

# Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Irina Slizskaia-Boxerman  
aus Minsk

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2011



*Biofunktionalisierung von Gold-Nanostrukturen  
mit Plasma-Fibronektin*

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz  
apl. Prof. Dr. Reiner Dahint



*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abstract.....	III
1 Motivation .....	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Fibronectin .....	5
2.1.1 Allgemein.....	5
2.1.2 Struktur .....	6
2.1.2.1 Aufbau .....	6
2.1.2.2 Alternatives Spleißen.....	7
2.1.2.3 Glykosylierung .....	8
2.1.3 Konformation .....	9
2.1.4 Fibrillenbildung und Matrixaufbau .....	11
2.1.4.1 Mechanismus .....	11
2.1.4.2 Elastizität der Fibrillen .....	12
2.1.5 Wechselwirkung mit Integrinen .....	13
2.1.6 Die Rolle des Fibronectins .....	15
2.1.6.1 Tumorerkrankung .....	15
2.1.6.2 Wundheilung.....	16
2.1.6.3 Embryogenese .....	17
2.2 Adsorption von Proteinen an Grenzflächen.....	18
2.2.1 Das Fibronectin an der Grenzfläche .....	20
2.2.1.1 Wechselwirkung von Aminosäuren mit Goldoberflächen .....	20
2.2.1.2 Adsorption von Fn auf Grenzflächen.....	20
2.3 Nanostrukturen .....	22
2.3.1 Nanostrukturierung der Oberflächen.....	22
2.3.2 Diblockcopolymer-Mizellen-Nanolithographie .....	24
2.3.2.1 Mizellenbildung.....	24
2.3.2.2 Nanostrukturierung der Substratoberfläche .....	27
2.4 Biofunktionalisierung der Nanostruktur.....	30
2.4.1 Methoden zur Anbindung von Fn an Gold-Nanostrukturen .....	31
3 Ergebnisse und Diskussion .....	35
3.1 QCM-D.....	35
3.1.1 Kombination von QCM-D und Reflektometrie .....	37
3.1.1.1 Adsorption des Fn Dimers auf homogenem Gold in PBS/Harnstoff .....	37

3.1.1.2	Adsorption des Fn Dimers auf homogenem Gold in PBS .....	38
3.1.1.3	Adsorption des Fn Monomers auf homogenem Gold in PBS/EDTA.....	39
3.1.2	QCM-D Experimente .....	41
3.1.2.1	Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS ..	41
3.1.2.2	Adsorptionsverhalten von Fn Monomeren auf unterschiedlichen homogenen Oberflächen in PBS .....	42
3.1.2.3	Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren und Monomeren auf homogenem Gold in PBS/EDTA.....	43
3.1.2.4	Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren bzw. Monomeren angebunden über das AFn auf homogenem Gold .....	45
3.1.2.5	Direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur .....	47
3.1.2.6	Direkte Anbindung des Fn Monomers auf die Nanostruktur .....	49
3.1.2.7	Indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via AFn .....	51
3.1.2.8	Indirekte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur via AFn...	53
3.1.2.9	Indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via Linker und AFn.....	55
3.1.3	Diskussion .....	59
3.1.3.1	Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchswerten.....	59
3.1.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
3.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	68
3.2.1	Ergebnisse .....	69
3.2.1.1	Auswirkung der Belichtungszeit auf die Fluorophore .....	70
3.2.1.2	Direkte Anbindung des Fn Dimers in PBS .....	70
3.2.1.3	Direkte Anbindung des Fn Dimers in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration .....	71
3.2.1.4	Indirekte Anbindung von Fn Dimeren .....	73
3.2.1.5	Direkte Anbindung des Fn Monomers in PBS.....	73
3.2.1.6	Direkte Anbindung des Fn Monomers in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration .....	74
3.2.1.7	Indirekte Anbindung von Fn Monomeren .....	75
3.2.2	Diskussion .....	76
3.2.2.1	Bestimmung der Markierungseffizienz .....	76
3.2.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Proteinlösung bei der direkten Anbindung.....	77
3.2.2.3	Abhängigkeit der direkten Anbindung von der Salzkonzentration des Puffers.....	78



3.2.2.4	Vergleich der direkten mit der indirekten Anbindung.....	79
3.2.2.5	Wichtigkeit der Qualität der Passivierungsschicht.....	80
3.2.2.6	Abstandsabhängigkeit der Gold-Nanopartikeln zueinander .....	81
3.3	Elektronenmikroskopie.....	83
3.3.1	Ergebnisse .....	85
3.3.1.1	Die Untersuchung des Fn Netzwerkes mittels Kryo-REM.....	85
3.3.1.2	Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden .....	89
3.3.1.3	TEM Untersuchung.....	90
3.3.2	Diskussion .....	93
3.3.2.1	REM-Experimente unter Kryo-Bedingungen .....	93
3.3.2.2	Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden .....	94
3.3.2.3	TEM Untersuchung.....	97
3.4	Rasterkraftmikroskopie .....	99
3.4.1	Ergebnisse .....	102
3.4.1.1	Untersuchung an Luft .....	102
3.4.1.2	Untersuchung in PBS .....	104
3.4.2	Diskussion .....	106
3.5	Kontaktwinkelmessungen .....	107
3.5.1	Ergebnisse .....	108
3.5.2	Diskussion .....	109
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	111
5	Materialien und Methoden.....	117
5.1	Materialien .....	117
5.2	Experimenteller Teil .....	118
5.2.1	Isolierung von pFn.....	118
5.2.1.1	Isolierung von Fn aus Blutserum.....	119
5.2.2	Fn Reduktion .....	120
5.2.3	Herstellung einer Goldlösung.....	121
5.2.4	Nanostrukturierung.....	122
5.2.5	Passivierung.....	122
5.2.6	Proteinanbindung .....	122
5.2.6.1	Direkte Anbindung.....	123
5.2.6.2	Indirekte Anbindung via AFn .....	123
5.2.6.3	Indirekte Anbindung via Linker und AFn .....	123
5.3	Methoden .....	125
5.3.1	QCM-D .....	125

5.3.1.1	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	128
5.3.1.2	Auswertung.....	130
5.3.2	Reflektometrie .....	133
5.3.2.1	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	134
5.3.2.2	Hydratation .....	135
5.3.2.3	Auswertung.....	135
5.3.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	139
5.3.3.1	Markierung von Fn Molekülen mit Fluorophoren.....	140
5.3.3.2	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	141
5.3.3.3	Auswertung.....	143
5.3.4	Elektronenmikroskopie .....	146
5.3.4.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	146
5.3.4.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	148
5.3.4.3	Allgemeine Versuchsdurchführung und Auswertung .....	150
5.3.5	Rasterkraftmikroskopie.....	152
5.3.5.1	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	153
5.3.5.2	Auswertung.....	154
5.3.6	Kontaktwinkelmessungen.....	156
5.3.6.1	Allgemeine Versuchsdurchführung und Auswertung .....	157
6	Danksagung .....	159
7	Abbildungsverzeichnis.....	161
8	Tabellenverzeichnis.....	169
9	Literaturverzeichnis .....	171

## Abkürzungsverzeichnis

AFM	atomic force microscopy
AFn	Antifibronektin, Antikörper
cFn	zelluläres Fibronektin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EZM	extrazelluläre Matrix
Fn	Fibronektin
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
pFn	Plasma-Fibronektin
PHSRN	Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin
QCM-D	quartz crystal microbalance dissipation
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
Sulfo-DSP	3,3-Dithio-bis-(sulfosuccinimidyl)propionat
TBS	Tris buffered saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

---

## Zusammenfassung

Biologische Adhäsion ist ein entscheidender Prozess für das Überleben vieler Zelltypen. Dabei ist die Zelladhäsion einerseits von der spezifischen Wechselwirkung zwischen Rezeptoren der Zellen und Liganden als mögliche Ankerpunkte für Zellen auf einer Oberfläche, andererseits von dem Abstand der Liganden zueinander abhängig. Eine untere kritische Grenze für die Abhängigkeit der Zelladhäsion/Zellüberleben vom Abstand der Liganden wurde bereits mit Hilfe von unterschiedlich dicht hexagonal angeordneten Gold-Nanopartikeln auf Oberflächen und deren Biofunktionalisierung mit der spezifischen RGD-Sequenz als Ligand gezeigt<sup>1</sup>.

In dieser Arbeit wird nun in einem weiteren Schritt die Biofunktionalisierung von nanostrukturierten Oberflächen mit dem gesamten Protein Fibronectin (Fn) untersucht, welches im Blut als Dimer vorkommt und zur Fibrillenbildung fähig ist. Für diesen Prozess sind intakte Fn Dimere nötig. Somit ist eine Untersuchung der Fibrillenbildung durch Fn Monomere in Abhängigkeit ihrer Abstände zueinander von großem Interesse.

Das Fn enthält, neben anderen Domänen, die oben genannte spezifische RGD-Sequenz, welche unter anderem von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, einem Transmembranprotein und Rezeptor der Zelle, erkannt wird und zur spezifischen Zell- und fibrillären Adhäsion führt. Für eine starke Affinitätsbindung von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und RGD-Sequenz im Fn ist eine zusätzliche Sequenz notwendig, die in der Nachbarschaftregion von Fn lokalisiert ist. Deswegen sind die Untersuchungen am ganzen sequenz-unmodifizierten Fn Molekül von großem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Fn Dimer oder Monomer an unterschiedlich dicht verteilte und circa 7 nm große Gold-Nanopartikel auf Oberflächen gebunden. Die Herstellung dieser Oberflächen erfolgt mittels Diblockcopolymer-Mizellen-Nanolithographie (engl.: block copolymer micelle lithography (BCML))<sup>2</sup>. Eine Herausforderung ist hierbei die effiziente und reproduzierbare Anbindung einzelner, unmodifizierter Fn Dimere oder Monomere an einzelne Gold-Nanopartikel auf Oberflächen sowie deren Charakterisierung. Hierfür wird die Effizienz a) einer direkten Anbindungsstrategie, bei der das Molekül statistisch orientiert an Gold-Nanopartikel gebunden wird, und b) einer indirekten Anbindungsstrategie, bei der das Molekül gerichtet orientiert über einen Linker an Gold-Nanopartikel gebunden wird, mittels der Schwingquarzmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (engl. quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D)), einer Kombination von QCM-D und Reflektometrie, Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscope (AFM)) untersucht. Ein Vergleich der Hydrophilie von Oberflächen untereinander geschieht hier mit Hilfe der statischen Kontaktwinkelmessung.

Mit Hilfe der Kontaktwinkelmessung werden zunächst alle in dieser Arbeit eingesetzten Oberflächen bezüglich ihrer Hydrophilie untersucht und gezeigt, dass diese miteinander vergleichbar sind. Für die folgenden Arbeiten wird dann ein Präparationsprotokoll zur Anbindung der Fn Moleküle an nanostrukturierte und passivierte Oberflächen erarbeitet.

Eine Kombination aus QCM-D und Reflektometrie liefert wertvolle Informationen bezüglich des Wassergehalts der Monomer- bzw. Dimer-Filme auf homogenen Oberflächen. Dies hilft bei der Bestimmung eines Richtwertes zur Ermittlung der Effizienz von unterschiedlichen Anbindungsstrategien an Nanostrukturen bei QCM-D Untersuchungen. Die QCM-D Studie liefert Informationen über den Unterschied zwischen der direkten und der indirekten Anbindungsstrategien: Sowohl für Fn Dimere als auch für Fn Monomere wird eine höhere Masse bei der indirekten Anbindung verzeichnet. Sowohl QCM-D als auch TEM Experimente zeigen deutlich, dass bei einer indirekten Anbindungsstrategie des Fn Dimers über einen kleinen Sulfo-DSP Linker und einen Antikörper, durch die Einlagerung des Linkers in die Passivierungsschicht und die Bindung der Fn Moleküle daran, eine nachteilige unspezifische Verteilung des Fn vorliegt. Die QCM-D Daten erlauben zudem einen Vergleich der viskoelastischen Eigenschaften von gebundenen Fn Dimeren oder Monomeren an homogene bzw. nanostrukturierte Oberflächen. Sie zeigen, dass angebundene Monomere mehr Wasser enthalten und weicher als Dimere sind.

Anhand von AFM Experimenten an Luft und in PBS Puffer wird festgestellt, dass die Gold-Nanopartikel von der Passivierungsschicht nicht verdeckt werden und genug Platz zur Anbindung des Fn anbieten sollten. Jedoch werden einzelne an die Gold-Nanopartikel gebundene Fn Moleküle mit AFM an Luft nicht aufgelöst. Für Experimente in PBS Puffer könnte durch einen weiteren präparativen Aufwand bessere Ergebnisse erzielt werden. Jedoch wird dabei das Gesamtsystem sehr komplex. Somit erwies sich die AFM Methode zur Untersuchung der Anbindungseffizienz von Fn an Nanostrukturen für die Fragestellung dieser Arbeit als nicht geeignet.

Daher wird die Effizienz der Anbindungsstrategien, sowie Bedingungen bei der direkten Anbindungsstrategie mit Hilfe der Fluoreszenzmethode untersucht. Sowohl eine Erhöhung der Konzentration der Proteinlösung als auch der Salzkonzentration des Arbeitspuffers haben keinen positiven Einfluss auf eine direkte Anbindung des Fn Monomers. Außerdem ist kein Effizienzunterschied bei der direkten und indirekten Anbindungsstrategie zu verzeichnen.

Mittels REM Experimenten unter Kryo-Bedingungen gelingt eine Untersuchung des Fn Netzwerkes. Dieses besteht sowohl aus gestreckten Fibrillen als auch aus Knoten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass für zufällige Zell-Adhäsionsstudien die direkte Anbindungsstrategie für das Fn gewählt werden sollte. Für die Fibrillenbildung hingegen wird eine indirekte Ankopplung des Fn via Antikörper empfohlen.

## Abstract

Adhesion is a crucial process for survival of many cell types. Not only is cell adhesion dependent on specific interactions between cell receptors and ligands (possible anchor points for cells on a surface), it is also dependent on the distance between the ligands. This distance dependence of cell adhesion has been previously investigated on gold nanostructures functionalized with the RGD sequence as a ligand<sup>1</sup>.

In this thesis the biofunctionalization of gold nanostructures with the whole protein Fibronectin (Fn) is investigated. Fn contains the above-named specific RGD sequence, which is recognized by  $\alpha 5\beta 1$ -integrin, one of the cell transmembrane proteins. However, specific cell adhesion and fibril formation develops from this interaction only when RGD is present together with an additional sequence in the adjacent region of Fn. Therefore, investigations with the whole sequence-unmodified Fn molecule are of great interest.

Within the framework of this thesis, Fn molecules as dimers (the cell-secreted state of Fn) or monomers (obtained after Fn reduction) are bound to 7 nm gold nanoparticles which are organized on surfaces in nanoarrays with different inter-particle distances. The fabrication of such nanoarrays is carried out by block copolymer micelle nanolithography (BCML)<sup>2</sup>. The challenge here is to efficiently and reproducibly bind single, sequence-unmodified Fn dimers or monomers to single gold nanoparticles. Two binding strategies are studied: i) direct binding of Fn to the gold nanoparticles, which resulted in a statistical orientation of Fn on the nanoparticles, and ii) indirect binding of Fn to the gold nanoparticles via a linker, which resulted in directed orientation of Fn on the nanoparticles. A general protocol for binding Fn molecules to the nanostructured and passivated surfaces was established (elaborated).

The hydrophilicity of and binding efficiency on these surfaces in each case is characterized. Static contact angle measurements confirm that all surfaces used in this thesis were hydrophilic and comparable for all experiments. The tools and methods used to investigate the binding efficiency are a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), reflectometry, fluorescence microscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM).

The QCM-D study provides information about the differences between the direct and indirect binding strategies. Higher mass is found when using the indirect binding strategy for both Fn dimers and monomers. Furthermore, the QCM-D data provide a comparison of the viscoelastic properties of bound Fn dimers and monomers. The Fn monomers are softer than the dimers and contain more water.

A combination of the QCM-D and reflectometry techniques provides useful information about water content in films of Fn monomers or dimers on homogeneous surfaces. Using these values, the approximate maximum binding value is calculated, which was used for determining the binding efficiency via the QCM-D measurements. The QCM-D as well as TEM experiments demonstrates that Fn dimers bound via a small Sulfo-DSP linker and an antibody leads to a nonspecific binding of Fn molecules between the gold nanoparticles.

AFM experiments in air and in PBS buffer show that the passivation layer does not cover the gold nanoparticles and there is enough space for binding Fn molecules. However, in air single Fn molecules are not resolved on the single gold nanoparticles. In PBS buffer the resolution is impaired by soft materials on the AFM tip.

The efficiency of the binding strategies as well as the conditions during the direct binding are also studied using fluorescence microscopy. No efficiency differences between the direct and indirect binding strategies were detectable. Furthermore, neither an increase of the protein concentration nor of the salt concentration of the buffer has a positive evidence for direct binding of Fn monomers.

A Fn fiber network is visualized using SEM under cryo conditions. The network contains stretched fibers as well as nodular structures.

In future investigations of Fn-dependent cellular processes, the results of the work done in this thesis indicate that the direct strategy of binding Fn to the nanoparticles is best suited for studying cellular adhesion processes, while for studying the process of fiber formation it is better to use the indirect binding strategy.



# 1 Motivation

Biologische Adhäsion (dt.: Anhaften, Kleben) hilft nicht nur beim Zusammenhalt von Gewebezellen, die in eine extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet sind, sondern wirkt auch bei lebenswichtigen Prozessen wie z. B. Embryogenese, Blutgerinnung, Wundheilung und Infektionsbekämpfung mit. Würden bestimmte Zelltypen nicht aneinander bzw. nicht an eine für sie bestimmte Umgebung haften (adhärieren), könnten vielzelligen Organismen nicht existieren<sup>3</sup>.

Die Zelladhäsion ist einerseits von der spezifischen Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren der Zellen und den Liganden, andererseits von dem Abstand der Liganden zueinander abhängig. Hierbei sind die Rezeptoren in die Zellmembran eingebettet und die Liganden Ankerpunkte, die sich auf der Oberfläche der EZM befinden. Die EZM ist essentiell für die Verankerung der Zellen und die Formkonsistenz der Gewebe. Sie ist ein sehr komplexes Gebilde, das aus verschiedenen Komponenten besteht, wie z. B. Kollagen, Elastin, Fibrillin, Laminin und Fibronectin<sup>4</sup>.

Das Protein Fibronectin (Fn) wird in dieser Arbeit als Ligand eingesetzt. Fn ist ein großes Glykoprotein, welches aus zwei ähnlich aufgebauten Monomereinheiten besteht. Jede Einheit enthält die RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure)-Sequenz, die von spezifischen Rezeptoren in der Membran von Gewebezellen erkannt wird. Die Erkennung der RGD-Sequenz löst eine Signalkaskade im Zellinneren aus. Dies führt zu Zelladhäsion und Wachstum bzw. Migration von Zellen.

Fn kommt in der unlöslichen Form in der EZM und auf der Oberfläche einiger Zelltypen vor, sowie in der löslichen Form im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten. In der EZM liegen Fn-Moleküle in der gestreckten Form vor. Sie sind in einem dichten fibrillären Netzwerk miteinander assoziiert<sup>5</sup>. *In vivo* ist die Fibrillenbildung durch die Einwirkung mechanischer Zugkräfte durch Zellen gesteuert<sup>6</sup>. *In vitro* gibt es auch zahlreiche zellfreie Mechanismen, die zur Fibrillenbildung führen, wie z. B. die Zugabe von Reduktions- bzw. Denaturierungsmitteln<sup>7</sup>. Außerdem ist bekannt, dass nur intakte Fn-Moleküle zur Fibrillenbildung fähig sind<sup>8</sup>.

Gerade wegen seinen zellbindenden Eigenschaften wird das Fn üblicherweise zur Durchführung von Zelladhäsionsstudien eingesetzt. Es adsorbiert auf einer Vielzahl von Oberflächen wie Kunststoff (z. B. Kulturpetrischalen)<sup>9</sup>, optische Wellenleiter<sup>10</sup>, Metalle<sup>11</sup> und selbst organisierte Monoschichten<sup>12</sup>. Für viele Versuche oder zur Kultivierung von Zellen im Labor genügt eine unspezifische Anbindung von Fn an Oberflächen. Für eine

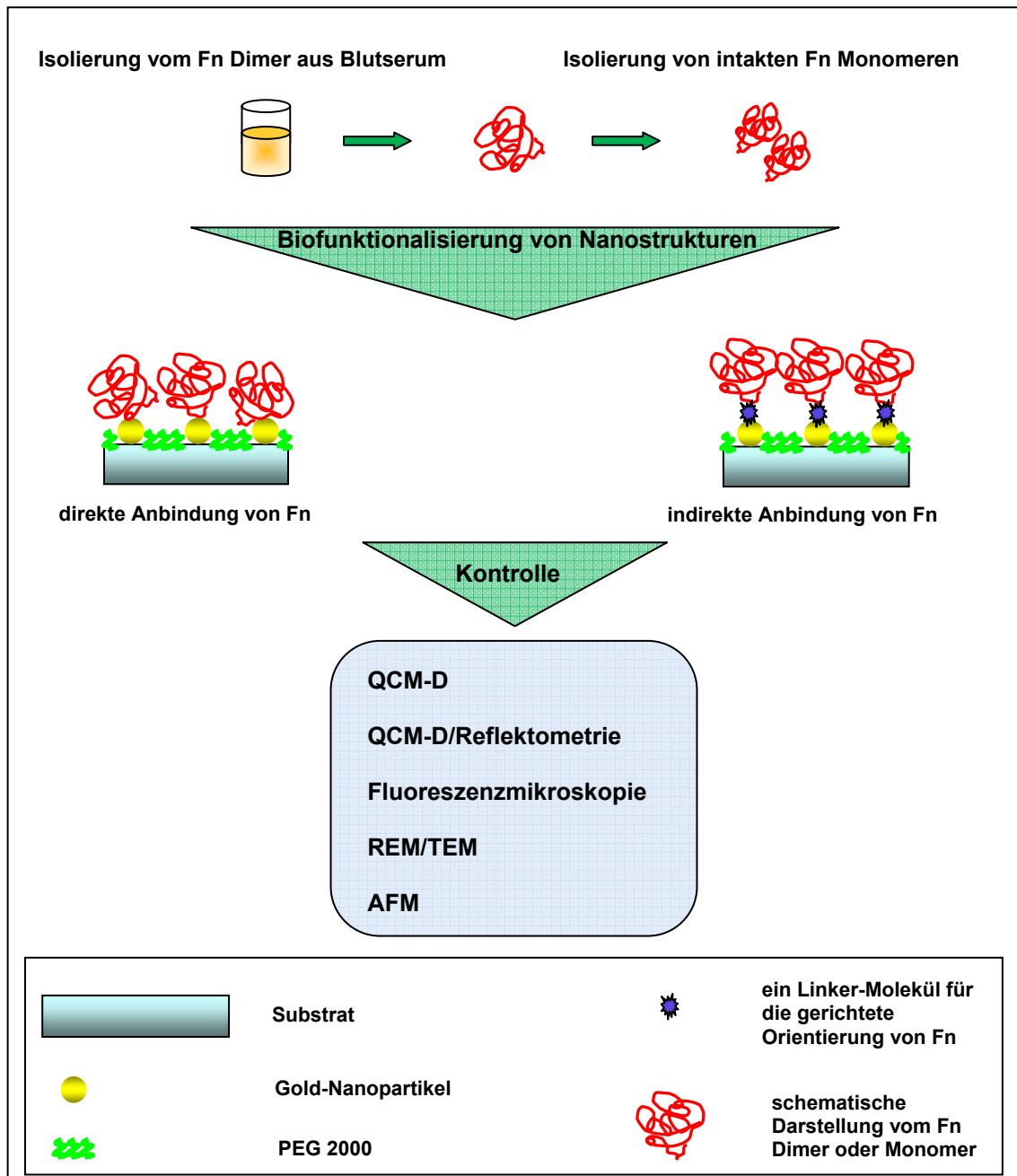
gezielte Orientierung des Moleküls auf Probenoberflächen ist eine spezifische Anbindung über bestimmte Moleküle wie Gelatin<sup>13</sup> oder Antikörper<sup>14</sup> möglich. Für andere Studien ist wichtig, dass das Molekül fest mit der Oberfläche verankert ist. Dann ist eine kovalente Anbindung des Fn über seine Aminogruppen an die aktivierten Estergruppen (über eine NHS/EDC Chemie) auf Oberflächen von Interesse<sup>15</sup>.

Unterschiedlich dicht hexagonal angeordnete Gold-Nanopartikel auf Oberflächen stellen ein wertvolles Werkzeug zur Kontrolle der Abstandsabhängigkeit der Liganden voneinander dar. In dieser Arbeit erfolgt die Herstellung derartiger Oberflächen durch Diblockcopolymer-Mizellen-Nanolithographie (engl.: block copolymer micelle lithography (BCML))<sup>16</sup>. Gelingt eine Anbindung von Proteinen an eine solche Oberfläche, erhält man eine hervorragende Möglichkeit zur kontrollierten Untersuchung wichtiger biologischer Prozesse wie z. B. Zelladhäsion, Zellmigration und Apoptose *in vitro*. Es ist bereits gelungen, mit Hilfe von unterschiedlich dichten, hexagonal angeordneten Gold-Nanopartikeln auf Oberflächen und deren Biofunktionalisierung mit der spezifischen RGD-Sequenz als Ligand zu zeigen, dass es eine universelle Längenskala von 58 bis 73 nm zwischen Gold-Nanopartikeln für die Zusammenlagerung der Integrine - der Transmembranproteine – und somit eine gute Adhäsion von Zellen gibt<sup>1</sup>.

Die Zelladhäsion an die RGD-Sequenz in Fn ist jedoch komplexer als die Adhäsion an die Oberflächen gebundene „nackte“ RGD-Sequenz. Beispielsweise ist für eine starke Affinitätsbindung von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, einem Transmembranprotein, an die RGD-Sequenz von Fn zusätzlich die PHSRN-Sequenz notwendig, die in der Nachbarschaftsregion lokalisiert ist<sup>17</sup>. Diese Komplexität ist der Grund für das große Interesse die Adhäsionsprozesse am ganzen unmodifizierten Molekül zu untersuchen.

Um solche Untersuchungen durchführen zu können, ist das Ziel dieser Arbeit, sowohl das Fn-Dimer als auch das Fn-Monomer in löslicher Form an ca. 7 nm großen Gold-Nanopartikel auf Oberflächen zu binden. Eine Herausforderung ist hierbei die kontrollierte und reproduzierbare Anbindung einzelner unmodifizierter Fn-Dimere oder -Monomere an einzelne Gold-Nanopartikel. Im Rahmen dieser Arbeit werden Anbindungsstrategien ausgearbeitet, um die Moleküle in einer statistischen Orientierung direkt oder in einer gerichteten Orientierung indirekt an die Gold-Nanopartikel zu koppeln (vgl. Abbildung 1). Zur Untersuchung und Kontrolle der Effizienz dieser Anbindungsstrategien werden folgende Techniken angewandt: die Schwingquarzmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (engl. quartz crystal microbalance dissipation (QCM-D)), eine Kombination der QCM-D Methode mit der

Reflektometrie, Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy (AFM)).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der kontrollierten Untersuchung einer effizienten und reproduzierbaren Anbindung von einzelnen löslichen Fn Dimeren oder Monomeren an einzelne Gold-Nanopartikel.

Auf Basis der vorliegenden Arbeiten kann in Zukunft die Fibrillenbildung durch Zellen, die das Fn sezernieren, sowie durch Zellen, die es nicht sezernieren, in Abhängigkeit von Abständen der Gold-Nanopartikel, an die das lösliche Fn angebunden ist, charakterisiert werden. Weiterhin kann in dem hier beschriebenen, neuartigen System die Fähigkeit der Monomere in Abhängigkeit von Abständen der Gold-Nanopartikel Fibrillen zu bilden, untersucht werden. Dies ist von großem Interesse, da aus der Literatur bisher bekannt ist, dass nicht gegeneinander ausgerichtete Monomere dazu nicht fähig sind<sup>8</sup>.

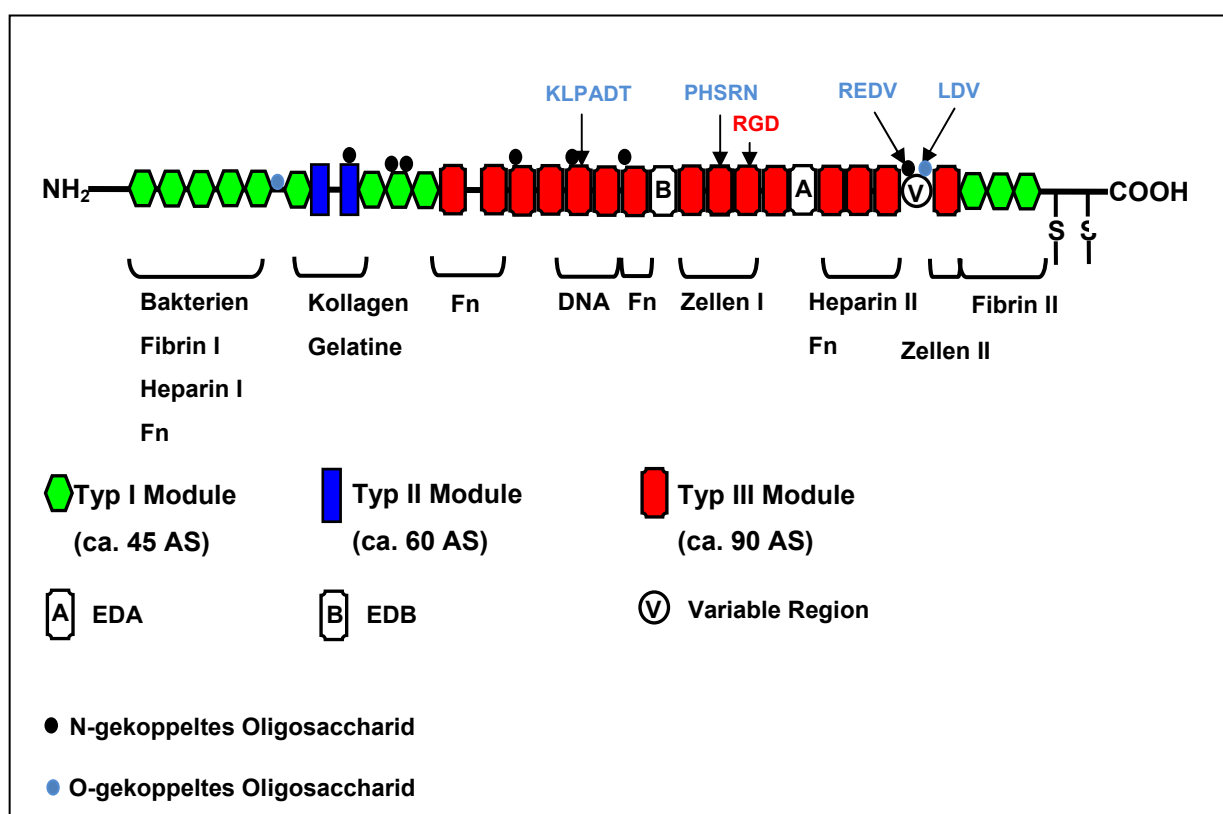
Neben der Fibrillenbildung kann auch die Fn vermittelte Zelladhäsion an den neu entwickelten Oberflächen charakterisiert werden. Diese potentiell zelladhäsions-spezifischen Oberflächen können dann als ein Werkzeug zum Aussortieren von unterschiedlichen Zelltypen dienen. Dies ist beispielsweise für Implantatoberflächen von Bedeutung, da hier nur die Adhäsion von bestimmten Zelltypen nützlich ist, während andere eine Genesung verhindern<sup>18</sup>.

## 2 Einleitung

### 2.1 Fibronektin

#### 2.1.1 Allgemein

**Fibronektin** (lat.: *fibra* für „Faser“; *nexus* für „Verknüpfung“)<sup>4</sup> ist ein dimeres Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von etwa 5%<sup>19</sup>. Es beinhaltet viele Funktionsdomänen und wechselwirkt mit einer großen Anzahl von Makromolekülen wie die Komponenten des Zytoskelets und EZM, im Blut zirkulierende Komponenten der Blutgerinnung und die Zellrezeptoren vieler Zelltypen wie Fibroblasten, Neuronen, Phagozyten und Bakterien<sup>20</sup> (vgl. Abbildung 2):



**Abbildung 2:** Eine schematische Darstellung eines monomeren Fibronektinmoleküls (abgewandelt von <sup>21</sup>). Es sind Spleiß-Varianten (EDA, EDB und die variable Region) sowie Bindedomänen und Glykosylierungsstellen dargestellt.

Das Fibronektin kommt in einer löslichen und unlöslichen Form vor. Als lösliches Dimer wird es hauptsächlich im Blutplasma (300 µg/ml) und anderen Körperflüssigkeiten wie

zerebrospinaler Flüssigkeit, Samenflüssigkeit, Bronchoalveolarflüssigkeit und im Fruchtwasser vorgefunden<sup>22</sup>. Der Hauptanteil von Plasma-Fibronektin (pFn) des Menschen scheint aus der Sekretion von Hepatocyten<sup>23</sup> und Endothelzellen<sup>24</sup> zu stammen. Das unlösliche (zelluläre) Fibronektin (cFn) kommt an der Oberfläche unterschiedlicher Zellen<sup>25</sup> (hauptsächlich von Fibroblasten<sup>26</sup>) bzw. im Zwischengeweberaum<sup>27</sup> vor: Das anfänglich lösliche Dimer wird in einem komplexen zellvermittelten Prozess in die EZM eingebaut.

Eine der hervorragenden Eigenschaften von Fn ist sein breites Vorkommen in unterschiedlichen Organismen. Das Fibronektin spielt in vielen Prozessen eine bedeutende Rolle: Zelladhäsion, Zellwachstum, Migration und Differentiation. Außerdem ist das Protein in den wichtigen Prozessen der Wundheilung und der Embryogenese von großer Bedeutung.

## 2.1.2 Struktur

### 2.1.2.1 Aufbau

Fibronektin ist ein Glykoprotein hohen Molekulargewichtes, das aus zwei ähnlichen aber nicht identischen Monomereinheiten besteht. Das Molekulargewicht beträgt abhängig von den Spleißvarianten (vgl. 2.1.2.2) 220 bis 250 kDa. Die Monomereinheiten sind am C-Ende über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden, das Molekül liegt also als Dimer vor<sup>20</sup>. Der isoelektrische Punkt ( $pI$ ) liegt zwischen  $pH = 5,5$  und  $6$ .

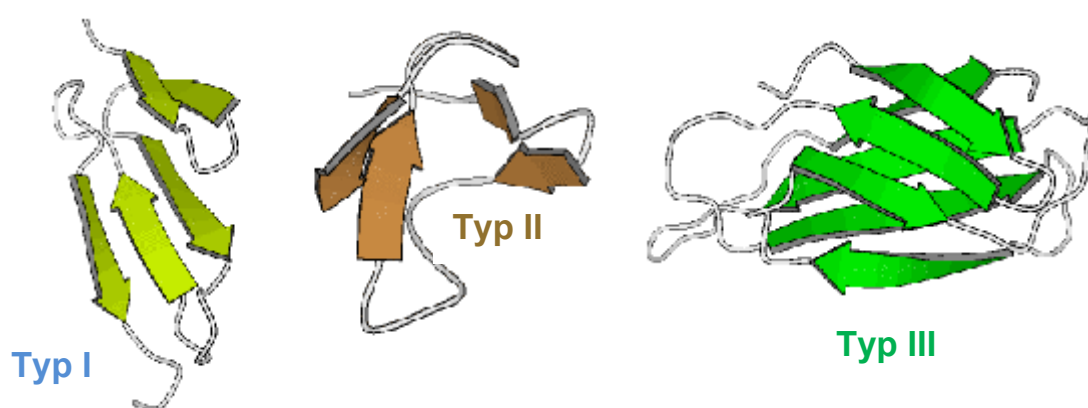
Die Aminosäuresequenz des Fn deckt drei Typen von intern homogenen Wiederholungen oder Modulen auf, die normalerweise mit einer kurzen Verbindungssequenz voneinander abgetrennt sind. Die Module sind in funktionelle Domänen organisiert. Diese sind resistent gegenüber der Proteolyse. Die Modulhomologen in Fn wurden auch in anderen Proteinen gefunden, vor allem das Modul Typ III<sup>20</sup>.

Das Protein ist aus wiederholenden globulären Modulen dreier Typen (Typ I, Typ II und Typ III) aufgebaut<sup>20</sup> (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3):

- Das Modul Typ I besteht aus etwa 45 Aminosäuren. Fn beinhaltet abhängig von der Spleißvariante 11-12 Module dieses Typs
- Das Modul Typ II ist aus etwa 60 Aminosäuren aufgebaut. Es gibt zwei Module dieses Typs im Fn.

- Das Modul Typ III enthält etwa 90 Aminosäuren. Abhängig von der Spleißvariante gibt es bis zu 15 Module dieses Typs in der monomeren Fn-Kette. Darunter Module EDA und EDB (s. Abbildung 1) und eine variable Region V.

Die Module des Typ I und Typ II enthalten jeweils vier Cysteinreste, die zur Ausbildung der jeweils zwei intramolekularen Disulfidbrücken dienen, die ihrerseits eine wichtige Rolle bei der Stabilität und den Funktionen des Proteins spielen<sup>28</sup>. Im Gegensatz dazu sind keine intramolekularen Disulfidbrücken im Modul Typ III vorhanden. Dafür gibt es freie Thiol-Gruppen an Modulen des Typ III<sub>7</sub> und des Typ III<sub>15</sub>, die ohne äußere Einwirkungen verborgen sind<sup>20</sup>.



**Abbildung 3:** Die drei Typen der Module<sup>29</sup>. Das Modul des Typ I besteht aus ca. 45 Aminosäuren, das Modul des Typ II aus ca. 60 Aminosäuren und das Modul des Typ III besteht aus ca. 90 Aminosäuren.

Die Sekundärstruktur der Module besteht hauptsächlich aus betha-Faltblättern. Das Protein enthält in seinem nativen und entfalteten Zustand etwa 40% betha-Faltblatt-Struktur und etwa 33% Windungen, der Rest ist die ungeordnete Struktur. Unter plasmatischen (physiologischen) Bedingungen (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH = 7,4) in mit und ohne Denaturierungsreagenz wie z. B. Harnstoff behält das Protein seine globale betha-Faltblattstruktur bei<sup>30</sup>. Die Module sind miteinander über kurze Ketten variablen Flexibilität verbunden. Außerdem beinhaltet das Fn viele aromatische Reste, darunter 200 Tyrosine, 78 Tryptophane<sup>20</sup>.

### 2.1.2.2 Alternatives Spleißen

Die Fibronektine werden von einem Gen kodiert. Es gibt jedoch viele Isoformen von Fn. Diese resultieren aus alternativem Spleißen der pre-mRNA. Es existieren bis zu zwanzig

humanen Fibronectin-Varianten<sup>31</sup>. Die meisten Variationen sind in der zentralen Region der Module des Typ III in dem Abschnitt Fn III<sub>7</sub> bis Fn III<sub>15</sub> zu finden. Sie unterscheiden sich in vier Bereichen voneinander:

- Zwei davon sind bekannt als die Module des Typ III- EDA (EDI oder EIIIA) und EDB (EDII oder EIIB). Sie sind im Fn Molekül entweder vollständig an- bzw. abwesend<sup>31</sup>. EDA ist zwischen den Modulen des Typ III<sub>11</sub> und Typ III<sub>12</sub>, EDB zwischen den Modulen des Typ III<sub>7</sub> und Typ III<sub>8</sub> lokalisiert. EDA und EDB sind im pFn nicht vorhanden.
- Der dritte Bereich ist die variable Region V (VR oder IIICS). Diese kommt im pFN nur in einem der beiden Monomeren vor<sup>32</sup>. Im Gegenteil dazu ist die variable Region im cFN in beiden Monomeren vorhanden<sup>33</sup>. Dieser Bereich ist zwischen den Modulen Typ III<sub>14</sub> und Typ III<sub>15</sub> lokalisiert.
- Der vierte Bereich ist am Carboxylende des Moleküls lokalisiert und resultiert in das Fehlen der Typ III<sub>15</sub> und Typ I<sub>10</sub> Module<sup>34</sup>.

Alternatives Spleißen ist gewebespezifisch und ist vom Entwicklungsstadium abhängig. EDA und EDB Regionen sind für Fibronectine in schnell proliferierenden Geweben wie beispielsweise während der Embryonalentwicklung<sup>35</sup>, der Wundheilung<sup>36</sup> oder auch in Tumoren<sup>37</sup> typisch.

Eine der vorgeschlagenen Funktionen der variablen Region in einem der Monomere ist die Mitwirkung bei der Bildung der Dimere<sup>38</sup>.

### **2.1.2.3 Glykosylierung**

Das Fibronectin ist ein Glykoprotein. Dies bedeutet, dass es Kohlenhydratreste enthält. Ihr Anteil variiert zwischen 4 und 9%<sup>31</sup>. Bislang sind sieben Glykosylierungen bekannt, die über Stickstoffatome, und mindestens zwei<sup>39</sup>, die über Sauerstoffatome mit dem Fn verknüpft sind. Die N-Glykosylierung ist an den Modulen des Typ II<sub>2</sub>, Typ I<sub>8</sub>, Typ III<sub>3,5,7</sub> und der variablen Region lokalisiert, die auch einen O-verlinkten Kohlenhydratrest enthält (s. Abbildung 2). Die Funktion der Kohlenhydratreste ist eine Stabilitätserhöhung bestimmter Domänen gegen die Protolyse<sup>40</sup>. Wahrscheinlich sind sie zusätzlich auch für die biologischen Funktionen des Proteins relevant<sup>21</sup>.

Die Größe der Kohlenhydratreste und der Typ der Glykosylierung sind gewebespezifisch. Im Fn aus amniotischer Flüssigkeit (Fruchtwasser) sind doppelt so viele Kohlenhydratreste vorhanden wie im pFn<sup>41</sup>. Das Fn, welches aus humanem Tumor-, Fötus- oder Plazenta-Gewebe isoliert wird, enthält ein einzigartiges, in der



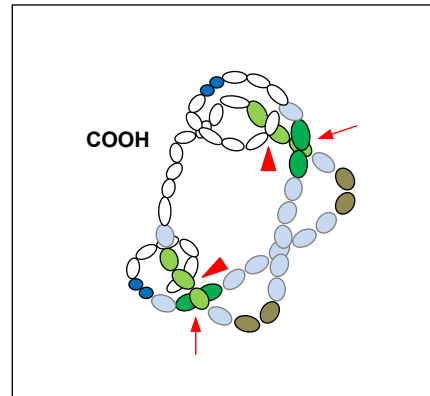
variablen Region lokalisiertes Epitop mit einer bestimmten Glykosylierungsstelle. Dieses Epitop wird von einem spezifischen Antikörper erkannt<sup>42</sup>. Diese Wechselwirkung bildet die Basis für pränatale Diagnostiktests, die das Frühgeburtsrisiko vorhersagen könnten<sup>43</sup>.

### 2.1.3 Konformation

Über die dreidimensionale Struktur des Fn ist wenig bekannt, da keine experimentellen Daten wie Röntgenstruktur- oder NMR-Analyse bezüglich des ganzen Moleküls vorliegen. Die Molekülgestalt wurde bereits mittels unterschiedlicher Techniken untersucht, jedoch wird über seine statistische Konformation debattiert<sup>44</sup>.

Pelta *et al.* führte statische und dynamische Lichtstreuungs- und Kleinwinkel-Neutronenstreuungsexperimente durch und stellte fest, dass unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4, Salzkonzentration 150 mM) das Fn eine zufällig orientierte Kette aus Kugeln darstellt (engl.: string of beads)<sup>44</sup>. Sjöberg *et al.* stellte anhand von Kleinwinkel-Neutronen- und Röntgenbeugung fest, dass das Fn Molekül unter physiologischen Bedingungen als eine kompakte abgeflachte Disk mit einem Achsenverhältnis von 1:10 erscheint<sup>45</sup>.

Untersuchungen der hydrodynamischen Eigenschaften von Fn in Lösungen belegen, dass es abhängig von der Ionenstärke und dem pH-Wert der Lösung in einer kompakten und einer lockereren Konformation existieren kann. In der kompakten Konformation ist das Molekül durch die van-der-Waals Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen und H-Brücken zwischen den einzelnen Modulen stabilisiert. Die Module des Typ III<sub>12-14</sub> und Typ III<sub>5</sub> sind Domänen mit einem Überschuss an positiver Ladung. Wohingegen sind die Module des Typ III<sub>2-3</sub> und EDA stark negativ geladen<sup>44</sup>. Diese entgegengesetzte Ladung erklärt eine Wechselwirkung zwischen den Domänen. Eine Änderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes führt zu einer Destabilisierung der elektrostatischen Wechselwirkung und Lockerung der Konformation. Es kommt dabei zum Verlust der tertiären Struktur<sup>46</sup>, dies ist jedoch reversibel. Von Johnson *et al.* (Abbildung 4) wird eine kompakte Konformation von einem Fn Dimer vorgeschlagen, in der das Molekül in Form einer Bretzel gefaltet ist<sup>47</sup>.



**Abbildung 4: Das vorgeschlagene Modell des Fn Moleküls von Johnson *et al.*<sup>47</sup>: Die kompakte Konformation von pFn-Dimer.** Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Modulen Typs III<sub>2-3</sub> (●) und Modulen Typs III<sub>12-14</sub> (●) und der N-terminalen Heparin I Einheit (○) sorgt für eine kompakte Konformation des Moleküls unter physiologischen Bedingungen.

Kaiser *et al.* führte Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Untersuchungen des Fn durch. Er stellte fest, dass es keine Änderung des Signals für das Fn unter physiologischen Bedingungen und in einem mit 1 M NaCl versetzten PBS Puffer gibt, was auf eine vergleichbare Struktur in der Lösung hindeutet<sup>48</sup>. Es wird berichtet, dass bestimmte Epitope in der Region der Module des Typ III<sub>9</sub> und III<sub>10</sub> bei höheren Ionenstärken besser zugänglich sind. Hingegen liegt das Fn im Blut in einer kompakten Konformation vor, so dass die biologische Aktivität des Moleküls unterdrückt wird, wodurch eine überflüssige Aktivierung der im Blut zirkulierenden Integrin-Rezeptoren von Zellen gedämpft werden sollte<sup>49</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen und bei niedriger Ionenstärke existiert das pFn in einer kompakten Konformation mit dem Sedimentationskoeffizient 10-13,5 S. Bei höheren pH-Werten und höheren Salzkonzentrationen erfährt das pFn eine reversible Entfaltung<sup>50</sup> und hat dann einen Sedimentationskoeffizienten von 6-8 S<sup>51</sup>.

Der durchschnittliche Trägheitsradius ist eine wichtige Größe zur Charakterisierung der räumlichen Ausdehnung unregelmäßig geformter Partikel. Er lässt sich durch Streuexperimente bestimmen. Der Trägheitsradius ist bei 0,152 M NaCl 8,81 nm und bei 1,064 M NaCl 16,2 nm<sup>45</sup>. Ulmer *et al.* zeigte mithilfe hochauflösender REM, dass das Fn Molekül in seiner globulären Konformation einen Durchmesser von etwa 32 nm aufweist<sup>52</sup>.

Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln oder Denaturierungsreagenzien in bestimmten Konzentrationen werden Disulfidbrücken gestört. Patel *et al.* verglich die Eigenschaften

von nativem mit zurückgefaltetem Fn, welches mit 10 M Harnstoff behandelt wurde, und stellte fest, dass die betha-Faltblattstruktur und die lokale Organisation in der Umgebung von Tyrosin- und Tryptophanresten beibehalten wurde. Jedoch fand eine globale Reorganisation der Monomereinheiten statt<sup>30</sup>.

## 2.1.4 Fibrillenbildung und Matrixaufbau

### 2.1.4.1 Mechanismus

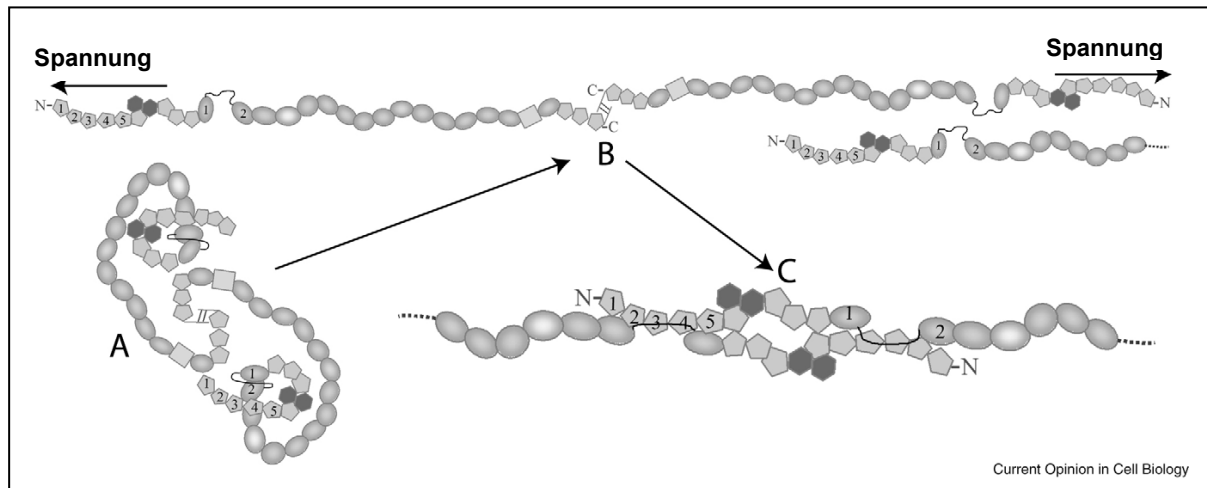
Eine der wichtigsten Eigenschaften von Fn ist die Fähigkeit zur Fibrillenbildung und zum Matrixaufbau. Dieser zellvermittelte und hochregulierte Prozess verläuft unter Beteiligung der Integrine<sup>53</sup>. Möglicherweise sind dabei auch andere Zellrezeptoren, die den Aminoterminus von Fn erkennen<sup>54</sup>, und zellgebundene Proteoglykane wie z. B. Syndekan-4 beteiligt<sup>55</sup>.

Es wird postuliert, dass der Prozess der Fibrillenbildung mehrstufig ist<sup>56</sup>. Zuerst bindet lösliches protomeres Fn an die Zelloberfläche. Diese Wechselwirkung wird über die N-terminale 70 kDa Region von Fn vermittelt. Im zweiten Schritt wandelt sich das protomere Fn in ein disulfidstabilisiertes Multimer um. Dieser Prozess wird durch Wechselwirkungen innerhalb oder zwischen den Fn Molekülen vermittelt. Beim letzten Schritt wird die Bindung zur Zelloberfläche gelockert. Die Aggregation der Fn Moleküle findet an einer spezifischen Stelle der Zelloberfläche statt und bedarf der Beteiligung der Integrine. Diese sind ein Verbindungsglied zwischen den Fn Molekülen und den Aktinfilamenten im Zellinneren.

Während des Einbaus in die Matrix kann das Fn sowohl mit anderen Fn Molekülen als auch mit einer Vielzahl der Matrixkomponenten wie Kollagen und Proteoglykan wechselwirken<sup>57</sup>. 1991 zeigte Schwarzbauer, dass für die *in vitro* Fibrillenbildung zwei Merkmale essentiell sind: Die am Aminoterminus lokalisierten Module des Typ I<sub>1-5</sub>, die für eine Fn-Fn Wechselwirkung zuständig sind, und eine dimere Struktur, die am C-Terminus durch zwei Disulfidbrücken beide Monomere zusammenhält<sup>8</sup>. Das Ergebnis der Studie zeigte deutlich, dass die Monomere alleine keine Matrix bilden können. Die Monomere können jedoch in die bereits vorhandene Matrix, die von Fibroblasten *in vitro* gebildet ist, eingebaut werden<sup>58</sup>.

Eine Wechselwirkung der Fn Moleküle untereinander könnte zusätzlich durch die Module des Typ II am N-Terminus mit dem Modul des Typ I<sub>12</sub> über Disulfidbrücken unterstützt werden<sup>59</sup>. Kürzlich wurde ein erweitertes Modell, das auf NMR-Studien basiert, von

Vakonakis *et al.* zur Fibrillenbildung diskutiert<sup>60</sup> (vgl. Abbildung 5). Wenn eine Zugspannung durch Zellen aufgebaut wird und Moleküle gestreckt werden, kann die Wechselwirkung zwischen den Modulen des Typ I am N-Terminus und den Modulen des Typ III<sub>1</sub> und Typ III<sub>2</sub> in ihrer „geöffneten“ Konformation eine Rolle spielen.



**Abbildung 5: Das vorgeschlagene Modell für die Fibrillogenese<sup>60</sup>.** Werden auf das Fn Molekül Zugkräfte angelegt, so entfaltet sich das Molekül unter Freilegung der Regionen, die für die Fibrillenbildung von Bedeutung sind.

Auch unter Einwirkung äußerer Kräfte in einem zellfreien Mechanismus können Fibrillen gebildet werden<sup>61</sup>. Bis jetzt ist jedoch nur wenig über die Anordnung einzelner Moleküle in den Fibrillen bekannt<sup>62</sup>. Mosher *et al.* postulierte 1990 ein Modell für eine Fibrille, in der die um etwa 40 nm zu einander versetzten Fn Moleküle dargestellt sind<sup>63</sup>.

#### 2.1.4.2 Elastizität der Fibrillen

Zellen können Zugkräfte ab 70 nN und ca.  $5,5 \pm 2 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  an einem einzelnen Ankerpunkt (Fokalen Kontakt) ausüben<sup>64</sup>, so dass Fn Fibrille *in vivo* hohen Kräfteinwirkungen ausgesetzt sind. *In vitro* zeigten Baneyx und Vogel ebenfalls eine erhebliche Deformation der Fn Struktur bei seiner Adsorption an eine Lipidmonoschicht auf Wasser<sup>65</sup>.

Die Fn Faltungs-Entfaltungs-Geschwindigkeit ist von der Streckungsgeschwindigkeit abhängig. Ohne Kräfteinwirkung entfaltet und faltet sich das Molekül spontan ( $2 \times 10^{-2} - 4 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$ ). Wenn jedoch kleinste Kräfte vorhanden sind, kann es sich weiter entfalten<sup>64</sup>.

In der Literatur sind zwei Modelle für eine Bildung der Fibrillen und ihre Elastizität vorgeschlagen: Das erste Modell von Erickson *et al.* schlägt vor, dass Fn Moleküle in einer kompakten Konformation in entspannten Fibrillen angewinkelt und gekringelt vorliegen. Werden Fibrillen gestreckt, nehmen die Moleküle eine verlängerte Konformation an, wobei die Module gefaltet bleiben. Das zweite Modell von Vogel *et al.* schlägt hingegen vor, dass die Fn Moleküle in den Fibrillen bereits gestreckt sind. Werden die Fibrillen gestreckt, entfalten sich Module des Typ III. Beide Modelle nehmen an, dass longitudinale Verbindungen von benachbarten Fn Molekülen durch Wechselwirkungen zwischen den entsprechenden N-terminalen Modulen des Typ I zustande kommen<sup>66</sup>.

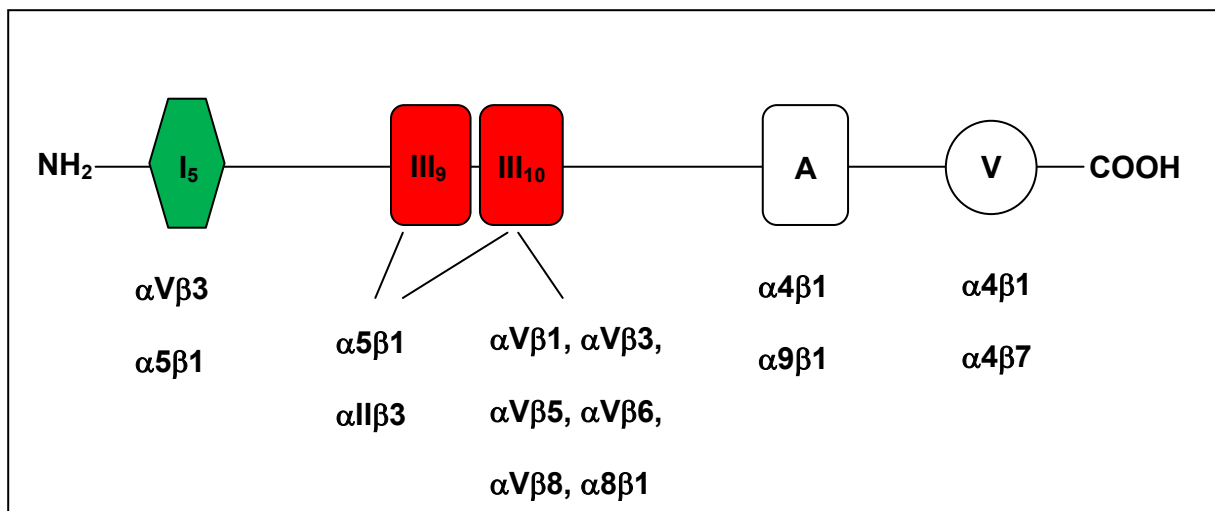
Wenn es die Möglichkeit gäbe einzelne Kräfte an einzelnen Fn Molekülen in einer Fibrille zu vermessen, dann könnte man Rückschlüsse ziehen, welches Modell der Wahrheit näher kommt. Da aber eine Fn Fibrille sehr viele Fn Einzelmoleküle enthalten kann, ist dies bis jetzt nicht gelungen. Man vermutet, dass die Kräfte, die notwendig sind, um das Fn Molekül zu entfalten, ohne die Struktur der Module zu zerstören, in der Größenordnung von 1-5 pN liegen und dass die Kräfte, die zur signifikanten Entfaltung der Module führen, größer als 10 pN sein müssten<sup>67</sup>. Oberhauser *et al.* stellte sogar erstaunlich hohe Entfaltungskräfte für einzelne Fn Module des Typ III<sub>10</sub> von etwa 80 pN und Typ III<sub>1-2</sub> von etwa 200 pN fest<sup>68</sup>. Ulmer *et al.* zeigte, dass bei der Biegung von Fn funktionalisierten PDMS Mikrosäulen eine lokale Kraft an die Fn Partikel in der Größenordnung von 8 pN pro Partikel einwirkt und beide Modelle ihre Konsistenz haben<sup>52</sup>.

Kaiser *et al.* untersuchte Eigenschaften der Fn Fibrillen beim automatisierten Ziehen der Oberfläche mit PDMS-Mikrosäulen über einem Tropfen der Fn-Lösung. Er konnte eine Abhängigkeit des Durchmessers der Fibrillen von der Proteinkonzentration und Zugeschwindigkeit feststellen: Bei hoher Proteinkonzentration und einer niedrigen Zugeschwindigkeit erhielt er dicke Fibrillen, bei den entgegengesetzten Parametern die dünnen. Außerdem stellte er fest, dass Fn Moleküle in den Fibrillen seines Systems bereits vorgestreckt waren. In seinem System findet keine reversible Entfaltung des Proteins nach den Zugexperimenten statt<sup>48</sup>.

### 2.1.5 Wechselwirkung mit Integrinen

Integrine sind transmembrane Proteine, die bei Adhäsionsprozessen vieler Zelltypen eine Rolle spielen und für die Signalübertragung ins Innere der Zelle zuständig sind. In

Gewebe exprimieren Zellen aktivierte Integrine, die produziertes cFn sofort binden. Durch die mechanische Zellspannung mittels Aktin-Zytoskeletts wird das gebundene cFn gestreckt, was zur Öffnung der verborgenen Domänen für die Bindung anderer Fn-Moleküle und schließlich zur Fibrillenbildung führt (s. Kap. 2.1.4.1). Im Blut exprimieren Blutzellen nicht aktivierte Integrine. Erst wenn diese aktiviert werden, wie z. B. bei der Ausbildung eines Thrombus, können sie pFn binden und in die Fibrille assoziieren<sup>69</sup>. Vor etwa 25 Jahren demonstrierte Ruoslahti *et al.* die Abhängigkeit der Zelladhäsion vom RGD-Motiv, das im Modul des Typ III<sub>10</sub> des Fn lokalisiert ist<sup>70</sup>. Dieses Motiv wird vom Integrin  $\alpha 5\beta 1$  der Zelle erkannt<sup>71</sup>. Mittlerweile kennt man weitere Integrine, die an das RGD-Motiv binden<sup>72</sup> (vgl. Abbildung 6):



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der modularen Struktur des Fn mit Integrin bindenden Domänen (abgewandelt von <sup>73</sup> und <sup>21</sup>).**

Unter den Fn bindenden Integrinen scheint das  $\alpha 5\beta 1$  Integrin die wichtigste Rolle zu spielen. Diese binden sich an Fn-Moleküle, bewegen sich von dem Fokalen Kontakt weg in Richtung der Zellmitte entlang des Aktinfilaments, wo sie eine neue Adhäsionsstruktur bilden, die Fibrillare Adhäsion heißt. In dieser Struktur sind Fn Fibrillen mit  $\alpha 5\beta 1$  Integrinen, F-Aktin Filamenten und einer Vielzahl an Signalmolekülen assoziiert<sup>74</sup>. Bei den Knockout-Mäusen, die die  $\alpha 5$ -Integrinsubeinheit nicht bilden können, übernimmt die  $\alpha V$  Integrinuntereinheit die Aufgabe der Fibrillenbildung<sup>75</sup>. *In vitro* sind diese Fn-Fibrillen kurz und dick. Die  $\alpha V$  Integrinsubeinheit sind bei der Fokalen Adhäsion beteiligt und nicht im Stande sich davon zu bewegen<sup>74</sup>. Interessant und nicht beantwortet ist die

Frage, ob auch *in vivo* das gemischte Netzwerk aus beiden Fn-Fibrillentypen vorläge: kurze und dicke, die von  $\alpha V$  Integrinsubeinheit produziert werden und lange und dünne, die von  $\alpha 5\beta 1$  Integrinen produziert werden.

Für eine starke Affinitätsbindung von dem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin sowie von dem Plättchen-spezifischen  $\alpha IIb\beta_3$  an die RGD-Sequenz von Fn ist die PHSRN-Sequenz (Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin, Human) bzw. PPSRN (Prolin-Prolin-Serin-Arginin-Asparagin, Maus) notwendig, die in dem benachbarten Modul Typ III<sub>9</sub> lokalisiert ist<sup>76</sup>. Die Integrine mit der  $\alpha V$  Subeinheit benötigen diese Synergierregion nicht<sup>77</sup>.

Es existieren andere nicht RGD- bindende Integrine (vgl. Abbildung 6). Die Integrine  $\alpha 9\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 1$  binden direkt im Bereich der EDA-Domäne an das Fn<sup>78</sup>, während  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$  an die variable Region des Fn binden. *In vitro* kann  $\alpha 4\beta 1$  unabhängig von der Wechselwirkung von  $\alpha 5\beta 1$  mit dem RGD-Motiv die Fibrillenbildung initiieren<sup>79</sup>. Jedoch ist es umstritten, ob dieser Prozess *in vivo* an der Fibrillognese beteiligt ist<sup>73</sup>.

## 2.1.6 Die Rolle des Fibronektins

Das Fibronektin spielt bei der Zelladhäsion, dem Zellwachstum, der Migration und der Differentiation eine große Rolle. Außerdem ist das Protein bei wichtigen Prozessen wie Wundheilung und Embryogenese von großer Bedeutung. In diesem Kapitel wird die Rolle von Fn bei der Wundheilung, der Tumorerkrankung und der Embryogenese näher erläutert.

### 2.1.6.1 Tumorerkrankung

Wenn eine Zellteilung beginnt, nimmt die Konzentration am perizellulären Fn ab. Dabei rundet sich die Zelle ab<sup>19</sup>. Nachdem die Mitose abgeschlossen ist, wird die Zelle wieder flach. Die fibrilläre, Fn-haltige Matrix wird erneut ausgebildet<sup>80</sup>. Je mehr Zellen entstehen, desto stärker kommt es zur Erschwerung weiterer Mitosen bis zum Wachstumsstopp. Durch onkogene Viren transformierte Fibroblasten besitzen an der Oberfläche fast kein Fn<sup>81</sup>. Sie sind nicht in der Lage, das ausgeschleuste Fn in die Matrix einzubauen<sup>82</sup>. Da das Fn den Kontakt von Zellen an die EZM vermittelt, kommt es bei dem Fn-Mangel zur Lösung der malignen Zellen aus dem Zellverband und damit zur Metastasierung<sup>19</sup>. Außerdem kommt es zu einem ungeordneten Wachstum transformierter Zellen in entsprechenden Kulturen, da hier keine Kontaktinhibition stattfindet.

### 2.1.6.2 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein körpereigener Prozess, bei dem sich die Wunde verschließt und das beschädigte Gewebe wieder hergestellt wird. Die Wundheilung ist üblicherweise in drei bis fünf Phasen unterteilt<sup>83</sup>.

Anfangs wird Fibrinogen mithilfe des Thrombins in das nichtlösliche Fibrin überführt. Ein Fibringerinnsel wird gebildet, welches ein Verkleben aneinanderliegender Wundränder ermöglicht. Jede Fn-Untereinheit enthält zwei Bindungsstellen für Fibrin: Fib-1 (Module Typ I<sub>1-5</sub>) und Fib-2 (Module Typ I<sub>10-12</sub>). Es ist bekannt, dass der Einbau von Fn in das Fibringerinnsel über die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Domänen am Fn und der  $\alpha$ C Region des Fibrins vermittelt wird. Zwei Proteine werden im nächsten Schritt mittels des Blutgerinnungsfaktors XIIIa kovalent verbunden. Die Bindung an die Fib-1 Domäne ist besser untersucht als die an Fib-2. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Bindung an die Fib-2 Domäne eine schwächere Affinität zur  $\alpha$ C Region des Fibrins aufweist als die Fib-1 Domäne<sup>84</sup>.

Die somit entstandene Fn haltige Matrix ist eine Basis, die die Einwanderung und Zellteilung im Wundgebiet fördert. Die Zellen der Immunabwehr wie z. B. Monozyten reifen in dem Wundgebiet zu Makrophagen, die Zelltrümmer und Pfropf abräumen. Fibroblasten vollbringen die eigentliche Aufbauarbeit.

In der Phase der Ausbildung der Gefäße (Angiogenese und Reepithelisierung) steuert das Fn die Wanderung der Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten zur Basalmembran. In der Remodellierungsphase ist das Fn bei der Organisation von Kollagenfibrillen beteiligt, die die Zugfestigkeit des Gewebes stark erhöhen und somit zu einem Wundverschluss führen<sup>85</sup>.

In den Knockout-Mäusen, die kein pFn und cFn produzieren können, wird eine verlangsamte Ausbildung des Thrombus beobachtet<sup>21</sup>, da die Bindung der Zellen untereinander weniger stabil ist und somit immer wieder Plättchen mit dem Blutstrom verloren gehen<sup>86</sup>.

Es wurde berichtet, dass topisch aufgebracht Plasmafibronektin in wertvoller Weise die Geschwindigkeit der Wundheilung, z. B. bei Hornhautwunden<sup>87</sup>, Beingeschwüren<sup>88</sup> und Haut mit Sonnenbrand<sup>89</sup> beeinflusst.



### 2.1.6.3 Embryogenese

Bereits im frühen Stadium der Embryogenese spielt das Fibronectin eine sehr wichtige Rolle nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei der Entwicklung von Amphibien und Vögeln<sup>21</sup>.

Bei der Embryogenese wandert die befruchtete Eizelle innerhalb drei oder vier Tage durch den Eileiter in den Uterus. Dabei verwandelt sie sich durch Teilung in eine Blastozyste. Sie besteht aus dem Trophoblast außen, aus dem Plazenta und Eihäute hervorgehen, und dem Embryoblast innen, aus dem sich der eigentliche Embryo entwickelt. Im Uterus kommt es zu einem direkten Kontakt der Blastozyste mit der EZM, die aus Kollagenen, Laminin, Fibronectin und Hyaluronsäure besteht. Die Trophoblastenzellen fangen an, Integrine zu bilden, um an die Komponenten der EZM binden zu können<sup>90</sup>. Wird die Wechselwirkung der Integrine mit der EZM gestört, kommt es zur Fehlbildungen der mesodermalen Strukturen<sup>91</sup>. Das Mesoderm entsteht während der dritten Schwangerschaftswoche. Aus den mesodermalen Zellen bilden sich innere Organe, Drüsen, Skelett und Knochen<sup>92</sup>. In der Abwesenheit von Fn kommt es zu Fehlbildungen. Die Embryonen der Maus, die kein Fn bilden können, versterben am Tag 8,5 *in utero*<sup>93</sup>. Auch das Fehlen der  $\alpha 5$ -Integrin Untereinheit in Mäusen führt zu der Bildung der fehlerhaften mesodermalen Strukturen und schließlich zum Tod am Tag 10-11. Dies ist vermutlich auf das Fehlen des Fibronectin-Rezeptors  $\alpha 5\beta 1$  zurückzuführen<sup>91</sup>.

## 2.2 Adsorption von Proteinen an Grenzflächen

Proteinadsorption ist ein komplexer, dynamischer Prozess. Allein die Struktur von Proteinen ist sehr komplex. Sie sind aus etwa 20 verschiedenen Aminosäureresten aufgebaut, die unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Oberfläche und dem Lösungsmittel aufweisen<sup>94</sup>. Die Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen einem Protein und der Grenzfläche ist für eine gezielte Oberflächenpräparation auf solchen Gebieten wie z. B. Bioseparation, Entwicklung der Biosensoren, Nahrungsmittelproduktion und Implantat-Technologien<sup>95</sup> von großer Bedeutung. Proteineigenschaften wie Struktur, Größe und strukturelle Stabilität als auch Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenenergie, Rauheit und Oberflächenchemie werden als Schlüsselfaktoren bei einem Adsorptionsprozess angesehen.

Ob die Proteinadsorption an der Grenzfläche freiwillig abläuft, gibt die Gibbs-Energie  $\Delta G$  wider, sie wird mit der Gleichung (1) beschrieben:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Wobei  $H$  die Enthalpie,  $S$  die Entropie und  $T$  die absolute Temperatur sind. Die Gibbs-Energie gibt an, ob eine Reaktion, in dem Fall die Adsorption eines Proteins, freiwillig abläuft. Dies liegt vor, wenn  $\Delta G < 0$  ist. Dieser Fall tritt ein, wenn entweder die freie Enthalpie  $H$  gesenkt oder die Entropie  $S$  erhöht wird. Somit wird eine Immobilisierung des Proteins an der Grenzfläche energetisch begünstigt. Treibende Kräfte der Proteinadsorption an Grenzflächen haben folglich sowohl einen enthalpischen als auch entropischen Charakter. Zur Erniedrigung der Enthalpie tragen van-der-Waals- und die Coulomb-Wechselwirkungen bei. Bei der Erhöhung der Entropie spielt der hydrophobe Effekt eine wichtige Rolle. Im Folgenden werden die Wechselwirkungen von Proteinen mit einer Grenzfläche erläutert.

### **Van-der-Waals Wechselwirkungen**

Die van-der-Waals Kraft ist eine anziehende Kraft mit kurzer Reichweite, deren Wechselwirkungsenergie mit etwa der sechsten Potenz des Abstandes abfällt. Sie ist die Folge der verschiedenen Dipol-Dipol Wechselwirkungen<sup>96</sup>:

- Die Keesom Wechselwirkung beschreibt die Anziehung zwischen den permanenten Dipolen.

- Die Debye Wechselwirkung ist zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol präsent.
- Auch in nicht-polaren Molekülen können Dipole induziert werden. Da die negativen Elektronen den positiven Kern umkreisen, kann ein temporärer Dipol entstehen. Dieses induziert in dem Nachbarmolekül wiederum ein Dipol. Eine solche Wechselwirkung heißt London Kraft<sup>96</sup>.

### **Coulomb-Wechselwirkungen**

Die Coulomb Wechselwirkungen sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem Proteinmolekül und einer elektrisch geladener Grenzfläche<sup>96</sup>. Die Ladungsverteilung an der Proteinoberfläche muss berücksichtigt werden. Diese ist stark pH-abhängig, da Aminosäuren Zwitterionen sind und abhängig vom pH-Wert unterschiedliche Ladungen haben. An ihrem isoelektrischen Punkt sind sie neutral, oberhalb negativ und unterhalb positiv geladen<sup>4</sup>. Die Struktur des Proteins ist unregelmäßig, daher hängen die elektrostatischen Wechselwirkungen von der Orientierung des Proteins zur Oberfläche ab<sup>94</sup>. Auch die Ionenstärke der Proteinlösung ist von großer Bedeutung: Über die Reichweite eines elektrostatischen Potentials sagt die Debye-Länge etwas aus. Diese gibt wider, in welchem Abstand der Betrag des elektrostatischen Potentials auf  $1/e$  seines ursprünglichen Wertes abfällt. Die Debye-Länge ist umgekehrt proportional zur Wurzel aus der Ionenstärke<sup>96</sup>. Somit reicht bei geringer Salzkonzentration das Potential weiter in die Lösung hinein als bei hohen Ionenstärken.

### **Der hydrophobe Effekt**

Die Wassermoleküle können mit hydrophoben Oberflächen keine H-Brücken ausbilden. Deswegen bilden sie eine käfigartige Struktur aus, bei der ihre Umorientierung eingeschränkt ist. Im Fall von einer Proteinadsorption an hydrophoben Oberflächen werden diese Wassermoleküle freigesetzt. Dieser Vorgang ist mit einem Entropieanstieg verbunden, da die Wassermoleküle ihre Freiheitsgrade zurückgewinnen<sup>94</sup>.

## 2.2.1 Das Fibronektin an der Grenzfläche

### 2.2.1.1 Wechselwirkung von Aminosäuren mit Goldoberflächen

Aminosäuren sind natürliche Bausteine der Proteine. In einer Simulationsstudie wurden Wechselwirkungen zwischen einer (111) Goldoberfläche und einzelnen Aminosäuren durchgeführt. Hierbei wurde eine Rechnung für jede einzelne Aminosäure angefertigt, bei der die freien Energien ermittelt und ein Mechanismus für die Annäherung an die Oberfläche vorgeschlagen wurde. Die theoretischen Rechnungen wurden mit den verfügbaren experimentellen Daten verglichen. Man fand folgende Tendenz bei der Affinität zur Goldoberfläche heraus: aromatische < schwefelhaltige < positiv geladene < polare < aliphatische ~ negativ geladene Aminosäuren<sup>97</sup>.

Eine beobachtete Wechselbeziehung spricht mehr für einen hydrophilen Charakter der Goldoberfläche in den Simulationen, dies beweisen auch die Kontaktwinkelmessungen von Wasser am Gold<sup>98</sup> (vgl. Kap. 3.5.1).

### 2.2.1.2 Adsorption von Fn auf Grenzflächen

Das Adsorptionsverhalten von Modulen des Typ III<sub>7-10</sub> des Fn auf hydrophoben, hydrophilen, negativ geladenen und positiv geladenen Oberflächen wurde experimentell untersucht. Auf hydrophoben CH<sub>3</sub>-terminierten Oberflächen finden starke Strukturänderungen der Domänen statt. Im Gegensatz dazu blieb die Struktur des Proteins auf hydrophilen OH-terminierten Oberflächen am besten erhalten. Die freie Adsorptionsenergie hat folgende Tendenz: NH<sub>2</sub>>CH<sub>3</sub>>COOH>OH, sowie strukturelle Änderungen befolgen die Reihe: CH<sub>3</sub>>COOH=NH<sub>2</sub>>OH<sup>99</sup>. Eine ähnliche Tendenz wurde für die freie Adsorptionsenergie und strukturelle Änderungen von Modulen des Typ III<sub>7-10</sub> auf gleichen Oberflächen in einer Modellierungsstudie berechnet<sup>100</sup>.

Die FRET-Untersuchungen der Adsorption von humanem Fn auf hydrophoben bzw. hydrophilen Oberflächen unter physiologischen Bedingungen oder in denaturierenden Reagenzien ergaben Folgendes: Das Fn Dimer weist eine stärker aufgewickelte Konformation bei der Adsorption auf hydrophilem Glas als auf dem hydrophoben Fluorosilan. Die Aggregation des Dimers findet bei den Konzentrationen größer als 20 µg/ml für das Glas und größer als 2 µg/ml für das Fluorosilan statt<sup>101</sup>.

Zum gleichen Ergebnis kamen Wissenschaftler, die Elektronen- und Kraftmikroskopische Untersuchungen durchführten: Das Fn bevorzugt eine kompaktere Konformation auf

hydrophoben und eine lockerere auf hydrophilen Oberflächen. Hierbei zwingt eine negativ geladene hydrophile Oberfläche das Protein zu einem Aufwickeln der Fn-Dimer Arme, wohingegen eine hydrophobe Oberfläche eine Störung der Sekundärstruktur und somit eine kompaktere Gesamtform mit weniger Wasser am Molekül hervorruft<sup>102</sup>.

Zellexperimente ergeben, dass bessere Zelladhäsion auf den hydrophilen mit Fn benetzten Oberflächen stattfinden. Dies bedeutet, dass Oberflächen, die das Fn nicht so stark binden, die Flexibilität des Moleküls sowie das Präsentieren der Zellbindenden Domäne erlauben. Ebenfalls das Beibehalten der Sekundärstruktur sollte die Integrinbindung an das Molekül ehe optimieren.

An der Luft-Puffer Grenzfläche findet eine Anreicherung der Fn-Moleküle statt. Die Moleküle befinden sich in einer nicht gestreckten und nicht entfalteten Konformation, sondern behalten ihre kompakte Konformation bei<sup>52</sup>. Hemmersam *et al.* zeigte in ihrer QCM-D Studie mit einer zufälligen sequenziellen Adsorptionsmodellierung (engl. Random Sequential Adsorption (RSA)), dass das Fn auf einer Goldoberfläche eine mehr aufrechte und gestreckte Konformation einnimmt als auf Titan- oder Tantaloxidoberflächen<sup>11</sup>.

## 2.3 Nanostrukturen

### 2.3.1 Nanostrukturierung der Oberflächen

Die Chinesen wussten bereits vor mehr als tausend Jahren Gold-Nanopartikel als rote Farbe für ihr Porzellan einzusetzen<sup>103</sup>. Heutzutage spielt die Nanotechnologie eine wichtige Rolle in Bereichen wie z. B. der Elektronik, Biotechnologie, Chemie oder Medizin. Die Entwicklung neuer Materialien mit herausragenden Eigenschaften bietet Anwendungsmöglichkeiten, von denen wir als Verbraucher Nutzen erzielen: Spezielle schmutz- und wasserabweisende sowie kratzfeste Beschichtungen, Schutz vor UV-Strahlen und vieles mehr<sup>104</sup>. Die Erforschung der Nanostrukturen bietet daher für alle Bereiche neue Entwicklungschancen.

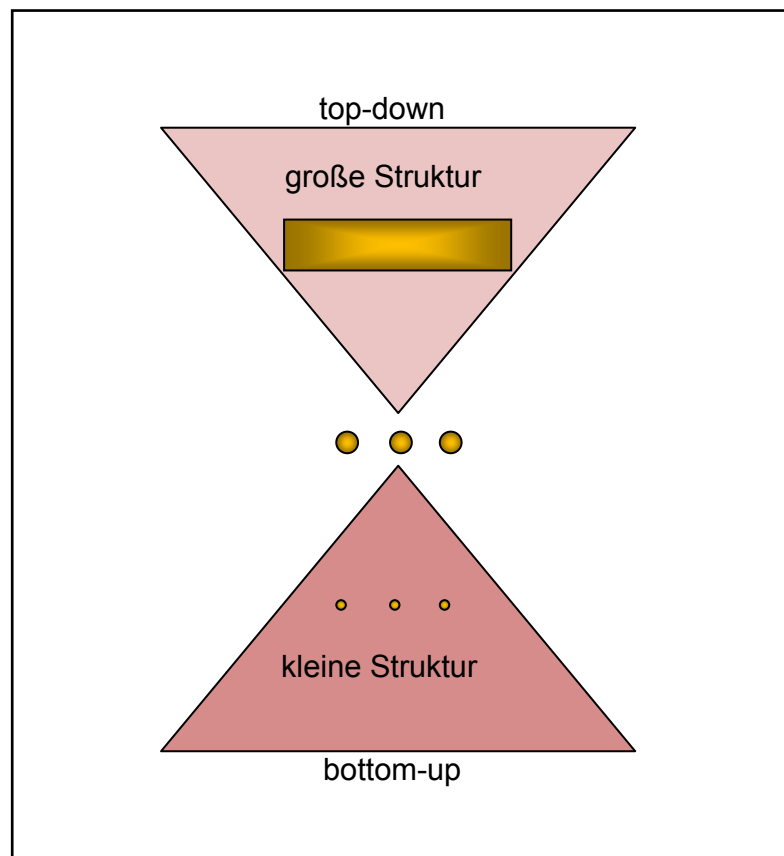


Abbildung 7: Schematische Darstellung beider Ansätze: top-down und bottom-up.

Allgemein gibt es zwei Ansätze für die Herstellung von Nanomaterialien und Nanostrukturen (vgl. Abbildung 7): Die Verfeinerung von-oben-nach-unten (engl. top-

down) und der Aufbau von-unten-nach-oben (engl. bottom-up). Bei einem top-down Ansatz werden kleinere Strukturen durch die Verfeinerung einer großen Struktur erzeugt. Dies geschieht z. B. durch einen lithographischen Prozess, bei dem auf die große Struktur eine Maske aufgelegt und das Material, welches von dieser nicht bedeckt ist, weggeätzt wird. Typische lithographische Verfahren des top-down Ansatzes sind Photo<sup>105</sup>-, Röntgenstrahl-<sup>106</sup> und Elektronenstrahlolithographie<sup>107</sup>. Dabei können Nanostrukturen mit Abständen zwischen den Objekten der Struktur bis zu 150 nm bei Photo- und 50 nm bei Elektronenstrahlolithographie erreicht werden<sup>108</sup>. Zusätzlich hierzu werden Techniken wie nasschemisches Ätzen<sup>109</sup> und reaktives Ionenätzen (engl.: RIE)<sup>110</sup> eingesetzt.

Im Gegensatz zum top-down Verfahren, werden bei einem bottom-up Ansatz Schritt für Schritt aus kleinen Strukturen größere Strukturen erzeugt. Dies geschieht oft durch eine spontane, durch die Reduktion der freien Gibbs Energie getriebene Selbstorganisation der Moleküle des Grundgerüsts. Somit sind auf diese Weise erzeugte Nanostrukturen und Materialien in einem Zustand nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht<sup>111</sup>. Nanolithographischen Verfahren wie z. B. die Blockcopolymerlithographie<sup>112</sup>, eine Selbstorganisation der Monoschichten<sup>113</sup> und Kolloidale Lithographie<sup>114</sup> sind typische Vertreter des bottom-up Ansatzes<sup>111</sup>.

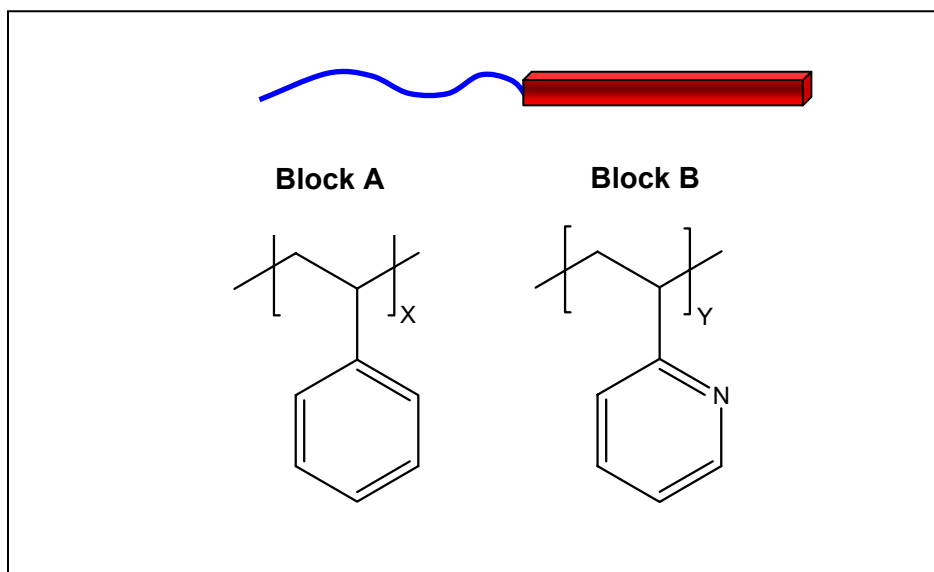
Jeder Ansatz hat seine Vor- und Nachteile. Das größte Problem beim top-down Ansatz ist unter anderem das Einführen innerer Spannungen in die Oberflächenstruktur, die durch signifikante Defekte der Kristallstruktur hervorgerufen werden<sup>115</sup>. Zusätzliche Defekte können während der anschließenden Ätzung hinzugefügt werden<sup>116</sup>. Beim bottom-up Ansatz ist das größte Problem das Fehlen der Präzision bei der Immobilisierung des Grundgerüsts<sup>117</sup>.

Heutzutage gibt es auch nichtkonventionelle Methoden wie die von Mirkin *et al.* entwickelte Dip-Pen Lithographie, die beide Ansätze vereint und Nanostrukturen mit bis zu 50 nm Abstand liefert<sup>118</sup>.

In unserer Arbeitsgruppe wird ein anderer Ansatz verfolgt, nämlich die Nanostrukturierung einer Oberfläche durch die Selbstorganisation von Diblockcopolymer-Mizellen (engl. block copolymer micelle lithography (BCML)). Hierbei werden Abstände zwischen den Objekten der Struktur bis zu 120 nm möglich<sup>119</sup>.

## 2.3.2 Diblockcopolymer-Mizellen-Nanolithographie

Diblockcopolymere sind aus zwei Einheiten, einer unpolaren und einer polaren, aufgebaut. Heutzutage sind viele Diblockcopolymere mit einer genau definierten Gewichtsverteilung erhältlich. In dieser Arbeit wird die Substratoberfläche mittels eines Diblockcopolymers Polystyrol-block-Poly(2/4-Vinylpyridin) (PS-b-P2/4PV) nanostrukturiert (vgl. Abbildung 8). Sein unpolarer Block A besteht aus  $x$  Styrolmonomeren, sein polarer Block B ist aus  $y$  2/4-Vinylpyridineinheiten aufgebaut [PS( $x$ )-b-P2/4PV( $y$ )]:



**Abbildung 8:** Eine schematische Darstellung eines Diblockcopolymeren: Block A besteht aus  $X$  Styrolmonomeren, Block B aus  $Y$  2-Vinylpyridineinheiten.

Solche Diblockcopolymere werden nach der Methode der sequenziellen anionischen Polymerisation bei tiefen Temperaturen hergestellt<sup>120</sup>.

### 2.3.2.1 Mizellenbildung

Die Diblockcopolymere sind nicht monodispers<sup>121</sup>. Ihre Verteilung ist sehr breit im Vergleich zu einem monodispersen Polymer. Die Mizellen sind aus Diblockcopolymeren aufgebaut, die unterschiedliche Monomerenanzahl besitzen und somit unterschiedliche Längen haben. In unpolaren Lösungsmitteln lagern sich Diblockcopolymere ähnlich wie Tenside zu inversen Mizellen zusammen: Der unpolare Teil zeigt nach außen und der

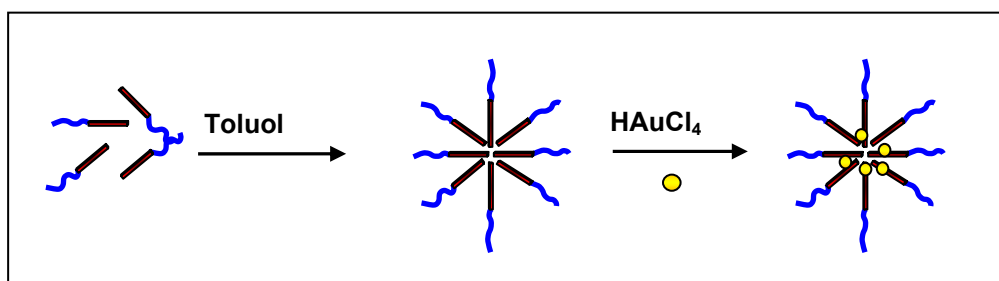


polare Teil nach innen, um energetisch ungünstige Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zu vermeiden (vgl. Abbildung 9)<sup>122</sup>.

Die Mizellenbildung in unpolaren Lösungsmitteln wird durch zwei Faktoren beeinflusst. Der erste Faktor ist die Abstoßung der Blöcke ungleicher Polarität. Dies führt zur Assoziation der Blöcke gleicher Polarität. Der zweite Faktor ist die sterische Einschränkung, wodurch das Zusammenwachsen von Mizellen begrenzt ist<sup>123</sup>.

Für das Entstehen der Mizellen ist es notwendig, dass die sogenannte kritische Mizellenkonzentration (engl. Critical Micellar Concentration, (CMC)) erreicht wird. Ist die Konzentration kleiner als die CMC, liegen die Diblockcopolymer-Ketten einzeln in einer Lösung vor. Beim Erreichen der kritischen Konzentration, beginnen die einzelnen Diblockcopolymer-Ketten Mizellen zu bilden. In diesem Zustand stehen die in einer Mizelle eingebauten Polymerketten mit den freien Ketten in der Lösung im dynamischen Gleichgewicht<sup>124</sup>.

Der Durchmesser der Mizellen kann durch das Molekulargewicht des Diblockcopolymers, durch Wechselwirkungen von Polymerblöcken untereinander und durch Wechselwirkungen von Polymerblöcken mit dem Lösungsmittel kontrolliert werden.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Entstehung und Beladung des polaren Kerns einer Mizelle mit dem Hydrogen Tetrachloroaurat(III) in Toluol.

Das Stickstoff-Atom der 2-Vinylpyridin-Einheit des Kerns einer Mizelle enthält ein freies Elektronenpaar. Es ist im Stande, mit Substanzen wie  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  oder  $\text{ZnCl}_2$  eine Lewis-Säure-Base-Reaktion einzugehen (vgl. Abbildung 10)<sup>125</sup>. Diese wird als Beladung des Mizellenkerns bezeichnet:

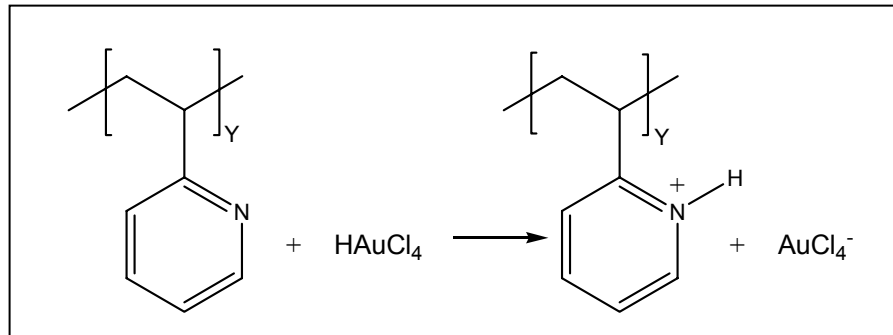


Abbildung 10: Protonierung des N-Atoms der 2-VP-Einheit.

Bei dieser Reaktion wird das schwach basische N-Atom des Vinylpyridins protoniert. Als Gegenion lagert sich das Tetrachloroauration  $\text{AuCl}_4^-$  im Kern ein. Bei diesem Prozess werden Mizellen verstärkt gebildet, da die Wechselwirkung des unpolaren Lösungsmittels mit dem beladenen polaren Kern energetisch sehr ungünstig wird.

Wenn jede zweite 2/4-Vinylpyridineinheit des Diblockcopolymers mit einem Molekül des Hydrogen Tetrachloroaurates(III) statistisch beladen wird, bedeutet dies, dass der Beladungsgrad  $L$  den Wert 0,5 hat (vgl. Gleichung (2)).

$$L = \frac{n(\text{Me})}{n(\text{P2VP})} \quad (2)$$

Dabei ist  $n(\text{Me})$  die Konzentration des Metallsalzes und  $n(\text{P2VP})$  die Konzentration des Blockcopolymers ist.

Die Polymerlösungen werden ständig gerührt. Dadurch wird gewährleistet, dass die Salzverteilung in der Lösung homogen bleibt und alle Mizellen beladen werden können.

Die Größe des beladenen Kernes der Mizelle und somit die Größe der später entstehenden Gold-Nanopartikel hängt vom Beladungsgrad ab. Auf diese Weise werden Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von drei bis acht Nanometer erreicht. Durch Parameter wie das Molekulargewicht des Diblockcopolymers, die Konzentration der Polymerlösung sowie die Geschwindigkeit, mit der Substrate in die Polymerlösung getaucht werden, ist eine Kontrolle der Abstände zwischen Nanopartikeln gegeben. Hiermit ist es eine große Vielfalt an Nanostrukturen möglich, die sich in der Größe der Nanopartikel sowie in ihrem Abstand untereinander unterscheiden<sup>126</sup>.

Sind Gold-Nanopartikel in der Größenordnung zwischen 30 bis 40 nm erwünscht, so können diese nach der Methode der stromlosen Abscheidung von Goldionen (engl.

elektroless diposition) auf den bereits vorhandenen Gold-Nanopartikeln und durch anschließende Reduktion erzeugt werden<sup>127</sup>.

### 2.3.2.2 Nanostrukturierung der Substratoberfläche

Nachdem eine geeignete Goldlösung hergestellt ist, sollte die Oberfläche des Glassubstrates damit benetzt werden. Dies geschieht mit Hilfe einer „Dippvorrichtung“.

Bei einem Dipprozess werden die gereinigten Substrate mit einer Geschwindigkeit von 12 mm/min in die Goldlösung getaucht und wieder herausgezogen. Durch die Wirkung der Kapillarkraft, der van-der-Waals Kraft und durch sterische Abstoßung der Mizellen beim Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich eine hexagonal angeordnete selbstorganisierte mizellare Monoschicht aus (vgl. Abbildung 11).

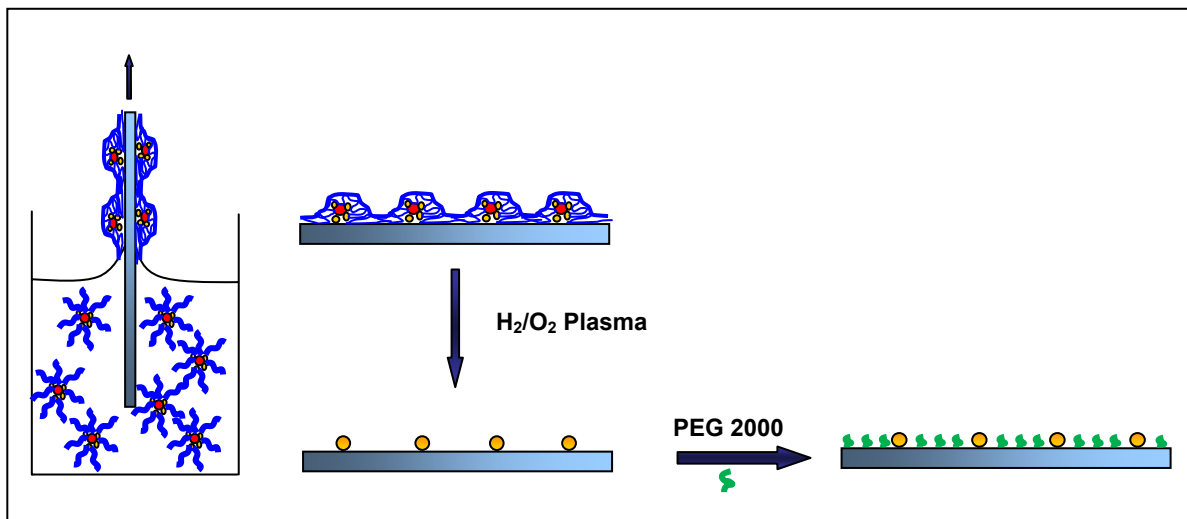


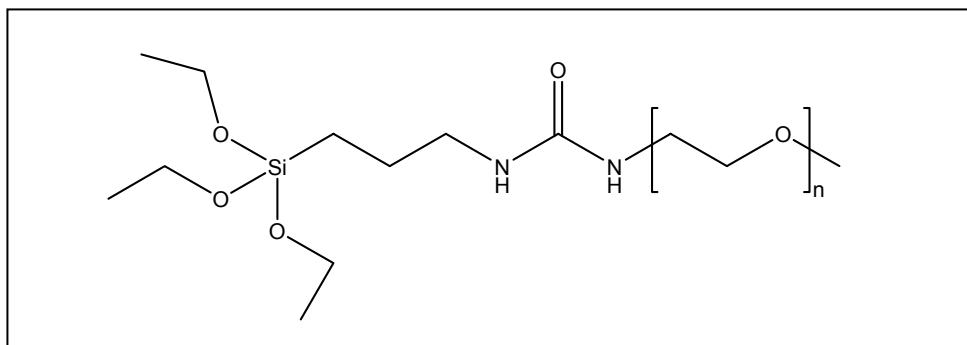
Abbildung 11: Benetzung der Substratoberfläche mit Hilfe eines Dipp-Vorganges mit anschließenden Plasmabehandlung und Passivierung mit PEG 2000.

Nachdem die Substratoberfläche mit Mizellen benetzt ist, folgt der nächste Schritt, die Reduktion der Goldionen zum elementaren Gold. Der Reduktionsprozess kann mittels Wasserstoffplasma durchgeführt werden. Beim Ätzen im Plasma werden sowohl die Goldionen im Kern der Mizellen zu elementarem Gold reduziert, als auch der Polymermantel um den Kern „abgebrannt“. Die Lage der Gold-Nanopartikel wird bei diesem Vorgang nicht verändert. Gleichzeitig wird die Glasoberfläche des Substrates aktiviert. Eine solche hydroxyterminierte, hydrophile Oberfläche ist für den weiteren Schritt – die Passivierung – unbedingt erforderlich.

Die Passivierung ist sehr wichtig für das Durchführen der in dieser Arbeit vorgesehenen Experimente. Das Ziel der Passivierung ist es, die Substratoberfläche zwischen den Gold-Nanopartikeln mit einer proteinabweisenden Substanz zu beschichten und somit die unspezifischen Wechselwirkungen zur Substratoberfläche zu minimieren.

Es ist bekannt, dass geordnete Polyethylenglykol(PEG)-Monoschichten einer unspezifischen Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche entgegenwirken<sup>128</sup>. Die Resistenz der PEG-Filme ist auf die helikale Struktur der Polyethylenglykol-Einheiten zurückzuführen<sup>129</sup>. Die Umwandlung von endständigen Hydroxygruppen zu Methoxygruppen beeinflusst die Resistenz dieser Schicht nicht oder nur unmerklich<sup>130</sup>. Die Proteinresistenz wird durch die sterische Abstoßungstheorie gut beschrieben<sup>131</sup>.

In dieser Arbeit wird das Polyethylenglykol mit molekularem Gewicht 2000 g/mol (PEG 2000, etwa 45 Monomereinheiten) eingesetzt. Die Polyethylenglykol-Kette ist an ein 3-Aminopropyl-triethoxysilan über eine Amid-Bindung angekoppelt (vgl. Abbildung 12). Dieses Reagenz wird in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert.



**Abbildung 12: N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-harnstoff als Passivierungsreagenz.**

Der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf der mit PEG 2000 passivierten Oberfläche beträgt etwa 33°, einer mit Carosche Säure behandelten Siliziumoberfläche etwa 53° (vgl. Kap. 3.5.1). Die Schichtdicke der PEG-Schicht wurde mit Hilfe von XPS im Ultrahochvakuum gemessen. Sie beträgt für PEG 2000 ca. 22 Å<sup>132</sup>.

Das PEG 2000 ist folglich für in dieser Arbeit untersuchte System gut geeignet, da die mindestens 50 Å großen Gold-Nanopartikel von der PEG-Schicht nicht bedeckt werden, auch wenn die PEG-Schicht in einem wässrigen Medium um etwa die Hälfte anschwellen sollte (vgl. Kap. 3.4.1.2).

Der Passivierungsschritt geschieht unmittelbar nach der Behandlung der nanostrukturierten Substrate im Wasserstoffplasma. Nach der Plasmabehandlung ist die Glasoberfläche aktiviert (hydroxyterminiert). An eine solche Oberfläche lässt sich das in dieser Arbeit verwendete Passivierungsreagenz, der N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-harnstoff, über die  $-\text{Si}(\text{OEt})_3$  Gruppen anbinden. Da die verwendeten PEG-Moleküle über einen großen Gyrationradius (der Radius des Kneuls) verfügen, können sie keine geordnete zweidimensionale Polysiloxanschicht ausbilden, wie kurzkettige PEG-Moleküle<sup>133</sup>.

Die Passivierung wird in Toluol bei 80°C, unter Einsatz von Triethylamin als Katalysator und einer kleinen Menge von Wasser als Vernetzungsmittel zwischen PEG-Molekülen durchgeführt. Die Zugabe des Katalysators ist für die zusätzliche Aktivierung und Polarisierung der Oberflächen-Hydroxygruppe notwendig<sup>134</sup>.

Mittels dieser Verfahren werden mit einem geringen präparativen Aufwand die nanostrukturierten und passivierten Oberflächen hergestellt.

## 2.4 Biofunktionalisierung der Nanostruktur

Nachdem die Substratoberfläche Gold-Nanopartikel und eine Passivierungsschicht aufweist, folgt die Biofunktionalisierung der Nanostruktur mit Fn Dimeren oder Fn Monomeren. Dabei ist Folgendes zu beachten:

- Es soll sichergestellt werden, dass die Gold-Nanopartikel von der Passivierungsschicht nicht verdeckt sind.
- Die Gold-Nanopartikel sollen genug Platz zum Anbinden des Proteins bieten. Gleichzeitig soll gewährleistet werden, dass es nicht zu viel Platz für denaturierende Wechselwirkungen des Proteins mit dem Gold zur Verfügung steht.

Der Durchmesser eines Gold-Nanopartikels liegt bei etwa 7 nm (vgl. 3.3.2.3). Der durchschnittliche Trägheitsradius von Fn Dimer liegt bei 9 nm<sup>45</sup>. Hemmersam *et al.* berechnete den optischen Äquivalent für den „Fingerabdruck“ von Fn auf einer Goldoberfläche. Dieser beträgt etwa 45 nm<sup>2</sup>, also etwa 7 nm im Durchmesser<sup>11</sup>. Einige wichtige Module für die Fibrillenbildung und die zellbindende Domäne von Fn bestehen aus Modulen des Typ III, diese weisen keine intermolekularen Disulfidbrücken auf, die bei der Wechselwirkung mit Gold zerstört werden können. Außerdem befinden sich in den Modulen des Typ III<sub>7/15</sub> freie Thiolgruppen<sup>20</sup>, die unter Umständen mit Gold eine kovalente Bindung eingehen können. Die N-terminale Region, die aus Modulen des Typ I und II besteht und die für die Fibrillogenese eine wichtige Rolle spielt<sup>8</sup>, enthält intramolekulare Disulfidbrücken, die bei der Wechselwirkung mit Gold reorganisiert werden können. Deswegen ist es von großem Interesse, dass das Molekül genug, aber nicht zu viel Platz am Gold-Nanopartikel hat, so dass intakte Domänen zur Fibrillenbildung zur Verfügung stehen. Hiermit ist ein auf diese Art und Weise direkt an das Gold-Nanopartikel gebundenes Molekül immer noch für Zellexperimente geeignet. Möchte man unbedingt eine intakte N-terminale Region beibehalten, so sollte das Molekül indirekt über andere Moleküle wie z. B. Antikörper oder kleine Linker gebunden werden. Bei einer indirekten Anbindungsstrategie ist zu beachten, dass durch die Länge des Linkers (oder Antikörpers) der Einsatz von Nanostrukturen ab einem bestimmten Abstand der Nanopartikel zueinander limitiert ist. Dies ist der Fall, wenn die Gesamtlänge des Antikörpers mit dem angebondenen Fn Dimer größer als der Abstand zwischen den Nanopartikeln ist.

## 2.4.1 Methoden zur Anbindung von Fn an Gold-Nanostrukturen

Um das Ziel dieser Arbeit zu realisieren, werden verschiedene Anbindungsmethoden an nanostrukturierte und passivierte Oberflächen für das Fibronectin (Fn) Dimer bzw. Monomer hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht. Da für die Fragestellung das Fn Dimer bzw. Monomer unmodifiziert sein soll, bieten sich folgende Strategien für eine Bindung an die Gold-Nanopartikel an:

### 1) *Die direkte Anbindung:*

Dabei werden Fn Dimere durch Wechselwirkungen mit Gold an einer zufälligen Stelle an die Gold-Nanopartikel gebunden (statistische Orientierung, vgl. Abbildung 13a)).

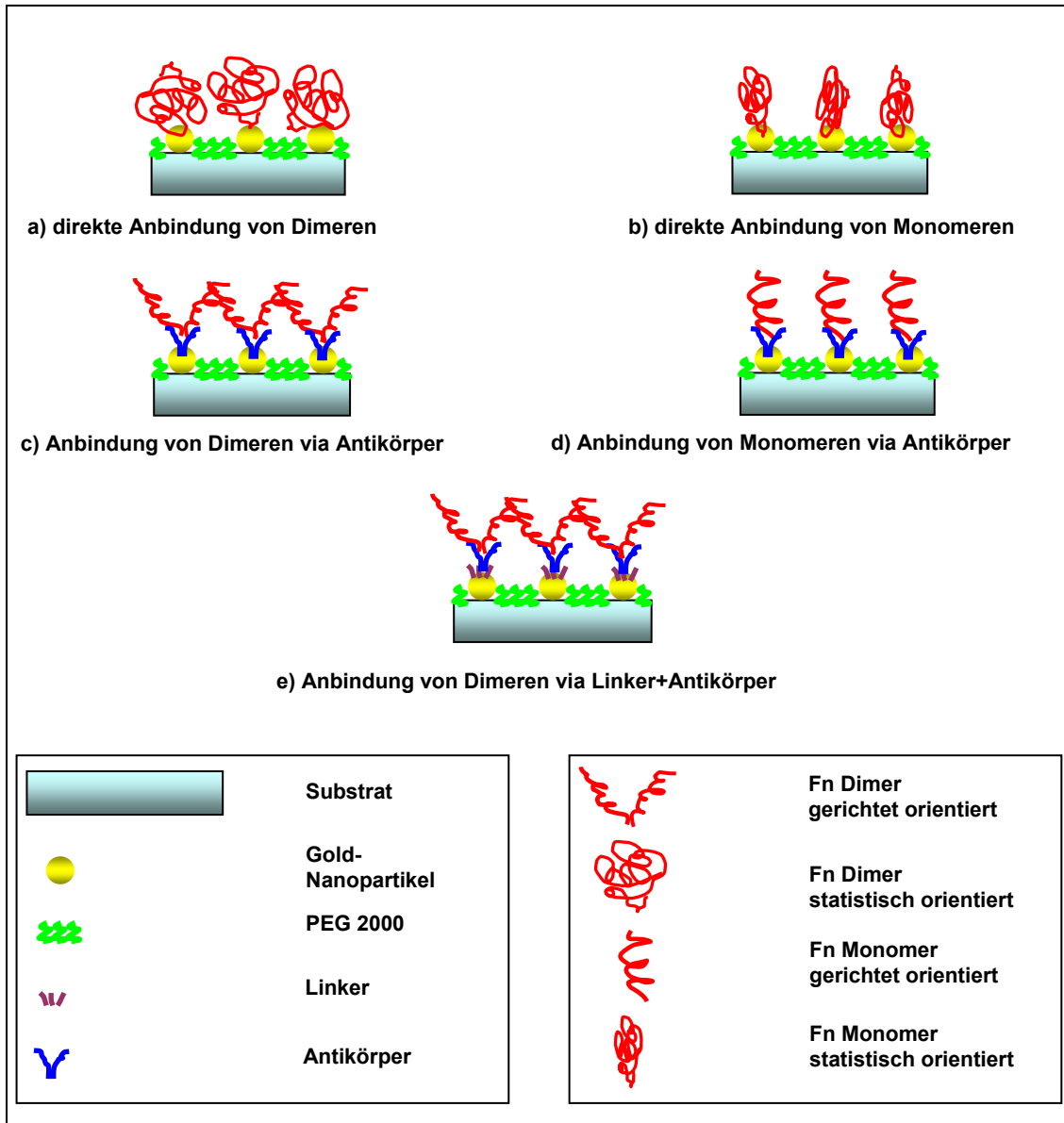
Durch die Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken des Fn Dimers entstehen zwei Monomere mit jeweils zwei freien Thiolgruppen. Die Monomereinheiten könnten beispielsweise über diese an die Gold-Nanopartikel direkt gebunden werden (vgl. Abbildung 13b)).

### 2) *Die indirekte Anbindung über einen Antikörper (Antifibronectin (AFn)):*

Bei dieser Methode werden Fn Dimere oder Monomere über einen Antikörper, der eine spezifische Domäne am C-Terminus des Fn's erkennt, gebunden (gerichtete Orientierung). Der Antikörper wird mittels Wechselwirkungen mit Gold statistisch orientiert an die Nanostruktur gebunden (vgl. Abbildung 13c) und d)).

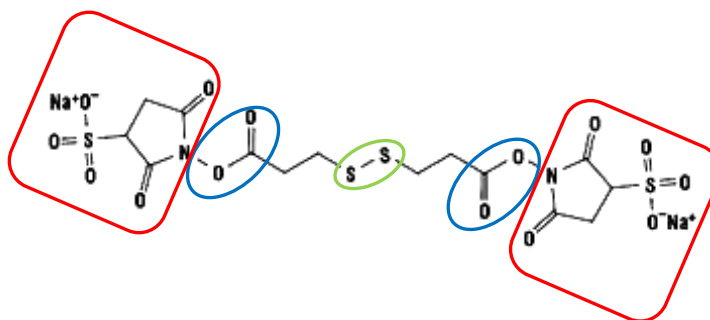
### 3) *Die indirekte Anbindung von Fn Dimeren über ein kleines Molekül (Linker) und AFn:*

Hierbei wird das Fn Dimer ebenfalls über den Antikörper an die Nanostruktur gebunden. Allerdings ist in diesem Fall der Antikörper über eine Amidbindung mit einem Linker verknüpft, der an das Gold-Nanopartikel gekoppelt ist. Durch diese Strategie soll eine effizientere Anbindung von AFn an die Nanostruktur im Vergleich zu der im Punkt 2) oben aufgeführten Anbindungsmöglichkeit erzielt werden. Mittels dieser Vorgehensweise wird das AFn Molekül chemisch statistisch orientiert und das Fn Dimer über den Antikörper am C-Terminus gerichtet orientiert an die Nanostruktur gebunden (Abbildung 13e)). Als Linker wird ein kleines Molekül 3,3-Dithio-*bis*-(sulfosuccinimidyl)propionat (Sulfo-DSP,  $M = 608$  g/mol, 12 Å Linker-Länge) benutzt (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 13: Anbindungsmöglichkeiten für Fn Dimere bzw. Monomere.** Für Fn Dimere werden drei Möglichkeiten untersucht: a) eine direkte Anbindung mit einer statistischen Orientierung des Fn- Moleküls; c) die Anbindung über ein Antifibronektin-Molekül mit einer gerichteten Orientierung des Fn-Moleküls; e) die Anbindung über einen kleinen Linker, an den im ersten Schritt das Antifibronektin-Molekül gebunden wird. Im zweiten Schritt wird das Fn-Molekül an das Antifibronektin-Molekül gebunden. Für das Fn Monomer werden die Anbindungsmöglichkeiten b) und d) untersucht.





**Abbildung 14: Chemische Struktur des Sulfo-DSP (3,3-Dithio-bis(sulfosuccinimidyl)-propionat)-Linkers.** Dieser Linker wird zur Anbindung der Antifibronektin-Antikörper an die Gold-Nanopartikel benutzt. Dabei bindet sich das Molekül unter Reduktion der Sulfidbindung (grün eingekreist) an die Oberfläche der Gold-Nanopartikel. Die Carbonylgruppe (blau eingekreist) bildet unter Abgang des Sulfosuccinimidylpropionats (rot eingekreist) eine Amidbindung mit einer NH<sub>2</sub>-Gruppe haltigen Aminosäure (z. B. Lysin) des Antifibronektins.



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 QCM-D

Die Zelladhäsion an die RGD-Sequenz in Fibronectin (Fn) ist komplexer als die Adhäsion an die oberflächengebundene, „nackte“ RGD-Sequenz. Beispielsweise ist für eine starke Affinitätsbindung von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an die RGD-Sequenz von Fn zusätzlich die PHSRN-Sequenz notwendig, die in der Nachbarschaftsregion lokalisiert ist<sup>17</sup>. Dies ist einer der Gründe, weswegen Adhäsionsprozesse am ganzen, unmodifizierten, dimeren Molekül von großem Interesse sind.

Wie in Kap. 2.1.4 beschrieben, bildet Fn unter Einwirkung von Zellen bzw. mit Hilfe anderer zellfreier Mechanismen Fibrillen<sup>135</sup>. 1991 zeigte Schwarzbauer, dass für die Fibrillenbildung *in vitro* zwei Merkmale essentiell sind: Die Module Typ I<sub>1-5</sub>, die an dem Aminoterminus lokalisiert sind und für eine Fn-Fn Wechselwirkung zuständig sind, und eine dimere Struktur, die durch zwei Disulfidbrücken am C-Terminus beide Monomere zusammenhält. Das Ergebnis der Studie zeigte deutlich, dass die Monomere alleine keine Matrix bilden können. Die Monomere können jedoch in die bereits vorhandene, von Fibroblasten *in vitro* gebildete Matrix eingebaut werden<sup>8</sup>. Also müssen zwei Monomereinheiten in einer geordneten Position und in einem bestimmten Abstand zueinander stehen, um Fibrillen auszubilden. Daher ist es eine sehr interessante Aufgabe, das unmodifizierte Fibronectin-Monomer an die Goldnanostruktur zu binden, um eine geordnete Ausrichtung von Monomeren erreichen zu können. Die Abstände zwischen den einzelnen Gold-Nanopartikeln können variiert werden.

Nun muss eine Technik gefunden werden, mit der es möglich ist, das Adsorptionsverhalten von den Fn Dimeren bzw. Monomeren auf Oberflächen zu untersuchen. Solch eine Technik ist z. B. die Schwingquarzmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (engl. quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D)). Mit Hilfe dieser elektromechanischen Methode ist es möglich, Informationen über die zeitlichen Änderungen der adsorbierten Masse pro Flächeneinheit des Quarzsensors sowie der viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Filme zu bekommen. Dadurch können Unterschiede zwischen ähnlichen Bindungsereignissen oder Konformationsänderungen in gebundenen Filmen detektiert werden. Dies führt zu einem besseren Verständnis molekularer Wechselwirkungen und Adsorptionen.

Eine akustische Methode wie QCM-D gestattet die Bestimmung der Masse des adsorbierten Films mit dem darin eingeschlossenen Wasser und der viskoelastischen Eigenschaften dieses Films. Eine optische Methode wie Reflektometrie erlaubt eine genaue Bestimmung der molekularen Masse des adsorbierten Films. Werden beide Techniken miteinander kombiniert, erhält man auf diese Weise wertvolle Informationen über die Hydratation bzw. den Wassergehalt des Films. In dieser Arbeit wird Reflektometrie in Kombination mit QCM-D als Hilfsmethode zu den durchgeführten QCM-D Experimenten eingeführt, um den Wassergehalt in den adsorbierten Filmen von Fn Dimeren und Monomeren zu bestimmen.

Um Ziele dieser Arbeit zu erreichen, werden direkte und indirekte Anbindungsmöglichkeiten für Fn Dimere bzw. Monomere auf nanostrukturierten und passivierten QCM-D Kristallen untersucht. Bevor man aber mit der Nanostruktur arbeitet, werden zuerst die einfachen Schritte auf homogenen Oberflächen unternommen.

Hier soll vermerkt werden, dass die ersten Versuche mit dem humanen und Rinder Fn Dimer von der Firma SIGMA Aldrich durchgeführt werden. Zu einem späteren Zeitpunkt wird das Fn Dimer aus humanem Blutserum in unserem Labor aufgereinigt (vgl. Kap. 5.2.1). Daher werden beide Fibronektine bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens auf homogenen Oberflächen zusätzlich untersucht.

Folgende Einzelexperimente werden durchgeführt:

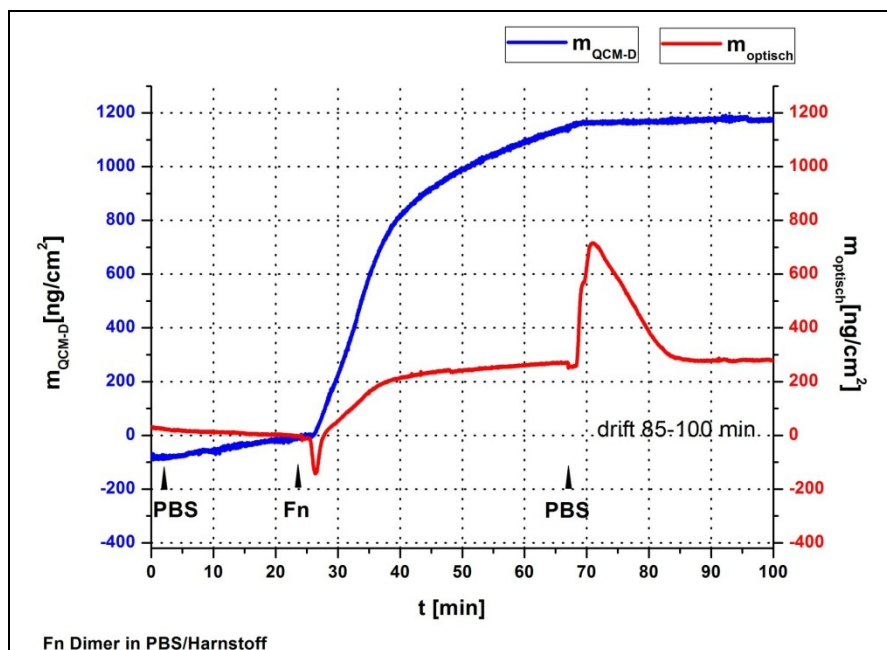
- 1) Anbindung von Fn Dimeren in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen.
- 2) Anbindung von Fn Monomeren auf homogenen Gold- und Siliziumdioxidoberflächen.
- 3) Anbindung von unterschiedlichen Fibronektinen auf homogenen Goldoberflächen: Das Fn Monomer, das kommerziell erhältliche Fn Dimer bzw. das in unserem Labor aufgereinigte Fn Dimer.
- 4) Anbindung von allen Fn an den Antikörper auf homogenen Gold Oberflächen.

Eine wichtige zusätzliche Information ist das eingeschlossene Wasser im adsorbierten Proteinfilm. Dazu werden die bei der Kombination der Reflektometrie und QCM-D Techniken erhaltenen Daten verwendet. Die Experimente sind nur auf homogenen Oberflächen möglich. Deswegen werden diese Daten für eine Erwartungsrechnung eingesetzt (vgl. Kap. 5.3.1.2).

### 3.1.1 Kombination von QCM-D und Reflektometrie

#### 3.1.1.1 Adsorption des Fn Dimers auf homogenem Gold in PBS/Harnstoff

In diesem Experiment wird die Adsorption vom Fn, welches in unserem Labor aufgereinigt wurde, in PBS/Harnstoff Puffer untersucht. Unter diesen Bedingungen werden beim Protein teilweise Wasserstoff-Brücken gebrochen, so dass das Fn Molekül denaturiert vorliegt.



**Abbildung 15:** Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) für das Fn Dimer in PBS/Harnstoff auf homogenem Gold. Die QCM-D Masse ist um den Faktor vier größer als die Trockenmasse, da das denaturierte Fn viel Wasser enthält.

In Abbildung 15 sieht man bei der Injektion vom Fn ein Minimum und beim Übergang zum Waschvorgang mit PBS ein Maximum in der Kurve, die die optische Masse (rot) abbildet. Das Fn liegt hier in dem PBS/Harnstoff Puffer vor. Somit ist die Pufferzusammensetzung unterschiedlich. Deswegen sind diese Extrema auf einen Puffereffekt zurückzuführen. Das Verhältnis der  $m_{\text{QCM-D}}$  zu  $m_{\text{optisch}}$  beträgt  $4,20 \pm 0,02$  (vgl. Tabelle 1). Da das Molekül teilweise denaturiert vorliegt und keine kompakte Konformation mehr hat, koordiniert es mehr Wassermoleküle als unter physiologischen Bedingungen.

Tabelle 1: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren in PBS/Harnstoff.

$\Delta m_{QCM-D}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m_{optisch}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\frac{\Delta m_{QCM-D}}{\Delta m_{optisch}}$
1178,9±4,1	280,5±3,3	4,20±0,02

### 3.1.1.2 Adsorption des Fn Dimers auf homogenem Gold in PBS

In diesem Versuch wird die Adsorption des Fn Dimers in PBS (unter physiologischen Bedingungen) untersucht (vgl. Abbildung 16).

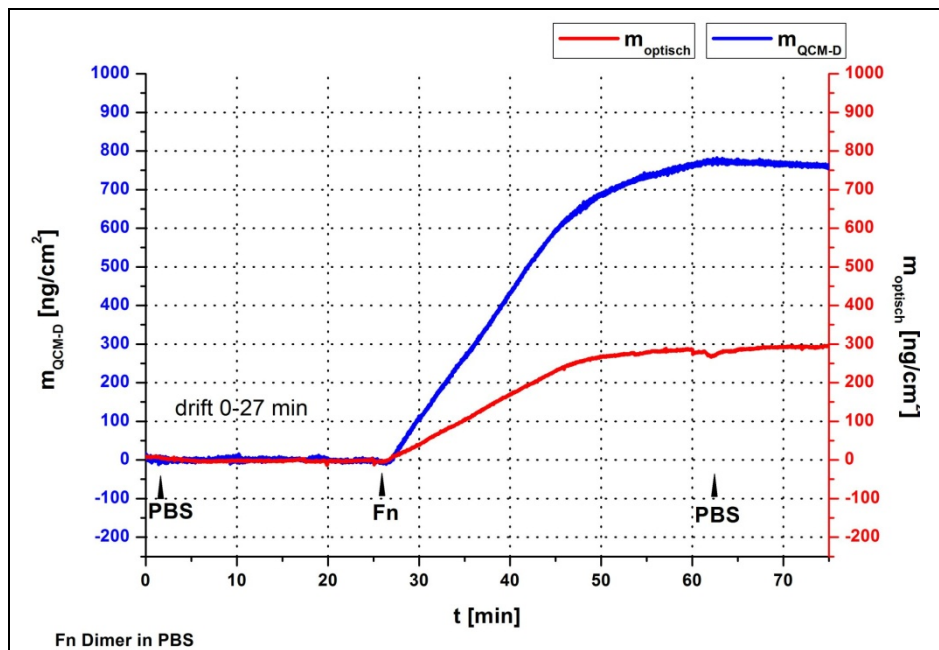


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) für das Fn Dimer in PBS auf homogenem Gold. Die QCM-D-Masse ist um den Faktor 2,6 größer als die Trockenmasse. Das Fn Molekül enthält unter physiologischen Bedingungen weniger Wasser als in dem denaturierten Zustand.

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Molekül in der Lösung in einer kompakten Konformation vor. Dies spiegelt sich im Verhältnis der akustischen Masse zur optischen Masse (2,6) wieder. Hier wird auch kein Puffereffekt wie im Falle vom denaturierten Fn Dimer beobachtet. Die zusammengefassten Daten sind in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren in PBS.

$\Delta m_{QCM-D}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m_{optisch}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\frac{\Delta m_{QCM-D}}{\Delta m_{optisch}}$
771,7±10,1	302,0±2,5	2,6±0,02

### 3.1.1.3 Adsorption des Fn Monomers auf homogenem Gold in PBS/EDTA

In diesem Versuch wird die Adsorption des Fn Monomers untersucht. Das Molekül liegt im PBS/EDTA Puffer vor. Die Monomereinheiten bleiben so über den gesamten Zeitraum des Experiments stabil (s. Kap. 5.2.2).

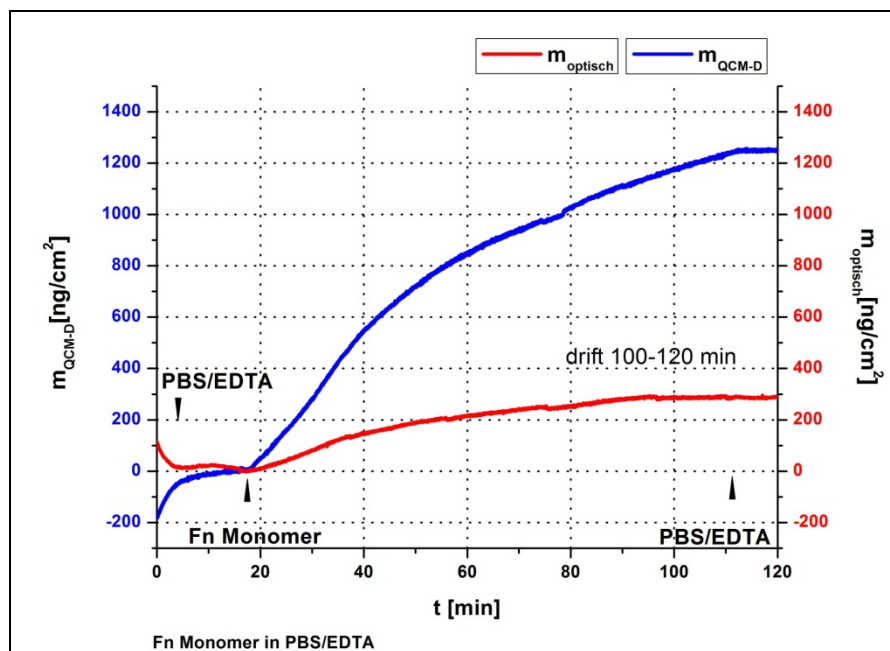


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) von Fn Monomeren in PBS/EDTA auf homogenem Gold. Die QCM-D Masse ist um den Faktor 4,3 größer als die Trockenmasse. Das Ergebnis ist ähnlich wie im Fall des denaturierten Fn's.

Die blaue und die rote Kurve, die jeweils akustische und optische Masse repräsentieren, haben nach der Injektion des Proteins keine Extrema, die auf einen Puffereffekt

hindeuten (vgl. Abbildung 17). Das Verhältnis von der akustischen Masse zur optischen Masse beträgt 4,32 (vgl. Tabelle 3) und ist ähnlich wie bei dem denaturierten Fn Dimer. Dies deutet darauf hin, dass das Monomer über keine kompakte Konformation verfügt und dadurch mehr Lösungsmittel-Moleküle koordiniert.

**Tabelle 3: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Monomeren in PBS/EDTA.**

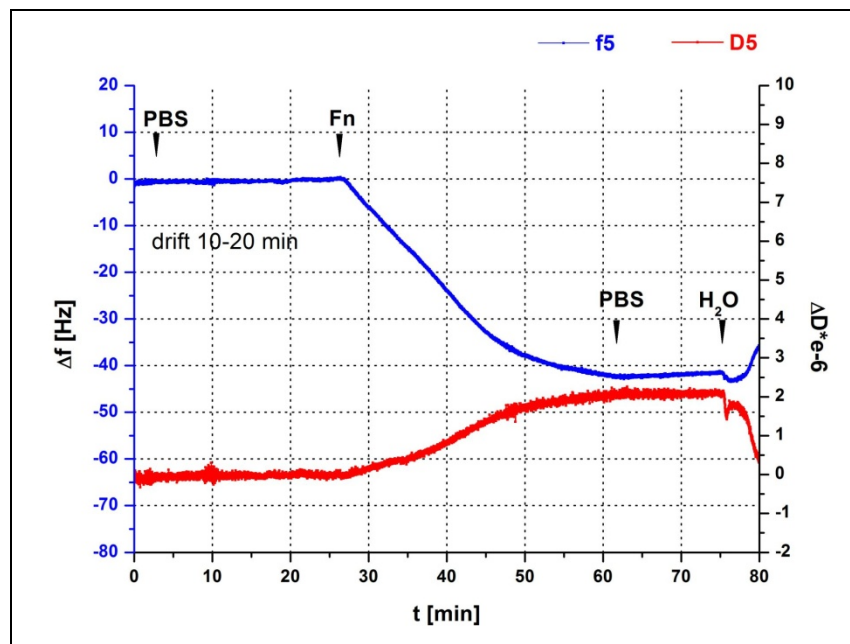
$\Delta m_{QCM-D}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta m_{optisch}$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\frac{\Delta m_{QCM-D}}{\Delta m_{optisch}}$
1246,9±24,7	288,4±2,1	4,32±0,03



### 3.1.2 QCM-D Experimente

#### 3.1.2.1 Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS

Als erstes wird hier das Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren in PBS unter physiologischen Bedingungen auf homogenem Gold untersucht. Anfangs wird das System mit PBS für etwa 25 min gespült. Danach wird das Fn injiziert. Anschließend wird nach etwa 30 min mit PBS gespült und zum Wasser übergegangen (vgl. Abbildung 18):



**Abbildung 18:** Adsorptionen von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS. Dargestellt sind die Frequenz ( $\Delta f$ )- und Dissipationsänderung ( $\Delta D$ ) von dem fünften Oberton. Der Adsorptionsvorgang dauert etwa 30 min.

In Abbildung 18 wird die Frequenz- und Dissipationsänderung bei der Adsorption des Fn Dimers in PBS dargestellt. In der Tabelle 4 werden die ausgewerteten Daten zusammengefasst.

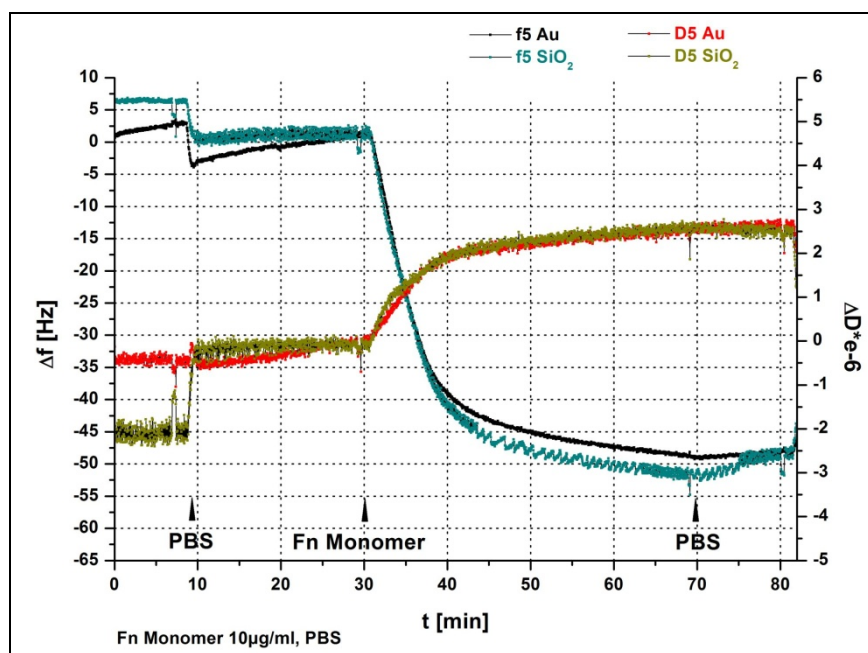
**Tabelle 4:** Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS.

Protein	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [10 <sup>-6</sup> ]	$\Delta D/\Delta f$ [10 <sup>-8</sup> s]
Fn Dimer in PBS	41,9±0,3	741±5,1	2,09±0,077	5,0±0,2

Innerhalb von etwa 30 min findet eine irreversible Adsorption des Fn Dimers in PBS statt. Darauf deutet die fehlende Änderung der Frequenz und Dissipation nach dem Waschvorgang mit PBS hin. Die Frequenzänderung beträgt  $41,9 \pm 0,3$  Hz, die entsprechende adsorbierte Masse  $741 \pm 5,1$  ng/cm<sup>2</sup>. Die Dissipationsänderung liegt bei etwa  $2 \times 10^{-6}$  Einheiten.

### 3.1.2.2 Adsorptionsverhalten von Fn Monomeren auf unterschiedlichen homogenen Oberflächen in PBS

In diesem Versuch wird untersucht, wie das Fn Monomer (SIGMA) an das homogene Gold und homogene Siliziumdioxid bindet, wobei PBS als Arbeitspuffer verwendet wird. Nach der Stabilisierung des Systems im PBS Puffer wird das Fn Monomer injiziert. Nach einer Inkubationszeit von etwa 40 min wird der Waschvorgang mit PBS eingeleitet (Abbildung 19):



**Abbildung 19: Adsorption von Fn Monomeren an unterschiedlichen homogenen Oberflächen.** Dargestellt sind die Frequenz- ( $\Delta f$ ) und Dissipationsänderung ( $\Delta D$ ) vom fünften Oberton: Am Gold ( $f_5$ ,  $D_5$ ) und Siliziumdioxid ( $f_5$ ,  $D_5$ ). Das Adsorptionsverhalten von Monomeren auf diesen Oberflächen ist sehr ähnlich.

Wie in der Abbildung 19 dargestellt, ist das Adsorptionsverhalten von Monomeren an den beiden untersuchten Oberflächen sehr ähnlich. Die Änderungen der Frequenz und der adsorbierten Masse auf den Oberflächen liegen innerhalb der Fehlergrenze und

betragen etwa -50 Hz bzw. 902 ng/cm<sup>2</sup> (vgl. Tabelle 5). Auch der Verlauf der Dissipationsänderung ist auf der Gold- und Siliziumdioxidoberfläche vergleichbar.

Die Adsorption des Proteins findet innerhalb von 40 min statt. Im Vergleich zu dem Dimer ist die adsorbierte Masse höher (vgl. Kap. 3.1.2.1). Die Dissipation unterscheidet sich nur um etwa  $0,5 \times 10^{-6}$  Einheiten. Dies bedeutet, dass die adsorbierten Filme von Dimeren und Monomeren eine ähnliche Steifigkeit besitzen.

**Tabelle 5: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Monomeren auf unterschiedlichen Oberflächen.**

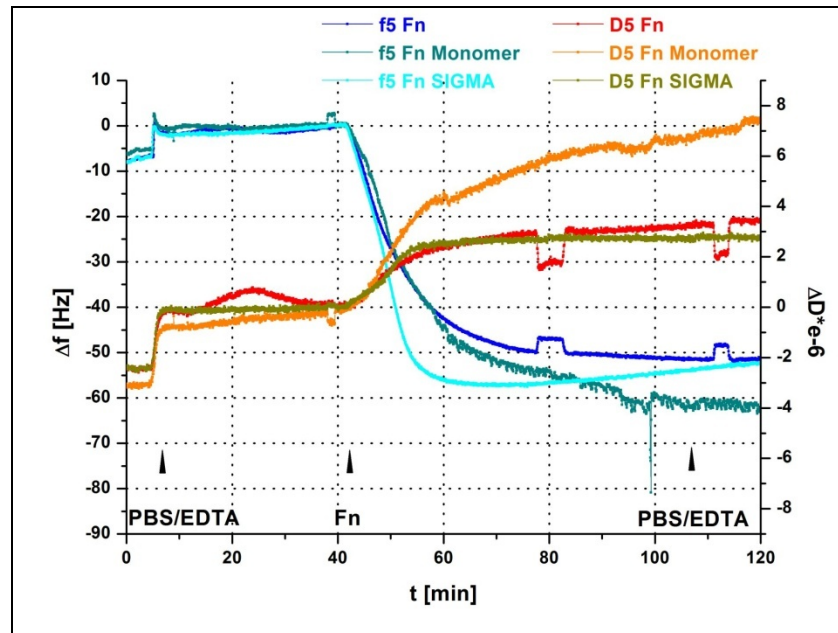
Oberfläche	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [ $10^{-6}$ ]	$\Delta D/\Delta f$ [ $10^{-8}$ s]
Au	49,4±0,5	892±9,0	2,58±0,121	5,2±0,3
SiO <sub>2</sub>	50,1±1,37	905±24,7	2,59±0,156	5,2±0,5

Bei diesem Versuch stellt sich die Frage, ob das Fn Monomer über die gesamte Versuchszeit stabil ist. In Kap. 5.2.2 wird deutlich dargestellt, dass das Fn Monomer nur im PBS/EDTA Puffer über längere Zeit stabil bleibt. Aus diesem Grund wird bei diesem Versuch angenommen, dass sich bereits in der Proteinlösung Dimere bzw. Multimere bilden. Daher besitzen die adsorbierten Filme von Fn Monomeren in diesem Versuch eine ähnliche Steifigkeit wie der Dimer-Film (vgl. 3.1.2.1).

### **3.1.2.3 Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren und Monomeren auf homogenem Gold in PBS/EDTA**

Zu dieser Zeit wird das Fn nicht mehr von der Firma SIGMA Aldrich bezogen, sondern aus dem humanen Blutserum in unserem Labor aufgereinigt. Die Versuche werden auf dieses Fn umgestellt. Daher wird in diesem Experiment untersucht, ob sich die aus unterschiedlichen Quellen bezogenen Fn's in ihrem Adsorptionsverhalten auf homogenem Gold unterscheiden. Parallel dazu wird das Adsorptionsverhalten des Fn Monomers überprüft. Dieses wird aus dem in unserem Labor aufgereinigten Fn hergestellt. Um die Adsorptionsverläufe miteinander zu vergleichen, wird PBS/EDTA als Arbeitspuffer eingesetzt. Dieser erwies sich als bester Puffer für das Fn Monomer, da die bei der Reduktion entstehenden Monomereinheiten über die Versuchszeit stabil bleiben (s. Kap. 5.2.2).

Nach der Stabilisierung der Signale in dem Arbeitspuffer werden Fn's innerhalb von 75 min injiziert. Danach wird der Waschvorgang mit dem Arbeitspuffer eingeleitet (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Adsorption von Fn Dimeren und Monomeren auf homogenem Gold im PBS/EDTA Puffer.** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Das in unserem Labor aufgereinigte Fn Dimer (f5, D5), das Fn Dimer von SIGMA (f5, D5) und das Fn Monomer (f5, D5). Die Signaländerungen für beide Fn Dimere sind vergleichbar.

In Abbildung 20 wird ein Unterschied im Adsorptionsverhalten beider Fn Dimere festgestellt. Das kommerzielle Fn adsorbiert schneller (hellblau dargestellt). Nach etwa 60 min findet eine Stabilisierung der Adsorption statt. Nach dem Spülen mit dem Arbeitspuffer wird eine vergleichbare Frequenzänderung und Endmasse für beide Fn Dimere beobachtet. Die Dissipationsänderung hat in beiden Fällen einen ähnlichen Verlauf, jedoch ist die von dem kommerziellen Fn um eine Einheit kleiner.

In dem Fall von dem Fn Monomer verläuft die Kurve (türkis dargestellt) zuerst ähnlich wie beim Fn Dimer, aus welchem es produziert wird. Die Frequenzänderung nach dem Waschvorgang ist um etwa 12 Hz größer als für das Dimer (vgl. Tabelle 6). Auch ein Unterschied in der Dissipationsänderung von etwa  $5 \times 10^{-6}$  im Vergleich zu der des Dimers zeigt an, dass der adsorbierte Monomer-Film weicher ist und mehr Wasser enthält. Die Adsorption des Monomers findet innerhalb von etwa 60 min statt.

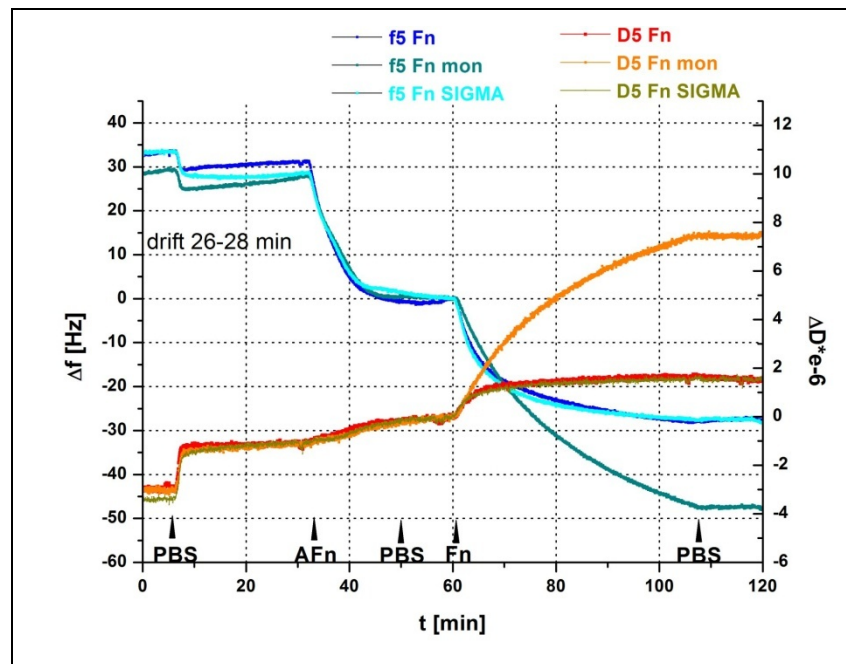
**Tabelle 6: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren bzw. Monomeren.**

<b>Protein</b>	<b><math>-\Delta f</math> [Hz]</b>	<b><math>\Delta m</math> [ng/cm<sup>2</sup>]</b>	<b><math>\Delta D</math> [10<sup>-6</sup>]</b>	<b><math>\Delta D/\Delta f</math> [10<sup>-8</sup> s]</b>
Fn Dimer SIGMA	50,7±0,5	916±9,0	2,73±0,125	5,4±0,3
Fn Dimer	51,0±0,4	921±7,2	3,43±0,110	6,7±0,2
Fn Monomer	63,8±1,0	1152±18,1	7,68±0,130	12±0,4

### **3.1.2.4 Adsorptionsverhalten von Fn Dimeren bzw. Monomeren angebunden über das AFn auf homogenem Gold**

Hier wird untersucht, inwieweit unterschiedliche Fn's in PBS als Arbeitspuffer an das Antifibronektin (CT) binden. Das Fn Monomer liegt in PBS/EDTA vor, das Fn Dimer in PBS. Das Experiment wird auf homogenen Goldoberflächen durchgeführt.

Nach der Stabilisierung des Systems im PBS Puffer wird das Antifibronektin injiziert. Der Adsorptionsvorgang dauert etwa 20 min. Danach wird mit PBS etwa 10 min gewaschen. Dann werden Fn's etwa für einen Zeitraum von 65 min injiziert. Anschließend wird das System mit dem PBS Puffer gespült.



**Abbildung 21: Anbindung von Fibronektinen an die homogene Goldoberfläche in PBS über das Antifibronektin (CT) in PBS.** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Das in unserem Labor aufgereinigte Fn Dimer ( $f_5$ ,  $D_5$ ), das Fn Dimer von SIGMA ( $f_5$ ,  $D_5$ ) und das Fn Monomer ( $f_5$ ,  $D_5$ ). Das Anbindungsverhalten an das Antifibronektin (CT) von beiden Dimeren ist vergleichbar.

Abbildung 21 und dazugehörige Tabelle 7 machen deutlich, dass der Adsorptionsverlauf von beiden Dimeren (dem kommerziellen (hellblau) und dem im Labor aufgereinigten (dunkelblau)) auf dem Antikörperfilm gleich ist:

- die Frequenzänderung von etwa 27 Hz,
- die entsprechende Endmasse von etwa  $486 \text{ ng/cm}^2$ ,
- die Dissipationsänderung während der Fn Adsorption von etwa  $1,4 \times 10^{-6}$ .

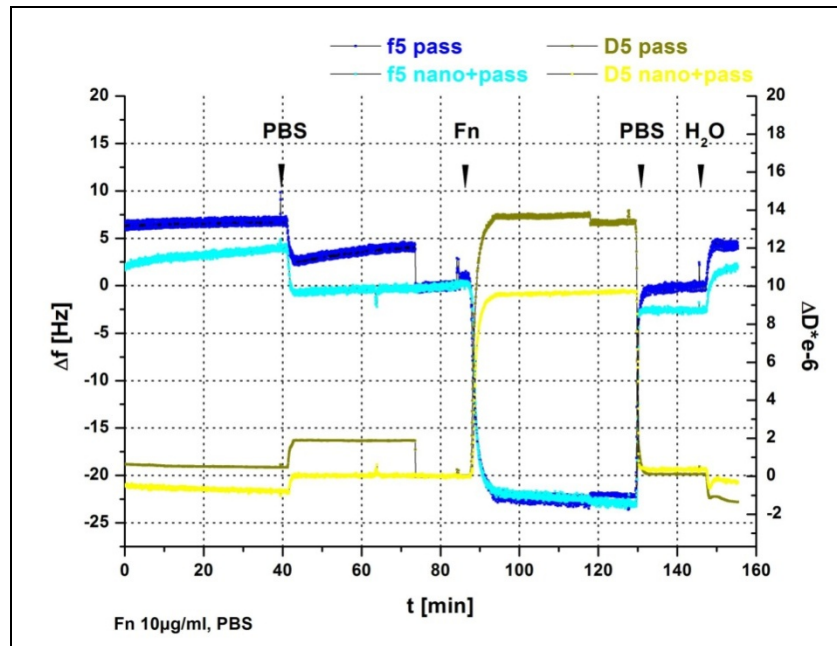
**Tabelle 7: Zusammengefasste Daten für die Anbindung von Fn's über das Antifibronektin auf der homogenen Oberfläche.**

Protein	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [10 <sup>-6</sup> ]	$\Delta D/\Delta f$ [10 <sup>-8</sup> s]
Fn Dimer SIGMA	26,7±0,9	482±16,3	1,41±0,197	5,3±0,9
Fn Dimer	27,1±0,9	489±16,3	1,46±0,151	5,4±0,7
Fn Monomer	47,2±0,4	852±7,2	7,39±0,116	15,6±0,4
AFn	28,9±0,6	522±10,8	1,21±0,115	4,2±0,3

Im Falle des Monomers verläuft die Frequenzkurve in den ersten 10 min weniger steil als die der Dimere. Eine Sättigung findet nicht statt. Nach dem Waschvorgang findet keine Änderung des Signals statt. Somit ist die Anbindung irreversibel. Die Endmasse beträgt 852 ng/cm<sup>2</sup> und die Dissipationsänderung ist um etwa  $6 \times 10^{-6}$  Einheiten größer als bei den Dimeren. Dies deutet erneut darauf hin, dass der am Antifibronektin gebundene Monomerfilm weicher als der Dimerfilm ist, und dass mehr Lösungsmittelmoleküle darin enthalten sind.

### **3.1.2.5 Direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur**

Der nächste Schritt ist der Übergang zu nanostrukturierten und passivierten Siliziumdioxid beschichteten Kristallen. Bei diesem Versuch wird das Verhalten der Adsorption bei einer direkten Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur untersucht. Zur Kontrolle und Vergleich der Passivierungsqualität wird gleichzeitig die Adsorption auf einem passivierten Siliziumdioxid beschichteten Kristall beobachtet. Nach der Stabilisierung der Signale in PBS wird das Fn innerhalb von etwa 45 min injiziert. Anschließend wird ein Waschvorgang mit PBS eingeleitet (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Adsorption bei einer direkten Anbindung von Fn Dimeren.** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Direkte Anbindung an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen.

In der Abbildung 22 wird nach der Injektion von Fn Dimeren eine Änderung der Frequenz- und Dissipationssignale auf beiden Kristallen beobachtet. Nach dem Waschen mit PBS als Arbeitspuffer des passivierten Kristalls geht das Signal auf  $0,1 \pm 0,3$  Hz zurück. Der Wert für die Frequenzänderung liegt innerhalb der Sensitivitätsgrenze. Der Wert für die Dissipationsänderung beträgt  $(0,11 \pm 0,052) \times 10^{-6}$  (vgl. Tabelle 8).

Auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall beträgt die Frequenzänderung  $2,6 \pm 0,2$  Hz und die Dissipationsänderung  $(0,35 \pm 0,074) \times 10^{-6}$ . Für die Adsorption auf der

Nanostruktur ist das Verhältnis  $\frac{\Delta D}{\Delta f} = (13,4 \pm 4,9) \times 10^{-8}$  s. In diesem Fall ist die Sauerbrey-Gleichung (4) eine gute Näherung (vgl. Kap. 5.3.1).



**Tabelle 8: Zusammengefasste Daten für eine direkte Anbindung von Fn Dimeren in PBS an die Nanostruktur.**

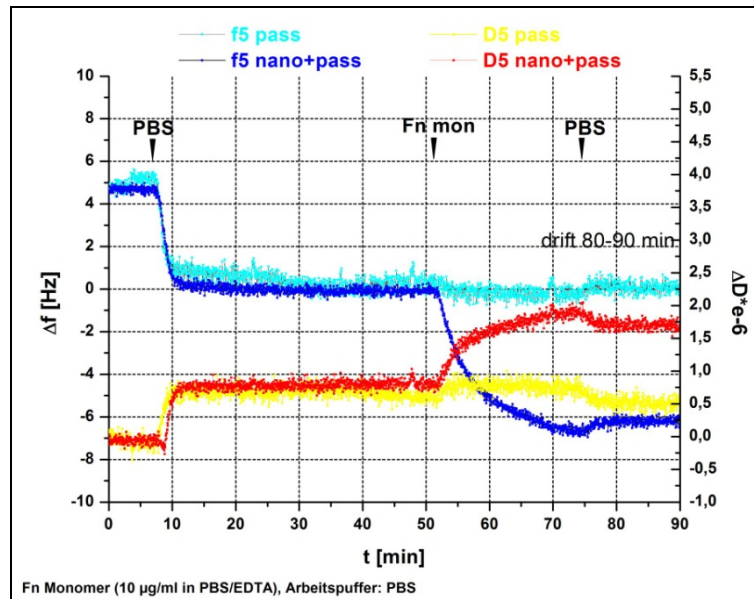
Oberfläche	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [10 <sup>-6</sup> ]	$\Delta D/\Delta f$ [10 <sup>-8</sup> s]
passiviert	0,5±0,8	–	0,11±0,052	22±48
nanostrukturiert und passiviert	2,6±0,2	47±3,6	0,35±0,074	13,4±4,9

Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst:

- Das Fn Dimer adsorbiert innerhalb von 15 min auf der Nanostruktur.
- Der passivierte Kristall reagiert mit einer Signaländerung bei der Injektion des Proteins. Nach dem Waschvorgang gehen die Signale zurück. Spätere Experimente mit denselben Kristallen und dem Passivierungsreagenz derselben Charge liefern eine ähnliche Signaländerung bei der Injektion des Proteins (hier nicht gezeigt). Die Gründe für solch eine starke Signaländerung könnten in der Passivierungsschicht liegen. Daher ist die Qualität der Passivierung von großer Bedeutung.

### 3.1.2.6 Direkte Anbindung des Fn Monomers auf die Nanostruktur

Es wird eine direkte Anbindung von Fn Monomeren auf der nanostrukturierten und passivierten Siliziumdioxid Oberfläche untersucht. Der Arbeitspuffer ist PBS. Das Fn Monomer liegt in PBS/EDTA Puffer vor. Nach der Stabilisierung des Systems wird das Fn Monomer etwa 20 min injiziert. Anschließend wird der Waschvorgang mit PBS eingeleitet (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Direkte Anbindung von Fn Monomeren auf die Nanostruktur.** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Direkte Anbindung an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. Es findet keine Adsorption auf dem passivierten Kristall statt.

In der Abbildung 23 deutet das Signal auf dem passivierten Kristall (hellblau) auf eine gute Qualität der Passivierungsschicht hin.

Auf der Passivierung wird eine leichte Änderung der Frequenz- und Dissipationssignale bei der Injektion des Proteins und beim Übergang zum Waschvorgang wahrgenommen. Diese Änderung der Dissipation auf dem passivierten bzw. passivierten und nanostrukturierten Kristall ist vergleichbar (Tabelle 9):  $0,20 \pm 0,12 \times 10^{-6}$  auf dem ersten bzw.  $0,26 \pm 0,12 \times 10^{-6}$  auf dem zweiten Kristall. Die Änderung der Frequenz beträgt  $0,47 \pm 0,31$  Hz auf dem ersten bzw.  $0,37 \pm 0,45$  Hz auf dem zweiten Kristall. Diese sind auf den Puffereffekt zurückzuführen: Wie oben beschrieben, ist der Arbeitspuffer PBS und das Fn Monomer liegt in PBS/EDTA vor.

Die dunkelblaue Kurve repräsentiert die Adsorption des Fn Monomers auf dem nanostrukturierten und passivierten Siliziumdioxid Kristall.  $6,2 \pm 0,3$  Hz der Frequenzänderung entsprechen  $112 \pm 5,4$  ng/cm<sup>2</sup> der Endmasse. Die Dissipation für den gesamten Adsorptionsprozess ändert sich um etwa eine Einheit. Das Verhältnis von

$$\frac{\Delta D}{\Delta f} = 0,15 \text{ s (vgl. Kap. 5.3.1).}$$

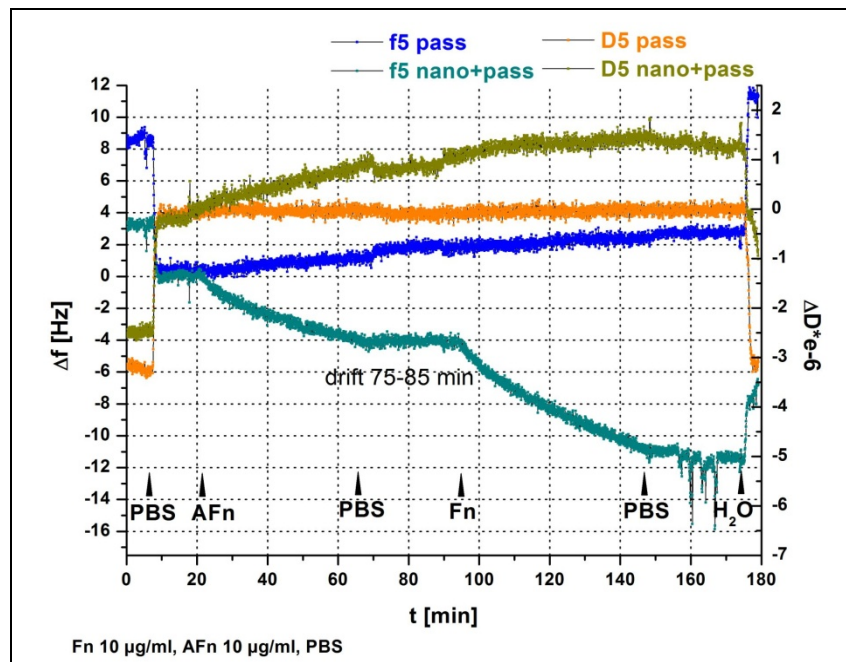
**Tabelle 9: Zusammengefasste Daten für eine direkte Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur.**

Oberfläche	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [10 <sup>-6</sup> ]	$\Delta D/\Delta f$ [10 <sup>-8</sup> s]
passiviert	0,4±0,4	–	-0,26±0,115	69,9±24,1
nanostrukturiert und passiviert	6,2±0,3	112±5,4	0,90±0,107	15±2,4

Das Wichtigste wird zusammengefasst: Der Adsorptionsprozess des Monomers auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall dauert etwa 25 min. Es findet eine Adsorption auf der Nanostruktur statt.

### **3.1.2.7 Indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via AFn**

Bei diesem Versuch wird untersucht, wie die Anbindung des Fn Dimerens über das Antifibronektin (CT) auf einem nanostrukturierten und passivierten Siliziumdioxid Kristall verläuft. Nach der Stabilisierung des Systems wird das AFn für etwa 50 min injiziert. Danach wird ein Waschvorgang mit PBS eingeleitet. Anschließend wird das Fn für etwa 50 min injiziert und schließlich erneut mit PBS gewaschen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Adsorption von Fn Dimeren auf der Nanostruktur via Antifibronektin (CT).** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Die Anbindung via Antifibronektin (AFn) an die nanostrukturierte und passivierte (*f5*, *D5*) sowie an die passivierte (*f5*, *D5*) Siliziumdioxidoberflächen. Auf der letzten Oberfläche findet keine Proteinadsorption statt.

In der Abbildung 24 wird der Verlauf des Adsorptionsprozesses verdeutlicht: Es findet keine Adsorption an der Passivierung statt (dunkelblaue Kurve für die Frequenzänderung und orange Kurve für die Dissipationsänderung). Das Frequenzsignal auf dem passivierten Kristall weist einen leichten Drift auf, welcher nicht korrigiert wird.

**Tabelle 10: Zusammengefasste Daten für die Anbindung von Fn Dimeren via Antifibronektin.**

Oberfläche/Protein	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [10 <sup>-6</sup> ]	$\Delta D/\Delta f$ [10 <sup>-8</sup> s]
passiviert	–	–	–	–
AFn auf passivierten Nanostruktur	4,1±0,4	74±7,2	1,07±0,137	26±5,6
Fn Dimer auf passivierten Nanostruktur	7,3±0,4	132±7,2	0,38±0,154	5,2±2,3

Bei der Adsorption von AFn auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall tritt eine Frequenzänderung von 4,1±0,4 Hz auf (vgl. Tabelle 10). Die Änderung der adsorbierten

Masse beträgt  $74 \pm 7,2 \text{ ng/cm}^2$ . Das Verhältnis von  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  ist größer 0,2  $[(0,26 \pm 0,06) \times 10^{-6} \text{ s}]$ . Dieser Wert ist jedoch sehr nah an 0,2, welcher nur als Daumenregel gilt (vgl. Kap. 5.3.1). Um die Konsistenz der Betrachtungen zu wahren, würde es sich lohnen, die Masse hier ebenfalls zu betrachten.

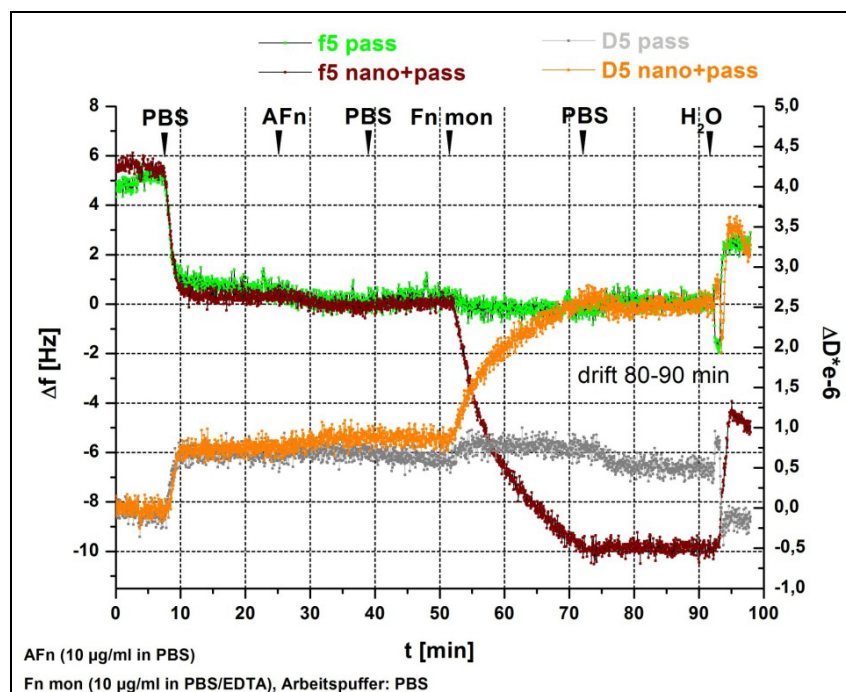
Die Frequenzänderung für das Fn Dimer beträgt  $7,3 \pm 0,4 \text{ Hz}$ . Dies entspricht  $132 \pm 7,2 \text{ ng/cm}^2$ . Die Dissipationsänderung beträgt  $0,38 \pm 0,154 \times 10^{-6}$ .

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem passivierten Kristall und dem nanostrukturierten und passivierten Kristall ist zu sehen: Auf dem letzten wird eine zeitaufgelöste Anbindung der Proteine an die Goldnanostruktur detektiert.

### 3.1.2.8 Indirekte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur via AFn

Bei diesem Versuch soll eine indirekte Anbindung des Fn Monomers über das Antifibronektin (CT) an die Nanostruktur untersucht werden.

Nach der Stabilisierung des Systems wird das Antifibronektin (CT) für etwa 10 min injiziert. Der Waschvorgang mit PBS dauert 10 min an. Anschließend findet eine Injektion des Fn Monomers für etwa 20 min statt. Schließlich wird mit PBS Puffer gewaschen.



**Abbildung 25: Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur via Antifibronektin (CT).** Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Die Anbindung via Antifibronektin (AFn) an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. Auf der letzten Oberfläche findet keine Proteinadsorption statt.

In Abbildung 25 wird die Frequenzänderung auf der passivierten Oberfläche (hellgrüne Kurve) dargestellt. Eine leichte Änderung des Frequenz- und Dissipationssignals bei der Injektion der Proteine wird beobachtet. Jedoch findet nach den Waschvorgängen eine Stabilisierung der Signale statt. Eine leichte Dissipationsänderung findet ebenfalls nach der Injektion von Fn Monomer und bei dem Übergang zum Waschvorgang mit PBS statt (graue Kurve). Die Werte für die Frequenz- und Dissipationsänderung liegen innerhalb der Fehlergrenze für beide Kristalle. Diese Änderungen sind auf den Puffereffekt zurückzuführen, da das Fn Monomer in PBS/EDTA vorliegt.

Dieses Mal wird nur eine kleine Änderung des Frequenzsignals von  $0,3\pm 0,2$  Hz (vgl. Tabelle 11) bei der Injektion vom Antifibronektin auf der Nanostruktur beobachtet (braun). Dies könnte auf eine andere Passivierungsqualität des Kristalls hindeuten. Das Verhältnis von  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  liegt bei  $46\pm 118\times 10^{-8}$  s, welches deutlich höher ist, als erlaubt, damit

die Sauerbrey-Gleichung (4) eine gute Näherung darstellt (vgl. Kap. 5.3.1). Aus diesem Grund wird hier kein Wert für die adsorbierte Masse von AFn auf der Nanostruktur ermittelt.

Die kleine adsorbierte Menge an AFn reicht aus, um eine um etwa 4 Hz höhere Frequenzänderung für die Adsorption des Fn Monomers zu erzeugen als bei der direkten Anbindung (vgl. Kap. 3.1.2.6). Das Dissipationssignal liegt bei  $1,60\pm 0,13\times 10^{-6}$  für das Fn Monomer. Dieser Wert ist um  $0,7\times 10^{-6}$  größer als bei der direkten Anbindung.

**Tabelle 11: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Monomers via AFn (CT).**

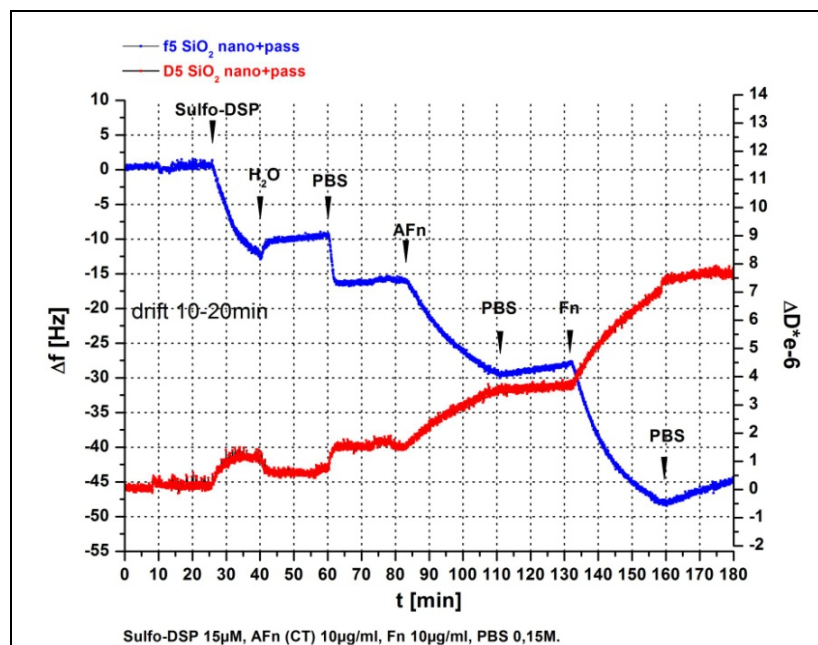
Oberfläche/Protein	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]	$\Delta D$ [ $10^{-6}$ ]	$\Delta D/\Delta f$ [ $10^{-8}$ s]
passiviert	–	–	–	–
AFn	$0,3\pm 0,2$	–	$0,12\pm 0,15$	$46\pm 118$
Fn Monomer	$9,9\pm 0,4$	$179\pm 7,2$	$1,60\pm 0,13$	$16\pm 1,9$

### 3.1.2.9 Indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via Linker und AFn

Die Anbindung eines Linkers an die Nanostruktur soll eine bessere Anbindung des Antifibronektins gewährleisten. Der Linker bindet an die freien Aminogruppen des Antifibronektins, wobei seine Konformation an der Nanostruktur beinahe erhalten bleibt. Die spezifischen Bindungsstellen für Fn sind somit zugänglich. Im Gegensatz dazu kann sich bei einer direkten Anbindung des Antikörpers an die Goldnanostruktur die Konformation ändern, so dass nicht alle spezifischen Bindungsstellen für Fn zur Verfügung stehen.

Bei diesem Versuch wird nach der Stabilisierung in Wasser zuerst das wasserlösliche Sulfo-DSP ( $c = 15 \mu\text{M}$ ) injiziert. Ein Waschvorgang mit Wasser wird für etwa 20 min eingeleitet. Danach wird zum PBS Puffer übergegangen. Nach etwa 20 min wird das Antifibronektin injiziert. Nach einem Waschvorgang mit PBS (etwa 20 min) folgt die Injektion des Fn Dimers, gefolgt von einem abschließenden Waschvorgang mit PBS.

Die Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und das Antifibronektin auf der Nanostruktur (Abbildung 26) und auf der passivierten Oberfläche (Abbildung 27) dargestellt. Die dazugehörigen Daten sind in der Tabelle 12 bzw. Tabelle 13 zusammengefasst.



**Abbildung 26: Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall.** Dargestellt sind die Frequenz- ( $f_5$ ) und Dissipationsänderung ( $D_5$ ) des fünften Obertons. Ein deutliches Signal für die Anbindung von Sulfo-DSP, ebenso wie von Proteinen an die Nanostruktur wird beobachtet.

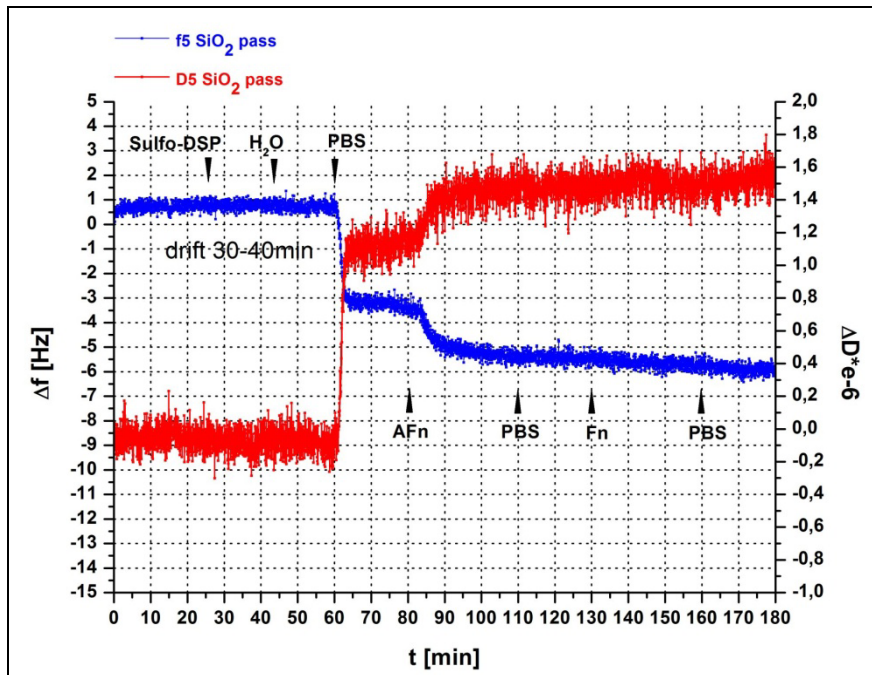
Auf dem Kristall mit der Nanostruktur (vgl. Abbildung 26) sieht man ein deutliches Signal bei der Injektion von Sulfo-DSP. Die Molmasse von Sulfo-DSP ist klein (609 g/mol) im Vergleich zu Fn (450000 g/mol), so dass bei dieser Konzentration ( $c = 15 \mu\text{M}$ ) eine Frequenzänderung von fast 10 Hz nicht zu erwarten ist. Auch wenn 100 Moleküle pro Goldcluster binden würden, wäre die Frequenzänderung bei 0,06 Hz (s. Kap. 3.1.3.1). Bei der gegebenen Auflösung von 0,1 Hz ist es nicht möglich, solch eine Änderung zu detektieren.

Nach dem Waschvorgang mit Wasser wird nur ein kleiner Teil des adsorbierten Linkers ausgewaschen. Nach dem Pufferwechsel wird das Antifibronektin injiziert. Die adsorbierte Menge davon beträgt  $220 \pm 7,2 \text{ ng/cm}^2$ , die Frequenzänderung für das Fn Dimer  $16,7 \pm 0,4 \text{ Hz}$  (vgl. Tabelle 12).

**Tabelle 12: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall.**

Spezie	$-\Delta f \text{ [Hz]}$	$\Delta m \text{ [ng/cm}^2\text{]}$	$\Delta D \text{ [10}^{-6}\text{]}$	$\Delta D/\Delta f \text{ [10}^{-8} \text{ s]}$
Sulfo-DSP	$10,7 \pm 0,6$	$193 \pm 10,8$	$0,46 \pm 0,199$	$4,3 \pm 2,1$
AFn	$12,2 \pm 0,4$	$220 \pm 7,2$	$2,14 \pm 0,132$	$17,6 \pm 1,6$
Fn Dimer	$16,7 \pm 0,4$	–	$4,02 \pm 0,130$	$24,1 \pm 1,3$





**Abbildung 27: Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem passivierten Kristall als Kontrolle.** Dargestellt sind die Frequenz- ( $f_5$ ) und Dissipationsänderung ( $D_5$ ) des fünften Obertons. Eine irreversible Anbindung vom AFn an die Passivierungsschicht wird beobachtet.

Eine Frequenz- oder Dissipationsänderung für Sulfo-DSP auf dem passivierten Kristall kann nicht detektiert werden (vgl. Abbildung 27). Es findet jedoch eine irreversible Adsorption vom Antifibronektin statt ( $2,0 \pm 0,4$  Hz). Die Signale für die Frequenz und Dissipation des Fn Dimers liegen innerhalb der Fehlergrenze.

**Tabelle 13: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem passivierten Kristall als Kontrolle.**

Spezie	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ $\text{ng}/\text{cm}^2$ ]	$\Delta D$ [ $10^{-6}$ ]	$\Delta D/\Delta f$ [ $10^{-8}$ s]
Sulfo-DSP	–	–	–	–
AFn	$2,0 \pm 0,4$	–	$0,33 \pm 0,151$	$16,1 \pm 10,2$
Fn Dimer	$0,3 \pm 0,4$	$5,4 \pm 7,2$	$0,06 \pm 0,135$	$17,9 \pm 61,1$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Anbindungsmöglichkeit am ungünstigsten ist: Das kleine Sulfo-DSP Molekül scheint sich irreversibel in der

Passivierungsschicht einzulagern. Bei der gegebenen experimentellen Anordnung ist es nicht möglich, die überschüssigen Mengen von Sulfo-DSP effektiv zu entfernen.

### 3.1.3 Diskussion

#### 3.1.3.1 Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchswerten

Für das in dieser Arbeit untersuchte System stellt die Sauerbrey-Gleichung (4) eine Näherung dar, da es sich nicht um einen steifen und dünnen Film handelt. Das Verhältnis  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  wird bei der Adsorption des jeweiligen Proteins ermittelt (vgl. Kap. 5.3.1)

und die Gültigkeit der Sauerbrey-Gleichung (4) überprüft. Da sowohl eine Nanostruktur als auch ein Passivierungsfilm auf der Oberfläche vorhanden sind, ist keine Homogenität der Oberfläche gegeben, auf der der Film adsorbiert. Erwartungswerte werden nach Gleichung 9 ermittelt (vgl. Kap. 5.3.1.2).

#### 1) Direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur:

Bei diesem Experiment wird eine Erwartungsrechnung angefertigt, bei der die adsorbierte Menge des Fn Dimers  $93 \text{ ng/cm}^2$  betragen sollte. Wie aus der Tabelle 14 zu sehen ist, beträgt die adsorbierte Endmasse etwa die Hälfte des erwarteten Wertes.

**Tabelle 14:** Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchsdaten für eine direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur.

passivierte Nanostruktur	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ $\text{ng/cm}^2$ ]
Fn Dimer	$2,6 \pm 0,2$	$47 \pm 3,6$ 51%
Erwartungswerte für Fn Dimer	5,0	$93 \pm 0,02$ ( $d = 49 \pm 11 \text{ nm}$ )

Die Gold-Nanopartikel haben ein Durchmesser von etwa 7 nm (vgl. Kap. 3.3.1.3). Sie sind in die PEG-Passivierungsschicht eingebettet. Die Schichtdicke der PEG Schicht wurde mithilfe von XPS im Ultrahochvakuum (UHV) gemessen. Sie beträgt für PEG 2000 im UHV ca.  $22 \text{ \AA}$  und in der wässrigen Lösung etwa  $50 \text{ \AA}^{136}$ . Somit sollen die Nanopartikel von der Passivierungsschicht nicht bedeckt sein. Ein Fn Dimer besitzt einen Trägheitsradius von 8,8 nm (vgl. Kap. 2.1.3). Das Gold-Nanopartikel sollte daher genug Platz für eine statistische Anbindung des Fn Moleküls gewährleisten. Andererseits wird durch die limitierte Goldoberfläche des Nanopartikels nicht zu viel Platz angeboten,

damit das Protein bei der Wechselwirkung mit dieser nicht komplett denaturiert. Somit stellt eine 50%-ige Wahrscheinlichkeit bei der statistischen Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur einen guten Wert dar.

## 2) Direkte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur:

Aus Tabelle 15 wird deutlich, dass die tatsächliche Endmasse des adsorbierten Fn Monomers etwa um den Faktor zwei höher ist als der erwartete Wert:

**Tabelle 15: Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchsdaten für eine direkte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur.**

passivierte Nanostruktur	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]
Fn Monomer	6,2±0,3	112±5,4 193%
Erwartungswerte für Fn Monomer	3,2	58±0,02 (d = 60±14 nm)

Berechnet man für denselben Abstand von 60±14 nm die Adsorption der Fn Dimere, erhält man einen Erwartungswert von 62±0,01 ng/cm<sup>2</sup>. Dieser ist mit dem Erwartungswert von 58±0,02 ng/cm<sup>2</sup> für die Adsorption der Monomere auf der Nanostruktur vergleichbar. Jedoch liegt die Änderung des Dissipationssignals für das Monomer bei  $0,90\pm 0,1 \times 10^{-6}$  und für das Dimer bei  $0,35\pm 0,1 \times 10^{-6}$  auf der Nanostruktur. In diesem Fall spricht dies für die Adsorption der Fn Monomere. Unwahrscheinlich wäre die Anbindung zweier Fn Monomere an einem Nanopartikel aus Platzgründen. Eventuell koordiniert das einzelne Fn Monomer-Molekül mehr Lösungsmittelmoleküle als angenommen.

## 3) Die Anbindung des Fn Dimers via Antifibronektin an die Nanostruktur:

Für das Antifibronektin liegen keine Daten bezüglich des Wassergehalts vor. Im Normalfall gehen etwa 50% oder mehr der auf einer homogenen Oberfläche adsorbierten Masse auf das eingeschlossene Lösungsmittel zurück<sup>137</sup>. Da die Molmasse des Antifibronektins ( $M \approx 150000$  g/mol) etwa um den Faktor drei kleiner als die des Fn Dimers ist, wird etwa ein Drittel des ausgerechneten Wertes für Fn Dimer erwartet. Somit sollte die Frequenzänderung im Bereich von etwa zwei bis drei Hertz liegen und die

Endmasse entsprechend etwa  $49 \text{ ng/cm}^2$  betragen. Die Frequenzänderung und die daraus resultierende Endmasse für das Antifibronektin liegen hier höher.

**Tabelle 16: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Dimers über das AFn an die Nanostruktur.**

passivierte Nanostruktur	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ $\text{ng/cm}^2$ ]
AFn	$4,1 \pm 0,4$	$74 \pm 7,2$
Erwartungswerte für AFn	2,7	49 (etwa 1/3 des Fn-Wertes)
Fn	$7,3 \pm 0,4$	$132 \pm 7,2$ 90%
Erwartungswerte für Fn	8,2	$148 \pm 0,02$ ( $d = 39 \pm 11 \text{ nm}$ )

Die Endmasse des adsorbierten Fn Dimer-Moleküls beträgt 90% des abgeschätzten Wertes (vgl. Tabelle 16). Die Adsorption des Fn Dimers über einen Antikörper liefert zwar fast um 40% ein besseres Ergebnis als bei einer direkten Anbindung. Jedoch ist unklar, wie das Antifibronektin auf der Nanostruktur adsorbiert.

#### 4) Die Anbindung des Fn Monomers via Antifibronektin:

Die zusammengefassten Daten aus dem Versuch der Anbindung des Fn Monomers mittels Antifibronektin an die Nanostruktur werden in der Tabelle 17 dargestellt:

**Tabelle 17: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur über das AFn.**

passivierte Nanostruktur	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]
AFn	0,3±0,2	–
Erwartungswerte für AFn	0,7	12 (etwa 1/3 des Fn-Dimer Wertes)
Fn Monomer	9,9±0,4	179±7,2 497%
Erwartungswerte für Fn Monomer	2,0	36±0,02 (d = 76±17 nm)

Für das AFn liegt das Verhältnis von  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  bei  $46 \pm 118 \times 10^{-8}$  s, welches deutlich höher ist,

als erlaubt, damit die Sauerbrey-Gleichung (4) als Näherung herangezogen werden kann (vgl. Kap. 5.3.1). Aus diesem Grund wird hier kein Wert für die adsorbierte Masse von AFn auf der Nanostruktur ermittelt. Wie bereits erwähnt, beträgt die Frequenzänderung des Antifibronektins  $0,3 \pm 0,2$  Hz. Dieser Wert ist deutlich kleiner als der im Falle des Fn Dimers. Dies könnte auf eine unterschiedliche Passivierungsqualität des Kristalls hindeuten.

Eine Anbindung des Fn Monomers über das Antifibronektin liefert eine etwa fünffach höhere Endmasse als abgeschätzt. Wie im Falle einer direkten Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur, könnte das einzelne Monomer-Molekül mehr Lösungsmittelmoleküle koordinieren als angenommen wird.

## 5) Die Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via Linker und AFn

Die bei diesem Versuch erhaltenen Daten sind in der Tabelle 18 zusammengefasst:

**Tabelle 18: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via Linker und AFn.**

passivierte Nanostruktur	$-\Delta f$ [Hz]	$\Delta m$ [ng/cm <sup>2</sup> ]
Sulfo-DSP	10,7±0,6	193±10,8
Erwartungswerte für Sulfo-DSP	0,006	0,1 (für 10 Moleküle)
AFn	12,2±0,4	220±7,2 1222%
Erwartungswerte für AFn	1,2	21 (etwa 1/3 des Fn-Dimer Wertes)
Fn Dimer	16,7±0,4	–
Erwartungswerte für Fn Dimer	3,4	62±0,02 (d = 60±14 nm)

Die adsorbierte Endmasse von Sulfo-DSP liegt bei 193±10,8 ng/cm<sup>2</sup>. Wie bereits im Kap. 3.1.2.9 erwähnt ist die Molmasse des Sulfo-DSP-Linkers klein (609 g/mol) im Vergleich zu Fn (450000 g/mol), so dass bei dieser Konzentration ( $c = 15 \mu\text{M}$ ) eine Frequenzänderung von fast 10 Hz nicht zu erwarten ist. Auch wenn 100 Moleküle pro Goldcluster binden würden, wäre die Frequenzänderung bei 0,06 Hz. Bei der gegebenen Auflösung von 0,1 Hz ist es nicht möglich, solch eine Änderung zu detektieren.

Die tatsächlich adsorbierte Endmasse für das AFn ist 1222% des Erwartungswertes. Die Frequenzänderung für das Fn Dimer beträgt 16,7±0,4 Hz und ist fast um den Faktor fünf höher als abgeschätzt wird. Das Verhältnis  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  liegt bei  $24,1 \pm 1,3 \times 10^{-8}$  s, deswegen

findet hier keine Berechnung der Masse statt (vgl. Kap. 5.3.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Anbindungsmöglichkeit am ungünstigsten ist: Das kleine Sulfo-DSP Molekül scheint sich irreversibel in der Passivierungsschicht anzulagern. Bei der gegebenen experimentellen Anordnung ist es nicht möglich, die überschüssigen Mengen von Sulfo-DSP effektiv zu entfernen. Es ist zwar kein Signal für die Adsorption von Sulfo-DSP auf dem passivierten Kristall zu

beobachten. Bei der gegebenen Auflösung von 0,1 Hz ist es auch nicht möglich, die Anlagerung solch eines kleinen Moleküls zu detektieren. Jedoch spricht eine Signaländerung bei der Injektion vom AFn dafür, dass die Passivierungsschicht durch die Behandlung mit Sulfo-DSP beeinträchtigt ist. Aus diesem Grund ist die Anbindungsmöglichkeit über einen kleinen Linker wie Sulfo-DSP die schlechteste unter den gegebenen Versuchsbedingungen.



### 3.1.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### Literaturvergleich:

Das Adsorptionsverhalten von Fibronectin mittels QCM-D wurde bereits auf homogenen Gold, Titan- und Tantal-Oxid Oberflächen untersucht<sup>11, 138</sup>. Jedoch wurde in allen Studien bei unterschiedlichen Bedingungen gearbeitet. So waren die Proteinkonzentrationen, die eingesetzten Lösungsmittel und die Proteinquellen unterschiedlich. In der Tabelle 19 sind die wichtigsten Daten zusammengefasst:

- die homogene Oberfläche, auf der die Proteinadsorption stattfindet,
- die Konzentration, in der das Protein vorliegt,
- der Puffer, in dem das Protein gelöst ist und in dem der Versuch durchgeführt wird,
- die Versuchstemperatur,
- die adsorbierte Endmasse nach Sauerbrey
- und die Dissipationsänderung.

Die Daten, die in unseren Versuchen ermittelt werden, sind rot dargestellt:

**Tabelle 19: Vergleich der Literaturwerte mit den erhaltenen Daten für die Fn Adsorption auf homogenen Oberflächen. Die ersten zwei Zeilen in rot repräsentieren unsere Daten.**

Oberfläche	c [µg/ml]	Puffer	T [°C]	Δm [ng/cm <sup>2</sup> ]	ΔD [10 <sup>-6</sup> ]
Gold	10	PBS	24	741±5,1	2,1±0,1
Gold	10	PBS/EDTA	24	916±9,0	2,7±0,1
Gold <sup>11</sup>	100	Tris	37	1460±80	5,2±0,4
Tantal-Oxid <sup>11</sup>	100	Tris	37	1060±20	3,1±0,2
Titan-Oxid <sup>139</sup>	20	PBS	37	580±84	≈1,3

Wie aus der Tabelle 19 ersichtlich, kann kein direkter Vergleich der Daten vorgenommen werden. Es fällt auf, dass die adsorbierte Endmasse und die Dissipationsänderung von

der Oberfläche, der Konzentration, dem Arbeitspuffer abhängen. Sollen die Puffereffekte miteinander verglichen werden, sollten die Anfangs- und Endbedingungen gleich sein. Da für uns geringe Proteinkonzentrationen relevant sind, damit Fn Moleküle einzeln in der Lösung vorliegen, wird bei einer Konzentration von 10 µg/ml gearbeitet. Der PBS Puffer weist für uns keine Nachteile auf. Im Gegenteil ist der Tris Puffer für die Fluoreszenzmikroskopie-Versuche ungeeignet, da dieser Aminogruppen enthält, die beim Markieren der Fn-Moleküle hinderlich sind. Somit findet die gesamte Oberflächenpräparation in PBS bzw. PBS/EDTA im Fall von Fn Monomere statt, damit unterschiedliche Methoden für die Untersuchung der Oberflächenpräparation verglichen werden können.

### **Anbindungsverhalten auf homogenen Oberflächen:**

Mit Hilfe von QCM-D Experimenten konnten einige wichtige Erkenntnisse bezüglich der Proteinadsorption auf homogenen Oberflächen gewonnen werden. Die Dissipationsänderung bei der Adsorption von Fn Monomere ist größer als die bei den Fn Dimeren. Dies deutet darauf hin, dass der Film von Fn Monomeren auf homogenen Oberflächen weicher als der von Fn Dimeren ist.

In dieser Arbeit werden Fibronektine aus unterschiedlichen Quellen eingesetzt. Ein wichtiges Ergebnis ist, dass diese auf homogenen Goldoberflächen ein vergleichbares Anbindungsverhalten an das Antifibronektin zeigen. Weiterhin sind ihre adsorbierten Endmassen und Änderungen des Dissipationssignals auf homogenen Goldoberflächen vergleichbar.

### **Anbindung an die Nanostruktur:**

Die Verwendung von Sulfo-DSP mit Antifibronektin für die Anbindung von Fn Dimeren auf der nanostrukturierten und passivierten Oberfläche ist ungeeignet, da das kleine Sulfo-DSP Molekül sich in der Passivierungsschicht anlagert.

Die direkte Anbindung von Fn Dimeren beträgt etwa 50% des Erwartungswertes.

Die Anbindung von Fn Dimeren über das Antifibronektin liefert annähernd den Erwartungswert an Fn Dimeren. Jedoch ist unklar, wie das Antifibronektin an die Nanostruktur bindet.

Die direkte Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur liefert fast doppelt so hohe Werte wie in der Erwartungsrechnung.

Die Anbindung von Fn Monomeren über das Antifibronektin erwies sich als schlechtere Anbindungsmethode als die direkte Anbindung an die Nanostruktur.

**Reflektometrie/QCM-D Versuche:**

Die erhaltenen Daten aus den kombinierten Reflektometrie/QCM-D Versuchen liefern als wichtige Information den Wassergehalt der adsorbierten homogenen Fn-Filme. Die Adsorption von Fn auf homogenen Tantal-Oxid Oberflächen mittels QCM-D und Ellipsometrie, einer optischen Technik, wurde untersucht<sup>138</sup>. Das Verhältnis von der QCM-D Masse zu der Ellipsometrie-Masse beträgt  $4,7 \pm 0,2$  bei einer Fn-Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$ . Das Fibronektin wurde für diese Versuche von SIGMA Aldrich bezogen und lag in einem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Puffer ( $10 \text{ mM}$  Tris,  $0,1 \text{ M}$  NaCl, pH 7,4) vor.

In dieser Arbeit wird die Adsorption von Fibronektin auf homogener Goldoberfläche untersucht. In PBS/Harnstoff (denaturiert) ist das Verhältnis von der „nassen“ Masse zur „Trockenmasse“ für das Fn Dimer  $4,20 \pm 0,02$  und in PBS (unter physiologischen Bedingungen)  $2,6 \pm 0,02$ . Für das Fn Monomer in PBS/EDTA ergibt sich ein Wert von  $4,32 \pm 0,03$ . Dieser liegt nah an dem Wert, der für das denaturierte Fn Dimer erhalten wird.

Bei dem Vergleich der aus unseren Versuchen ermittelten Werte mit den Literaturwerten wird deutlich, dass das Wassergehalt des Proteinfilms stark von der Oberfläche und dem Lösungsmittel, in dem es vorliegt, abhängt.

Mithilfe von diesen Werten kann eine Erwartungsrechnung erstellt werden, um abschätzen zu können, mit welcher Frequenzänderung während des QCM-D Experiments zu rechnen ist.

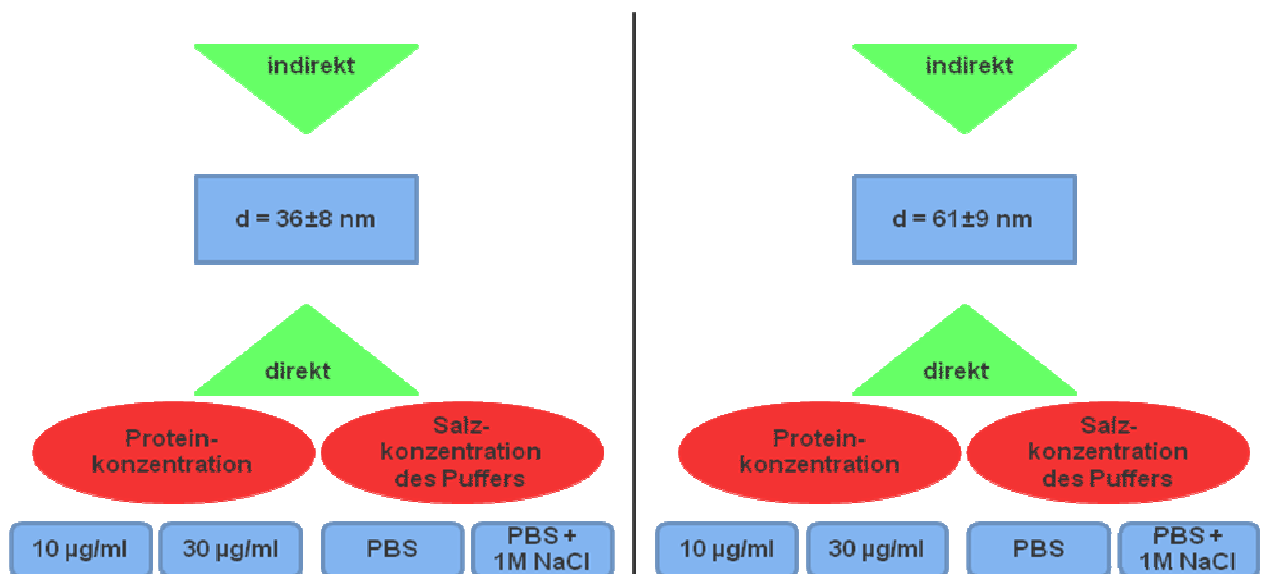
**Biofunktionalisierung:**

Eine Erkenntnis, die man aus den QCM-D Experimenten gewinnt, ist unter anderem die Vorgehensweise zur Biofunktionalisierung der nanostrukturierten und passivierten Substrate.

Das Fn Dimer liegt in PBS in der Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  vor, das Fn Monomer in PBS/EDTA in der Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$ . Die Inkubationszeit für Fn Dimer und Fn Monomer wird auf 30-40 min festgelegt. Damit die Proteinlösung auf dem Substrat nicht austrocknet, wird in einer feuchten und dunklen Kammer inkubiert. Der Waschvorgang der Substrate findet in PBS als Arbeitspuffer im Durchflussmodus statt (ähnlich wie in den QCM-D Durchflussmodulen), ohne die Substrate aus dem Arbeitspuffer zu entfernen.

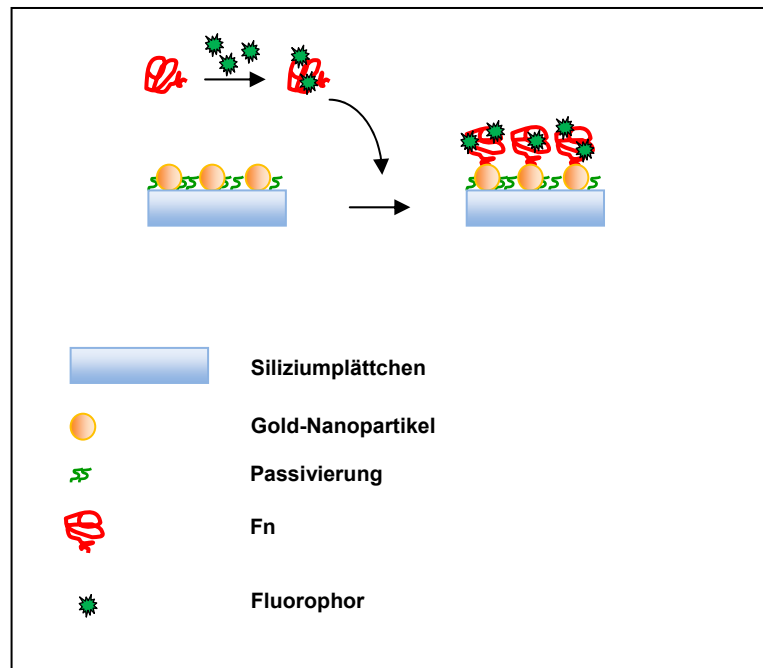
### 3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das Ziel dieser Arbeit ist es einzelne Proteinmoleküle, in diesem Fall Fn Dimere oder Fn Monomere, an einzelne Ankerpunkte in Form von hexagonal angeordneten Gold-Nanopartikel (die Nanostruktur) zu binden. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der empfindlichsten Methoden zur Analyse der Anbindung eines Fluorophor-markierten Proteins an eine Oberfläche<sup>140</sup>. In Abbildung 28 ist eine schematische Darstellung der zu untersuchenden Parametern bei den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten dargestellt. Hierbei werden Nanostrukturen mit Abständen  $61\pm 9$  nm und  $36\pm 8$  nm eingesetzt, um die Abstandsabhängigkeit der Anbindung der Fn Dimere oder Monomere zu untersuchen. Die direkte und indirekte Anbindungsstrategien (vgl. Abbildung 13a-d)) für Fn Dimere oder Monomere werden ebenfalls untersucht. Bei der direkten Anbindung der Fn Dimere oder Monomere an die Nanostruktur werden zusätzliche Parameter wie die Konzentration der Proteinlösung und die Salzkonzentration des Puffers untersucht.



**Abbildung 28:** Eine schematische Darstellung der zu untersuchenden Parameter bei den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten.

Fn Moleküle werden für diese Versuche mit einem Alexa Fluor Fluorophor über Aminogruppen (Aminosäure Lysin) direkt markiert. Eine schematische Darstellung der zu untersuchenden Oberflächen ist in Abbildung 29 zu sehen:



**Abbildung 29: Schematische Darstellung der in diesem Versuch untersuchten Proben.**

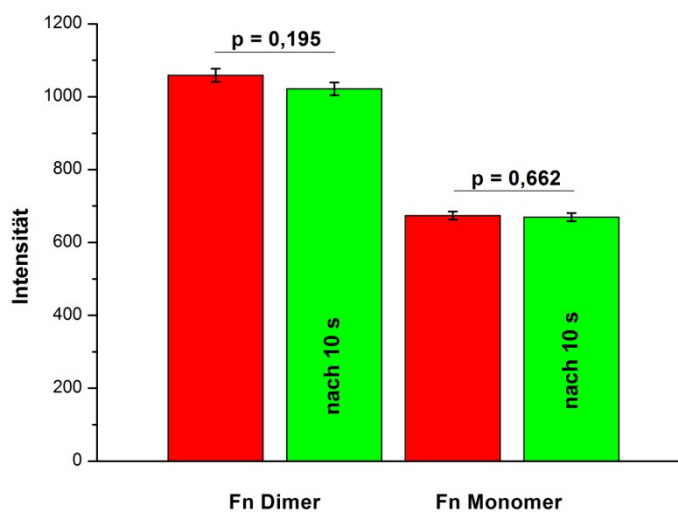
Die Alexa Fluor Farbstoffe zeichnen sich durch ihre Stabilität im Gegensatz zu den herkömmlichen Fluoreszenz Molekülen, wie z. B. Fluorescein oder Rhodamin, und durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber pH-Wert Änderungen im Bereich zwischen vier und zehn aus<sup>141</sup>.

### 3.2.1 Ergebnisse

Es werden Anbindungsstrategien von Fn Dimeren bzw. Monomeren auf Nanostrukturen mit zwei unterschiedlichen Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln untersucht:  $61 \pm 9$  nm und  $36 \pm 8$  nm. Als Substrat für diese Versuche dienen nanostrukturierte und passivierte Silizium Plättchen. Die Nachweismethode mit direkt markierten Fn Molekülen hat einige Vorteile gegenüber der Methode der indirekten Markierung des Proteins. Bei der letzten handelt es sich um eine Markierung, bei der das auf die Nanostruktur gebundene Fn über einen Primärantikörper und Fluorophor-haltigen Sekundärantikörper markiert wird. Diese Technik erwies sich für dieses System als nicht geeignet, da viele Zwischenschritte notwendig sind und dadurch die Passivierungsschicht sehr oft beeinträchtigt wird (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Daher wird bei den in diesem Kapitel vorgestellten Versuchen mit direkt markierten Fn Molekülen gearbeitet.

### 3.2.1.1 Auswirkung der Belichtungszeit auf die Fluorophore

Als erstes wird untersucht, ob die Probe während der Aufnahmen durch die Belichtung ausbleichen. Dafür werden Aufnahmen der Proben, die mit fluoreszenzmarkierten Fn Dimeren oder Monomeren inkubiert werden, mit konstanten Belichtungszeiten (100 ms für das Fn Monomer und 1000 ms für das Fn Dimer) zum Zeitpunkt  $t_1$  gemacht. Danach werden die Proben 10 s lang belichtet und erneut mit Belichtungszeiten aufgenommen ( $t_2$ ). Die zehn Sekunden zwischen den Aufnahmen resultieren aus der Zeit, die notwendig ist, um sich auf der Probe zu orientieren. In Abbildung 30 werden die absoluten Intensitätssignale zu den Zeitpunkten  $t_1$  (rot) und  $t_2$  (grün) dargestellt:



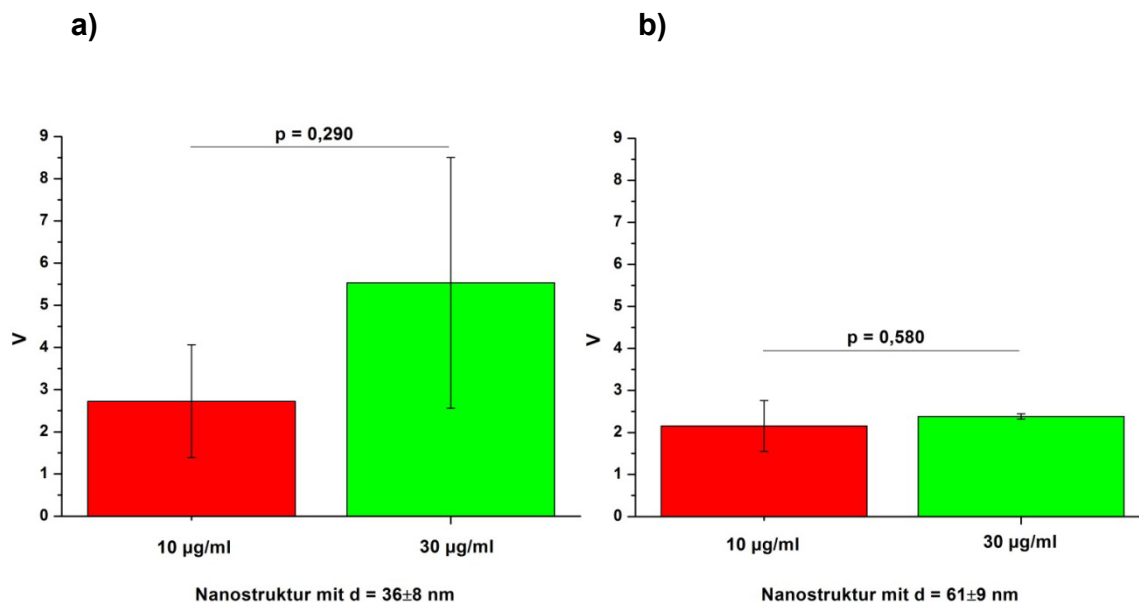
**Abbildung 30: Ausbleicheffekt für das Fn Dimer und Fn Monomer.** Die Signalintensitäten zum Zeitpunkt  $t_1$  bzw.  $t_2$  sind rot bzw. grün dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit (p) dafür, wie signifikant die Unterschiede zwischen den jeweiligen Signalen sind, ist oberhalb der dazugehörigen Balken abgebildet.

Wie aus Abbildung 30 deutlich zu erkennen ist, unterscheiden sich die Signale vor und nach der Belichtung von zehn Sekunden nicht signifikant voneinander. Somit kann der Verlust des Signals durch einen Ausbleicheffekt vernachlässigt werden.

### 3.2.1.2 Direkte Anbindung des Fn Dimers in PBS

Bei diesem Experiment wird untersucht, ob eine Konzentrationsabhängigkeit bei der direkten Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur besteht. Hierfür wird geprüft, ob die direkte Anbindung des Proteins vom höheren Angebot der Proteinmoleküle in der Lösung abhängig ist. Dafür werden die Proteinkonzentrationen in PBS mit 10  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 30  $\mu\text{g/ml}$  festgelegt. In Abbildung 31 werden Verhältnisse der Intensitätssignale auf der

Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur dargestellt (vgl. Gleichung 3, Kap. 5.3.3.3). **a)** zeigt das Diagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abstand, **b)** das Diagramm mit  $61\pm 9$  nm Abstand.



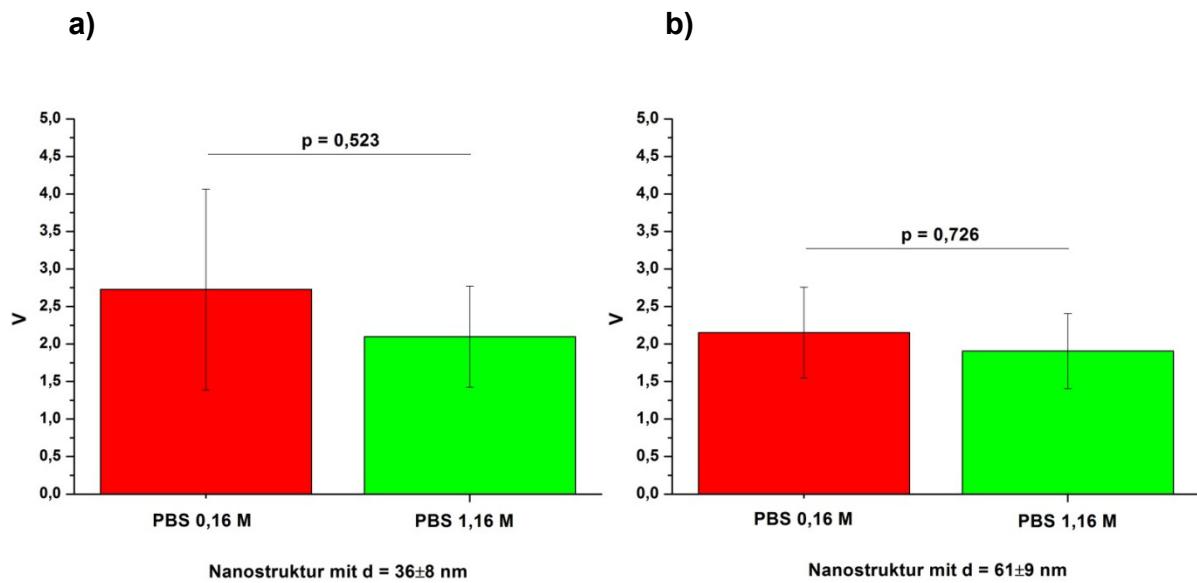
**Abbildung 31: Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung von Fn Dimeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

Aus Abbildung 31 geht hervor, dass es keine Konzentrationsabhängigkeit unter den gegebenen Bedingungen und Anzahl der Versuche gibt. Die Werte liegen innerhalb der Fehlerbalken und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Auch bei dem visuellen Vergleich der Aufnahmen fallen keine Unregelmäßigkeiten auf.

### 3.2.1.3 Direkte Anbindung des Fn Dimers in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration

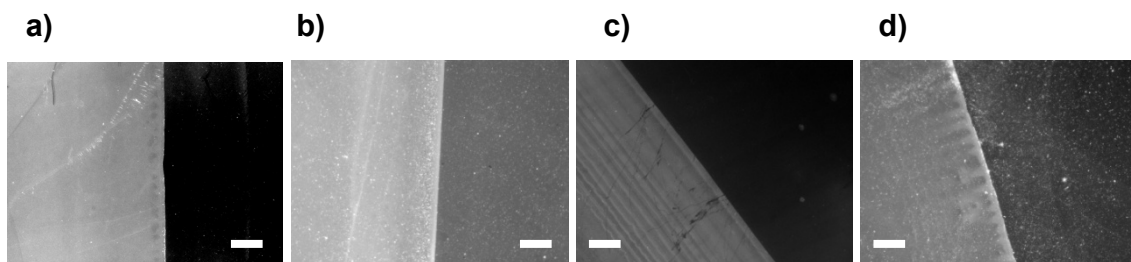
Bei diesem Versuch wird untersucht, ob eine höhere Salzkonzentration des Puffers (1 M NaCl) einen Einfluss auf die direkte Anbindung hat. Wie in Kap. 2.1.3 beschrieben, wird in der Literatur über eine Konformationsänderung des Fibronektins berichtet, die durch die Störungen der elektrostatischen Wechselwirkungen im Molekül zustande kommen. Diese werden durch höhere Ionenstärken des Puffers verursacht.

In Abbildung 32 sind die Verhältnisse der Intensitätssignale auf der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur dargestellt. **a)** zeigt das Diagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abständen, **b)** das Diagramm mit  $61\pm 9$  nm Abständen.



**Abbildung 32: Abhängigkeit der Salzkonzentration des Puffers bei der direkten Anbindung von Fn Dimeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Puffers.

Es kann kein Einfluss der Salzkonzentration des Puffers auf das Anbindungsverhalten des Fn Dimers an die Nanostrukturen festgestellt werden. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Bei dem visuellen Vergleich der Aufnahmen der jeweiligen Dippkante fällt jedoch auf, dass das Fn Dimer in dem Puffer mit einer höheren Salzkonzentration eine stärkere Tendenz zeigt, sich an die passivierte Seite anzubinden (vgl. Abbildung 33).

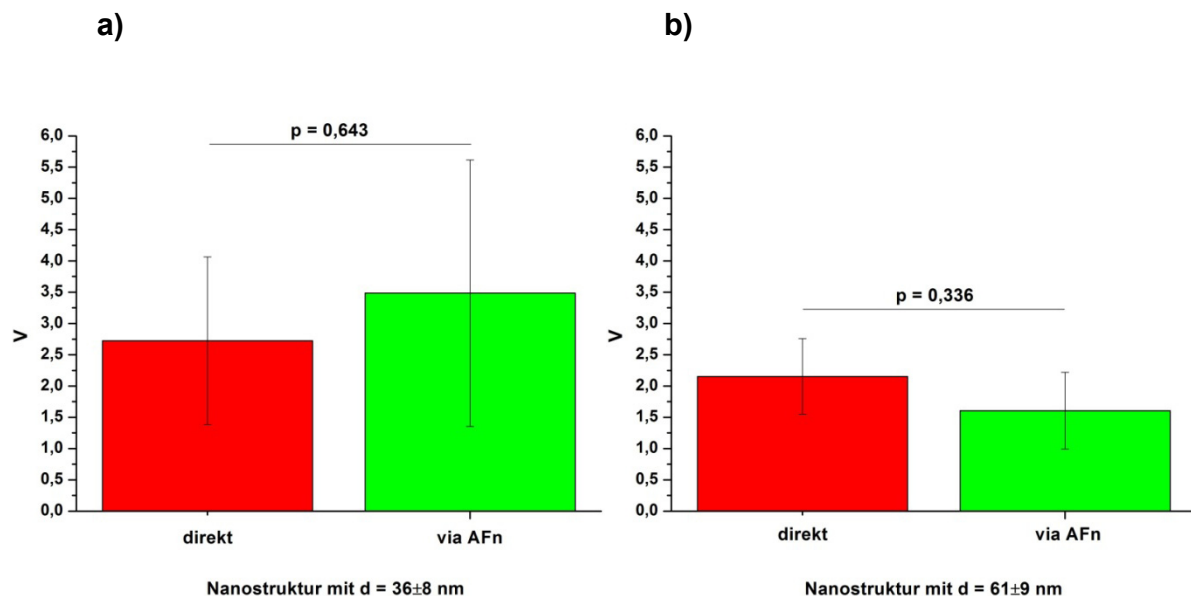


**Abbildung 33: Ein visueller Vergleich der Aufnahmen miteinander: a) Fn in PBS (d = 61 ± 9 nm), b) Fn in PBS+NaCl 1 M (d = 61 ± 9 nm), c) Fn in PBS (d = 36 ± 8 nm) und d) Fn in PBS+NaCl 1 M (d = 36 ± 8 nm).** Maßstab ist 100 µm.



### 3.2.1.4 Indirekte Anbindung von Fn Dimeren

In diesem Versuch wird überprüft, ob eine indirekte Anbindung des Fn Dimers über den Antikörper bessere Resultate als bei einer direkten Anbindung liefert. Wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, wird ein Antikörper ausgesucht, der eine bestimmte Domäne im Fn erkennt, die sich nahe dem C-Terminus befindet. Dadurch wird das Fn in einer gerichteten Orientierung an die Nanostruktur gebunden. In Abbildung 34 sind die Verhältnisse der Intensitätssignale auf der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur dargestellt. **a)** zeigt das Diagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abständen, **b)** das Diagramm mit  $61\pm 9$  nm Abständen aufgetragen.



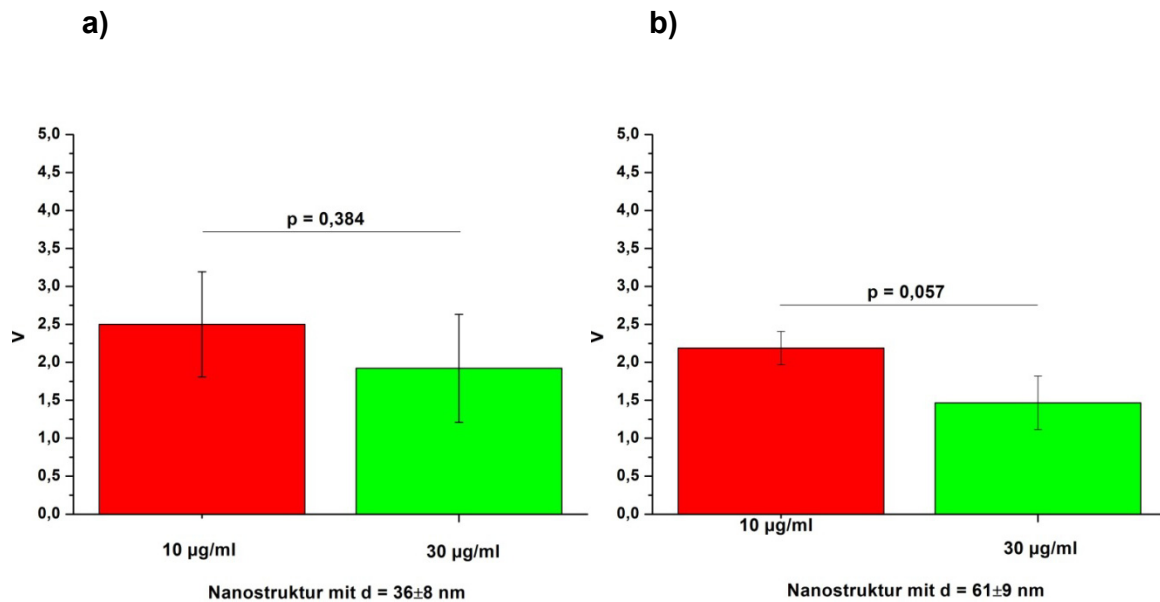
**Abbildung 34: Vergleich der direkten Anbindung des Fn Dimers mit einer indirekten über einen Antikörper an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der direkten und indirekten Anbindung des Fn Dimers an Nanostrukturen.

Auch bei diesem Versuch unterscheiden sich die Werte nicht signifikant voneinander.

### 3.2.1.5 Direkte Anbindung des Fn Monomers in PBS

Bei diesem Versuch wird untersucht, wie die Konzentrationsabhängigkeit der Proteinlösung das Anbindungsverhalten des Fn Monomers beeinflusst. In Abbildung 35 sind die Verhältnisse der Intensitätssignale der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne

Nanostruktur dargestellt. **a)** zeigt das Diagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abständen, **b)** das Diagramm mit  $61\pm 9$  nm Abständen.



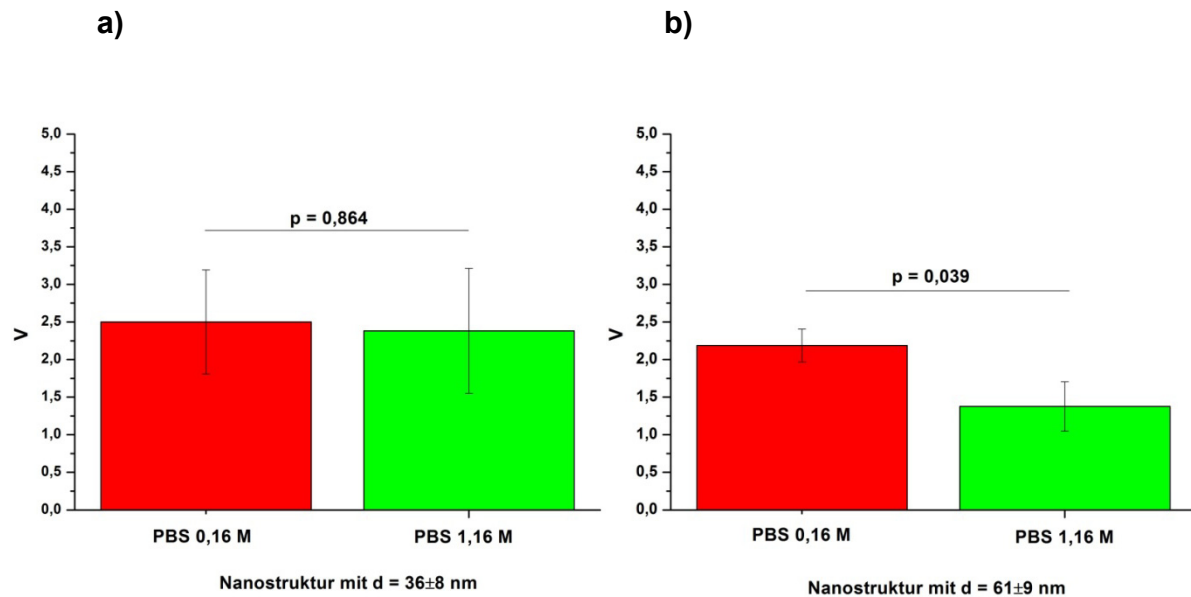
**Abbildung 35: Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen auf der Nanostruktur mit kleineren Abständen, aber beinahe signifikanten Unterschied auf der Nanostruktur mit größeren Abständen.

In diesem Fall ist die Tendenz bei der Anbindung des Fn Monomers deutlicher als im Falle des Dimers: bei einer höheren Proteinkonzentration wird das Verhältnis  $V$  kleiner. Die Werte für die Anbindung an die Nanostruktur mit kleineren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Jedoch zeigt sich bei der Anbindung an die Nanostruktur mit größeren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln ein Unterschied ( $p = 0,0566$ ), der nahe dem Grenzwert liegt. In diesem Fall bedeutet dies, dass sich bei der höheren Konzentration der Proteinlösung eine stärkere Anbindung des Proteins an die Seite ohne Nanostruktur stattfindet.

### 3.2.1.6 Direkte Anbindung des Fn Monomers in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration

Bei diesem Versuch wird die Abhängigkeit der Salzkonzentration des Puffers bei der Anbindung des Fn Monomers untersucht. Die Verhältnisse der Intensitätssignale auf der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur werden miteinander verglichen: die Anbindung von Fn Monomer in PBS bzw. in einem PBS Puffer mit NaCl Zusatz

(1 M). In Abbildung 36 zeigt **a)** das Balkendiagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abständen, **b)** das Balkendiagramm mit  $61\pm 9$  nm Abständen.

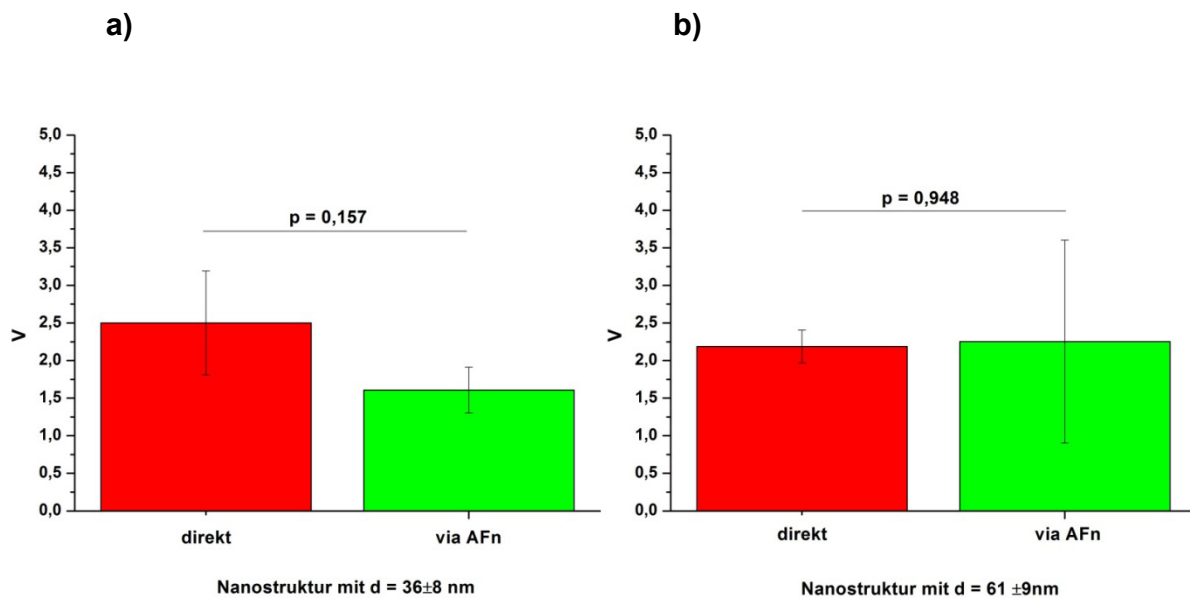


**Abbildung 36: Abhängigkeit der Salzkonzentration des Puffers bei der direkten Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Puffers auf der Nanostruktur mit kleineren Abständen, aber einen signifikanten Unterschied auf der Nanostruktur mit größeren Abständen.

Aus Abbildung 36 geht hervor, dass eine höhere Salzkonzentration des Puffers bei der Anbindung an die Nanostruktur mit kleineren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln keinen Einfluss hat. Im Gegensatz dazu ist der Unterschied bei größeren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln signifikant ( $p < 0,05$ ). In diesem Fall ist eine höhere Salzkonzentration des Puffers von Nachteil.

### 3.2.1.7 Indirekte Anbindung von Fn Monomeren

Bei diesem Versuch sollten die direkte und die indirekte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostrukturen miteinander verglichen werden. In Abbildung 37 sind die Verhältnisse der Intensitätssignale der beiden Anbindungsmethoden auf der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur dargestellt. **a)** zeigt das Balkendiagramm für die Nanostruktur mit  $36\pm 8$  nm Abständen, **b)** das Balkendiagramm mit  $61\pm 9$  nm Abständen.



**Abbildung 37: Vergleich der direkten Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur mit einer indirekten über einen Antikörper: a) 36 nm, b) 61 nm.** Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der direkten und indirekten Anbindung des Fn Monomers an Nanostrukturen.

Auf der Nanostruktur mit kleineren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln ist der Unterschied zwischen einer direkten und einer indirekten Anbindung deutlich zu sehen, dieser ist jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ist auf der Nanostruktur mit größeren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln kein Unterschied zu verzeichnen.

## 3.2.2 Diskussion

### 3.2.2.1 Bestimmung der Markierungseffizienz

Wie in Kap. 5.3.3.1 beschrieben erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentration  $c_{\text{Protein}}$  des mit Fluorophor markierten Proteins nach der Gleichung (15)<sup>142</sup> (vgl. Kap. 5.3.3.1). In Tabelle 20 sind die zusammengefassten Daten dargestellt ( $\epsilon_{\text{Protein}}$  Werte sind aus<sup>169</sup> und<sup>170</sup> entnommen):

Tabelle 20: Bestimmung der Proteinkonzentration.

<b>Protein</b>	$\epsilon_{\text{Protein}}$ [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	<b>Fluorophor</b>	$A_{280}$	$A_{\text{Absorption}}$	<b>K</b>	$C_{\text{Protein}}$ [M]
Fn Dimer	742500	Alexa Fluor 488	0,060	0,085	0,11	6,89×10 <sup>-8</sup>
Fn Dimer	742500	Alexa Fluor 568	0,104	0,137	0,46	9,60×10 <sup>-8</sup>
Fn Monomer	367375	Alexa Fluor 568	0,221	0,271	0,46	2,62×10 <sup>-7</sup>

Die erhaltenen Werte für  $C_{\text{Protein}}$  werden für die Bestimmung der Markierungseffizienz nach der Gleichung (16) (vgl. Kap. 5.3.3.1) eingesetzt. In Tabelle 21 sind die zusammengefassten Daten dargestellt:

Tabelle 21: Bestimmung des Markierungsgrades.

<b>Fluorophor</b>	$\epsilon_{\text{Fluorophor}}^{142}$ [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Protein}}$ [M]	<b>N</b>
Alexa Fluor 488	71000	6,89×10 <sup>-8</sup>	17,4
Alexa Fluor 568	91300	9,60×10 <sup>-8</sup>	15,6
Alexa Fluor 568	91300	2,62×10 <sup>-7</sup>	11,4

Der Markierungsgrad der Proteine liegt in dem erwarteten Bereich der Markierungseffizienz des Herstellers.

### 3.2.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Proteinlösung bei der direkten Anbindung

Bei diesem Versuch werden die Nanostrukturen mit Abständen 61±9 nm und 36±8 nm eingesetzt, um die Abstandsabhängigkeit der Anbindung zu untersuchen. Zugleich ist hier ein weiterer Parameter von großem Interesse: Die Proteinkonzentration. Mit einer steigenden Konzentration des Proteins in der Inkubationslösung sollen noch mehr Proteinmoleküle zur Anbindung an die Gold-Nanopartikel zur Verfügung stehen. Demzufolge wird erwartet, dass die Effizienz der Anbindung steigt.

Eine Rechnung wird angestellt, in der man berücksichtigt, wie hoch die Konzentration an Proteinmolekülen sein müsste, damit alle Gold-Nanopartikel besetzt sind: Auf ein

Silizium-Plättchen mit einem Maß von etwa  $1 \times 1,5$  cm nimmt die Nanostruktur eine ca.  $1 \times 1$  cm Fläche ein. Auf der  $1 \times 1$  cm Oberfläche mit  $d_{\text{Gold}} = 36 \pm 8$  nm bzw.  $61 \pm 9$  nm ist die Anzahl der Gold-Nanopartikel  $N_{\text{Gold}} = (7,7 \pm 3,4) \times 10^{10}$  bzw.  $(2,7 \pm 0,9) \times 10^{10}$ . In Tabelle 22 ist die berechnete Anzahl der Proteinmoleküle  $N_{\text{Protein}}$  bei der Konzentration der Proteinlösung  $c_{\text{Protein}}$  von 10  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 30  $\mu\text{g/ml}$  in 300  $\mu\text{l}$  Proteinlösung aufgeführt:

**Tabelle 22: Berechnete Anzahl der Proteinmoleküle in 300  $\mu\text{l}$  Proteinlösung**

Protein	$c_{\text{Protein}}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$N_{\text{Protein}}$
Fn Monomer	10	$7,5 \times 10^{12}$
	30	$2,25 \times 10^{13}$
Fn Dimer	10	$4,35 \times 10^{12}$
	30	$1,31 \times 10^{13}$

Wie aus Tabelle 22 ersichtlich, sind in den 300  $\mu\text{l}$  Proteinlösung unabhängig von der Konzentration genug Proteinmoleküle enthalten, um jedes Gold-Nanopartikel zu besetzen.

Tatsächlich ist eine Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung (nahe dem Grenzwert der Signifikanz) bei dem Fn Monomer auf Nanostrukturen mit größeren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln zu verzeichnen. Dabei erhöht sich mit der steigenden Proteinkonzentration gleichzeitig die Menge an Protein, welches unter anderem an die Seite ohne Nanostruktur bindet. Dies spiegelt sich im Verhältnis der Intensitätssignale zwischen den Seiten mit Nanostruktur und ohne wider: Dieses wird kleiner. Also ist in diesem Fall eine Erhöhung der Proteinkonzentration von Nachteil.

Im Falle des Fn Dimers unterscheiden sich die Werte für beide Nanostrukturen und für beide Proteinkonzentrationen nicht signifikant voneinander. Die Gründe dafür können in einer nicht immer gleichen Homogenität der zu vergleichenden Proben liegen.

### **3.2.2.3 Abhängigkeit der direkten Anbindung von der Salzkonzentration des Puffers**

Bei diesem Versuch wird untersucht, ob eine Erhöhung der Salzkonzentration des Puffers, in dem Proteine vorliegen, einen Einfluss auf die Effizienz der Anbindung hat. Hierfür wird einmal im PBS unter physiologischen Bedingungen gearbeitet und einmal im PBS mit einem Zusatz von Kochsalz NaCl (1 M). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine

Erhöhung der Salzkonzentration des Puffers eine Störung der elektrostatischen Wechselwirkungen in dem Fn Molekül hervorruft, indem das Protein eine lockerere Konformation einnehmen kann. Hierbei werden seine verborgenen, freien Cysteinreste (Sulfhydrylgruppen) zugänglicher<sup>143</sup>. Dies sollte die Effizienz der Anbindung des Proteins an die Gold-Nanopartikel verbessern.

Bei der Anbindung des Fn Monomers an Nanostrukturen mit größeren Abständen zwischen den Gold-Nanopartikeln wird tatsächlich ein signifikanter Unterschied beobachtet: Das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen den Seiten mit Nanostruktur und ohne wird bei höheren Salzkonzentration des Puffers kleiner. Dies bedeutet, dass mehr Protein an die Seite ohne Nanostruktur bindet. Die Gründe dafür könnten in der Beeinträchtigung der proteinabweisenden Eigenschaft der Passivierungsschicht bei höheren Salzkonzentrationen des Puffers liegen.

Im Falle des Fn Dimers besteht jedoch kein signifikanter Unterschied bei der Anbindung. Dies könnte wiederum an der unterschiedlichen Homogenität der zu vergleichenden Proben liegen.

#### **3.2.2.4 Vergleich der direkten mit der indirekten Anbindung**

Bei diesen Versuchen wird überprüft, ob beide Anbindungsstrategien in ihrer Effizienz vergleichbar sind. Hierbei wird eine direkte Anbindung des Fn Dimers oder Monomers mit einer indirekten Anbindung über einen Antikörper, der eine spezifische Domäne am C-Terminus des Fn erkennt, verglichen.

Dabei stellt sich heraus, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Intensitätsverhältnissen zwischen den Seiten mit Nanostruktur und ohne auf unterschiedlichen Nanostrukturen sowohl für das Fn Dimer als auch für das Fn Monomer gibt. Dies könnte bedeuten, dass die Effizienz beider Anbindungsstrategien vergleichbar ist. Die Entscheidung darüber, welche Strategie anzuwenden ist, wird nach der Fragenstellung getroffen, ob statistisch oder gerichtet orientierte Proteine auf der Nanostruktur erwünscht sind.

Beim Vergleich von Fluoreszenz- und QCM-D-Daten muss darauf hingewiesen werden, dass die Fluoreszenzmethode in diesem Fall relative und QCM-D absolute experimentelle Werte liefert. Bei der QCM-D Methode ist kein interner Vergleich (ein Vergleich innerhalb der Probe) möglich (vgl. Kap. 5.3.1). Hierzu sollen die Sensitivitätsbereiche beider Methoden beachtet werden: Einzelne Fn Moleküle, die auf dem passivierten QCM-D Kristall adsorbieren, können bei einem QCM-D Experiment

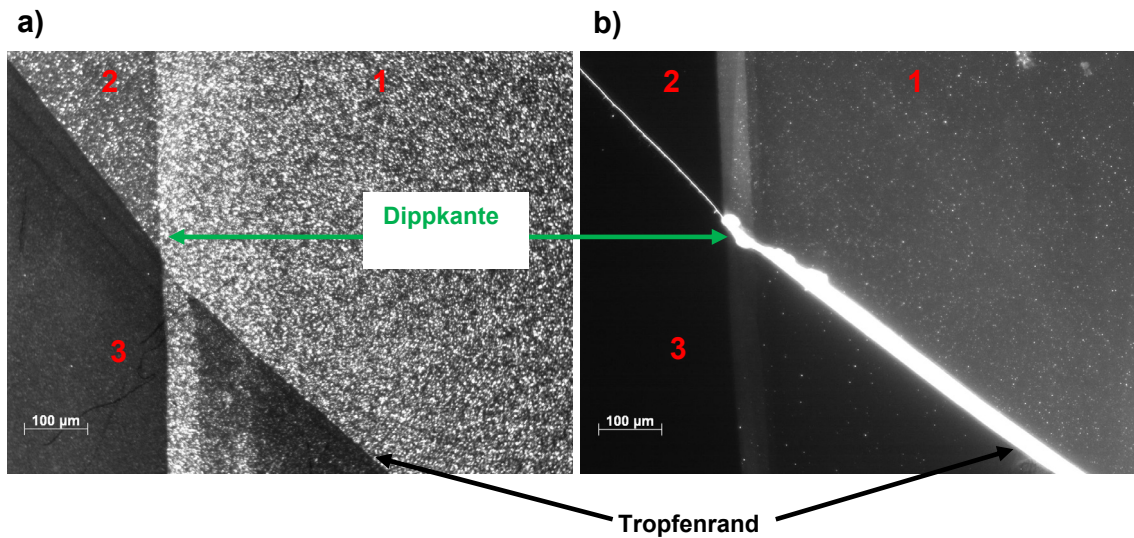
nicht detektiert werden. Somit lassen sich Ergebnisse beider Methoden nicht direkt miteinander vergleichen.

### **3.2.2.5 Wichtigkeit der Qualität der Passivierungsschicht**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der empfindlichsten Methoden zur Analyse der Anbindung eines Fluorophor-markierten Proteins an eine Oberfläche<sup>140</sup>. Die in dieser Arbeit eingesetzten Oberflächen sind nicht homogen: Es gibt Nanostrukturen und eine Passivierungsschicht, die proteinabweisende Eigenschaften aufweist. Die Qualität der Passivierungsschicht ist von großer Bedeutung. Wenn diese nicht gut genug ist, findet eine Proteinadsorption auf der Oberfläche dort statt, wo sie unerwünscht ist. Dieses Geschehen erschwert dann die Aussage über den Unterschied der Anbindung des Proteins auf der Seite mit Nanostruktur und auf der Seite ohne.

Wie in Kap. 5.3.3.2 beschrieben wird die Nanostruktur auf der Hälfte des einzelnen Silizium-Plättchens aufgebracht und die Passivierungsschicht bedeckt das ganze Plättchen. Die Proteinlösung wird in Form eines Tropfens in der Mitte des Plättchens platziert dort, wo die Dippkante verläuft, damit man die Signalintensitäten der mit Protein benetzten Oberfläche mit der proteinfreien vergleichen kann. In Abbildung 38 werden zwei Aufnahmen miteinander verglichen, um auf die Wichtigkeit der Passivierungsschicht hinzuweisen. Auf beiden Aufnahmen ist eine Dippkante mit dem Tropfenrand zu sehen. Im ersten Fall ist der Unterschied zwischen der Seite mit Nanostruktur **1** und der Seite ohne Nanostruktur **2** dort, wo die Inkubation mit dem markierten Fn Dimer stattfand, kaum zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist der Unterschied zwischen **1** und **2** auf der zweiten Aufnahme deutlich höher. Außerdem unterscheiden sich die Verhältnisse der passivierten Seiten **2** und **3** um eine Einheit voneinander (vgl. Tabelle 23).





**Abbildung 38:** Andeutung der Wichtigkeit der Qualität der Passivierungsschicht. Auf dem Bild a) ist die Passivierung deutlich schlechter als auf dem Bild b). Die visuellen Unterschiede zwischen der Seite mit Nanostruktur **1** und der Seite ohne Nanostruktur **2** sind deutlich zu sehen.

**Tabelle 23:** Zusammengefasste Daten der Intensitätsverhältnisse

Bild	Intensitätsverhältnis von <b>1</b> zu <b>2</b>	Intensitätsverhältnis von <b>2</b> zu <b>3</b>
a)	1,03±0,789	2,34±0,422
b)	4,04±0,240	1,33±0,158

### 3.2.2.6 Abstandsabhängigkeit der Gold-Nanopartikeln zueinander

Wie oben erwähnt ist Fluoreszenzmikroskopie eine sensitive Methode, um sogar einzelne mit Fluorophor markierte Proteinen nachzuweisen<sup>140</sup>. Daher wird bei der Entscheidung, die Fluoreszenzexperimente durchzuführen, eine Hypothese aufgestellt, dass es möglich ist, den Unterschied der Signalintensitäten auf den Nanostrukturen mit zwei unterschiedlichen Abständen zu sehen. Bei der Durchführung der Experimente stellte sich heraus, dass sich die absoluten Werte der Intensitätssignale, die bei in diesem Kapitel aufgeführten Versuchen erhalten werden, nicht direkt miteinander vergleichen lassen. Die Gründe dafür liegen in nicht immer gleicher Intensität der Quecksilberlampe und nicht immer gleicher Ausprägung der unspezifischen Anbindung an die Seite ohne Nanostruktur. Deswegen werden keine absoluten Werte miteinander verglichen, sondern die Verhältnisse  $V$  der Signalintensitäten von der Seite mit Nanostruktur  $\bar{M}_{\text{Nanostruktur}}$  zu der Seite ohne Nanostruktur  $\bar{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$ . Dieses

Verhältnis beschreibt, wie gut sich das Protein an die Seite ohne Nanostruktur bindet (vgl. Kap. 5.3.3.3):

$$V = \frac{\overline{M}_{\text{Nanostruktur}}}{\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}} \quad (3)$$

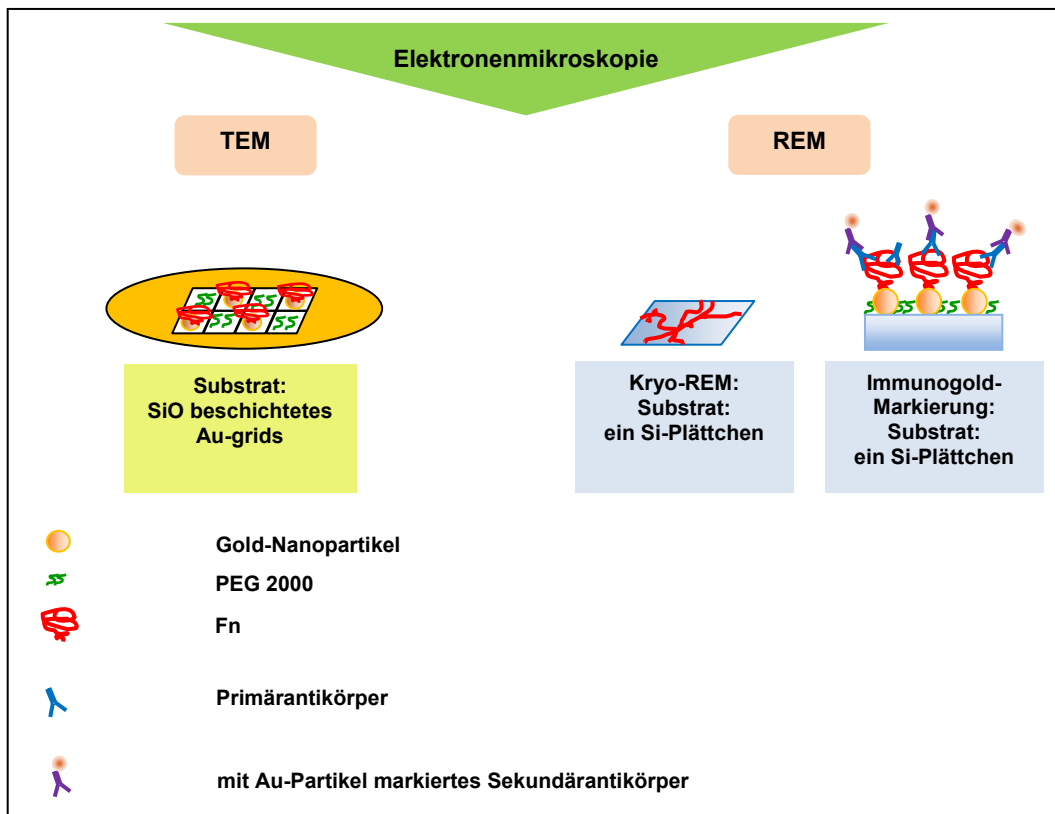
Ist  $V$  groß, bedeutet dies, dass die Passivierungsschicht gut proteinabweisend ist und auf der Seite ohne Nanostruktur wenige Proteine anbinden ( $\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$  ist klein). Das Gegenteil tritt in zwei Fällen ein:

- Auf der Seite ohne Nanostruktur ist eine unspezifische Proteinadsorption stattgefunden ( $\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$  ist groß).
- Auf der Seite mit Nanostruktur ist wenig Protein angebunden ( $\overline{M}_{\text{Nanostruktur}}$  ist klein).

Bei diesen Versuchen liefert der Vergleich jeweiligen Verhältnisse auf Nanostrukturen mit zwei unterschiedlichen Abständen miteinander keinen signifikanten Unterschied zweier Datensätze. Die Gründe dafür können in der nicht immer gleicher Ausprägung der unspezifischen Anbindung an die Seite ohne Nanostruktur und nicht immer gleichen Homogenität der zu vergleichenden Proben liegen.

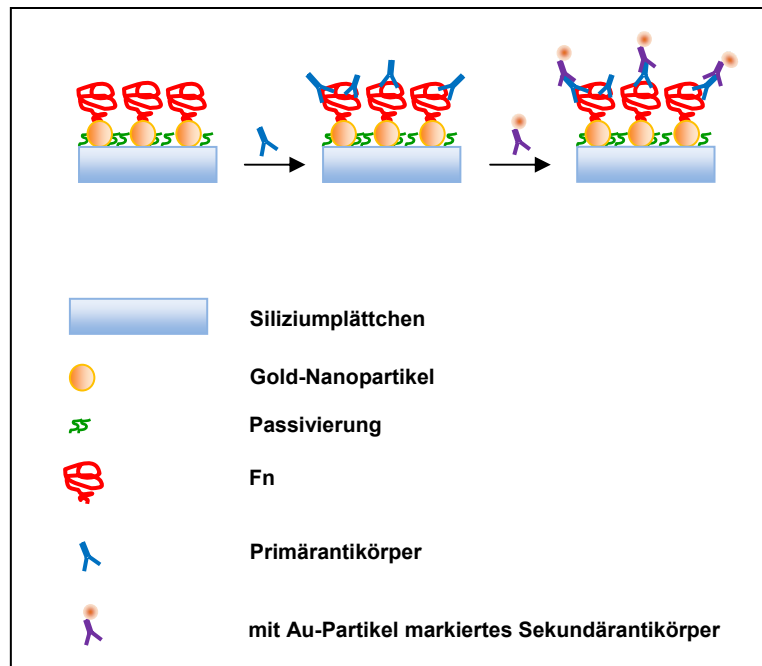
### 3.3 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ist dank ihrer hohen Auflösung eine wertvolle Technik für strukturelle Untersuchungen im Nanometermaßstab. In dieser Arbeit werden sowohl Raster- als auch Transmissionselektronenmikroskopische Experimente durchgeführt (vgl. Abbildung 39)



**Abbildung 39:** Schematische Darstellung der elektronenmikroskopischen Experimenten. Bei TEM sowie bei REM Experimenten wird die Effizienz der direkten Anbindungsstrategie von Fn Dimeren untersucht. Bei REM wird zusätzlich Fibrillenbildung bei Kryo-Bedingungen sowie Immunogold-Markierung

Die rasterelektronenmikroskopischen Proben liefern wertvolle Informationen über die Gestalt und den Aufbau des Fn Netzwerkes. Außerdem werden mittels dieser Methode kombiniert mit einer Immunogold-Markierung die Positionen einzelner Fn Moleküle, deren Elektronendichte zur Detektion ansonsten nicht ausreicht, bestimmt (vgl. Abbildung 40).



**Abbildung 40: Schematische Darstellung einer Immunogoldmarkierung.**

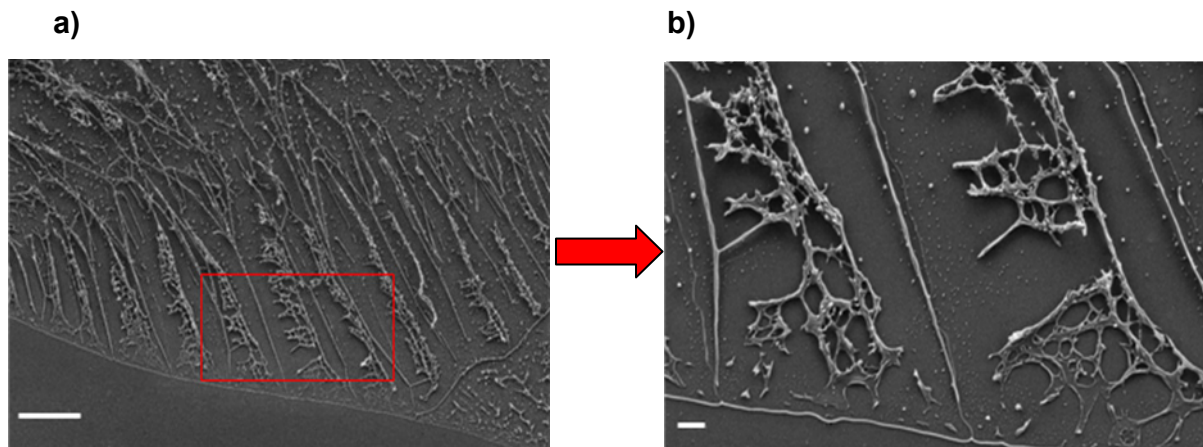
Die Transmissionselektronenmikroskopie erlaubt eine Visualisierung der über den Linker und Antikörper angeordneten Fn Moleküle. Weiterhin wird ein Einblick in die Nanostruktur bei guter Auflösung ermöglicht.

### 3.3.1 Ergebnisse

#### 3.3.1.1 Die Untersuchung des Fn Netzwerkes mittels Kryo-REM

Die rasterelektronenmikroskopische Experimente unter Kryo-Bedingungen (bei den Temperaturen nahe dem Siedepunkt des flüssigen Stickstoffs  $-183^{\circ}\text{C}$ ) liefern wertvolle Informationen über das Fn Netzwerk.

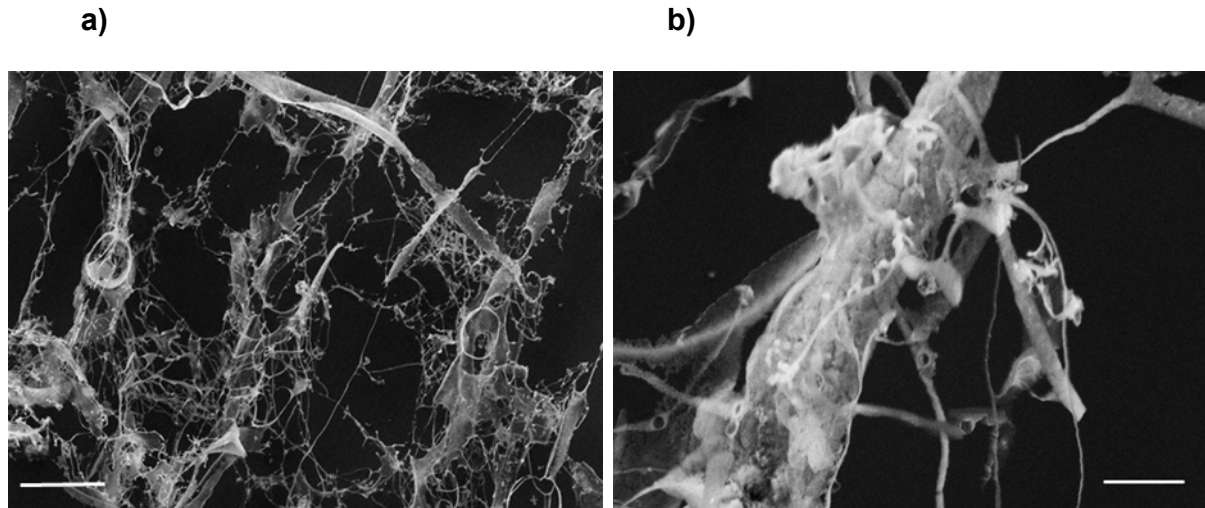
In Abbildung 41 sieht man, wie ein geordnetes Fn Netzwerk entlang des austrocknenden Tropfens der Proteinlösung ausgebildet wird. In **a)** ist ein Überblick über eine größere Fläche dargestellt, in **b)** werden im roten Rechteck eingeschlossenen Strukturen näher betrachtet.



**Abbildung 41:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerkes entlang des austrocknenden Tropfens der Proteinlösung: a) ein Überblick; b) eine nähere Betrachtung. Der Maßstab in a)  $10\ \mu\text{m}$ , in b)  $1\ \mu\text{m}$ .

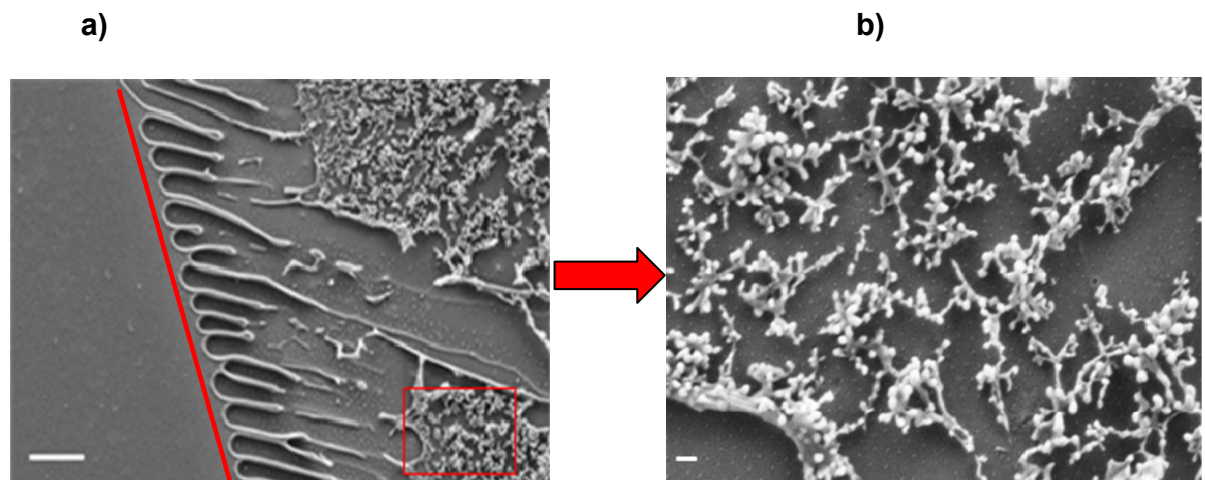
Einige Fibrille sind mehr, die anderen weniger gerichtet und gestreckt. Die längste gestreckte Fibrille beträgt etwa  $58\ \mu\text{m}$ , die kürzeste etwa  $5\ \mu\text{m}$ .

Näher zu der Mitte des Tropfens fallen unter anderem auch ungeordnete entspannte faserige Strukturen auf (vgl. Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerks in der Mitte des aufgetragenen Tropfens. Es sind mehr ungeordnete entspannte faserige Strukturen vorhanden. Der Maßstab beträgt in a) 10  $\mu\text{m}$ , in b) 1  $\mu\text{m}$ .

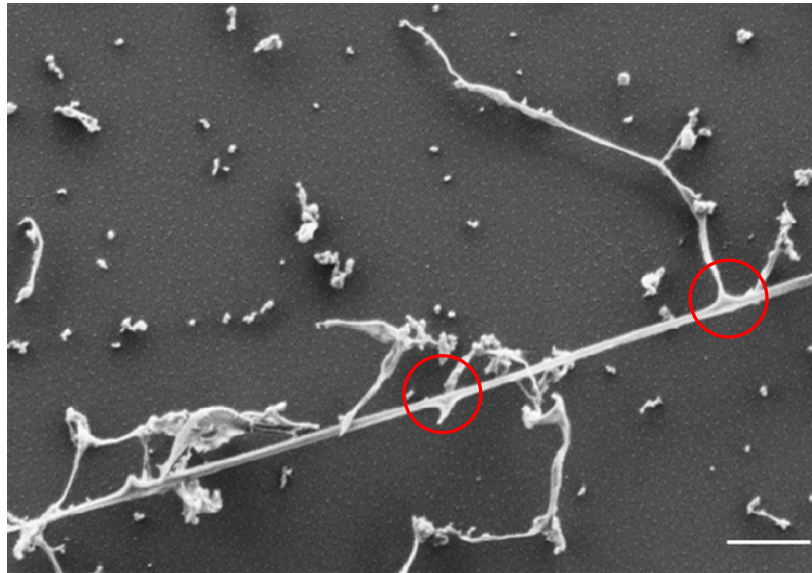
In Abbildung 43 a) wird eine weitere Struktur eines Fn Netzwerks dargestellt. Am Rand des Tropfens befinden sich noch ausgebildete Fibrillen (rote Linie). Im Anschluss findet sich eine Mischung aus gestreckten Fn Fibrillen und aus Knoten. Eine im roten Rechteck eingeschlossene Region ist vergrößert in Abbildung 43 b) dargestellt.



**Abbildung 43:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerks, die gestreckte Fibrillen und Knoten beinhaltet: a) ein Überblick; in b) eine nähere Betrachtung. Der Maßstab beträgt in a) 2  $\mu\text{m}$ , in b) 200 nm.

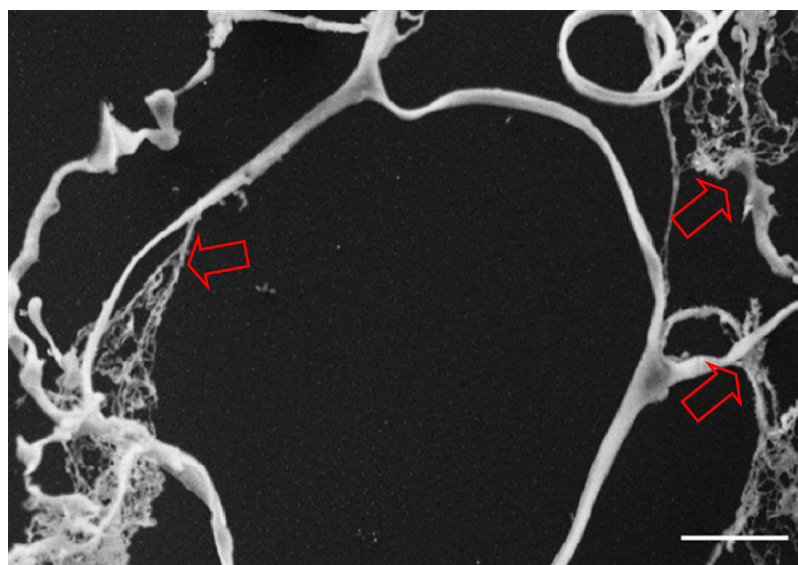
Der mittlere Durchmesser eines Knotens beträgt  $71,1 \pm 20,0$  nm.

Betrachtet man eine gestreckte Fn Fibrille mit einigen Abzweigungen (roter Kreis, Abbildung 44) genauer, lassen sich Details zur Struktur der Fibrillen erkennen. Es fällt dabei auf, dass die hier gezeigte Fibrille aus zwei dünneren Fibrillen besteht, wie auch von Ulmer *et al.* beobachtet wird<sup>52</sup>.



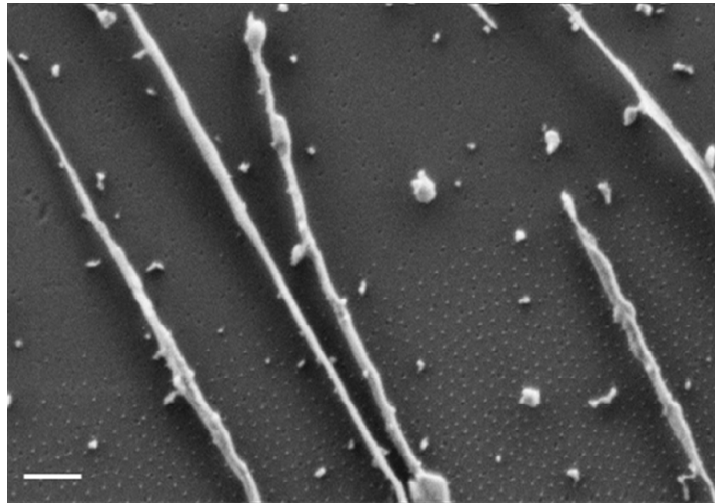
**Abbildung 44:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer gestreckten Fn Fibrille. Diese besteht aus zwei dünneren Fibrillen. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 45 sind ungeordnetere und lockerere Fibrillen dargestellt. Es ist sichtbar, dass die dickeren Fibrillen aus etwa 15-25 dünneren Fasern aufgebaut sind:



**Abbildung 45:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer dicken Fibrillen, die aus vielen dünnen und entspannten Fasern bestehen. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

Ob die Nanostruktur während des gesamten Präparationsprozesses der Probe erhalten bleibt, ist in Abbildung 46 zu erkennen. Abgebildet ist die Dippkante mit Fn Fibrillen.



**Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Dippkante mit Fn Fibrillen. Der Maßstab beträgt 400 nm.**

Die Nanostruktur behält die hexagonale Anordnung der Gold-Nanopartikel bei, jedoch fällt auf, dass sich die Fibrillen entlang des Tropfens auch auf dem nicht nanostrukturierten Teil der Oberfläche befinden.

In Tabelle 24 sind alle gemessenen Daten bezüglich des Fibrillen-, Fasern- und Knotendurchmessers aufgeführt:

**Tabelle 24: Durchmesser der Strukturen des Fn Netzwerkes**

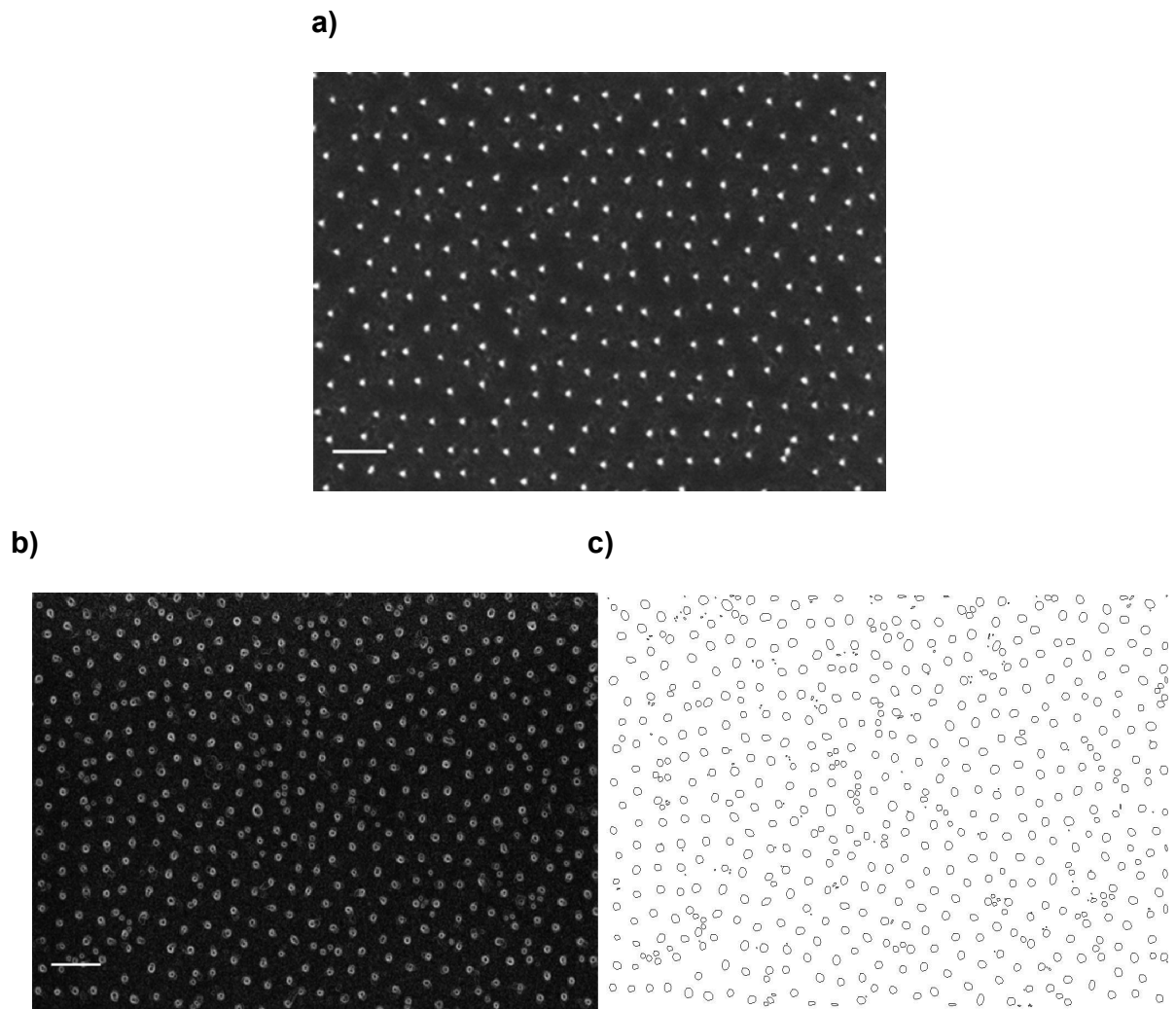
Struktur	mittlerer Durchmesser [nm]	kleinster Durchmesser [nm]	größter Durchmesser [nm]
Knoten	71,090±20,023	43,815	118,394
Doppelfibrille	97,652±12,971	79,824	115,96
Einzelfibrille in einer Doppelfibrille	57,007±10,544	35,395	73,347
Faser	20,471±4,061	11,541	25,806



### **3.3.1.2 Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden**

Bei diesem Versuch soll untersucht werden, wie effizient eine direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur ist. Um dies zu überprüfen, wird das an die Nanostruktur gebundene Fn mittels Immunoreaktion mit einem Primär- und Sekundärantikörper markiert. An den Sekundärantikörper sind 10 nm große Gold-Kolloide gekoppelt. Hiermit kann im REM die Position des an die Nanostruktur gebundenen Proteins visualisiert werden (vgl. Abbildung 40).

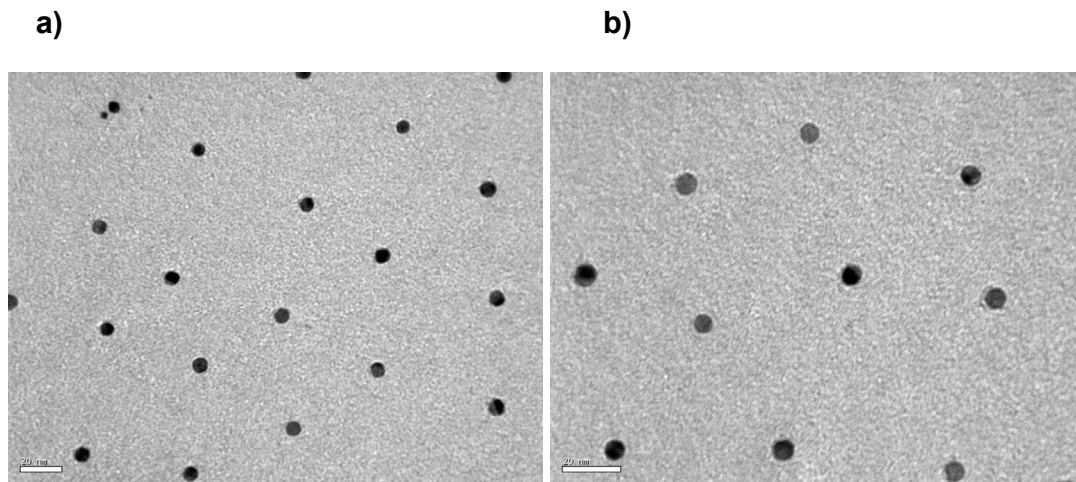
Die Nanostruktur ohne Protein (Abbildung 47 **a**) zeigt das typische hexagonale Muster, während bei der Nanostruktur mit Protein und Immunomarkierung weitere kleinere Partikeln zu sehen sind. Die Auswertung mit ImageJ bei der Ellipsen, die an die Umrandungen der Partikel angepasst sind (vgl. Abbildung 47 **b**) und **c**)), ergibt, dass  $12\pm 4\%$  der Nanostruktur mit Proteinen bedeckt ist.



**Abbildung 47:** a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Nanostruktur. b) + c) Eine Auswertung mittels ImageJ: links ist die 8 bit-Aufnahme mit Umrandungen der Nanopartikeln versehen, rechts sind an die Umrandungen Ellipsen angelegt. Der Maßstab beträgt 100 nm.

### 3.3.1.3 TEM Untersuchung

Bei diesem Experiment wird untersucht, welche der Anbindungsstrategien des Fn an die Nanostruktur - die direkte, die indirekte über einen Antikörper oder die indirekte über einen Sulfo-DSP Linker und einen Antikörper - effizienter ist. Dafür werden Goldnetzchen, wie in Kap. 5.3.4.3 beschrieben, vorbereitet. Eine Referenzprobe mit Nanostruktur (Abbildung 48a)) zeigt die typische hexagonale Anordnung der Gold-Nanopartikel.

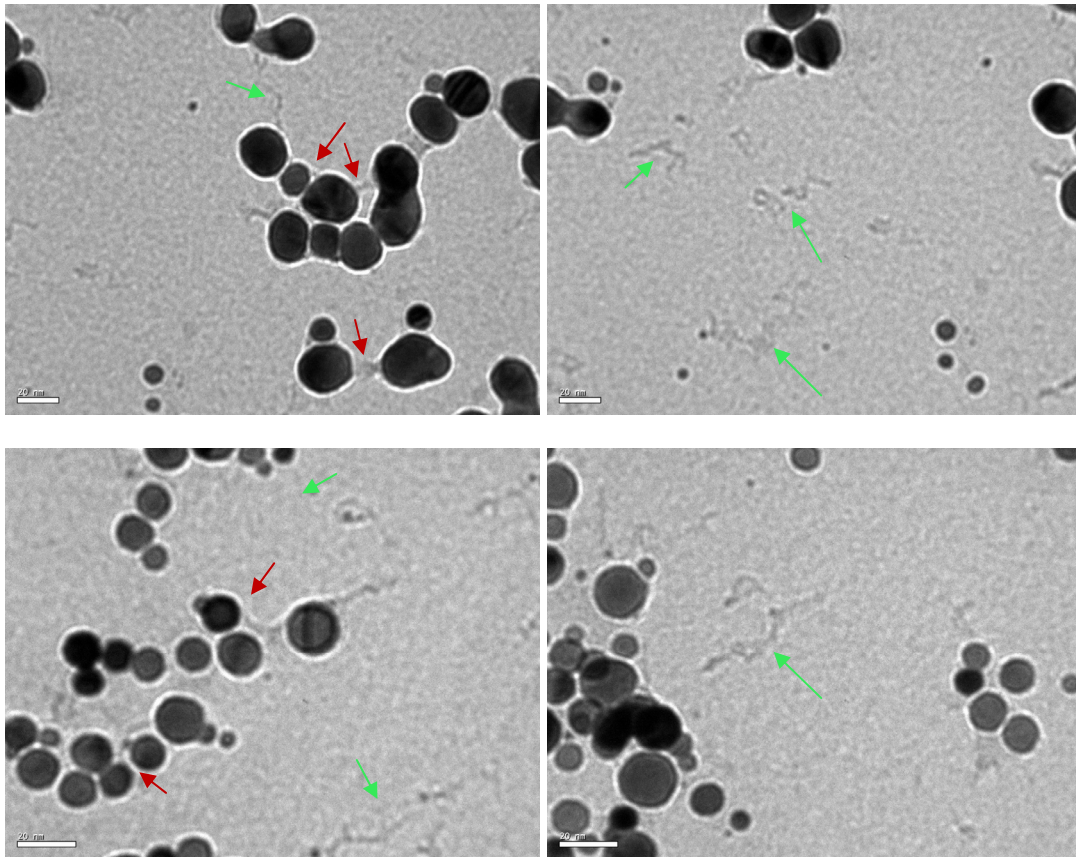


**Abbildung 48: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Referenzproben a) nanostrukturiert, b) nanostrukturiert und anschließend passiviert. Der Maßstab beträgt 20 nm.**

Die Nanopartikel sind  $6,9 \pm 0,5$  nm groß. Die Nanostruktur bleibt auf den Netzen auch während der Passivierungsprozedur erhalten (vgl. Abbildung 48b)).

Bei diesen Experimenten stellt sich heraus, dass aufgrund der kleinen Elektronendichte der einzelnen Fn Moleküle diese im TEM trotz Anfärben mit dem Schwermetallsalz (Uranylacetat) nicht visualisiert werden können. Jedoch sind bei der indirekten Anbindung über einen Sulfo-DSP Linker und einen Antikörper Moleküle im Zwischenraum auf der Passivierungsschicht aufzufinden (grüne Pfeile, Abbildung 49). Bei den anderen Anbindungsmethoden konnten keine Fn-Moleküle im Zwischenraum detektiert werden.

Aus Abbildung 49 geht zudem deutlich hervor, dass die Nanostruktur auf den Netzen während der Prozedur der Proteinanbindung nicht stabil ist und die Partikel sich verschieben. An einigen Stellen (rote Pfeile) sieht man, dass Nanopartikeln durch das Protein zusammengehalten werden. Die Gold-Nanopartikel sind größer als bei den Referenzproben.



**Abbildung 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der indirekten Anbindung des Fns über den Linker und den Antikörper an die Nanostruktur. Es sind Moleküle im Zwischenraum aufzufinden (grüne Pfeile). An einigen Stellen (rote Pfeile) werden Nanopartikeln durch das Protein zusammengehalten. Der Maßstab beträgt 20 nm.**

### 3.3.2 Diskussion

#### 3.3.2.1 REM-Experimente unter Kryo-Bedingungen

Bei diesen Experimenten wird das Fn Netzwerk visualisiert und untersucht. Dabei stellt sich heraus, dass das Netzwerk am Rande des austrocknenden Tropfens aus mehr geordneten und gestreckten Fibrillen besteht als in der Mitte des Tropfens. Außerdem weist das Netzwerk neben den fibrillären auch knotenförmige Strukturen auf. Dabei liegen die längste Fibrille bei etwa 58  $\mu\text{m}$  und die kürzeste bei etwa 5  $\mu\text{m}$ . Der Durchmesser des Knotens beträgt  $71 \pm 20$  nm. Der Knoten könnte aus mehreren Fn Molekülen aufgebaut sein. Ulmer *et al.* berichtet von etwa 32 nm großen Fn Einzelmolekülen, die sich an der Grenzfläche Puffer/Luft in einem Tropfen befinden<sup>52</sup>, so dass in diesem Experiment beobachtete Werte mit den Literaturwerten korrelieren.

Weiter zeigt das Experiment einige dickere gestreckte Fibrillen, die aus zwei dünneren bestehen. Hierbei beträgt der durchschnittliche Durchmesser einer Doppelfibrille  $98 \pm 13$  nm und der dünneren Einzelfibrillen  $57 \pm 11$  nm. Zusätzlich werden ungeordnetere und lockerere Fibrillen beobachtet, die aus etwa 15-25 dünneren etwa 20 nm dicken Fasern aufgebaut sind. Einzelne etwa 14 nm dicke Doppelfibrillen, die aus zwei etwa 7 nm dicken Fibrillen aufgebaut sind, wurden von Ulmer *et al.* beobachtet<sup>52</sup>. Weiterhin wird in der Literatur berichtet, dass die Fibrillen eines Fn Netzwerkes bis zu 1  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und dicker sein können. Diese Fibrillen bestehen aus dünneren, parallel angeordneten Fasern, die etwa 5 nm im Durchmesser sind<sup>144</sup>. Dieser Durchmesser liegt nahe demjenigen des einzelnen Fn Moleküls (3 nm)<sup>145</sup>. Jedoch ist bis zum heutigen Zeitpunkt keine exakte Anordnung der Fn Moleküle in den Filamenten (Fasern) bekannt. In diesem Zusammenhang entsprechen die in diesem Experiment bestimmten Werte den Literaturergebnissen.

Für weitere Arbeiten kann gezeigt werden, dass die Nanostruktur während der gesamten Präparation der Probe die hexagonale Anordnung der Gold-Nanopartikel beibehält. Die Fibrillen bilden sich entlang des Tropfens ebenfalls auf der Seite ohne Nanostruktur aus. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Fibrillen bereits auf Grund der höheren Proteinkonzentration während des Trocknungsprozesses sowie der Kapillarkraft bilden.

### 3.3.2.2 Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden

Bei diesen Experimenten wird die Effizienz einer direkten Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur überprüft. Dafür wird das Fn direkt an die Nanostruktur gebunden. Eine Visualisierung des angebondenen Moleküls erfolgt mittels einer Immunreaktion mit einem Primär- und Sekundärantikörper, an den Gold-Kolloide gekoppelt sind.

Die Analyse ergibt eine 12%-tige Bedeckung der Nanostruktur mit Protein. In der Literatur wird beschrieben, dass die Effizienz einer Immunomarkierung etwa bei einem Prozent liegt<sup>146</sup>. Es ist zu beachten, dass bei einer indirekten Markierung des Proteins mehrere Faktoren eine Rolle spielen:

- Nicht jedes Antikörpermolekül trägt ein Gold-Nanopartikel, da diese nicht kovalent gebunden sind<sup>146</sup>.
- Durch eine längere Präparation der Probe und anschließende mehrere Waschvorgänge können einzelne physisorbierte Fn Moleküle von der Oberfläche entfernt werden.

Um die Effizienz des Experiments zu steigern, soll das Fn Dimer direkt mit etwa 15 nm großen Gold-Kolloiden (synthetisiert von Dr. Roberto Fiammengio) über die NHS/EDC-Derivat Chemie markiert werden (vgl. Abbildung 50).

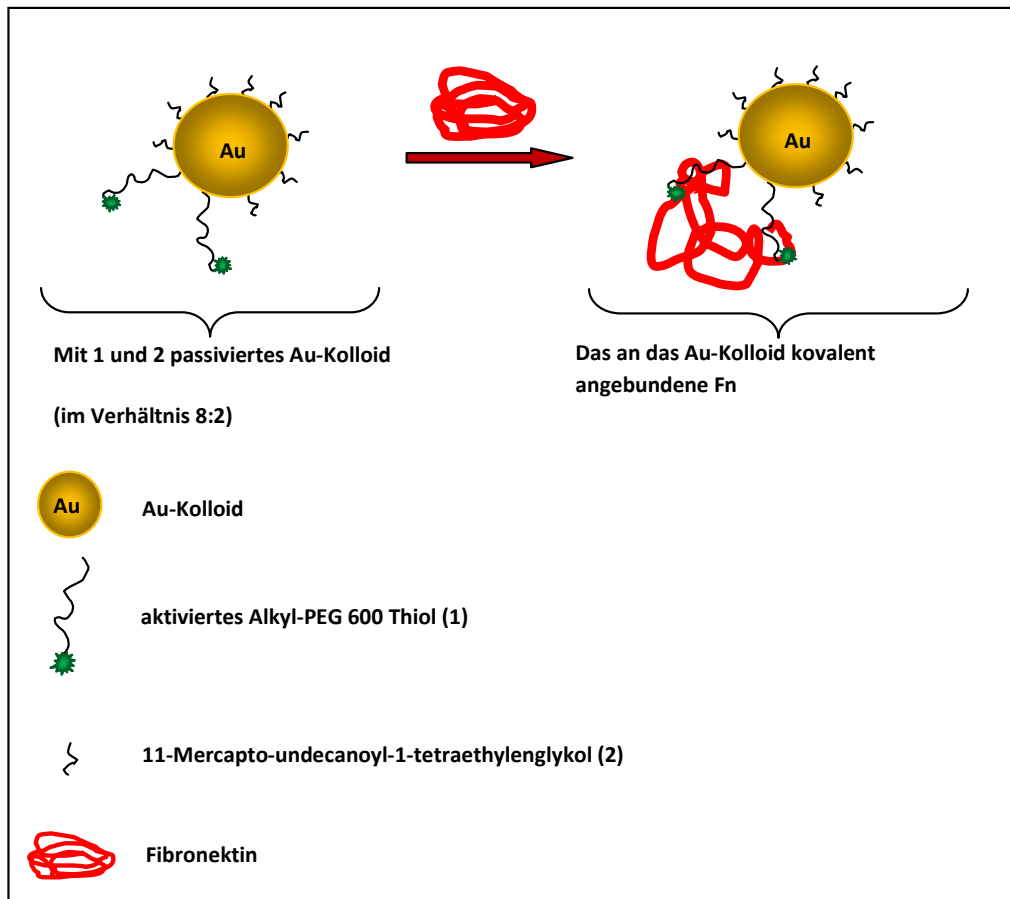


Abbildung 50: Eine schematische Darstellung der Markierung des Fn mit einem passivierten Au-Kolloid.

Die Gold-Kolloide sind mit einem Alkyl-PEG 600 Derivat **1**<sup>147</sup> (durchschnittlich  $n = 12$ ) und einem Tetraethylglykol mit einer zusätzlichen Alkylkette **2** in einem Verhältnis 2:8 passiviert (vgl. Abbildung 51).

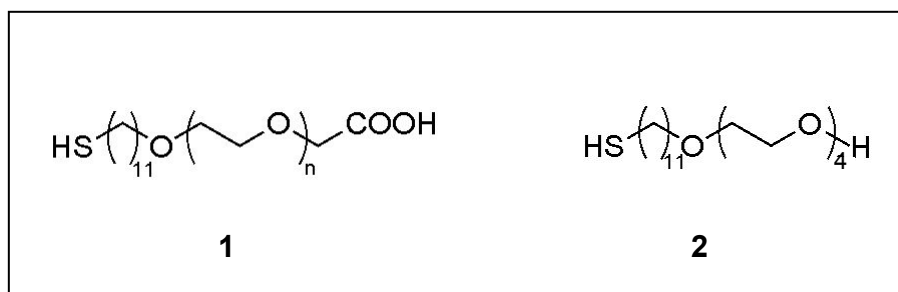
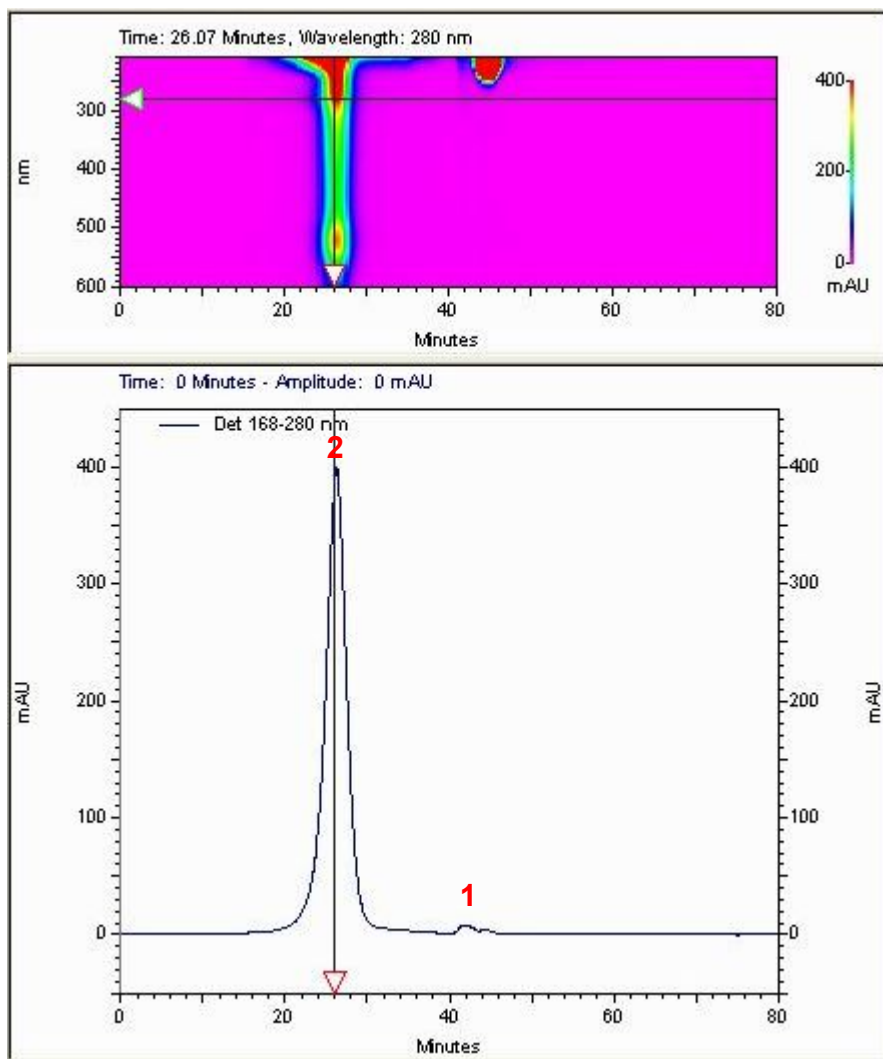


Abbildung 51: Für die Passivierung der Gold-Kolloide verwendete Moleküle: **1** ein Alkyl-PEG 600 Derivat und **2** ein Tetraethylglykol mit einer zusätzlichen Alkylkette<sup>147</sup>.

Es gelingt, das markierte Protein von dem nicht markierten mittels Größenausschlusschromatographie zu trennen. Jedoch erweist sich die Trennung des markierten Proteins von den freien Gold-Kolloiden wegen der Größe des markierten Proteins als nicht möglich. In Abbildung 52 ist ein Chromatogramm der Mischung, die das markierte und das nicht markierte Protein und freie Gold-Kolloide enthält, während der Reinigung dargestellt.

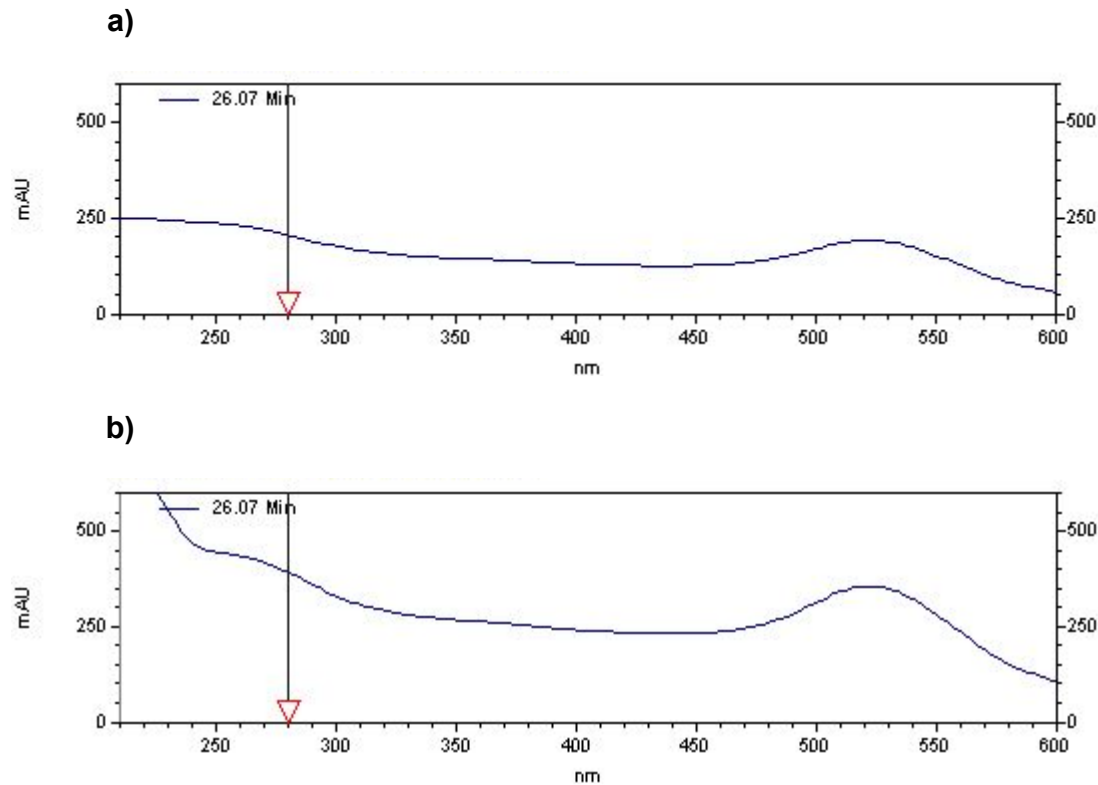


**Abbildung 52: Ein Chromatogramm des mit Gold-Kolloiden markierten Proteins.** Oben wird das 2D Chromatogramm, unten 1D Chromatogramm dargestellt. Zwei Signale sind deutlich zu sehen. Das Signal 1 gehört zu dem nicht markierten Protein, das Signal 2 gehört zu der Mischung, die das markierte Protein und freie Gold-Kolloide enthält.

In Abbildung 53a) ist eine UV/Vis Absorptionskurve für die Kolloiden-Lösung abgebildet, in b) eine Mischung aus Kolloiden und dem mit Kolloiden markierten Fn Dimer. Hier wird deutlich, dass die Kolloide von dem markierten Protein nicht zu trennen sind. Außerdem



ist die Konzentration des markierten Proteins sehr gering, so dass diese mit üblichen Methoden nicht zu bestimmen ist.



**Abbildung 53: UV/Vis Absorptionskurven von a) Gold-Kolloiden, b) mit Gold-Kolloiden markiertem Protein.**

Aus den oben aufgeführten Gründen werden keine weiteren Versuche mit dem direkt markierten Fn Dimer unternommen.

Eine Untersuchung der indirekten Anbindung über die Immunomarkierung liefert keine Ergebnisse. Die Gründe dafür können in den vielen Inkubationsschritten sowie in einer langen Präparationszeit liegen.

### 3.3.2.3 TEM Untersuchung

Bei den TEM-Experimenten werden die mit Siliziumoxid beschichteten Goldnetzchen nanostrukturiert, passiviert und mit dem Protein benetzt. Um die Elektronendichte der einzelnen Proteinmoleküle, die an die Nanostruktur gekoppelt sind, zu erhöhen, werden diese mit dem Salz eines Schwermetalls (Uranylacetat) angefärbt. Jedoch können keine einzelnen an die Nanostruktur gebundenen Moleküle detektiert werden. Allerdings

können einzelne Fn Moleküle in dem Zwischenraum auf der Passivierungsschicht bei der indirekten Anbindung über einen Sulfo-DSP Linker und einen Antikörper nachgewiesen werden.

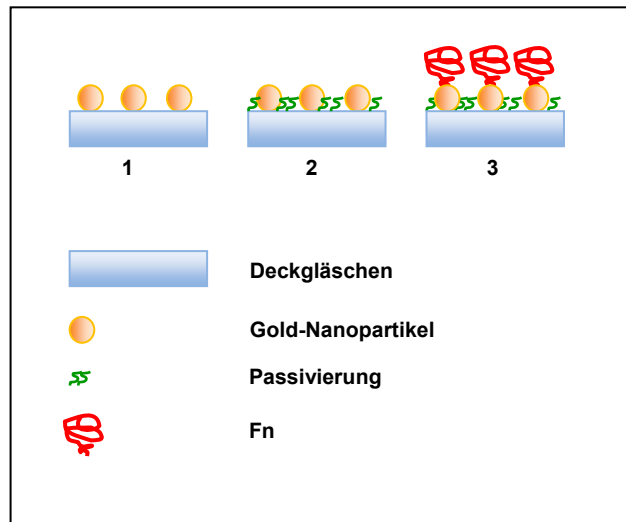
Eine weitere wichtige Information erhält man bezüglich der Stabilität der Nanostruktur auf den mit Siliziumoxid beschichteten Goldnetzchen: Die Gold-Nanopartikel sind verschoben und erscheinen viel größer als bei der Referenzprobe. Die Gründe dafür können in der nicht vollkommen vergleichbaren Oberfläche des Goldnetzchens und der Oberfläche eines Silizium-Plättchens liegen. Außerdem könnte das Anfärben mit Uranylacetat die Gold-Nanopartikel vergrößert erscheinen.

Die Ergebnisse dieses Experiments deuten darauf hin, dass die indirekte Anbindung des Fn über einen Sulfo-DSP Linker und einen Antikörper für das in dieser Arbeit untersuchte System nicht geeignet ist.

### 3.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy (AFM)) ermöglicht eine Untersuchung der topographischen und mechanischen Eigenschaften der Oberfläche sowohl an der Luft als auch in wässrigen Lösungen<sup>148</sup>. Das Ziel dieses Experiments ist in erster Linie zu untersuchen, ob bei der direkten Anbindungsstrategie einzelne Fn Moleküle an die Gold-Nanopartikel effizient binden und wie groß diese unter wässrigen Bedingungen erscheinen. In zweiter Linie ist von großem Interesse, ob die in die Passivierungsschicht eingebettete Nanopartikel nicht teilweise von dieser verdeckt werden. MacDonald *et al.* beobachtete, dass auf reiner Titanoberfläche adsorbiertes Fn in einer globulären Konformation mit einer Länge von  $16,5 \pm 1,0$  nm, Breite von  $9,6 \pm 1,2$  nm und Höhe von  $2,5 \pm 0,5$  nm vorliegt<sup>149</sup>. Vallières *et al.* berichtet von einem Durchmesser des Moleküls von  $33 \pm 8$  nm und einer Höhe von  $1,7 \pm 0,8$  nm auf einer durch Peroxomonoschwefelsäure aktivierten Siliziumoxid Oberfläche<sup>150</sup>. Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften von Fn mit Hilfe der AFM liefern zusätzliche Informationen über die Konformation des adsorbierten Moleküls: Auf Grund einer erhöhten Oberflächendenaturierung weist das Molekül eine steife Konformation auf hydrophoben und eine lockerere auf hydrophilen Oberflächen auf<sup>151</sup>.

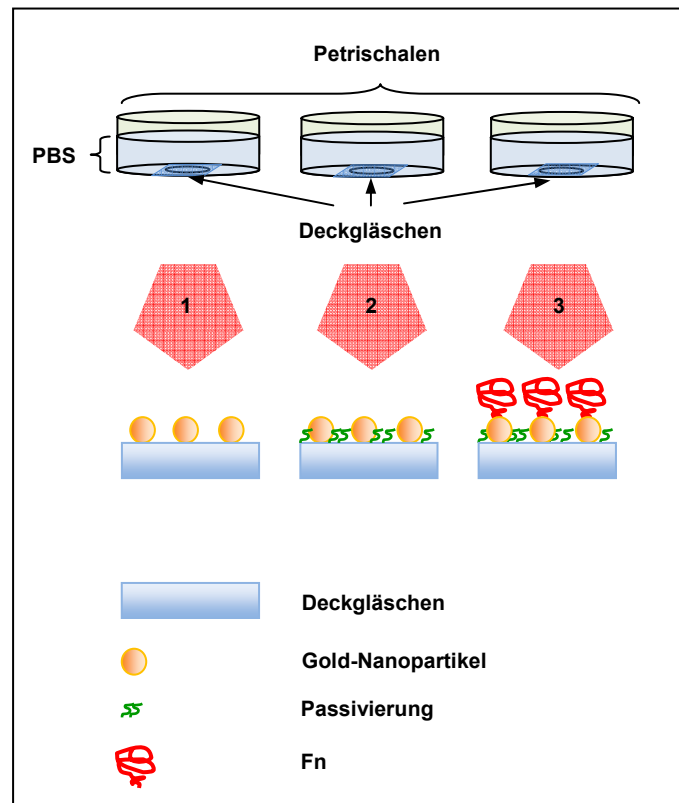
In Abbildung 54 ist eine schematische Darstellung der mit AFM untersuchten Proben an Luft festgehalten:



**Abbildung 54:** Schematische Darstellung der für AFM Experimente an Luft verwendeten Proben: 1: nanostrukturierte Glasoberfläche, 2: nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche, 3: nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit angebundenem Fn.

Bei diesen Experimenten werden nanostrukturierte Oberflächen, nanostrukturierte und passivierte Oberflächen, sowie nanostrukturierte und passivierte Oberflächen mit angebundenem Fn untersucht.

In Abbildung 55 ist eine schematische Darstellung der mit AFM untersuchten Proben in Puffer gezeigt:



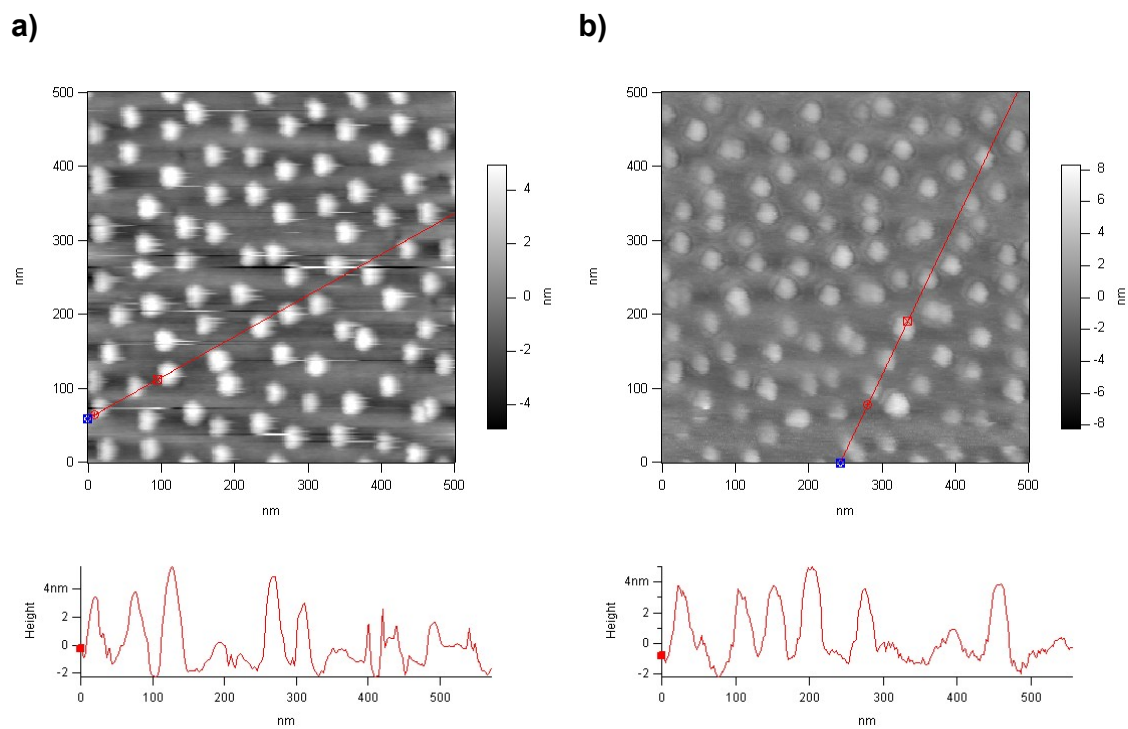
**Abbildung 55:** Eine schematische Darstellung der mit AFM untersuchten Proben in einem PBS Puffer: 1. nanostrukturierte Glasoberfläche, 2. nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche, 3. nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit angebundenem Protein. Die Proben sind an Petrischalen befestigt. Diese sind mit PBS gefüllt.

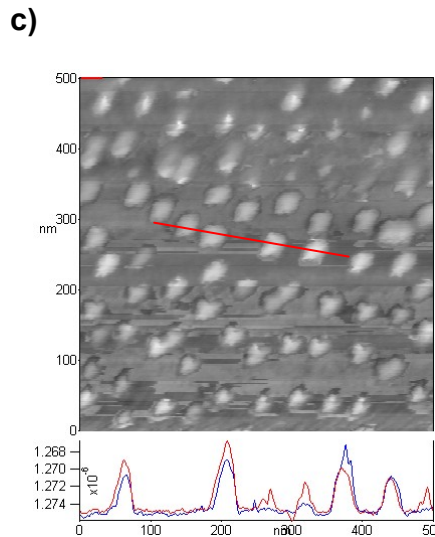
Bei diesen Experimenten werden ebenfalls nanostrukturierte Oberflächen, nanostrukturierte und passivierte Oberflächen, sowie nanostrukturierte und passivierte Oberflächen mit angebundenem Fn. Die Proben sind an Petrischalen befestigt, die mit PBS gefüllt werden. Die Probenpräparation für die AFM Experimente ist im Kap. 5.3.5.1 erleutert.

### 3.4.1 Ergebnisse

#### 3.4.1.1 Untersuchung an Luft

Als erstes werden Gold-Nanostruktur-Referenzproben ohne und mit Passivierungsschicht untersucht. In Abbildung 56 sind Gold-Nanopartikel in einem annähernd hexagonalen Muster ohne **a)** und mit dazwischenliegenden Passivierungsschicht **b)** zu sehen. In **c)** sind Fn funktionalisierte Nanopartikel abgebildet. Unterhalb der Aufnahmen sind Höhenprofile der Nanopartikel entlang der roten Linien gezeigt.





**Abbildung 56: AFM Aufnahmen a) einer nanostrukturierten, b) einer nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche. In c) ist eine nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit an die Nanostruktur gebundenem Fn abgebildet. Unten sind Höhenprofile der Nanopartikel entlang roter Linien angegeben.**

In **b)** ist deutlich zu sehen, dass Gold-Nanopartikel von der Passivierungsschicht nicht verdeckt sind und als Ankerpunkte für Fn Moleküle dienen können.

In Tabelle 25 sind Daten der durchschnittlichen Höhe und des Durchmessers von Gold-Nanopartikeln auf Oberflächen ohne und mit einer Passivierungsschicht zusammengestellt.

**Tabelle 25: Höhe und Durchmesser von Nanopartikeln auf unterschiedlich behandelten Glasoberflächen.**

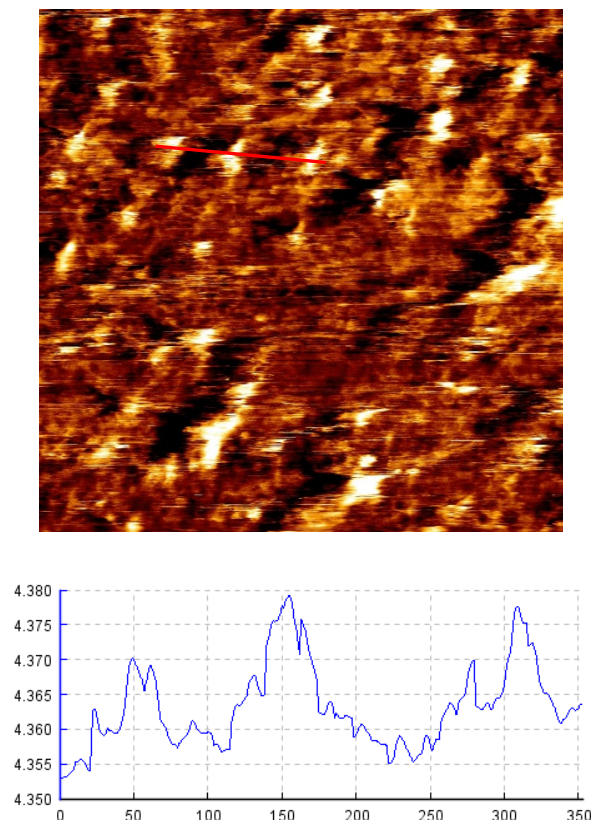
Nr.	Oberfläche	Höhe [nm]	Durchmesser [nm]
1	nanostrukturierte Glasoberfläche	6,7±0,6	44,6±4,5
2	nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche	5,5±1,1	35,6±4,1
3	nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit an die Nanostruktur gebundenem Fn	6,6±1,9	37,8±9,0

Die Höhe und der Durchmesser einzelner Nanopartikel auf den Deckgläschen mit **(2)** und ohne **(1)** Passivierung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander. Der

Unterschied der Höhe bzw. der Breite von Nanopartikeln zwischen Oberfläche (2) und (3) ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

### 3.4.1.2 Untersuchung in PBS

Bei AFM Untersuchungen in Puffer ergibt sich ein instabiles verschwommenes Signal, das auf das Sammeln der weichen Materie, wie z. B. Verunreinigungen oder PEG-Moleküle, und zusätzlich auf einen thermischen Drift zurückzuführen ist. Die Aufnahmen der Nanostruktur ohne Passivierungsschicht sind auf Grund der verschwommenen Signale für die Auswertung nicht geeignet. In Abbildung 57 ist die Nanostruktur auf einer passivierten Glasoberfläche zu sehen. Die Gold-Nanopartikel sind etwa 20 nm hoch und etwa 50-70 nm breit. Es ist deutlich zu sehen, dass in PBS die Nanopartikel ebenfalls nicht von der Passivierungsschicht verdeckt werden.

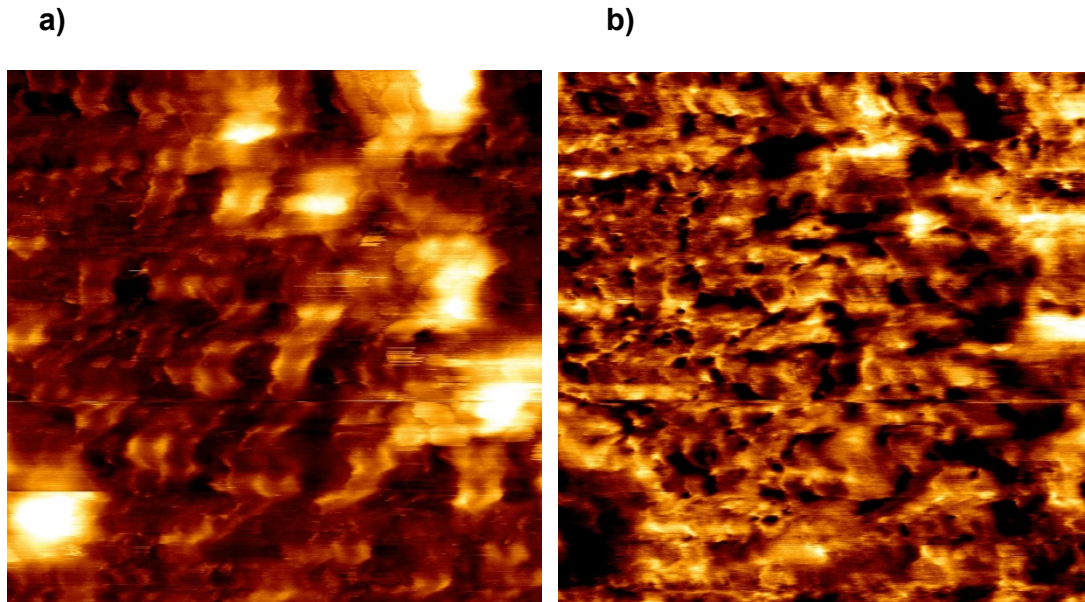


**Abbildung 57: Eine 1x1  $\mu\text{m}$  AFM-Aufnahme einer nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche in PBS mit einem Höhenprofil entlang der roten Linie.**

In Abbildung 58 ist in **a)** eine Höhen-Rücklauf (engl. height-retrace) Aufnahme einer nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche mit angebondenem Fn dargestellt, bei der das Signal durch eine weiche Materie verwischt ist. Es sind etwa 100-200 nm



große Strukturen zu erkennen. In **b)** ist eine Phasen-Rücklauf (engl. phase-retrace) Aufnahme desselben  $1 \times 1 \mu\text{m}$  Abschnitts der Oberfläche dargestellt, bei dem sich teilweise die Nanostruktur erkennen lässt.



**Abbildung 58:**  $1 \times 1 \mu\text{m}$  AFM Aufnahmen einer nanostrukturierten und passivierten Probe mit angebundenem Fn: a) eine Höhen- Rücklauf (engl. height-retrace) und b) eine Phasen-Rücklauf (engl. phase-retrace) Aufnahme. In b) lässt sich eine Nanostruktur teilweise erkennen.

Da Diese Aufnahmen verschwommen sind, lässt sich keine genaue Aussage bezüglich der der Anbindung des Fn an die Nanostruktur machen.

### 3.4.2 Diskussion

AFM Untersuchungen nanostrukturierter Oberflächen, nanostrukturierter und passivierter Oberflächen sowie Fn funktionalisierter nanostrukturierter und passivierter Oberflächen werden an Luft und in PBS durchgeführt.

An Luft, d. h. im trockenen Zustand, weisen nanostrukturierte Proben mit und ohne Passivierung einen signifikanten Unterschied bezüglich der Höhe und Breite der Nanopartikel auf. Dies liegt daran, dass Gold-Nanopartikel an Luft zu etwa 20% in die Passivierungsschicht eingebettet sind (in diesem Fall  $1,2 \pm 1,7$  nm), sodass die mit AFM messbare Höhe und Breite der Partikel dadurch reduziert wird. Der Vergleich der Partikel mit bzw. ohne Fn kann somit nur mit den nanostrukturierten und passivierten Proben als Referenz erfolgen.

Bei in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der Höhe und Breite der Nanopartikel zwischen den Proben mit und ohne Fn zu verzeichnen. Somit lässt sich keine Aussage darüber treffen, wie das Fn an die Nanostruktur bindet. In der Literatur wird von der Höhe eines Fn Moleküls auf Peroxomonoschwefelsäure aktivierten Siliziumoxid Oberflächen von  $1,7 \pm 0,8$  nm berichtet<sup>150</sup>. Dieser Unterschied von etwa 1,7 nm kann vermutlich in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden, da die sehr stark von der AFM-Spitze abhängige Auflösung nicht hoch genug ist. Hierfür spricht, dass die Gold-Nanopartikel mit 40 nm Durchmesser in AFM Versuchen sehr viel größer erscheinen als in TEM Versuchen (7 nm; vgl. Kap. 3.3.2.3). Zusätzlich kann sich die Auflösung der Spitze durch Aufsammeln des lockereren Oberflächenmaterials wie Verunreinigungen oder PEG Moleküle verringern.

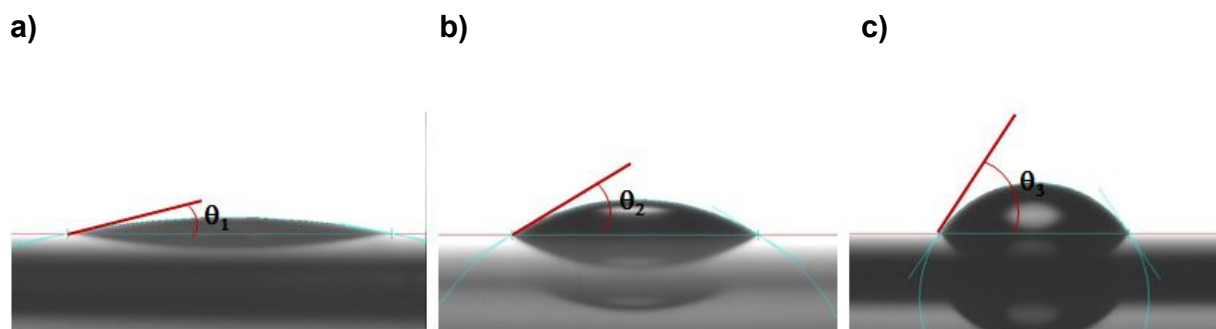
Auf Grund eines thermischen Drifts lässt sich während AFM Experimente im PBS Puffer keine Stabilität des Signals erzielen. Außerdem wird die AFM Spitze sehr schnell durch Anhaften weicher Elemente der Oberfläche wie PEG 2000 oder Teile der Fn Moleküle verschmutzt. Es lässt sich keine bessere Auflösung erzwingen, da diese durch den Spitzendurchmesser limitiert ist. Darüber hinaus lässt sich keine Aussage über die Anbindung der Fn Moleküle an die Nanostruktur machen. Ungeachtet dessen lässt sich beurteilen, dass Gold-Nanopartikel von der Passivierungsschicht in einem PBS Puffer nicht verdeckt werden und als Ankerpunkte für Fn Moleküle zur Verfügung stehen.

### 3.5 Kontaktwinkelmessungen

Mit der Methode des liegenden Wassertropfens zur Bestimmung des statischen Kontaktwinkels wird hier überprüft, ob die in dieser Arbeit für verschiedene Experimente eingesetzten Oberflächen bezüglich ihrer Hydrophilie/Hydrophobie vergleichbar sind: QCM-D Experimente werden auf Gold oder Silizium beschichteten Kristallen, Fluoreszenzexperimente auf Silizium-Plättchen und REM und AFM Experimente werden auf Silizium-Plättchen oder auf Deckgläschen durchgeführt. Alle Substrate werden bei gleichen Bedingungen aktiviert und passiviert.

Die Hydrophilie/Hydrophobie der hier eingesetzten Oberflächen ist von großem Interesse, da aus Literaturdaten sich die Tendenz erkennen lässt, dass das Fibronectin auf hydrophilen Oberflächen eine vorwiegend lockerere und auf hydrophoben eine kompakte Konformation einnimmt<sup>152</sup>. Auf den hydrophoben Oberflächen findet eine Störung der Sekundärstruktur statt, so dass einige Studien belegen, dass die Zelladhäsion und die Wechselwirkung zu bestimmten Antikörpern auf hydrophilen Oberflächen besser ist als auf hydrophoben. Bei Zelladhäsionsexperimenten auf Hydrogelen (PEG-Netzwerke), auf denen das Fn physisorbiert war, konnten Zellen das Fn in Fibrillen einordnen<sup>15a</sup>. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Oberflächen, die das Fn nicht so stark binden und dadurch eine Flexibilität des Moleküls erlauben, für Zelladhäsionsstudien besser geeignet sind.

In Abbildung 59 ist ein Beispiel der optischen Messung auf einer mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten Goldoberfläche, einer passivierten Glasoberfläche und einem mit Carosche Säure gereinigten Siliziumplättchens mit dazugehörigen Winkeln dargestellt.










**Abbildung 59:** Eine optische Messung des Kontaktwinkels  $\theta$  auf a) einer mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten Goldoberfläche, b) einer passivierten Glasoberfläche und c) einem mit Carosche Säure gereinigten Silizium Plättchens mit dazugehörigen Winkeln dargestellt.

### 3.5.1 Ergebnisse

Bei diesen Experimenten wird die Benetzbarkeit der in dieser Arbeit benutzten Oberflächen untersucht (vgl. Tabelle 26):

**Tabelle 26: Darstellung der experimentellen Daten.**

Nr.	Oberfläche	$\theta$ [°]	Anzahl der Oberflächen	Abbildung
1	passiviertes Glas	32,82±0,70	9	
2	in O <sub>2</sub> -Plasma aktiviertes Glas	-	4	
3	in Carosche Säure gereinigtes Si-Plättchen	53,39±4,93	7	
4	in O <sub>2</sub> -Plasma aktiviertes Si-Plättchen	15,45±1,43	4	
5	in O <sub>2</sub> -Plasma aktiviertes mit SiO beschichtetes QCM-D Kristall	17,38±3,08	4	
6	passiviertes mit SiO beschichtetes QCM-D Kristall	34,33±0,62	7	
7	in O <sub>2</sub> -Plasma aktiviertes mit Au beschichtetes QCM-D Kristall	13,57±4,29	3	

Beim Vergleich der Kontaktwinkel  $\theta$  ist deutlich zu sehen, dass die in O<sub>2</sub>-Plasma aktivierten Materialien mit Ausnahme der Glasoberfläche, bei der die Messung des Kontaktwinkels auf Grund einer starken Benetzung der Oberfläche nicht möglich ist, einen vergleichbaren Kontaktwinkel von etwa 15° aufweisen. Eine mit PEG 2000-Derivat passivierte Glasoberfläche oder Siliziumoxid Oberfläche eines QCM-D Kristalls sind ebenfalls miteinander vergleichbar und haben einen Kontaktwinkel von etwa 33°. Das in Carosche Säure gereinigtes Silizium Plättchen hat den größten Kontaktwinkel von etwa 53°. Alle in diesem Versuch benutzten Oberflächen sind hydrophil, da sie einen Kontaktwinkel von unter 90° aufweisen.

### 3.5.2 Diskussion

Die Vergleichbarkeit der hier eingesetzten Oberflächen wird bezüglich ihrer Hydrophilie/Hydrophobie mittels einer statischen Kontaktwinkelmessung untersucht. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass alle Oberflächen einen hydrophilen Charakter aufweisen. Gleich behandelte Oberflächen weisen eine vergleichbare Benetzbarkeit mit Wasser auf. Für die durchgeführten Experimente bedeutet dies, dass die Oberflächen vergleichbar sind und dass auf Grund der Hydrophilie der Oberflächen zu erwarten wird, dass das adsorbierte Fn vorwiegend nicht kompakte Konformation einnehmen wird. Auch eine in O<sub>2</sub>-Plasma aktivierte Goldoberfläche ist hydrophil. Dies korreliert mit einer Studie der Adsorption von Fn auf Gold, Titan und Tantaloxid von Hemmersam *et al.*, bei der gezeigt wird, dass das Fn auf Gold eine mehr aufrechte und gestreckte Konformation einnimmt als auf Ti/Ta-Oxid Oberflächen<sup>11</sup>.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Wie bereits im Kap. 1 erwähnt wird das Fn wegen seinen zellbindenden Eigenschaften weit verbreitet eingesetzt. Für einige Studien reicht eine homogene Beschichtung mit statistisch orientiert angebundenem Fn, für andere Studien muss das Molekül eine bestimmte Orientierung auf der Oberfläche aufweisen, die bei einer spezifischen Wechselwirkung mit bestimmten Molekülen oder bei einer kovalenten Anbindung an die Oberfläche vorliegt.

In dieser Arbeit wird das Fn an dicht hexagonal angeordnete Gold-Nanopartikel gebunden. Die Nanostrukturen, die ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der Abstandsabhängigkeit von angekoppelten Molekülen zueinander darstellen, werden hier mittels BCML erzeugt.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine effiziente und reproduzierbare Anbindung einzelner unmodifizierter, löslicher Fn Molekülen, Dimere oder durch eine Reduktion der Dimere erhaltene Fn Monomere, an einzelne Gold-Nanopartikel auf Oberflächen. Die Anbindung von Monomeren ist von Interesse, da aus der Literatur bekannt ist, dass Monomere alleine zur Fibrillenbildung nicht fähig sind. Wenn man aber diese gerichtet an die Nanostruktur anbinden und die Abstände zwischen Molekülen durch Variation der Abstände von Nanopartikeln erreichen kann, dann könnte man untersuchen, ob eine Ausbildung der Fibrillen in diesem Fall stattfindet.

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, werden die hier vorgestellten Anbindungsstrategien verfolgt: Eine direkte Anbindungsstrategie, bei der das Protein eine zufällige Orientierung auf dem Nanopartikel hat, und indirekte Anbindungsstrategien, bei denen das Protein über einen Antikörper (AFn) an einer spezifischen Stelle an den Nanopartikel gekoppelt und somit gerichtet orientiert wird. Im letzten Fall kommen für das Fn Dimer zwei Strategien in Frage: Bei der ersten wird das Fn über einen zufällig angebundenen AFn und bei der zweiten über einen kleinen Linker gebundenen AFn gekoppelt. Bei der letzten Möglichkeit sollte die Effizienz der Anbindung vom AFn an die Nanostruktur verbessert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Effizienz der Anbindungsstrategien von Fn Dimeren oder Fn Monomeren auf nanostrukturierten und mit PEG 2000 passivierten Oberflächen mit folgenden Methoden untersucht: Die Schwingquarzmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (engl. quartz crystal microbalance dissipation (QCM-D)), eine Kombination von QCM-D und Reflektometrie, Fluoreszenzmikroskopie,

Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy (AFM)). Ein Vergleich der hier eingesetzten Oberflächen und eine Untersuchung der Hydrophilie von Oberflächen wird mittels der Methode des liegenden Wassertropfens (statische Kontaktwinkelmessungen) erstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das pFn aus Blutserum isoliert, damit Fn Qualität für alle Experimente vergleichbar ist. Es ist ebenfalls gelungen intakte Fn-Monomere herzustellen (vgl. Kap. 5.2.1. und Kap. 5.2.2).

Mittels Kontaktwinkelmessungen erhält man eine Aussage bezüglich der Hydrophilie der Oberflächen und somit über ihre Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Experimenten: Diese sind hier hydrophil und lassen sich vergleichen (vgl. Kap. 3.5).

Die Protokolle einer direkten und einer indirekten Anbindungsstrategie für Fn Dimere oder Monomere an die Nanostruktur werden hier erarbeitet (vgl. Kap. 5.2.6).

Mit Hilfe von QCM-D Messungen kann erfolgreich gezeigt werden, dass ein Unterschied bei den viskoelastischen Eigenschaften der angebundenen Fn Dimer- oder Monomerfilmen auf homogener Oberfläche zu sehen ist. Der angebundene Monomerenfilm ist weicher und enthält mehr Wasser (vgl. Kap. 3.1.3).

Da es keine etablierte Modelle zur quantitativen Auswertung des angebundenen Proteins an die Nanostruktur bei der QCM-D Methode gibt, wird eine Erwartungsrechnung erstellt, die für die Ermittlung eines Richtwertes für die Masse des angebundenen Proteins in einzelnen Experimenten hilfreich ist (vgl. Kap. 5.3.1.2). Eine Bestimmung des Wassergehaltes in homogenen Fn Dimer- oder Fn Monomer-Filmen gelingt mittels einer kombinierten Methode der QCM-D- und Reflektometrie-Technik (vgl. Kap. 3.1.1). Im Falle einer direkten Anbindungsstrategie des Fn Dimers an die Nanostruktur stellt eine etwa 50%-ige Wahrscheinlichkeit der Anbindung (etwa 50% des Erwartungswertes) einen guten Wert dar (vgl. Kap. 3.1.2.5). Hingegen wird bei der Untersuchung der Anbindungseffizienz in den Immunogoldmarkierung-Experimenten ein Wert von 12% ermittelt. Dieser kleine Wert wird durch eine geringe Effizienz (etwa 1% <sup>146</sup>) bei einer Immunogoldmarkierung erklärt.

Der experimentelle Wert bei einer direkten Anbindungsstrategie von Fn Monomeren beträgt bei der QCM-D Untersuchung fast das Doppelte des Erwartungswertes. Anhand der gemessenen Dissipationswerte handelt es sich in diesem Fall vermutlich nicht um antiparallel wieder organisierte Dimere, da die viskoelastischen Eigenschaften von



angebundenen Dimeren sich von angebundenen Monomeren unterscheiden. Aus sterischen Gründen sollten keine zwei Monomere an einen Nanopartikel binden. Eine weitere Reorganisation der Monomere in Dimere könnte möglich sein sowie eine Koordination von mehr Wasser als anfänglich vermutet (vgl. Kap. 3.1.3.1).

Bei einer indirekten Anbindungsstrategie der Fn Dimere über den AFn wird für das Fn eine etwa 40% höhere Wahrscheinlichkeit der Anbindung an Nanostrukturen verzeichnet. Es ist jedoch unklar, wie AFn Moleküle an Nanostrukturen binden, da keine experimentellen Daten bezüglich des Wassergehaltes in dem AFn Film vorliegen. Für Monomere werden mehr Moleküle angebunden als nach der Erwartungsrechnung der Fall ist. Der Grund dafür könnte wiederum in einer höheren als erwartet Koordination des Wassers liegen (vgl. Kap. 3.1.3.1).

Bei einer indirekten Anbindungsstrategie des Fn Dimers über den kleinen Linker Sulfo-DSP und den AFn erhält man einen Wert, der viel größer, als der Erwartungswert ist. Somit erweist sich diese Strategie für das hier untersuchte System als ungünstig (vgl. Kap. 3.1.2.9).

Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinlösung auf die Effizienz der direkten Anbindung mittels Fluoreszenzmikroskopie stellt sich heraus, dass eine Erhöhung dieser im Falle von Fn Monomere auf größeren Abständen der Nanopartikel zueinander einen tendenziell negativen Effekt hat. Dies gilt auch für eine Erhöhung der Salzkonzentration des PBS Puffers im gleichen System. Diese Aussage beruht auf einer verstärkten, detektierbaren unspezifischen Adsorption des Proteins an die Seite ohne Nanostruktur. Für das Fn Dimer ist bei der direkten Anbindung keine Abhängigkeit der Effizienz von der Konzentration der Proteinlösung sowie des Salzes im Puffer zu beobachten (vgl. Kap. 3.2.2.2 und Kap. 3.2.2.3).

Desweiteren wird mittels Fluoreszenzmikroskopie kein Unterschied zwischen der Effizienz bei einer direkten und einer indirekten Anbindung von Fn Dimeren oder Monomeren sowie keine Abstandsabhängigkeit verzeichnet (vgl. Kap. 3.2.2.4 und Kap. 3.2.2.6). Die Gründe dafür können vor allem in nicht immer gleicher Ausprägung der unspezifischen Anbindung an die Seite ohne Nanostruktur liegen. Deswegen werden Verhältnisse der Signalintensitäten von der Seite mit Nanostruktur zu der Seite ohne Nanostruktur gebildet und keine absoluten Werte miteinander verglichen (vgl. Kap. 5.3.3.3). Aus diesem Grund ist kein Vergleich mit der QCM-D Methode möglich, da es sich bei QCM-D um absolute und bei der Fluoreszenzmikroskopie um relative experimentelle Werte handelt. Hierzu sollen die Sensitivitätsbereiche beider Methoden

beachtet werden: Eine Detektion einzelner Fn Moleküle auf der Passivierungsschicht ohne Nanostruktur bei einem QCM-D Experiment liegt außerhalb der Sensitivitätsgrenze.

REM Versuche unter Kryo-Bedingungen liefern eine wertvolle Information über das Fn Netzwerk. Dieses besteht aus sowohl gestreckten Fibrillen als auch aus Knotenartigen Strukturen. Der Durchschnittliche Durchmesser einer einzelnen Fibrille beträgt hier etwa 57 nm und eines Knotens etwa 71 nm (vgl. Kap. 3.3.1.1). Mittels elektronenmikroskopischer Methoden ist das lokalisieren einzelner Moleküle auf einzelnen Gold-Nanopartikeln auf Grund einer geringen Elektronendichte des Proteins und einer hohen von Gold-Nanopartikeln nicht möglich.

TEM Untersuchungen liefern hingegen wertvolle Informationen über die Nanostruktur. Die Gold-Nanopartikel sind etwa 7 nm groß. Die Nanostruktur bleibt während des Passivierungsvorganges erhalten. Mittels TEM Experimenten gelingt eine Aussage über die Qualität der indirekten Anbindungsstrategie für das Fn Dimer über Sulfo-DSP als Linker und den Antikörper (vgl. Kap. 3.3.1.3). Das Fn ist in diesem Fall auf der Passivierungsschicht aufzufinden, was darauf hindeutet, dass das kleine Sulfo-DSP Molekül sich in die Passivierungsschicht einlagert und sich nicht effektiv genug entfernen lässt. Dies erklärt die erhöhten Werte bei den QCM-D Experimenten.

Laut AFM Experimenten sind Gold-Nanopartikel von der Passivierungsschicht nicht verdeckt (vgl. Kap. 3.4.1). Es wird die Annahme getroffen, dass die im Durchmesser etwa 7 nm große Nanopartikel genug Platz für im Durchmesser etwa 18 nm große Fn Moleküle anbieten. Dies basiert auf einer Studie von Hemmersam *et al.*, die besagt, dass der berechnete optische Äquivalent für den „Fingerabdruck“ von Fn auf einer Goldoberfläche etwa  $45 \text{ nm}^2$ , also etwa 7 nm im Durchmesser beträgt<sup>11</sup>. Durch eine Konzentration von 10 µg/ml der Fn Moleküle und einer durch die Abstände zwischen den Nanopartikeln gegebenen Oberfläche zur Anbindung wird angenommen, dass genug Fn Moleküle in der Proteinlösung vorhanden sind, um diese einzeln an Nanopartikel zu binden.

Für Analysen an Luft scheinen die AFM Messungen nicht sensitiv genug zu sein. Es ist ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Nanopartikel mit und ohne Passivierungsschicht zu detektieren, jedoch kein Unterschied in der Höhe der Nanopartikel mit oder ohne Fn (vgl. Kap. 3.4.1.1). Für weitere Studien in einem PBS Puffer sollen andere Strategien überlegt werden, wie z. B. eine Beschichtung der AFM Spitze mit einer PEG Schicht. Dies sollte das Einsammeln von weicher Materie, vor allem PEG-Moleküle, durch die AFM Spitze vermeiden. Es sollte jedoch beachtet

werden, dass das System an sich, mit einer Nanostruktur, daran gebundenem Protein und einer Passivierungsschicht sehr komplex ist.

Desweiteren sollte hier nochmals erwähnt werden, dass die Qualität der Passivierungsschicht von großer Bedeutung ist.

Wie in Kap. 1 beschrieben wäre das weiterreichende Ziel eine Charakterisierung der Fibrillenbildung auf Oberflächen mit Hilfe von Zellen, die das Fn produzieren, sowie durch transformierte Zellen, die kein Fn sekretieren. Eine Abhängigkeit von Abständen der Gold-Nanopartikel, an die das Lösliche Fn gebunden ist, stellt ebenfalls eine sehr interessante Aufgabe dar. Hierbei ist von großem Interesse eine Untersuchung der Fähigkeit der Monomere in Abhängigkeit von Abständen der Gold-Nanopartikel Fibrillen zu bilden, da aus der Literatur bekannt ist, dass nicht gegeneinander ausgerichtete Monomere dazu nicht fähig sind<sup>8</sup>.

Weiterhin kann die Fn vermittelte Adhäsion von unterschiedlichen Zelltypen in Abhängigkeit von Abständen der Gold-Nanopartikel zueinander an neu entwickelten Oberflächen untersucht werden. Wenn solche Abhängigkeit besteht, dann stellen solche Oberflächen ein Werkzeug zum Aussortieren von unterschiedlichen Zelltypen dar. Dies ist beispielsweise für Implantatoberflächen von Bedeutung, da hier nur die Adhäsion von bestimmten Zelltypen nützlich ist, während andere eine Genesung verhindern<sup>153</sup>.

Abhängig von der Fragenstellung, ob man eine Adhäsionsstudie oder eine Untersuchung der Fibrillenbildung durchführen möchte, ist eine direkte oder eine indirekte Anbindungsstrategie von Interesse. Der Grund hierfür liegt in der Struktur des Fn: Die zellbindende Domäne beinhaltet Module des Typ III<sub>9-10</sub>, die keine intramolekularen Disulfidbrücken enthalten (vgl. Kap. 2.1.2.1) und somit bei der Wechselwirkung mit Gold wenig beeinflusst werden. Hingegen beinhaltet die 70 kDa Region, die für die Fibrillenbildung von großer Bedeutung ist, intramolekulare Disulfidbrücken. Diese könnten bei der Wechselwirkung mit Gold eine Konformationsänderung eingehen, wodurch die Bildung der Fibrillen erschwert oder unmöglich wird.



## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline (PBS)) (0,14 M NaCl, 0,01 M  $\text{PO}_4^{3-}$  Puffer, 0,003 M KCl) wird laut Vorschrift aus PBS Tabletten (Gibco Invitrogen Corporation) mit deionisiertem Wasser (TKA GenPure Wasseraufbereitungssysteme) hergestellt. PBS/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Puffer wird durch Zugabe von 0,01 M EDTA (Fluka) und PBS/Harnstoff Puffer durch Zugabe von 6 M Harnstoff (U5378, SIGMA Aldrich) zu PBS hergestellt.

Humanes (F0895) und Rinder (F1141) pFn werden bei SIGMA Aldrich bezogen, sowie weiteres Humanes pFn wird in unserem Labor isoliert (vgl.Kap. 5.2.1.1). Der monoklonale Antikörper aus der Maus gegen C-terminales Humanes-Fibronektin, (Mouse anti-human pFn C-terminal (CT) monoclonal antibody, MAB 1935) wird von Chemicon bezogen. Der monoklonale Anti-Humanes-Fibronektin Antikörper aus der Maus gegen Humanes-Fibronektin (Klon IST-3 (F 0791)) und der Polyklonale Anti-Maus-IgG Antikörper aus dem Schaf (ganzes Molekül)-Gold 5 nm mit kolloidalem Gold (G7527) werden bei SIGMA Aldrich erworben.

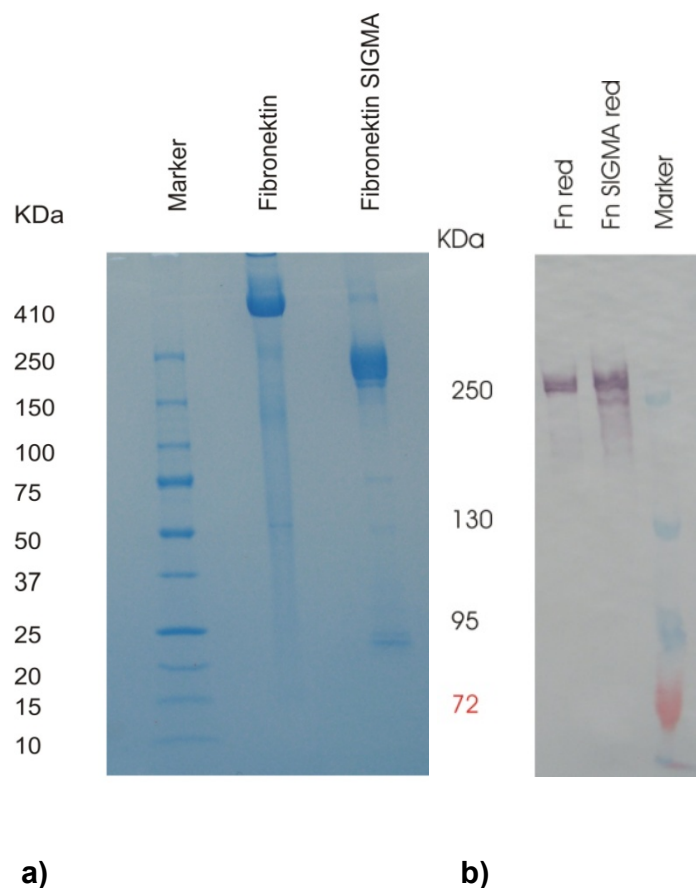
Ethanol (p.a.), Ethylacetat (p.a.), Toluol (p.a.) sowie Wasserstoffperoxid (30%) werden von Merck bezogen. Glutaraldehyd (8%), Hydrogen Tetrachloroaurat(III) werden von SIGMA Aldrich erworben. Schwefelsäure (95-98%) und Deckgläser werden bei Roth bezogen. Dithiotreitol (DTT), sowie bovine serum albumin (BSA) werden von Serva, Triethylamin (extra pure 99,7%) von Acros Organics, Elvanol/ Mowiol von Biomedica (Forster City, CA) und Uranylacetat von Alfa Aesar bezogen. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) sind von Acros Organics.

Reagenzien für die Gel-Elektrophorese, sowie fertige Gradientengele werden von Bio-Rad bezogen.

## 5.2 Experimenteller Teil

### 5.2.1 Isolierung von pFn

Das Humane und Rinder pFn wird anfänglich gelöst in einem Tris Puffer von SIGMA Aldrich bezogen. Dieses enthält unter anderem Zusätze, die das Protein gegen Aggregation stabilisieren sollten. Außerdem kommt es vor, dass das kommerzielle Fn andere Banden aufweist als in der Literatur berichtet<sup>20</sup>. Wie in Abbildung 60 dargestellt werden Banden bei 415, eine breite Bande von 209 bis 277, 193, 75, 50 und 22 kDa deutlich. Aus diesen Gründen, um experimentelle Verzögerungen zu vermeiden und reproduzierbare experimentelle Abläufe zu gewährleisten, wird das pFn aus humanem Blutserum (s. Kap. 5.2.1.1) in unserem Labor isoliert<sup>154</sup>.



**Abbildung 60: SDS-PAGE von in unserem Labor hergestellten Fn und kommerziell erhältlichen Fn von SIGMA: a) nach Färbung mit PageBlue; b) nach Silberfärbung.**

Für das in unserem Labor isolierte Fn sind folgende Banden sichtbar: 414 und 450, eine leichte Bande bei 250, 140 und 53 kDa. Hauptsächlich ist das 414 kDa schwere Protein vertreten.

### **5.2.1.1 Isolierung von Fn aus Blutserum**

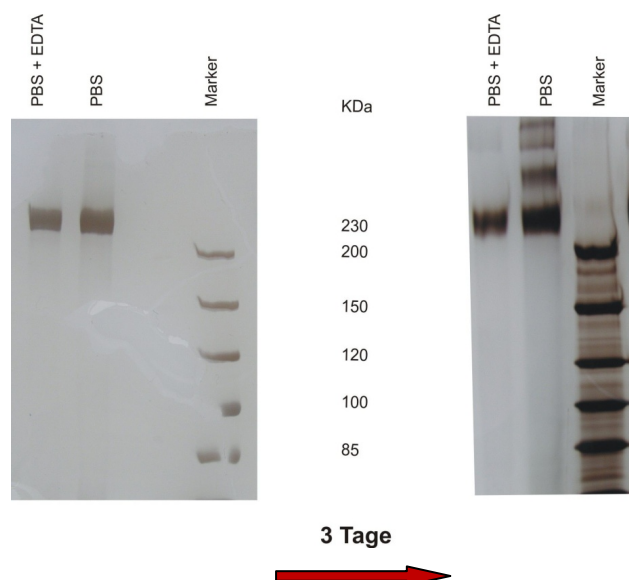
Die Isolierung erfolgt bei Raumtemperatur. 253 ml des eingefrorenen humanen Blutserums (Katharinenhospital Stuttgart, Deutschland) werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und bei 750 g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Sorvall SLA-1500 Zentrifuge, SORVALL SUPERSPEED). 5 ml einer wässrigen Phenylmethansulphonyl-fluorid (PMSF)-Lösung (Stammlösung 100 mM) und 942 mg Ethylendiamintetraacetat (EDTA) werden zugegeben. Danach wird bei 17000 g für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird über einen 0,4 µm Porenfilter (Millipore) filtriert und mittels einer 18 ml Sepharose CL4B Säule (SIGMA Aldrich), die mit 150 mM PBS, 2 mM EDTA, pH = 7,2 equilibriert ist, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml/min von den Fibrinogen Aggregaten befreit. Direkt danach erfolgt eine Affinitätschromatographie mittels einer 18 ml Gelatin-Sepharose 4B Säule (GE Healthcare), die ebenfalls mit 150 mM PBS, 2 mM EDTA equilibriert ist, in einem Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System (ÄKTA purifier, Amersham Biociences, GE Healthcare) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml/min. Das an das Säulenmaterial adsorbierte Fibronectin wird mit einem EDTA (10 mM) und PMSF (2 mM) haltigen PBS Puffer solange gewaschen, bis die OD<sub>280</sub> auf Null fällt. Das Fn wird von der Gelatin-Sepharose Säule mit einem EDTA (10 mM) und Harnstoff (6 M) haltigen PBS Puffer eluiert. Die Fraktionen 10 bis 30 werden gesammelt und die Proteinkonzentration mittels UV/Vis Spektrometrie (Nanodrop 1000, Peqlab, Deutschland) ermittelt. Zur Ermittlung des Reinheitsgrades wird eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot durchgeführt. Hierfür werden 0,4 µg Protein pro Linie auf das Gel (4-20% Gradientengel, Bio-Rad) aufgetragen. SDS-PAGE wird mittels Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) und Western Blot mittels Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) durchgeführt. Es wird nach Protokoll der Firma Bio-Rad vorgegangen<sup>155</sup>. Für Western Blot verwendete Antikörper: Der Anti-Humanes-Fibronectin Antikörper aus dem Kaninchen (1:1000) (SIGMA Aldrich, F3648) und der Anti-Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase konjugiert, (1:2000) (Caltac, L42008). Das Fn wird in Eluierungspuffer in der Konzentration 1 mg/ml bei -80°C in 1 ml Polypropylen-Reaktionsgefäßen (Eppendorf-Reaktionsgefäßen) aufbewahrt. Vor Gebrauch wird das Fn mittels illustra Nap-Säulen (GE Healthcare) in PBS überführt. Eine Gel-

Elektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Kontrolle des Reinheitsgrades des Proteins vor jeder Experimentreihe durchgeführt.

### 5.2.2 Fn Reduktion

Das Fn Monomer wird aus dem in unserem Labor isolierten Fn Dimer hergestellt. Bei den ersten QCM-D Experimenten fällt auf, dass sich kurze Zeit nach der Isolation der Monomereinheiten Multimere bilden (vgl. Kap. 3.1.2.2), obwohl vor dem Versuch laut SDS Page intakte Monomereinheiten in der Lösung existieren. Um die Multimerenbildung zu vermeiden, wird dem PBS EDTA zugesetzt.

Homandberg *et al.* entwickelte eine einfache und effektive Methode zur Isolation der funktional aktiven Fn Monomereinheiten bei dem Einsatz von Dithiothreitol (DTT)<sup>156</sup> in einem Verhältnis zum Protein von  $1:3,5 \times 10^3$  (8,5 mM DTT zu 2,43  $\mu$ M des Fn). Vor jedem Experiment wird daher mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) nachkontrolliert, ob die Monomereinheiten stabil sind. In Abbildung 61 sind Bilder der Polyacrylamid-Gelelektrophorese direkt nach der Reduktion (**a**) und drei Tage später dargestellt. Es ist deutlich, dass die Monomereinheiten über diese Zeitperiode in dem EDTA haltigen Puffer stabil bleiben. Sie sind 230 kDa schwer.



**Abbildung 61: Überprüfung der Stabilität von Fn Monomeren: a) direkt nach der Reduktion mit DTT und b) drei Tage danach mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese.** Die Monomereinheiten bleiben in dem EDTA haltigen PBS Puffer im Gegensatz zu dem EDTA freien PBS Puffer stabil.



Unmittelbar vor jedem Experiment mit Fn Monomeren wird mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft, ob diese in der Lösung stabil sind.

Zu 240  $\mu\text{l}$  einer Fn-Lösung (1 mg/ml) in einem PBS/EDTA/Harnstoff Puffer werden 0,33  $\mu\text{g}$  DTT (8,5 mM) in 10  $\mu\text{l}$  PBS zugegeben und 2 h bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wird die Reaktionslösung auf eine illustraNap-5 Säule aufgetragen und mit PBS/EDTA(10 mM) Puffer eluiert. Die Endkonzentration der Fn-Monomerlösung wird mittels UV/Vis Spektrometer bestimmt. Eine Gel-Elektrophorese wird vor jeder Experimentreihe durchgeführt.

### 5.2.3 Herstellung einer Goldlösung

Nachdem sich eine bestimmte Menge des  $[\text{PS}(x)\text{-b-P2/4PV}(y)]$  Polymers (Polymer Source, Inc., Canada) in Toluol innerhalb 24 Stunden löst, wird Hydrogen Tetrachloroaurat(III) in einer bestimmten Konzentration zugegeben. Die Lösungen werden unter ständigem Rühren unter Lichtausschluss aufbewahrt. In Tabelle 27 sind Parameter für die in dieser Arbeit benutzten Goldlösungen zusammengefasst.

**Tabelle 27: Zusammengefasste Parameter für die eingesetzten Goldlösungen.**

Goldlösung	PS Einheiten	c(HAuCl <sub>4</sub> ) [mg/ml]	Ladungsgrad	Abstand [nm]
Lösung 501	501	5	0,4	50-65
Lösung 245	245	8	0,2	35-45
Lösung 153	153	5	0,4	30-35

## 5.2.4 Nanostrukturierung

In dieser Arbeit verwendeten Proben sind wenn nicht anders vermerkt, Siliziumplättchen (100) (CrysTec Kristalltechnologie, Berlin, Deutschland). Diese werden in einer Größe von etwa 10 x 15 mm aus einer Scheibe ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgt innerhalb einer Stunde in Schwefelmonoperoxosäure (Carosche Säure), hergestellt aus 30%-tiger Wasserstoffperoxidlösung und 95-98%-tiger Schwefelsäure im Verhältnis 1:3. Danach werden die Substrate mit UltraReinem Wasser gereinigt, im Stickstoffstrom getrocknet und in eine entsprechende Goldlösung gedippt. Anschließend werden sie mit H<sub>2</sub>-Plasma (PVA TePla 100, Feldkirchen, Deutschland) bei 0,4 mbar, 200 W, 45 min behandelt.

## 5.2.5 Passivierung

Die Passivierung erfolgt in einem 50 ml Glasrohr mit einem Teflonkücken und mit Teflon beschichteten Deckel in einem Teflonhalter. Zu den Oberflächen werden 10 ml trockenes Toluol, eine Spatelspitze des N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-harnstoffs<sup>136</sup> und 10  $\mu$ l trockenes Triethylamin zugegeben. Die Reaktion erfolgt für 24 h bei 80°C. Danach werden die Substrate einzeln mit Ethylacetat und Ethanol gespült. Die passivierten Substrate werden sofort für weitere Versuche eingesetzt.

## 5.2.6 Proteinanbindung

Für QCM-D Experimente werden alle Lösungen in den Konzentrationen wie für eine stationäre Anbindung im Durchflussmodus mittels einer peristaltischen Pumpe injiziert (vgl. Kap. 5.3.1.1).

### **5.2.6.1 Direkte Anbindung**

Für eine direkte Fn Anbindung werden 300 µl einer Fn Lösung (10 µg/ml in PBS) auf nanostrukturierte und passivierte Substrate mittig platziert und bei RT in einer feuchten und dunklen Kammer 45 min lang inkubiert. Anschließend werden die Proben in einem Durchflussmodus (gleichzeitiges Zu- und Absaugen von PBS in der Petrischale) jeweils mit etwa 50 ml PBS gewaschen. Falls eine Fixierung erforderlich ist, wird dafür PBS Puffer gegen eine 0,01%-tige Glutaraldehydlösung in Wasser getauscht und 40 min bei RT stehen gelassen. Danach werden Proben mit deionisiertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Falls kein Fixierungsschritt erfolgt, wird beim letzten Waschgang zum PBS eine BSA-Lösung (0,01%) zugesetzt, damit keine Etnetzung an der Oberfläche stattfindet und das Fn nicht denaturiert.

### **5.2.6.2 Indirekte Anbindung via AFn**

Für eine indirekte Anbindung via Antikörper werden 300 µl einer Antifibronektin Lösung (10 µg/ml in PBS) (Mouse Anti-Human Plasma Fibronectin C-Terminal Monoclonal Antibody, Chemicon) auf nanostrukturierte und passivierte Substrate mittig platziert und bei RT in einer feuchten und dunklen Kammer eine Stunde lang inkubiert. Anschließend werden die Proben in einem Durchflussmodus (gleichzeitiges Zu- und Absaugen von PBS in der Petrischale) jeweils mit etwa 50 ml PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wird zum PBS eine BSA Lösung (0,01% zugesetzt). Im Anschluss daran findet für 45 min in einer feuchten und dunklen Kammer eine Inkubation mit 300 µl einer Fn Lösung (10 µg/ml in PBS) statt. Danach werden die Proben wieder im Durchflussmodus mit jeweils etwa 50 ml PBS gewaschen und wenn erforderlich mit 0,01%-tigen Glutaraldehyd 40 min lang fixiert und mit UltraReinem Wasser gewaschen. Wenn keine Fixierung erforderlich ist, wird beim letzten Waschgang zum PBS eine BSA Lösung (0,01%) zugesetzt.

### **5.2.6.3 Indirekte Anbindung via Linker und AFn**

Zur indirekten Anbindung via Linker und Antikörper werden 300 µl einer wässrigen Lösung von Sulfo-DSP (15 µM) auf nanostrukturierte und passivierte Substrate mittig platziert und bei RT in einer feuchten und dunklen Kammer eine Stunde lang inkubiert. Danach werden die Proben im Durchflussmodus jeweils mit etwa 100 ml UltraReinem Wasser und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Weiterhin wird wie in Kap. 5.2.6.2 vorgegangen.



## 5.3 Methoden

### 5.3.1 QCM-D

QCM-D Methode liefert Informationen über die zeitlichen Änderungen der adsorbierten Masse pro Flächeneinheit des Quarzsensors sowie der viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Filme.

Quarzsensoren werden dafür aus Quarzscheiben, die in einem Winkel von  $35^\circ 10'$  zur optischen Achse aus  $\alpha$ -Quarz herausgeschnitten werden, hergestellt. Diese heißen AT-Schnitt Quarze. Sie zeichnen sich durch eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz aus<sup>157</sup>. Bei der QCM-D Technik wird der piezoelektrische Effekt des AT-Schnitt Quarzkristalls ausgenutzt: Eine an den Kristall angelegte Wechselspannung mit der Frequenz in der Nähe der Resonanzfrequenz des Quarzkristalls erzeugt mechanische Scherkraft in der Ebene des Kristalls (alternierende Scherdeformation des Quarzkristalls)<sup>158</sup>. Somit wird der Kristall zu einer Scherschwingung angeregt. Diese Schwingung breitet sich in Form einer transversalen akustischen Welle senkrecht zur Quarzoberfläche durch den Quarz hindurch aus<sup>157</sup> (Abbildung 62):

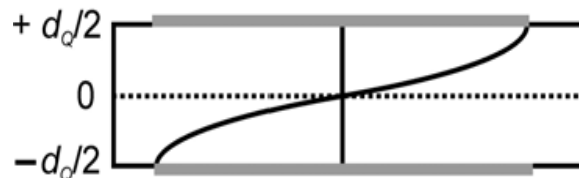


Abbildung 62: Verlauf der transversalen akustischen Welle zwischen den Goldelektroden (grau) in einem AT-Schnitt Quarz mit der Dicke  $d_q$  (links)<sup>159</sup>.

1959 zeigte G. Sauerbrey in der Theorie und Praxis, dass die Frequenzänderung des oszillierenden Quarzkristalls proportional zu der darauf adsorbierten Masse ist<sup>160</sup>:

$$\Delta m = -\frac{v_q \rho_q}{2 f_0^2} \frac{\Delta f_n}{n} = -\frac{C}{n} \Delta f_n. \quad (4)$$

Die Schallgeschwindigkeit in einem Quarzkristall  $v_q = 3340$  m/s und die Dichte des Quarzkristalls  $\rho_q = 2,65$  g/cm<sup>3</sup> sind spezifische Größen. Die Grundfrequenz  $f_0$  hängt (in der ersten Näherung) von der Dicke  $t_q$  des Quarzkristalls ab<sup>161</sup>:  $f_0 = v_q / 2t_q$ . In unserem Fall ist die Grundfrequenz  $f_0 = 4,95 \pm 0,02$  MHz und  $f_n = n \cdot f_0$ , wobei  $n$  eine ungerade,

ganze Zahl (Obertonnummer) ist. Die Konstante  $C \approx 18,06 \text{ ng/Hz} \times \text{cm}^2$  ist für einen 4,95 MHz-Kristall. Sie ist von dem Adsorbat unabhängig und bedarf keiner speziellen Kalibrierung, um ermittelt zu werden.

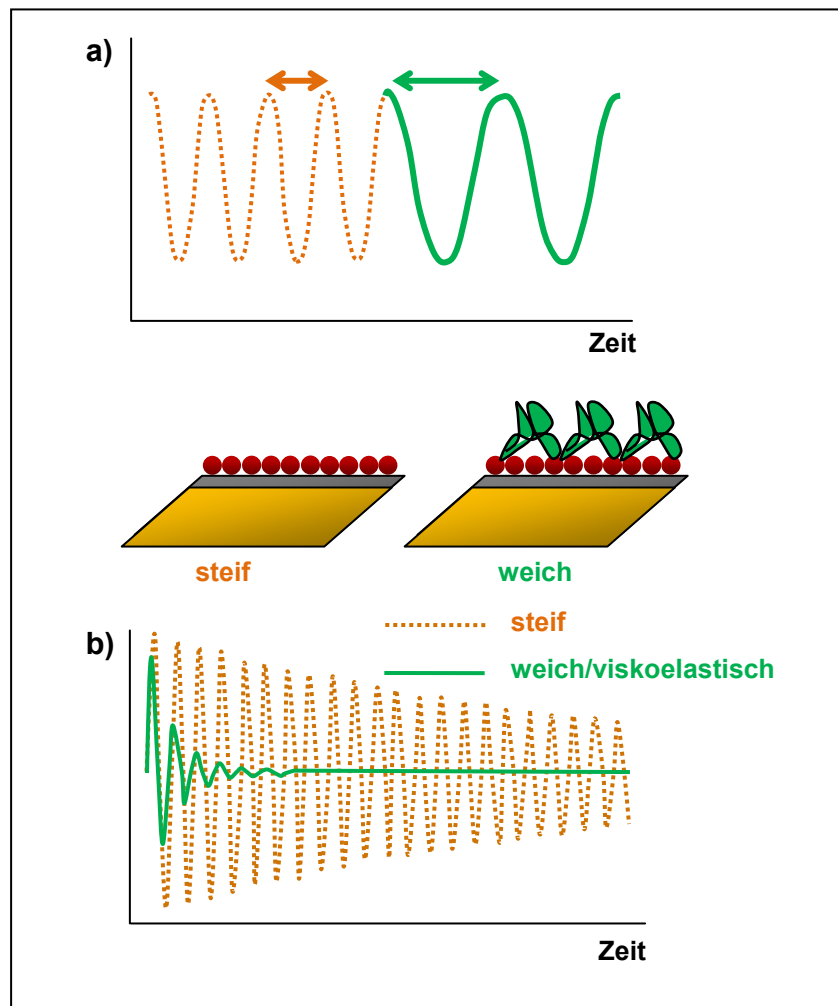
Es ist zu beachten, dass die Sauerbrey-Gleichung nur für dünne und steife adsorbierte Filme gilt. In nicht-steifen Filmen finden Reibungsverluste statt. Dies ist durch Änderung der Dissipationsenergie quantifiziert. Der Dissipationsparameter ist ein Maß für alle Verluste des Systems und ist gegeben durch:

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{E_{\text{dissipiert}}}{2\pi E_{\text{gespeichert}}}, \quad (5)$$

wobei  $Q$  der Qualitätsfaktor,  $E_{\text{dissipiert}}$  die Energie, die während eines Oszillationszyklus verloren geht, und  $E_{\text{gespeichert}}$  die gespeicherte Energie im oszillierenden System sind<sup>162</sup>.

Im Allgemeinen gilt: Die Frequenzänderung ist ein Maß für die adsorbierte Masse, während die Dissipationsänderung die viskoelastischen Eigenschaften widerspiegelt. Für ein Verhältnis  $\frac{\Delta D}{\Delta f} < 0,2 \times 10^{-6} \text{ Hz}^{-1}$  ist die Sauerbrey-Gleichung eine gute Näherung<sup>161</sup>.

In Abbildung 63 wird schematisch dargestellt, wie das QCM-D Signal von der Steifigkeit/Weichheit des adsorbierten Films abhängt: Die steifen adsorbierten Filme haben weniger Einfluss auf die Änderung des Dissipationssignals als die weichen Filme. Somit ist die Dissipationsänderung für weiche adsorbierte Filme größer.



**Abbildung 63: Schematische Darstellung eines QCM-D Signals für steife (rot) und weiche (grün) Filme:** **a)** Die Frequenz der Schwingung des Quarzkristalls ändert sich mit der adsorbierten Masse am Sensor für einen steifen (rot) und einen weichen (grün) Film. **b)** Wenn die an den QCM-D Kristall angelegte Spannung ausgeschaltet wird, hat ein Dissipationssignal o. dargestellte Formen bei steifen und weichen Filmen. Dieser Vorgang kann bis zu 200-mal pro Sekunde erfolgen. Dies verleiht der QCM-D-Methode eine hervorragende Sensitivität und Auflösung. (Die Abbildung ist abgewandelt von<sup>163</sup>)

Allgemein gilt für das in dieser Arbeit verwendete System:

Die Auflösung des Systems ist  $\Delta f = \pm 0,1 \text{ Hz}$  und  $\Delta D = \pm 1 \times 10^{-7}$ . Somit ergibt sich eine Empfindlichkeit von  $\Delta m < 5 \text{ ng/cm}^2$ . Die Zeitauflösung ist besser als 1 s. Die Frequenzänderung von 1 Hz entspricht etwa  $20 \text{ ng/cm}^2$  (für homogene Oberflächen)

### 5.3.1.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

#### **Probenvorbereitung:**

Die mit Gold beschichteten QCM-D Kristalle mit einer Resonanzfrequenz von  $4,95 \pm 0,02$  MHz, werden von Q-Sense AB (Västra Frölunda, Schweden) erworben. Auf die Kristalle, die später passiviert bzw. nanostrukturiert und passiviert werden, wird eine zusätzliche etwa 100 nm dicke Schicht von Siliziumdioxid auf Gold aufgebracht (G. Albert PVD Beschichtungen, Silz, Deutschland). Ein Unterschied zu den Siliziumdioxid beschichteten Kristallen von Q-Sense wird nicht beobachtet<sup>137</sup>.

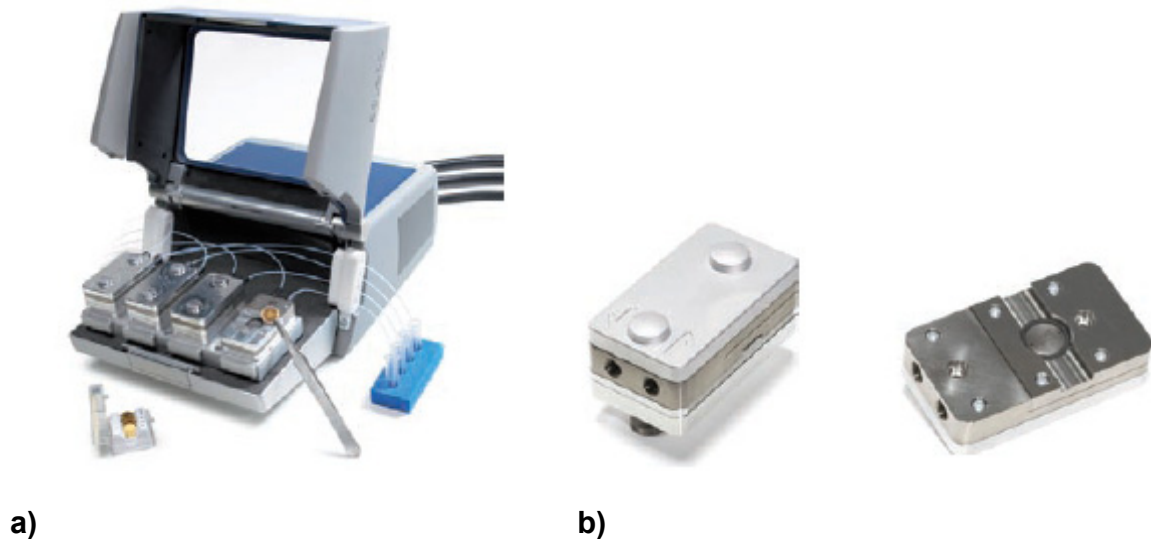
Die goldbeschichteten Kristalle werden in einem Teflonhalter in der Lösung von  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 1:1:4 bei  $70^\circ\text{C}$  5 min gereinigt. Danach werden sie einzeln mit ultrareinem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend folgt eine Behandlung im  $\text{O}_2$ -Plasma (200 W, 0,3 mbar) für 10 min (PVA TePla 100, Feldkirchen, Deutschland). Die mit Siliziumdioxid beschichteten Kristalle werden für die Untersuchungen an homogenen Oberflächen 10 min in der Lösung von  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  gereinigt. Sonst bleibt die Prozedur unverändert. Die mit Siliziumdioxid beschichteten Kristalle mit Nanostruktur und die Referenzkristalle für die Passivierung werden in einem Teflonhalter in einer 3 %-igen Lösung von Natriumdodecylsulfat im Ultraschallbad für 15 min gereinigt. Anschließend werden sie im  $\text{O}_2$ -Plasma (200 W, 0,3 mbar) 30 min behandelt.

Zur Nanostrukturierung der mit Siliziumdioxid beschichteten Kristalle werden diese gereinigt und in  $\text{O}_2$ -Plasma 10 min aktiviert. Anschließend werden sie einzeln per Hand in die Goldlösung eingetaucht (gedippt) und im  $\text{O}_2$ -Plasma (200 W, 0,3 mbar) 45 min abgebrannt. Danach folgt die Passivierung mit PEG 2000 von den Kristallen mit und ohne Nanostruktur (als Referenz für die Passivierung) wie in Kap. 5.2.5 beschrieben.

#### **Versuchsdurchführung:**

Die Messungen werden mit einem Q-Sense E4 System in den Durchflussmodulen durchgeführt (Abbildung 64):





**Abbildung 64:** a) Messplattform eines Q-Sense E4 Systems und b) Durchflussmodule<sup>163</sup>. Die goldbeschichteten QCM-D Kristalle werden in die Durchflussmodule eingesetzt. Die Durchflussmodule werden zusammengeschraubt in der Messplattform befestigt. Danach werden die Schläuche angeschlossen.

Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt zwischen 25-50  $\mu\text{l}/\text{min}$  und wird durch eine peristaltische Pumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz) gewährleistet. Die Arbeitstemperatur beträgt 24°C. Die Resonanzfrequenz und die Dissipation werden gleichzeitig bei sechs Obertönen (~15, 25...65 MHz) gemessen. Dargestellt wird hier die Änderungen der Dissipation und die normierte Frequenz  $\Delta f = f_n / n$  des fünften Obertons ( $n = 5$ , ~25 MHz).

Die QCM-D Apparatur wird etwa 30 min vor dem Experiment eingeschaltet, damit sich die Temperatur im Gesamtsystem auf 24°C einstellt. Alle Puffer werden davor im Ultraschallbad entgast. Die vorbereiteten Kristalle werden in den Durchflussmodulen befestigt. Diese werden wie in Abbildung 64 dargestellt in die Messplattform eingesetzt. Der Zu- bzw. Abfluss der Lösungen geschieht über Schläuche. Die Zufluss-Schläuche sind mit den Durchflussmodulen über die peristaltische Pumpe verbunden. Die Enden der Schläuche werden in Eppendorf Reaktionsgefäße (2 ml) mit den entsprechenden Lösungen eingetaucht. Die Abfluss-Schläuche enden in einem Abfallgefäß.

Als erstes werden die Grundfrequenz, sechs Obertonfrequenzen und Dissipationen der Kristalle an der Luft bestimmt. Dann werden die Durchflusskammern inklusive Kristalle mit ultrareinem Wasser solange gespült, bis sich die Signale stabilisierten. Dann geht man zum Arbeitspuffer über. Danach werden Proteinlösungen injiziert. Erst wird mit dem Arbeitspuffer gewaschen, dann mit Wasser. Das ganze System wird am Ende des

Experiments mit einer 3%-igen Lösung von Natriumdodecylsulfat in Wasser etwa 20 min gespült.

Beim Wechseln der Lösungen wird die peristaltische Pumpe für etwa drei bis fünf Sekunden angehalten, die Schläuche werden in die entsprechenden Eppendorf Reaktionsgefäße umgesteckt und die Pumpe wieder betätigt.

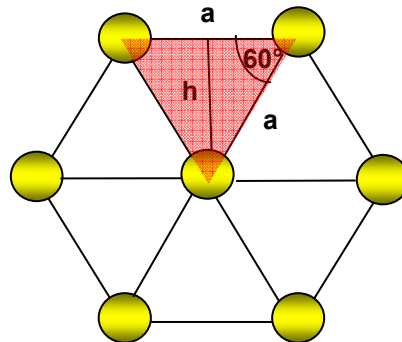
### 5.3.1.2 Auswertung

#### Erwartungswerte für die Anbindung der Proteine an die Nanostruktur:

Um abschätzen zu können, wieviel Protein an einem nanostrukturierten und passivierten Quarzkristall adsorbiert, wird eine Erwartungsrechnung angefertigt:

Die Abstände zwischen den Gold-Nanopartikeln sind durch Rasterelektronische Untersuchungen der Quarzkristalle bekannt. Die Vorversuche der Adsorption auf den homogenen Oberflächen werden durchgeführt. Eine kombinierte Technik, bestehend aus Reflektometrie und QCM-D, wird zur Bestimmung des Wassergehalts des adsorbierten Proteinfilms auf der homogenen Goldoberfläche eingesetzt.

Es wird mit einem Dreieck, bestehend aus drei Gold-Nanopartikel und Fn Dimeren als darauf bindendes Protein gerechnet (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Graphische Darstellung der Nanostruktur.** Eine hexagonale Anordnung der Gold-Nanopartikel (gelb) wird angenommen. Die Fläche des Dreiecks (rosa) wird berechnet, indem  $a$  der Abstand zwischen den Nanopartikeln und  $h$  die Höhe des Dreiecks sind.

Zuerst wird die Fläche des Dreiecks (rosa dargestellt) berechnet:

$$F = \frac{1}{2} \times a \times h \quad (6)$$

Wobei  $a$  der Abstand zwischen den Gold-Nanopartikeln und  $h = a \sin 60^\circ$  die Höhe des Dreiecks sind.

Weiterhin wird angenommen, dass an ein Gold-Nanopartikel ein Proteinmolekül bindet. Die Anzahl der Proteinmoleküle pro Dreieck mit der Fläche  $F$  werden folgendermaßen berechnet:

In einem Hexagon bindet  $1/6$  des Proteinmoleküls pro ein Gold-Nanopartikel. Folglich bindet pro drei Nanopartikel in einem Dreieck  $3 \times 1/6 = 1/2$  Molekül. Das Fn Dimer hat ein Molekulargewicht von 414-450 kDa, welches durch eine SDS-Page ermittelt wird. Dies entspricht etwa einer Molaren Masse von 414000-450000 g/mol. Das Fn Monomer hat ein Molekulargewicht von 220-250 kDa (SDS-Page), welches einer Molaren Masse von etwa 220000-250000 g/mol entspricht. Die Masse eines Proteinmoleküls, des Fn Dimers bzw. Monomers,  $m(P)$  errechnet sich wie folgt:

$$\frac{1}{2} m(P) = \frac{1}{2} \frac{M(P)}{N_A} \quad (7)$$

wobei  $M$  die Molmasse des Proteins und  $N_A \approx 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  die Avogadro-Konstante sind.

Die Änderung der Trockenmasse pro Flächeneinheit des Quarzkristalls ist:

$$\Delta m_{\text{trocken}}(Fn) = \frac{\frac{1}{2} m(P)}{F} = \frac{M(P)}{N_A} \frac{1}{a \times h} \quad (8)$$

Laut dem Reflektometrie-QCM-D Experiment sollte man noch mit der Wasserzahl multiplizieren, um eine Änderung der Masse mit eingeschlossenem Wasser zu berechnen. Im Fall des Fn Dimers entspricht diese Zahl 2,6, die des Fn Monomers 4,32. Somit ist der Erwartungswert für die  $\Delta m_{\text{QCM-D}}$  mit der Gleichung (9) zu bestimmen:

$$\Delta m_{\text{QCM-D}} = \text{Wasserzahl} \times \Delta m_{\text{trocken}} \quad (9)$$

Dieser Wert wird mit dem gemessenen Wert verglichen. Der gemessene Wert wird mit Gleichung (4) ermittelt. So kann abgeschätzt werden, wieviele Fn Moleküle an dem entsprechenden Kristall binden.

Der Fehler  $d\Delta m_{\text{QCM-D}}$  errechnet sich aus der Fehlerfortpflanzung:

$$d\Delta m_{\text{QCM-D}} = \left| \frac{\partial \Delta m_{\text{QCM-D}}}{\partial \Delta m_{\text{trocken}}} \right| \times d\Delta m_{\text{trocken}} + \left| \frac{\partial \Delta m_{\text{QCM-D}}}{\partial F} \right| \times dF + \left| \frac{\partial \Delta m_{\text{QCM-D}}}{\partial \text{Wasserzahl}} \right| \times d\text{Wasserzahl} \quad (10)$$

Die Berechnung des Erwartungswertes stellt nur eine Annahme dar, da der Wert für das eingeschlossene Wasser für homogene Oberflächen gemessen wird. Es ist unklar, wieviel Wasser ein einzelnes Molekül an einem einzelnen Gold-Nanopartikel tatsächlich enthält.

Der Verlauf der Adsorptionsvorgänge in Echtzeit wird mittels QSoft (Q-Sense) am Bildschirm beobachtet und gleichzeitig aufgezeichnet. Die Daten werden mittels QTools (Q-Sense) analysiert. Die Auswertung und graphische Darstellung werden mittels OriginPro 8.1G realisiert.

$\Delta f$  wird aus der Differenz  $\Delta f = f_{\text{Ende}} - f_{\text{Anfang}}$  ermittelt.  $f_{\text{Anfang}}$  bzw.  $f_{\text{Ende}}$  sind Mittelwerte der Frequenz am Anfang der Proteininjektion bzw. am Ende des Waschvorgangs innerhalb einer Minute. Sie werden aus den OriginPro 8.1G-Graphen entnommen. Die Fehler  $df_{\text{Ende}}$  bzw.  $df_{\text{Anfang}}$  sind die Standardabweichungen von Mittelwerten. Der Fehler  $d\Delta f$  wird mittels Fehlerfortpflanzung berechnet:

$$d\Delta f = \left| \frac{\partial \Delta f}{\partial f_{\text{Ende}}} \right| \times df_{\text{Ende}} + \left| \frac{\partial \Delta f}{\partial f_{\text{Anfang}}} \right| \times df_{\text{Anfang}} = df_{\text{Anfang}} + df_{\text{Ende}} \quad (11)$$

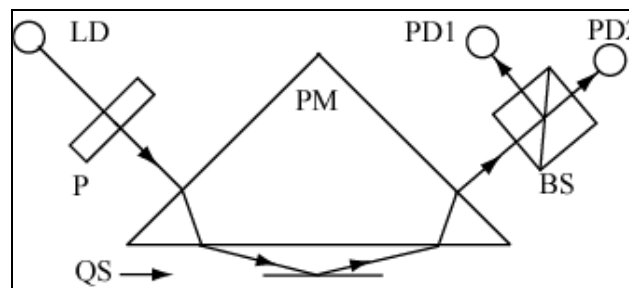
Die Werte von  $\Delta f$  werden für die Bestimmung der Endmasse von adsorbiertem Film in die Gleichung (4) eingesetzt. Die Werte von  $\Delta D$  bzw.  $d\Delta D$  werden ebenso ermittelt.

Das Verhältnis  $\frac{\Delta D}{\Delta f}$  wird bei der Adsorption des jeweiligen Proteins berechnet. Somit

wird die Gültigkeit der Sauerbrey-Gleichung (4) überprüft.

### 5.3.2 Reflektometrie

Die Reflektometrie ist eine optische Methode. Sie ist empfindlich für Differenzen der optischen Dichte zwischen dem adsorbierten Film und dem Lösungsmittel. Es ist somit möglich, die „Trockenmasse“ eines an der homogenen Oberfläche adsorbierten Films zu bestimmen. In der Abbildung 66 wird das Grundprinzip schematisch dargestellt<sup>164</sup>:



**Abbildung 66: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Reflektometrie.** Der linear polarisierte Laserstrahl wird an dem Prisma (PM) gebrochen und von der Oberfläche reflektiert. Durch die erneute Brechung an dem Prisma wird er im polarisierenden Strahlteiler (BS) in die senkrechte und parallele Komponente gespalten und mittels zwei Photodioden (PD1, PD2) detektiert.

Der einfallende Strahl des monochromatischen Lichts wird mittels einer Laserdiode (LD) erzeugt und mittels eines Polarisators (P) linear polarisiert. Er wird an dem Prisma (PM) gebrochen und fällt auf die Oberfläche. Der reflektierte Strahl wird erneut an dem Prisma gebrochen und gelangt somit in den polarisierenden Strahlteiler (BS). Dort wird der Strahl in die parallele ( $p$ ) und senkrechte ( $s$ ) Komponente aufgespalten. Gemessen wird

das Verhältnis  $S = \frac{I^p}{I^s}$  zwischen den entsprechenden Intensitäten  $I^s$  und  $I^p$ , die mittels

zweier Photodioden (PD1 und PD2) detektiert werden. Aufgrund des Unterschiedes von Brechungsindizes von Lösungsmittel und adsorbierten Film kann die optische Masse („Trockenmasse“) mit der Gleichung (12) ermittelt werden<sup>165</sup>:

$$m_{\text{optisch}} = \frac{d_{\text{optisch}}(n - n_0)}{dn/dc} = \frac{1}{A_s} \frac{\Delta S}{S_0} \frac{1}{dn/dc} \quad (12)$$

Hier sind  $c$ ,  $d$  und  $n$  die Konzentration, Dicke und Brechungsindex des dünnen Films,  $n_0$  ist der Brechungsindex des Puffers.  $d_{\text{optisch}}$  ist die optische Dichte,  $A_s$  ist der Empfindlichkeitsfaktor des Systems (in  $\text{nm}^{-1}$ ) und  $S_0$  ist das Verhältnis der Intensitäten

der Polarisationskomponenten vor der Anlagerung des dünnen Films.  $A_s$  ist abhängig von  $d$  und  $n$  sowie von den optischen Eigenschaften der Reflektionsoberfläche, des Lösungsmittels, dem Lichteinfallswinkel und von der Wellenlänge. Mit einer entsprechenden Anordnung kann die Reflektionsoberfläche so eingestellt werden, dass  $A_s$  annähernd konstant über einen großen Bereich von  $d$  und  $n$  bleibt, wie es in unseren Experimenten der Fall ist.  $\Delta S = S - S_0$ , wobei  $S_0$  der Wert zum Zeitpunkt  $t_0$  ist.  $dn/dc$  ist charakteristisch für jedes Molekül und kann in der Literatur ermittelt werden. Für das Fibronektin beträgt dieser Wert  $0,188 \text{ cm}^3/\text{g}^{166}$ .

### 5.3.2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die kombinierten Experimente Reflektometrie/QCM-D werden zusammen mit P. Bingen durchgeführt. Leider wird bei der oben beschriebenen Anordnung ein Fehler in den Messdaten von bis zu etwa 20% festgestellt. Es liegt daran, dass am Boden des Prismas ebenfalls Adsorptionsprozesse stattfinden. Dies hat Konsequenzen für die Strahlengänge. Die Anordnung wurde später auf wie in der Literatur beschrieben vier Detektoren erweitert<sup>167</sup>.

Da eine Wiederholung der Versuche nicht mehr möglich ist, wird der Fehler von 20% bei den erhaltenen Werten mit einkalkuliert.

Die Reflektometrie-Versuche werden mit Fn Dimeren in PBS/Harnstoff (denaturiert), Fn Dimeren in PBS (unter physiologischen Bedingungen) und von Fn Monomeren in PBS/EDTA durchgeführt. Die Datenaufnahme für das Antifibronektin war aus technischen Gründen nicht mehr möglich.

### 5.3.2.2 Hydratation

Die QCM-D Messung liefert Werte der Masse mit eingeschlossenem Lösungsmittel. Die Reflektometrie dagegen gibt Auskunft über die „Trockenmasse“ (reine biomolekulare Masse). Bei der Kombination beider Methoden werden wertvolle Informationen über den auf der Oberfläche adsorbierten Film erhalten: Die Rolle des Wassers kann ermittelt werden. Hier wird der Begriff der Hydratation eingeführt, welcher folgendermaßen definiert ist<sup>164</sup>:

$$H = \frac{m_{\text{Wasser}}}{m_{\text{gesamt}}} = \frac{m_{\text{QCM-D}} - m_{\text{optisch}}}{m_{\text{QCM-D}}} \quad (13)$$

$m_{\text{Wasser}}$  ist die Differenz aus der Gesamtmasse (akustischen Masse)  $m_{\text{QCM-D}}$  und der „Trockenmasse“ (optischen Masse)  $m_{\text{optisch}}$ . Die Hydratation ist ein Verhältnis von der Wassermasse und der Gesamtmasse und ist dimensionslos.

### 5.3.2.3 Auswertung

Wie oben beschrieben, werden die Reflektometriedaten beinahe zeitgleich mit denen der QCM-D Messung aufgenommen. Die Werte von  $I^p$ ,  $I^s$  und  $S$  werden als Textdatei gespeichert und mit OriginPro 8.1G ausgewertet. Zuerst wird der Wert von  $\Delta S$  ermittelt, dann der von  $\frac{\Delta S}{S_0}$ , wobei  $S_0$  der Wert zum Zeitpunkt  $t_0$  ist. Alle Werte werden dann in die Gleichung (12) eingesetzt.

Ungeachtet dessen, dass der Zustand des Systems vor der ersten Proteininjektion stabil ist, wird ein annähernd linearer Drift beobachtet. Es wird festgestellt, dass der Drift oberflächenspezifisch ist: Die Experimente an Siliziumdioxid beschichteten Kristallen bleiben beinahe drifffrei. Jedoch wird ein starker Drift an den Goldoberflächen beobachtet. Dies wird durch die Subtraktion einer linearen Funktion von den Messwerten über die gesamte Messzeit korrigiert. Die optische Masse  $m_{\text{optisch}}$  wird zusammen mit der akustischen Masse  $m_{\text{QCM-D}}$  gegen die Zeit aufgetragen.

Anhand der per Reflektometrie erhaltenen Daten wird der „Wasserfaktor“ für die adsorbierten Filme an homogenen Goldoberflächen ermittelt. Dafür werden bei dem Endpunkt der Messung die Werte für die optische und akustische Masse abgelesen und ein Verhältnis davon gebildet:

$$\text{Wasserzahl} = \frac{m_{\text{QCM-D}}}{m_{\text{optisch}}} \quad (14)$$

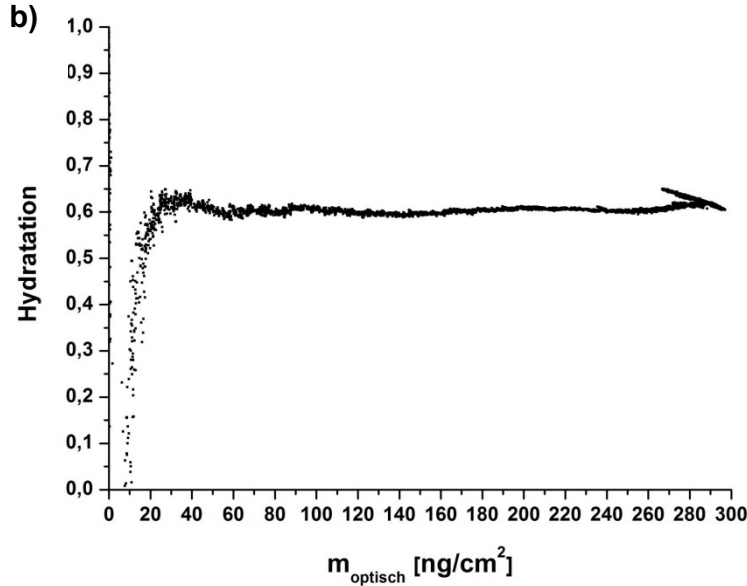
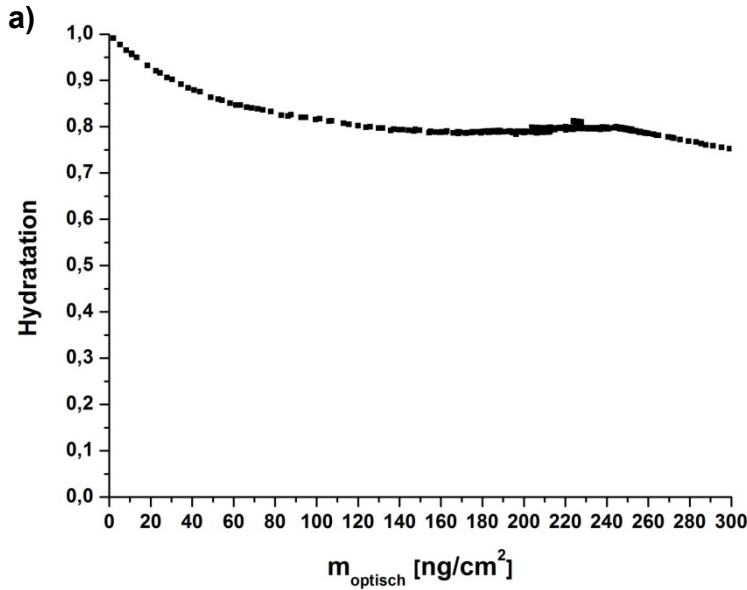
Mittels der „Wasserzahl“ wird abgeschätzt, mit wieviel Wasser für die weiteren Versuche an nanostrukturierten und passivierten Oberflächen bei Fn Dimeren und Fn Monomeren zu rechnen ist. Die „Wasserzahl“ ist ein Richtwert, da diese für homogene Filme an Goldoberflächen ermittelt wird und nicht für einzelne Moleküle.

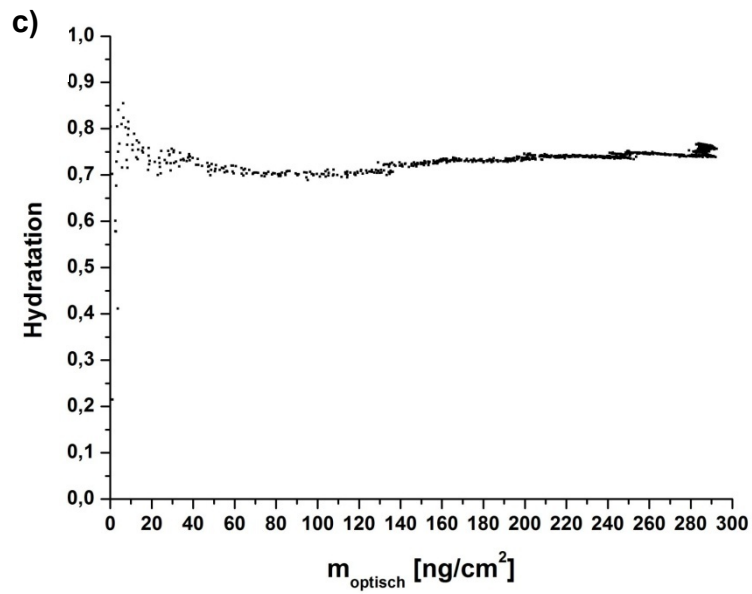
### **Ermittlung der Hydratation:**

Wie oben beschrieben, erfolgt die Aufnahme der Daten für QCM-D und Reflektometrie beinahe zeitgleich. Damit jedem  $m_{\text{QCM-D}}$ - sowie jedem  $m_{\text{optisch}}$ -Punkt ein Zeitpunkt zugeordnet werden kann, müssen die Datenpunkte für  $m_{\text{QCM-D}}$  und für  $m_{\text{optisch}}$  in einen neuen Punktsatz interpoliert werden. Die erhaltenen Werte für beide Massen werden in die Gleichung (14) eingesetzt und gegen die optische Masse aufgetragen, um den Verlauf der Hydratation bei dem steigenden Bedeckungsgrad der Oberfläche abschätzen zu können.

Im Normalfall fällt der Wert der Hydratation mit steigendem Bedeckungsgrad ab. Ist die Abhängigkeit der Hydratation von dem Bedeckungsgrad linear, so kann ein linearer Fit angewandt werden und so  $H_0$  und die Steigung ermittelt werden<sup>164</sup>.  $H_0$  ist ein Maß für die Anfangshydratation bei einem Bedeckungsgrad von Null. Die Steigung ist ein Maß dafür, wie stark das Wasser bei der Einlagerung der weiteren Moleküle von der Oberfläche verdrängt wird. Jedoch ist in unserem Fall die Abhängigkeit nicht linear (s. Abbildung 67):



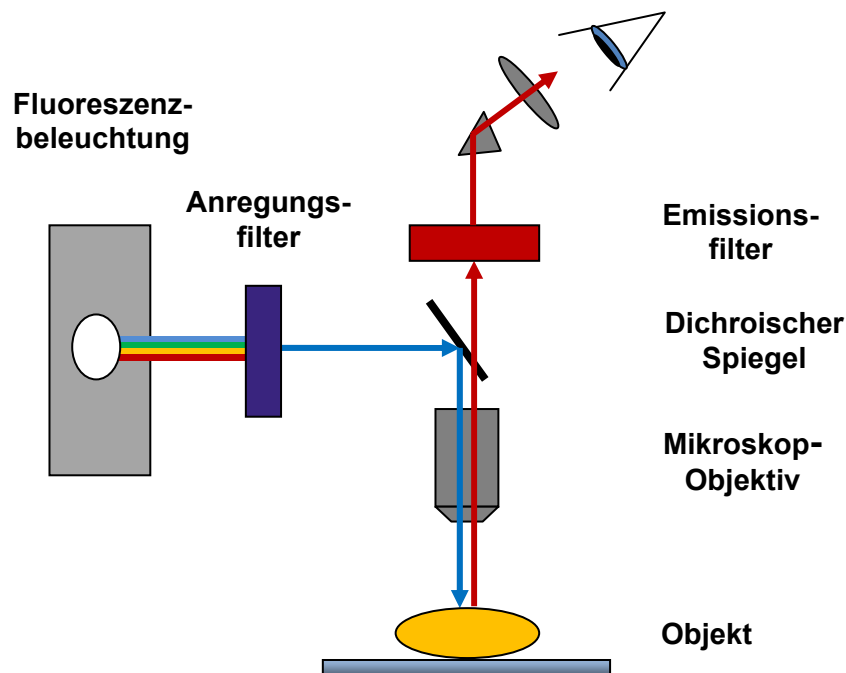




**Abbildung 67:** Hydratation von a) Fn Dimer in PBS/Harnstoff Puffer (denaturiert); b) Fn Dimer in PBS Puffer (unter physiologischen Bedingungen); c) Fn Monomer in PBS/EDTA Puffer. Hier ist die Hydratation gegen die Trockenmasse ( $m_{\text{optisch}}$ ) aufgetragen.

### 5.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird die Fähigkeit gewisser Moleküle, Fluorophore, ausgenutzt, einen Teil der von ihnen absorbierten Strahlung in Form einer energetisch ärmeren Strahlung wieder abzugeben. Durch das Anbringen spezieller Filter wird gewährleistet, dass nur das von einer Probe abgestrahlte Licht beobachtet wird. In Abbildung 68 ist eine schematische Darstellung des Strahlengangs gezeigt.



**Abbildung 68:** Eine schematische Darstellung des Strahlengangs in einem Fluoreszenzmikroskop. Der anregende Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge wird am dichroischen Spiegel zum Präparat gelenkt. Die so angeregten Fluorophore emittieren das langwelligere Licht als die anregende Strahlung. Dieses gelangt durch den dichroischen Spiegel und durch das Okular zum Auge. Abgewandelt von<sup>168</sup>.

Der Anregungsfilter sorgt dafür, dass nur anregende Strahlung das Präparat erreicht. Der Emissionsfilter ist nur für langwellige, durch Emission am Präparat erzeugte Fluoreszenz durchlässig. Im Innern des Mikroskops wird das Licht von einem dichroischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Dieser Spiegel hat die für Fluoreszenzversuche nützliche Eigenschaft, Licht mit kleineren Wellenlängen zu reflektieren und Licht mit größeren Wellenlängen durchzulassen. So wird der Anregungsstrahl durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während der langwelligere

emittierte Fluoreszenzstrahl den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge gelangt<sup>140</sup>.

In dieser Arbeit wird die Fluoreszenzmikroskopie zur Charakterisierung der Anbindungsqualität der Fn Dimere und Monomere an die Nanostruktur eingesetzt. Hierzu wird das Intensitätssignal auf der Seite mit Nanostruktur und auf der Seite ohne Nanostruktur gemessen. Es ist zu erwarten, dass dieses auf der Seite mit Nanostruktur viel stärker als auf der Seite ohne Nanostruktur ist. Um die Proben miteinander zu vergleichen, werden Signalverhältnisse gebildet (vgl. Kap. 5.3.3.3).

Als Substrate dienen in diesem Versuch nanostrukturierte und passivierte Silizium-Plättchen, als Fluorophore die Alexa Fluor Farbstoffe. Sie zeichnen sich durch ihre Stabilität im Gegensatz zu den herkömmlichen Fluoreszenz Molekülen, wie z. B. Fluorescein, und ihre Unempfindlichkeit gegenüber pH-Wert Änderungen im Bereich zwischen vier und zehn aus.

### 5.3.3.1 Markierung von Fn Molekülen mit Fluorophoren

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden Fn Dimere und Monomere direkt mit Fluorophoren markiert. Als Fluorophore werden Alexa Fluor 448 (A-10235) mit dem Anregungs- bzw. Emissionsmaxima bei etwa 494 nm bzw 519 nm und Alexa Fluor 568 (A-10238) mit dem Anregungs- bzw. Emissionsmaxima bei etwa 577 nm bzw 603 nm ausgesucht. Die Reagenzien und Materialien werden von Invitrogen (Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Markierung wird nach dem Protokoll der Firma durchgeführt<sup>142</sup>:

Zu der gelieferten Fluorophormenge wird eine Lösung von 0,5 ml Fn-Lösung (1 mg/ml) in PBS und 50 µl Bicarbonatlösung (1 M) zugesetzt und bei Raumtemperatur eine Stunde lang geschwenkt. Das markierte Protein wird mittels Größen-Ausschluss-Chromatographie gereinigt. Als Säuleninhalt dient das beigelegte Säulengranulat der Firma Invitrogen in PBS (Bio-Rad BioGel P-30 Fine size exclusion purification resin). Der Endpunkt des Aufreinigungsprozesses wird mittels einer UV Lampe bestimmt. UV/Vis Spektroskopie wird bei 280 nm und der Absorptionswellenlänge des Fluorophors durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration  $c_{\text{Protein}}$  erfolgt nach der Gleichung 15:

$$c_{\text{Protein}} = \frac{A_{280} - A_{\text{Absorption}} \times K}{\epsilon_{\text{Protein}}} \quad (15)$$

wobei  $K$  der Korrekturfaktor bei der Absorption des Fluorophors bei 280 nm und  $A_{Absorption}$  die Absorption des markierten Proteins bei der Absorptionswellenlänge sind.  $\varepsilon_{Protein}$  ist der molare Extinktionskoeffizient der Proteine, dieser wird der Proteindatenbank<sup>169</sup> entnommen bzw. mittels dort angegebener Formel errechnet<sup>170</sup>.

Die Anzahl der Fluorophormoleküle pro Proteinmolekül  $N$  errechnet sich mit Hilfe der Gleichung 16:

$$N = \frac{A_{Absorption}}{\varepsilon_{Fluorophor} \times C_{Protein}} \quad (16)$$

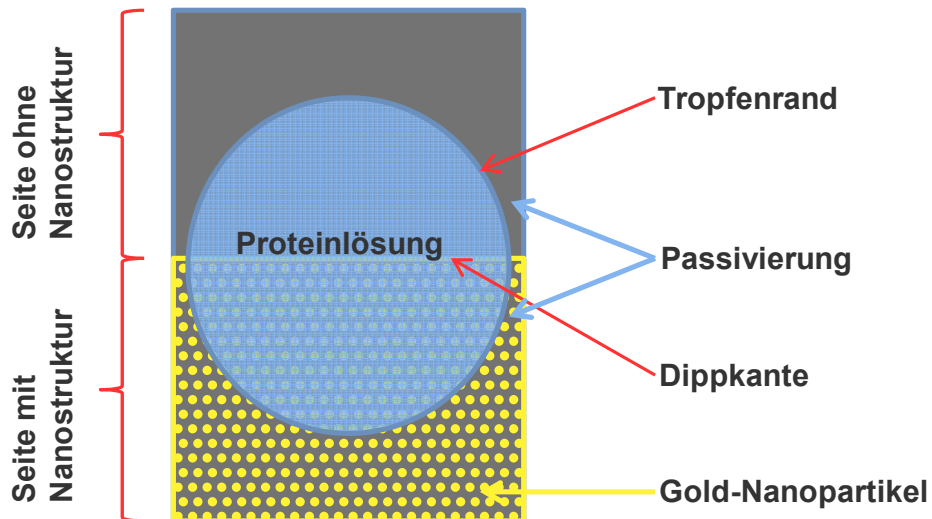
wobei  $\varepsilon_{Fluorophor}$  der molare Extinktionskoeffizient vom Fluorophor bei seiner Absorptionswellenlänge ist.

Die auf diese Weise markierten Proteine werden bei 4°C aufbewahrt. Vor jedem Versuch wird die Proteinlösung auf die gewünschte Konzentration in PBS verdünnt.

### 5.3.3.2 Allgemeine Versuchsdurchführung

#### **Probenvorbereitung:**

Das Fn Dimer bzw. Monomer wird mit einem Fluorophor wie im Kap. 5.3.3.1 beschrieben markiert. Die etwa 1×1,5 cm großen Silizium Plättchen werden wie in Kap. 5.2.4 beschrieben zur Hälfte nanostrukturiert und anschließend komplett passiviert. Auf einem Silizium-Plättchen mit einem Maß von etwa 1×1,5 cm bedeckt die Nanostruktur eine ca. 1×1 cm große Fläche. Das Plättchen wird wie im Kap. 5.2.6.1 und Kap. 5.2.6.2 beschrieben in einer feuchten und dunklen Kammer mit 300 µl Proteinlösung eine Stunde lang inkubiert, indem der Tropfen mittig auf das Plättchen aufgebracht wird (vgl. Abbildung 69). Dies ermöglicht die Visualisierung des Tropfenrandes bei der Bildaufnahme und eine zusätzliche Kontrolle der Passivierungsqualität.



**Abbildung 69: Schematische Darstellung eines nanostrukturierten und passivierten Substrats während der Inkubation mit der Proteinlösung.**

Wie in Abbildung 28 dargestellt werden für Versuche mit der direkten Anbindungsstrategie weitere Parameter untersucht:

- 1) Die Proteinkonzentration (10 µg/ml und 30 µg/ml). Die Konzentrationen werden ausgewählt, um sicher zu stellen, dass genügend Proteinmoleküle in der Lösung zur Abdeckung der Nanostruktur vorhanden sind.
- 2) Die Salzkonzentration des PBS Inkubationspuffers, in dem die Proteine vorliegen (ohne NaCl Zusatz und mit NaCl (1 M) Zusatz).

Die Proben werden anschließend mit PBS im Durchflussmodus gewaschen, mit Glutaraldehyd fixiert und in Elvanol eingebettet. Die bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss getrockneten Proben werden anschließend mikroskopiert.

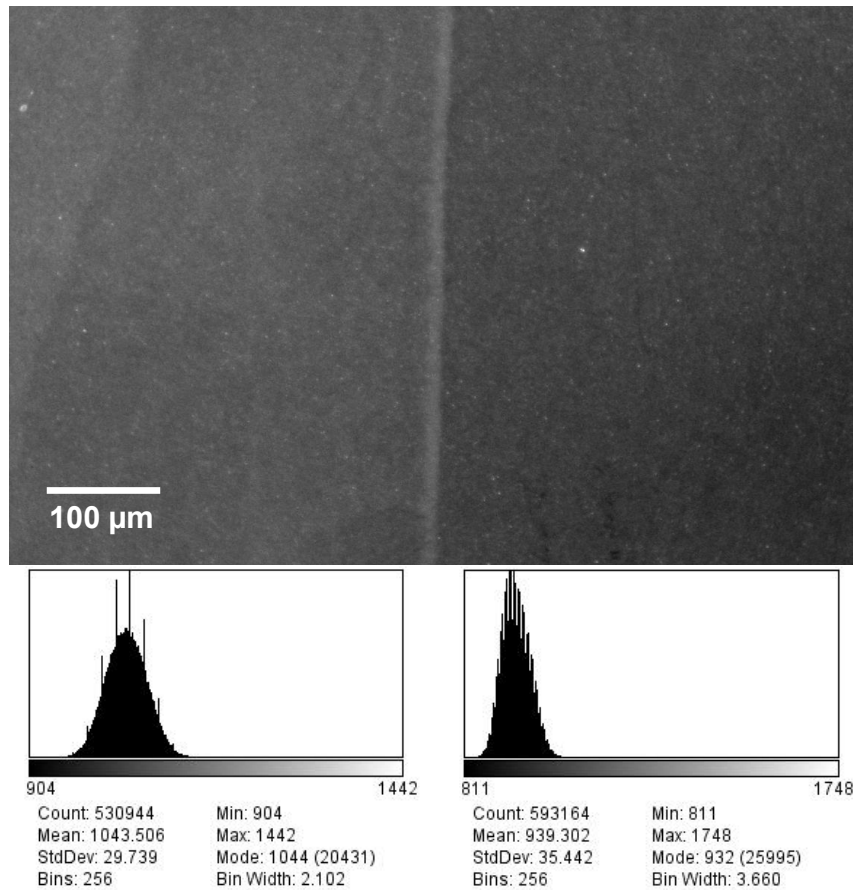
### **Versuchsdurchführung:**

Für jede Anbindungsstrategie werden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei der Bildaufnahme wird schnell die Dippkante aufgesucht. Von ihr ausgehend erfolgen drei bis vier Aufnahmen der nanostrukturierten und passivierten (Nanostruktur) sowie der ausschließlich passivierten Seite (ohne Nanostruktur). Für Fn Dimere beträgt die Belichtungszeit 1000 ms, für Fn Monomere 100 ms. Am Ende der Messzeit wird eine Blindaufnahme mit der geschlossenen Blende (das Rauschen der gesamten Apparatur)

gemacht. Die Aufnahmen stammen von einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit integrierter Xenonlampe und einer Orca Kamera der Firma Hamamatsu. Für Fluoreszenzaufnahmen wird ein 10× Luftobjektiv (Zeiss, APlan 10×/0.25 Phase 1) und folgende Filter verwendet: EGFP Filter (Zeiss, Exzitation: 470±40 nm; Emission: 525±50 nm) und das Texas Red Filter (Zeiss, Exzitation: 560±55 nm, Emission: 645±75 nm). Für Phasenkontrastaufnahmen wird ein 10× Luftobjektiv (Zeiss, APlan 10×/0.25 Phase 1) verwendet.

### **5.3.3.3 Auswertung**

Bei der Bildaufnahme werden zufällige Stellen auf der Seite mit Nanostruktur sowie auf der Seite ohne Nanostruktur aufgesucht. Die Analyse der Intensitätssignale erfolgt mittels ImageJ (engl.: Image Processing and Analysis in Java, entwickelt vom National Institute of Health (NIH), USA)<sup>171</sup>. Bei jedem Versuch wird ein Hintergrundbild (Blindaufnahme), das Rauschen des Systems, aufgenommen. Dieses wird von den Fluoreszenzbildern abgezogen. Danach wird jeweils ein Histogramm der passivierten bzw. nanostrukturierten und passivierten Seite erstellt. In Abbildung 70 wird als ein Beispiel eine Aufnahme dargestellt, bei der bereits das Hintergrundbild abgezogen wurde. Die dazugehörigen Histogramme stellen eine Verteilung des Intensitätssignals auf der Seite mit Nanostruktur bzw. der Seite ohne Nanostruktur dar.



**Abbildung 70: Das Fluoreszenzbild mit Nanostruktur (links) und passivierten Seite (rechts) und die dazugehörigen Histogramme.**

Der von dem Programm ImageJ errechnete Mittelwert des Intensitätssignals  $M$  und die Standardabweichung  $s$  werden mittels Microsoft Office Excel 2007 weiter verarbeitet. Von allen Mittelwerten  $M$  einer Probe für die Seite mit Nanostruktur und für die Seite ohne Nanostruktur wird wiederum ein Mittelwert  $\overline{M}$  errechnet. Der statistische Fehler  $F$  wird nach Gleichung (17) berechnet. Die Anzahl der Messungen  $n$  pro eine Probe beträgt drei bzw. vier je nach der Homogenität der Probe<sup>172</sup>:

$$F_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{M_i}{s_i}\right)^2}} \quad (17)$$

Um alle Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wird ein Verhältnis  $V$  des Intensitätssignals auf der Nanostruktur  $\overline{M}_{\text{Nanostruktur}}$  zur passivierten Seite  $\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$  gebildet:

$$V = \frac{\overline{M}_{\text{Nanostruktur}}}{\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}} \quad (3)$$



Ist  $V$  groß, bedeutet dies, dass die Passivierungsschicht gut proteinabweisend ist und auf der Seite ohne Nanostruktur wenige Proteine anbinden ( $\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$  ist klein). Das Gegenteil tritt in zwei Fällen ein:

- Auf der Seite ohne Nanostruktur ist eine unspezifische Proteinadsorption stattgefunden ( $\overline{M}_{\text{ohneNanostruktur}}$  ist groß).
- Auf der Seite mit Nanostruktur ist wenig Protein angebunden ( $\overline{M}_{\text{Nanostruktur}}$  ist klein).

Der größtmögliche Fehler von  $F_V$  wird ermittelt, in dem der kleinste Wert  $V_{\min}$  von dem größten Wert  $V_{\max}$  abgezogen wird und durch zwei geteilt wird:

$$F_V = \frac{V_{\max} - V_{\min}}{2} \quad (17)$$

Balkendiagramme werden mittels Origin 8.1 erstellt, dabei wird  $V$  auf der Ordinate aufgetragen.

Mittels Excel werden zweiseitige t-Tests (TTEST) durchgeführt, um die Signifikanz der Unterschiede einzelner Datensätze zu überprüfen. Falls die Vergleiche einen signifikanten Unterschied aufweisen, wird dieser mittels eines p-Wertes im Diagramm angedeutet.

## 5.3.4 Elektronenmikroskopie

### 5.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

In einem Rasterelektronenmikroskop wird die Probenoberfläche mit einem fein gebündelten Elektronenstrahl abgerastert. Die ganze Anordnung besteht aus einer REM-Säule, deren wesentliche Elemente eine Elektronenkanone, Linsensysteme, Ablenkeinheiten und Detektoren sind, UHV-Pumpen, der Kontroll-Firmware, Hochspannungsleitungen, Computern und Steuerhebel. Nicht jedes Elektronenmikroskop ist gleich aufgebaut und ausgerüstet, die hier verwendete Gemini-Elektronenkanone der Firma Zeiss ist in Abbildung 71 gezeigt.



**Abbildung 71: Ein Ultra 55 Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss<sup>173</sup>.**

Der Elektronenstrahl wird in der Elektronenkanone im Vakuum erzeugt. Dieser Strahl wird zuerst durch die magnetische Kondensorlinse gebündelt (vgl. Abbildung 71). Die darunter angebrachte Aperturblende korrigiert den sphärischen Fehler der Linse, damit man einen weitgehend parallelen Strahl erhält. Mithilfe einer magnetischen Objektivlinse wird er danach als sehr kleiner Punkt auf die Probenoberfläche fokussiert. Innerhalb der Objektivlinse befinden sich einige Ablenkspulen, die mit einer veränderlichen Spannung

versorgt werden. Sie erzeugen ein Magnetfeld, das den Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster (Raster) hin- und zurückführt<sup>174</sup>.

Der Elektronenstrahl wechselwirkt mit der Probe. Dabei werden die Elektronen der Probe freigesetzt, die Probenoberfläche wird aufgeladen. Um diese überschüssige Ladung abzuleiten, soll die Probenoberfläche leitend sein oder gemacht werden. Dies wird gegebenenfalls durch Aufdampfen einer wenige Nanometer dicken Metallschicht gewährleistet. Die freigesetzten Elektronen werden von Detektoren gesammelt. Allgemein ist ein REM mit einem In-lens, ES2 und ESB Detektoren ausgestattet. Die Aufgabe des Inlens Detektors, der sich in der Gemini-Säule oberhalb der Objektivlinse befindet (vgl. Abbildung 72), ist es die Sekundärelektronen aufzufangen, die an der Oberfläche in dem Einstrahlzentrum oder in der unmittelbaren Nähe bei der Wechselwirkung von Primärelektronen des Elektronenstrahls mit der Probe entstehen. ES2 Detektor befindet sich an der Probenkammerwand. Dieser fängt weniger energiereiche Sekundärelektronen auf. Der ESB Detektor befindet sich oberhalb des Inlens Detektors (vgl. Abbildung 72) und sammelt die Rückstreuelektronen, die den Großteil ihrer Energie durch inelastische Stöße nicht abgegeben haben, und die Sekundärelektronen, die wegen ihrer höheren Energie von dem Inlens Detektor nicht aufgefangen wurden.

Die von Detektoren aufgefangenen Elektronen werden in einen Verstärker weitergeleitet. Das verstärkte Signal wird zur Bildröhre weiter geführt und elektronisch verarbeitet. Die laterale Auflösung eines solchen Mikroskops liegt im nm-Bereich<sup>174]</sup>. Eine schematische Darstellung des Strahlengangs in einem REM ist in Abbildung 72 gezeigt:

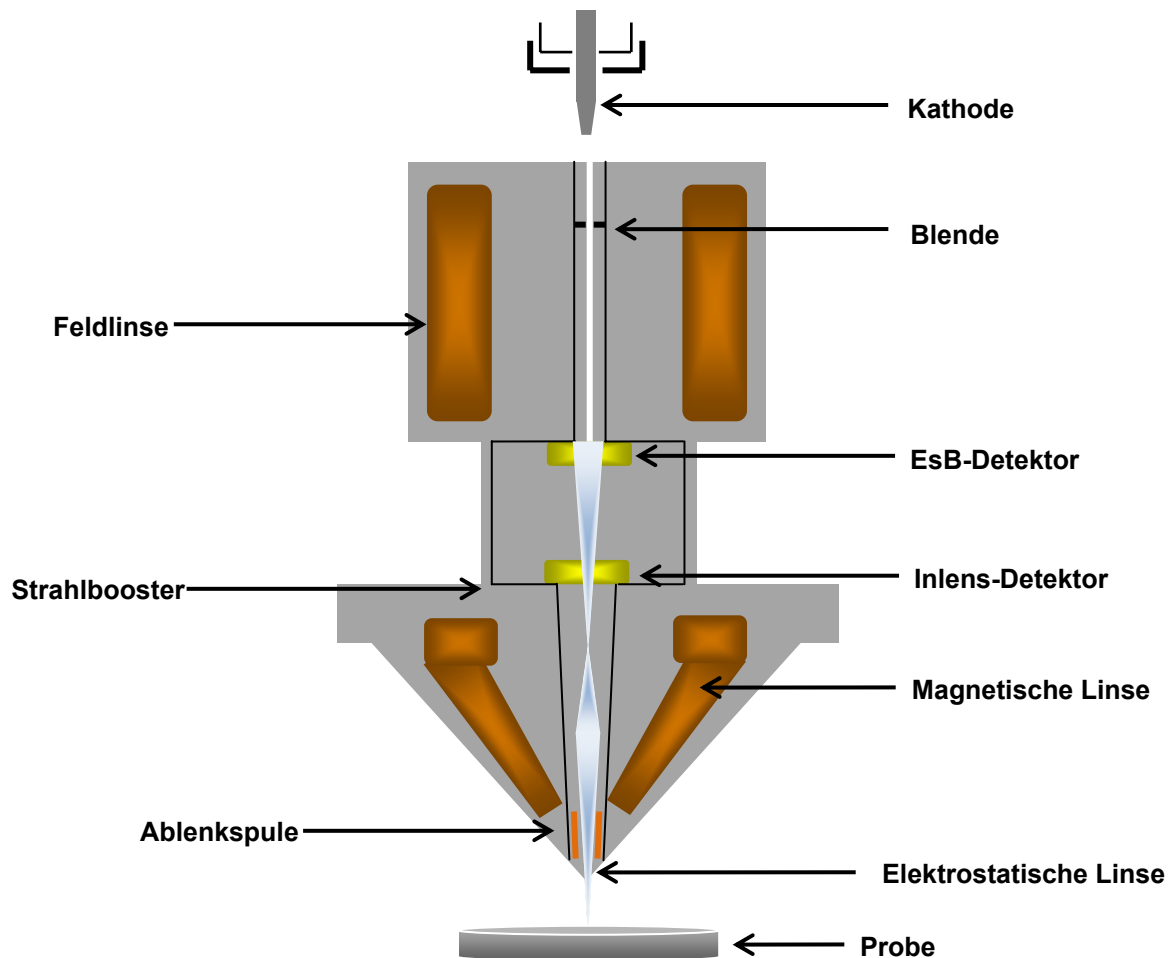


Abbildung 72: Allgemeine Darstellung des Strahlenganges und des Linsensystems in einem Rasterelektronenmikroskop (abgewandelt von <sup>175</sup>).

In dieser Arbeit werden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem Gerät der Firma Zeiss, Modell Ultra 55, ausgestattet mit einer Gemini-Elektronenkanone mit Hilfe von In-lens und Everhart-Thornley (SE2) Detektoren angefertigt

#### 5.3.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Objekt beim Transmissionselektronenmikroskop wird ständig durchleuchtet. Wie bei dem REM werden die von der Elektronenquelle gelieferten Elektronen vom Kondensor-Linsensystem so abgelenkt, dass sie den zu beobachtenden Objektabschnitt gleichmäßig ausleuchten und alle etwa parallel zueinander auf das Objekt einfallen (vgl. Abbildung 73). Der Probenraum wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt, damit nicht zu viele Verunreinigungen auf der Probe abgeschieden werden. Die unterhalb der Probe befindliche Lochblende lässt nur die unelastisch gestreuten sowie die ungestreuten

Elektronen durch, die mittels eines Objektiv-Linsensystems in der hinteren Brennebene in einem Punkt fokussiert werden<sup>174</sup>.

Das Projektiv-Linsensystem vergrößert das vom Objektiv-Linsensystem erzeugte erste Zwischenbild weiter. Durch eine Änderung des Projektiv-Linsensystems kann anstatt des Zwischenbildes auch die Beugungsebene der Objektivlinse vergrößert abgebildet werden. Man erhält so ein Elektronenbeugungsbild, mit dessen Hilfe sich die Kristallstruktur der Probe bestimmen lässt<sup>174</sup>. Das Beugungsbild wird mittels eines Detektors detektiert. Falls das Bild aufgezeichnet werden soll, verwendet man fotografische Filme/Platten oder eine CCD-Kamera.

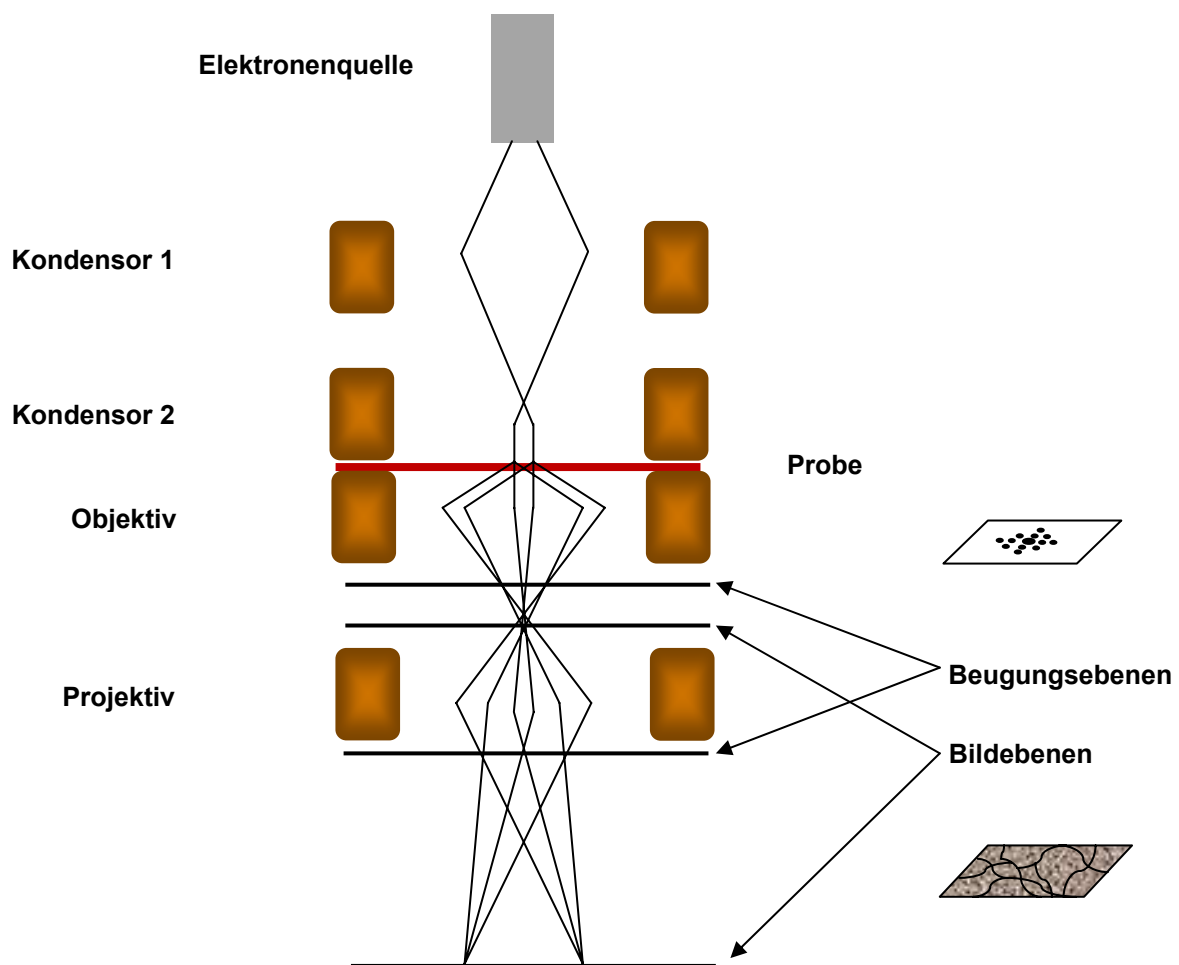


Abbildung 73: Eine schematische Darstellung des Strahlenganges in einem TEM<sup>176</sup>.

In dieser Arbeit werden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem Gerät der Firma Phillips, ausgestattet mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode und einer Weitwinkelkamera der Firma Gatan angefertigt.

### **5.3.4.3 Allgemeine Versuchsdurchführung und Auswertung**

#### **REM-Experimente:**

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen werden mit einem Gerät der Firma Zeiss, Modell Ultra 55, ausgestattet mit einer Gemini-Elektronenkanone bei einer Beschleunigungsspannung von drei bis fünf Kilovolt angefertigt.

#### **Qualitätskontrolle der Nanostruktur:**

Für die Qualitätskontrollen der Nanostruktur werden einige wie im Kap. 5.2.4 beschrieben nanostrukturierte Silizium Plättchen stichprobenartig kontrolliert. Die Silizium Plättchen sind leitend, so dass sie ohne Aufdampfen einer leitenden Schicht im REM untersucht werden. Bildaufnahmen werden bei einer Beschleunigungsspannung von drei bis fünf Kilovolt, einer 30 µm großen Aperturblende und InLens Detektor angefertigt und mit ImageJ (entwickelt vom National Institute of Health (NIH), USA) analysiert. Die Bestimmung der Abstände zwischen den Gold-Nanopartikeln und des Ordnungsparameters wird mit dem Plug-in, welches für diese Zwecke für ImageJ entwickelt wurde<sup>177</sup>, durchgeführt.

#### **REM Versuche unter Kryo-Bedingungen:**

Für den Versuch unter Kryo-Bedingungen wird das Silizium Plättchen wie in Kap. 5.2.4 und Kap. 5.2.5 beschrieben nanostrukturiert und passiviert. Etwa 300 µl einer Fn-Lösung in PBS (10 µg/ml) werden auf dem Plättchen mittig aufgebracht und an der Luft etwa eine Stunde trocknen gelassen. Danach wird die Probe mit PBS drei Mal gespült und im flüssigen Stickstoff bei -180°C schockgefroren. Mittels der Vorrichtung Bal-Tec MED 020 Coating System (Bal-Tec EM-Technology and Application, Balzers, Fürstentum Lichtenstein) wird die Probe bei -80°C 30 min lang sublimiert, um Wasserkristalle zu entfernen, mit Gold (2 nm) bedampft und in die Probenkammer des Elektronenmikroskops transferiert. Bildaufnahmen werden bei einer Beschleunigungsspannung von 1,08 kV, 10 µm großer Aperturblende und mit dem SE2 Detektor angefertigt. Die aufgenommenen Strukturen werden mit ImageJ hinsichtlich der Länge und des Durchmessers analysiert.

#### **Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden:**

Für die Immunomarkierung mit Gold-Kolloiden werden die Proben wie in Kap. 5.2.4 und Kap. 5.2.5 beschrieben nanostrukturiert und passiviert. Danach erfolgt die Anbindung des Fibronectins (wie in Kap. 5.2.6.1 beschrieben), des Primär-( $\alpha$ -Fn, mouse anti human, SIGMA Aldrich, F-0791; 1:50, 120 min, RT) und Gold-Nanopartikel haltigen

Sekundärantikörpers (goat anti mouse, SIGMA Aldrich, G-7652; 1:10, 60 min, RT) mit anschließenden Waschvorgängen und Fixierung mit 0,01%-tigen Glutaraldehyd. Daraufhin werden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet und im REM bei einer Beschleunigungsspannung von drei Kilovolt, der 30 µm großen Aperturblende und InLens Detektor untersucht. Die angefertigten Bildaufnahmen werden mit ImageJ analysiert.

### **Auswertung des Versuchs der Immunogoldmarkierung:**

Die Immunomarkierung wird mit Hilfe ImageJ ausgewertet. Es werden drei verschiedene Aufnahmen und mindestens 500 Partikel analysiert. Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

Als erstes wird der Maßstab von 0,91 Pixel pro ein Nanometer für eine 100k Vergrößerung festgelegt. Danach wird die Umrandung der Partikeln mit dem Befehl (Process) „Find Edges“ festgelegt. Daraufhin erfolgt eine Umwandlung in ein binäres Bild (engl.: Process->Make Binary). Mittels eines Befehls (Analyze) „Analyze Particles“ wird eine Ellipse an die Umrandungen der Partikel angepasst und die Fläche berechnet. Zuerst werden alle Partikel gezählt, dann nur die kleinen. Mittels Excel wird eine Datentabelle angefertigt und der prozentuale Anteil der kleinen Partikeln bestimmt.

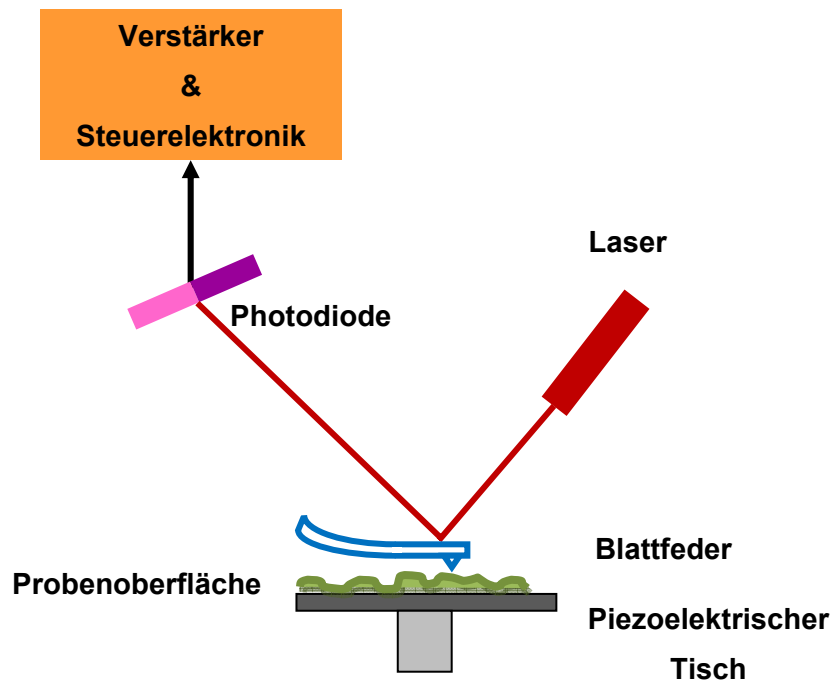
### **TEM Experimente:**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden mit einem Gerät der Firma Phillips, Modell CM 200, mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode bei 120 kV Beschleunigungsspannung und 1,5 µm oberhalb der Brennebene (Defokussierung) angefertigt. Die Bilder werden mit einer Weitwinkelkamera vom Typ Erlangshen (CS500W, Model 782) der Firma Gatan aufgenommen.

Als Probenträger dienen 200 Mesh-Goldnetzchen (engl.: Grids) der Firma Plano, die mit einem Siliziumoxidfilm belegt sind. Die Goldnetzchen werden im Sauerstoffplasma (150 W, 1,5 mbar, 10 min) aktiviert, auf ein Filterpapier gelegt und mit einem Tropfen der Goldlösung (d = 60 nm) in Toluol benetzt. Anschließend werden sie im Sauerstoffplasma (150 W, 1,5 mbar, 45 min) abgebrannt und wie in Kap. 5.2.5 beschrieben in einem Glashalter passiviert. Danach folgen der Inkubationsschritt mit dem Protein (Antikörper, Fn), Waschvorgänge und die Fixierung mit Glutaraldehyd (0,01%-tig) wie in Kap. 5.2.6.1 und Kap. 5.2.6.2 beschrieben. Schließlich wird jeweils ein Tropfen der wässrigen 2%-tigen Uranylacetat-Lösung auf die Proben gegeben. Nach einer Minute wird die überschüssige Lösung mit einem Filterpapier abgezogen. Die angefertigten Bildaufnahmen werden mittels ImageJ analysiert.

### 5.3.5 Rasterkraftmikroskopie

Ein Rasterkraftmikroskop besteht aus vier Hauptkomponenten: Einer an der Blattfeder befestigten Spitze, einem Piezostellelement (piezoelektrischer Tisch), einem Sensor, der die Biegung der Feder detektiert und einem elektrischen Rückkopplungsmechanismus für das Piezostellelement<sup>148</sup>. Eine Darstellung eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 74 gezeigt:



**Abbildung 74: Schematische Darstellung eines AFM:** Die Auslenkung der Blattfeder (engl. Cantilever) bei der Annäherung an die Probe, die auf dem Scan-Tisch befestigt ist, wird durch die Auslenkung des Laserstrahls mit einer Photodiode detektiert. Das Signal wird an die Steuerelektronik weitergegeben und verstärkt. Abgewandelt von<sup>178</sup>.

Bei einem AFM Experiment wird eine an der Blattfeder befestigte Spitze mittels der piezoelektrischen Vorrichtung zeilenweise in einem definierten Raster über die Oberfläche einer Probe bewegt. Dabei wird die Blattfeder abhängig von der Oberflächenstruktur der Probe unterschiedlich weit ausgelenkt. Diese Auslenkung der Spitze kann mit optischen Sensoren gemessen werden und ist ein Maß für die zwischen der Spitze und der Oberfläche wirkenden atomaren Kräfte. In einem Kontaktmodus (engl. Contact-Mode) wird die AFM-Spitze in den Kontakt mit der zu untersuchenden Oberfläche gebracht. Die Piezoelemente, die an die Elektronik gekoppelt sind, sorgen



beim Abrastern der Oberfläche für das Aufrechterhalten der bestehenden Abbildungsparameter (z. B. Kraft)<sup>148</sup>. Für weiche biologische oder Polymer-Filme bewehrte sich die Untersuchung der Oberfläche in einem Nicht-Kontaktmodus (engl. Non-Contact-Mode). Dabei wird die Feder in eine Schwingung, deren Frequenz nah an die Resonanzfrequenz der Feder liegt, gebracht. Hierbei werden die Änderungen der Schwingungsamplitude sowie der Phase der Schwingung während der Annäherung an die Oberfläche detektiert. Somit werden wertvolle Informationen über die Topographie der zu untersuchenden Oberfläche erhalten<sup>148</sup>. Heutzutage ist eine molekulare Auflösung möglich<sup>179</sup>.

In dieser Arbeit soll mit Hilfe von AFM Experimenten untersucht werden, ob bei einer direkten Anbindung Fn Moleküle einzeln und effizient an die Gold-Nanopartikel gekoppelt sind. Hierfür werden passivierte und nicht passivierte Oberflächen mit Nanostrukturen sowie Fn funktionalisierte nanostrukturierte und passivierte Oberflächen an Luft und in Puffer untersucht.

In Abbildung 54 ist eine schematische Darstellung der mit AFM untersuchten Proben an Luft und in Abbildung 55 in PBS dargestellt.

### **5.3.5.1 Allgemeine Versuchsdurchführung**

#### **Untersuchungen an Luft:**

Bei diesen Experimenten werden nanostrukturierte Glasoberflächen, nanostrukturierte und passivierte Glasoberflächen sowie nanostrukturierte und passivierte Glasoberflächen mit an die Nanostruktur gebundenem Fn untersucht. Als Substrat dienen 24x24 mm Deckgläschen der Firma Roth.

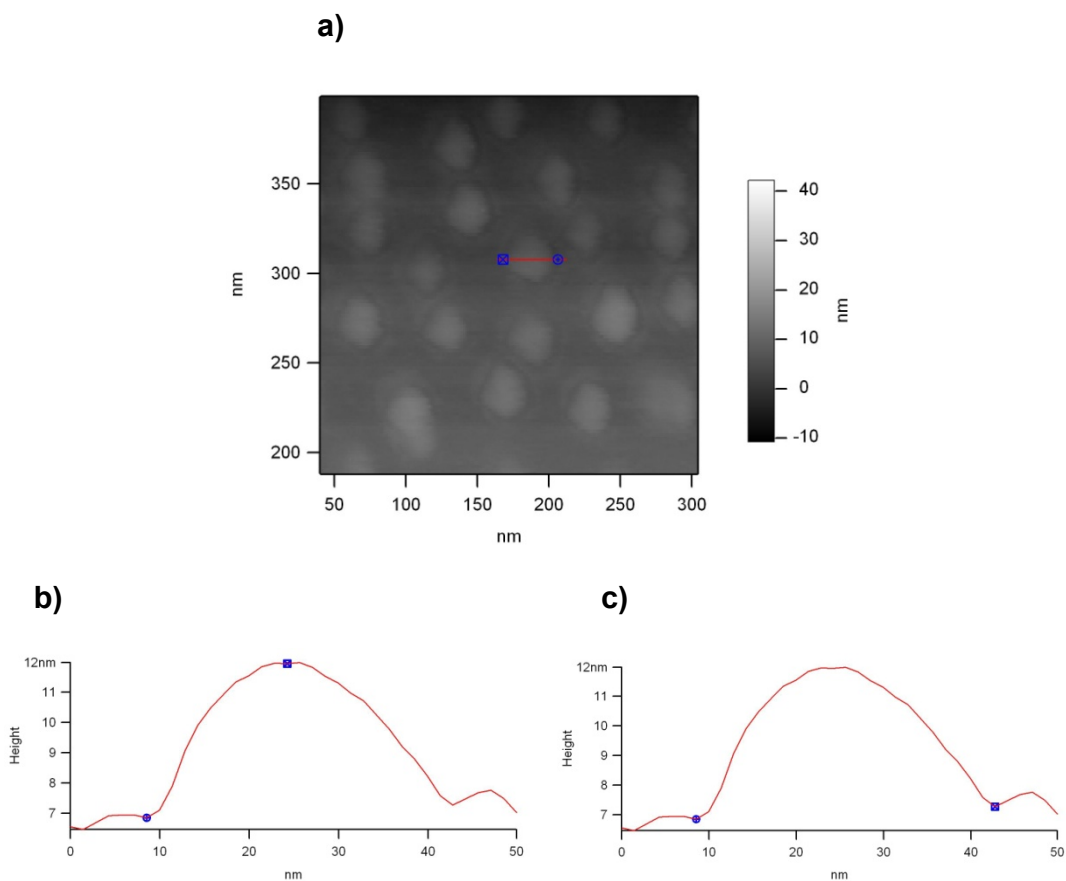
Die Nanostrukturierung, Passivierung sowie eine direkte Anbindung und Fixierung von Fn ist in Kap. 5.2.4-5.2.6 beschrieben.

Die Experimente werden an einem AFM (MFP-3D-BIO, Asylum Research, Santa Barbara, USA) ausgestattet mit einem optischen Mikroskop (Olympus IX71) und einer Kamera (AxioCam Mrm, Zeiss) durchgeführt. Die Deckgläschen werden mit einem transparenten Klebeband seitlich an den Probenstisch befestigt. Daraufhin wird die AFM Spitze am Spitzenhalter fixiert ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ , Federkonstante  $k = 42 \text{ N/m}$ , OMCL-AC160TS-W2, Olympus) und der Laser auf der Spitze positioniert. Danach wird die Eigenfrequenz der Spitze bestimmt und die Oberfläche im AC Modus (tapping mode) bei einer

Geschwindigkeit von  $4,98 \mu\text{m/s}$  untersucht. Die Aufnahmen werden mittels des Programms IGOR Pro (Asylum Research) bearbeitet und mit Excel ausgewertet.

### 5.3.5.2 Auswertung

Es werden zu jeder Probensorte drei unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils zwei Aufnahmen (mindestens 20 Partikel) untersucht. Die Höhe und die Breite der Partikel werden wie in Abbildung 75 gezeigt ermittelt. Die Daten werden in eine Excel Tabelle erfasst und Mittelwerte sowie Werte für die Standardabweichung und den zweiseitigen t-Student Test (TTEST) bestimmt.



**Abbildung 75:** a) Eine vergrößerte AFM Aufnahme der nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche. Ein Beispiel für die Ermittlung der Höhe in b) bzw. der Breite in c) eines Nanopartikels.

### Untersuchung in PBS:

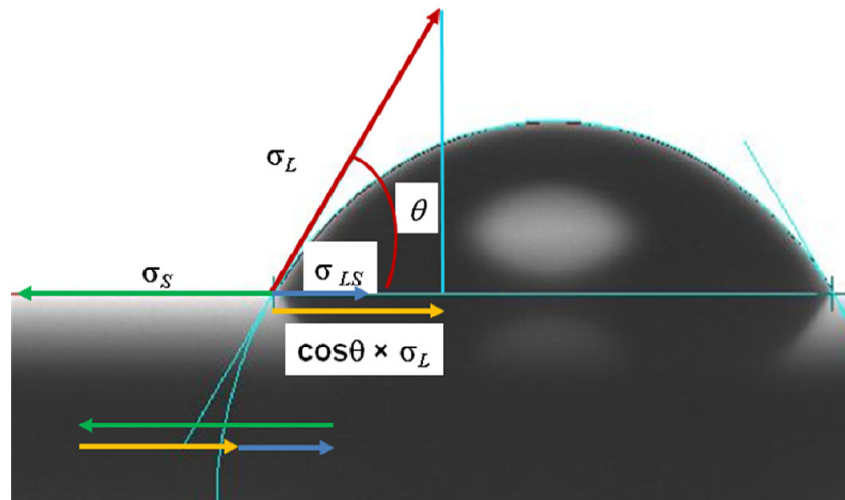
Bei diesen Experimenten werden nanostrukturierte sowie nanostrukturierte und passivierte Glasoberflächen wie in Kap. 5.2.4 und Kap. 5.2.5 beschrieben hergestellt. Im

Anschluss daran werden diese mit einem Zweikomponenten-Kleber an die mit einer ausgeschnittenen Öffnung ( $d = 20 \text{ mm}$ ) versehenen Petrischalen befestigt. Daraufhin werden einige der Proben mit einer Fn Lösung ( $c = 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen (vgl. Kap. 5.2.6.1) und in PBS aufbewahrt. Die restlichen Petrischalen werden ebenfalls mit PBS gefüllt. Alle Petrischalen werden in PBS untersucht.

Die AFM Experimente in Puffer werden von Dr. Tamás Haraszti (Universität Heidelberg) an einem AFM (JPK NanoWizard I, Instruments AG, Berlin, Deutschland), ausgestattet mit einem optischen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) im AC-Modus (tapping mode, non-contact mode) durchgeführt. Die dafür verwendete AFM-Spitze ist eine Siliziumnitrid-Spitze mit der Federkonstante  $k = 0,06 \text{ N/m}$  der Firma Olympus. Aufnahmen werden mit einem Bildverarbeitungsprogramm (SPM Control Software v.3, Version 3.1.19) erstellt.

### 5.3.6 Kontaktwinkelmessungen

Bei der Methode des liegenden Tropfens zur Bestimmung eines statischen Kontaktwinkels wird hier ein Wassertropfen auf der zu untersuchenden Oberfläche erzeugt und dann optisch der Randwinkel (Kontaktwinkel)  $\theta$  zwischen Wasser und Oberfläche bestimmt (vgl. Abbildung 76).



**Abbildung 76:** Eine Kontaktwinkelmessung zwischen der Kontaktoberfläche eines Wassertropfens und einer Oberfläche mit dem Kontaktwinkel  $\theta$ , der Oberflächenspannung des Wassers  $\sigma_L$ , der freien Oberflächenenergie des Festkörpers  $\sigma_S$  und der Grenzflächenenergie zwischen Wasser und Oberfläche  $\sigma_{LS}$ .

Hierbei gibt der Kontaktwinkel  $\theta$  Auskunft über die Benetzbarkeit der Oberfläche.  $\sigma_L$  ist die Oberflächenspannung des Wassers,  $\sigma_S$  ist die freie Oberflächenenergie des Festkörpers und  $\sigma_{LS}$  ist die Grenzflächenenergie zwischen Wasser und Oberfläche. Die Beziehung zwischen den oben aufgeführten Größen wird durch die Youngsche Gleichung (18) beschrieben<sup>180</sup>:

$$\cos \theta = \frac{\sigma_S - \sigma_{LS}}{\sigma_L} \quad (18)$$

Ein kleiner Kontaktwinkel bedeutet, dass die Oberfläche eine gute Benetzbarkeit aufweist und daher hydrophil ist (im Falle des Wassertropfens). Ein großer Kontaktwinkel deutet auf eine hydrophobe Oberfläche hin. Hierbei ist der Kontaktwinkel nach Young nur von der physikalisch-chemischen Natur des Drei-Phasen-Systems (Wasser-Oberfläche-Luft) abhängig<sup>181</sup>.

### **5.3.6.1 Allgemeine Versuchsdurchführung und Auswertung**

Es werden zu jedem Oberflächentyp mindestens drei bis neun Proben ausgewertet. Die Proben werden mittels eines Geräts für optische Messungen des Kontaktwinkels bei hohen Geschwindigkeiten OCAH 200 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland), ausgestattet mit einem Hoch-Geschwindigkeit Videosystem, vermessen und mittels eines Programms SCA20 ausgewertet. Die zu untersuchenden Siliziumplättchen werden entweder in Peroxomonoschwefelsäure (Carosche Säure) gereinigt (vgl. Kap. 5.2.4) oder in Sauerstoffplasma aktiviert (150W, 0,1 mbar, 10 min). Die mit Gold bzw. Siliziumoxid beschichteten QCM-D Kristalle, bei denen die native Oberfläche untersucht wird, werden ebenfalls im Sauerstoffplasma (O<sub>2</sub>-Plasma) aktiviert (150W, 0,1 mbar, 10 min). Glasträger und mit Siliziumoxid beschichteten QCM-D Kristalle werden laut Protokoll gereinigt und passiviert (vgl. Kap. 5.3.1.1).

Jede Probe wird auf dem Probenstisch befestigt, ein 2 µl Tropfen UltraReines Wasser wird mittels des Geräts auf die Probe platziert und mit dem Videosystem der Tropfen aufgenommen. Anschließend werden bei den aufgenommenen Tropfen Kontaktwinkel berechnet und mit Excel Mittelwerte und Standardabweichungen analysiert.



## 6 Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei all denjenigen bedanken, die zum Erstellen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die interessante Themenstellung der Arbeit. Ich möchte mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken, insbesondere für die Unterstützung und das Verständnis während meiner Schwangerschaft und nach dem Wiedereinstieg danach.

Herrn apl. Prof. Dr. Reiner Dahint danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die hilfreichen Diskussionen möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. Roberto Fiammengo, Dr. Fania Geiger, Dr. Ralf Richter, Dr. Cornelia Lee-Thedieck und Dr. Tamás Haraszti danken.

Pit Bingen und Dr. Tamás Haraszti danke ich für die gemeinsame Durchführung der Reflektometrie bzw. AFM Experimente an Luft. Dr. Roberto Fiammengo gilt der besondere Dank bei der Unterstützung in chemischen sowie in biologischen Verfahren.

Ich danke vom ganzen Herzen Frau Christine Mollenhauer, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und deren Wissen und Erfahrung im Laboralltag eine große Hilfe war. Herrn Dr. Michael Bärmann danke ich für die Einführung in die Fm Präparation. Henriette Ries danke ich für die Beantwortung vieler Fragen bezüglich der Zellkultur, sowie für die Schockladen-Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Mark-Oliver Diesner, Dr. Vera Hirschfeld-Warneken, Dr. Nadine Perschmann, Dr. Patricia Wolny, Theresa Pohl für die schöne und freundschaftliche Zeit während der Durchführung dieser Arbeit in Heidelberg danken.

Maria Sycha und Margit Kapp haben mich während meiner Schwangerschaft mit der Präparation der Oberflächen sehr entlastet. Herzlichen Dank dafür! Ioanis Grigoris danke ich sehr für eine perfekte ganzheitliche technische Unterstützung und gute Laune.

Für die Einführung in die Zellkultur danke ich Dr. Dr. Ada Cavalcanti-Adam und Dr. Raquel Martin.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Cornelia Lee-Thedieck für eine schöne und freundschaftliche Büro- und Spielplatz-Atmosphäre.

Dr. Daniel Aydin danke ich für die Geduld bei den ersten unglücklichen QCM-D Experimenten.

Dr. Iain Dunlop danke ich für hilfreiche und freundliche Diskussionen bezüglich der Durchführung der Fluoreszenzexperimente.

Weiterhin möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft während der Fluoreszenzmikroskopie-Experimente und Kontaktwinkelmessungen bei Dr. Peter Kaiser bedanken.

Für die Einführung in die AFM Technik möchte ich mich bei Dr. Nicole Rauch bedanken.

Für die hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen zu dieser Arbeit bedanke ich mich besonders herzlich bei Dr. Fania Geiger, die viele Stunden dafür geopfert hat. Außerdem danke ich Dr. Ralf Richter, Dr. Roberto Fiammengo, Dr. Stefan Kudera, Dr. Kristen Mills, Dr. Nadine Walter und Ann-Kathrin Wandner für das Korrekturlesen und gute Vorschläge zur Gestaltung der Arbeit.

PD Dr. Günter Majer danke ich für die hilfreichen Diskussionen bezüglich statistischen Auswertungen sowie Dr. Alex de Beer.

Weiterhin danke ich Marion Kelsch (Stuttgarter Zentrum für Elektronenmikroskopie) für die ersten transmissionselektronenmikroskopischen Messungen und die darauf folgende kompetente Einweisung.

Für die finanzielle und materielle Unterstützung während der Promotion möchte ich mich an dieser Stelle bei der Universität Heidelberg und Max-Planck-Gesellschaft bedanken.

Ich danke sehr Frau Pfeilmeier und Frau Hess für ihren Einsatz und Verständnis im administrativen Bereich.

Dr. Linda Purwaningsih, Dr. Nadine Walter, Dr. Cornelia Lee-Thedieck, Dr. Nicole Rauch, Dr. Raquel Martin, Dr. Tamar Shahal, Dr. Roberto Fiammengo, Dr. Stefan Kudera, Dr. Kristen Mills, Dr. Mihaela Drumea-Miramcea möchte ich für die schönen Stunden während und außerhalb der Arbeitszeit danken.

Dem gesamten AK Spatz möchte ich für die fröhliche und kooperative Arbeitsatmosphäre sowie für die schöne Zeit während der Promotion danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern vom MPI, die mich mit Materialien und Hilfe unterstützt haben. Herrn Hans Riek danke ich fürs Binden dieser Arbeit.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an meine Freunde Fam. Vilner, Fam. Roizen, Fam. Goldberg, Fam. Mozynski, Meryem, die mit der Wissenschaft nichts zu tun haben, aussprechen. Meiner Freundin Georgiana Baldea danke ich für die Freundschaft und Unterstützung, innerhalb und außerhalb des Studiums.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie: meiner Mutter, meinem Großvater und meiner Großmutter, die an mich stets geglaubt und mich unterstützt haben. Auch meine Schwiegereltern haben zum Erstellen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet. Ich möchte mich auch herzlich bei Herrn Benner für seine Unterstützung bedanken.

Meinem Ehemann Artur und meinem Sohn Simeon danke ich insbesondere für ein wunderschönes familiäres Leben, erfüllt mit viel Glück und Freude. Ohne sie wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Verwaltung des Max-Planck-Institutes, insbesondere Fr. Berner und Fr. Fanther, sowie Konzept-e danke ich sehr für einen sicheren und fröhlichen Aufenthalt meines Sohnes in der MPI Kita „Forscherzwerge“.



## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der kontrollierten Untersuchung einer effizienten und reproduzierbaren Anbindung von einzelnen löslichen Fn Dimeren oder Monomeren an einzelne Gold-Nanopartikel. .... 3
- Abbildung 2: Eine schematische Darstellung eines monomeren Fibronektinmoleküls (abgewandelt von ). Es sind Spleiß-Varianten (EDA, EDB und die variable Region) sowie Bindedomänen und Glykosylierungsstellen dargestellt. .... 5
- Abbildung 3: Die drei Typen der Module. Das Modul des Typ I besteht aus ca. 45 Aminosäuren, das Modul des Typ II aus ca. 60 Aminosäuren und das Modul des Typ III besteht aus ca. 90 Aminosäuren. .... 7
- Abbildung 4: Das vorgeschlagene Modell des Fn Moleküls von Johnson *et al.*: Die kompakte Konformation von pFn-Dimer. Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Modulen Typs III<sub>2-3</sub> ( ● ) und Modulen Typs III<sub>12-14</sub> ( ● ) und der N-terminalen Heparin I Einheit ( ○ ) sorgt für eine kompakte Konformation des Moleküls unter physiologischen Bedingungen. .... 10
- Abbildung 5: Das vorgeschlagene Modell für die Fibrillogenese. Werden auf das Fn Molekül Zugkräfte angelegt, so entfaltet sich das Molekül unter Freilegung der Regionen, die für die Fibrillenbildung von Bedeutung sind. .... 12
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der modularen Struktur des Fn mit Integrin bindenden Domänen (abgewandelt von und ). .... 14
- Abbildung 7: Schematische Darstellung beider Ansätze: top-down und bottom-up. . 22
- Abbildung 8: Eine schematische Darstellung eines Diblockcopolymers: Block A besteht aus X Styrolmonomeren, Block B aus Y 2-Vinylpyridineinheiten. .... 24
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Entstehung und Beladung des polaren Kerns einer Mizelle mit dem Hydrogen Tetrachloroaurat(III) in Toluol. .... 25
- Abbildung 10: Protonierung des N-Atoms der 2-VP-Einheit. .... 26
- Abbildung 11: Benetzung der Substratoberfläche mit Hilfe eines Dipp-Vorganges mit anschließenden Plasmabehandlung und Passivierung mit PEG 2000. .... 27
- Abbildung 12: N-3-Triethoxysilylpropyl-N'-ω-methoxypolyethylenglykolharnstoff als Passivierungsreagenz. .... 28
- Abbildung 13: Anbindungsmöglichkeiten für Fn Dimere bzw. Monomere. Für Fn Dimere werden drei Möglichkeiten untersucht: a) eine direkte Anbindung mit einer statistischen Orientierung des Fn- Moleküls; c) die Anbindung über ein Antifibronektin-

Molekül mit einer gerichteten Orientierung des Fn-Moleküls; e) die Anbindung über einen kleinen Linker, an den im ersten Schritt das Antifibronektin-Molekül gebunden wird. Im zweiten Schritt wird das Fn-Molekül an das Antifibronektin-Molekül gebunden. Für das Fn Monomer werden die Anbindungsmöglichkeiten b) und d) untersucht. .... 32

Abbildung 14: Chemische Struktur des Sulfo-DSP (3,3-Dithio-*bis*(sulfosuccinimidyl)-propionat)-Linkers. Dieser Linker wird zur Anbindung der Antifibronektin-Antikörper an die Gold-Nanopartikel benutzt. Dabei bindet sich das Molekül unter Reduktion der Sulfidbindung (grün eingekreist) an die Oberfläche der Gold-Nanopartikel. Die Carbonylgruppe (blau eingekreist) bildet unter Abgang des Sulfosuccinimidyl-propionats (rot eingekreist) eine Amidbindung mit einer NH<sub>2</sub>-Gruppe haltigen Aminosäure (z. B. Lysin) des Antifibronektins. .... 33

Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) für das Fn Dimer in PBS/Harnstoff auf homogenem Gold. Die QCM-D Masse ist um den Faktor vier größer als die Trockenmasse, da das denaturierte Fn viel Wasser enthält. .... 37

Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) für das Fn Dimer in PBS auf homogenem Gold. Die QCM-D-Masse ist um den Faktor 2,6 größer als die Trockenmasse. Das Fn Molekül enthält unter physiologischen Bedingungen weniger Wasser als in dem denaturierten Zustand. .... 38

Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Trockenmasse (rot) bzw. QCM-D Masse (blau) von Fn Monomeren in PBS/EDTA auf homogenem Gold. Die QCM-D Masse ist um den Faktor 4,3 größer als die Trockenmasse. Das Ergebnis ist ähnlich wie im Fall des denaturierten Fn's. .... 39

Abbildung 18: Adsorptionen von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS. Dargestellt sind die Frequenz ( $\Delta f_5$ )- und Dissipationsänderung ( $\Delta D_5$ ) von dem fünften Oberton. Der Adsorptionsvorgang dauert etwa 30 min. .... 41

Abbildung 19: Adsorption von Fn Monomeren an unterschiedlichen homogenen Oberflächen. Dargestellt sind die Frequenz- ( $\Delta f$ ) und Dissipationsänderung ( $\Delta D$ ) vom fünften Oberton: Am Gold ( $f_5$ ,  $D_5$ ) und Siliziumdioxid ( $f_5$ ,  $D_5$ ). Das Adsorptionsverhalten von Monomeren auf diesen Oberflächen ist sehr ähnlich. .... 42

Abbildung 20: Adsorption von Fn Dimeren und Monomeren auf homogenem Gold im PBS/EDTA Puffer. Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Das in unserem Labor aufgereinigte Fn Dimer ( $f_5$ ,  $D_5$ ), das Fn Dimer von SIGMA ( $f_5$ ,  $D_5$ ) und das Fn Monomer ( $f_5$ ,  $D_5$ ). Die Signaländerungen für beide Fn Dimere sind vergleichbar. .... 44

Abbildung 21: Anbindung von Fibronektinen an die homogene Goldoberfläche in PBS über das Antifibronektin (CT) in PBS. Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Das in unserem Labor aufgereinigte Fn

Dimer (f5, D5), das Fn Dimer von SIGMA (f5, D5) und das Fn Monomer (f5, D5). Das Anbindungsverhalten an das Antifibronektin (CT) von beiden Dimeren ist vergleichbar. 46

Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Adsorption bei einer direkten Anbindung von Fn Dimeren. Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Direkte Anbindung an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. .... 48

Abbildung 23: Direkte Anbindung von Fn Monomeren auf die Nanostruktur. Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Direkte Anbindung an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. Es findet keine Adsorption auf dem passivierten Kristall statt..... 50

Abbildung 24: Adsorption von Fn Dimeren auf der Nanostruktur via Antifibronektin (CT). Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Die Anbindung via Antifibronektin (AFn) an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. Auf der letzten Oberfläche findet keine Proteinadsorption statt..... 52

Abbildung 25: Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur via Antifibronektin (CT). Dargestellt sind die Frequenz- und Dissipationsänderung des fünften Obertons: Die Anbindung via Antifibronektin (AFn) an die nanostrukturierte und passivierte (f5, D5) sowie an die passivierte (f5, D5) Siliziumdioxidoberflächen. Auf der letzten Oberfläche findet keine Proteinadsorption statt..... 53

Abbildung 26: Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall. Dargestellt sind die Frequenz- (f5) und Dissipationsänderung (D5) des fünften Obertons. Ein deutliches Signal für die Anbindung von Sulfo-DSP, ebenso wie von Proteinen an die Nanostruktur wird beobachtet..... 55

Abbildung 27: Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem passivierten Kristall als Kontrolle. Dargestellt sind die Frequenz- (f5) und Dissipationsänderung (D5) des fünften Obertons. Eine irreversible Anbindung vom AFn an die Passivierungsschicht wird beobachtet. .... 57

Abbildung 28: Eine schematische Darstellung der zu untersuchenden Parameter bei den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten. .... 68

Abbildung 29: Schematische Darstellung der in diesem Versuch untersuchten Proben..... 69

Abbildung 30: Ausbleicheffekt für das Fn Dimer und Fn Monomer. Die Signalintensitäten zum Zeitpunkt  $t_1$  bzw.  $t_2$  sind rot bzw. grün dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit (p) dafür, wie signifikant die Unterschiede zwischen den jeweiligen Signalen sind, ist oberhalb der dazugehörigen Balken abgebildet..... 70

Abbildung 31: Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung von Fn Dimeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen..... 71

Abbildung 32: Abhängigkeit der Salzkonzentration des Puffers bei der direkten Anbindung von Fn Dimeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Puffers. .... 72

Abbildung 33: Ein visueller Vergleich der Aufnahmen miteinander: a) Fn in PBS (d = 61±9 nm), b) Fn in PBS+NaCl 1 M (d = 61±9 nm), c) Fn in PBS (d = 36±8 nm) und d) Fn in PBS+NaCl 1 M (d = 36±8 nm). Maßstab ist 100 µm. .... 72

Abbildung 34: Vergleich der direkten Anbindung des Fn Dimers mit einer indirekten über einen Antikörper an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der direkten und indirekten Anbindung des Fn Dimers an Nanostrukturen. .... 73

Abbildung 35: Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen auf der Nanostruktur mit kleineren Abständen, aber beinahe signifikanten Unterschied auf der Nanostruktur mit größeren Abständen. .... 74

Abbildung 36: Abhängigkeit der Salzkonzentration des Puffers bei der direkten Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Anbindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Puffers auf der Nanostruktur mit kleineren Abständen, aber einen signifikanten Unterschied auf der Nanostruktur mit größeren Abständen. .... 75

Abbildung 37: Vergleich der direkten Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur mit einer indirekten über einen Antikörper: a) 36 nm, b) 61 nm. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der direkten und indirekten Anbindung des Fn Monomers an Nanostrukturen. .... 76

Abbildung 38: Andeutung der Wichtigkeit der Qualität der Passivierungsschicht. Auf dem Bild a) ist die Passivierung deutlich schlechter als auf dem Bild b). Die visuellen Unterschiede zwischen der Seite mit Nanostruktur 1 und der Seite ohne Nanostruktur 2 sind deutlich zu sehen. .... 81

Abbildung 39: Schematische Darstellung der elektronenmikroskopischen Experimenten. Bei TEM sowie bei REM Experimenten wird die Effizienz der direkten Anbindungsstrategie von Fn Dimeren untersucht. Bei REM wird zusätzlich Fibrillenbildung bei Kryo-Bedingungen sowie Immunogold-Markierung..... 83

Abbildung 40: Schematische Darstellung einer Immunogoldmarkierung..... 84

- Abbildung 41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerks entlang des austrocknenden Tropfens der Proteinlösung: a) ein Überblick; b) eine nähere Betrachtung. Der Maßstab in a) 10  $\mu\text{m}$ , in b) 1  $\mu\text{m}$ . ..... 85
- Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerks in der Mitte des aufgetragenen Tropfens. Es sind mehr ungeordnete entspannte faserige Strukturen vorhanden. Der Maßstab beträgt in a) 10  $\mu\text{m}$ , in b) 1  $\mu\text{m}$ . ..... 86
- Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fn Netzwerks, die gestreckte Fibrillen und Knoten beinhaltet: a) ein Überblick; in b) eine nähere Betrachtung. Der Maßstab beträgt in a) 2  $\mu\text{m}$ , in b) 200 nm. .... 86
- Abbildung 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer gestreckten Fn Fibrille. Diese besteht aus zwei dünneren Fibrillen. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ . ..... 87
- Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer dicken Fibrillen, die aus vielen dünnen und entspannten Fasern bestehen. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ . ..... 87
- Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Dippkante mit Fn Fibrillen. Der Maßstab beträgt 400 nm. .... 88
- Abbildung 47: a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Nanostruktur. b) + c) Eine Auswertung mittels ImageJ: links ist die 8 bit-Aufnahme mit Umrandungen der Nanopartikeln versehen, rechts sind an die Umrandungen Ellipsen angelegt. Der Maßstab beträgt 100 nm. .... 90
- Abbildung 48: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Referenzproben a) nanostrukturiert, b) nanostrukturiert und anschließend passiviert. Der Maßstab beträgt 20 nm. .... 91
- Abbildung 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der indirekten Anbindung des Fns über den Linker und den Antikörper an die Nanostruktur. Es sind Moleküle im Zwischenraum aufzufinden (grüne Pfeile). An einigen Stellen (rote Pfeile) werden Nanopartikeln durch das Protein zusammengehalten. Der Maßstab beträgt 20 nm. .... 92
- Abbildung 50: Eine schematische Darstellung der Markierung des Fn mit einem passivierten Au-Kolloid. .... 95
- Abbildung 51: Für die Passivierung der Gold-Kolloide verwendete Moleküle: 1 ein Alkyl-PEG 600 Derivat und 2 ein Tetraethylenglykol mit einer zusätzlichen Alkylkette... 95
- Abbildung 52: Ein Chromatogramm des mit Gold-Kolloiden markierten Proteins. Oben wird das 2D Chromatogramm, unten 1D Chromatogramm dargestellt. Zwei Signale sind deutlich zu sehen. Das Signal 1 gehört zu dem nicht markierten Protein, das Signal 2 gehört zu der Mischung, die das markierte Protein und freie Gold-Kolloide enthält. .... 96

- Abbildung 53: UV/Vis Absorptionskurven von a) Gold-Kolloiden, b) mit Gold-Kolloiden markiertem Protein..... 97
- Abbildung 54: Schematische Darstellung der für AFM Experimente an Luft verwendeten Proben: 1: nanostrukturierte Glasoberfläche, 2: nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche, 3: nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit angebindenem Fn..... 100
- Abbildung 55: Eine schematische Darstellung der mit AFM untersuchten Proben in einem PBS Puffer: 1. nanostrukturierte Glasoberfläche, 2. nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche, 3. nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit angebindenem Protein. Die Proben sind an Petrischalen befestigt. Diese sind mit PBS gefüllt..... 101
- Abbildung 56: AFM Aufnahmen a) einer nanostrukturierten, b) einer nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche. In c) ist eine nanostrukturierte und passivierte Glasoberfläche mit an die Nanostruktur gebundenem Fn abgebildet. Unten sind Höhenprofile der Nanopartikel entlang roter Linien angegeben. .... 103
- Abbildung 57: Eine 1x1  $\mu\text{m}$  AFM-Aufnahme einer nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche in PBS mit einem Höhenprofil entlang der roten Linie. .... 104
- Abbildung 58: 1x1  $\mu\text{m}$  AFM Aufnahmen einer nanostrukturierten und passivierten Probe mit angebindenem Fn: a) eine Höhen- Rücklauf (engl. height-retrace) und b) eine Phasen-Rücklauf (engl. phase-retrace) Aufnahme. In b) lässt sich eine Nanostruktur teilweise erkennen. .... 105
- Abbildung 59: Eine optische Messung des Kontaktwinkels  $\theta$  auf a) einer mit  $\text{O}_2$ -Plasma behandelten Goldoberfläche, b) einer passivierten Glasoberfläche und c) einem mit Carosche Säure gereinigten Silizium Plättchens mit dazugehörigen Winkeln dargestellt..... 107
- Abbildung 60: SDS-PAGE von in unserem Labor hergestellten Fn und kommerziell erhältlichen Fn von SIGMA: a) nach Färbung mit PageBlue; b) nach Silberfärbung. ... 118
- Abbildung 61: Überprüfung der Stabilität von Fn Monomeren: a) direkt nach der Reduktion mit DTT und b) drei Tage danach mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Monomereinheiten bleiben in dem EDTA haltigen PBS Puffer im Gegensatz zu dem EDTA freien PBS Puffer stabil. .... 120
- Abbildung 62: Verlauf der transversalen akustischen Welle zwischen den Goldelektroden (grau) in einem AT-Schnitt Quarz mit der Dicke  $d_Q$  (links). .... 125
- Abbildung 63: Schematische Darstellung eines QCM-D Signals für steife (rot) und weiche (grün) Filme: a) Die Frequenz der Schwingung des Quarzkristalls ändert sich mit der adsorbierten Masse am Sensor für einen steifen (rot) und einen weichen (grün) Film.

b) Wenn die an den QCM-D Kristall angelegte Spannung ausgeschaltet wird, hat ein Dissipationssignal o. dargestellte Formen bei steifen und weichen Filmen. Dieser Vorgang kann bis zu 200-mal pro Sekunde erfolgen. Dies verleiht der QCM-D-Methode eine hervorragende Sensitivität und Auflösung. (Die Abbildung ist abgewandelt von) . 127

Abbildung 64: a) Messplattform eines Q-Sense E4 Systems und b) Durchflussmodule. Die goldbeschichteten QCM-D Kristalle werden in die Durchflussmodule eingesetzt. Die Durchflussmodule werden zusammengeschraubt in der Messplattform befestigt. Danach werden die Schläuche angeschlossen. .... 129

Abbildung 65: Graphische Darstellung der Nanostruktur. Eine hexagonale Anordnung der Gold-Nanopartikel (gelb) wird angenommen. Die Fläche des Dreiecks (rosa) wird berechnet, indem  $a$  der Abstand zwischen den Nanopartikeln und  $h$  die Höhe des Dreiecks sind..... 130

Abbildung 66: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Reflektometrie. Der linearpolarisierte Laserstrahl wird an dem Prisma (PM) gebrochen und von der Oberfläche reflektiert. Durch die erneute Brechung an dem Prisma wird er im polarisierenden Strahlteiler (BS) in die senkrechte und parallele Komponente gespalten und mittels zwei Photodioden (PD1, PD2) detektiert..... 133

Abbildung 67: Hydratation von a) Fn Dimer in PBS/Harnstoff Puffer (denaturiert); b) Fn Dimer in PBS Puffer (unter physiologischen Bedingungen); c) Fn Monomer in PBS/EDTA Puffer. Hier ist die Hydratation gegen die Trockenmasse ( $m_{\text{optisch}}$ ) aufgetragen. .... 138

Abbildung 68: Eine schematische Darstellung des Strahlengangs in einem Fluoreszenzmikroskop. Der anregende Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge wird am dichroischen Spiegel zum Präparat gelenkt. Die so angeregten Fluorophore emittieren das langwelligere Licht als die anregende Strahlung. Dieses gelangt durch den dichroischen Spiegel und durch das Okular zum Auge. Abgewandelt von. .... 139

Abbildung 69: Schematische Darstellung eines nanostrukturierten und passivierten Substrats während der Inkubation mit der Proteinlösung. .... 142

Abbildung 70: Das Fluoreszenzbild mit Nanostruktur (links) und passivierten Seite (rechts) und die dazugehörigen Histogramme..... 144

Abbildung 71: Ein Ultra 55 Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss..... 146

Abbildung 72: Allgemeine Darstellung des Strahlenganges und des Linsensystems in einem Rasterelektronenmikroskop (abgewandelt von)..... 148

Abbildung 73: Eine schematische Darstellung des Strahlenganges in einem TEM... 149

Abbildung 74: Schematische Darstellung eines AFM: Die Auslenkung der Blattfeder (engl. Cantilever) bei der Annäherung an die Probe, die auf dem Scan-Tisch befestigt ist,

wird durch die Auslenkung des Laserstrahls mit einer Photodiode detektiert. Das Signal wird an die Steuerelektronik weitergegeben und verstärkt. Abgewandelt von. .... 152

Abbildung 75: a) Eine vergrößerte AFM Aufnahme der nanostrukturierten und passivierten Glasoberfläche. Ein Beispiel für die Ermittlung der Höhe in b) bzw. der Breite in c) eines Nanopartikels. .... 154

Abbildung 76: Eine Kontaktwinkelmessung zwischen der Kontaktfläche eines Wassertropfens und einer Oberfläche mit dem Kontaktwinkel  $\theta$ , der Oberflächenspannung des Wassers  $\sigma_L$ , der freien Oberflächenenergie des Festkörpers  $\sigma_S$  und der Grenzflächenenergie zwischen Wasser und Oberfläche  $\sigma_{LS}$ .... 156



## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren in PBS/Harnstoff. ....	38
Tabelle 2: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren in PBS. ....	39
Tabelle 3: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Monomeren in PBS/EDTA. ....	40
Tabelle 4: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren auf homogenem Gold in PBS. ....	41
Tabelle 5: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Monomeren auf unterschiedlichen Oberflächen. ....	43
Tabelle 6: Zusammengefasste Daten für die Adsorption von Fn Dimeren bzw. Monomeren. ....	45
Tabelle 7: Zusammengefasste Daten für die Anbindung von Fn's über das Antifibronektin auf der homogenen Oberfläche. ....	47
Tabelle 8: Zusammengefasste Daten für eine direkte Anbindung von Fn Dimeren in PBS an die Nanostruktur. ....	49
Tabelle 9: Zusammengefasste Daten für eine direkte Anbindung von Fn Monomeren an die Nanostruktur. ....	51
Tabelle 10: Zusammengefasste Daten für die Anbindung von Fn Dimeren via Antifibronektin. ....	52
Tabelle 11: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Monomers via AFn (CT). ....	54
Tabelle 12: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem nanostrukturierten und passivierten Kristall. ....	56
Tabelle 13: Zusammengefasste Daten für die Anbindung des Fn Dimers über Sulfo-DSP und AFn auf dem passivierten Kristall als Kontrolle. ....	57
Tabelle 14: Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchsdaten für eine direkte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur. ....	59
Tabelle 15: Vergleich der Erwartungswerte mit den Versuchsdaten für eine direkte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur. ....	60

Tabelle 16: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Dimers über das AFn an die Nanostruktur. ....	61
Tabelle 17: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Monomers an die Nanostruktur über das AFn. ....	62
Tabelle 18: Vergleich der Erwartungswerte mit den erhaltenen Daten für eine indirekte Anbindung des Fn Dimers an die Nanostruktur via Linker und AFn.....	63
Tabelle 19: Vergleich der Literaturwerte mit den erhaltenen Daten für die Fn Adsorption auf homogenen Oberflächen. Die ersten zwei Zeilen in rot repräsentieren unsere Daten. ....	65
Tabelle 20: Bestimmung der Proteinkonzentration. ....	77
Tabelle 21: Bestimmung des Markierungsgrades.....	77
Tabelle 22: Berechnete Anzahl der Proteinmoleküle in 300 µl Proteinlösung .....	78
Tabelle 23: Zusammengefasste Daten der Intensitätsverhältnisse .....	81
Tabelle 24: Durchmesser der Strukturen des Fn Netzwerkes .....	88
Tabelle 25: Höhe und Durchmesser von Nanopartikeln auf unterschiedlich behandelten Glasoberflächen.....	103
Tabelle 26: Darstellung der experimentellen Daten.....	108
Tabelle 27: Zusammengefasste Parameter für die eingesetzten Goldlösungen.....	122

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, H. Kessler, J. P. Spatz, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383.
- <sup>2</sup> J. P. Spatz, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 3507.
- <sup>3</sup> A. F. Horwitz, *Spektrum der Wissenschaft*, **1998**, *1*, 86.
- <sup>4</sup> J. G. Voet, D. Voet, C. W. Pratt, Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH, **2002**.
- <sup>5</sup> D. M. Peters, L. M. Portz, J. Fullenwider, D. F. Mosher, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 249.
- <sup>6</sup> a) I. F. Wierzbicka-Patynowski, J. E. Schwarzbauer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3269; b) G. Baneyx, L. Baugh, V. Vogel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 14464.
- <sup>7</sup> a) D. C. Hocking, R. K. Smith, and P. J. McKeown-Longo, *J Cell Biol* **1996**, *133*(2), 431; b) A. Morla, Z. Zhang, and E. Ruoslahti, *Nature* **1994**, *367*(6459), 193.
- <sup>8</sup> J. E. Schwarzbauer, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1463.
- <sup>9</sup> a) R. Biran, K. Webb, M. D. Noble, P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 1; b) P. A. Dimilla, S. M. Albelda, J. A. Quinn, *J. Coll. & Interf. Sci.* **1992**, *153*, 212.
- <sup>10</sup> a) L. Guemouri, J. Ogier, J. J. Ramsden, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 3265; b) L. Guemouri, J. Ogier, Z. Zekhnini, J. J. Ramsden, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 8183.
- <sup>11</sup> A. G. Hemmersam, K. Rechendorff, M. Foss, D. Sutherland and F. Besenbacher, *J. Coll. & Interf. Sci.* **2008**, *320*, 110.
- <sup>12</sup> a) K. B. McClary, T. Ugarova, W. Grainger, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 428; b) C. A. Scotchford, C. P. Gilmore, E. Cooper, G. J. Legget, S. Downes, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*, 84.
- <sup>13</sup> A. Pataki, E. Madarász, I. Kurucz, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *68*, 113.
- <sup>14</sup> C. Calonder, H. W. T. Matthew, P. R. van Tassel, *Wiley Periodicals, Inc.* **2005**, 316.
- <sup>15</sup> a) C. Lee-Thedieck, *persönliche Mitteilung*, **2011**; b) S. T. Plummer, Q. Wang, P. W. Bohn, *Langmuir* **2003**, *19*, 7528.
- <sup>16</sup> a) J. P. Spatz, S. Mossmer, C. Hartmann, M. Möller, T. Herzog, M. Krieger, H. Boyen, P. Ziemann, B. Kabius, *Langmuir* **2000**, *16*, 407; b) J. P. Spatz, S. Mossmer, M. Möller, *Chem.Eur.J.* **1996**, *2*, 1552.
- <sup>17</sup> S. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada, *J.Biol.Chem.* **1994**, *269*(40), 24756.
- <sup>18</sup> M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angewandte Chemie* **1999**, *111*(4), 587.
- <sup>19</sup> E. Klar, D. L. Heene *DLKlein Wochenschr.* **1984**, *62*, 963.
- <sup>20</sup> R. O. Hynes, *Fibronectins*, Springer, New York, **1990**.

- <sup>21</sup> N. Kawelke, *Dissertation*, **2009**.
- <sup>22</sup> E. Crouch, G. Balian, K. Holbrook, D. Duksin, P. Bornstein, *J. Cell. Biol.*, **1978**, *78*, 701; P. Kuusela, A. Vaheri, J. Palo, E. Ruoslahti, *J. Lab. Clin. Med.*, **1978**, *92*, 595; K. S. Webb, G. H. Linn, *Inv. Urology*, **1980**, *17*, 401.
- <sup>23</sup> B. Voss, S. Allan, J. Rauterberg, K. Ullrich, K. Gieselmann, K. von Figura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1979**, *90*, 1348.
- <sup>24</sup> C. R. Birdwell, D. Gospodarowicz, G. L. Nicolson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, *75*, 3273; E. A. Jaffe, D. F. Mosher, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1978**, *312*, 122; T. M. Saba, E. Jaffe, *Am. J. Med.*, **1980**, *68*, 577.
- <sup>25</sup> D. F. Mosher, O. Saksela, J. Keski-Oja, A. Vaheri, *J. Supramol. Struct.*, **1977**, *6*, 551.
- <sup>26</sup> E. Ruoslahti, A. Vaheri, P. Kuusela, E. Linder, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1973**, *322*, 352.
- <sup>27</sup> E. Linder, A. Vaheri, E. Ruoslahti, J. Wartiovaara, *J. Exp. Med.*, **1975**, *142*, 41.
- <sup>28</sup> B. S. Isaacs, S. A. Brew, K. C. Ingham *Biochemistry* **1989**, *28*(2), 842.
- <sup>29</sup> <http://nethingham.org/FN2009/figs/modules2.htm>.
- <sup>30</sup> S. Patel, A. F. Chaffotte, B. Amanac, F. Goubard, E. Pauthe, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2006**, *38*, 1547.
- <sup>31</sup> R. Pankov, K. M. Yamada, *J. Cell. Sci.* **2002**, *115*, 3861.
- <sup>32</sup> J. I. Paul, J. E. Schwarzbauer, J. W. Tamkun, R. O. Hynes *J Biol Chem* **1986**, *261*(26), 12258.
- <sup>33</sup> J. E. Schwarzbauer, C. S. Spencer, C. L. Wilson *J Cell Biol* **1989**, *109*(6 Pt 2), 3445.
- <sup>34</sup> J. N. MacLeod, N. Burton-Wurster, D. N. Gu, G. Lust, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 18954.
- <sup>35</sup> T. Vartio, L. Laitinen, O. Narvanen, M. Cutolo, L. E. Thornell, L. Zardi, I. Virtanen, *J. Cell Sci.*, **1987**, *88*, 419; V. L. Magnuson, M. Young, D. G. Schattenberg, M. A. Mancini, D. L. Chen, B. Steffensen, R. J. Klebe, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*(22), 14654.
- <sup>36</sup> L. F. Brown, D. Dubin, L. Lavigne, B. Logan, H. F. Dvorak, L. Van de Water, *Am. J. Pathol.*, **1993**, *142*(3), 793; C. Ffrench-Constant, L. Van de Water, H. F. Dvorak, R. O. Hynes, *J. Cell Biol.*, **1989**, *109*(2), 903.
- <sup>37</sup> F. Oyama, S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani, K. Sekiguchi, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(18), 10331; M. V. Barone, C. Henchcliffe, F. E. Baralle, G. Paoletta, *EMBO J*, **1989**, *8*(4), 1079.
- <sup>38</sup> J. E. Schwarzbauer, C. S. Spencer, C. L. Wilson, *J. Cell. Biol.*, **1989**, *109*, 3445.

- 
- <sup>39</sup> M. Tajiri, S. Yoshida, Y. Wada, *Glycobiology*, **2005**, 15(12), 1332.
- <sup>40</sup> B. A. Bernard, K. M. Yamada, K. Olden, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257(14), 8549.
- <sup>41</sup> B. C. Zhu, R. A. Laine, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260(7), 4041.
- <sup>42</sup> H. Matsuura, T. Greene, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264(18), 10472.
- <sup>43</sup> C. J. Lockwood, A. E. Senyei, M. R. Dische, D. Casal, K. D. Shah, S. N. Thung, L. Jones, L. Deligdisch, T. J. Garite, *N. Engl. J. Med.*, **1991**, 325(10), 669.
- <sup>44</sup> J. Pelta, H. Berry, G. C. Fadda, E. Pauthe, D. Lairez, *Biochemistry* **2000**, 39(17), 5146.
- <sup>45</sup> B. Sjöberg, M. Eriksson, E. Österlund, S. Pap, K. Österlund, *Eur. Biophys. J.* **1989**, 17, 5.
- <sup>46</sup> S. S. Alexander, Jr., G. Colonna, H. Edelhoch, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 1501; E. C. Williams, P. A. Janmey, J. D. Ferry, D. F. Mosher, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 14973; H. P. Erickson, N. A. Carrell, *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 14539.
- <sup>47</sup> K. J. Johnson, H. Sage, G. Briscoe, H. P. Erickson, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274 (28), 15473.
- <sup>48</sup> P. Kaiser, *Dissertation*, **2009**.
- <sup>49</sup> K. J. Johnson, H. Sage, G. Briscoe, H. P. Erickson, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274 (28), 15473.
- <sup>50</sup> Z. Markovic, A. Lustig, J. Engel, H. Richter, H. Hormann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1983**, 364, 1795; C.-S. Lai, N. M. Tooney, E. G. Ankel, *Biochemistry*, **1984**, 23, 6393.
- <sup>51</sup> S. S. Alexander, Jr., G. Colonna, H. Edelhoch, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 1501; E. C. Williams, P. A. Janmey, J. D. Ferry, D. F. Mosher, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 14973; H. P. Erickson, N. A. Carrell, *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 14539.
- <sup>52</sup> J. Ulmer, B. Geiger, J. P. Spatz, *Soft Matter* **2008**, 4, 1998.
- <sup>53</sup> <http://nethingham.org/FN2009/fibril/>
- <sup>54</sup> D. F. Mosher, J. Sottile, C. Wu, J. A. McDonald, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1992**, 4(5), 810.
- <sup>55</sup> A. Woods, J. R. Couchman, *Mol. Biol. Cell.*, **1994**, 5(2), 183.
- <sup>56</sup> P. J. McKeown-Longo, D. F. Mosher, *J Cell Biol.* **1983**;97, 466.
- <sup>57</sup> B. J. Dzamba, D. M. Peters, *J. Cell. Sci.*, **1991**, 100 ( Pt 3), 605.
- <sup>58</sup> J. E. Schwarzbauer, *J. Cell Biol.*, **1991**, 113, 1463; M. A. Chernousov *et al.*, *FEBS Lett.*, **1985**, 183, 365; P. J. McKeown-Longo, D. F. Mosher, *J. Cell. Biol.*, **1985**, 100, 364; B. J. Quade, J. A. McDonald, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 19602.
- <sup>59</sup> D. F. Mosher, F. J. Fogerty, M. A. Chernousov, E. L. R. Barry, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1990**, 614, 167.
- <sup>60</sup> I. Vakonakis, I. D. Campbell, *Curr Opin Cell Biol*, **2007**, 19(5), 578.

- <sup>61</sup> D. C. Hocking, R. K. Smith, and P. J. McKeown-Longo, *J Cell Biol*, 1996, 133(2), 431–44; A. Morla, Z. Zhang, and E. Ruoslahti, *Nature*, 1994, 367(6459), 193–6.
- <sup>62</sup> <http://nethingham.org/FN2009/fibril/>
- <sup>63</sup> B. J. Dzamba a. D. M. P. Peters, *J Cell Sci.* **1991**, 100, 605.
- <sup>64</sup> N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, B. Geiger, *Nature Cell Biology*, **2001**, 3, 466.
- <sup>65</sup> G. Baneyx and V. Vogel, *PNAS*, **1999**, 96(22), 12518.
- <sup>66</sup> H. P. Erickson, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **2002**, 23, 575.
- <sup>67</sup> H. P. Erickson, N. Carrell, J. McDonagh, *J. Cell Biol.* **1981**, 91, 673.
- <sup>68</sup> A. F. Oberhauser, C. Badilla-Fernandez, M. Carrion-Vazquez, J. M. Fernandez, *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 433.
- <sup>69</sup> G. Baneyx, L. Baugh, V. Vogel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99(8), 5139; R. Pankov et al., *J. Cell. Biol.*, **2000**, 148(5), 1075.
- <sup>70</sup> M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81(19), 5985.
- <sup>71</sup> R. Pytela, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Cell*, **1985**, 40(1), 191.
- <sup>72</sup> R. O. Hynes, *Cell*, **2002**, 110(6), 673.
- <sup>73</sup> M. Leiss, K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, R. Fassler, *Curr Opin Cell Biol*, **2008**, 20(5), 502.
- <sup>74</sup> B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K. M. Yamada, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2001**, 2, 793.
- <sup>75</sup> K. Wennerberg, L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson, R. Fassler, *J Cell Biol*, **1996**, 132(1-2), 227.
- <sup>76</sup> S. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269(40), 24756-61.
- <sup>77</sup> E. H. Danen et al., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(37), 21612.
- <sup>78</sup> Y. F. Liao, P. J. Gotwals, V. E. Kotliansky, D. Sheppard, L. Van De Water, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(17), 14467.
- <sup>79</sup> J. L. Sechler et al., *J. Cell. Sci.*, **2000**, 113, 1491.
- <sup>80</sup> a) R. O. Hynes a. J. M. Bye, *Cell* **1974**, 3, 113; b) S. Stenmann, J. Wartiovaara, A. Vaheri, *J. Cell Biol.* **1977**, 74, 453.
- <sup>81</sup> a) G. C. Gahmberg, D. Kiehn, S. I. Hakomori, *Nature* **1974**, 248, 413; b) N. M. Hogg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, 71, 489; c) R. O. Hynes, *Cell* **1973**, 1, 3170.
- <sup>82</sup> L. T. Furcht, G. Wendelschafer-Grabb *Cancer Res.* **1978**, 38, 4618.
- <sup>83</sup> L. Juchli, M. v. Mügler, Dudli u. a., *Pflege. Praxis und Theorie der Gesundheits- und Krankenpflege.*, **1994**, Thieme, Stuttgart, 7. A.

- <sup>84</sup> E. Makogonenko, K. C. Ingham, L. Medved, *Biochemistry*, **2007**, 46(18), 5418.
- <sup>85</sup> <http://www.patent-de.com/20060105/DE69634430T2.html>
- <sup>86</sup> H. Ni, P. S. Yuen, J. M. Papalia, J. E. Trevithick, T. Sakai, R. Fassler, R. O. Hynes, D. D. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2003**, 100(5), 2415.
- <sup>87</sup> T. Nishida, S. Nakagawa, T. Awata, *Jpn. J. Ophthalmol.*, **1982**; 26, 416; T. M. Phan, C. S. Foster, S. A. Boruchoff, *Am. J. Ophthalmol.*, **1987**; 104, 494; EP-A-179 477; H. M. Boisjoly, R. Sun, M. Giasson, A. Beaulieu, *Arch. Ophthalmol*, **1990**, 108, 1758.
- <sup>88</sup> A. Wysocki, C. R. Baxter, P. R. Bergstresser, *Arch. Dermatol*, **1988**, 124, 175.
- <sup>89</sup> US-4 837 019.
- <sup>90</sup> L. H. Rohde, D. D. Carson, *J. Cell. Physiol.*, **1993**, 155(1), 185; A. E. Sutherland, P. G. Calarco, C. H. Damsky, *J. Cell. Biol.*, **1988**, 106(4), 1331.
- <sup>91</sup> a) N. Kawelke, *Dissertation*, **2009**; b) E. L. George, E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development*, **1993**, 119(4), 1079.
- <sup>92</sup> E. Blechschmidt, *Wie beginnt das menschliche Leben? Vom Ei zum Embryo*. Stein am Rhein 1989.
- <sup>93</sup> B. R. Zetter, G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1978**, 75(5), 2324.
- <sup>94</sup> C. Czeslik, *Chem. Unserer Zeit*, **2006**, 40, 238.
- <sup>95</sup> J. D. Andrade, V. Hlady, *Adv. Polym. Sci.*, **1986**, 79, 1; J. L. Brash, T. A. Horbett, J. L. Brash, Eds., ACS Symposium Series No. 602; Am. Chem. Soc.: Washington, DC, 1995.
- <sup>96</sup> G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, **1987**, Weinheim.
- <sup>97</sup> M. Hoefling, F. Iori, S. Corni, K.-E. Gottschalk, *Langmuir*, **2010**, 26(11), 8347.
- <sup>98</sup> M. E. Schrader, *J. Colloid&Interface Sci.*, **1984**, 100 (2), 372.
- <sup>99</sup> K. E. Michael, V. N. Vernekar, B. G. Keselowsky, J. C. Meredith, R. A. Latour, A. J. García, *Langmuir*, **2003**, 19, 8033.
- <sup>100</sup> K. Wilson, S. J. Stuart, A. Garcia, R. A. Latour, Jr., *Wiley Periodicals, Inc.*, **2004**, 686.
- <sup>101</sup> L. Baugh, V. Vogel, *Wiley Periodicals, Inc.*, **2004**, 525.
- <sup>102</sup> T. M. Price, M. L. Rudee, M. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 129, 359; M. Bergkvist, J. Carsson, S. Oscarsson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2003**, 64A, 349.
- <sup>103</sup> G. Y. Tseng, J. C. Ellenbogen, *Science*, **2001**, 294, 1293.
- <sup>104</sup> <http://www.bmbf.de>.
- <sup>105</sup> M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press **1997**.
- <sup>106</sup> W. Ehrfeld, H. Lehr, *Radiation Physics and Chemistry* **1995**, 45, 349.
- <sup>107</sup> a) D. Pickard, T. Groves, B. Rafferty, N. Crosland, D. Adam, and G. Schubert, *Microelectronic Engineerin*, **2002**, 61, 285; b) S. D. Berger, J. M. Gibson, R. M.

Camarda, R. C. Farrow, H. A. Huggins, J. S. Kraus, and J. A. Liddle, *Journal of vacuum science and technology B*, **1991**, *9*, 2996.

<sup>108</sup> A. Götzhäuser, W. Eck, W. Geyer, V. Stadler, T. Weimann, P. Hinze, M. Grunze, *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 806.

<sup>109</sup> a) J. R. Link a. M. J. Sailor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2003**, *100*, 10607; b) A. M. Ruminski, M. M. Moore, M. J. Sailor *Advanced Functional Materials*, **2008**, *18*, 3418; c) T. A. Schmedake, F. Cunin, J. R. Link, M. J. Sailor *Advanced Materials*, **2002**, *14 (18)*, 1270; d) B. H. King, A. M. Ruminski, J. L. Snyder, M. J. Sailor, *Advanced Materials*, **2007**, *19 (24)*, 4530.

<sup>110</sup> a) P. W. Leech, *Vacuum*, **1999**, *55*, 191; b) E. Metwalli a. C. G. Pantano, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **2003**, *207*, 21.

<sup>111</sup> G. Gao, Nanostructures and nanomaterials, Imperial College Press., 2004.

<sup>112</sup> a) R. Glass, M. Arnold, J. Bluemmel, A. Kueller, M. Moeller, and J. P. Spatz, *Advanced Functional Materials* **2003**, *13 (7)*, 569; b) R. Glass, M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, J. Blimmel, C. Haferkemper, C. Dodd, a. J. P. Spatz, *New Journal of Physics*, **2004**, *6*, 101.

<sup>113</sup> a) S. Kraemer, R. R. Fuierer, and C. B. Gorman, *Chemical Review*, **2003**, *103*, 4367; b) A. Valsesia, P. Colpo, T. Meziani, P. Lisboa, M. Lejeune, and F. Rossi, *Langmuir*, **2006**, *22*, 1763.

<sup>114</sup> a) J. C. Hulteen a. R. P. V. Duyne, *Journal of Vacuum Science and Technology*, **1995**, *13 (3)*, 1553; b) Peng Jiang a. M. J. McFarland, *Journal of American Chemical Society*, **2004**, *126*, 13778.

<sup>115</sup> W. Liang, M. P. Shores, M. Bockrath, J. R. Long, H. Park, *Nature*, **2002**, *417*, 725.

<sup>116</sup> J. Park, N. A. Pasupathy, J. I. Goldsmith, C. Chang, Y. Yaish, J. R. Petta, M. Rinkoski, J. P. Sethna, H. D. Abruna, P. L. McEuen, D. C. Ralph, *Nature*, **2002**, *417*, 722.

<sup>117</sup> Y. Xia, Y. Yin, Y. Lu, and J. McLellan *Advanced functional Materials*, **2003**, *13 (12)*, 907.

<sup>118</sup> C. A. Mirkin, *ACS Nano* 2007, *1*, 79.

<sup>119</sup> a) J. P. Spatz, *Angewandte Chemie*, **2002**, *114*, 3507; b) J. P. Spatz, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2002**, *114*, 3359.

<sup>120</sup> M. Möller, R. W. Lenz, *Macromol. Chem.*, **1989**, *4*, 123.

<sup>121</sup> Z. Gao, A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 7353.

<sup>122</sup> a) K. A. Cogan, A. P. Gast, *Macromolecules*, **1990**, *23*, 745; b) Z. Gao, A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 7353; c) L. Zhang, A. Eisenberg, *Science*, **1995**, *268*, 1728.



- <sup>123</sup> R. Glass, M. Möller, J. P. Spatz, *Nanotechnology*, **2003**, *14*, 1153.
- <sup>124</sup> a) Z. Gao a. A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 7353; b) J. F. Gohy, *Block Copolymer II*. Springer-Verlag, **2005**.
- <sup>125</sup> G. Kistle, H.-G. Boyen, F. Weigl, G. Lengl, T. Herzog, P. Ziemann, S. Riethmüller, O. Mayer, C. Hartmann, J. Spatz, M. Möller, M. Ozawa, F. Banhardt, M. Garnier, P. Ölhafen, *Functional Mater.*, **2003**, *13(11)*, 853.
- <sup>126</sup> T. Lohmüller, *Dissertation, Universität Heidelberg* **2008**.
- <sup>127</sup> a) S. Meltzer, R. Resch, B. E. Koel, M. E. Thompson, A. Madhukar, A. A. G. Requicha, P. Will *Langmuir* **2001**, *17*, 1713; b) K. R. Brown, D. G. Walter, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 306.
- <sup>128</sup> G. P. Lopez, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5877.
- <sup>129</sup> P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 426.
- <sup>130</sup> F. Morhard, J. Pipper, R. Dahint, M. Grunze, *Sensor Actuat. B – Chem.*, **2000**, *70*, 232.
- <sup>131</sup> D. Schwendel, R. Dahint, S. Herrwerth, M. Schloerholz, W. Eck, M. Grunze, *Langmuir*, **2001**, *17*, 5717.
- <sup>132</sup> J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, *Biomaterials*, **2007**, *50*, 4329.
- <sup>133</sup> A. Ulman, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1533.
- <sup>134</sup> C. P. Tripp, R. P. N. Veregin, M. L. Hair, *Langmuir*, **1993**, *9*, 3518
- <sup>135</sup> a) D. C. Hocking, R. K. Smith, and P. J. McKeown-Longo, *J. Cell. Biol.* **1996**, *133(2)*, 431; b) A. Morla, Z. Zang, E. Ruoslahti, *Nature* **1994**, *367(6459)*, 193.
- <sup>136</sup> J. Blümmel, *Dissertation, Heidelberg*, **2005**.
- <sup>137</sup> P. M. Wolny, J. P. Spatz, R. P. Richter, *Langmuir*, **2010**, *26(2)*, 1029.
- <sup>138</sup> M. B. Hovgaard, K. Rechendorff, J. Chevallier, M. Foss, F. Basenbacher, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8241.
- <sup>139</sup> T. Hayakawa, M. Yoshinari, K. Nemoto, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater. B* **2005**, *73*, 271.
- <sup>140</sup> D. B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*, Wiley-Liss, Inc., **2001**.
- <sup>141</sup> N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47 (9)*, 1179.
- <sup>142</sup> Molecular Probes: Produkt Information Alexa Fluor 488/568 Proteinlabeling Kit.

- <sup>143</sup> T. P. Ugarova, C. Zamarron, Y. Veklich, R.D. Bowditch, M. H. Ginsberg, J. W. Weisel, E. F. Plow, *Biochemistry* **1995**, *34*(13), 4457.
- <sup>144</sup> a) L. B. Chen, A. Murray, R.A. Segal, A. Bushnell, M. L. Walsh, *Cell* **1978**, *14*, 377; b) I. I. Singer, *Cell* **1979**, *16*, 675.
- <sup>145</sup> D. J. Leahy, I. Aukhil, H. P. Erickson, *Cell* **1996**, *84*, 155.
- <sup>146</sup> a) G. Grifiiths, *Fine Structure immunocytochemistry*, Berlin, Springer Verlag, **1993**; b) V. N. Kharazia a. R. J. Weinberg, *The Journal of Comparative Neurology* **1999**, *412*, 292.
- <sup>147</sup> L. Maus, O. Dick, H. Bading, J. P. Spatz, R. Fiammengo, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6617.
- <sup>148</sup> H. Takano, J. R. Kenseth, S.-S. Wong, J. C. O'Brien, M. D. Porter, *Chem.Rev.* **1999**, *99*, 2845.
- <sup>149</sup> D. E. MacDonald, B. Markovic, M. Allen, P. Somasundaran, A. L. Boskey, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41*, 120.
- <sup>150</sup> K. Vallie`res, P. Chevallier, C. Sarra-Bournet, S. Turgeon, G. Laroche, *Langmuir* **2007**, *23*, 9745.
- <sup>151</sup> P. Y. Meadows, G. C. Walker, *Langmuir* **2005**, *21*, 4096.
- <sup>152</sup> L. Baugh u. V. Vogel, Wiley Periodicals, Inc., **2004**.
- <sup>153</sup> M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angewandte Chemie* **1999**, *111*(4), 587.
- <sup>154</sup> W. C. Little, M. L. Smith, U. Ebnetter, V. Vogel, *Matrix Biol.*, **2008**, *27*(5).
- <sup>155</sup> A Guide to transfer and Detection, 3. Edition, Bio-Rad.
- <sup>156</sup> G. A. Homandberg, D. L. Amrani, D. B. Evans, C. M. Kane, E. Ankel, M. W. Mosesson, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1984**, *238*(2), 652.
- <sup>157</sup> A. Janshoff, H.-J. Galla, C. Steinem, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 4004.
- <sup>158</sup> M. C. Dixon, *J.Boim.Tech.*, 2008, *19*, 151-158.
- <sup>159</sup> S. Fraiss, *Dissertation*, Mainz, **2003**.
- <sup>160</sup> G. Sauerbrey, *Z. Physik*, **1959**, *155*, 206.
- <sup>161</sup> R. Richter, *These*, Université Bordeaux I – Institut Européen de Chimie et Biologie, **2004**.
- <sup>162</sup> M. Rodahl, B. Kasemo., *Rev. Sci. Instr.*, **1996**, *67*, 3238.
- <sup>163</sup> [http://www.lot-oriel.com/site/site\\_down/qsense\\_qcmdissipation\\_en01.pdf](http://www.lot-oriel.com/site/site_down/qsense_qcmdissipation_en01.pdf)
- <sup>164</sup> P. Bingen, Project for Master of Science in Physics at Imperial College London **2006-2007**.
- <sup>165</sup> J. C. Dijt, M. A. Cohen-Stuart, G. J. Fleer. *Adv. Colloid interface Sci.*, **1994**, *50*, 79-101.

- <sup>166</sup> C. Calonder, H. W. T. Matthew, P. R. van Tassel, *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, 75 (2), 316.
- <sup>167</sup> a) G. Wang, M. Rodahl, M. Svardson, S. Svedheim, G. Ohlsson, F. Höök, B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, 79, 075107; b) P. Bingen, G. Wang, N. F. Steinmetz, M. Rodahl, R.P. Richter, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8880.
- <sup>168</sup> [www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/epifluol.jpg](http://www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/epifluol.jpg).
- <sup>169</sup> <http://expasy.org/cgi-bin/protparam1?P02751@32-2386@>.
- <sup>170</sup> <http://expasy.org/tools/protparam-doc.html>
- <sup>171</sup> <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- <sup>172</sup> in Kommunikation mit PD Dr. Günter Mejer, **2008**.
- <sup>173</sup> <http://www.directindustry.de/prod/carl-zeiss-smt-nano-technology-systems-division/analytische-feldemissions-rasterelektronenmikroskope-fe-sem-22691-404987.html>.
- <sup>174</sup> S. L. Flegler, J. W. Heckman jr., K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen-Methoden-Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- <sup>175</sup> J. Ackermann, Handbuch für die Rasterelektronenmikroskope SUPRA(VP) und ULTRA, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, **2004**.
- <sup>176</sup> [de.academic.ru/dic.nsf/](http://de.academic.ru/dic.nsf/)
- <sup>177</sup> D. P. Girard, "Dot analyser." *ImageJ plugin*, EMBL Heidelberg, Germany **2008**.
- <sup>178</sup> [www.iept.tu-clausthal.de/.../afm\\_stm/AFM01.jpg](http://www.iept.tu-clausthal.de/.../afm_stm/AFM01.jpg).
- <sup>179</sup> <http://www.jpk.com/nanowizard-3-bioscience-afm.535.html>.
- <sup>180</sup> T. Young, *An Essay on the Cohesion of Fluids. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, The Royal Society, London* **1805**, 95, 65.
- <sup>181</sup> K. L. Mittal, Contact Angle, Wettability and Adhesion, Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands, **2009**.