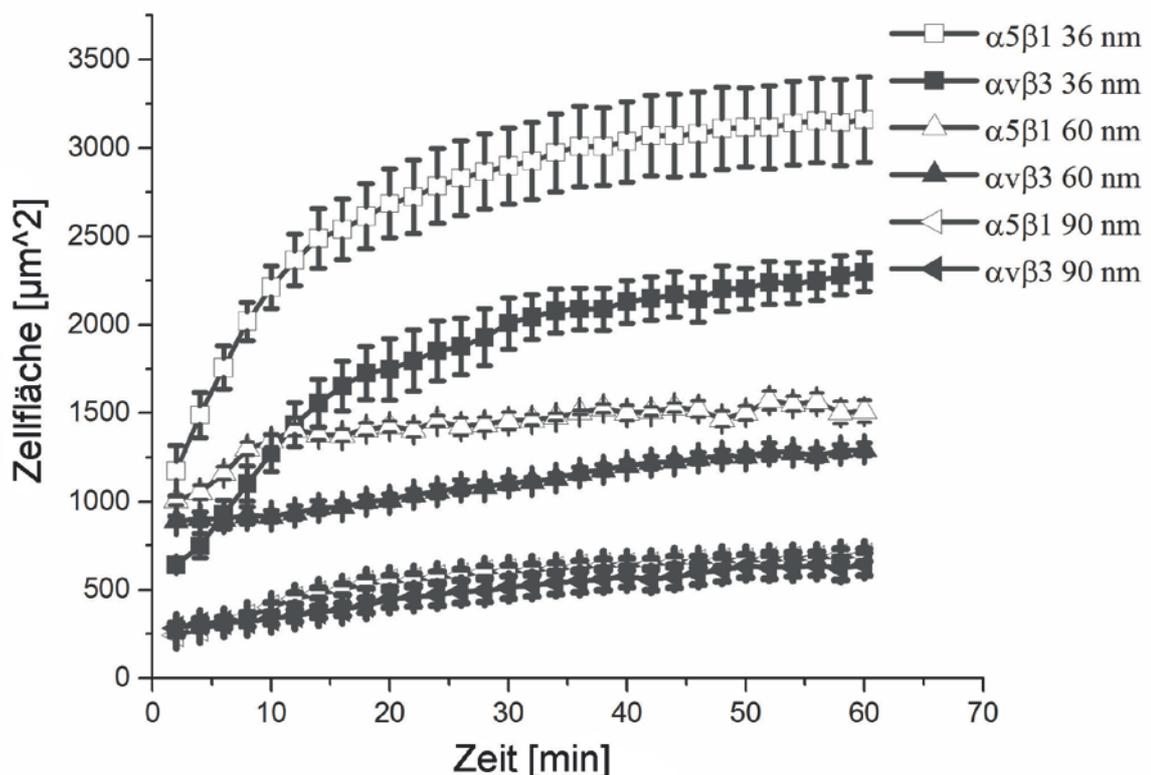


**Abbildung 37: Spreiten der U2OS-Zellen auf drei unterschiedlichen Goldnanopartikelabständen von 36 nm, 60 nm und 90 nm. Für 36 nm erreichen die Zellen eine größere maximale Zellfläche als für 60 und 90 nm. Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ist die Zellfläche auf allen Abständen erhöht im Vergleich zum  $\alpha_v\beta_3$ -**

## Ergebnisse und Diskussion

**Mimetikum.** Bei 36 nm bilden sich für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum Lamellipodien aus und die Zelle besitzt keine rundliche wie auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum.

Jedoch ist eine deutliche Diskrepanz in der projizierten Zellfläche zwischen den beiden Mimetika zu erkennen (Abb. 37, 38). Die Zellen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum besitzen im Gegensatz zu den Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum nach einer Beobachtungszeit von vier Stunden eine kleinere Zellfläche. Da zwischen den einzelnen Goldnanopartikeln die Substrate mit PEG-Silan passiviert wurden, waren die Zellen im Stande nur an den funktionalisierten Goldnanopunkten anzuheften. Der Unterschied in der Zellfläche verringert sich, je größer die Abstände zwischen den Goldnanopartikeln gewählt werden. Dementsprechend vermindert sich dieser Effekt für 60 nm und für 90 nm Abstände, für 90 nm überlagern sich die beiden Kurven sogar. Bei den Abständen 60 nm und 90 nm ist ein steilerer Anstieg der  $\alpha_5\beta_1$ -Kurve am Anfang des Spreitprozesses zu erkennen, während die  $\alpha_v\beta_3$ -Kurve sehr langsam bis zur maximalen Zellfläche ansteigt. D.h. das initiale Zellwachstum ist größer für Zellen bei denen  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinheterodimere mittels des selektiven Mimetikums rekrutiert wurden.



**Abbildung 38:** Progressionskurve der U2OS-Zellfläche. Dargestellt sind beide Mimetika auf drei verschiedene Goldnanopartikelabständen. Die Zellfläche wächst für das  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat schneller an, als für

## Ergebnisse und Diskussion

das  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat für alle drei Goldnanopartikelabstände. Bei kleiner werdenden Abständen der Goldnanopartikel wächst die Differenz zwischen der  $\alpha_5\beta_1$ - und der  $\alpha_v\beta_3$ -Kurve. n=25

### **5.1.2 Spreitgeschwindigkeit der U2OS-Zellen**

Die Abbildung 39 zeigt die Geschwindigkeit des Spreitvorgangs, welche mit Hilfe des ImageJ Plugins Multiple Kymograph gemessen und in Abhängigkeit der Zeit als Diagramm dargestellt wurde. Die Zellen breiten sich auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -funktionalisierten Substrat schneller aus als auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierten, durchlaufen ein Maximum und verlieren wieder an Geschwindigkeit. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum durchläuft die Zellausbreitungsgeschwindigkeit keine auffälligen Extrema und schwankt lediglich ganz leicht an einigen Zeitpunkten. Auf 60 nm Substraten ist die Geschwindigkeit zu Beginn des Ausbreitungsprozesses höher für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Ungefähr nach einer halben Stunde erreichen jedoch die Zellen dieselbe Ausbreitungsgeschwindigkeit für beide Mimetika. Bei einem NP-Abstand von 36 nm zeigt die Ausbreitungsgeschwindigkeit für das  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat ein lokales Minimum zu Beginn des Kurvenverlaufs. Dieses Minimum wird vermutlich durch den anfänglichen Zellausbreitungsprozess verursacht. Bei einem Ausbreitungsvorgang der Zelle auf einer Oberfläche durchläuft diese meistens mehrere Stadien. Im ersten Schritt nimmt die Zelle einen Kontakt mit der Oberfläche auf. Die ganz frühe Phase des Zellausbreitungsvorgangs wird durch eine passive Adhäsion und eine Zelldeformation gezeichnet.<sup>113</sup> Da bei einem NP-Abstand von 36 nm auch für das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ein leichtes lokales Minimum beobachtet wird, werden die Minima eventuell durch die hohe Dichte des Mimetikums verursacht. Somit bewirkt eine hohe Konzentration des Mimetikums auf dem Substrat, anfänglich eine geringe Geschwindigkeit des Zellspreitens die sich im Anschluss dann erhöht.

## Ergebnisse und Diskussion

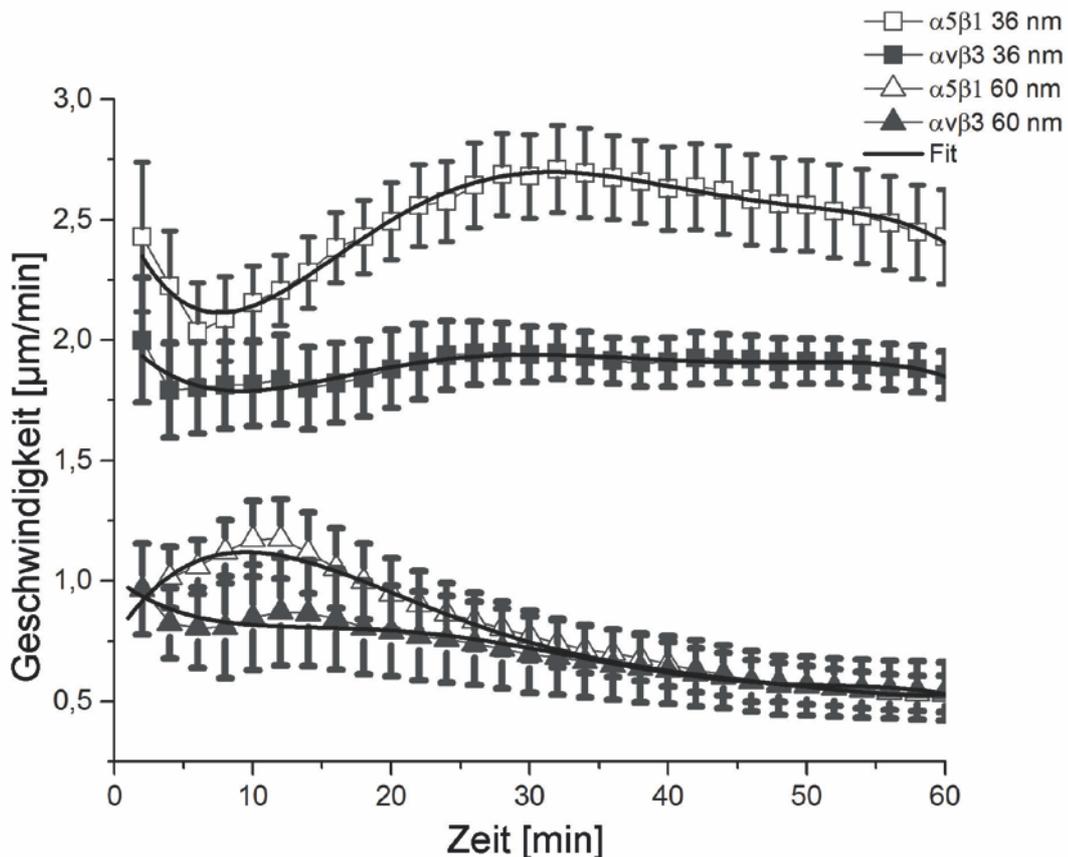
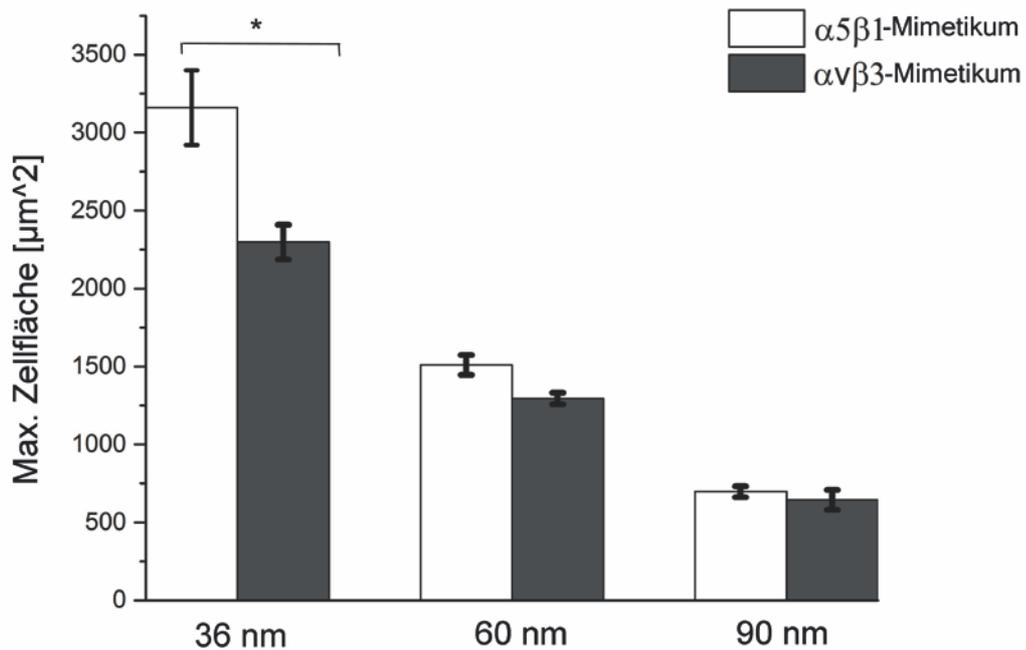


Abbildung 39: Spreitgeschwindigkeit der U2OS-Zellen auf integrinselektiven Mimetika für 30 nm und 60 nm. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum spreiten die Zellen schneller als auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum für beide NP-Abstände. Bei einem Abstand von 60 nm spreiten die Zellen langsamer als bei 36 nm für beide Mimetika. Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum durchlaufen die Kurven ein Maximum und verlieren dann an Geschwindigkeit. Nach 30 min erreichen die beiden Kurven für 60 nm ungefähr die gleiche Spreitgeschwindigkeit.  $n=25$ , Polynomialer Fit

### 5.1.3 Maximale projizierte Zellfläche

Ebenfalls unterscheidet sich die maximale projizierte Zellfläche für U2OS (Abb. 40), die auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum und auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ausgesät wurden. Zusätzlich besteht ein Unterschied in der Größe der Zellfläche in Abhängigkeit der verwendeten Goldnanopartikelabstände. Für einen NP-Abstand von 36 nm wird für das  $\alpha_5\beta_1$ -funktionalisierte Substrat eine ca. 30 % größere Maximalzellfläche erreicht als auf dem entsprechenden  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat. Je größer die Goldnanopartikelabstände gewählt werden, desto geringer ist dieser Unterschied zwischen den beiden Mimetika. Jedoch beträgt er für 60 nm 15 % und für 90 nm nur noch 7,5 %.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 40: Maximale Zellfläche für  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika. NP-Abstände betragen 36 nm, 60 nm und 90 nm. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat erreichen U2OS-Zellen eine höhere maximale Zellfläche als auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat für alle NP-Abstände. Je größer die NP-Abstände und damit je geringer die Ligandendichte auf dem Substrat gewählt werden, desto geringer fällt die maximale Zellfläche für beide Mimetika aus.  $p=0,0001$**

Da die Zellfläche und die Zellausbreitungsgeschwindigkeit auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum erhöht sind, lässt dies vermuten, dass das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin hauptsächlich für das Zellspreiten verantwortlich ist, während das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin während des Zellausbreitungsprozesses keine große Rolle spielt und eher bei der Bildung stabiler Fokalkontakte ins Spiel kommt. Fibronectin- und Vitronectin-beschichtete Oberflächen zeigen eine ähnliche Wirkung auf Zellen<sup>114</sup> wie die in dieser Arbeit verwendeten Liganden. Auf Fibronectin nimmt man an, dass die Adhäsion größtenteils durch das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und auf Vitronectin durch das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt wird. Auf Fibronectin können die Zellen eine größere projizierte Fläche ausbilden als auf Vitronectin. Die Fokaladhäsionen bilden dünnere Strukturen auf Fibronectin aus, die über die ganze Zellfläche verteilt sind. Auf Vitronectin dagegen zeigen Zellen größere Cluster der Adhäsionsproteine auf, die größtenteils in der Zellperipherie lokalisiert sind. Jedoch scheint die Moleküldichte des Mimetikums auf der Oberfläche, eine große Rolle zu spielen. Je dichter die Moleküle beieinander liegen, desto leichter erkennt die Zelle das integrinselektive Mimetikum und desto schneller kann sie spreiten und eine größere Zellfläche erreichen. Vor

## Ergebnisse und Diskussion

einiger Zeit wurde von Cavalcanti-Adam et al. gezeigt, dass die Ligandendichte auf der Oberfläche entscheidend für die Bildung stabiler Fokaladhäsionen und für das beständige Zellspreiten ist<sup>115</sup>. Dort wurden cRGD-biofunktionalisierte Goldnanopartikel-Oberflächen mit unterschiedlichen Abständen von 58 nm und 108 nm verwendet. Im Vergleich zu 58 nm Abständen wurde auf 108 nm verzögertes Zellspreiten mit mehreren Protrusions-Rückzugs Zyklen festgestellt. Von Arnold et al. wurde ebenfalls ein minimal notwendiger Abstand zur Ausbildung der Integrincluster und der Integrinaktivierung festgestellt<sup>10</sup>. Vor kurzem wurde von Liu et al. die Zugkraft der Integrine mit Hilfe der molekularen Zugkraftmikroskopie (MTFM) in Kombination mit der BCMN und cRGD auf 50 und 100 nm Abständen untersucht. Die Integrine auf den größeren Abständen zeigten dabei eine deutlich reduzierte Zugkraft im Vergleich zu den kleineren Abständen<sup>116</sup>. Bei diesen Untersuchungen wurde das cRGD verwendet, welches verschiedene Integrinheterodimere bindet. 2004 stellten Mondal et al. seine Aktivität nicht nur gegenüber dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wie das bisher vermutet wurde, sondern auch gegenüber dem  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin fest<sup>117</sup>. Deswegen beeinflussen bei diesen Experimenten eher mehrere Integrintypen das Zellverhalten, dabei bleibt aber die Frage offen wie die Zellantwort durch einen bestimmten Integrintyp beeinflusst wird.

## **5.2 Untersuchung der Fokaladhäsionen**

### **5.2.1 Vinculinclustergröße auf verschiedenen Goldnanopartikelabständen**

Um den Einfluss der einzelnen Integrinheterodimere auf die Größe der Fokalkontakte zu untersuchen, wurde Phosphopaxillin (Abb. 44), Vinculin (Abb. 41) und Aktin mittels immunozytochemischer Färbung untersucht. Die Analyse der Vinculinclusterfläche (Abb. 43) ergab erhöhte Werte auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum für alle drei Abstände. Für 30 nm und 60 nm waren die Vinculincluster signifikant größer auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum. Für den 90 nm Abstand ist zwar die Clustergröße auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum erhöht, jedoch ist der Unterschied zum  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum nicht signifikant. Zellen, die auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ausgesät wurden, zeigten meistens Fokaladhäsionen peripher. Im Gegensatz dazu wiesen Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum eher fibrilläre Fokaladhäsionen über die ganze Zellfläche auf.

## Ergebnisse und Diskussion

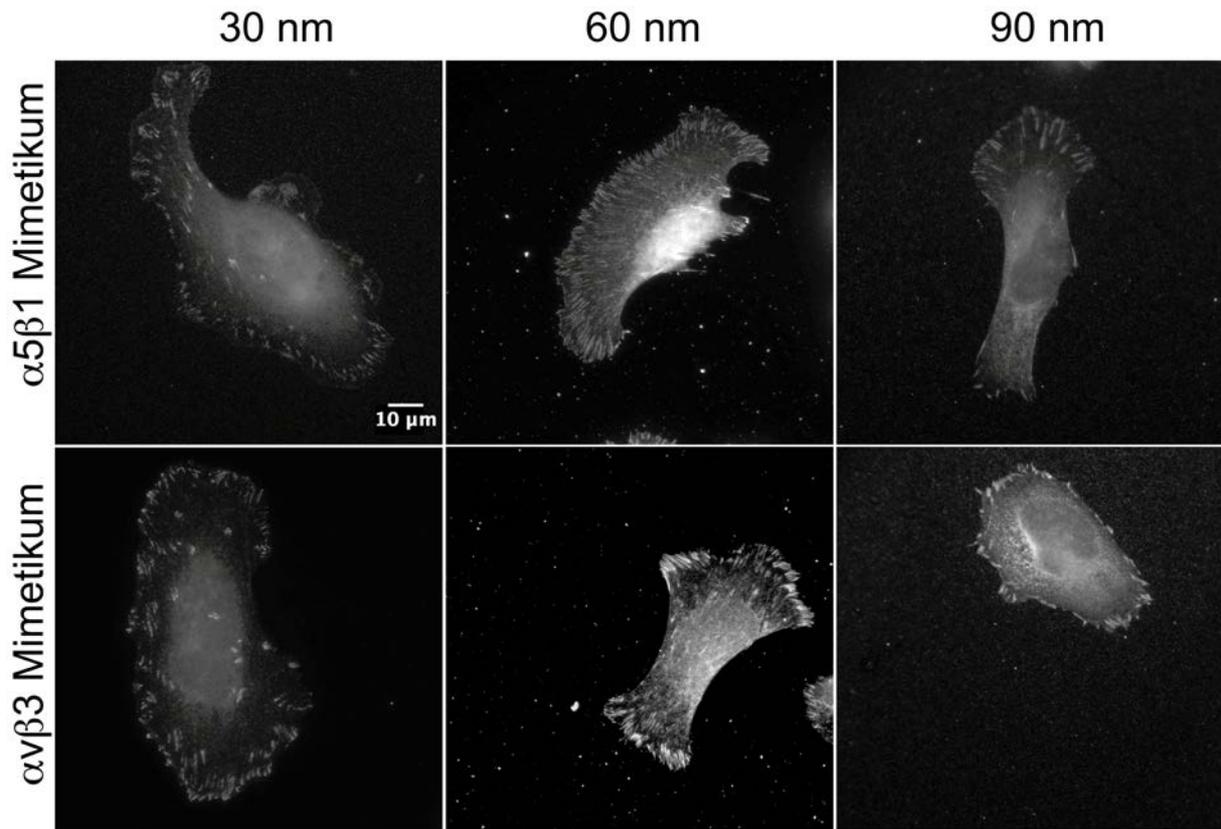


Abbildung 41: Immunocytochemisch angefarbtes Vinculin in U2OS-Zellen auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 36 nm, 60 nm und 90 nm.

Werden die Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ausgesät, so beginnen sie nach der Adhäsion unter Ausbildung von Lamellopodien sich sehr schnell auf dem Substrat zu bewegen. Auf dem  $\alpha_V\beta_3$ -Substrat dagegen ist die Bewegung der Zellen minimal und die Ausbildung der Lamellopodien bleibt aus (Abb. 42).

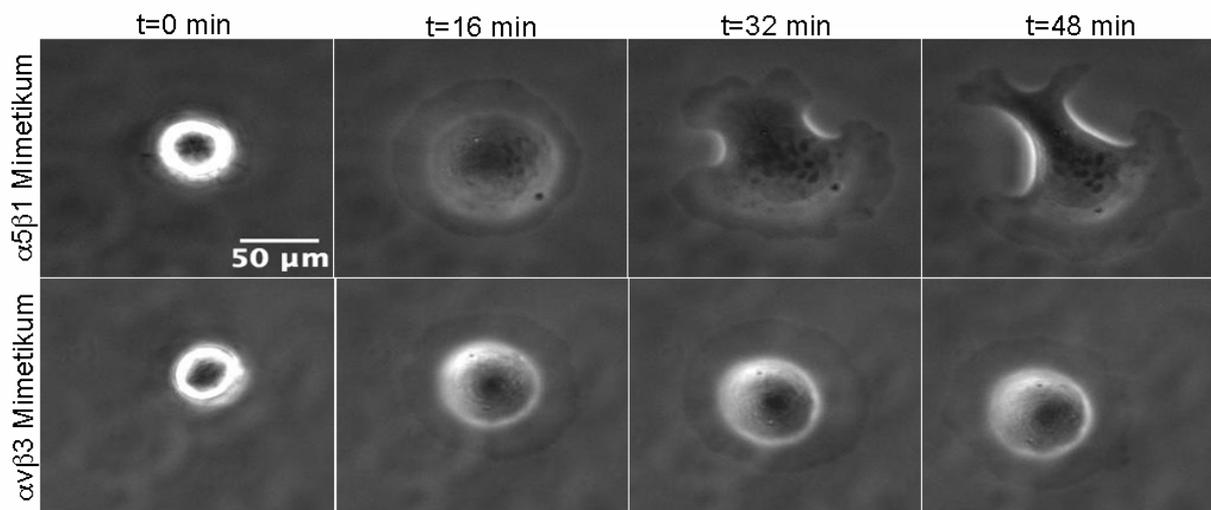


Abbildung 42: Unterschiedliches Spreitverhalten von U2OS-Zellen auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetika. Es sind unterschiedliche Zeitpunkte des Spreitprozesses aufgezeigt. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat beginnt die Zelle nach 30

## Ergebnisse und Diskussion

Minuten sich zu polarisieren und bewegt sich auf dem Substrat. Zellen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat ändern sogar nach 48 Minuten kaum ihre Form.

Verantwortlich für solch ein substratspezifisches Verhalten könnte die schon vorhin erwähnte Vinculinclustergröße sein. Da diese auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum reduziert ist, ist die Adhäsion an das Substrat dementsprechend schwächer. Da auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat größere Vinculin Cluster ausgebildet werden, ist auch die Anbindung dementsprechend stärker und die Bewegung dagegen reduziert. Somit ist der Adhäsionseffekt geringer in Zellen, die kleinere Vinculincluster besitzen, es fällt ihnen einfacher sich auf dem Substrat zu bewegen. Allerdings wird hier eine chaotische Bewegung im Gegensatz zum  $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierten Substrat beobachtet.

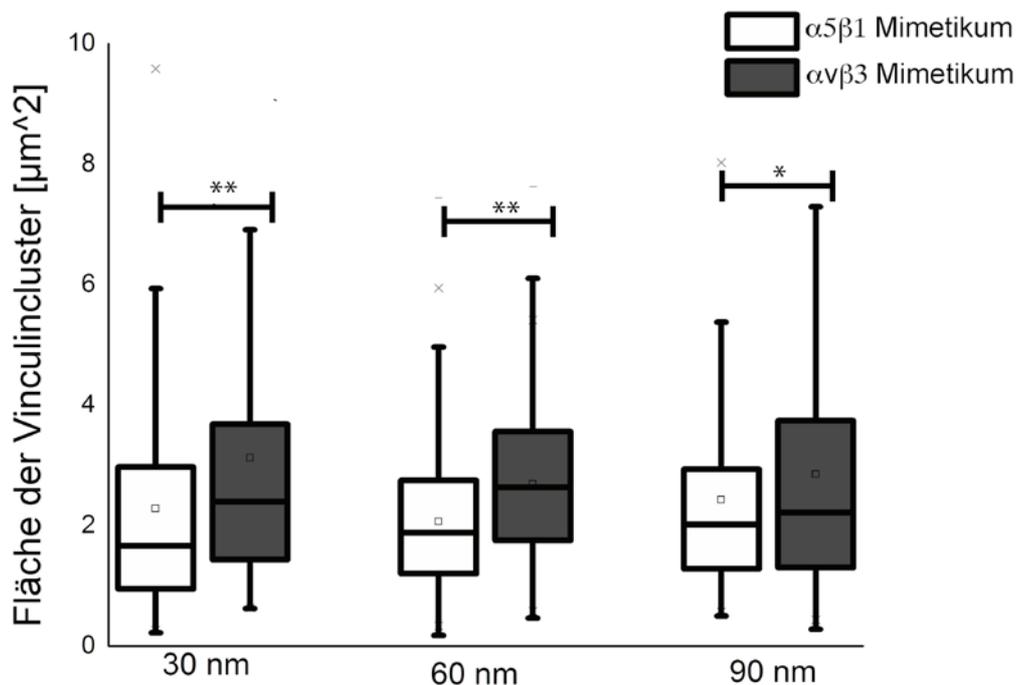


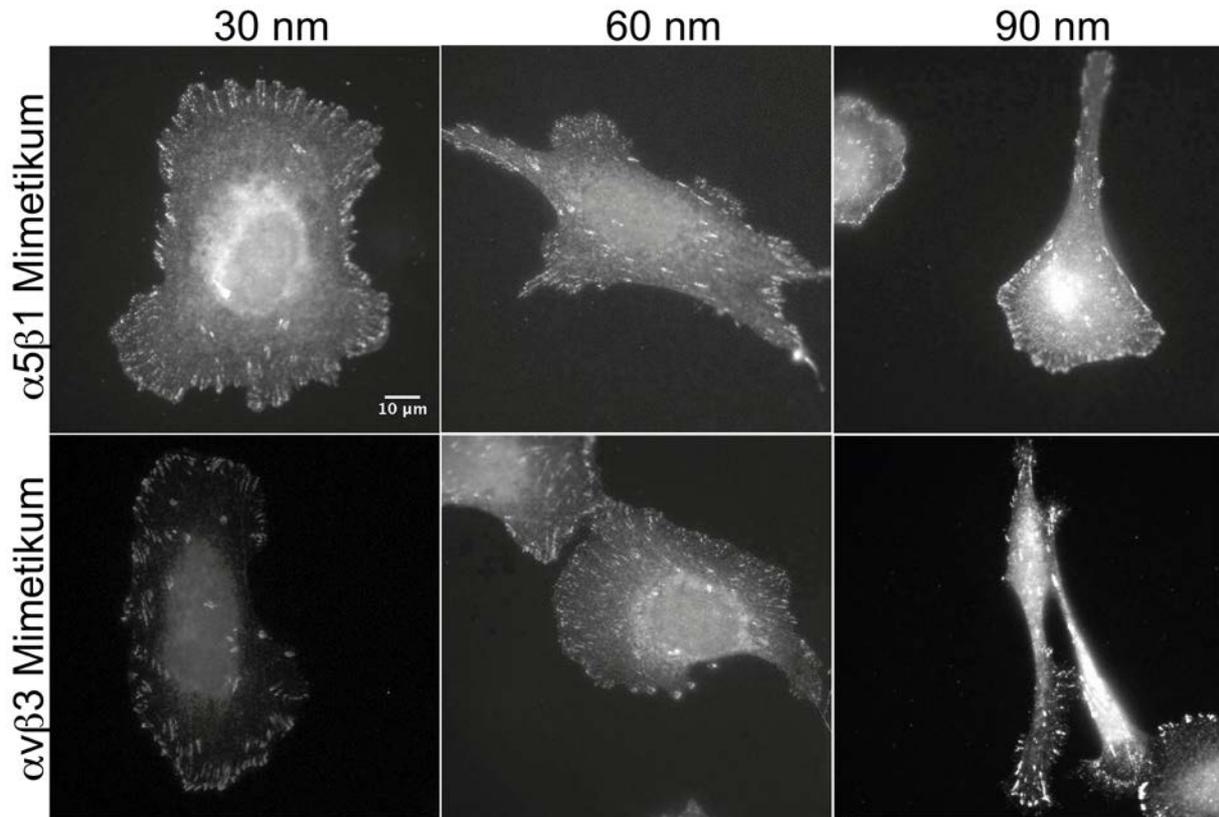
Abbildung 43: Boxplot-Darstellung der Vinculinclustergröße auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm. Die Vinculinclusterfläche ist für alle drei NP-Abstände höher auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum als auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Die Werte der Vinculinclusterfläche liegen in dem Boxplot-Diagramm zwischen 25 % und 75 % und die Whisker zwischen 10 % und 90 % des Datenbereichs. Die waagerechte Linie in der Box zeigt den Median. \*\* $p < 0,0001$ , \* $p < 0,001$ ,  $n = 30$

### 5.2.2 Phosphopaxillinclustergröße auf verschiedenen Goldnanopartikelabständen

Es wurde in der Literatur berichtet, dass die Phosphorylierung von Paxillin an Tyrosin 118 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und dem Abbau bzw. der Umordnung der Fokaladhäsionen einnimmt. Das Paxillin wird bei der Aktivierung und Anbindung der Integrine an die EZM bei der Adhäsion phosphoryliert<sup>118</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde

## Ergebnisse und Diskussion

Phosphopaxillin immunocytochemisch angefärbt (Abb. 44), um den Einfluss der einzelnen Integrine auf die Paxillinphosphorylierung zu überprüfen.



**Abbildung 44: Immunocytochemisches Anfärben des Phosphopaxillins auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_5\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm.**

Dafür wurde die Größe der Paxillincluster auf beiden Mimetika für die NP-Abstände 30 nm, 60 nm und 90 nm analysiert. Cluster des Phosphopaxillins werden auf dem  $\alpha_5\beta_3$  Mimetikum signifikant ( $p < 0,0001$ ) kleiner wenn der Abstand der Goldnanopartikel von 30 auf 60 nm erhöht wird. Wird nun der Goldnanopartikelabstand weiter auf 90 nm erhöht, so reduziert sich die Clustergröße hingegen nicht signifikant im Vergleich zu 60 nm aber signifikant im Vergleich zu 30 nm (Abb. 45). Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ist zwar beim Übergang von 30 nm auf 60nm eine geringe Reduktion in der Clustergröße bemerkbar jedoch ist sie nicht signifikant. Allerdings besteht ein signifikanter Größenunterschied zwischen 30 nm und 90 nm sowie zwischen 60 nm und 90 nm. Somit wird bei der  $\alpha_5\beta_1$ -integrinvermittelten Adhäsion die Paxillinphosphorylierung erst beim Übergang zu größeren Goldnanopartikelabständen bzw. geringerer Ligandendichte auf dem Substrat beeinflusst. Jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mimetika auf den einzelnen Nanopartikelabständen festgestellt. Somit stellen die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_3$  keinen großen Unterschied für die Bildung der Phosphopaxillincluster dar.

## Ergebnisse und Diskussion

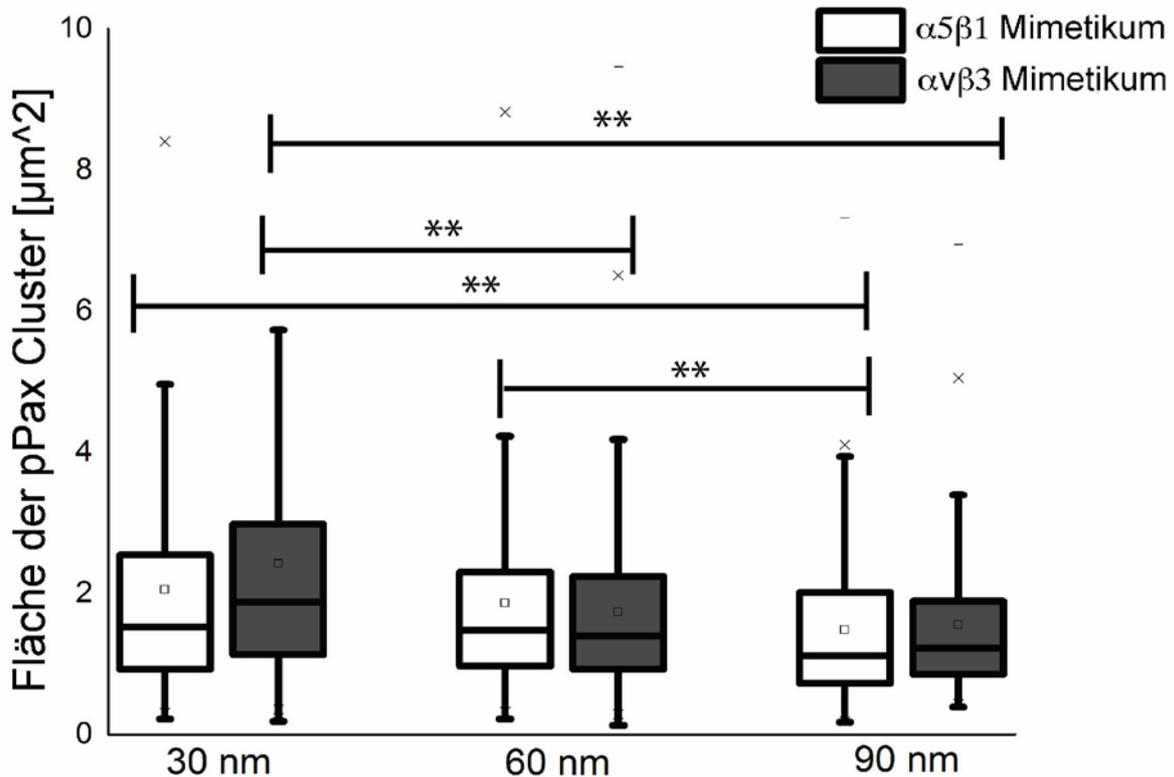


Abbildung 45: Boxplot-Darstellung der Phosphopaxillinclusterfläche auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm. Die Werte der Phosphopaxillinclusterfläche liegen in dem Boxplot-Diagramm zwischen 25 % und 75 % und die Whisker zwischen 10 % und 90 % des Datenbereichs. Die waagerechte Linie in der Box zeigt den Median. \*\* $p < 0,0001$ , \* $p < 0,001$ ,  $n = 30$

### 5.2.3 Zyxin und Aktin

Aktinfilamente kommen in zwei unterschiedlichen Formen in der Zelle vor. Zum einen ist es der quasi zweidimensionale Aktinkortex und zum anderen das dreidimensionale Aktinnetzwerk, welches im Zytosol lokalisiert ist. Der Aktinkortex besteht aus teilweise polymerisierten Aktinfilamenten und bildet eine „Rinde“, die sich an der Zellwand befindet. Da die Dicke im Vergleich zur lateralen Ausdehnung vernachlässigt werden kann wird der Kortex als zweidimensional betrachtet. Das im Zytosol lokalisierte Aktin stellt ein miteinander verknüpftes Aktinnetzwerk dar. Wird die Zelle durch innere oder äußere Einflüsse stimuliert, so bildet dieses Netzwerk oft parallel angeordnete und dicht beieinander liegende Filamente aus.

Zellen üben Kontraktionskräfte auf die EZM hauptsächlich über das Aktinzytoskelett über die Fokaldhäsionen aus, während mechanische Kräfte der EZM ebenfalls über Fokaldhäsionen an Aktin weitergeleitet werden. Dabei spielt das Fokaldhäsionsprotein Zyxin eine entscheidende Rolle und scheint die zu übermittelnden Kräfte zwischen dem extra- und dem intrazellulären

## Ergebnisse und Diskussion

Raum weiterzuleiten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Zyxin immunozytochemisch und Aktin mittels Phalloidin fluoreszent markiert (Abb. 46). Dabei wurde ein  $\alpha_5\beta_1$  und ein  $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisiertes Substrat verwendet. Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat wurden deutlicher ausgebildete Zyxincluster in der Peripherie der Zelle und ein dichteres Aktinzytoskelett beobachtet. Wobei das Zyxin mit den Aktinfasern verbunden war. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Ligand lagen die Zyxincluster mehr im Innern der Zelle und waren deutlich geringer an der Anzahl und das Aktinnetzwerk nicht so dicht vernetzt wie auf dem  $\alpha_5\beta_1$  Ligand. Vor einiger Zeit stellte Rahmouni et al.<sup>119</sup> ein System zur Messung der  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -integrinvermittelten Kräfte vor. Dabei wurden elastische Goldnanopartikel-bedeckte-PEG-Säulen verwendet, die es ermöglichten die Kräfte mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen. Dabei stellten sie fest, dass Zellen, die über das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin adhäreren, höhere Kräfte auf die Nanosäulen ausüben als Zellen, welche über das  $\alpha_v\beta_3$  mit den Säulen wechselwirken. Des Weiteren zeigten die Zellen in dieser Studie einen höheren Zyxinlevel auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat im Vergleich zum  $\alpha_v\beta_3$ . Das ist ein deutlicher Hinweis auf unterschiedliche Mechanismen bei der Krafterzeugung der Zellen.

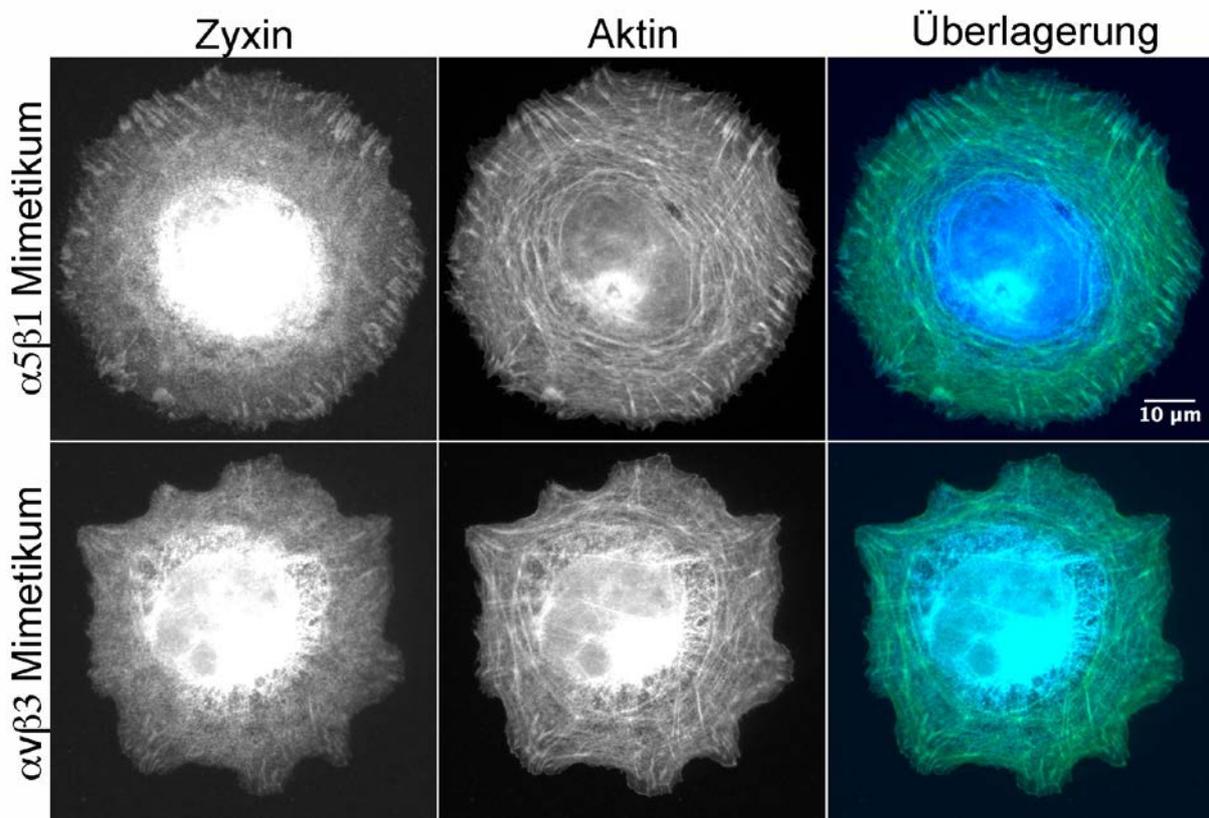


Abbildung 46: Immunozytochemisches Anfärben des Zyxins und des Aktinnetzwerkes für  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika

### **5.3 Untersuchung der $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine**

#### **5.3.1 Screening der Antikörper**

Zur Überprüfung der Integrinrekrutierung durch das  $\alpha_5\beta_1$ - und das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum wurden immunozytochemische Färbungen der beiden Integrinheterodimere durchgeführt. Zur Durchführung dieser Färbungen musste im ersten Schritt eine Reihe von Antikörpern getestet werden, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Integrinheterodimere  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$  zuverlässig erkennen. Dazu wurde mehrere Antikörpern, die das  $\alpha_5\beta_1$ - oder das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinheterodimer ansprechen, getestet. Es wurden sowohl Antikörper eingesetzt, die beide Untereinheiten der Integrine erkennen, als auch welche, die nur eine der beiden Untereinheiten binden (Abb. 47). Für die Untersuchung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinheterodimers wurden die Antikörper anti  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin mouse IgG, zwei unterschiedliche anti- $\alpha_5$ -Integrin rabbit IgG, das anti- $\beta_1$ -Integrin mouse IgG und das anti- $\alpha_5$ -Integrin mouse IgG verwendet. Da die genannten Antikörper kein erfolgreiches Anfärben des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinheterodimers zeigten wurde der anti  $\alpha_5$ -Integrin rat IgG Antikörper. Dieser Antikörper erwies sich als der beste zur Detektion des  $\alpha_5$ -Integrins für das vorliegende System (Abb. 47).

Zum Anfärben des  $\alpha_v\beta_3$  -Integrins wurden zwei unterschiedliche anti- $\alpha_v$ -Integrin mouse IgG, der anti- $\beta_3$ -Integrin mouse IgG und der anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mouse IgG verwendet. Für die Detektion des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinheterodimers wurde der letztgenannte Antikörper verwendet, da er beide Untereinheiten dieses Integrins erkennt.

## Ergebnisse und Diskussion

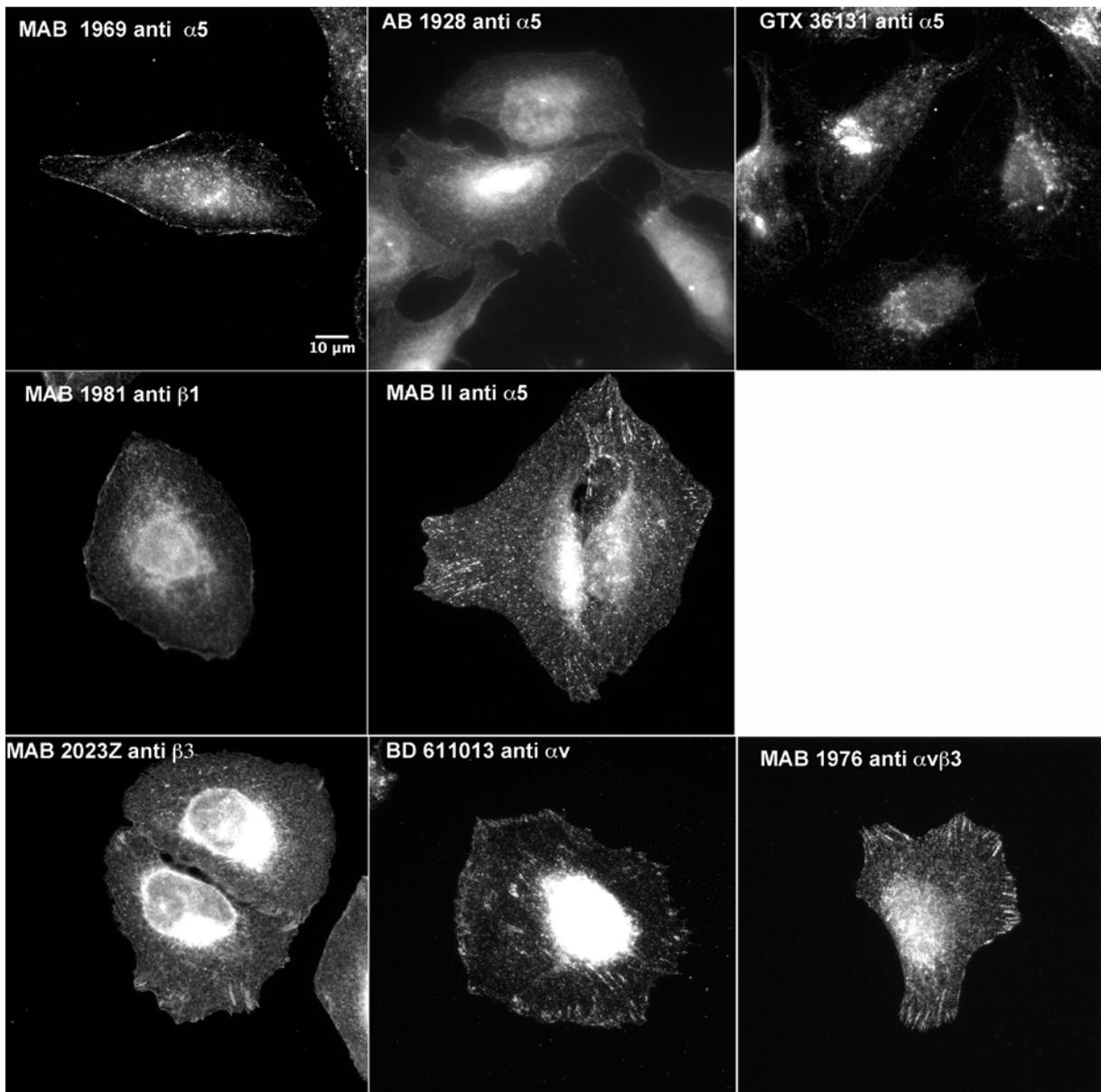


Abbildung 47: Screening der Integrinantikörper. Es wurden mehrere Antikörper getestet und die verwendet die am besten die beiden Integrinheterodimere erkennen. Für weitere Experimente wurden das MAB II anti  $\alpha_5$  und das MAB 1976 anti  $\alpha_v\beta_3$  verwendet.

### 5.3.2 Kontrollexperimente auf Fibronektin und Vitronektin

Diese Experimente dienten einerseits als Kontrolle für Adhäsionsexperimente mit den Mimetika, andererseits wurde mit ihrer Hilfe bewiesen, dass U2OS-Zellen notwendige Integrine zur Untersuchung der selektiven Mimetika aufweisen (Abb. 48).

In der Literatur wurde ein unterschiedliches Zellverhalten für Fibronektin- und Vitronektin-beschichtete Substrate berichtet. Es werden unterschiedliche Muster bei Vorgang des Zellspreitens sowie bei der Verteilung der Fokaladhäsionen beobachtet. Auf Fibronektin adhärierende Zellen spreiten auf dem Substrat viel stärker und bilden fokale Adhäsionen vor

## Ergebnisse und Diskussion

allem durch die gesamte ventrale Membran aus. Im Gegensatz dazu besitzen auf Vitronektin adherierende Zellen Fokaladhäsionen vorwiegend in der peripheren Zone<sup>114</sup>.

In dieser Arbeit wurden integrinselektive Mimetika zur Untersuchung des Zellspreitens und der Fokaladhäsionsbildung den beiden EZM-Proteinen Fibronektin und Vitronektin vorgezogen, da die Mimetika spezifisch nur die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  rekrutieren.

Zusätzlich wurden jedoch Zellexperimente auf Fibronektin und Vitronektin zur Überprüfung der Zelladhäsion und des Zellspreitens durchgeführt. Nach einer 4 stündigen Adhäsionszeit der Zellen auf den Substraten, wurden sie fixiert. Anschließend wurde eine immunozytochemische Färbung des  $\alpha_5$ - und des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins durchgeführt. Auf Fibronektin weisen die Zellen neben vereinzelt  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinclustern verstärkt  $\alpha_5$ -Integrin über die ganze ventrale Zellmembran verteilt auf. Auf Vitronektin treten dagegen  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster in der Peripherie auf, während das  $\alpha_5$ -Integrin nur einzelne sehr schwache Fokalkomplexe ausbildet.

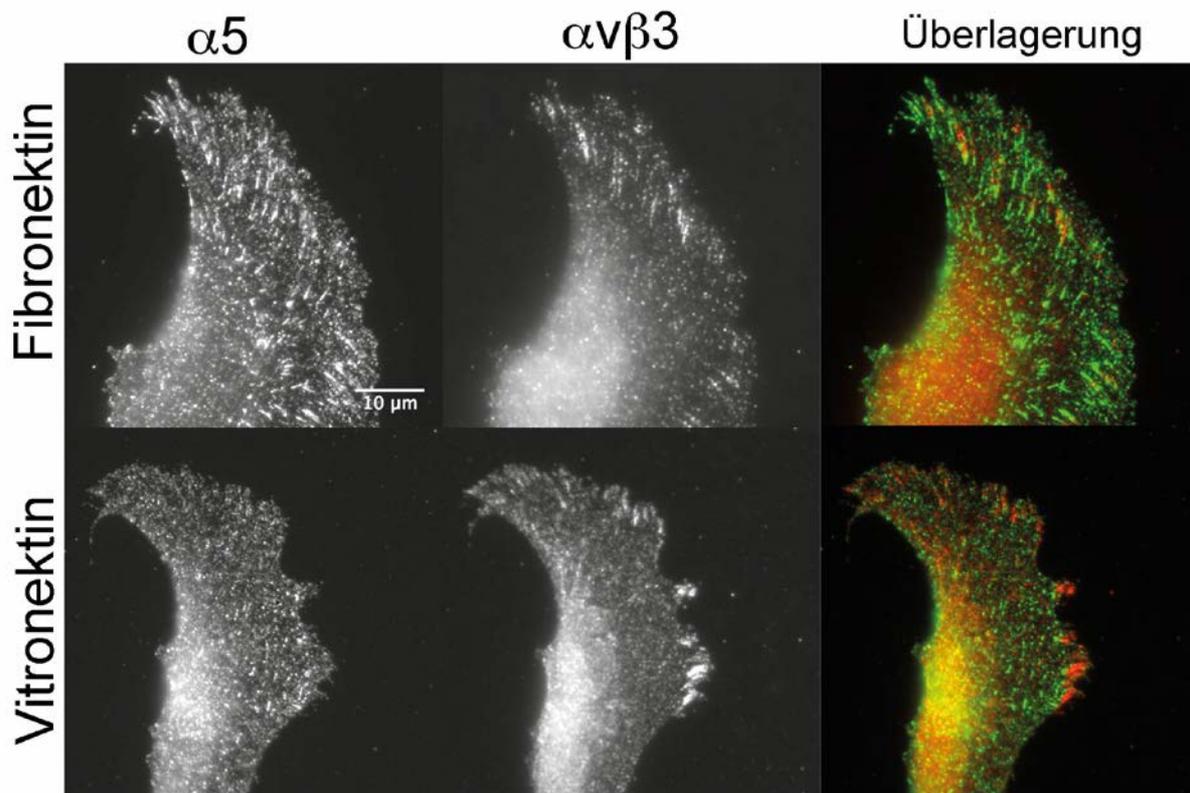


Abbildung 48:  $\alpha_5$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf homogen beschichteten Substraten mit Fibronektin und Vitronektin.

### 5.3.3 $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrinmuster auf Goldnanopartikeln funktionalisiert mit selektiven Mimetika

## Ergebnisse und Diskussion

Um die durch beide Mimetika rekrutierten Integrine zu detektieren, wurde die  $\alpha_5$ -Untereinheit indirekt markiert. Zur Untersuchung des  $\alpha_v$ -Integrins wurde das Fusionsprotein  $\alpha_v$ -mApple durch transiente Transfektion in den Zellen exprimiert. Vor der Integrindetektion wurden die Zellen auf goldnanostrukturierte Oberflächen, funktionalisiert mit selektiven Mimetika, ausgesät und nach 4 h fixiert. Hierfür wurden 30 nm Abstände und 60 nm Abstände verwendet. Der 90 nm Nanopartikelabstand wurde nicht verwendet, denn dieser bietet wie von Arnold et al. gezeigt eine zu geringe Ligandendichte die das Integrinclustern nicht erlaubt. Auf solchen großen Abständen sind die Zellen weder im Stande große Fokaladhäsionen auszubilden noch sich vollständig auszubreiten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Verringerung der Zellfläche und der Clusterfläche der Adhäsionsproteine (Kapitel 5.1, 5.2.1 und 5.2.2) beobachtet.

Auf allen Substratoberflächen wurden  $\alpha_v$ -Integrincluster gefunden, jedoch ist die Clustergröße auf 30 nm Partikelabständen erhöht im Vergleich zu 60 nm. Auf 60 nm Abständen sind  $\alpha_v$ -Integrincluster für das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ebenfalls größer, verglichen mit dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Zellen welche auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ausgesät wurden, wiesen zusätzlich  $\alpha_5$ -Cluster auf, welche mit den  $\alpha_v$ -Clustern kolokalisieren, wobei die  $\alpha_v$ -Cluster nicht so dominant waren wie auf den  $\alpha_v\beta_3$ -Substraten. Dagegen zeigten Zellen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum reine  $\alpha_v$ -Cluster die sich in der Peripherie der Zelle befanden. Weiterhin wurden für den 30 nm Abstand und das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum deutlichere  $\alpha_5$ -Cluster beobachtet, während auf dem 60 nm Abstand für das gleiche Mimetikum eher „dünnere“ Cluster, die eine fibrilläre Struktur aufweisen, beobachtet wurden (Abb. 49).

Somit führt die Rekrutierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins zu einer Aktivierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins. Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist nach den Ergebnissen des Kapitels 5.1 zwar nicht für das anfängliche Spreiten der Zellen notwendig, jedoch scheint es für die Bildung stabiler Fokalkontakte unentbehrlich zu sein. Dieses Verhalten könnte auch einen „Crosstalk“ zwischen den beiden Integrinen indizieren, denn Integrine sind befähigt, auch mit anderen Integrinheterodimeren zu kommunizieren und somit einen Multikomplex auszubilden. Solch ein Multikomplex führt dann weiterhin zur Aktivierung und Mobilisierung anderer Signalmoleküle<sup>120</sup>. Es wurden in der Literatur einige „Crosstalks“ zwischen Integrinen berichtet. Meistens wurde dabei die Funktion des Zielintegrins und die gleichzeitige Anbindung des sogenannten informationsübertragenden Integrins beschrieben. Es wurden viele Beispiele des Integrincrosstalks in primären Zellen aber auch in Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und anderen Zelllinien gefunden<sup>121</sup>. Die Wechselwirkung einzelner Integrine untereinander kann unterschiedliche Funktionen der Zelle wie z.B. Phagozytose<sup>122,123</sup>, Adhäsion<sup>124,125</sup>, Migration

## Ergebnisse und Diskussion

<sup>125,126</sup> oder Genexpression<sup>127</sup> beeinflussen. In vielen Fällen wird berichtet, dass das signalübermittelnde Integrin zu einem viel geringeren Anteil in betroffenen Zellen exprimiert wird als das Zielintegrin. Dies soll ein Hinweis dafür sein, dass die beiden beteiligten Integrine nicht miteinander um die Aktivierung eines Signalmoleküls konkurrieren, sondern dass das signalübermittelnde Integrin eine Signalkaskade auslöst, die die Funktion des Zielintegrins beeinflusst.

1994/95 haben Blystone et al. einen „Crosstalk“ zwischen den Integrinen  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  in Makrophagen nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass eine Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelte Phagozytose verhindert<sup>122,123</sup>.

Vor kurzem zeigte Guasch et al.<sup>128</sup>, dass bei Verwendung von abwechselnden adhäsiven Bereichen bestehend aus  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum aufgereinigte Integrine nur an das entsprechende Mimetikum binden. Werden auf diese Mikroinselsubstrate U2OS-Zellen ausgesät und anschließend Integrine immunocytochemisch untersucht, so wird das gleiche Verhalten wie oben beschrieben beobachtet. D. h. es wurden wieder beide Integrine auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum beobachtet. Folglich ist die Kollokalisierung des  $\alpha_5\beta_1$ - und des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins kein Effekt der in dieser Arbeit verwendeten nanostrukturierten Substrate sondern auf die Fähigkeit der beiden Integrine miteinander zu kommunizieren zurückzuführen. Somit wird höchstwahrscheinlich die hohe Affinität des  $\alpha_5\beta_1$ -Liganden durch den Crosstalk „übersehen“. Auf der molekularen Ebene, kommt es nach der Wechselwirkung der einzelnen Integrintypen mit der extrazellulären Matrix zur anschließenden Signalübermittlung. Solch eine Signalweiterleitung wird teilweise durch die Rho-Familie der GTPasen eingeleitet und führt zu spezifischen aber zur gleichen Zeit koordinierten Antworten zwischen den Rezeptoren<sup>129-131</sup>. RhoA-GTPasen spielen hauptsächlich eine Rolle bei der Reifung fokaler Komplexe, die durch Bindung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins entstehen. Eine Blockierung der Rho-GTPasen verhindert sogar die Bildung von Fokaladhäsionen<sup>132</sup>.  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin exprimierende Zellen besitzen eine höhere RhoA Aktivität als  $\alpha_v\beta_3$ -exprimierende Zellen und zusätzlich die Fähigkeit Adhäsionsstellen zu stabilisieren und diese mit dem Zytoskelett zu verbinden<sup>133</sup>. Dieser Mechanismus ist eng verbunden mit der Aktivierung des ATP-abhängigen Motorproteins Myosin-II. Die Hochregulation dieses Effektormoleküls, welches für die Aktin-getriebene Zellmotilität verantwortlich ist, erfordert die Anwesenheit des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins im Zusammenspiel mit dem  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Der beschriebene Mechanismus der RhoA-abhängigen Signalübertragung von innen nach außen (inside-out signalling) könnte auch in vorliegender Arbeit für die Anwesenheit des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum sein.

## Ergebnisse und Diskussion

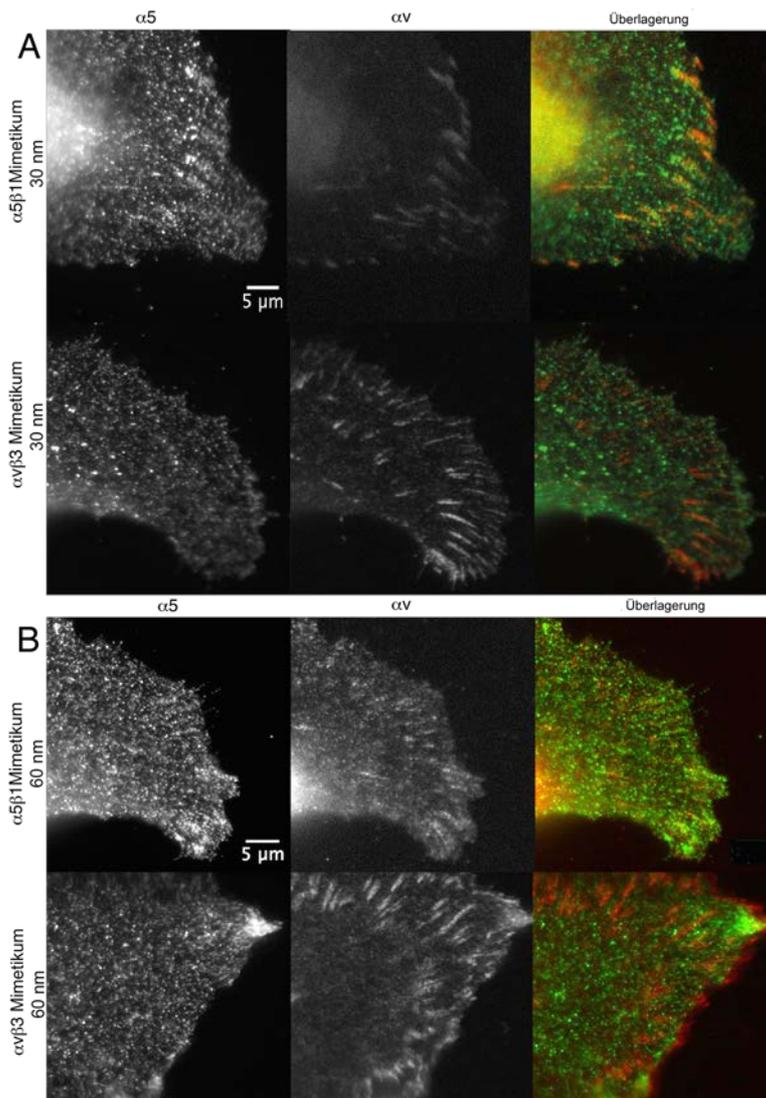


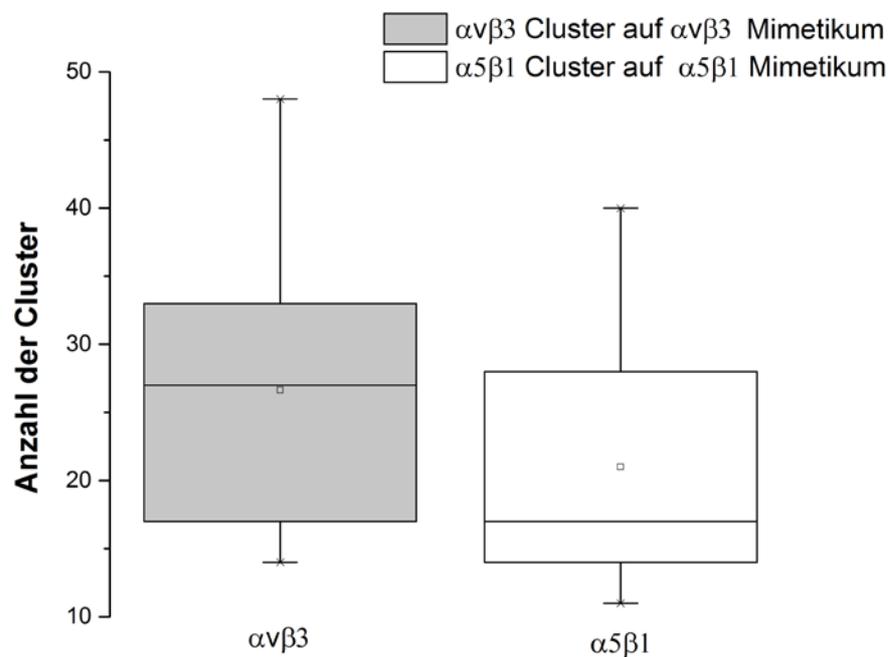
Abbildung 49:  $\alpha_5$ - und  $\alpha_V$ -Integrine auf 30 und 60 nm Goldnanopartikelabstand auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetika. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum sind  $\alpha_5$ - und  $\alpha_V$ -Integrincluster detektiert worden, während auf dem  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetikum nur  $\alpha_V$ -Integrincluster vorkommen

Aus den aufgenommenen Fluoreszenzbildern wurde die Anzahl der  $\alpha_V\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetikum und Anzahl der  $\alpha_5$ -Cluster auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum bestimmt (Abb. 50). Demnach ergab die Analyse eine höhere Anzahl der  $\alpha_V\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetikum als  $\alpha_5$ -Cluster auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Somit ist die Zelle im Stande auf dem  $\alpha_V\beta_3$ -Mimetikum durch Ausbildung großer Anzahl an  $\alpha_V\beta_3$ -Clustern stabil zu adhären. Auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum wird eine geringere Anzahl an  $\alpha_5$ -Clustern ausgebildet, dies führt womöglich unter anderem auch zur zusätzlichen Rekrutierung des  $\alpha_V\beta_3$ -Integrins zur notwendigen Stabilisierung der fokalen Kontakte.

Allgemein können Adhäsionskontakte die von Zellen ausgebildet werden anhand der molekularen und strukturellen Kriterien in zwei Gruppen unterteilt werden. Fokale Kontakte

## Ergebnisse und Diskussion

sind hauptsächlich in der Zellperipherie auffindbar und enthalten hohe Konzentrationen an Vinculin und Paxillin, Proteine die einen phosphorylierten Tyrosinrest sowie  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin besitzen. Im Gegensatz dazu bilden fibrilläre Adhäsionen gestreckte oder perlenschnurartige Strukturen die im Zellzentrum lokalisiert sind und einen hohen Anteil an Tensin und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin besitzen.<sup>134,135</sup> Diese zwei unterschiedlichen Adhäsionstypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Form und der molekularen Zusammensetzung, sondern scheinen auch unterschiedliche Aufgaben zu besitzen.<sup>136,137</sup> Klassische Fokalkontakte befinden sich üblicherweise in einer Entfernung von 10 - 20 nm vom Substrat. Fibrilläre Adhäsionen liegen dagegen 100 nm vom Substrat entfernt und bieten der Zelle keine starke Haftung.<sup>134</sup>



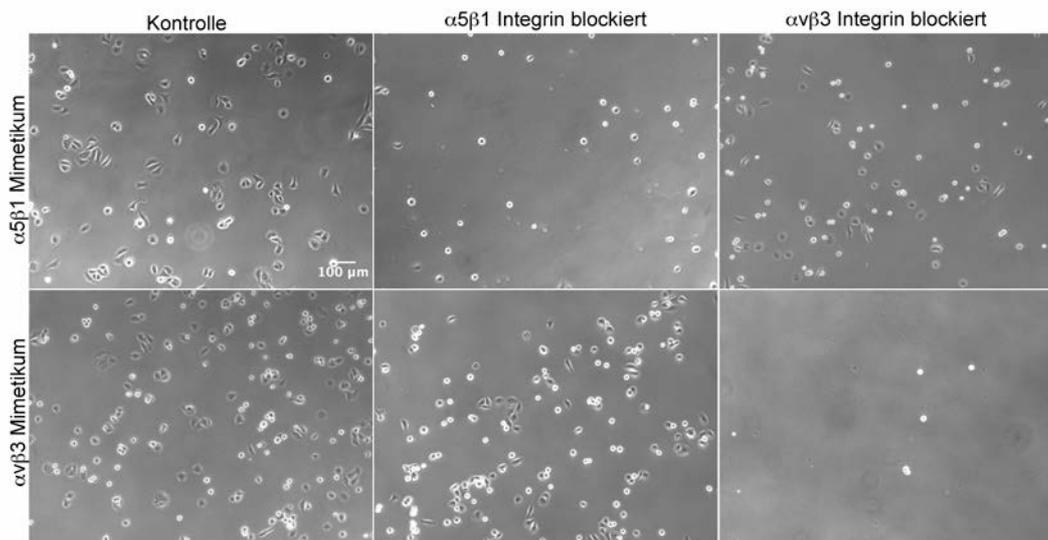
**Abbildung 50: Mittlere Anzahl der  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum und der  $\alpha_5\beta_1$ -Cluster auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Die Anzahl der  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ist höher als die Anzahl der  $\alpha_5\beta_1$ -Cluster auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Die Werte des Boxplots liegen zwischen 25 % und 75 %. Die Whisker liegen zwischen 10 % und 90 %. Die waagerechte Linie stellt den Median dar.**

### 5.3.4 Blockierungsexperimente

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Integrine im Einzelnen auf das Zellverhalten ausüben, wurden in vorliegender Arbeit Blockierungsexperimente der beiden Integrine durchgeführt. Die Inhibierung der einzelnen Integrine wurde mittels thiofreier Mimetika vollbracht. Anschließend wurden die Zellen auf ihr Adhäsionsverhalten auf den funktionalisierten Substraten getestet. Dabei wurde entweder das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin oder das  $\alpha_v\beta_3$ -

## Ergebnisse und Diskussion

Integrin inhibiert und anschließend die Zellen auf beiden Substratsorten ausgesetzt (Abb. 51). Bei Inhibierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins und anschließendem Aussähen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat wurde die Adhäsion der Zellen unterbunden. Wurden aber Zellen mit dem blockierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf gleiche Substrate ausgesetzt, so wiesen diese eine ungehinderte Adhäsion auf. Dementsprechend findet man keine Adhäsion auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat wenn das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin inhibiert ist. Wird dagegen das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin blockiert und Zellen auf demselben Substrat ausgesät, so findet Adhäsion statt. Dieses Resultat belegt nun, dass die Mimetika eine integrinselektive Adhäsion entweder über das  $\alpha_5\beta_1$ - oder das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auslösen.



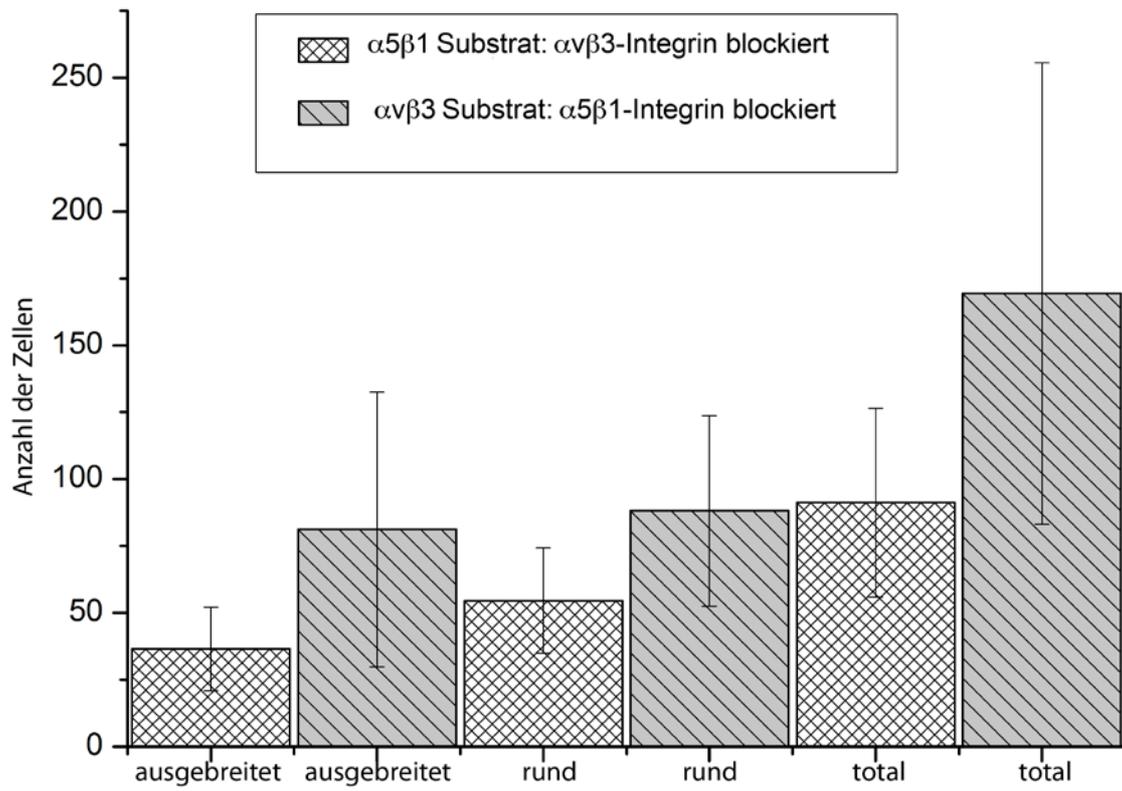
**Abbildung 51: Blockierung der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  zeigte wie selektiv beide Mimetika sind. Wird das eine Integrin blockiert, so findet Adhäsion ausschließlich auf dem anderen Mimetikum statt.**

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins einen größeren Einfluss auf das Zellverhalten ausübt, als die Blockierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins. Die Analyse der Zellzahl nach dem Inhibieren des jeweiligen Integrins ergab, dass weniger Zellen sich auf dem Substrat befinden, wenn das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin blockiert wird (Abb. 52). Aus der Gesamtanzahl der adhärenen Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum bleiben bei Inhibierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins 60% rundlich klein und sind sogar nach 4 h Adhäsionszeit nicht im Stande auf dem Substrat zu spreiten. Wird das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin blockiert, so ist die Gesamtanzahl der Zellen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat um 54 % höher als bei Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins. Auch die Anzahl der nicht vollständig gespreiteten Zellen ist mit 52 % etwas niedriger.

Die Blockierungsexperimente an beiden Integrinen zeigen zwar eine deutlich selektive Eigenschaft der Mimetika auf, jedoch wirkt sich die Inhibierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins

## Ergebnisse und Diskussion

dramatischer auf die Zelladhäsion aus und weist wiederum auf die notwendige Anwesenheit des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins wie schon bei der immunocytochemischen Anfärbung gesehen wurde, hin.



**Abbildung 52: Anzahl der Gesamtzellen, der runden und der gespreiteten Zellen auf beiden Mimetika nach Blockierung entweder des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins oder des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins.**

Zusätzlich wurde nach der Blockierung der einzelnen Integrine eine immunocytochemische Färbung des  $\alpha_5\beta_1$ - und des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins durchgeführt. Nach der Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins findet man auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum keine  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster mehr und das Adhäsionsmuster der  $\alpha_5$ -Untereinheit nimmt eine mehr fibrilläre Gestalt an. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum werden nach der Inhibierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins, weiterhin  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster beobachtet (Abb. 53).

Somit bewirkt eine Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins eine teilweise Funktionsstörung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins, es bleibt zwar eine Anheftung und Spreiten an das Substrat möglich, jedoch scheint es dass keine stabilen Fokalkontakte geformt werden können.

## Ergebnisse und Diskussion

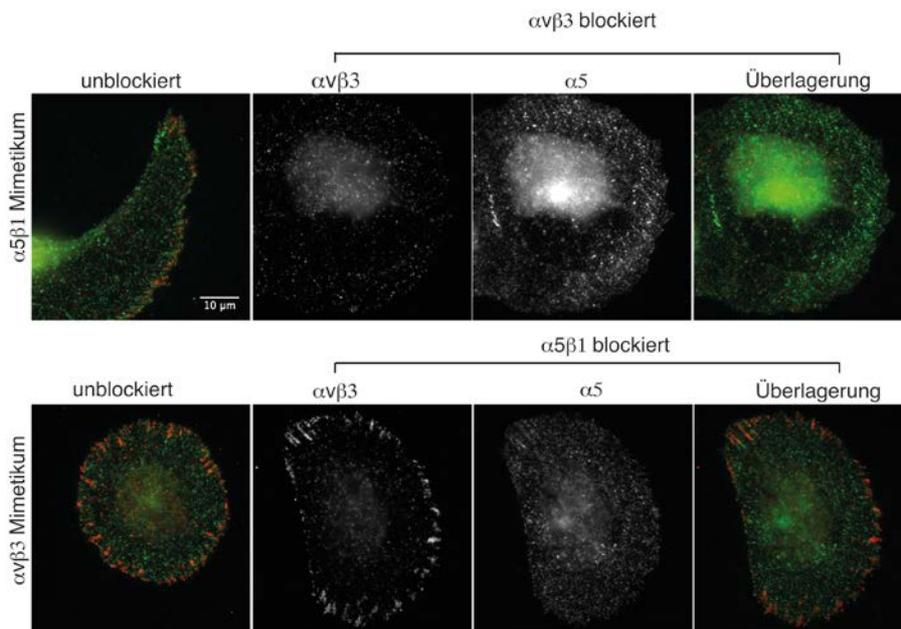


Abbildung 53: Anfärbung der Integrine  $\alpha_5$  und  $\alpha_v\beta_3$  nach dem Blockieren auf Substraten funktionalisiert mit den selektiven Mimetika.

### 5.3.5 $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum immobilisiert auf einem Substrat

Bisher wurden in dieser Arbeit Zelladhäsionsexperimente jeweils auf den einzelnen Mimetika beschrieben. Zur Untersuchung des Zellverhaltens bei Angebot beider Mimetika wurde das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum und das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum im Verhältnis 1:1 gemischt und auf Goldnanopartikeln immobilisiert. Wie auf Abbildung 54 zu sehen ist, verhalten sich Zellen auf doppelt funktionalisierten Substraten sehr ähnlich zu den Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -funktionalisiertem Substrat. Nach einer 4 stündigen Adhäsionszeit sind U2OS-Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat und auf dem doppelt funktionalisierten Substrat um ca. 30 % ausgebreitet im Vergleich zum  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat. Hier weisen die Zellen eine kleinere projizierte Fläche auf, zusätzlich befinden sich viele runde ungespreitete Zellen auf der Oberfläche, die sogar nach dem Waschen mit PBS nicht abgelöst werden können.

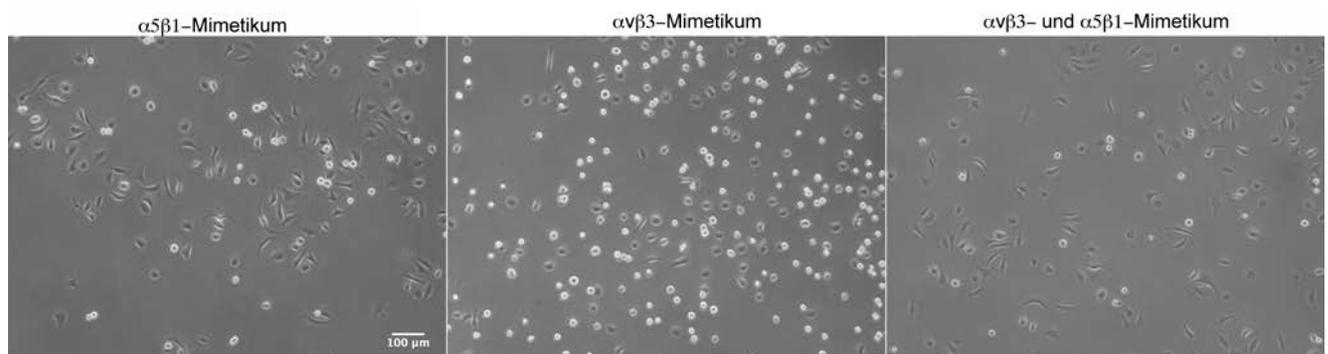
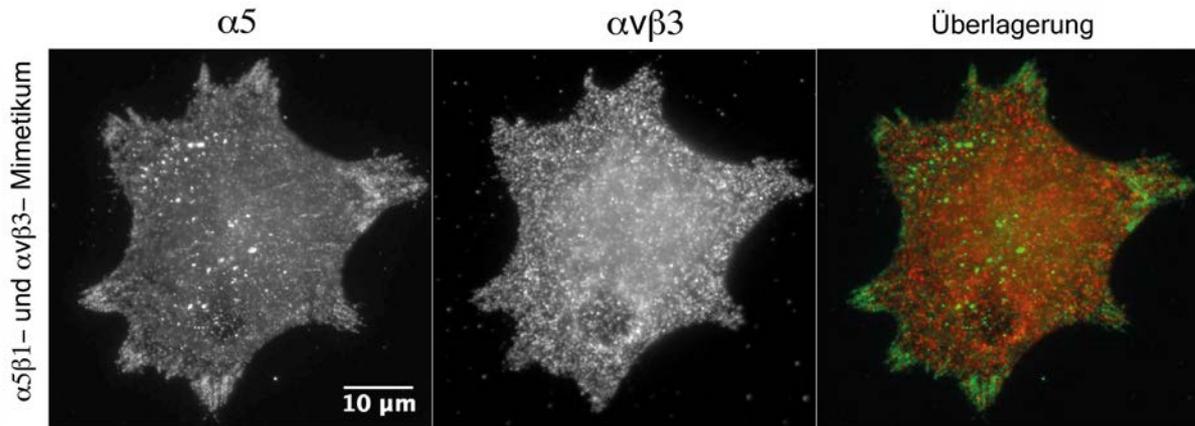


Abbildung 54: Links: Zelladhäsion auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum Mitte: Adhäsion auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum Rechts: Adhäsion auf beiden Mimetika

## Ergebnisse und Diskussion

Interessanterweise wurde bei der Anfärbung der beiden Integrine hauptsächlich das  $\alpha_5$ -Integrin auf den doppelt funktionalisierten Substraten detektiert. Dieses befand sich vorwiegend in der Zellperipherie und bildete im Gegensatz zum  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum keine fibrillären Strukturen sondern Cluster aus (Abb. 55).



**Abbildung 55: Integrinfärbung auf einem doppelt-funktionalisierten Substrat mit  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_5\beta_3$ -Mimetikum.  $\alpha_5\beta_1$ -Integrincluster befinden sich in der Zellperipherie.**

Welcher Mechanismus sich hinter solch einer Integrinrekrutierung verbirgt ist unklar. Womöglich wird bei Anwesenheit beider Mimetika als erstes das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und erst später das  $\alpha_5\beta_3$ -Integrin rekrutiert. Es wurden hier nur Substrate mit 60 nm Goldnanopartikelabstand doppelt funktionalisiert, da zuvor dieser Abstand von Cavalcanti-Adam et al.<sup>51</sup> als optimal für das Zellspreiten und Ausbildung der fokalen Adhäsionen von Fibroblasten berichtet wurde. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem größeren oder kleineren Abstand wieder ein anderes Adhäsionsmuster entsteht, da dadurch wiederum eine andere Ligandendichte den Zellen angeboten wird. Es sollte aber auch die projizierte Zellfläche sowie das Spreitverhalten auf Oberflächen funktionalisiert mit beiden Mimetika untersucht werden.

Die präzise Funktion der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_3$  während des Zellspreitens und der Ausbildung fokaler Kontakte ist bisher ungeklärt und bleibt von großer Bedeutung für das Verständnis dieser Prozesse. Es wurde von unterschiedlichen Forschungsgruppen nachgewiesen, dass das  $\alpha_5\beta_3$ -Integrin sich in den frühen Fokalkomplexen befindet. Eine Reifung dieser Fokalkomplexe führt zur Rekrutierung unterschiedlicher Fokaladhäsionsproteine und des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins, welches mit dem  $\alpha_5\beta_3$ -Integrin kolokalisiert.<sup>84,134,138</sup>

Unter Verwendung von  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_5\beta_3$ -integrinselektiven Mimetika wurden in Rahmen dieser Arbeit Substrate hergestellt, die in U2OS-Zellen jeweils nur das eine Integrin rekrutieren. Mithilfe dieser Substrate konnte unterschiedliches Verhalten der Zellen beobachtet werden. Der

## Ergebnisse und Diskussion

Spreitvorgang war beschleunigt für Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat im Vergleich zum  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat. Die maximale Zellfläche nach Beendigung des Spreitvorgangs lag für Zellen die über das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  mit der Oberfläche wechselwirken um 30 % höher. Somit ist das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin mehr in den Spreitprozess der Zellen involviert als das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Allerdings zeigte die Untersuchung der Vinculinclusterfläche einen höheren Wert bei Zellen die über das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit der Oberfläche wechselwirken, und damit einen stärkeren Kontakt zu ihr aufbauen. Da der Kontakt der Zellen auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum zu dem Substrat größer ist, fällt es ihnen schwerer sich über dieses zu bewegen. Die geringere Zellmotilität auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum im Vergleich zum  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum machte sich zusätzlich in der Ausbildung von Lamellopodien bemerkbar.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Vorherige Studien zeigen, dass die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  an vielen biologischen Prozessen wie Migration, Proliferation oder Apoptose beteiligt sind. Sie werden sogar mit mehreren pathologischen Vorgängen wie der Angiogeneese, der Arteriogeneese<sup>139</sup> oder der Thrombose<sup>140</sup> in engen Zusammenhang gebracht. Aufgrund der fehlenden effektiven Methoden konnten bislang jedoch nur unpräzise die genauen Funktionen der einzelnen Integrine bestimmt werden.

Gegenstand dieser Arbeit war ein System, welches die Funktionsaufklärung der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  bei der Ausbildung der Adhäsionskontakte und dem Zellspreiten ermöglichte. Dazu wurden hochselektive und aktive Liganden<sup>19,140,141</sup> für die genannten Integrine auf Goldnanopartikeln immobilisiert und als biomimetische Substrate für Zellexperimente verwendet. Dieses Vorgehen erlaubte erstmalig eine Untersuchung unterschiedlicher Zelleigenschaften die durch die einzelnen Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  dirigiert werden. Zusätzlich bietet der vorgestellte Substrataufbau die Möglichkeit zur Regulierung der Ligandendichte auf der Substratoberfläche, was zur Untersuchung des Zellverhalten ausgenutzt wurde.

Anfängliche Kinetikuntersuchungen der U2OS Zellen auf selektiven Mimetika zeigten ein unterschiedliches Verhalten je nachdem welches Mimetikum zur Funktionalisierung des Substrates verwendet wurde (Abb. 37, 38). Das immobilisierte  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum führte zu einem schnelleren und aktiveren Zellspreiten, während das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ein langsames und zögerndes Spreiten herbeiführte. Nach gleicher Beobachtungszeit erreichten Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat eine größere projizierte Zellfläche als auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat (Abb. 37, 40). Das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin ist zufolge dieser Ergebnisse größten Teils für das Spreiten und womöglich auch für die Motilität zuständig, denn es wurde auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -funktionalisierten Substrat eine größere Beweglichkeit der Zellen beobachtet (Abb. 42). Bei Verwendung unterschiedlicher Goldnanopartikelabstände auf den Substraten und damit verbundener unterschiedlicher Ligandendichte konnte die Geschwindigkeit des Zellspreitens für beide Mimetika beschleunigt oder verzögert werden (Abb. 39). Eine Verringerung des Nanopartikelabstands z. B. von 60 nm auf 30 nm führt zu einer Beschleunigung des Zellspreitens für beide Liganden, jedoch war dieser Effekt stärker auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum. Bei Vergrößerung des Abstandes nahm der Unterschied in der Zellspreitgeschwindigkeit zwischen den beiden Mimetika ab. Bei einem Abstand von 90 nm verschwand er fast vollständig und es lag nur ein geringfügiger Unterschied

## Zusammenfassung und Ausblick

für beide Mimetika vor. Die erhöhte maximale Zellfläche bleibt bei Verringerung des Goldnanopartikelabstandes bestehen, jedoch verringert sich dieser Unterschied je größer der Abstand zwischen den Goldnanopartikeln wird.

Eine Integrin-vermittelte Adhäsion führt zum Agglomerieren von Integrinen und anschließend zur Rekrutierung intrazellulärer Proteine. In vorliegender Arbeit wurde der Einfluss der beiden Integrine auf die Clustergröße des Adhäsionsproteins Vinculin untersucht. Dazu wurden Substrate mit unterschiedlichen Goldnanopartikelabständen hergestellt. Eine Analyse der Clusterfläche ergab erhöhte Werte auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum für alle Abstände (Abb. 43). Jedoch war der Unterschied für den größten Goldnanopartikelabstand von 90 nm nicht mehr signifikant. D.h. auch im Falle der Fokaladhäsionsausbildung spielt die Ligandendichte eine entscheidende Rolle und übt Einfluss auf die Zelladhäsion aus.

Auch das Adhäsionsprotein Phosphopaxillin wurde hier zur Analyse herangezogen, um festzustellen welchen Einfluss die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  auf dieses ausüben. Ebenfalls wurden hier drei unterschiedliche Goldnanopartikelabstände von 30, 60 und 90 nm für die Experimente und Analyse der Phosphopaxillin-Cluster eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass sich beim Übergang von 30 auf 90 nm und beim Übergang von 60 auf 90 nm die Clusterfläche des Phosphopaxillins auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum signifikant verringert. Auch für das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum verringert sich die Fläche der Cluster beim Übergang von 30 auf 60 nm und von 30 auf 90 nm signifikant. Es wurde zusätzlich die Clustergröße für jeden einzelnen Abstand für beide Mimetika verglichen. Auf 30 nm wurden erhöhte Werte für das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum und für das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum auf den Abständen 60 und 90 nm beobachtet (Abb. 45). Es waren zwar beschriebene Differenzen aus dem Boxplot-Diagramm auszulesen, jedoch wurde durch Anwenden eines Mann-Whitney-Testes keine Signifikanz festgestellt. Somit wird die Ausbildung des Phosphopaxillins nicht besonders stark von jedem Integrin im Einzelnen beeinflusst. Dagegen spielt die Ligandendichte auf dem Substrat eine größere Rolle für das Formen großer und damit stabiler Phosphopaxillin-Cluster.

Des Weiteren zeigte das Aktinnetzwerk eine unterschiedliche Struktur für beide Substrate. Für das  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat bildeten Zellen ein dichtes radiales Netzwerk bestehend aus dünnen Fasern. Im Gegensatz dazu wurde auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ein weniger dichtes Netzwerk mit dickeren Aktinfasern ausgebildet. Das Fokaladhäsionsprotein Zyxin, welches eng mit Aktin verbunden ist, wurde verstärkt in Zellen festgestellt die auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum ausgesetzt wurden (Abb. 46).

Adhäsionskontrollexperimente auf Fibronectin und Vitronectin mit anschließendem immunozytochemischen Anfärben der beiden Integrine bewiesen, dass U2OS-Zellen im Stande

## Zusammenfassung und Ausblick

sind diese zu exprimieren. Die Zellen bildeten dabei unterschiedliche Adhäsionsmuster für die beiden EZM-Proteine aus. Auf Fibronectin fand man eine große Anzahl an  $\alpha_5$ -Clustern verteilt über die ganze Zelle und nur ein Paar  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster. Auf Vitronectin dagegen wurden große  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster in der Peripherie der Zelle ausgebildet und nur wenige schwache  $\alpha_5$ -Cluster im Zellzentrum (Abb. 48). Zelladhäsion auf Fibronectin wird größtenteils über das  $\alpha_5\beta_1$ - und auf Vitronectin über das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt. Die gefundenen Adhäsionsmuster auf diesen beiden EZM-Proteinen zeigten eine gewisse Ähnlichkeit zu den Adhäsionsmustern auf den selektiven Mimetika. So sind fibrilläre  $\alpha_5$ -Adhäsionsstrukturen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat ebenfalls zum Zellzentrum hin verschoben und  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat in der Zellperipherie aufzufinden.

Die Untersuchung der Integrine mittels Immunofluoreszenz auf selektiv funktionalisierten Substraten zeigte, dass das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum und beide Integrine auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum vorkommen. Dieses Ergebnis galt für Goldnanopartikelabstände von 30 und 60 nm. Die Oberflächen mit 90 nm Abstand wurde für die Untersuchung der Integrine nicht mehr eingesetzt, da vorige Ergebnisse zur Fokaladhäsionsproteinen und Zellspreitexperimenten bewiesen, dass bei diesem Abstand kaum noch ein Unterschied zwischen den beiden Mimetika besteht.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrincluster waren dominanter auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum. Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum wird höchstwahrscheinlich durch das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin innerhalb der Signaltransduktion von innen nach außen rekrutiert (inside-out-signaling) (Abb. 49).

Eine Blockierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins führte nämlich im Falle des Aussetzens der Zellen auf das  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum zu einer kompletten Verhinderung der Adhäsion. Wurden dagegen Zellen mit dem blockierten  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin auf das  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ausgesetzt, so hat dies keine Auswirkung auf die Zelladhäsion gezeigt. Umgekehrt bei Inhibierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins kam es zu einer Adhäsion auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum während sie auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum ausblieb. Immunozytochemisches Färben der Integrine während der Blockierung gewährte einen Blick auf das Muster der Integrincluster auf dem jeweiligen Substrat. Auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Substrat wurden bei Blockierung des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins nur  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster entdeckt. Dagegen zeigten Zellen auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat bei Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins lediglich das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in fibrillärer Struktur (Abb. 53).

Bei der Immobilisierung beider Mimetika im Verhältnis 1:1 auf einem Substrat zeigten die Zellen in den Adhäsionsassays ein ähnliches Verhalten wie auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat. Und zwar befindet sich hier, ähnlich zum  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat, eine größere Anzahl an vollständig gespreiteten Zellen mit einer deutlich kleineren Zellanzahl im Anfangsstadium des Spreitprozesses.

## Zusammenfassung und Ausblick

Interessanterweise wurde bei doppelter Funktionalisierung des Substrates hauptsächlich das  $\alpha_5$ -Integrin beim Anfärben detektiert (Abb. 54).

Die Forschung auf dem Gebiet der Integrine und fokaler Adhäsionen schreitet mit einem hohen Tempo voran und bietet ständig neue Möglichkeiten zur Aufklärung ihrer Struktur und Funktion. Hier konnten die unterschiedlichen Aufgaben der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  mittels der BCMN und selektiver Mimetika aufgezeigt werden.

Da durch integrinvermittelte Adhäsion die Struktur und Größe vieler Adhäsionsproteincluster beeinträchtigt wird, wurden in vorliegender Arbeit die Adhäsionsproteine Vinculin und Phosphopaxillin untersucht. Es existiert jedoch eine Reihe weiterer Adhäsionsproteine die höchstwahrscheinlich auch vom  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin beeinflusst werden. Z.B. könnte eine Analyse des Adhäsionsproteins Talin, Kindlin oder Tensin durchgeführt werden. Talin wird mit der Aktivierung des integrinvermittelten Signaltransfer von innen nach außen in Zusammenhang gebracht <sup>142</sup>. In letzter Zeit wurde eine große Anzahl an Arbeiten publiziert die belegen, dass Kindlin eine wichtige Rolle für die Funktion der Integrine spielt. <sup>143-145</sup> Die Anwesenheit des Proteins Tensin in fokalen Kontakten ist ein Anzeichen für fibrilläre Adhäsion, die durch das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelt wird.

<sup>134,146</sup>

Ebenfalls wäre eine Größen- und Formanalyse der Adhäsionsplaques nach der Blockierung der jeweiligen Integrine sinnvoll. Denn es hat sich in vorliegender Arbeit herausgestellt, dass die Blockierung eines Integrins die Adhäsion auf dem entsprechenden Mimetikum verhindert, auf dem anderen Mimetikum kann die Adhäsion allerdings ungehindert ablaufen. Im Falle der  $\alpha_v\beta_3$ -Blockierung fand zwar die Adhäsion auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Substrat statt, jedoch wurde eine richtige Ausbildung der  $\alpha_5$ -Cluster verhindert. Vermutlich wird durch Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins auch die Bildung fokaler Kontakte beeinflusst.

Die Rekrutierung der Integrine auf doppelt funktionalisierten Substraten (Abb. 55) zeigte ein anderes Muster als auf den einfach funktionalisierten Substraten. Um dieses Verhalten der Zellen zu verstehen, wären Kinetikuntersuchungen und zusätzliche Analysen der projizierten Zellfläche notwendig. Auch Adhäsionsassays mit anschließenden immunozytochemischen Integrinfärbungen nach der Blockierung der einzelnen Integrine könnten hier Kenntnis über die Rekrutierung der Integrine bei Angebot beider Liganden bieten. Zur doppelten Funktionalisierung der Substrate wäre ein alternierendes System bestehend aus zwei unterschiedlichen Nanopartikelarten sowie die beiden Mimetika verknüpft mit

## Zusammenfassung und Ausblick

unterschiedlichen funktionellen Gruppen zur Anbindung an das jeweilige Nanopartikel des Substrates hilfreich.

Des Weiteren kann das hier vorgestellte System zur Untersuchung des  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin abhängigen Migrationsverhaltens dienen. In der Literatur wurde bereits von einem unterschiedlichen Migrationsstil berichtet, je nachdem welches Integrin involviert ist. Jedoch fehlten bisher hochselektive Reagenzien die individuelle Rezeptoren ansprechen können<sup>147</sup>. Danen et al<sup>148</sup>. beschreibt z. B., dass ein und dieselben Zellen bei Beteiligung des  $\beta_1$ -Integrins eine chaotische und bei Beteiligung des  $\beta_3$ -Integrins eine persistente Migration aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das Agglomerierverhalten der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  die Zelladhäsion, das Zellspreiten und die Ausbildung fokaler Adhäsionen reguliert. Als Werkzeug dazu diente ein nanostrukturiertes Substrat, welches es erlaubte das Agglomerieren der beiden Integrine durch unterschiedliche Goldnanopartikelabstände zu kontrollieren. Möglicherweise kann in Zukunft diese Methode, kombiniert mit hochauflösenden mikroskopischen Verfahren, die Dynamik der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  in den Fokaladhäsionsstrukturen aufklären.

## I. Literaturverzeichnis

1. Darribere T, Skalski M, Cousin H, Gaultier A, Montmory C, Alfandari D. Integrins: Regulators of embryogenesis. *Biology of the Cell*. 2000;92:5-25.
2. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From Cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):174-180. doi:10.1002/jcp.10471.
3. Gumbiner BM. Cell Adhesion: Review The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*. 1996;84:345-357.
4. Khalili A, Ahmad M. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *IJMS*. 2015;16(8):18149-18184. doi:10.3390/ijms160818149.
5. Rape AD, Zibinsky M, Murthy N, Kumar S. A synthetic hydrogel for the high-throughput study of cell-ECM interactions. *Nature Communications*. 2015;6:1-9. doi:10.1038/ncomms9129.
6. Wu C. A Focal Point in Current Cell Biology and Molecular Medicine. *Cell Adhesion and Migration*. 2007;1(1):13-18.
7. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(29):21785-21788. doi:10.1074/jbc.R000003200.
8. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):21-33. doi:10.1038/nrm2593.
9. Glass R, Möller M, Spatz J. Block copolymer micelle nanolithography. *Nanotechnology*. 2003;14:1153-1160.
10. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, et al. Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces. *ChemPhysChem*. 2004;5(3):383-388. doi:10.1002/cphc.200301014.
11. Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunological Reviews*. 2002;186:141-163.
12. Pierschhaber MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984;309:30-33.
13. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):604-617. doi:10.1038/nrc2353.
14. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Review Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110:673-687.
15. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature*

## Literaturverzeichnis

*Medicine*. 2002;8(9):918-921.

16. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin  $\alpha 5\beta 1$  with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(4):1345-1362. doi:10.1016/S0002-9440(10)65005-5.
17. Sipkins DA, Cheesh DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KCP. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphavbeta3-trageted magnetic resonance imaging. *Nature Medicine*. 1998;4(5):1-4.
18. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, et al. Integrin alphavbeta3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell Press*. 1994;70:1157-1164.
19. Rechenmacher F, Neubauer S, Polleux J, et al. Functionalizing  $\alpha v\beta 3$ - or  $\alpha 5\beta 1$ - Selective Integrin Antagonists for Surface Coating: A Method To Discriminate Integrin Subtypes In Vitro. *Angew Chem Int Ed*. 2012;52(5):1572-1575. doi:10.1002/anie.201206370.
20. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;66A:247-259.
21. Huang J, Gräter SV, Corbellini F, et al. Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Lett*. 2009;9(3):1111-1116. doi:10.1021/nl803548b.
22. Kilian KA, Mrksich M. Directing Stem Cell Fate by Controlling the Affinity and Density of Ligand-Receptor Interactions at the Biomaterials Interface. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51(20):4891-4895. doi:10.1002/anie.201108746.
23. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385-4415. doi:10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
24. Guler MO, Hsu L, Soukasene S, Harrington DA, Hulvat JF, Stupp SI. Presentation of RGDS Epitopes on Self-Assembled Nanofibers of Branched Peptide Amphiphiles. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):1855-1863. doi:10.1021/bm060161g.
25. Massia SP, Hubbell JA, Jeffrey. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin  $\alpha v\beta 3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation . *J Cell Biol*. 1991;114:1089-1100.
26. Barth JV, Costantini G, Kern K. Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces. *Nature*. 2005;437(7059):671-679. doi:10.1038/nature04166.
27. Yat Li FQJX, Ya. Nanowire electronic and optoelectronic devices. *Materials Today*. September 2006:1-10.

## Literaturverzeichnis

28. Gazit E. *Plenty of Room for Biology at the Bottom: an Introduction to Bionanotechnology*. Imperial College Press, 2007,; 2011:1-3.
29. Aliuos P, Reich U, Lenarz T, Reuter G. Effects of micro and nano structured surfaces on the cell adhesion using single cell force spectroscopy. *JPK Instruments Application Note*.:1-8.
30. Salou L, Hoornaert A, Louarn G, Layrolle P. Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: An experimental study in rabbits. *Acta Biomaterialia*. 2015;11(C):494-502. doi:10.1016/j.actbio.2014.10.017.
31. Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, et al. Nanostructured Surfaces of Dental Implants. *IJMS*. 2013;14(1):1918-1931. doi:10.3390/ijms14011918.
32. Zhao F, Wang J, Guo H, Liu S, He W. The Effects of Surface Properties of Nanostructured Bone Repair Materials on Their Performances. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015(22):1-11. doi:10.1155/2015/893545.
33. Biswas A, Bayer IS, Biris AS, Wang T, Dervishi E, Faupel F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012;170(1-2):2-27. doi:10.1016/j.cis.2011.11.001.
34. Xiang Zhang CS, Fang N. Manufacturing at nanoscale: Top-down, bottom-up and system engineering. *Journal of Nanoparticle Research*. 2004;(125-130):1-6.
35. Birol H, Renato Rambo C, Guiotoku M, Hotza D. Preparation of ceramic nanoparticles via cellulose-assisted glycine nitrate process: a review. *RSC Adv*. 2013;3(9):2873-2884. doi:10.1039/C2RA21810K.
36. Whitesides GM, Boncheva M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. *Proc Natl Acad Sci USA*. April 2002:1-6.
37. Whitesides GM, Grzybowski B. Self-Assembly at All Scales. *Science*. March 2002:2418-2421.
38. Gutzler R, Cardenas L, Rosei F. Kinetics and thermodynamics in surface-confined molecular self-assembly. *Chem Sci*. 2011;2(12):2290-11. doi:10.1039/c1sc00531f.
39. Plantenberg SFUT. Von selbstorganisierenden Polymeren zu Nanohybrid- und Biomaterialien. *Angew Chem*. 2002;114:712-739.
40. Bates FS. BLOCK COPOLYMER THERMODYNAMICS: Theory and Experiment. *Annual Revues Physical Chemistry*. 2002;41:525-527.
41. Bates RS. Polymer-Polymer Phase Behavior. *Science*. 2005;251:898-905.
42. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65(3):259-269. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009.

## Literaturverzeichnis

43. Riess G. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*. 2003;28(7):1107-1170. doi:10.1016/S0079-6700(03)00015-7.
44. Förster S, Plantenberg T. Funktionale Strukturhierarchien aus selbstorganisierenden Polymeren. *Angew Chem*. 2002;114:713-739.
45. Kästle G, Boyen HG, Weigl F, et al. Micellar Nanoreactors—Preparation and Characterization of Hexagonally Ordered Arrays of Metallic Nanodots. *Adv Funct Mater*. 2003;13(11):853-861. doi:10.1002/adfm.200304332.
46. Spatz JP, Mössmer S, Hartmann C, et al. Ordered Deposition of Inorganic Clusters from Micellar Block Copolymer Films. *Langmuir*. 2000;16(2):407-415. doi:10.1021/la990070n.
47. Spatz JP, Sheiko S, Möller M. Ion-Stabilized Block Copolymer Micelles: Film Formation and Intermicellar Interaction. *Macromolecules*. 1997;29:3220-3226.
48. Norrman K, Ghanbari-Siahkali A, Larsen NB. 6 Studies of spin-coated polymer films. *Annu Rep Prog Chem, Sect C*. 2005;101:174–28. doi:10.1039/b408857n.
49. Rehage H. Selbstorganisation von Tensiden: Biomimetische Synthesen von Nanomaterialien. *Chemie in unserer Zeit*. 2005;39(1):36-44. doi:10.1002/ciuz.200400330.
50. Dimitrov AS, Nagayama K. Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces . *Langmuir*. 1997;12:1303-1311.
51. CAVALCANTIADAM E, MICOULET A, BLUMMEL J, AUERNHEIMER J, Kessler H, SPATZ J. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *European Journal of Cell Biology*. 2006;85(3-4):219-224. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.011.
52. Krishnamoorthy S, Pugin R, Brugger J, Heinzelmann H, Hinderling C. Tuning the Dimensions and Periodicities of Nanostructures Starting from the Same Polystyrene-block-poly(2-vinylpyridine) Diblock Copolymer. *Adv Funct Mater*. 2006;16(11):1469-1475. doi:10.1002/adfm.200500524.
53. Marco Arnold. Molecularly defined nanostructured interfaces as tools for the regulation and measurement of functional length scales cell adhesion mediating protein clusters. *Inaugural Dissertation*. October 2005:1-162.
54. Darhuber AA, Troian SM, Davis JM, Miller SM, Wagner S. Selective dip-coating of chemically micropatterned surfaces. *J Appl Phys*. 2000;88(9):5119-5119. doi:10.1063/1.1317238.
55. Gasser U, Maret G, Keim P. Das Schmelzen zweidimensionaler Kristalle. Phasenübergänge durch topologische Defekte. *Phys Unserer Zeit*. 2008;39(1):36-43. doi:10.1002/piuz.200601138.
56. Maret G. Zweidimensionale Festkörper. *Physik Journal*. 2011;10:35-38.
57. Murray CA, Grier DG. VIDEO MICROSCOPY OF MONODISPERSE COLLOIDAL SYSTEMS. *Annual Revues Physical Chemistry*. 1998;47:421-

## Literaturverzeichnis

- 462.
58. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*. February 1997:1533-1554.
59. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*. 2000;65:151-256.
60. Dannenberger O, Buck M, Grunze M. Self-Assembly of n-Alkanethiols: A Kinetic Study by Second Harmonic Generation. *J Phys Chem B*. 1999;103(12):2202-2213. doi:10.1021/jp983433l.
61. Balko SM, Kreer T, Mulder DJ, Costanzo PJ, Patten TE, Kuhl TL. Using Thiol–Gold Bond Formation To Bridge Surfaces with a Polymer Brush: SFA Experiments and MD Simulations. *Macromolecules*. 2013;46(24):9826-9836. doi:10.1021/ma4015356.
62. Vericat C, Vela ME, Benitez G, Carro P, Salvarezza RC. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev*. 2010;39(5):1805-1830. doi:10.1039/b907301a.
63. Rong H-T, Frey S, Yang Y-J, et al. On the Importance of the Headgroup Substrate Bond in Thiol Monolayers: A Study of Biphenyl-Based Thiols on Gold and Silver. *Langmuir*. 2001;17(5):1582-1593. doi:10.1021/la0014050.
64. Haensch C, Hoepfner S, Schubert US. Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions. *Chem Soc Rev*. 2010;39(6):2323–12. doi:10.1039/b920491a.
65. Zhuravlev LT. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces*. 2000;173:1-38.
66. Arkles B. Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes. *Gelest Inc Morrisville, PA*. February 2007:1-10.
67. Obermeier B, Wurm F, Mangold C, Frey H. Multifunctional Poly(ethylene glycol)s. *Angew Chem Int Ed*. 2011;50(35):7988-7997. doi:10.1002/anie.201100027.
68. Dingels C, Schömer M, Frey H. Die vielen Gesichter des Poly(ethylenglykol)s. *Chemie in unserer Zeit*. 2011;45(5):338-349. doi:10.1002/ciuz.201100551.
69. Zalipsky S, Harris JM. Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). In: *Poly(Ethylene Glycol)*. Vol 680. Chemistry and Biological Applications. Washington, DC: American Chemical Society; 2009:1-13. doi:10.1021/bk-1997-0680.ch001.
70. Lee JH, Lee HB, Andrade JD. Blood Compatibility Of Polyethylene Oxide Surfaces.
71. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes PG. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1991;142(1):149-158. doi:10.1016/0021-9797(91)90043-8.

## Literaturverzeichnis

72. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. *Lehrbuch Der Molekularen Zellbiologie*. 4 ed.; 2012.
73. Hynes RO. Cell adhesion:old and new questions. *Trends in Cell Biology*. 1999;(Millenium Issue):M33-M37.
74. Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB*. 1999;13:S91-S100.
75. Blobel CP, White JM. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;4:760-765.
76. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *European Journal of Cell Biology*. 2015;75:464-474.
77. Tamkun JW, Simone DW, Fonda D, et al. Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane Linkage between Fibronectin and Actin. *Cell*. 2003;46:271-282.
78. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2009;339(1):269-280. doi:10.1007/s00441-009-0834-6.
79. Xiong J-P, Stehle T, Diefenbach B, et al. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3. *Science*. 2015;294:339-345.
80. Xie C, Zhu J, Chen X, Mi L, Nishida N, Springer TA. Structure of an integrin with an  $\alpha$ I domain, complement receptor type 4. *The EMBO Journal*. 2009;29(3):666-679. doi:10.1038/emboj.2009.367.
81. Zhu J, Luo B-H, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces. *Molecular Cell*. 2008;32(6):849-861. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.018.
82. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(3):1-14. doi:10.1101/cshperspect.a004994.
83. Grande-Garcia A, Echarrri A, Del Pozo MA. Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33:609-613.
84. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 2001;114:3538-3590.
85. Volberg T, Geiger B, Kam Z, et al. Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci*. 1995;108:2253-2260.
86. SAUNDERS R, HOLT M, JENNINGS L, et al. Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *European Journal of Cell Biology*. 2006;85(6):487-500. doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.014.

## Literaturverzeichnis

87. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol.* 2007;179(5):1043-1057. doi:10.1083/jcb.200703036.
88. Carisey A, Ballestrem C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *European Journal of Cell Biology.* 2010;90(2-3):157-163. doi:10.1016/j.ejcb.2010.06.007.
89. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology.* 2007;9(8):858-867. doi:10.1038/ncb0807-858.
90. Balaban NQ, Schwarz US, Rivelino D, et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using gelatin micropatterned substrates. *Nature Cell Biology.* 2001;3:466-471.
91. Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology.* 2000;2:E231-E236.
92. Turner CE. Paxillin interactions. *Cell Science at a Glance.* November 2000:4139-4140.
93. Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene.* 2001;20:6459-6472.
94. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *J Cell Sci.* 2008;121(15):2435-2444. doi:10.1242/jcs.018044.
95. Wiseman PW, Brown CM, Webb DJ, et al. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by Image Correlation Microscopy. *J Cell Sci.* 2004;117(23):5521-5534. doi:10.1242/jcs.01416.
96. Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of Vascular Surgery.* 1989;9(4):0535-0541. doi:10.1067/mva.1989.vs0090535.
97. Marano RPC, Vilaro S. The Role of Fibronectin, Laminin, Vitronectin and Their Receptors on Cellular Adhesion in Proliferative Vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology Visual Science.* 1994;35(6):2791-2803.
98. Lhoest JB, Detrait E, van den Bosch de Aguilar P, Bertrand P. Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studied by radiolabeling, XPS, and ToF SIMS. May 1998:1-9.
99. Hlady V, Buijs J. Protein adsorption on solid surfaces. *Analytical Biotechnology.* 1996;7:72-77.
100. Elbert DL, Hubbell JA. SURFACE TREATMENTS OF POLYMERS FOR BIOCOMPATIBILITY. *Annual Reviews Material Science.* 1996;26:365-394.
101. Horbett TA, Lew KR. Residence time effects on monoclonal antibody binding to adsorbed fibrinogen. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.*

## Literaturverzeichnis

- 1995;6(1):15-33. doi:10.1163/156856295X00724.
102. Pierschhaber MD, Ruoslahti E. Influence of Stereochemistry of the Sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on Binding Specificity in Cell Adhesion\*. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(36):17294-17298.
103. Aumailley M, Gurrath M, Müller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. *FEBS Letters*. 1991;291:50-54.
104. Gurrath M, Müller G, Kessler H, Aumailley M, Timpl R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *European Journal of Biochemistry*. July 2004;911-921.
105. Haubner R, Gratias R, Diefenbach B, Goodman SL, Jonczyk A, Kessler H. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin R. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118:7461-7473.
106. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2010;10:753-768.
107. Heckmann D, Meyer A, Laufer B, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Rational Design of Highly Active and Selective Ligands for the  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Receptor. *ChemBioChem*. 2008;9(9):1397-1407. doi:10.1002/cbic.200800045.
108. Rechenmacher F, Neubauer S, Polleux J, et al. Functionalizing  $\alpha v\beta 3$ - or  $\alpha 5\beta 1$ -Selective Integrin Antagonists for Surface Coating: A Method To Discriminate Integrin Subtypes In Vitro. *Angew Chem Int Ed*. 2012;52(5):1572-1575. doi:10.1002/anie.201206370.
109. Christophe C, Peignon M-C, Tessier P-Y. Plasma etching: principles, mechanisms, application to micro- and nano-technologies. *Applied Surface Science*. 2000;164:72-83.
110. Egerton RF. *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer Verlag; 2005:1-211.
111. Ludwig T. Rasterelektronenmikroskop. March 2016:1-4.
112. Murphy DB. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001:1-385.
113. McGrath JL. Cell Spreading: The Power to Simplify. *Current Biology*. 2007;17(10):R357-R358. doi:10.1016/j.cub.2007.03.057.
114. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(5):1-21. doi:10.1101/cshperspect.a005033.
115. Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophys J*. 2007;92(8):2964-2974.

## Literaturverzeichnis

doi:10.1529/biophysj.106.089730.

116. Liu Y, Medda R, Liu Z, et al. Nanoparticle tension probes patterned at the nanoscale: Impact of integrin clustering on force transmission. *Nano Lett.* 2014;14(10):5539-5546. doi:10.1021/nl501912g.
117. Mondal G, Barui S, Chaudhuri A. The relationship between the cyclic-RGDfK ligand and  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin receptor. *Biomaterials.* 2013;34(26):6249-6260. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.065.
118. Zaidel-Bar R, Milo R, Kam Z, Geiger B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 2006;120(1):137-148. doi:10.1242/jcs.03314.
119. Rahmouni S, Lindner A, Rechenmacher F, et al. Hydrogel micropillars with integrin selective peptidomimetic functionalized nanopatterned tops: a new tool for the measurement of cell traction forces transmitted through  $\alpha$ v $\beta$ 3- or  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrins. *Adv Mater.* 2013;25(41):5869-5874. doi:10.1002/adma.201301338.
120. Porter JC, Hogg N. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends in Cell Biology.* 1998;8:390-396.
121. Blystone SD, Slater SE, Williams MP, Crow MT, Brown EJ. a molecular mechanism of integrin crosstalk:  $\alpha$ v $\beta$ 3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 function. *Journal of Cell Biology.* 1999;145:889-897.
122. Blystone SD, Graham IL, Lindberg FP, Brown EJ. Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *Journal of Cell Biology.* 1994;127:1129-1137.
123. Blystone SD, Lindberg FP, LaFlamme SE, Brown EJ. Integrin  $\beta$ 3 cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 phagocytosis by  $\alpha$ v $\beta$ 3 and integrin-associated protein. *Journal of Cell Biology.* 1995;130:745-754.
124. Diaz-Gonzales F, Forsyth J, Steiner B. Trans-dominant Inhibition of Integrin Function. *Molecular Biology of the Cell.* 1996;7:1939-1951.
125. Porter JC, Hogg N. Integrin Cross Talk: Activation of Lymphocyte Function-associated Antigen-1 on Human T Cells Alters. *Journal of Cell Biology.* 1997;138:1437-1447.
126. Simon KO, Nutt EM, Abraham DG, Rodan GA, Le T Duong. The  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-mediated cell migration toward fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(46):29380-29389.
127. Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. Cooperative signaling by  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *Journal of Cell Biology.* 1995;129(3):867-879.
128. Guasch J, Conings B, Neubauer S, et al. Segregation Versus Colocalization:

## Literaturverzeichnis

- Orthogonally Functionalized Binary Micropatterned Substrates Regulate the Molecular Distribution in Focal Adhesions. *Adv Mater.* 2015;27(25):3737-3747. doi:10.1002/adma.201500900.
129. Schiller HB, Hermann M-R, Polleux J, et al. beta1- and alpha5-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nature Cell Biology.* 2013;15(6):625-636. doi:10.1038/ncb2747.
130. Danen EHJ. The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alpha5beta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 2002;159(6):1071-1086. doi:10.1083/jcb.200205014.
131. Morgan MR, Byron A, Humphries MJ, Bass MD. Giving off mixed signals- distinct functions of alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life.* 2009;61(7):731-738. doi:10.1002/iub.200.
132. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia. *Cell.* 1995;81:53-82.
133. Roca-Cusachs P, Gauthier N, del Rio A, Sheetz MP. Clustering of alpha5beta1 integrins determines adhesion strength whereas alpha5beta3 and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(38):16245-16250.
134. Zamir E, Katz M, Posen Y, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology.* 2000;2:191-197.
135. Zamir E, Katz B-Z, Aota S-I, Yamada KM, Geiger B, Kam Z. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 1999;112:1655-1669.
136. Akiyama SK, Yamada SS, Chen W-T, Yamada KM. Analysis of Fibronectin Receptor Function with Monoclonal Antibodies: Roles in Cell Adhesion, Migration, Matrix Assembly, and Cytoskeletal Organization. *Journal of Cell Biology.* 1989;109:863-875.
137. Katz B-Z, Zamir E, Bershadsky AD, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. Physical State of the Extracellular Matrix Regulates the Structure and Molecular Composition of Cell-Matrix Adhesions. *Molecular Biology of the Cell.* 2000;11:1047-1060.
138. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 2003;116(22):4605-4613. doi:10.1242/jcs.00792.
139. Cai W-J, Li MB, Wu X, et al. Activation of the integrins alpha5beta1 and alpha5beta3 and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2008;322(1-2):161-169. doi:10.1007/s11010-008-9953-8.
140. Heckmann D, Meyer A, Marinelli L, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Rationales Design von hoch aktiven und selektiven Liganden für alpha5beta1- und alpha5beta3-Integrine. *Angew Chem.* 2007;119(19):3641-3644. doi:10.1002/ange.200700008.

## Literaturverzeichnis

141. Rechenmacher F, Neubauer S, Mas-Moruno C, et al. A Molecular Toolkit for the Functionalization of Titanium-Based Biomaterials That Selectively Control Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Chem Eur J*. 2013;19(28):9218-9223. doi:10.1002/chem.201301478.
142. Wang J-H. Pull and push: Talin activation for integrin signaling. *Nature Publishing Group*. 2012;22(11):1512-1514. doi:10.1038/cr.2012.103.
143. Karakose E, Schiller HB, Fassler R. The kindlins at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(14):2353-2356. doi:10.1242/jcs.064600.
144. Bialkowska K, Ma Y-Q, Bledzka K, et al. The Integrin Co-activator Kindlin-3 Is Expressed and Functional in a Non-hematopoietic Cell, the Endothelial Cell. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(24):18640-18649.
145. Böttcher RT, Lange A, Fässler R. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(5):670-675. doi:10.1016/j.ceb.2009.05.008.
146. Pankov R, Cukierman E, Katz B-Z, et al. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha5beta1 integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*. 2000;148:1075-1090.
147. White DP, Caswell PT, Norman JC. alphavbeta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol*. 2007;177(3):515-525. doi:10.1083/jcb.200609004.
148. Danen EHJ, van Rheenen J, Franken W, et al. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol*. 2005;169(3):515-526. doi:10.1083/jcb.200412081.

## **II. Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Verwendete Diblockcopolymere</i>	_____	<i>53</i>
<i>Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper</i>	_____	<i>58</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper</i>	_____	<i>58</i>

### III. Abkürzungsverzeichnis

Asp.....	Asparaginsäure
BCMN .....	mizellare Blockcopolymer Nanolithographie
BSA.....	Rinderserumalbumin
CMC.....	kritische Mizellenkonzentratio
c-RGDFV.....	cyclo-(Arginin-Glycin-Asparaginsäure-D-Phenylalanin-Valin)
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
D-Phe .....	D-Phenylalanin
EGF .....	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM .....	Extrazelluläre Matrix
FAK.....	Fokale Adhäsionskinase
FBS.....	fetales Kälberserum
FRAP.....	Fluorescence Recovery after Photobleaching
GAGs .....	Glycosaminoglykane
GTP-asen .....	Guanosintriphosphasen
ICM .....	Image Correlative Microscopy
IgG.....	Immunglobulin G
mA .....	Milliampere
MAP-Kinase.....	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mbar.....	Millibar
MIDAS .....	Metallionabhängige Adhäsionsstelle
mM .....	millimolar
nm .....	Nanometer
NP .....	Nanopartikel
p.a.....	pro analysi
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung
PE.....	Primärelektronen
PEG .....	Polyethylenglycol
PLL-g-PEG.....	Poly-L-Lysin-grafted-Polyethylenglycol

## Abkürzungsverzeichnis

REM.....	<i>Rasterelektronenmikroskop</i>
rpm.....	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
RT .....	<i>Raumtemperatur, Raumtemperatur</i>
SAM.....	<i>Selbstorganisierende Monolagen</i>
SE.....	<i>Sekundärelektronen</i>
TRITC.....	<i>Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat</i>
UV.....	<i>Ultraviolett</i>
W.....	<i>Watt</i>
XPS.....	<i>Röntgenphotoelektronenspektroskopie</i>
μl.....	<i>Mikroliter</i>

## **IV. Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Top-down und bottom-up-Ansatz*
- Abbildung 2: Phasendiagramm eines Diblockkopolymers*
- Abbildung 3: Das amphiphile Polystyrol-b-Poly-(2-vinylpyridin) (PS-b-P2VP)*
- Abbildung 4: Kritische Mizellenkonzentration (CMC)*
- Abbildung 5: Beladung der Mizellen mit Tetrachlorgoldsäure.*
- Abbildung 6: Auftretende Kräfte beim Tauchbeschichtungsverfahren*
- Abbildung 7: Meniskus eines vertikal eintauchenden Substrates*
- Abbildung 8: Dislokationspaar*
- Abbildung 9: Aufbau einer selbstorganisierten Monolage*
- Abbildung 10: Wechselwirkungspotential einer Adsorption*
- Abbildung 11 : Selbst assemblierte Monolagen eines Octanthiols auf einem Goldsubstrat.*
- Abbildung 12: Schema der Silanreaktion mit hydroxyterminierten Oberflächen.*
- Abbildung 13: Mechanismen der Proteinresistenz einer PEG-Schicht.*
- Abbildung 14: Struktur der Extrazellulärmatrix*
- Abbildung 15: Fibronektinstruktur*
- Abbildung 16: Schematische Darstellung der Integrinfamilie*
- Abbildung 17: Schematische Darstellung der abgeknickten und aufrechten Konformation des Integrin*
- Abbildung 18: Integrinvermittelte Adhäsion*
- Abbildung 19: Clustern der Integrine*
- Abbildung 20: Schematische Darstellung des Vinculinaufbaus und seiner aktiven und inaktiven Form.*
- Abbildung 21: Direkte Bindungspartner von Vinculin und ihre weitergehenden Funktionen.*
- Abbildung 22: Struktur und Signalwege von Paxillin*
- Abbildung 23: Die in natürlichen EZM-Molekülen vorkommende RGD-Sequenz*
- Abbildung 24: Zyklisierung des linearen RGD und Das Cyclopentapeptid c-RGDfv*
- Abbildung 25:  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin selektive Liganden*
- Abbildung 26: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskopes*
- Abbildung 27: Wechselwirkungsvolumen eines Elektronenstrahls und einer Substratoberfläche.*

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 28: Unterschiedliche Detektorarten eines REMs
- Abbildung 29: REM-Aufnahmen einer goldnanostrukturierten Oberfläche
- Abbildung 30: Destruktive und konstruktive Interferenz
- Abbildung 31: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Phasenkontrastmikroskopes
- Abbildung 32: Schematische Darstellung eines Antkörpers
- Abbildung 33: Jablonski Diagramm
- Abbildung 34: Stockes-Verschiebung
- Abbildung 35: Reaktionsschema der Anbindung des Triethoxysilans an das Glassubstrat
- Abbildung 36: Anbindung des PLL-PEGs an eine negativ geladene Substratoberfläche
- Abbildung 37: Spreiten der U2OS-Zellen auf drei unterschiedlichen Goldnanopartikelabständen von 36 nm, 60 nm und 90 nm.
- Abbildung 38: Progressionskurve der U2OS-Zellfläche
- Abbildung 39: Spreitgeschwindigkeit der U2OS-Zellen auf integrinselktiven Mimetika für 30 nm und 60 nm.
- Abbildung 40: Maximale Zellfläche für  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika.
- Abbildung 41: Immunocytochemisch angefärbtes Vinculin in U2OS-Zellen auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 36 nm, 60 nm und 90 nm.
- Abbildung 42: Unterschiedliches Spreitverhalten von U2OS-Zellen auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika.
- Abbildung 43: Boxplot-Darstellung der Vinculinclustergröße auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm.
- Abbildung 44: Immunocytochemisches Anfärben des Phosphopaxillins auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm.
- Abbildung 45: Boxplot-Darstellung der Phosphopaxillinclusterfläche auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika für NP-Abstände von 30 nm, 60 nm und 90 nm.
- Abbildung 46: Immunocytochemisches Anfärben des Zyxins und des Aktinnetzwerkes für  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika
- Abbildung 47: Screening der Integrinantikörper
- Abbildung 48:  $\alpha_5$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf homogen beschichteten Substraten mit Fibronectin und Vitronectin.
- Abbildung 49:  $\alpha_5$ - und  $\alpha_v$ -Integrine auf 30 und 60 nm Goldnanopartikelabstand auf  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetika.
- Abbildung 50: Mittlere Anzahl der  $\alpha_v\beta_3$ -Cluster auf dem  $\alpha_v\beta_3$ -Mimetikum und der  $\alpha_5$ -Cluster auf dem  $\alpha_5\beta_1$ -Mimetikum.

## Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 51: Blockierung der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$*

*Abbildung 52: Anzahl der Gesamtzellen, der runden und der gespreiteten Zellen auf beiden Mimetika nach Blockierung entweder des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins oder des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins.*

*Abbildung 53: Anfärbung der Integrine  $\alpha_5$  und  $\alpha_v\beta_3$  nach dem Blockieren auf Substraten funktionalisiert mit den selektiven Mimetika.*

*Abbildung 54: Zelladhäsion auf verschiedenartig funktionalisierten Substraten*

*Abbildung 55: Integrinfärbung auf einem doppelt-funktionalisierten Substrat mit  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_3$ - Mimetikum.*



## **V. Danksagung**

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Spatz für die Möglichkeit in seiner Gruppe promovieren zu können und dieses spannende Thema bearbeiten zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Reiner Dahint bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Allen beteiligten Prüfern danke ich für die Mühe, sich mit dem Thema zu beschäftigen.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Ada Cavalcanti-Adam, die mich während meiner Doktorarbeit ständig unterstützt und motiviert hat. Ohne ihre Mitwirkung wäre die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Sie hat mich sozusagen all die Jahre durch den finsternen Wald der Integrine und der fokalen Adhäsionen geführt.

Ich danke Dr. Vera Hirschfeld-Warnecken für die Einführung in das Thema, für das Einlernen in der Zellkultur, die BCMN-Technik und für die Einführungen an den Mikroskopen. Ebenfalls danke ich ihr für Diskussionen und Motivation.

Dr. Rebecca Medda danke ich für ihre Hilfe bei Problemen an den DVs und auch bei Problemen in der Zellkultur. Ganz egal welches Problem auftrat konnte man sich immer an sie wenden. Ich danke ihr auch für die Hilfe bei der Datenauswertung.

Bei Maria Halbig möchte ich mich nicht nur für die Hilfsbereitschaft bei administrativen und organisatorischen Fragen bedanken, sondern auch für die moralische und seelische Ermunterung während der ganzen Jahre.

Bei Dr. Elisabeth Baha-Schwab möchte ich mich insbesondere für die schöne gemeinsame Zeit als Bürokollegen und die hilfreichen Diskussionen bedanken.

Helmi Czichos-Medda gilt ein großes Dankeschön für die Übernahme der pPax-Vin-Act-Stainings während meiner Elternzeit. Bei Ihr bedanke ich mich ebenfalls für die wunderbare gemeinsame Bürozeit und für die vielen interessanten Geschichten.

Ich möchte mich auch bei der ganzen Ada-Gruppe für die erlebnisreiche Zeit, die gemeinsamen Ausflüge und die Ada-Meetings bedanken.

Für die Bereitstellung der Plasmide möchte ich an dieser Stelle Delia Bucher ganz herzlich danken.

## Danksagung

Franziska Schenk und Christiane Antoni danke ich für die gemeinsamen Mittagspausen, für das gemeinsame Laufen zum Unishop. Bei Franziska bedanke ich mich für die netten Teepausen mit vielen Gesprächen und Diskussionen.

Es gilt hier ein besonderes Dankeschön Dr. Elisabeth Baha-Schwab, Dr. Rebecca Medda, Christiane Antoni, Tina Wiegand, Dr. Seraphine Wegner, Dr. Ada Cavalcanti-Adam und Rolf Schäfer für das Korrekturlesen einzelner Teile dieser Arbeit.

Ich möchte auch der ganzen Spatz-Gruppe für die freundliche und nette Atmosphäre danken.

Dr. Anna Luise Grab und Yasaman Riahi danke ich für die netten Gespräche, gemeinsame Mittagspausen und ständige Motivation.

Abschließend möchte ich meiner ganzen Familie für das Verständnis, Geduld und Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Wladimir der mich immer wieder zum Schreiben motiviert hat und natürlich meiner Tochter Anastasia, die ständig für gute Laune sorgt.

Vielen Dank!



**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

---

---

---

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich wie folgt/bislang nicht<sup>1)</sup> an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: \_\_\_\_\_

---

Hochschule und Jahr: \_\_\_\_\_

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: \_\_\_\_\_

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

<sup>1)</sup> Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung.