

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Dipl.-Biophys. Katharina Klein
aus Zweibrücken

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2012

Untersuchung von Adhäsionscharakteristika
mittels physikalischer Messungen
zur Selektion von Tumorzellen

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer H. A. Fink

Zusammenfassung

Während der Tumorprogression ändert sich das Adhäsionsvermögen der Zellen. Die hierbei auftretenden Effekte sind biophysikalisch noch weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit wurde das Adhäsionsverhalten von Tumorzelllinien verschiedener Differenzierungsgrade auf kollagenbeschichteten Oberflächen mithilfe der markerfreien Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) analysiert. Mit der RIKM werden Kontaktzonen zwischen Zelle und Substrat visualisiert, wodurch eine Adhäsionskarte abgebildet wird. Aus diesen komplexen Adhäsionsmustern wurden verschiedene Parameter ausgelesen, um so einen charakteristischen Fingerabdruck der Zelle zu erstellen, welcher zur Klassifizierung von Tumorzellen genutzt werden kann. Die beiden Zelllinien (PatuT & PatuS) mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad zeigten bereits in der Kinetik ihres Spreit- und Adhäsionsprozesses signifikante Unterschiede. Besonders bemerkenswert erwiesen sich die Unterschiede in der Morphologie ihrer Adhäsionsbereiche. Die PatuS Zellen zeigten eine kleinere absolute Adhäsionsfläche auf als die malignen PatuT Zellen. Der Anteil der Adhäsionsfläche an der Gesamtzellfläche war für die PatuS Zellen jedoch größer. Zusätzlich unterschieden sich die beiden Zelllinien in ihrem Adhäsionsmuster. Die PatuS Zellen zeigten im Vergleich zu den PatuT Zellen weniger, größere und vorzugsweise an der Zellperipherie lokalisierte Adhäsionspatches. Diese Unterschiede ließen auf eine höhere Adhäsionsstärke der PatuS Zellen schließen, was anhand eines mikrofluidischen Ablöseassays bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde ein Modell etabliert, was erlaubt die Adhäsionsstärke direkt aus den RIKM-Bildern zu berechnen. Zur Bestimmung weiterer Unterscheidungskriterien erwies sich die Fraktalanalyse der RIKM-Bilder als geeignet. Es konnten so Unterschiede in der fraktalen Dimension der beiden Zelllinien und damit im Malignitätsgrad festgestellt werden. Mit den hier gewonnenen Resultaten aus der Analyse der Adhäsionsparameter und -muster, der Berechnung von Adhäsionsstärken und der Untersuchung der fraktalen Dimension konnte ein charakteristischer Fingerabdruck der Zelle erstellt werden, welcher mit ihrem Differenzierungsgrad korreliert werden kann.

Abstract

During tumor progression changes in the adhesion capability of cells occur. However, little is known about the underlying biophysical aspects. In this work, adhesion characteristics of tumor cell lines with different degrees of differentiation on collagen-coated surfaces were analyzed with the label free method reflection interference contrast microscopy (RICM). With RICM, contact zones between cells and surfaces are visualized and adhesion maps can be displayed. Using these complex adhesion maps, various parameters were extracted to create a characteristic fingerprint of the cell, which can be used to classify the tumor cell. The two cell lines (PatuT & PatuS) with a different degree of differentiation showed significant differences in the kinetics of their spreading and adhesion. However, differences in morphology of the adhesion zones proved to be the most remarkable. PatuS cells exhibited a smaller absolute adhesion area than the more malignant PatuT cells. However, the ratio of the adhesion area to the entire cell area for PatuS cells exceeded that of PatuT cells. In addition, both cell lines differed in their adhesion patterns. Compared to PatuT, PatuS cells showed fewer and larger adhesion patches, which were located preferentially in the cell periphery. These differences demonstrated the PatuS cells have a higher adhesion strength that could be confirmed with microfluidic detachment assays. In addition, a model was established which enables the calculation of adhesion strength directly from the RICM images. The fractal analysis of RICM images was used as a further distinctive criterion. Differences in the fractal dimension and thus in the grade of differentiation between the two cell lines could be observed. With the results obtained from the analysis of the adhesion parameters and patterns, the evaluation of adhesion strengths and the fractal analyses it was possible to generate a characteristic fingerprint of the cell, which correlates with the grade of differentiation.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einführung und Motivation	1
2 Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Zell-Substrat-Interaktionen	5
2.1.1 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)	5
2.1.2 Die integrinvermittelte Adhäsion	8
2.2 Das Adhäsions - und Spreitverhalten von Zellen	11
2.2.1 Physikalische Betrachtung der Zelladhäsion	12
2.2.2 Die Rolle der spezifischen Bindungen	13
2.3 Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens durch nanostrukturierte, biofunktionalisierte Oberflächen	16
2.4 Verändertes Adhäsionsverhalten von Tumorzellen	18
2.5 Das Geschwisterzelllinienpaar PatuT und PatuS des Pankreasadenokarzinoms	19
2.6 Techniken zur Analyse der Interaktion zwischen Zelle und unterliegendem Substrat	20
2.6.1 Elektrochemische Techniken	21
2.6.2 Optische Techniken	21
2.6.3 Kraftmessungen	22
2.7 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens mittels Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM)	23
2.7.1 Theorie der RIKM	24
2.7.2 Mehrwellenlängen-RIKM	27
2.7.3 RIKM an lebenden Zellen	29
2.8 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens mittels Mikrofluidik	30
2.9 Fraktale Geometrie	34
3 Material und Methoden	37
3.1 Zellkultur	37
3.1.1 Kultivierung der Zellen	39
3.1.2 Fixierung und immunozytochemische Färbung der Zellen	40

3.2	Oberflächenpräparation	41
3.2.1	Reinigung von Glasoberflächen	41
3.2.2	Homogene Funktionalisierung von Glasoberflächen	41
3.2.3	Homogene Funktionalisierung von Goldoberflächen	42
3.3	Herstellung von nanostrukturierten Oberflächen	42
3.3.1	Herstellung der mizellaren Goldlösung	43
3.3.2	Tauchbeschichtungsprozess und Plasmabehandlung	44
3.3.3	Charakterisierung der nanostrukturierten Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie	45
3.3.4	Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen	47
3.3.5	Biofunktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen	49
3.4	Herstellung von Bead-Lösungen	52
3.5	Herstellung von Flusszellen	53
3.6	Mikroskopie	55
3.7	Bildanalysen	56
3.7.1	Auswerteroutine für RIKM-Bilder	56
3.7.2	Untersuchung der Größenverteilung der Adhäsionspatches	56
3.7.3	Untersuchung der Radialverteilung	56
3.7.4	Berechnung der Fraktalen Dimension	57
3.7.5	Bestimmung des Abstandes und des Ordnungsparameters der Goldnanopartikel	58
3.8	Datenauswertung	58
3.8.1	Fehlerrechnung	58
3.8.2	Statistik	58
4	Ergebnisse und Diskussion	61
4.1	Aufbau eines Drei-Wellenlängen-RIKM	62
4.1.1	Konzeptioneller Aufbau	62
4.1.2	Etablierung des RIKM-Aufbaus	65
4.1.3	Ausleuchtung der Proben	68
4.1.4	Abgleich der beiden Kameras	68
4.2	Auswerteroutine zur Zellsegmentierung	69
4.3	Analyse und Bestimmung der adhäsiven Zellbereiche	72
4.3.1	Einfluss unterschiedlicher Wellenlängen auf die Analyse der RIKM-Bilder	74
4.3.2	Bestimmung eines Grenzwertes zur Darstellung der Adhäsionsbereiche als Binärbild (Min-Max-Methode)	75
4.3.3	Verfahren zur Berechnung der Adhäsionsfläche aus zwei Wellenlängen	78
4.3.4	Zusammenfassung: Methodischer Teil der RIKM	79
4.4	Adhäsionsverhalten der Zelllinien PatuT und PatuS auf biofunktionalisierten Oberflächen	79
4.4.1	Unterschiede in der projizierten Zellfläche der beiden Geschwisterzelllinien	82
4.4.2	Unterschiede in der Gesamtadhäsionsfläche der beiden Zelllinien	86
4.4.3	Interpretation der experimentell bestimmten Adhäsionsflächen	89
4.4.4	Größenverteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zellen	90
4.4.5	Räumliche Verteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zellen	93
4.4.6	Zusammenfassung: Zellexperimente mit RIKM	94

4.5	Untersuchung des Adhäsionsvermögens mittels eines mikrofluidischen Ablöseexperiments	96
4.5.1	Unterschiede im Adhäsionsverhalten der beiden Geschwisterzelllinien unter Flussbedingungen	98
4.5.2	Berechnung der angelegten Scherspannung	99
4.5.3	Berechnung des Adhäsionsvermögens der Zellen	100
4.5.4	Theorien zur Interpretation des Adhäsionsvermögens der Zellen	102
4.5.5	Adhäsionsmodelle	104
4.5.6	Zusammenfassung: Zellexperimente in der Mikrofluidik	105
4.6	Modell zur Berechnung von Adhäsionsstärken auf der Basis von RIKM-Bildern	106
4.7	Untersuchung der fraktalen Dimension der Zelllinien PatuT und PatuS anhand von RIKM-Bildern	111
4.7.1	Analyse der FD unter dem Konturaspekt	112
4.7.2	Analyse der FD unter dem globalen Kontur-Strukturaspect	114
4.7.3	Analyse der FD unter dem internen Strukturaspect	116
4.7.4	Zusammenfassung: Fraktalanalyse der RIKM-Bilder	117
4.8	Adhäsionsverhalten von Zellen auf nanostrukturierten, biofunktionalisierten Oberflächen	118
4.8.1	Einfluss verschiedener Biofunktionalisierungen auf das Adhäsionsvermögen von Zellen	119
4.8.2	Einfluss verschiedener Passivierungen auf das Adhäsionsvermögen von Zellen	123
4.8.3	Adhäsionsvermögen bei Anbindung eines Peptidfragments an die nanostrukturierten Oberflächen	124
4.8.4	Zusammenfassung: Zellexperimente auf nanostrukturierten Oberflächen	125
5	Zusammenfassung und Ausblick	127
A	Anhang	131
A.1	Verwendete MATLAB Codes	131
A.1.1	Auswerteroutine zur Zellsegmentierung	131
A.1.2	Auswerteroutine zur Bestimmung der tatsächlichen Adhäsionsfläche	137
	Literaturverzeichnis	139
	Danksagung	157
	Erklärung	159

Abbildungsverzeichnis

1.1	Skizzierung der wichtigsten Untersuchungsaspekte zum physikalischen Verständnis der Zelladhäsion mittels RIKM	4
2.1	Schematische Darstellung der Makromoleküle der extrazellulären Matrix	6
2.2	Schematische Darstellung der modularen Struktur des Fibronektins	8
2.3	Die Familie der Integrinrezeptoren	9
2.4	Schema der bidirektionalen Signalübertragung des Integrins	10
2.5	Schematisches Modell der molekularen Architektur von fokalen Adhäsionen	11
2.6	Verlauf der Freien Enthalpie entlang einer Reaktionskoordinate bei einem Bindungsbruch	14
2.7	Verschiedene Konfigurationen von molekularen Bindungen in einem Adhäsionscluster	15
2.8	Schema der biofunktionalisierten, nanostrukturierten Oberflächen und deren Einfluss auf die Zelladhäsion	18
2.9	Charakteristika der beiden Pankreasadenokarzinomzelllinien PatuT und PatuS	20
2.10	Anwendungsfelder der RIKM	24
2.11	Prinzip der RIKM	25
2.12	Prinzip der Antiflextechnik	27
2.13	Intensitätsplots der verwendeten Wellenlängen in der RIKM	28
2.14	Geschwindigkeitsprofil eines druckgetriebenen Flusses innerhalb eines Flusskanals	32
2.15	Hydrodynamische Kräfte zur Ausübung von Kräften auf Objekte im Flusskanal	33
2.16	Beispiele für die fraktale Dimension verschiedener Objekte	35
3.1	Hellfeldaufnahmen der PatuT und PatuS Zellen	38
3.2	Hellfeldaufnahmen der MCF7 und MCF10A Zellen	38
3.3	Markierung der Integrinuntereinheiten, die von den verwendeten Zelllinien exprimiert werden	39
3.4	Verhalten mizellarer Lösungen in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration und Assoziationsprozess freier Blockcopolymerketten	43
3.5	Schematische Übersicht zur Strukturbildung der Goldnanopartikel auf Substratoberflächen	44
3.6	RIKM-Bild eines gedippten Deckglases	45
3.7	Rasterelektronenmikroskopie	47
3.8	Schematische Übersicht zur Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen	48
3.9	Schematische Übersicht zur Biofunktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen	50

3.10	Reaktionsschema des Traut's Reagenz mit dem Fibronektinfragment FNIII ₉₋₁₀	51
3.11	Dreidimensionale Struktur des Fibronektinfragments FNIII ₉₋₁₀	52
3.12	Bild und schematische Darstellung einer fertigen Flusszelle	54
3.13	Foto vom Aufbau des Flusseperiments am Mikroskop	55
4.1	Schematische Sicht auf den Strahlengang des OT/RIKM-Aufbaus	62
4.2	Aufsicht auf das Mikroskop und das optischen System	65
4.3	Anwendung der Antiflextechnik auf das RIKM-Bild eines Polystyrolbeads	66
4.4	Einfluss der Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens auf das RIKM-Bild eines Polystyrolbeads	67
4.5	Interferenzstruktur eines Beads	68
4.6	Aufnahmen zur Justierung der beiden Kameras	69
4.7	Linienplots der in Abbildung 4.6 gezeigten Linien	69
4.8	Bildbearbeitungsschritte zur Segmentierung einer Zelle im RIKM-Bild	72
4.9	Vergleich eines Fluoreszenzbildes von fokalen Adhäsionen mit RIKM-Bildern	73
4.10	Ausschnitt der Intensitätsplots der beiden verwendeten Wellenlängen in der RIKM	74
4.11	Einfluss der Anwendung eines Grenzwertes auf das RIKM-Bild	75
4.12	Addition der beiden Grenzwertbilder	78
4.13	Kinetisches Verhalten der beiden Geschwisterzelllinien	81
4.14	RIKM-Bilder und dazugehörige Grenzwertbilder nach bestimmten Adhäsionszeitpunkten	82
4.15	Zeitlicher Verlauf der projizierten Zellfläche	83
4.16	Doppellogarithmischer Plot der projizierten Zellfläche über die Zeit	84
4.17	Erste Ableitung der projizierten Zellfläche über die Zeit	85
4.18	Zeitlicher Verlauf der Exzentrizität im Vergleich zur projizierten Zellfläche	86
4.19	Zeitlicher Verlauf der Adhäsionsfläche	87
4.20	Erste Ableitung der Adhäsionsfläche über die Zeit	88
4.21	Verhältnis zwischen projizierter Zellfläche zur Adhäsionsfläche	89
4.22	Farbcodierte Darstellung der Adhäsionspatches	90
4.23	Histogramm der Größen der Adhäsionspatches	92
4.24	Kreisdiagramme mit drei verschiedenen Größenbereichen der Adhäsionspatches	93
4.25	Radialverteilung der Adhäsionsbereiche	94
4.26	Charakteristische „Adhäsionskarte“ der beiden Geschwisterzelllinien	95
4.27	PatuT und PatuS Zellen im Flusskanal nach den verschiedenen angelegten Flussraten	97
4.28	Anteil an adhärennten Zellen in Abhängigkeit von der angelegten Flussrate	98
4.29	Anteil an adhärennten Zellen in Abhängigkeit von der Scherspannung	101
4.30	Modellierte Verteilung der Scherspannungen für verschiedene Zellformen bei einem angelegten Fluss	102
4.31	Skizzierung der untersuchten Parameter für das mathematische Modell der Berechnung der Adhäsionsstärken aus den RIKM-Bildern	107
4.32	Verhältnis der Adhäsionsstärke von PatuT zu PatuS Zellen	110
4.33	Übersicht der drei verschiedenen Aspekte, unter denen die fraktale Dimension der PatuT und PatuS Zellen bestimmt wurde	112
4.34	Fraktale Dimension für die Kontur der PatuT und PatuS Zellen	113
4.35	Fraktale Dimension für die Kontur und Struktur der PatuT und PatuS Zellen	115
4.36	Fraktale Dimension für die interne Struktur der PatuT und PatuS Zellen im RIKM-Bild	116

4.37	Ligamentests zum Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A auf nanostrukturierten Oberflächen	120
4.38	Einfluss der Linkerlänge des cRGDs auf das Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A	121
4.39	Vergleich des Adhäsionsvermögens der MCF10A Zellen auf nanostrukturierten, funktionalisierten Oberflächen und homogenen, funktionalisierten Goldoberflächen	122
4.40	Vergleich des Adhäsionsvermögens der MCF7 Zellen auf nanostrukturierten Oberflächen, funktionalisiert mit zyklischem und linearem RGD	122
4.41	Hellfeldbilder der MCF7 Zellen auf unterschiedlich passivierten nanostrukturierten Oberflächen nach verschiedenen Zeitpunkten	123
4.42	Hellfeldaufnahmen der MCF7 Zellen auf unterschiedlich passivierten nanostrukturierten Oberflächen 24 h nach Aussaat	124
4.43	Hellfeldaufnahmen der MCF7 Zellen auf unterschiedlich funktionalisierten nanostrukturierten Oberflächen 24 h nach Aussaat	125

Tabellenverzeichnis

2.1	Charakterisierung von Zell-Matrix-Kontaktstrukturen und deren Auftreten im RIKM-Bild	30
4.1	Auflistung der optischen Bauelemente des OT/RIKM-Aufbaus	64
4.2	Vergleich von verschiedenen Grenzwertberechnungen der Intensität	78
4.3	Fitparameter der in Abbildung 4.16 gezeigten Fits für die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS	84
4.4	Umrechnung der angelegten Flussraten in die, auf die Zellen wirkende, Scherspannung	100
4.5	Verteilung der Bindungen auf die einzelnen Segmente	108
4.6	Zusammenfassung zur Analyse der fraktalen Dimension der beiden Geschwisterzelllinien unter den drei verschiedenen Untersuchungsaspekten	117

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
$\lambda/4$ -Plättchen ..	Lambdaviertelplättchen
AFM	Rasterkraftmikroskopie
AR	Antireflexionsbeschichtung
b.E.	Beliebige Einheit
BCM	Boxcounting-Methode
BCML	Mizellare-Blockcopolymer-Nanolithografie
cmc	Kritische Mizellkonzentration
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRGD	zyklisches RGD
D _B	Box-Dimension
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes essenzielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECIS	Elektrochemischer Zellimpedanzsensor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsion
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	Fötales Kälberserum
FD	Fraktale Dimension
FN	Fibronectin
FNIII ₉₋₁₀	Fibronectinfragment
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HS	Pferdeserum
I _G	Intensitätsgrenzwert
I _M	Maximaler Intensitätswert
I _m	Minimaler Intensitätswert
IRM	Reflexionsinterferenzmikroskopie
L _e	Eingangslänge
LED	Laser emittierende Diode
IRGD	lineares RGD

OT	Optische Pinzette
p. a.	Pro analysi; für die Analyse
P2VP	Poly-2-vinylpyridin
PatuS	PaTu8988S - solide Pankreasadenokarzinom-Zelllinie
PatuT	PaTu8988T - tubuläre Pankreasadenokarzinom-Zelllinie
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
Pe	Péclet-Zahl
PEG	Polyethylenglykol
PEG2000	mPEG-triethoxysilan-2000-urea
PHSRN	Aminosäuresequenz aus Prolin, Histidin, Serin, Arginin und Asparagin
PLL	Poly-L-Lysin
PLL- <i>g</i> -PEG	Poly-L-Lysin grafted Polyethylenglykol
PS	Polystyrol
QCM-D	Quarzkristallmikrowaage mit Dissipation
Re	Reynoldszahl
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RIKM	Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur
TIRFM	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Einführung und Motivation

Die Entwicklung von Krebs (Karzinogenese) ist ein mehrstufiger Prozess, der gekennzeichnet ist durch eine fortschreitende Akkumulation genetischer und molekularer Veränderungen. Die Diagnostik von Krebs stellt aufgrund seiner Komplexität immer noch eine große Herausforderung dar. Es ist wichtig konkrete, biologisch relevante Tumorparameter zu definieren, die sich anhand reproduzierbarer Kriterien eindeutig und prognostisch relevant voneinander abgrenzen lassen (Tumorklassifizierung). Der erste Schritt zur Tumorklassifizierung ist die Entnahme von Zellen oder Geweben aus dem verdächtigen Bereich (Biopsie).

Gegenwärtig wird durch die feingewebliche Untersuchung der Biopsieprobe unter dem Mikroskop und mit molekularbiologischen Tests, das Tumormaterial in ein international einheitliches Klassifizierungssystem eingeteilt, woraus dann eine Prognose und die entsprechende Behandlung abgeleitet werden. Bei den durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen lässt sich z.B. erkennen, welcher Tumorgewebetyp vorliegt oder ob es sich um einen schnell oder langsam wachsenden Tumor handelt. Zusätzlich können durch den Einsatz spezifischer Antikörper und Biomarker der Tumorausprung und der Differenzierungsgrad bestimmt werden und anschließend mittels fluoreszenz- oder magnetfeldbasierten Methoden eine Zellseparierung stattfinden (Lostumbo et al., 2006). Diese Biomarker sind zwar hochspezifisch, aber rar und die Markierungsmethoden sind aufwendig, zeitintensiv und kostspielig (Herr et al., 2006; Kim et al., 2006). Daher besteht ein großer Bedarf bei der Entwicklung von markerfreien Detektionsmethoden.

Markerfreie Analysetechniken können physikalische Zelleigenschaften, wie die Zellgröße oder die dielektrischen Eigenschaften umfassen (Ito und Shinomiya, 2001; Higuchi und Tsukamoto, 2004). In den letzten Jahren wurden auch die mechanischen Eigenschaften der Zelle zu einem interessanten Untersuchungsmerkmal der Tumordiagnose. In verschiedenen Studien konnte nämlich gezeigt werden, dass der Verlust an Zellsteifigkeit in Korrelation mit dem Krebsstadium steht (Cross et al., 2008; Lekka et al., 2012).

Eine weitere wichtige physikalische Eigenschaft von Tumorzellen ist ihr Adhäsionsverhalten, denn bei der Karzinogenese treten Veränderungen in der Regulation und Interaktion von Zell-Zell-Kontakten und von Kontakten zwischen den Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) auf (Albertson et al., 2003; Balmain et al., 2003; Bissell et al., 2002). Gerade bei der Tumormetastasierung spielen die Expression von Adhäsionsmolekülen und adhäsionsrelevante Prozesse eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Adhäsionsstärke in einem inversen Zusammenhang mit dem Metastasierungsgrad der Zelle steht (Indra et al., 2011). Um Adhäsionsprozesse für diagnostische Zwecke einsetzen zu können oder

eine verminderte Metastasierung zu beeinflussen, ist aber noch eine detailliertere Charakterisierung der Prozesse nötig (Bendas und Borsig, 2012).

Gegenstand dieser Arbeit war die markerfreie Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Tumorzelllinien mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Metastasierungsgrad, um die Korrelation von verminderter Adhäsion mit höherem Malignitätsgrads zu quantifizieren. Dies kann in Zukunft ermöglichen, diese Erkenntnisse für diagnostische Zwecke einsetzen zu können.

Eine leistungsstarke Technik zur Untersuchung von Interaktionen zweier Grenzflächen, insbesondere des Vorgangs der Adhäsion, ist die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM). Sie wird genutzt um eine Vielzahl an dynamischen Phänomenen zu analysieren, wie z.B. die Adhäsion von Vesikeln, die Dynamik kolloider Proben nahe der Oberfläche, Benetzungsvorgänge, aber auch die Zelladhäsion (Limozin und Sengupta, 2009). Im Vergleich zur internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM), die auch zur Untersuchung von Kontaktzonen verwendet wird, besitzt die RIKM gerade bei der Untersuchung von biologischen Proben den Vorteil, dass sie nicht-invasiv ist und Zellen markerfrei und ohne zusätzliche Arbeitsschritte in Echtzeit untersucht werden können.

Die Basis der Entstehung des Bildkontrastes bei der mikrointerferometrischen RIKM-Technik ist die Interferenz von Strahlen, die an unterschiedlichen Grenzflächen reflektiert werden. Mit dieser Methode wird eine adhärente Zelle als Objekt mit verschiedenen grauen und dunklen Intensitätsbereichen auf einem einheitlichen grauen Hintergrund visualisiert. Die Intensitätswerte geben dabei Aufschluss über den Abstand zwischen Zelle und Substrat. Die so entstehenden „Adhäsionskarten“ spiegeln die charakteristischen Muster der unterschiedlichen Adhäsionszonen wider. Aus diesen spezifischen Adhäsionsmustern können Adhäsionsparameter analysiert werden, um einen charakteristischen Fingerabdruck der Zelle zu erstellen. Die geeignete Kombination dieser Parameter bietet die Möglichkeit für ein neuartiges, adhäsionsbasiertes und markierungsfreies Tumorklassifizierungsmodell.

Als Modellsystem wurde im Rahmen dieser Arbeit das humane Zelllinienpaar PatuT und PatuS gewählt. Da die beiden Zelllinien aus derselben Metastase eines Pankreastumors isoliert wurden, besitzen sie den gleichen genetischen Hintergrund, weisen aber einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad auf. Dadurch ermöglichen sie die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Adhäsionsverhalten und dem Grad der Differenzierung.

Zur Analyse des charakteristischen Fingerabdrucks wurde das Zelladhäsionsmuster mittels RIKM untersucht. Auch weitere Parameter zur Beschreibung dynamischer Prozesse wie der Kinetik des Adhäsions- und Spreitprozesses wurden herangezogen (siehe Abbildung 1.1). Die zentrale Grundfrage der Arbeit war dabei:

- Wie können Tumorzellen anhand der aus den charakteristischen Adhäsionsmustern ausgelesenen Parameter klassifiziert werden?

Zur Beschreibung des Malignitätsgrades wurden zwei in der Literatur beschriebene physikalische Gesetzmäßigkeiten der Tumorzellen herangezogen:

- (1.) Die negative Korrelation zwischen der Adhäsionskraft einer Zelle und deren Tumorgrad (Indra et al., 2011) und
- (2.) die positive Korrelation zwischen der fraktalen Dimension einer Zelle und deren Tumorgrad (Sarkar und Chaudhuri, 1994; Mashiah et al., 2008).

Folglich wurde untersucht wie aus den RIKM-Adhäsionskarten die Extraktion der beiden Para-

meter „Adhäsionsstärke“ und „fraktale Dimension“ erfolgen kann, um damit Aussagen über den Tumorgrad der Zelle treffen zu können.

Es musste daher die Frage geklärt werden, welcher Zusammenhang zwischen der Adhäsionsstärke und dem Muster der Adhäsionspatches bezüglich deren Größe und räumlichen Verteilung zu finden ist.

Des Weiteren musste erörtert werden, wie die fraktale Dimension der Adhäsionskarten, d.h. die Irregularität von Zellstrukturen, in Abhängigkeit zum Tumorgrad stehen und welche Parameter, also die Kontur der Kontaktfläche oder das Adhäsionsmuster selbst, die relevanten Informationen beinhalten.

Die Kombination der Informationen aus den beiden Analyseparametern „Adhäsionsstärke“ - durch die Charakterisierung der Adhäsionspatches - und „fraktale Dimension“ - durch die Fraktalanalyse der Adhäsionskarte - stellen eine mögliche Anwendung zur markierungsfreien und schnellen Zellklassifizierung in Aussicht.

In Hinblick auf die Notwendigkeit von schnellen und zuverlässigen Analysemethoden im klinischen Alltag, könnte diese Analyse der RIKM-Bilder, ähnlich zu der computerassistierten Detektion (CAD), die durch Kombination von digitaler Bildbearbeitung und Mustererkennung bei z.B. Vorsorgeuntersuchungen in der Brustkrebsdiagnostik eingesetzt wird, als automatisiertes Verfahren zur Zellklassifizierung eingesetzt werden.

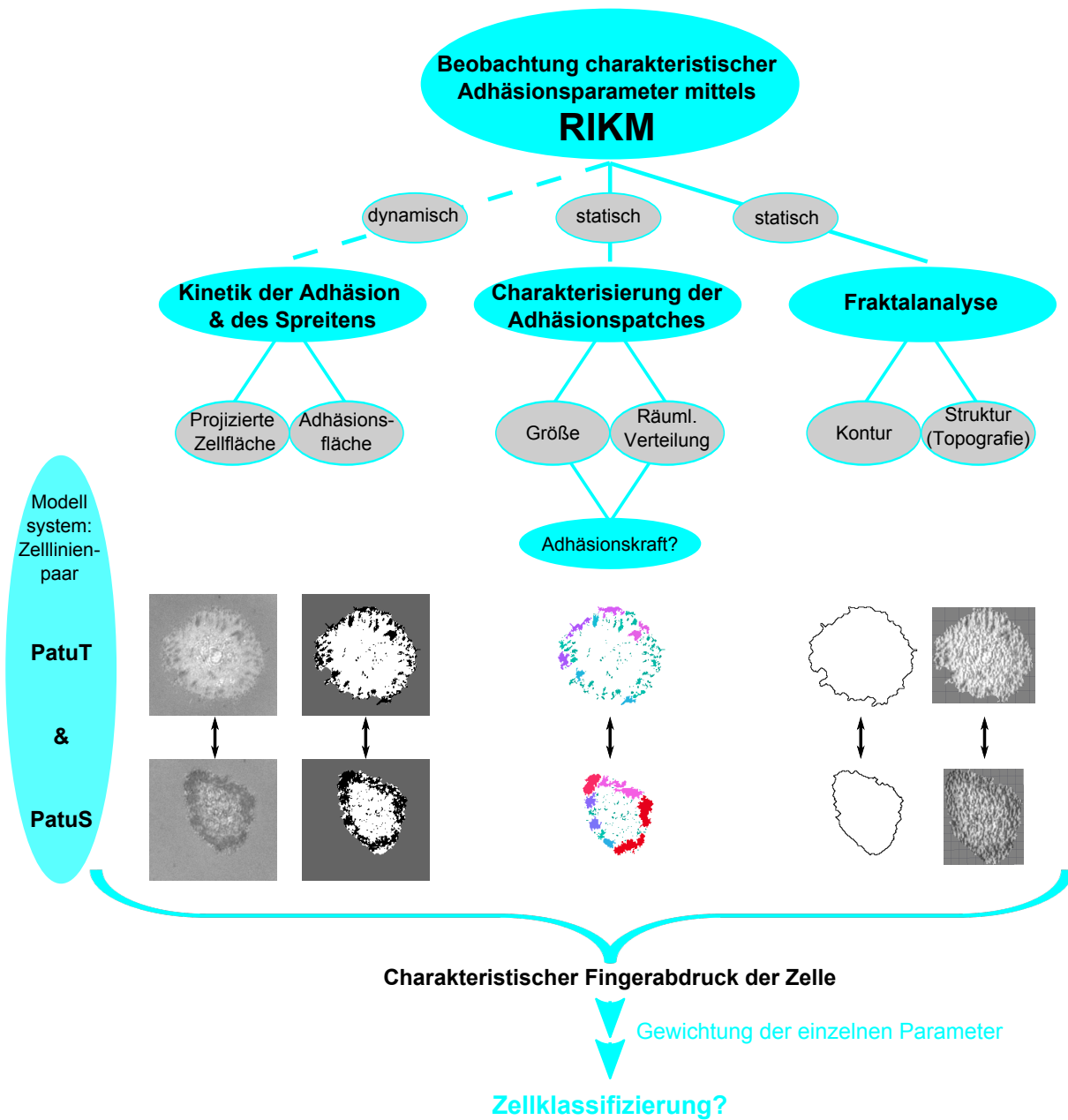


Abbildung 1.1: Skizzierung der wichtigsten Untersuchungsaspekte zum physikalischen Verständnis der Zelladhäsion mittels RIKM. Neben spezifischen Adhäsionsparametern, die zur Erstellung eines charakteristischen Fingerabdrucks der Zellen dienen, sollten in Hinblick auf die Möglichkeit zur Erstellung eines Tumorklassifizierungsprogramms, daraus zusätzlich tumorrelevante Parameter abgeleitet werden.

Theoretischer Hintergrund

2.1 Zell-Substrat-Interaktionen

Die Plasmamembran stellt die Barriere zwischen einer lebenden Zelle und ihrer unbelebten Umgebung dar. Trotzdem sind die Materialien in der Umgebung wichtig für das Leben der Zelle, denn die Interaktion mit ihnen reguliert unterschiedliche Zellaktivitäten, wie z.B. die Migration, das Zellwachstum, die Proliferation und Stoffwechselfunktionen. Denn Zellen besitzen eine bemerkenswerte Fähigkeit ihre Umwelt wahrzunehmen, sich an diese anzupassen und auf sie zu reagieren. Sie können ihre Umgebung chemisch und physikalisch (z.B. mechanisch) erfassen, was auf eine komplexe Folge von Interaktionen zwischen den makromolekularen Komponenten der Zelle zurückzuführen ist. Störungen in der mechanischen Kraftsensorik, der Weitergabe von Signalen oder der Zellantwort auf externe Signale resultieren in Krankheitsformen, wie z.B. Krebs, Immunerkrankungen, Gendefekten oder Nervenleiden. Während gesunde Zellen Ankerpunkte benötigen um zu proliferieren, können sich Tumorzellen aufgrund ihres veränderten Zellverhaltens auch ohne Adhäsion an das Substrat vermehren (Stoker et al., 1968).

Zellen haben die Fähigkeit verschiedene chemische Eigenschaften des Substrats zu erkennen, was auf die unterschiedliche Aktivierung von bestimmten Oberflächenrezeptoren zurückzuführen ist, welche selektiv mit den präsenten Liganden auf der Oberfläche interagieren. Eine jedoch noch verblüffendere Eigenschaft der Zellen ist ihre Fähigkeit Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften der Substrate, wie z.B. der Steifigkeit (Trichet et al., 2012), der Topographie (Gentile et al., 2010), der Geometrie (Bischofs et al., 2008), der Ligandendichte aber auch Unterschiede in der räumliche Organisation und dem Clustering der Liganden (Arnold et al., 2004; Cavalcanti-Adam et al., 2007) wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Abstandsvariationen der Signalmoleküle in der EZM konnten mit Abstandsgradientenoberflächen gemessen werden, bei denen Fibroblasten und Prä-Osterblasten Variationen in der Präsentation von 1 nm wahrnehmen konnten (Arnold et al., 2008).

2.1.1 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM ist ein komplexes, geordnetes Netzwerk aus Proteinen, Polysacchariden und löslichen Faktoren verschiedenster Größen und verschiedenster chemischer und physikalischer Eigenschaften, das sich jenseits der unmittelbaren Umgebung der Plasmamembran befindet. Kontakte der

EZM sind räumlich begrenzt auf die Oberfläche der Zelle, wo spezifische Transmembranrezeptoren an die EZM binden und diese intrazellulär mit den Komponenten des Zytoskeletts verbinden. Die Zellen interagieren mit ihrer Umgebung durch Zell-Zell-Kontakte und Zell-EZM-Kontakte. Die extrazellulären Matrixkontakte erfüllen dabei mehrere wichtige Zwecke:

- Ankerelemente der EZM an die Zelloberfläche
- Physikalische Kopplung der EZM mit Komponenten des Zytoskeletts, was für die Adhäsion der Zellen und deren Bewegung wichtig ist
- Lokalisierte Stellen für die Übertragung von mechanischen Kräften und elastischen Rückstößen zwischen der Zelle und der EZM
- Lokalisierte Stellen für die Signalübertragung
- Schlüsselkomponente in der Vernetzung und Organisation zellulärer und nicht zellulärer Elemente innerhalb des Gewebes

Nicht nur die molekulare Zusammensetzung der EZM ist wichtig für die Zellen, auch ihre Topografie und ihre mechanischen Eigenschaften spielen eine bedeutende Rolle (Geiger et al., 2001). Die Zusammensetzung und Organisation der EZM variiert und ist an ihre funktionellen Anforderungen des jeweiligen Gewebes angepasst (Davies et al., 1997). Sie besteht aus zwei Hauptklassen extrazellulärer Makromoleküle (siehe Abbildung 2.1):

1. Proteoglykane (Protein glykolisiert mit Glykosaminoglykanen)
2. Faserproteine, die nochmals in Strukturproteine (z.B. Kollagen, Elastin) und Anheftungsproteine (z.B. Fibronectin, Laminin) aufgeteilt werden

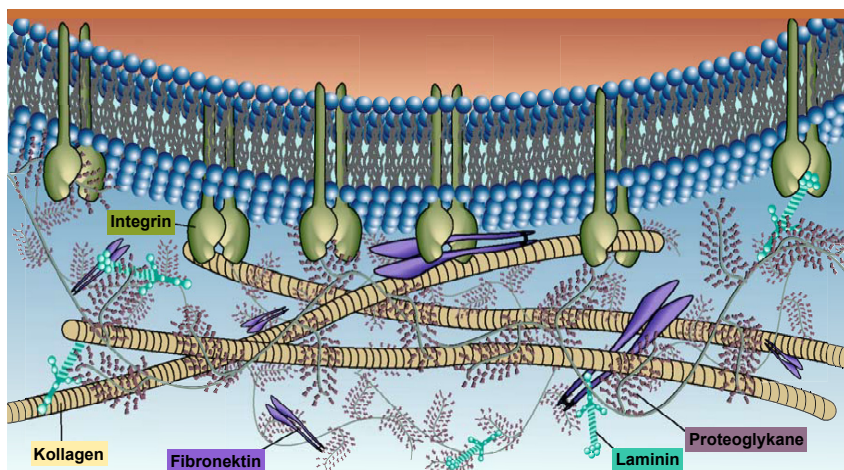


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Makromoleküle der extrazellulären Matrix. Die Proteine Fibronectin, Kollagen und Laminin besitzen gegenseitige Bindungsstellen, an denen sie sich jeweils aneinander heften können, sowie Bindungsstellen für Rezeptoren (hier: Integrine), die sich auf der Zelloberfläche befinden. Die riesigen Protein-Polysaccharid-Komplexe (Proteoglykane) nehmen sterisch einen Großteil der EZM ein. Abbildung modifiziert übernommen von Karp (2005).

Die Proteoglykane

Proteoglykane stellen einen charakteristischen Protein-Polysaccharid-Komplex dar, bei dem Proteine kovalent an Ketten von Glykosaminoglykanen (= Zucker) gebunden sind. Sie bilden eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in der die Faserproteine eingebettet sind und die, dem von außen auf die Matrix einwirkenden Druck standhält. In dieser Grundsubstanz findet die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen zwischen den Zellen im Gewebe und dem Blut statt.

Faserproteine - 1. Das Strukturprotein Kollagen

Kollagene, die zur Familie der fibrösen Glykoproteine gehören und auch Faserproteine genannt werden, sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix. Bei allen vielzelligen Organismen kommen sie als Hauptbestandteile des Bindegewebes (Knochen, Sehnen, Bänder, Knorpel und Zähne) und der Haut vor und zeichnen sich durch ihre hohe Zugfestigkeit aus. Ein sehr charakteristisches Merkmal aller Kollagene ist ihre dreisträngige, helikale Tertiärstruktur: Die Kollagenmoleküle sind Trimere, die in ihrer Sekundärstruktur aus drei Polypeptidketten (α -Ketten) aufgebaut sind, die sich unter Bildung einer einzigartigen stabartigen rechtsgängigen Tripel-Helix umeinander winden. Die Stabilität und die gedrehte Struktur werden durch sich wiederholende Sequenzen der drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin gewährleistet.

Faserproteine - 2. Das Anheftungsprotein Fibronectin

Das Glykoprotein Fibronectin (FN) ist ein Dimer aus zwei sehr großen, fast identischen Untereinheiten, die durch zwei Disulfidbrücken nahe der Carboxyl-Enden verbunden sind. Die beiden Untereinheiten bestehen aus einer Reihe gefalteter, stäbchenförmiger Domänen unterschiedlichster Funktionen, die durch biegsame Bereiche der Polypeptidkette getrennt sind. Die einzelnen Domänen sind darauf spezialisiert, an ein bestimmtes EZM-Molekül (z.B. Kollagen, FN) oder an Zelloberflächen-Moleküle (z.B. Integrin) zu binden. Sie selbst bestehen aus kleinen Modulen, die sich mehrfach wiederholen, weshalb man FN als ein modulares Protein bezeichnet. Es gibt drei verschiedene Module (TypI, TypII und TypIII), wobei das wichtigste Modul die sogenannte Fibronectin-Wiederholungseinheit des TypIII ist, die in jeder Untereinheit mindestens 15-mal vorkommt (Alberts et al., 2002). Diese besitzt in der zehnten Wiederholung (FNIII₁₀) die spezifische Tripeptidsequenz RGD, mit den Aminosäuren Arginin(R)-Glycin(G)-Asparaginsäure(D), welche zur wichtigsten Bindungsstelle für Zellen gehört, und die Zelladhäsion über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine vermittelt (Hynes, 1992). Die Aminosäuresequenz PHSRN mit den Aminosäuren Prolin(P)-Histidin(H)-Serin(S)-Arginin(R)-Asparagin(N) im FNIII₉ wurde als zweite Zellbindungsstelle im FN identifiziert, die synergistisch die $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelte Zelladhäsion durch RGD fördert (Aota und Yamada, 1994; Danen et al., 1995).

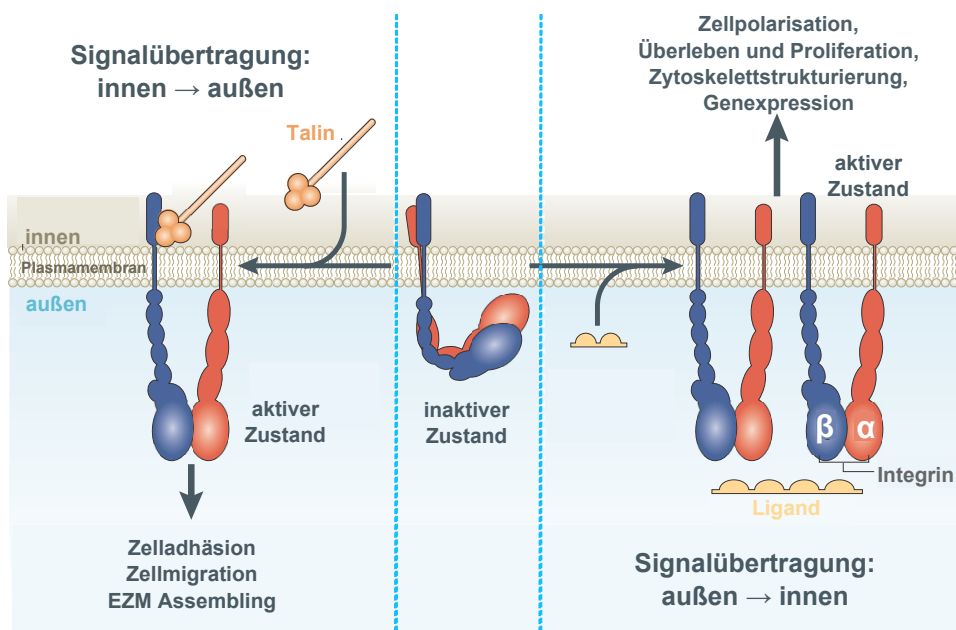


Abbildung 2.4: Schema der bidirektionalen Signalübertragung des Integrins. Integrine besitzen einen inaktiven, gebeugten Zustand (mitte), von dem sie durch verschiedene Ereignisse zu einem aktiven, ausgestreckten Zustand (links und rechts) aktiviert werden können. Im aktivierten Zustand können die Integrine Signale von innen nach außen, sowie von außen nach innen übertragen und so verschiedene Zellprozesse regulieren. Abbildung modifiziert übernommen von [Shattil et al. \(2010\)](#).

Fokaladhäsionen

Die Fokaladhäsionen vermitteln starke Adhäsionen zum Substrat. Im Fokalkontakt binden die transmembranen Integrinrezeptoren mit ihrer extrazellulären Domäne an einen Proteinbestandteil der EZM, wie z.B. an die Peptidsequenz RGD, und mit ihrer intrazellulären Domäne indirekt, über einen Komplex von verschiedenen Anheftungsproteinen (fokale Adhäsionscluster), an Bündel von Aktinfilamenten ([Hynes, 2002](#); [Kanchanawong et al., 2010](#)). Mit hochauflösender 3D-Fluoreszenzmikroskopie konnte die Proteinorganisation in den fokalen Adhäsionen (FAs) als ca. 40 nm hoher Bereich zwischen den Integrinen und dem Aktin identifiziert werden, welche in eine Integrinsignalschicht, eine mittlere Krafttransduktionsschicht und eine Aktinregulationsschicht eingeteilt werden kann (siehe [Abbildung 2.5](#)) ([Kanchanawong et al., 2010](#)).

Durch die Zusammensetzung und Morphologie können die FAs in drei Kategorien eingeordnet werden. Fokale Komplexe sind kleine, punktförmige Gebilde mit einem Durchmesser von ca. 1 μm , die innerhalb des Lamellipodiums direkt hinter der „Leading edge“ zu finden sind. Fokalkontakte oder auch fokale Adhäsionen sind flache, elongierte, dynamische Strukturen der Größe von 2-5 μm , welche in der Zellperipherie lokalisiert sind. Fibrilläre Adhäsionen sind hingegen große, stabile Strukturen mit einer Länge von 1-10 μm , die über die ganze Zelle verteilt sind ([Geiger et al., 2001](#)). Chemische und mechanische Signale von den an der EZM gebundenen Integrinen regulieren auch die Aktivitäten der Zytoskelettkinasen, Wachstumsfaktorrezeptoren und Ionenkanäle sowie die Organisation des Aktin-Zytoskeletts.

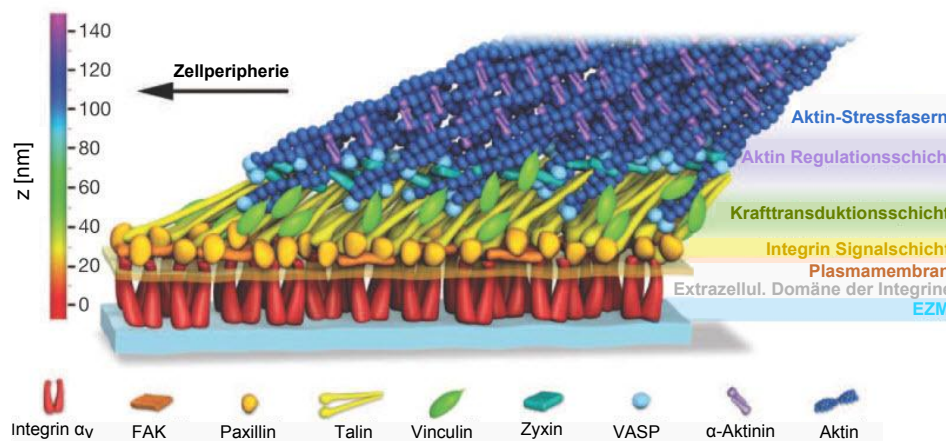


Abbildung 2.5: Schematisches Modell der molekularen Architektur von fokalen Adhäsionen. Die experimentell ermittelten Proteinpositionen sind dargestellt, wobei die Stöchiometrie der Proteine nicht berücksichtigt ist. Abbildung modifiziert übernommen von [Kanchanawong et al. \(2010\)](#).

2.2 Das Adhäsions - und Spreitverhalten von Zellen

Die Zelladhäsion und das Spreiten von Zellen, d.h. das Abflachen und Ausbreiten der Zellen auf dem Untergrund der EZM, sind wichtig für die Zellbewegung, das Zellwachstum und die Organisation von Geweben. Einmal in Kontakt mit der EZM, beginnt die Zelle die Oberfläche bezüglich der chemischen Zusammensetzung und physikalischen Steifigkeit der EZM abzutasten, um die integrinvermittelte Adhäsion einleiten zu können. Die Signalkaskade, die auf die Interaktion der Integrine mit der EZM folgt, leitet dann Reaktionen wie das Spreiten, die Bewegung und das Überleben der Zellen ein ([Geiger et al., 2001](#)).

Die abgeflachten Zellen besitzen kontraktile Fähigkeiten, die sie auch auf das Substrat ausüben, wobei Integrinrezeptoren als Kraftsensoren dienen ([Riveline et al., 2001](#); [Galbraith et al., 2002](#)). Die Zell-Matrix-Adhäsion stellt somit ein komplexes Zusammenspiel der Dichte von EZM Rezeptoren, der Krafterzeugung an diesen Rezeptoren und der Zell-Matrixkontaktfläche dar. Das Zellspreiten ist ein aktin- und myosinabhängiger Prozess der Membranausdehnung entlang der EZM beschichteten Oberfläche. Dabei muss der Grundzustand der Zellmembranelastizität und die Steifigkeit des Zytoskeletts überwunden werden. Der Prozess wird durch die Aktinpolymerisation an der Membran der „leading edge“ eingeleitet, der zur mechanischen Ausdehnung der Zellmembran und somit zur Umwandlung der Zellform von einer kugeligen zu einer nahezu scheibenförmigen Gestalt führt ([Döbereiner et al., 2004](#); [Chamaraux et al., 2005](#)).

Aufgrund des großen Interesses an dem zugrunde liegenden biophysikalischen Mechanismus des Zellspreitens wurden viele experimentelle aber auch theoretische Untersuchungen dem Thema gewidmet ([Bardsley und Aplin, 1983](#); [Dubin-Thaler et al., 2004](#); [Sengupta et al., 2006](#); [Li et al., 2010](#)). [Bardsley und Aplin \(1983\)](#) beschrieben verschiedene Herangehensweisen, mit statistischen, kinetischen oder empirischen Modellen, um den Zeitverlauf des Spreitens zu fitten. Abhängig vom Zelltyp haben sich verschiedene Modelle herauskristallisiert, wie z.B. das Fitten mit einer hyperbolischen Tangensfunktion bei der Amöbe *Dictyostelium discoideum* ([Chamaraux et al., 2005](#)), mit einer modifizierten Fehlerfunktion bei Endothelzellen ([Reinhart-King et al., 2005](#)) oder aber mit einer Potenzfunktion bei Fibroblastenzellen ([Döbereiner et al., 2004](#)). Da das Wachstum

der Zellfläche generell einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigt, sind die oben genannten Modelle alle charakterisiert durch einen quasi-linearen Verlauf der Zellfläche über die Zeit mit einer Phasenverzögerung zu Beginn und einer Plateau-Phase am zeitlichen Ende des Spreitens. Die Phasenverzögerung zu Beginn des Spreitens hängt antiproportional von der Matrixdichte des Substrats ab, was bedeutet, dass die Phasenverzögerung zwischen Zellkontakt und Beginn des Spreitens bei erhöhter Anzahl an vorhandenen EZM Molekülen kleiner wird (Dubin-Thaler et al., 2004). Dabei konnte aber auch gezeigt werden, dass die Dynamik des Zellwachstums nach der Verzögerungsphase nicht von der Matrixdichte beeinflusst wird. Cuvelier et al. (2007) postulierten, dass es ein universelles Gesetz zur Kinetik des Zellspreitens gibt. Die drei verschiedenen Phasen des Zellverhaltens beim Spreiten werden als basale, kontinuierliche und kontraktile Phase bezeichnet, wobei jede signifikante Unterschiede in der Proteinaktivität aufweist und sich die Phasen somit funktionell unterscheiden (Döbereiner et al., 2004, 2005; Ryzhkov et al., 2010).

2.2.1 Physikalische Betrachtung der Zelladhäsion

Die Zelladhäsion kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase, der Primärprozess der Zelladhäsion kennzeichnet sich durch die Ausbildung vieler mikroskopisch kleiner Haftstellen aus, wie in Abschnitt 2.1.2 bereits beschrieben wurde. Dieser Prozess ist ein komplexer Vorgang, der durch die Interaktion von generischen Grenzflächenkräften mittlerer Reichweite (ca. 100 nm), von elastischen Spannungen in der Zellmembran und vor allem von attraktiven spezifischen Kräften mit kurzer Reichweite (ca. 10 nm) getrieben wird (Sackmann und Bruinsma, 2002). Schon Bell postulierte 1978, dass der Vorgang der Zelladhäsion nicht nur durch unspezifische elektrostatische Interaktionen eingeleitet wird, sondern auch spezifische Bindungen eine Rolle spielen (Bell, 1978).

Zu den generischen Kräften zählen die Kapillarkräfte, die beispielsweise auch bei der Adhäsion eines Wassertropfens auf einer Oberfläche bestimmen, ob dieser die Oberfläche benetzt oder an ihr abperlt. Weiterhin gehören die Abstoßungskräfte, die durch Puffermoleküle der Glykokalix vermittelt werden, sowie entropische Undulationskräfte, durch die dynamische Oberflächenrauigkeit der Zellen entstehen, dazu. Die Kräfte der elastischen Spannungen in der Zellmembran kommen durch deren adhäsionsinduzierten Deformationen zustande.

Die spezifischen Kräfte werden durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, wobei es neben den schon beschriebenen Integrinen (Haftung: Zellen - Gewebe), noch drei weitere Rezeptorfamilien, die Immunglobuline (Kontakt: zwischen Zellen des Immunsystems), die Selektine (schwache Haftung: weiße Blutzellen - Innenwand der Blutgefäße) und die Cadherine (Kopplung: zwischen Epithelzellen) gibt. Diese spezifischen Bindungen sind anders als chemische Bindungen zu verstehen. Die Bindungspartner passen genau zusammen, weshalb man auch vom Schlüssel-Schloss-Prinzip dieser Bindungen spricht. Dabei werden sie über Wasserstoffbrückenbindungen oder van der Waals-Kräften zusammengehalten und sind somit schwächer als kovalente Bindungen, aber viel spezifischer.

Viele Aspekte der Zelladhäsion in der Primärphase können als Benetzungsübergang erster Ordnung angesehen werden, wobei die Besonderheit der biologischen Benetzung, die Ausbildung von punktuellen Haftstellen ist. Allgemein versteht man unter einem Benetzungsübergang die spontane Ausbildung eines dünnen Filmes einer Flüssigkeit auf einem Festkörper durch vollständige Spreitung eines Tropfens, bis ein dünner Flüssigkeitsfilm entsteht. Voraussetzung für das Spreiten des Tropfens ist eine starke Attraktion der Wand, andererseits muss auch eine weitreichende Abstoßung zwischen dem Festkörper und der äußeren Oberfläche des Flüssigkeitsfilms vorliegen, sodass eine endliche Filmdicke stabilisiert wird.

In der zweiten Phase des Zelladhäsionsprozesses werden die Haftstellen (Adhäsionsdomänen) durch die Kopplung der intrazellulären Segmente der Rezeptoren an das Zytoskelett stabilisiert, wodurch es auch zu einer Zunahme der Membransteifigkeit kommt. Durch diese Verknüpfung des mechanischen Primärprozesses mit dem Inneren der Zelle können so biochemische und genetische Signalprozesse zur Regulierung der Adhäsion genutzt werden, welches die Basis der Adaption der Adhäsion an die Umgebungsbedingungen darstellt (Sackmann und Bruinsma, 2002).

2.2.2 Die Rolle der spezifischen Bindungen

Stabile Adhäsionen bei der Zelladhäsion werden durch die Bildung sogenannter Adhäsionscluster erreicht. Diese sind wichtig, da die Adhäsion durch einzelne Integrin-EZM-Bindungen nicht stark genug wäre. Die Bindungsaffinität solch einer einzelnen spezifischen Bindung mit einer Reichweite von max. 1 nm ist durch die Freie Enthalpie der Bindung bestimmt und liegt im Bereich von 7-35 $k_B T^1$ und sind somit um das 10-100-fache schwächer als kovalente Bindungen (z.B. C-C Bindung: $\approx 150 k_B T$). Durch die hohe Passgenauigkeit der beiden Bindungspartner der spezifischen Bindungen (Schlüssel-Schloss-Bindungen) weisen sie aber eine ungleich höhere Selektivität im Vergleich zur Ausbildung von kovalenten Bindungen auf. Durch die Ausbildung von Adhäsionsclustern kann die Zelladhäsion verstärkt werden, denn: 1.) Bei der Ausübung einer Kraft auf ein Cluster, wird diese gleichmäßig auf alle Bindungen verteilt, was die Beanspruchung einer einzelnen Bindung verringert. 2.) Zusätzlich ist die Möglichkeit der Wiederbindung einer gebrochenen Bindung innerhalb eines Clusters viel größer, da hier die Region der möglichen Rezeptordiffusion durch die anderen Bindungen räumlich begrenzt ist.

Die Bindungsenthalpien der spezifischen Bindungen liegen in den Größenordnungen der thermischen Energien, weshalb sie bei Bedarf schnell gelöst werden können. Das Konkurrieren der Bindungen mit thermischen Energien führt zu einer endlichen Bindungslebensdauer und einer stochastischen Verringerung der Adhäsion. Jede Kontaktzerstörung einer Adhäsionsverbindung ist nichts anderes als ein Bindungsbruch auf molekularem Niveau. Zur Beschreibung einer thermodynamisch induzierten Bindungsbrechung kann die Kramers Theorie angewendet werden (Kramers, 1940). Ursprünglich wurde sie zur Beschreibung von chemischen Reaktionsraten entwickelt, kann aber auch verwendet werden um Bindungsereignisse im Phasenraum der Freien Enthalpie zu beschreiben (Hänggi et al., 1990; Evans, 2001). Die Bindung ist durch ein lokales Minimum A der Freien Enthalpie gegeben. Der Bindungsbruch erfolgt über eine energetische Barriere S hinweg, für die die Aktivierungsenergie G_S nötig ist (siehe Abbildung 2.6).

¹ k_B : Boltzmann-Konstante = $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K; T: Temperatur

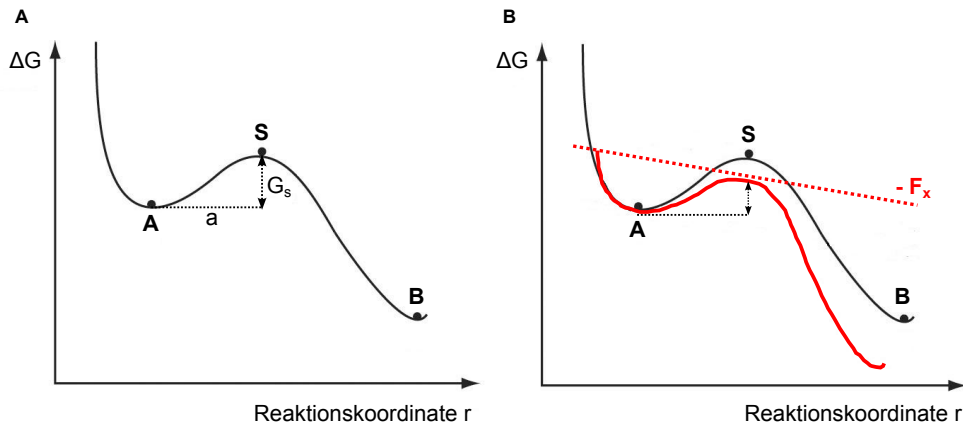


Abbildung 2.6: Verlauf der Freien Enthalpie entlang einer Reaktionskoordinate bei einem Bindungsbruch. Die Reaktion erfolgt vom Zustand A (hier bestehende Bindung) entlang des Reaktionspfades. Die höchste Freie Enthalpie wird am Punkt S im Abstand a vom Punkt A erreicht, die Freie Enthalpie der Aktivierung ist G_s . (**A**) zeigt den Vorgang bei einer unbelasteten Bindung, (**B**) die Veränderung bei einer belasteten Bindung. Die wirkende Kraft liefert einen additiven Beitrag $-F_x$ zum Potential. Die Freie Enthalpie des Übergangszustands S wird um F_a abgesenkt. Abbildung modifiziert übernommen von [Sackmann und Merkel \(2010\)](#).

Der statistisch auftretende Bruch einer Einzelbindung kann mit der Dissoziationsrate k_0 beschrieben werden. Nach dem van't Hoff-Arrhenius Gesetz ist die Dissoziationsrate proportional zu $\exp(-\Delta G/k_B T)$ ([Simson, 1999](#)). Die Dissoziation einer Bindung kann entlang unterschiedlicher Pfade in der Energielandschaft erfolgen und die Form, Höhe und Lage der Barriere kann durch eine äußere Kraft F verändert werden. Im einfachsten Fall, wie es bereits [Bell \(1978\)](#) postuliert hat, kann angenommen werden, dass die wirkende Kraft durch einen Zusatzterm $-F_x$ in der Freien Enthalpie beschrieben werden kann. In diesem Modell wird die Freie Enthalpie der Aktivierung um den Betrag $-F_a$ gesenkt. Somit ergibt sich für die Dissoziationsrate k_{off} des Bindungsbruchs, die exponentiell mit der äußeren Kraft wächst, zu ([Bell, 1978](#)):

$$k_{off}(F) = k_0 \cdot e^{\left(\frac{F}{F_0}\right)} \quad (2.1)$$

F_0 ist dabei die innere Kraft, gegeben durch den Quotienten aus thermischer Energie $k_B T$ und dem räumlichen Abstand a des Ausgangszustandes A zum Übergangszustand S. Bei typischen Werten von $a = 0,01-0,3$ nm und $T = 300$ K liegt sie im Bereich von 10-400 pN ([Sackmann und Merkel, 2010](#)).

Bei der Betrachtung von Adhäsionsclustern, einem System aus vielen Bindungen, kann die Verteilung der applizierten Kräfte auf die Bindungen aufgrund unterschiedlicher Konfigurationen der Bindungen auf unterschiedliche Weise geschehen (siehe [Abbildung 2.7](#)). Sind die Bindungen seriell verbunden, erfahren alle Bindungen die Kraft F . In einer parallelen Anordnung erfährt jede einzelne Bindung nur einen Anteil der Kraft F , da dieser über alle Bindungen gleichmäßig verteilt wird. In einem Abziehmodell erfährt nacheinander jede Bindung die Kraft F .

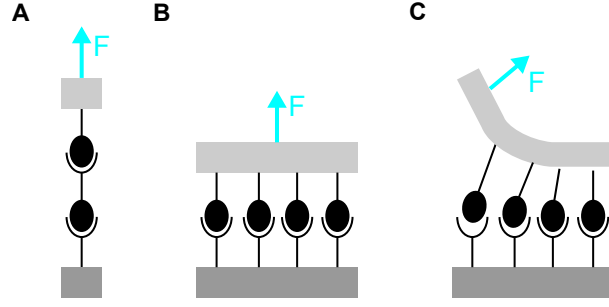


Abbildung 2.7: Verschiedene Konfigurationen von molekularen Bindungen in einem Adhäsionscluster. Die Bindungen können seriell verbunden sein, wodurch alle Bindungen der gleichen Kraft ausgesetzt werden (**A**). In einer parallelen Anordnung wird die Kraft auf alle Bindungen gleich verteilt (**B**). In einem Abzieh-Modell (peeling model) wirkt die Kraft nacheinander auf jede einzelne Bindung (**C**).

Die Bindungen in Adhäsionsclustern werden in theoretischen Modellen in paralleler Anordnung beschrieben, da aufgrund der an den fokalen Kontakten verankerten Aktin-Stressfasern, die Kraft auf ein ganzes Adhäsionscluster verteilt wird (Besser und Safran, 2006; Erdmann und Schwarz, 2007). Wie schon zuvor beschrieben liegt der Vorteil von Adhäsionsclustern im Vergleich zu Einzelbindungen darin, dass gebrochene Bindungen innerhalb des Clusters wieder binden können. Damit kann das Modell um eine Variable, die Wiederbindungsrate k_{on} erweitert werden. Zu einem bestimmten Zeitpunkt sind in einem Cluster eine Anzahl von N_t Rezeptoren, wobei der Adhäsionszustand allein von der Anzahl der gebundenen Rezeptoren N_i abhängt. Der Index i kann je nach Adhäsionszustand Werte zwischen 0 (alle Rezeptoren ungebunden) und N_t (alle Rezeptoren gebunden), annehmen. Die Kraft, die benötigt wird um ein Adhäsionscluster zu brechen wird durch zwei Parameter bestimmt: der maximalen Anzahl an gebundenen Rezeptoren N_i und der Beanspruchungsrate r ($r = dF/dt$).

Das von Selhuber-Unkel et al. (2010) beschriebene Modell geht von zwei verschiedenen Regimen aus, einer langsamen und einer schnellen Beanspruchung. Bei einer langsamen Beanspruchung erhöht sich die Brechkraft linear mit der Anzahl der gebundenen Rezeptoren N_i innerhalb eines Clusters und ist unabhängig von der Beanspruchungsrate. Bei einer schnellen Beanspruchung wird die Wiederbindungsrate k_{on} irrelevant und die Brechkraft verhält sich wie der Logarithmus der Beanspruchungsrate:

$$a) F = N_t F_0 p \ln(k_{on}/(k_o e)) : r \ll N_{eq} k_0 F_0 \quad (2.2)$$

$$b) F = N_{eq} F_0 \ln\left(\frac{r}{N_{eq} k_0 F_0}\right) : r \gg N_{eq} k_0 F_0 \quad (2.3)$$

Dabei ist $p \ln(a)$ das Produkt des Logarithmus, das als Lösung x von $x \exp(x) = a$ definiert ist. e ist die eulersche Zahl und N_{eq} beschreibt die Anzahl an gebundenen Rezeptoren im Gleichgewichtszustand ohne äußeren Krafteinfluss ($N_{eq} = N_t k_0 / (k_o + k_{on}) < N_t$). Die Anzahl der Rezeptoren N_t in einem Cluster ist durch die Fläche A des Clusters und der Fläche, die eine Bindung einnimmt A_0 , bestimmt ($N_t = A/A_0$).

2.3 Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens durch nanostrukturierte, biofunktionalisierte Oberflächen

Wie in vorherigen Abschnitten schon beschrieben, dirigiert die EZM mit ihrer Architektur, den räumlichen, chemischen und mechanischen Parametern, das Zellverhalten. Sie besitzt topografische und adhäsive Eigenschaften im Mikrometer- und Nanometerbereich. Die ersten *in vitro* Studien zur EZM-Interaktion beschränkten sich auf das Design von bioaktiven Oberflächenbeschichtungen, um so die molekulare Zusammensetzung der EZM erklären zu können (Ito et al., 1991; Dee et al., 1998). Dabei gingen die Studien vorwiegend von einer gleichmäßigen Verteilung der Proteine aus, was aber die EZM nicht ausreichend beschreibt, da ihre räumliche Struktur viel komplexer aufgebaut ist.

Mit den Fortschritten in der Mikrotechnologie und jüngst in der Nanotechnologie konnten leistungsstarke Werkzeuge zur Untersuchung des Einflusses der EZM auf das Zellverhalten entwickelt werden, um so die Signalkaskaden, die durch die EZM initiiert werden zu erkennen und zu verstehen. Zu den konventionellen Herstellungsmethoden von Mikro- und Nanostrukturen, bei denen das untere Limit der Auflösung bei ca. 100 nm liegt, zählen die Elektronenstrahlithografie und die optische Lithografie (Tennant, 1999; Valiokas, 2012). Unkonventionelle Methoden der Struktur-erzeugung deren Gemeinsamkeit auf der Verwendung eines strukturierten Elastomers als Maske, Stempel oder Abguss basiert und die Strukturen im Bereich von 30 nm bis 500 μm herstellen können werden unter dem Begriff der Softlithografie zusammengefasst (Xia und Whitesides, 1998; Valiokas, 2012)

Die Herstellung von Mikrostrukturen, die adhäsive Bereiche in Form verschiedener Muster präsentieren, konnte zur Untersuchung von selektivem Zelladhäsionsverhalten genutzt werden (Chen et al., 1997; Lehnert et al., 2004), wobei sich die Struktur der EZM als zentrales Schaltwerk für viele zelluläre Prozesse herausgestellt hat. Der Einfluss der Nanoarchitektur auf das Zellverhalten kann mit der faszinierenden Fähigkeit der Zellen, Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften der adhäsiven Oberfläche hinsichtlich ihrer Steifigkeit (Discher et al., 2005), Geometrie (Chen et al., 1997; Lehnert et al., 2004), Topografie (Dalby et al., 2004), ihrer Ligandendichte und der räumlichen Anordnung, dem Clustering (Maheshwari et al., 2000; Arnold et al., 2004) wahrzunehmen und darauf zu reagieren, erklärt werden.

Die präzise Kontrolle eines definierten Abstandes zwischen den adhäsiven Liganden in einer Längendimension von 10-250 nm bleibt immer noch eine großer Herausforderung. Genau in dieser Längendimension jedoch, werden zelluläre Funktionen reguliert, oft durch Bildung molekularer Cluster, wobei neben der räumlichen Verteilung der einzelnen Proteine auch die Anzahl an Proteinen eines Clusters eine entscheidende Rolle spielt. In der AG Spatz wurde eine Methode, die Mizellare-Blockcopolymer-Nanolithografie (BCML, block copolymer micelle nanolithography) (Spatz et al., 1996, 1999) verwendet, bei der Oberflächen mit Metallnanopartikeln in Abständen weit unter der Auflösungsgrenze der optischen Lithografie und der Elektronenstrahlithografie modifiziert werden können (Spatz et al., 2000; Glass et al., 2003). Grundprinzip dieses Ansatzes ist die Selbstorganisation von mit Metallsalzen beladenen Zweiblockcopolymer-Mizellen in einem organischen Lösungsmittel, wobei quasi-hexagonale Nanostrukturen auf unterschiedlichen Substraten (z.B. Glas oder SiO_2) abgeschieden werden können.

Mizellare Blockcopolymer-Nanolithografie zur Untersuchung von Protein-Clustering Effekten auf das Zelladhäsionsvermögen

Mit der BCML können Nanopartikel mit einer Größe von 1-10 nm hergestellt werden, die quasi-hexagonal auf einer Oberfläche angeordnet sind. Dabei können die Nanopartikel einen mittleren Abstand von 25-250 nm einnehmen (Glass et al., 2004; Girard et al., 2007).

Die Technik, die in Abschnitt 3.3 nochmals genauer beschrieben wird, basiert auf Blockcopolymeren, zwei chemisch unterschiedliche Polymerblöcke, die an einer Stelle miteinander verknüpft sind. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Blöcke, bilden diese in einem Lösungsmittel inverse Mizellen aus. Zugefügte Metallsalze lagern sich im Kern der Mizelle an, sodass, wie in dieser Arbeit verwendet, Mizellen mit einem goldbeladenen Kern entstehen. Wird z.B. eine Glasoberfläche in die mizellare Lösung eingetaucht und wieder herausgezogen, so bilden die fast kugelförmigen Mizellen eine zweidimensionale, dicht gepackte, quasi-hexagonale Anordnung auf der Substratoberfläche, was mit den wirkenden Kapillarkräften bei Verdunstung des Lösungsmittels erklärt werden kann. Durch einen Gasplasmaprozess wird das Polymer entfernt und das Goldsalz zu Gold reduziert. Das Ergebnis ist eine nanostrukturierte Glasoberfläche, bei der die Goldnanopartikel quasi-hexagonal angeordnet sind.

Für die Verwendung der nanostrukturierten Oberflächen zur Untersuchung der Adhäsion von Zellen müssen diese noch weiter modifiziert werden, da sie in ihrer ursprünglichen Form noch keine für die Zelle biologisch relevanten Eigenschaften besitzen. Die freien Glasflächen zwischen den Goldnanopartikeln werden dabei mit einer Monolage eines Protein abweisenden Hydrogels (Polyethylenglykol) überzogen. Über Thiolchemie werden dann spezielle Signalmoleküle (wie z.B. Integrine) an die Goldnanopartikel angebunden, sodass eine klar definierte biofunktionalisierte Oberfläche entsteht. Da die Kopfregion eines Integrins mit ungefähr 9 nm (Xiong et al., 2001) in der gleichen Größenordnung wie der Durchmesser der Goldnanopartikel (1-10 nm) liegt, kann nur jeweils ein Integrin an einen Goldnanopartikel binden. Der Abstand der Goldnanopartikel gibt somit die Entfernung zwischen den benachbarten Integrinen vor, sodass die räumliche Präsentation der Signalmoleküle Aufschlüsse über die Funktion der molekularen Anordnung der Integrine und somit für die Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens der Zellen geben kann.

Als Signalmoleküle stehen hierbei Proteine und kleine Peptidsequenzen zur Verfügung (Hersel und Kessler, 2003). Die Vorteile der Anbindung kleiner Peptidsequenzen liegt in der höheren Stabilität hinsichtlich pH- oder Temperaturschwankungen und sie unterliegen keiner Denaturierung oder Degeneration, wie es bei Proteinen der Fall sein kann. Kleine Peptidsequenzen lassen sich im Gegensatz zu großen Proteinen kontrollierter, in einer bestimmten Orientierung an die Goldnanopartikel anbinden, was wichtig für das Zusammenspiel mit den Zellmembranrezeptoren ist. Berücksichtigt man weiterhin, dass die Proteine mehr als nur ein Zellerkennungsmotif besitzen, erlaubt eine Verwendung von kleinen Peptidsequenzen die Adressierung von speziellen Integrinen, wodurch die Spezifität der Zellreaktion erhöht werden kann. Beispielsweise erhöht eine zyklische Konformation der Peptidsequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), welche die Zellbindungsdomäne des Fibronektins darstellt, die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, wohingegen eine lineare Konformation die Bindung an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine bevorzugt.

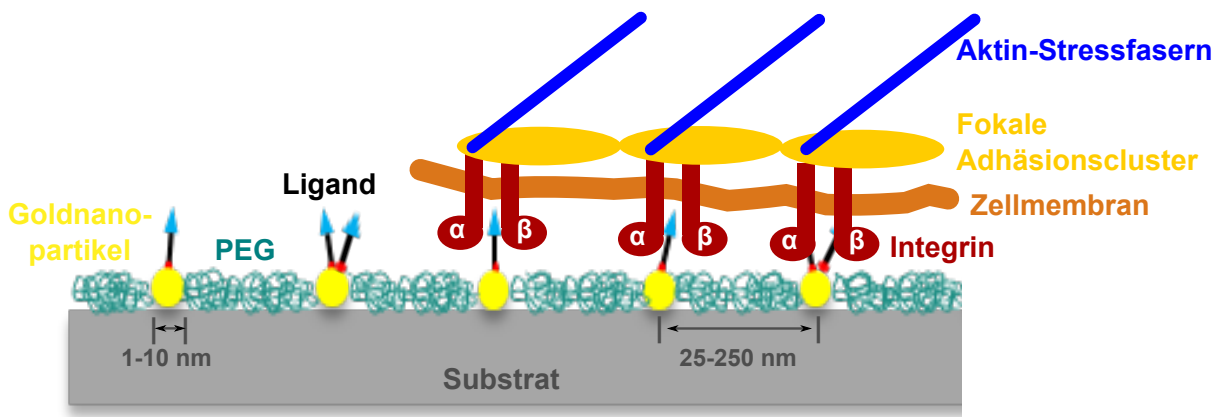


Abbildung 2.8: Schema der biofunktionalisierten nanostrukturierten Oberflächen und deren Einfluss auf die Zelladhäsion. Die Größe der Goldnanopartikel und deren Abstand kann mit der BCML variiert werden. Die Substratoberfläche zwischen den Goldnanopartikeln wird mit einer Monolage Protein abweisenden PEGs überzogen. Die Goldnanopartikel können mit verschiedenen Signalmolekülen (Liganden) funktionalisiert werden, die dann von der Zelle wahrgenommen werden und eine Zellreaktion einleiten. Die Integrine in der Membran der Zelle binden an die Liganden auf den Goldnanopartikeln und es können sich fokale Adhäsionscluster ausbilden, die die Integrine mit den Aktin-Stressfasern im Zellinneren verbinden.

Ein entscheidender Aspekt der Zelladhäsion ist die Ausbildung fokaler Adhäsionscluster. Um die Funktion dieser molekularen Ausrichtung einzelner Integrine untersuchen zu können, wurden die oben beschriebenen nanostrukturierten Oberflächen genutzt (Arnold et al., 2004) und das Adhäsionsvermögen der Zellen bei unterschiedlichen Abständen der Goldnanopartikel und damit der Präsentation der Signalmoleküle zu untersuchen. Bis zu einem Abstand von 58 nm war die Adhäsion von Fibroblastenzellen und Melanozyten sehr gut, wohingegen ein Abstand von mehr als 73 nm zwischen den Adhäsionspunkten zu einer geringeren Adhäsion und zu einer diffusen, nicht klar abgegrenzten Ausbildung von fokalen Adhäsionen führte. Somit muss es einen kritischen Bereich zwischen 58 und 73 nm geben, wie sich die Integrine anhäufen müssen um Adhäsionssignale in diesen Zellen initiieren können. Bei diesen charakteristischen Abständen konnte gezeigt werden, dass die Zelladhäsion (Arnold et al., 2004), das Zellspreiten, das Assembling von fokalen Adhäsionen und die Migration der Zellen (Cavalcanti-Adam et al., 2006, 2007) auf verschiedene Arten beeinflusst werden. Mit der Präsentation der Liganden in Form eines Abstandsgradienten lies sich die absolute Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Abstandsvariationen der Signalmoleküle in der EZM messen (Arnold et al., 2008). Es zeigte sich, dass Fibroblasten und Prä-Osteoblasten Variationen in der Präsentation der Liganden von 1 nm wahrnehmen. Das Anhäufen von Proteinclustern wird somit von der Zelle genutzt um ihre Umgebung wahrzunehmen und auf geringste geometrische Änderungen zu reagieren.

2.4 Verändertes Adhäsionsverhalten von Tumorzellen

Tumorzellen sind gekennzeichnet durch zwei Eigenschaften: ihr unkontrolliertes Wachstum und Proliferation und ihre Fähigkeit in gesundes Nachbargewebe einzuwandern. Solange das Wachstum der Zellen lokal begrenzt ist, bezeichnet man den Tumor als gutartig (benigne). Dieser kann chirurgisch entfernt und meist vollständig ausgeheilt werden. Ein Tumor bezeichnet man als bösartig (maligne) oder als Krebs, wenn seine Zellen in benachbartes Gewebe eindringen. Bösartige

Tumore besitzen die Fähigkeit zur Metastasierung, d.h. sie bringen Zellen hervor, die sich von der Tumormasse ablösen und durch Invasion in Blut- oder Lymphgefäßsystemen zu anderen Zielorganen gelangen und dort sekundäre Tumore (Metastasen) bilden können. Die Entwicklung eines malignen Tumors (Tumorgenese) ist ein mehrstufiger Prozess, der gekennzeichnet ist durch eine fortschreitende Akkumulation genetischer und molekularer Veränderungen, wobei sich daraus auch Veränderungen in der Regulation und Interaktion von Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakten ergeben (Albertson et al., 2003; Balmain et al., 2003; Bissell et al., 2002).

Im Hinblick auf die Fähigkeit der Metastasierung, muss eine Tumorzelle ihre Zell-Zell-Kontakte zu den Nachbarzellen lösen um zu den Gefäßen wandern zu können. Dort müssen sie die Basalmembran und die Endothelschicht der Gefäße durchdringen um in den Kreislauf zu gelangen, den sie an einer anderen Stelle wieder verlassen. In ihrer neuen Umgebung müssen sie sich an diese anpassen um dort weiter proliferieren zu können. Viele dieser Schritte erfordern spezielle Zelladhäsionsfunktionen. In den meisten Fällen geht diese Zelltransformation mit einem Verlust des Adhäsionsvermögens einher. Untersuchungen weisen darauf hin, dass Störungen der Expression oder der Funktion von Adhäsionsmolekülen resultierend in einer veränderten und fehlerhaften Gewebearchitektur mit der Tumorgenese assoziiert sind (MacCalman et al., 1994; Akiyama et al., 1995). Insbesondere sind Veränderungen des Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin oder spezifischen Integrinen in Korrelation mit dem invasiven Potential von Tumorzellen und deren Metastasierung beobachtet worden (Birchmeier, 1995; Perl et al., 1998; Janes und Watt, 2006). Speziell N-Cadherin erhöht die Motilität von Tumorzellen, wobei Tumorzellen, mit Verlust der E-Cadherin-Expression von neuem N-Cadherin exprimieren, weshalb man von einem Umschalten von proadhäsiven Cadherinen (z.B. E-Cadherin) zu mesenchymalen, promigratorischen Cadherinen spricht (Hazan et al., 2004).

Der Prozess der Metastasierung ähnelt in zellulärer sowie in molekularer Hinsicht der reversiblen Übernahme von Programmen, wie sie embryonale und adulte Stammzellen in der Ontogenese und bei der Gewebereparatur durchlaufen. Eines dieser Programme stellt die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) und ihre Umkehrung bei der Absiedlung der Tumorzelle vom Primärtumor dar. Die M(metastatische)-EMT ist charakterisiert durch den Verlust epithelialer Komponenten und damit der Zellpolarität, aber auch durch die Aktivierung einer Reihe mesenchymaler Gene (z.B: Vimentin, Tenascin) (Zöller, 2010).

2.5 Das Geschwisterzelllinienpaar PatuT und PatuS des Pankreasadenokarzinoms

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Zelllinien PaTu8988S und PaTu8988T (im Weiteren abgekürzt als PatuS bzw. PatuT) wurden aus derselben Metastase eines Pankreastumors isoliert. Während PatuS Zellen eine Lokalisation von E-Cadherin und β -Catenin Komplexen an der Plasmamembran zeigen, besitzt die PatuT Zelllinie keine E-Cadherin-Expression und das β -Catenin ist hauptsächlich im Zytoplasma zu finden (Marques et al., 2009). Die gut differenzierten PatuS Zellen wachsen in großen inselartigen Zellverbänden, wohingegen die undifferenzierten PatuT ungeordnet als Einzelzellen wachsen, die keine Zell-Zell Kontakte (Adherens Junctions) ausbilden. Diese Unterschiede bei identischem genetischem Hintergrund machen diese Zelllinien zu einem idealen System, um die Funktion des Adhäsionsvermögens in der Progression und Metastasierung eines Pankreastumors zu untersuchen. Der Verlust des E-Cadherins in den PatuT Zellen entspricht auch dem migratorischen Verhalten dieser Zellen, die in sogenannten „Scratch

assays“ eine erhöhte Migration aufwiesen. Bei der Implantation der beiden Zelllinien in den Dottersack eines Zebrafisches, konnten Marques et al. (2009) zeigen, dass die PatuS Zellen im Dottersack verblieben, wohingegen die PatuT Zellen ein invasives und metastatisches Verhalten zeigten, da diese in verschiedenen Organen wie Gehirn, Herz, Leber, aber vor allem in Organen des Magen-Darm-Trakts wieder zu finden waren.

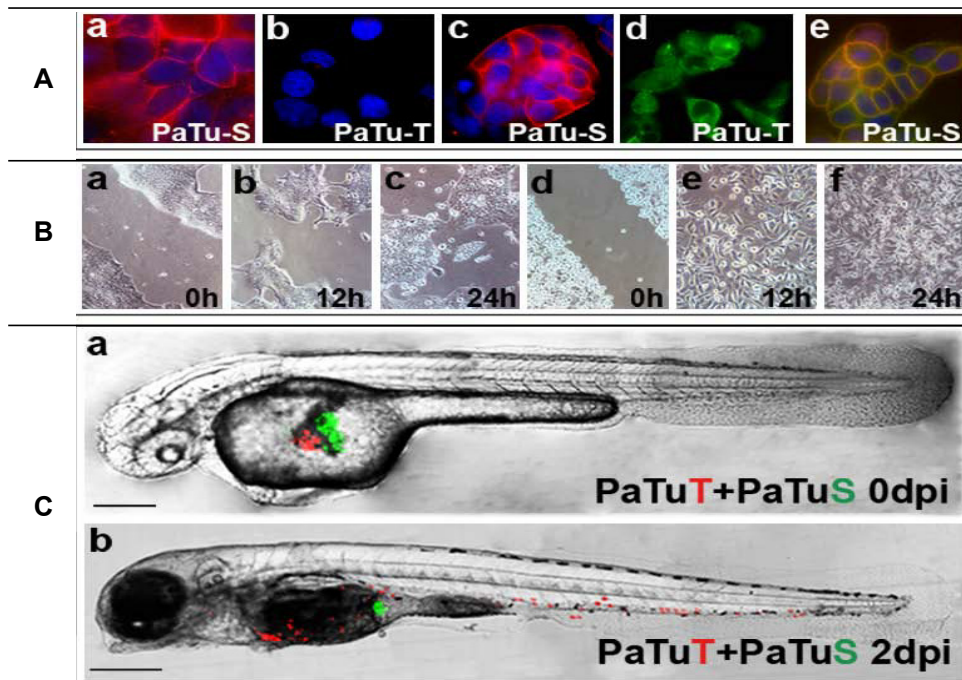


Abbildung 2.9: Charakteristika der beiden Pankreasadenokarzinomzelllinien PatuT und PatuS. In Reihe (A) sind Fluoreszenzaufnahmen von E-Cadherin und β -Catenin gezeigt. PatuS Zellen (a) exprimieren E-Cadherin im Gegensatz zu den PatuT Zellen (b). DAPI-Färbungen wurden genutzt um den Zellkern zu visualisieren. β -Catenin ist in beiden Zelllinien zu finden (c,d). Die Kolokalisation von E-Cadherin und β -Catenin in PatuS Zellen ist erkennbar durch gelbe Färbung der Plasmamembran (d). Reihe (B) zeigt einen *in vitro* Migrationsassay, bei dem das unterschiedliche Migrationsverhalten der beiden Zelllinien ersichtlich ist. Reihe C zeigt die Einpflanzung der nicht invasiven PatuS Zellen und der invasiven PatuT Zellen in denselben Embryo. Abbildung übernommen von Marques et al. (2009).

2.6 Techniken zur Analyse der Interaktion zwischen Zelle und unterliegendem Substrat

Die Untersuchung der Interaktion von Zellen mit dem unterliegenden Substrat ist sehr wichtig für die Weiterentwicklung im Bereich von biokompatiblen Materialien. Dabei stehen verschiedene Aspekte, je nach Anwendung des Biomaterials im Vordergrund. Bei Implantaten z.B. soll die Oberfläche so konzipiert sein, dass die Zellen adhären und proliferieren können, wohingegen bei beispielsweise Kontaktlinsen oder Kathetern die Anlagerung von Zellen verhindert werden soll. Für die Untersuchung der Zell-Substrat Interaktionen, wie z.B. das Adhäsionsverhalten, stehen verschiedene Techniken basierend auf elektrischen, optischen oder Kräfte messenden Eigenschaften zur Verfügung. Dabei zielen einige Techniken auf die Beobachtung auf Einzelzellebene, andere auf die Untersuchung eines kompletten Zellverbunds ab. Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung des Adhäsionsverhaltens ist dieses in Echtzeit verfolgen zu können, was nicht bei jeder

Technik gegeben ist. Zusätzlich ist eine nicht invasive Technik wichtig um etwaige Einflüsse von Farbstoffen auf das Adhäsionsverhalten ausschließen zu können. Im folgenden werden die gängigsten Analysetechniken kurz erläutert, bevor in den nächsten beiden Kapiteln 2.7 und 2.8, die in dieser Arbeit verwendeten Methoden- die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und die mikrofluidische Methode zur Untersuchung des Adhäsionsvermögens - genauer beschrieben werden.

2.6.1 Elektrochemische Techniken

Als Techniken, die sich elektrische Eigenschaften der Zellmembran zu nutzen machen, sind der elektrochemische Zellimpedanzsensor (ECIS, electric cellsubstrate impedance sensing) und die Quarzkristallmikrowaage mit Dissipation (QCM-D, quartz crystal microbalance with dissipation) zu nennen.

Bei der **ECIS** werden Zellen auf einer Elektrodenoberfläche kultiviert und als Messsignal der elektrische Wechselstromwiderstand (Impedanz) der mit dem Zellmedium bedeckten Elektrode detektiert. Bei Adhäsion der Zellen auf der Elektrode steigt die Impedanz an, da die Zellen als dielektrische Körper den Stromfluss zwischen der Elektrode und dem Medium erschweren. Sobald ein konfluenter Zellrasen auf der Elektrodenoberfläche erreicht ist, stellt sich ein Gleichgewichtswert der Impedanz ein, der von zelltypspezifischen Parametern wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten abhängt (Giaever und Keese, 1993; Wegener et al., 2000). ECIS stellt zwar eine markerfreie und nicht invasive Technik dar, bei der das Adhäsionsverhalten der Zellen in Echtzeit aufgezeichnet werden kann, trotzdem stellt es eine Herausforderung dar zwischen Signalen, die durch den Adhäsionsprozess zustande kommen und Signalen, die von schon adhärennten Zellen ausgesendet werden, zu unterscheiden (Marcotte und Tabrizian, 2008).

Die **QCM-D** ist eine massensensitive Technik, die auf der Frequenzmessung eines Schwingquarzes zwischen zwei aufgedampften Elektroden beruht. Durch Adsorption von Masse verändert sich die Frequenz des Schwingquarzes. Traditionell wurde die QCMD genutzt um die viskoelastischen Eigenschaften und die Adsorption eines festen Films auf der Oberfläche zu untersuchen (Höök et al., 1998). Da ein Zellrasen nicht als fester Film angesehen werden kann, sind keine direkten Messungen der Masse oder der Viskosität möglich (Marcotte und Tabrizian, 2008). Trotzdem kann die QCM-D zur Untersuchung der Zellinteraktion mit dem Substrat genutzt werden, da sich zelltypspezifische Eigenschaften des Adhäsionsverhaltens anhand unterschiedlicher Frequenzverschiebungen beobachten lassen (Wegener et al., 2001). Auch bei dieser Technik erfolgt die Analyse des Adhäsionsverhaltens in Echtzeit, markerfrei und nicht invasiv. Es können jedoch nur Aussagen über einen gesamten Zellverbund und keine Einzelzellinformationen ausgelesen werden.

2.6.2 Optische Techniken

Auf optischen Methoden basierende Adhäsionsstudien benötigen eine hohe Empfindlichkeit um die Prozesse, die nahe an der Substratoberfläche ablaufen, zu detektieren. Die meist verbreiteten Techniken sind die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy) und die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM).

Die **TIRFM** ist eine spezielle Methode der Lichtmikroskopie, bei der die Fluoreszenz der Probe durch eine evaneszente Welle angeregt wird. Die Technik beruht auf dem Prinzip der Totalrefle-

xion von Licht an der Grenzfläche von Glas und Wasser. Bei Einstrahlung von Licht unter einem flachen Winkel bildet sich im Wasser ein evaneszentes Feld aus, dessen Intensität mit steigendem Abstand vom Substrat exponentiell abfällt. Die typische Eindringtiefe bei sichtbarem Licht liegt zwischen 100-200 nm. Weil somit die Anregung der Fluorophore auf einen kleinen Bereich begrenzt ist, kann mit dieser Technik ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt werden. TIRFM stellt jedoch keine markerfreie Methode dar, da die zu beobachteten Bestandteile der Zellen, wie z.B. Proteine der Zellmembran fluoreszenzmarkiert werden müssen.

Bei der **RIKM** hingegen ist keine Markierung der Zellen nötig, da hier der Kontrast allein von der Interferenz zweier an einer Grenzfläche reflektierten Lichtstrahlen zustande kommt (die Technik wird in Abschnitt 2.7 genauer beschrieben). Bei beiden Techniken (TIRFM und RIKM) können Einzelzellen auf ihr Adhäsionsverhalten hin untersucht werden. Anders als bei den elektrochemischen Techniken ist es bei der RIKM auch möglich, die Größe, die Struktur und auch die Dynamik von Adhäsionskomplexen und Fokaladhäsionen direkt zu beobachten.

2.6.3 Kraftmessungen

Eine andere Herangehensweise die Zell-Substrat-Interaktionen zu verstehen ist die Stärke der Adhäsionskraft zu bestimmen. Die Methoden zur Untersuchung der Adhäsionskräfte können in drei Kräftekatgorien eingeordnet werden (Christ und Turner, 2010): die Zentrifugalkräfte (McClay et al., 1981; Channavajjala et al., 1997), die hydrodynamischen Scherkräfte (Usami et al., 1993; Garcia et al., 1997; Wu et al., 1997) und die Zugkräfte, die durch Mikro-manipulation verursacht werden (Tözeren et al., 1992; Merkel et al., 1999; Simon und Durrieu, 2006). Bei den ersten beiden Kategorien werden die Kräfte auf eine ganze Zellpopulation ausgeübt und indirekt über die Ablöseereignisse auf die Adhäsionskraft der Zellpopulation geschlossen. Bei der dritten Kategorie stehen jedoch die Einzelzellmessungen im Vordergrund.

Der **Zentrifugationsassay** ist die einfachste Technik mit hohem Durchsatzvermögen. Dabei werden die Zellen in Multiwell-Zellkulturplatten ausgesät, die vertikal an einem Zentrifugentisch befestigt werden. Bei der Zentrifugation werden sie einer Zentrifugalkraft, die orthogonal zum Substrat wirkt, ausgesetzt. Die auf die einzelnen Zellen wirkenden Kräfte liegen dabei im Bereich von 1-2000 pN (Christ und Turner, 2010), weshalb dieser Assay vorrangig für Kurzzeit-Adhäsionsstudien genutzt wird, bei denen die Adhäsionskraft noch unvollständig ist. Nachteilig an dieser Methode ist, dass pro Versuch nur eine Kraft ausgeübt und das Adhäsionsverhalten nicht in Echtzeit beobachtet werden kann. Um die Adhäsionsstärke zu bestimmen muss die Zahl adhärenter Zellen vor und nach dem Experiment bestimmt und in Relation zur ausgeübten Zentrifugalkraft gesetzt werden.

Es gibt drei Methoden, die Zellen einer wohl definierten **hydrodynamischen Scherkraft** aussetzen: die Drehschreibe (spinning disk), die radiale Flusskammer und die Flusskammer basierend auf parallelen Platten (Christ und Turner, 2010).

Bei der Spinning disk Methode werden die Zellen auf einer Platte ausgesät, die in eine mit Medium gefüllten Kammer auf der Drehscheibe eingesetzt wird. Die Scherkraft, die auf die Zellen wirkt, steigt linear mit dem Radius der Scheibe an. Somit kann ein Kräftebereich von mehreren Größenordnungen (ca. 1-2000 dyn/cm²) untersucht werden. Allerdings handelt es sich nicht um ein Echtzeitexperiment, da der Anteil der verbleibenden Zellen erst anschließend an einem Mikroskop bestimmt werden kann.

In einer radialen Flusskammer wird die hydrodynamische Scherkraft durch einen aktiven Flüssigkeitsstrom generiert. Die Flüssigkeit wird in die Mitte einer stationären, runden Platte, auf

der die Zellen adhären, geleitet und breitet sich von dort radial über die Platte hin aus. Da die Geschwindigkeit des Stromes und damit auch die hydrodynamische Scherkraft mit steigendem Radialabstand linear abnehmen, erfahren die Zellen je nach Position eine unterschiedliche Scherkraft. Bei Verwendung von transparenten Substraten kann der Ablösevorgang in Echtzeit unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die maximal applizierte Scherkraft von $< 200 \text{ dyn/cm}^2$ begrenzt diese Methode jedoch auf Kurzzeit-Adhäsionsstudien.

Der Flusskammer basierend auf zwei parallelen Platten liegt dasselbe Prinzip des aktiven Flüssigkeitsstroms wie der radialen Flusskammer zugrunde. Die Zellen adhären in der Flusskammer und die applizierte hydrodynamische Scherkraft wird durch ein parabolisches Flussprofil verursacht, indem ein Flüssigkeitsstrom seitlich in die Kammer eingelassen wird (die Technik wird in Abschnitt 2.8 genauer beschrieben).

Bei den Techniken der **Mikromanipulation** wird direkt eine Zugkraft auf einzelne Zellen ausgeübt. Eine übliche Methode der Mikromanipulation ist die Verwendung eines Rasterkraftsensors (Blattfeder), dessen Spitze in die Nähe der Zelle gebracht und die Zelle damit gedrückt oder angezogen wird, bis sich die Zelle vom Substrat gelöst hat. Durch die aufgenommenen Kraft-Abstands-Kurven lässt sich dann die applizierte Kraft über die Deformation des Kraftsensors berechnen, wobei Materialparameter wie z.B. die Steifigkeit der Blattfederspitze berücksichtigt werden müssen. Mit dieser Technik können Kräfte von bis zu $1 \mu\text{N}$ ausgeübt werden (Christ und Turner, 2010), womit sie auch für Langzeit-Adhäsionsstudien geeignet ist. Bei der Mikromanipulation werden Einzelzellstudien durchgeführt, die durch die präzise Kontrolle der applizierten Kraft zwar einen besseren Einblick in mechanische Prozesse geben, die bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen, allerdings sind sie zeitaufwendig und benötigen spezielles Zubehör. Weitere Techniken, die zur Untersuchung der Adhäsionskraft einzelner Zellen verwendet werden, sind beispielsweise optische oder magnetische Pinzetten (Thoumine et al., 2000; Walter et al., 2006).

2.7 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens mittels Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM)

Die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie ist ein lichtoptisches Verfahren, mit dessen Hilfe man aus dem Interferenzbild, der an einem Objekt reflektierten Strahlen polarisierten Lichtes, das Höhenprofil des Objektes über dem Substrat rekonstruieren kann. Während die laterale Auflösung durch die Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie gegeben ist, kann in axialer Richtung, für optisch eindeutige, statische Objekte, eine Auflösung von 2 nm erreicht werden (Limozin und Sengupta, 2009).

In der Zellbiologie wurde die Technik das erste Mal von Abercrombie und Ambrose (1958) und Curtis (1964) angewendet und später mit der von Ploem (1975) entwickelten Antiflextechnik entscheidend verbessert (siehe Abschnitt 2.7.1). Die RIKM wird für die Untersuchung einer Vielzahl von dynamischen Phänomenen, wie z.B. der Adhäsion von Vesikeln (Rädler und Sackmann, 1993; Albersdörfer und Sackmann, 1997; Limozin und Sengupta, 2007), der Dynamik von kolloiden Proben (Rädler und Sackmann, 1992; Schilling et al., 2004; Robert et al., 2008), der Analyse von Benetzungsphänomenen (Wiegand et al., 1998) und von Filmdicken (Theodoly et al., 2010) und, mit einer weniger genauen Höhenaussage, der Adhäsion von Zellen (Abercrombie und Ambrose, 1958; Curtis, 1964; Verschuere, 1985; Schindl et al., 1995; Pierres et al., 2002), genutzt (siehe Abbildung 2.10). In der Zellbiologie liegen seit dem Jahre 2003 die Untersuchung der Dynamik des Spreitens der Zelle (Hategan et al., 2004; Pierres et al., 2003; Sengupta et al., 2006;

Cuvelier et al., 2007) zusammen mit theoretischen Modellierungen (Frisch und Thoumine, 2002; Chamaraux et al., 2005) im Fokus. Seit der Einführung der RIKM mit mehreren Wellenlängen, ist eine bessere Quantifizierung der Daten möglich (Schilling et al., 2004; Picart et al., 2004; Richter et al., 2007). Eine weitere Anwendungstechnik ist die „dynamische RIKM“ mit der die Fluktuationen von Modellmembranen auf der Oberfläche dazu genutzt werden um die Adhäsionsbereiche zu untersuchen (Smith et al., 2008). Die RIKM ist eine leistungsstarke Technik um Interaktionen zwischen zwei Grenzflächen, insbesondere den Vorgang der Adhäsion, zu untersuchen. Ein großer Vorteil der Technik ist, dass die zu untersuchenden Proben nicht markiert werden müssen. Mit dieser nicht-invasiven Methode sind somit Studien in Echtzeit über einen beliebigen Beobachtungszeitraum möglich. Nichts desto trotz stellt die Datenanalyse, insbesondere bei der Untersuchung der Zelladhäsion, eine Herausforderung dar, weil hier Einflüsse von verschiedenen Brechungsindizes und Mehrfachreflexionen auftreten können. In den folgenden Abschnitten wird die Theorie der RIKM, die Modifizierung der RIKM für die Untersuchung von Zellen und insbesondere die Anwendung der RIKM in Zelladhäsionsstudien erläutert.

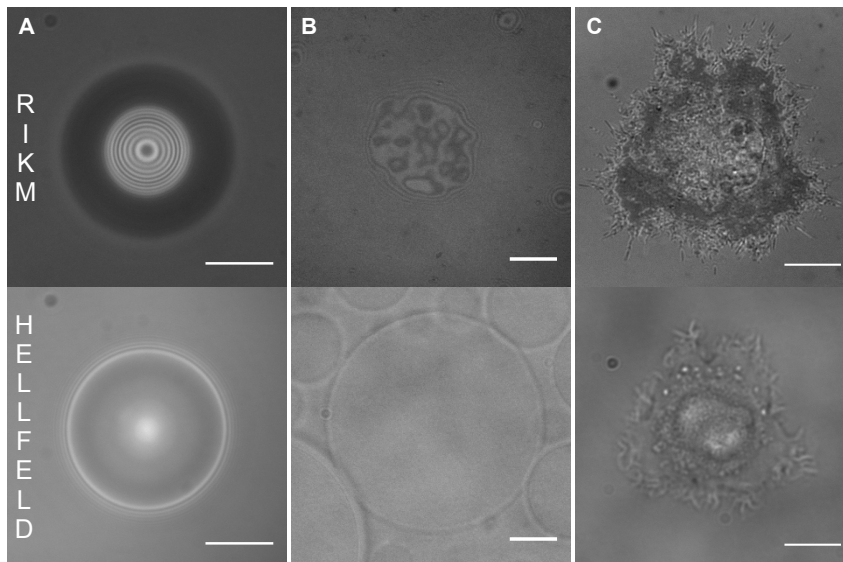


Abbildung 2.10: Anwendungsfelder der RIKM. Die RIKM wird beispielsweise zur Untersuchung von Polystyrolkugeln (A), Vesikeln (B) und Zellen (C) verwendet. Die zweite Reihe zeigt die dazugehörigen Hellfeldbilder. Maßstab: 10 μm .

2.7.1 Theorie der RIKM

Die Basis der Bildentstehung bei der mikrointerferometrischen Technik der RIKM ist die Interferenz zweier Strahlen, die an unterschiedlichen Grenzflächen reflektiert werden. Abbildung 2.11 zeigt einen einfallenden Strahl I_0 , der zuerst an der Grenzfläche Glas-Medium mit den Brechungsindexübergängen $n_0 \rightarrow n_1$ (Strahl I_1) und weiterhin an der Grenzfläche Medium-Objekt mit den Brechungsindexübergängen $n_1 \rightarrow n_2$ (Strahl I_2) reflektiert wird. Die beiden reflektierten Strahlen weisen eine Differenz in ihrer optischen Weglänge auf und überlagern sich entsprechend der unterschiedlichen Wegstrecken konstruktiv oder destruktiv, was zu einem Interferenzmuster des Objektes auf dem Detektor führt.

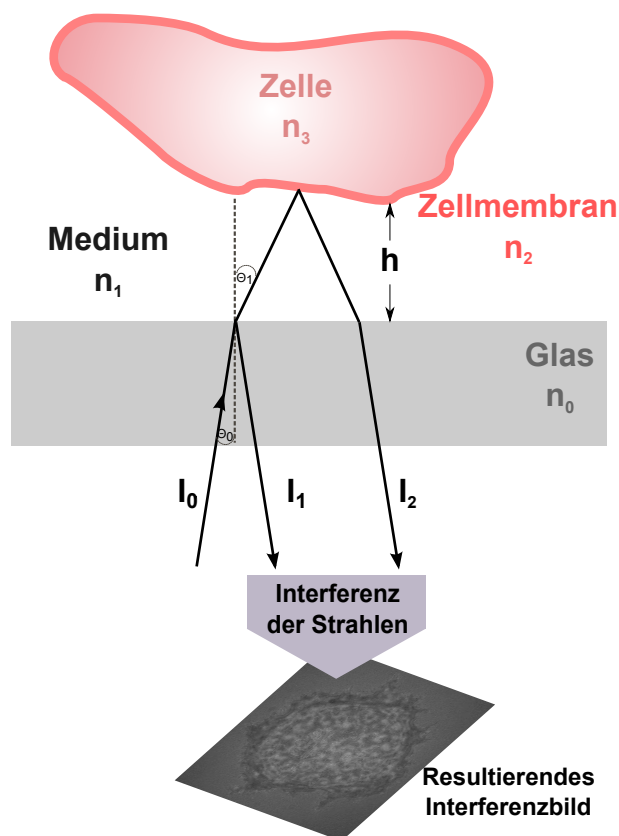


Abbildung 2.11: Prinzip der RIKM. Der einfallende Strahl I_0 wird an der Grenzfläche Glas-Medium und an der Grenzfläche Medium-Objekt (in diesem Fall eine Zelle) reflektiert. Die beiden reflektierten Strahlen I_1 und I_2 interferieren, wodurch ein Interferenzbild des Objektes entsteht.

Im trivialsten Fall des quasi senkrechten einfallenden Lichtes, bei dem keine Effekte vom Auftreten mehrerer reflektierender Oberflächen mit unterschiedlichen Brechungsindizes und keine Effekte von gekrümmten, reflektierenden Oberflächen berücksichtigt werden, können die Intensitätswerte I des Interferogramms in Abhängigkeit vom Substrat-Objekt Abstand für die eingestrahelte Wellenlänge λ an jedem beliebigen Punkt (x,y) beschrieben werden als:

$$I(h(x,y), \lambda) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi n h(x,y)}{\lambda} + \phi\right) \quad (2.4)$$

Mit den Parametern:

$I(h(x,y), \lambda)$: Intensität eines Punktes im Interferogramm, mit den Koordinaten x,y ;

h : Abstand zwischen Objekt und Substrat;

λ : Verwendete Wellenlänge;

I_1, I_2 : Intensitäten der an den Grenzflächen reflektierten Strahlen;

n : Brechungsindex des verwendeten Mediums;

ϕ : Phasenänderung des Lichtes, das an der Grenzfläche reflektiert wird ($\phi = \pi$ bei $n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}}$);

Durch Umstellung der Formel 2.4, mit der Verwendung der experimentell zugänglichen Extremwerten, der maximalen $I_M = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}$ und minimalen Intensität $I_m = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1 I_2}$ und

der Voraussetzung, dass $n_{Objekt} > n_{Medium}$ (und damit $\phi = \pi$) ist, erhält man eine Formel zur Abstandsbestimmung (Formel 2.5) von Objekt und Substrat.

$$h(x, y) = \frac{\lambda}{4\pi n} \arccos \left(\frac{2I(x, y) - (I_M + I_m)}{I_M - I_m} \right) \quad (2.5)$$

Die Intensität I_1 und I_2 der beiden reflektierten Strahlen hängen dabei von der Intensität des Eingangsstrahls wie folgt ab: $I_1 = r_{01}^2 I_0$ und $I_2 = (1 - r_{01}^2) r_{12}^2 I_0$, mit r als Fresnelschen Reflexionskoeffizienten $r_{ij}^\perp = \frac{n_i \cos \Theta_i - n_j \cos \Theta_j}{n_i \cos \Theta_i + n_j \cos \Theta_j}$ (für $i, j = 0, 1, 2$).

Unterschiede der Intensität werden somit durch die unterschiedlichen Abstände zwischen Objekt und Substrat hervorgerufen. Befindet sich das Objekt direkt auf dem Substrat ($h = 0$), so nimmt der Cosinus in Formel 2.4 den Wert -1 an und somit erscheinen Bereiche mit kleinen Abständen zum Substrat als dunkle Bereiche im Interferogramm. Im Allgemeinen nimmt die Amplitude des periodischen Interferenzmusters mit steigendem Objekt-Substrat Abstand ab. Dieser Abfall erfolgt bei einer höheren Beleuchtungsapertur (INA, illuminating numerical aperture) schneller, sodass es möglich ist die Tiefenschärfe anhand der Aperturblende zu regulieren (Gingell und Todd, 1979; Rädler und Sackmann, 1993; Wiegand et al., 1998).

Das Licht, welches in Medium an weichen Materialien oder biologischen Grenzflächen, wie z. B. der Zellmembran reflektiert wird, besitzt meist eine sehr geringe Intensität ($I \approx 10^{-3} I_0$). Nimmt man für die Brechungsindizes $n_{Glas} = 1,523$ (Angabe der Firma Carl Roth für ihre Borosilikat-Deckgläser), $n_{Medium} = 1,333$ (n von Wasser), $n_{Zellmembran} = 1,455$ (Vörös, 2004) an, so beträgt das Reflexionsvermögen R an einer Glas-Medium Grenzfläche $R = r^2 = 0,004$ (für $\Theta_{i,j} = 0^\circ$), das von der Medium-Membran-Grenzfläche nur $R = r^2 = 0,002$. Dies zeigt, dass die Reflexion von Streulicht innerhalb des Mikroskops aufgrund der höheren Intensitäten das eigentlich zu untersuchende Signal überlagert bzw. verfälschen kann. Um auch Systeme mit geringen Unterschieden im Brechungsindex adäquat abbilden zu können muss daher der Einfluss von Streulicht verhindert werden.

Kontrasterhöhung durch Anwendung der Antiflextechnik

Die bis zu diesen Zeitpunkt beschriebene Methode wird als Reflexions-Interferenz-Mikroskopie (IRM, interference reflection microscopy) beschrieben. Erst durch die von Ploem (1975) entwickelte Antiflextechnik, bestehend aus den Komponenten Polarisator, Analysator und $\lambda/4$ -Plättchen konnte der Kontrast der Interferenzbilder bei schwach reflektierenden Objekten wesentlich erhöht werden, sodass seither die IRM um den Begriff „Kontrast“ erweitert wurde und man von Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) spricht. In Abbildung 2.12 ist das Prinzip der Antiflextechnik skizziert. Das eintretende Licht wird durch einen Polarisator linear polarisiert und über einen Strahlteiler auf die Probe gelenkt. Das Objektiv besitzt ein $\lambda/4$ -Plättchen, wodurch das Licht zirkular polarisiert wird (Demtröder, 2009). Im weiteren Strahlenverlauf werden nun die speziellen Eigenschaften von zirkular polarisiertem Licht geschickt genutzt: bei der Reflexion an optisch dünneren Medien erfährt nur die elektrische Feldkomponente, die parallel zur Einfallsebene liegt eine Phasenverschiebung um π , wohingegen die senkrechte Komponente nicht beeinflusst wird. Bei der Reflexion an optisch dichteren Medien verhält es sich genau umgekehrt; die senkrechte Komponente erfährt eine Phasenverschiebung um π . Somit wird die Richtung der Zirkularpolarisation durch die Reflexionen an den beiden Grenzflächen umgekehrt, weshalb das Licht beim erneuten Durchlaufen des $\lambda/4$ -Plättchens wieder linear, aber um 90° zum

einfallenden Strahl gedreht, polarisiert wird. Dieses Licht kann den Analysator, der 90° versetzt zum Polarisator eingestellt ist, passieren. Da Streuung und Reflexion meist im optischen Strahlengang vor dem $\lambda/4$ -Plättchen erfolgen, ist das entstehende Streulicht senkrecht zu dem an der Probe reflektierten Licht polarisiert und wird somit vom Analysator blockiert. Der Kontrast des Interferogramms des schwach reflektierenden Objekts kann somit verbessert werden.

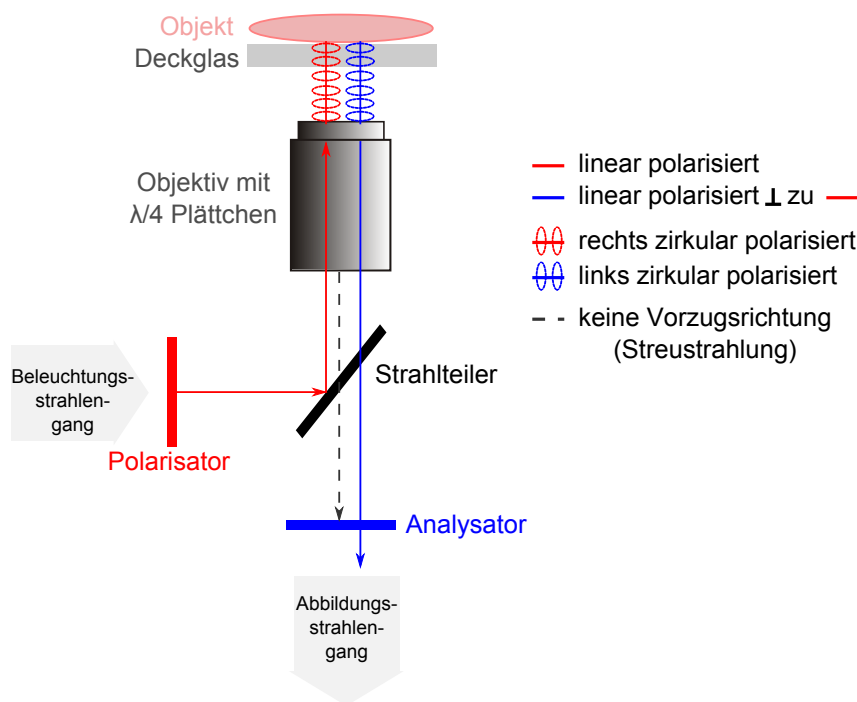


Abbildung 2.12: Prinzip der Antiflexentechnik. Durch den Einsatz der Komponenten Polarisator, $\lambda/4$ -Plättchen und Analysator kann das Streulicht heraus gefiltert und so der Kontrast des Interferogramms erhöht werden. Nur das Licht, das an beiden Grenzflächen reflektiert wurde, durchläuft das $\lambda/4$ -Plättchen zweimal und besitzt somit die richtige Polarisation um den Analysator passieren zu können.

2.7.2 Mehrwellenlängen-RIKM

Ein großer Nachteil der konventionellen Einwellenlängen-RIKM ist die Unklarheit über den Abstand des Punktes an dem die Reflexion auftritt. Aufgrund der Cosinusfunktion in Formel 2.5 wiederholt sich das Interferenzmuster periodisch alle $\Delta h = \lambda/2n$, was zu Unbestimmtheiten im Abstand $h(x, y)$ führt. Diese Periodizität eines Musters ist in allen Interferenzphänomenen bekannt. Bei der RIKM mit einer Wellenlänge, kann man den Abstand des Objektes daher nicht eindeutig bestimmen: Intensitäts-Minima im Interferogramm können bei einem Objekt, das unter der Wellenlänge $\lambda = 546 \text{ nm}$ und dem Brechungsindex $n = 1,33$ betrachtet wird beispielsweise bei Abständen von 0, 204, 408 nm, usw. auftreten (siehe Abbildung 2.13). Eine Bestimmung des tatsächlichen Abstandes ist nur unter der Annahme möglich, dass das zu untersuchende Objekt maximal ca. 100 nm vom Substrat entfernt ist. Bei der Betrachtung von Zell- oder Vesikeladhäsionen ist diese Voraussetzung meist erfüllt, da die Membranen direkt auf dem Substrat aufliegen. Die Spanne, bei der diese Ungenauigkeit in der Abstandsbestimmung auftritt ($\Delta h = \lambda/2n$ bei Einwellenlängen-RIKM), kann durch die Verwendung von zwei Wellenlängen erweitert werden. Die zusätzliche Periodizität und die Randbedingungen verschieben diese Unbestimmtheit der Ab-

standsberechnung, je nach den verwendeten Wellenlängen, auf mehr als 800 nm (Schilling et al., 2004; Picart et al., 2004).

In Abbildung 2.13 ist zur Veranschaulichung der Cosinus-Term der Formel 2.4 für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen $\lambda_1 = 593$ nm und $\lambda_2 = 546$ nm skizziert. Im Abstandsbereich $h = 0-1100$ nm wiederholt sich das Muster noch nicht, sodass in diesem Bereich eine eindeutige Zuordnung der Höhe über die Intensität erfolgen kann. Erst bei einem Abstandsbereich ca. 5130 nm zeigen die beiden Wellenlängen wieder den gleichen Nulldurchgang.

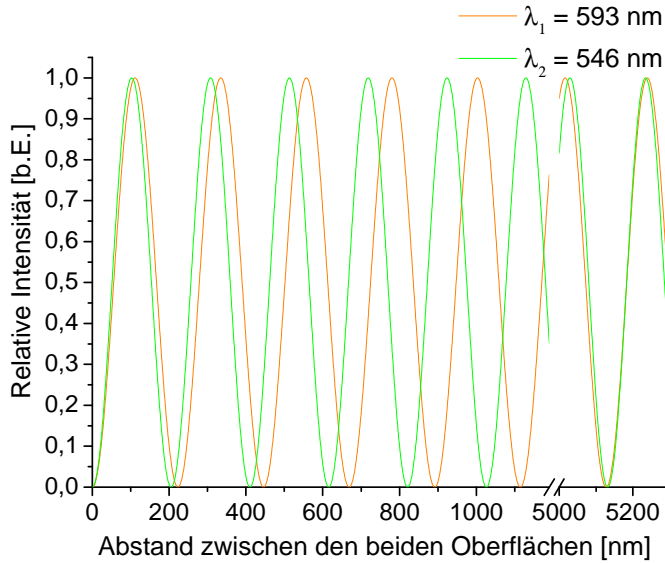


Abbildung 2.13: Intensitätsplots der verwendeten Wellenlängen in der RIKM für verschiedene Abstände zwischen der Oberfläche und dem reflektierenden Objekt. Dabei ist relative Intensität für den Abstandsbereich von 0-600 und 5000-5600 nm aufgetragen.

Mit der Kenntnis der Intensitäten beider Wellenlängen I_{λ_1} und I_{λ_2} und den Intensitätsmaxima und -minima ($I_{M_{\lambda_{1,2}}}$, $I_{m_{\lambda_{1,2}}}$), kann die Intensität I_{λ_1} der ersten Wellenlänge als Funktion der Intensität I_{λ_2} der zweiten Wellenlänge ausgedrückt werden:

$$I_{\lambda_1} = D_{\lambda_2} - S_{\lambda_1} \cdot \cos \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \arccos \left(\frac{D_{\lambda_1} - I_{\lambda_2}}{S_{\lambda_2}} \right) \quad (2.6)$$

wobei hier die Summen der Extremwerte mit S und die Differenzen mit D abgekürzt sind ($S_{\lambda_{1,2}} = I_{M_{\lambda_{1,2}}} + I_{m_{\lambda_{1,2}}}$ und $D_{\lambda_{1,2}} = I_{M_{\lambda_{1,2}}} - I_{m_{\lambda_{1,2}}}$). Damit kann für jedes Intensitätenpaar I_{λ_1} und I_{λ_2} eine eindeutige Höhe bestimmt werden.

Mit der Mehrwellenlängen-RIKM ist somit eine Bestimmung des absoluten Abstands möglich. Für viele Anwendungen aber genügt es auch den relativen Abstand zu bestimmen. Bei einem adhärenen Vesikel beispielsweise ist meist nur die Kontaktfläche von Interesse und nicht sein absoluter Abstand über dem Substrat, oder bei einer fluktuierenden Polystyrolkugel nur die Abstandsänderungen mit der Zeit.

2.7.3 RIKM an lebenden Zellen

Obwohl die RIKM eine einfach zu handhabende, markerfreie Methode zur Beobachtung der Interaktionen zwischen Zelle und unterliegendem Substrat ist, ist die quantitative Analyse und die Bildbearbeitung zur Erlangung der Abstandsinformationen nicht trivial (Gingell und Todd, 1979; Bereiter-Hahn et al., 1979; Verschueren, 1985; Limozin und Sengupta, 2009), da sowohl intrazelluläre Strukturen mit unterschiedlichen Brechungsindizes als auch Reflexionen an der oberen Plasmamembran den berechneten Zusammenhang zwischen lokaler Intensität und Zell-Substrat-Abstand beeinflussen können. Um eine präzise Abhängigkeit zwischen der Intensität und dem Abstand zu erhalten wurde in dieser Arbeit eine semi-quantitative Methode angewendet, mit der zwischen adhärennten und nicht adhärennten Bereichen der Zellmembran unterschieden wurde (siehe Abschnitt 4.3). Durch die Verwendung der Mehrwellenlängen-RIKM konnte die Robustheit der semi-quantitativen Methode weiter verstärkt werden.

Neben der Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes, lässt sich mit der RIKM auch die Dynamik des Adhäsionsprozesses von der initialen Phase, mit Auftreten der ersten Kontaktbildung zwischen Zelle und Substrat, bis hin zur Beobachtung des Zellspreitens mit der Ausbildung feiner Membranausläufer, wie z.B. Filopodien, in Echtzeit verfolgen (Fang et al., 2005; Sengupta et al., 2006; Cuvelier et al., 2007; Pierres et al., 2008). Zu Beginn tastet die Zelle schwebend das Substrat ab, bevor sie zum ersten Kontakt kommt. Beim ersten Kontakt ist die Zelle noch kugelförmig und das entstehende Interferenzmuster zeigt die charakteristischen Newtonschen Ringe, die auch bei der Beobachtung von sphärischen Objekten in der RIKM auftreten. Zu diesem Zeitpunkt sind die Fluktuationen der Zellmembran noch sehr groß. Je nach Zelltyp und Substrat findet die Zelle nach einer bestimmten Zeit Ankerpunkte und beginnt auf dem Substrat zu adhären und sich immer mehr zu spreiten. Vorteil der RIKM-Technik gegenüber der Hellfeldmikroskopie ist, dass die Kontaktformierung der Zelle mit dem Substrat und feinste Strukturen wie Mikrospikes, kleinste Membraneinschlüsse der Zelle, beobachtet werden kann.

Die Untersuchungen bezüglich der Kontaktflächen haben gezeigt, dass die dunklen Stellen im RIKM-Bild der Zelle als sehr enge Kontakte (FA) und enge Kontakte interpretiert werden können (Abercrombie und Dunn, 1975; Riveline et al., 2001; Holt et al., 2008). Tabelle 2.1 zeigt einen Überblick über die Zell-Matrix-Kontaktstrukturen und deren Identifikation im RIKM-Bild (Adams, 2001).

Mit der RIKM-Untersuchung von Matrix-Kontaktstrukturen können so auch Rückschlüsse auf das Adhäsionsvermögen gezogen werden. In dieser Arbeit wurden die RIKM-Ergebnisse zum Adhäsionsvermögen mit dem Adhäsionsvermögen der Zellen unter einem hydrodynamischen Fluss verglichen, was im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

Tabelle 2.1: Charakterisierung von Zell-Matrix-Kontaktstrukturen und deren Darstellung im RIKM-Bild.

Kontakttyp	Dimension [μm]	Darstellung im RIKM Bild	Abstand zum Substrat [nm]
Enger Kontakt	assoziiert mit Filopodium	grau	30-50 nm
Filopodium	20-200 μm lang; 0,2-0,5 μm im Durchmesser	grau	-
Hemidesmosomen	Plaques von 0,04-0,15 μm	-	-
Fokaler Kontakt/ Fokale Adhäsion	1,50 μm lang; 0,25 μm breit	schwarz	10-15 nm
Fibrilläre Adhäsionen	3-5 μm lang	weiß	>100 nm
Mikrospikes	2-10 μm lang; 0,2-0,4 μm im Durchmesser	grau -	-
Podosomen	0,2-0,4 μm im Durchmesser	schwarz	-

2.8 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens mittels Mikrofluidik

Mikrofluidik bezeichnet das Verhalten von Gasen und Flüssigkeiten in speziellen miniaturisierten Kanalsystemen. Die Dimensionen dieser Kanalsysteme liegen in der Regel im Bereich von 1-100 μm Kanalhöhe, 10-500 μm Kanalbreite und einer Länge der Kanäle bis in den Zentimeterbereich. Die Mikrofluidik basiert im Wesentlichen auf den gleichen physikalischen Grundlagen wie die klassische Strömungslehre, doch können auf Grund der Verringerung der Dimensionen physikalische Effekte in den Vordergrund treten, die im Verhalten makroskopischer Fluide oft vernachlässigt werden können (Squires und Quake, 2005).

Das Flussregime der Mikrofluidik kann zum Beispiel als laminare Strömung ohne nennenswerte Turbulenzen beschrieben werden, da die Reibungskräfte die Trägheitskräfte dominieren. Dies lässt sich durch die sehr kleine Reynoldszahl Re ($Re < 100$) in mikrofluidischen Systemen beschreiben (Young und Simmons, 2010). Die dimensionslose Reynoldszahl gibt das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften wieder. Sie ist definiert als der Quotient des Impulstransports durch Konvektion und des Impulstransports durch viskose Reibung:

$$Re = \frac{\rho v d_h}{\eta} \quad (2.7)$$

mit der Dichte ρ [$\frac{kg}{m^3}$], der Strömungsgeschwindigkeit v [$\frac{m}{s}$] und der dynamischen Viskosität η [$\frac{kg}{ms}$] des Fluids. d_h [m] beschreibt den hydraulischen Durchmesser, gegeben durch $d_h = 4A/U$ (mit A : Fläche und U :Umfang). Für einen rechteckigen Flusskanal (mit der Höhe h und der Breite w) und der Beschreibung der Flussgeschwindigkeit v in Form eines Volumenstroms Q pro Fläche A , kann die Reynoldszahl wie folgt dargestellt werden (Formel 2.8):

$$Re = \frac{\rho Q 2wh}{\eta wh (w + h)} = \frac{2Q\rho}{\eta (w + h)} \quad (2.8)$$

Aufgrund der laminaren Strömungen innerhalb des Flusskanals erfolgt das Mischen zweier Flüssigkeiten fast ausschließlich durch Diffusion, was in manchen Experimenten zu ungewollt langen Mischungszeiten führt. Dies lässt sich durch die im Allgemeinen kleine thermische und diffusive Péclet-Zahl Pe für Wärme- und Stofftransport beschreiben. Die dimensionslose Zahl gibt das Verhältnis von Stofftransport durch Konvektion zum Transport durch Diffusion (mit der Diffusionskonstanten D der Flüssigkeit $\left[\frac{m^2}{s}\right]$) wieder (siehe Formel 2.9):

$$Pe = \frac{vw}{D} \quad (2.9)$$

Aufgrund des großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses spielen Grenzflächenphänomene in der Mikrofluidik eine wichtige Rolle. So tritt z.B. die Dominanz von Kapillarkräften gegenüber der Gravitationskraft auf. Im Gegensatz zur stehenden Kapillare existiert im horizontal gelagerten Kanal keine die Kapillarkraft ausgleichende Gravitationskraft, so dass sich der Kanal ohne externe Kräfte vollständig füllen lässt.

Der Einsatz mikrofluidischer Chips zur Untersuchung des Adhäsionsvermögens von Zellen hat sich als eine gute Methode herausgestellt um einen hohen Durchsatz, eine gute Auflösung und eine gute Reproduzierbarkeit bei Zellexperimenten zu erlangen (Lu et al., 2004; Young et al., 2007; Christophis et al., 2010). Auch wird diese Technik genutzt, um eine Separation bzw. Anreicherung eines bestimmten Zelltyps zu erreichen, was vor allem im Bereich des Tumorscreenings einen großen Nutzen bringt (Wankhede et al., 2006; Kwon et al., 2007). Die kleinen Dimensionen der Kanäle im Mikrometerbereich gewährleisten einen laminaren Fluss auch bei hohen linearen Flussgeschwindigkeiten, welche bei der Generierung von hohen Scherkräften benötigt werden. Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zu anderen kraftbasierten Methoden, weil die applizierte Kraft nicht auf einen bestimmten Größenbereich beschränkt ist. Ein weiterer großer Vorteil der Mikrokanäle ist, dass lediglich ein kleines Probenvolumen benötigt wird. Durch die Parallelisierung, d.h. der Herstellung eines Mikrofluidik-Chips mit mehreren, identischen Kanälen kann ein hoher Durchsatz an unterschiedlichen Versuchsbedingungen innerhalb einer Messung erreicht werden. Die auf die Zellen applizierte hydrodynamische Scherspannung innerhalb des Kanals, welche durch das parabolische Flussprofil verursacht wird, ist an den meisten Stellen des Kanals gleichmäßig, falls das Verhältnis zwischen Kanalbreite und Kanalhöhe groß genug ist (siehe Abbildung 2.14).

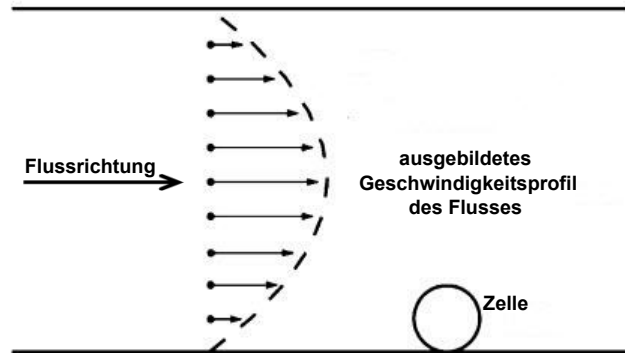


Abbildung 2.14: Geschwindigkeitsprofil eines druckgetriebenen Flusses innerhalb eines Flusskanals. Eine adhärenzte Zelle erfährt in einem vollständig ausgebildeten laminaren Fluss ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil. In der Nähe der Kanalwände sind die Flussgeschwindigkeiten viel geringer als das Mittel über die ganze Kanalbreite. Abbildung modifiziert übernommen von [Wankhede et al. \(2006\)](#).

Die Scherspannung τ entlang der Kanalwände innerhalb der Flusszelle, die durch den Fluss des Mediums erzeugt wird, kann nach dem Poiseuilleschen Modell mit der Gleichung 2.10 beschrieben werden. Die eindimensionale Näherung kann angewendet werden, wenn die Kanalbreite w viel größer als die Kanalhöhe h ist ($w > 10 h$). Die Scherspannung kann beschrieben werden durch den Volumenstrom (=Flussrate) Q und die Viskosität der Flüssigkeit η . Dieses vereinfachte Modell stimmt mit dreidimensionalen, numerischen Berechnungen ([Lu et al., 2004](#)) und Berechnungen, die die Purday Näherung verfolgen ([Young et al., 2007](#)), überein.

$$\tau = \frac{6\eta Q}{h^2 w} \left[\frac{kg}{ms^2} \right] \quad (2.10)$$

Um im laminaren Flussbereich zu arbeiten darf die Reynoldszahl für diese Geometrie (parallele Plattengeometrie der Flusszelle) nicht größer als 2100 werden ([Hao et al., 2006](#)). Die korrelative Beziehung zwischen τ und Re in Formel 2.11 zeigt, dass zur Erlangung von großen Scherspannungen in einem laminaren Flussbereich geringe Kanalhöhen (kleiner $100 \mu m$) eingesetzt werden müssen ([Christ et al., 2010](#)).

$$\tau \sim \frac{Re}{h^2} \quad (2.11)$$

Bei der Konstruktion des Flusskanals muss auch die Länge des Kanals berücksichtigt werden, da der Fluss aufgrund des hohen Drucktrops am Eingang des Kanals eine gewisse Eingangslänge L_e benötigt, bis er im Kanal völlig homogen ausgebreitet ist (siehe Formel 2.12). Die Länge des Kanals sollte somit immer größer als die kritische Eingangslänge L_e sein ([Christ et al., 2010](#)).

$$L_e \cong 0,05 Red_h \quad (2.12)$$

Der hydrodynamische Fluss zur Ausübung von Kräften

Durch das Anlegen eines hydrodynamischen Flusses erfahren die Objekte im Flusskanal verschiedene Kräfte. Damit können beispielsweise die statistischen Lebensdauern von Bindungen

unter Kräfteinfluss gemessen werden. Dabei können die Bindungskräfte einzelner Bindungen untersucht werden, indem man beispielsweise ein Bindungsmolekül auf einer Mikrokugel und den molekularen Partner auf einer Glasscheibe verankert, und diese einer hydrodynamischen Kraft aussetzt (siehe Abbildung 2.15A). Die hydrodynamische Scherkraft F_S wird von einer Kraft F_B , die auf die Bindung wirkt, kompensiert. Sie kann berechnet werden, falls der Abstand l zwischen dem Berührungspunkt der Kugel und den Bindungsmolekülen bekannt ist.

Bei der Beobachtung von Zellen hängt das Ablöseverhalten unter Fluss einerseits von dem Adhäsionsvermögen der Zelle, gegeben durch die Kontaktfläche und deren Adhäsionsflächen, andererseits von der auf die Zelle wirkende Kraft, die durch die Geometrie der Zelle bestimmt wird, ab. Die Kraft um Zellen abzulösen erhöht sich mit steigender Anzahl an gebunden Adhäsionsproteinen (Lotz et al., 1989). Dabei spielen die Stärke einzelner Bindungen, die Rezeptordichte, aber auch die Anordnung der Bindungen, wie schon in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, eine Rolle. Die Adhäsion wird durch den Anteil an FA in der Kontaktzone erhöht und bei Zerstörung der Aktinpolymerisation verringert (Truskey und Pirone, 1990). Auch die Form der Zelle hat maßgeblichen Einfluss darauf welche Kraft auf die Zelle ausgeübt wird. Mit theoretischen Modellierungen zeigten Olivier und Truskey (1993), dass die Scherkraft F_S und das Torsionsmoment T_S für kugelige Zellen am größten ist, während des Spreitens abnimmt und bei einer abgeflachten Zelle, um einen Faktor 2 (für die Scherkraft) bzw. einen Faktor 20 (für das Torsionsmoment) verringert ist.

Bei der Betrachtung einer Zelle im Flusskanal unter einem mechanischen Gleichgewichtszustand ($\sum F=0$) muss die angelegte hydrodynamische Kraft mit F_S und T_S durch tangentielle F_B^x und vertikale F_B^y Bindungskräfte und Abstoßungskräfte F_{Ab} (wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben) ausgeglichen werden (siehe Abbildung 2.15). Die Bindungskraft F_B^y ist dabei die dominierende Kraft, die der hydrodynamischen Kraft gegenüber steht (Gallant und García, 2007).

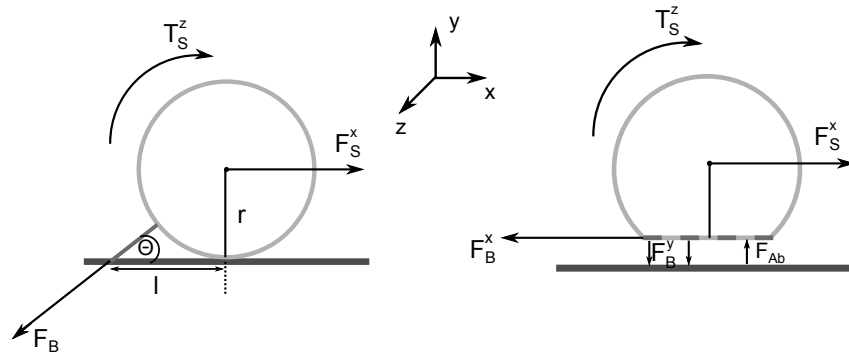


Abbildung 2.15: Hydrodynamische Kräfte zur Ausübung von Kräften auf Objekte im Flusskanal. Durch Anlegung einer hydrodynamischen Kraft, bestehend aus einer Scherkraft F_S und einem Torsionsmoment T_S , kann die Bindungsstärke einzelner Bindungen untersucht werden (A). Dabei wird die Auslenkung bis zum Loslösen einer Mikrokugel, die mit dem Substrat über eine Bindung mit der Oberfläche verbunden ist, beobachtet. In (B) wirken die hydrodynamischen Kräfte auf eine Zelle. Ihnen stehen tangentielle F_B^x und vertikale F_B^y Bindungskräfte, sowie Abstoßungskräfte F_{Ab} gegenüber.

Für die Beschreibung des Ablösevorgangs der Zelle vom Substrat werden zwei verschiedene Modelle beschrieben. Das gleichmäßige Beanspruchungsmodell („uniform stress model“) nimmt an, dass sich die Zellen zu dem Zeitpunkt loslösen, an dem alle Bindungen gleichzeitig brechen (Hammer und Lauffenburger, 1989). Beim Abzieh-Modell („peeling model“) wird angenommen, dass das Loslösen der Zelle an der Zellperipherie initiiert wird und nicht alle Bindungen gleichzeitig brechen, sondern brechende Bindungszonen sich vom Rand der Zelle zum Inneren der

Zelle hin ausbreiten, und so die Zelle vom Substrat abgezogen wird (Evan A. Evans, 1983; Ward und Hammer, 1993). Bei dem Beanspruchungsmodell kommt es zu keiner Beeinflussung der räumlichen Verteilung der Rezeptoren auf die Adhäsionsstärke, da die kritische Scherspannung dem Wert entspricht bei dem die totale Bindungsstärke überschritten wird. Bei dem Abzieh-Modell hingegen, beeinflusst die Lage der Rezeptoren die Stärke der Adhäsion. In dieser Arbeit wird anhand der RIKM- und Mikrofluidik-Experimente ein Modell für das Ablöseverhalten der Zellen erstellt.

2.9 Fraktale Geometrie

Komplexe und dynamische Systeme können mathematisch mit der Chaostheorie beschrieben (Crutchfield et al., 1986) und mit der fraktalen Geometrie visualisiert werden. Das Konzept der fraktalen Geometrie wurde von dem Mathematiker Benoît Mandelbrot im Jahre 1982 geprägt (Mandelbrot, 1982). Fraktale beschreiben selbstähnliche, irreguläre Strukturen, die selbst nach Vergrößerung und Maßstabsänderung identische geometrische Eigenschaften besitzen. Seit den Beschreibungen von Mandelbrot hat das Konzept der fraktalen Strukturen Einzug in die Fragestellungen der Mathematik und in viele Anwendungen der Naturwissenschaften gehalten.

Um komplexe, irreguläre Strukturen beschreiben zu können, reicht die klassische Geometrie mit ihren ganzzahligen Dimensionen nicht aus. In der fraktalen Geometrie kann die Komplexität einer Struktur gemessen und als fraktale Dimension beschrieben werden. Die fraktale Dimension ist ein Index für die raumfüllenden Eigenschaften eines Objekts. Sie weicht von unserer intuitiven Vorstellung von Dimension ab, da sie nicht ganzzahlige Werte annimmt. Falls ein Objekt eine komplett gefüllte Fläche besitzt, wird dieses als zweidimensional beschrieben und eine gerade Linie als eindimensionales Objekt. Werte dazwischen beschreiben die lokale Komplexität oder Irregularität der beiden Objekte. Die fraktale Dimension gibt somit den Grad der Komplexität eines Objektes an oder wie viel Raum dieses Objekt zwischen den euklidischen Dimensionen (1 und 2) einnimmt.

Der in Abbildung 2.16 gezeigte Sierpinski Teppich ist ein Fraktal mit einer FD von $\ln 8 / \ln 3 \approx 1,8928$. Aus einem gefüllten Quadrat wird in der Mitte ein Neuntel der Fläche entfernt. Aus den um das Loch verbliebenen acht quadratischen Feldern wird wiederum je ein Neuntel der Fläche entfernt, und so weiter. Die gängigste Methode zur Berechnung von FD ist die sogenannte Boxcounting-Methode (BCM) (Mandelbrot, 1967, 1982; Buczkowski et al., 1998) (siehe Abschnitt 3.7.4).



Abbildung 2.16: Beispiele für die fraktale Dimension verschiedener Objekte. Ein ungefülltes Rechteck (links) besitzt die FD von 1, während ein gefülltes Rechteck die FD von 2 besitzt (mitte). Sie lassen sich auch mit der euklidischen Geometrie beschreiben. Der Sierpinski Teppich (rechts) hingegen ist ein Fraktal. Seine FD beträgt 1,8928 und liegt somit zwischen den euklidischen Dimensionen.

Fraktale Strukturen in der Biologie

Beispiele für fraktale Strukturen lassen sich überall finden und reichen von der weitreichenden Struktur des Universums bis hin zu Formen von Küstenlinien, Bäumen, Wolken, oder auch Kornstrukturen von vielen Metallen, Keramiken und Mineralien. Auch in der Biologie sind fraktale Strukturen zu finden und stellen dort einen großen Nutzen dar um Oberflächenphänomene zu untersuchen. Fraktale sind in der Biologie bei einer Vielzahl von Strukturen mit unterschiedlichsten Größenordnungen, von Molekülen (Lieberman-Aiden et al., 2009; Bedin et al., 2010) und Zellen (Vilela et al., 1995; West et al., 1999), über Gewebe (Cross, 1997) bis hin zu Organen (Zamir, 2001; Zhang et al., 2006) zu beobachten. Viele Organe und Strukturen des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel die Dendriten von Nervenzellen, der Atemtrakt, oder die Nierenarterien können als fraktale Strukturen angesehen werden. Die fraktale Geometrie kommt in der Kardiologie zur Berechnung der Herzfrequenz, in der Neurologie zur Analyse sich ändernder Muster von Elektroenzephalogrammen (EEG) und in der Radiologie zur Analyse von Knochenheilung, Brustläsionen und Tomografien zur Anwendung. Somit hat sich die fraktale Geometrie auf mehreren Ebenen als geeignetes Mittel zur Untersuchung der Irregularität und Komplexität von Geweben erwiesen: von der Organisation der Zellen auf Organebene bis hin zur Oberfläche der Zellen, der Verteilung von Proteinaggregaten in der Membran, der Organisation des Zellkerns und der Struktur einzelner Proteine.

Es zeigt sich, dass Änderungen in der strukturellen Organisation und der funktionellen Koordination sich in der Form einer höheren morphologischen Komplexität manifestieren. Der Grad dieser Komplexität bzw. Irregularität kann durch die fraktale Dimension FD bestimmt werden. Der Begriff der Irregularität hat somit auch Einzug in die Welt der Medizin bekommen. In der Dermatologie werden bei der morphologischen Beschreibung von bösartigen Melanomen auch die Begriffe der irregulären, asymmetrischen Form und der unklaren Ränder verwendet (Claridge et al., 1992). Aufgrund der weit verbreiteten Hypothese, dass ein gestörtes Gleichgewicht verschiedenster biochemischer Reaktionen mit dem Auftreten von Krebs assoziiert ist, wurde die Fraktalanalyse auch für die Untersuchung von Krebs interessant. Es konnte ein krebsspezifisches fraktales Verhalten gefunden werden (Mashiah et al., 2008; Dokukin et al., 2011; Vasilescu et al., 2012). Dokukin et al. (2011) konnten bei der Untersuchung von humanen Gebärmutterhalszellen mittels Rasterkraftmikroskopie anhand der Oberflächenabbildung („surface adhesion maps“) zeigen,

dass die fraktale Dimension bei den krebsartigen Gebärmutterhalszellen eindeutig höher war als bei gesunden Gebärmutterhalszellen. Studien zur Untersuchung des Epithelium/Stroma Grenzflächengewebes in Abhängigkeit von unterschiedlich stark entwickelten Läsionen zeigten eine positive Korrelation in der Irregularität des Gewebes und der fraktalen Dimension von Werten 1,0 für normales Epithelgewebe bis hin zu 1,62 für invasives Tumorgewebe ([Landini und Rippin, 1996](#)).

Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Zur Identifizierung spezifischer Unterschiede von Tumorzellen gegenüber differenzierten Zellen hat sich in der Vergangenheit die Verwendung von „Zellpaaren“ als erfolgversprechend herausgestellt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zellpaare verwendet:

- Die Geschwisterzelllinien des humanen Pankreasadenokarzinoms PaTu8988T (im Folgenden nur noch PatuT genannt) und PaTu8988S (PatuS)¹ (siehe Abbildung 3.1).
- Die humane, bösartige MCF7 Zelllinie² (Brustadenokarzinom) und die humane, gutartige MCF10A Zelllinie³ (fibrös-zystische Mastopathie) (siehe Abbildung 3.2).

Die hier verwendeten Zelllinien PatuT und PatuS werden aufgrund ihrer Herkunft als Geschwisterzelllinien bezeichnet. Sie wurden aus derselben Metastase eines Pankreastumors isoliert und besitzen somit den gleichen genetischen Hintergrund. Trotzdem zeigen sie teils unterschiedliche morphologische, chromosomale und funktionelle Eigenschaften (Albersdörfer und Sackmann, 1997). Ein Zelllinienpaar aus dem Brustepithel ist die metastasierende MCF7 Zelllinie und die nicht metastasierende MCF10A Zelllinie. Beide Zelllinien sind humanen Ursprungs (unterschiedliche Spender), unterscheiden sich aber dahingehend, dass MCF7 Zellen als Modell für Brustkrebszellen genutzt werden, während MCF10A Zellen als Beispiel für differenzierte („normale“) Brustepithelzellen dienen.

¹Die beiden Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Schnekenburger, Westfälische Wilhelms-Universität Münster zur Verfügung gestellt.

²ATCC-Nr: HTB-22TM; ATCC, Deutschland

³Die MCF10A Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Narz, Qiagen, Hilden zur Verfügung gestellt.

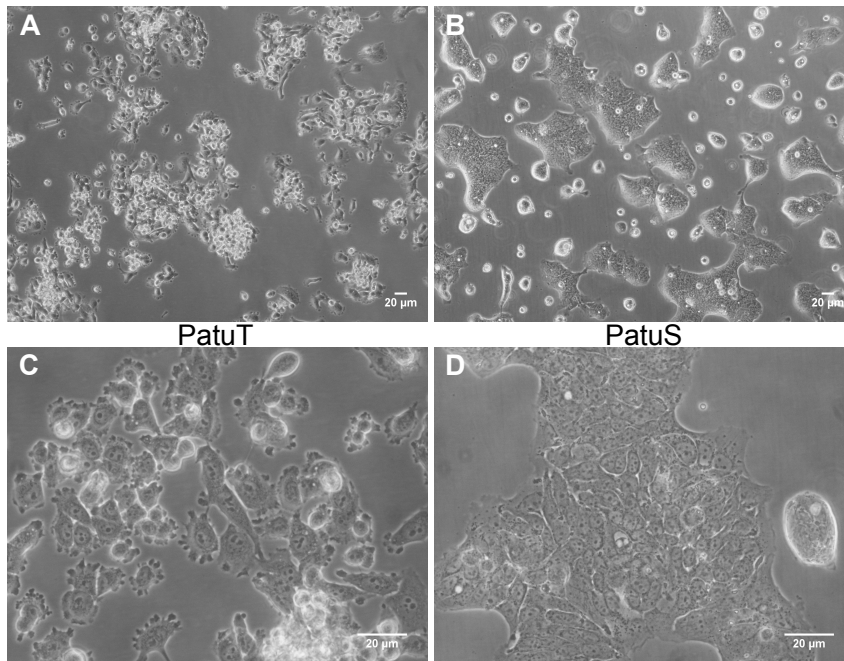


Abbildung 3.1: Hellfeldaufnahmen der PatuT und PatuS Zellen aufgenommen mit einem 10x (A, B) und einem 40x Luftobjektiv (C, D). Maßstab: 20 µm.

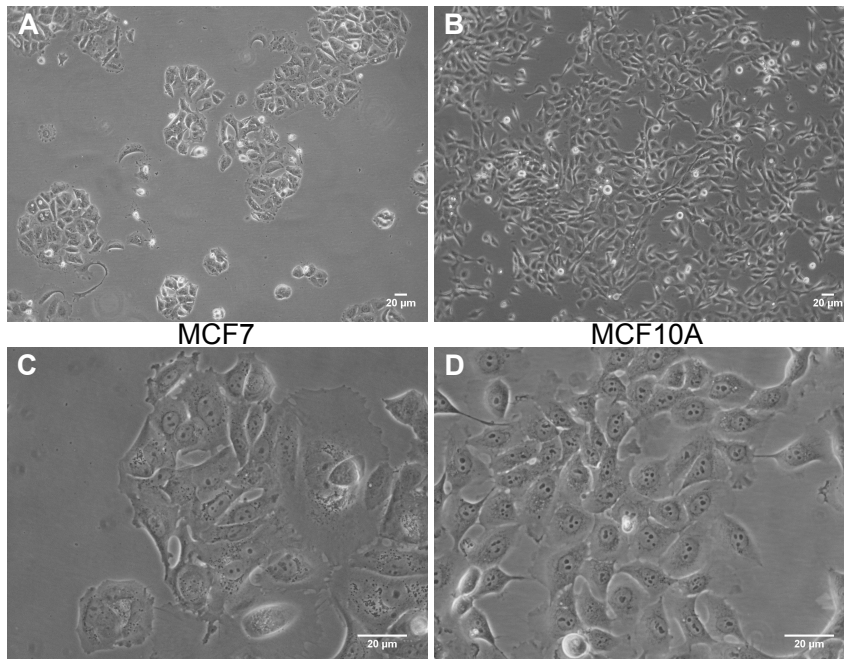


Abbildung 3.2: Hellfeldaufnahmen der MCF7 und MCF10A Zellen aufgenommen mit einem 10x (A, B) und einem 40x Luftobjektiv (C, D). Maßstab: 20 µm.

in denen die Zellen bis zu einer Konfluenz von 100 % gewachsen waren, wurden nicht für Zellexperimente verwendet, da die Zelldichte das Adhäsionsvermögen der Zellen beeinflussen kann (Shiba et al., 1989). Für das Abernten der Zellen wurde das Zellmedium entfernt und der Zellrasen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) (PAA, Österreich) gewaschen, um die Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 2,5 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Deutschland) für zwei Minuten im Inkubator inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden losgelöst hatten, wurde frisches Medium zur Neutralisierung des Trypsins zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension bei 1200 rpm für drei Minuten zentrifugiert (5702R; Eppendorf, Deutschland). Das Zellpellet wurde danach mit Zellmedium resuspendiert und die Zellsuspension konnte für Zellexperimente oder zur Weiterkultivierung in Zellkulturflaschen verwendet werden. Für die Zellexperimente wurde Medium mit 1 % Serum verwendet. Es wurden regelmäßig Mykoplasmentests durchgeführt.

Behandlung der Zellen für die RIKM-Experimente

Für die RIKM müssen die Zellen direkt auf dem Deckglas in Lösung beobachtet werden. Dazu wurden die Deckgläser von unten mittels eines additionsvernetzenden Dubliersilikons (Twinsil; Picodent, Deutschland) auf Petrischalen mit einem Loch aufgeklebt. Die Petrischalen konnten nach Aushärten des Twinsils mit Zellkulturmedium gefüllt werden. Für die Experimente wurden $75 \cdot 10^3$ Zellen direkt am Mikroskop auf Kollagen beschichtete Deckgläser in 2 ml 1 %igem Medium ausgesät.

Behandlung der Zellen für die Mikrofluidik-Experimente

Für die Mikrofluidik wurden die Zellen noch in der Zellkulturflasche mit einem Lebendzellfarbstoff CellTracker™ (CellTracker Blue CMF₂HC für PatuT Zellen; CellTracker Red CMTPX für PatuS Zellen; Arbeitskonzentration 5 μ M; Molecular Probes, USA) in serumfreien Medium inkubiert. 45 min nach Inkubation wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen trypsiniert. Je $5 \cdot 10^5$ Zellen der beiden unterschiedlich gefärbten Zelllinien wurden in 1 ml 1 %igem Medium gemischt und für die Beladung der Flusszelle in eine Spritze aufgezogen.

3.1.2 Fixierung und immunozytochemische Färbung der Zellen

Für die Fixierung der Zellen wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen dreimal mit warmem PBS abgespült. Die Zellen wurden anschließend mit 3,7 %igem Paraformaldehyd (PFA) (Honeywell Riedel de Haen, Deutschland) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert, indem die Proteine der Zelle reversibel vernetzt werden. Danach wurden die Zellen 10 min bei RT mit 0,1 % Triton X-100 (Triton™X-100 für die Molekularbiologie; Sigma-Aldrich, Deutschland) in PBS permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Proben zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 60 min bei RT mit 1 %igem bovinen Serumalbumin (BSA; MP Biomedicals LLC, Frankreich) in PBS inkubiert.

Zur immunozytochemischen Färbung wurde der spezifische Primärantikörper (anti-Paxillin mouse IgG, monoklonal; BD Biosciences, Deutschland) 1:500 in PBS mit 0,1 % BSA verdünnt und für 1 h bei RT auf die fixierten Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Cy3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG; Jackson

ImmunoResearch Europe Ltd, UK), 1:400 verdünnt in PBS, 45 min inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Zur Untersuchung der fixierten und gefärbten Zellen wurde die Proben wie bei den RIKM-Experimenten von unten in Petrischalen mit Loch geklebt und die Petrischale mit PBS gefüllt. Ab der Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Proben vor Licht geschützt, um ein Bleichen der Fluorophore zu verhindern.

Kryokonservierung

Zum Einfrieren der Zellen wurden die folgenden Einfriermedien verwendet:

- PatuT und PatuS: 70 % Kulturmedium 20 % FBS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, für die Spektroskopie; Merck, Deutschland)
- MCF7: 70 % Kulturmedium 20 % FBS und 10 % DMSO
- MCF10A: 95 % Kulturmedium mit Zusätzen und 5 % DMSO

Die Zellen wurden schrittweise abgekühlt und im -80°C Kühlschranks oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2 Oberflächenpräparation

3.2.1 Reinigung von Glasoberflächen

Zur Reinigung der Deckgläser (20x20 mm; Carl Roth, Deutschland) wurden diese in einem Teflonhalter fixiert und 30 min in frisch hergestellte Carosche Säure (Peroxomonoschwefelsäure), bestehend aus einer 1:3 Mischung aus 95 %iger Schwefelsäure (H_2SO_4 , p. a.; Sigma-Aldrich, Deutschland) und 30 %igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , p. a.; AppliChem, Deutschland) eingetaucht. Nach gründlichem Spülen mit MilliQTM-Wasser (Widerstand $> 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) und mehrfacher Behandlung im Ultraschallbad (3 x 5 min; mit jeweiligem Austausch des MilliQ Wassers) wurden die Deckgläser im Stickstoffstrom getrocknet und sofort weiterverwendet.

3.2.2 Homogene Funktionalisierung von Glasoberflächen

Zur Beschichtung der Glasoberflächen wurden je 70 μl der Proteinlösungen (siehe unten) auf ein Stück Parafilm getropft und das gereinigte Deckglas kopfüber darauf gelegt. Nach der Inkubationszeit von 30 min wurde das Deckglas gründlich gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und von unten an Petrischalen mit Loch geklebt. Die Deckgläser wurden mit einer der drei Proteinlösungen beschichtet:

- Kollagen (Typ I, Rattenschwanz, Harbor Bio-Products, USA), Konzentration: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, in 0,02 N Essigsäure
- Fibronectin (Plasmafibronectin, human, 0,1 %ig; Sigma, Deutschland), Konzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS
- Laminin (von humanen Fibroblasten; Sigma, Deutschland), Konzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS

3.2.3 Homogene Funktionalisierung von Goldoberflächen

Für die Anbindung von thiolierten Peptidsequenzen wurden goldbeschichtete Glasoberflächen verwendet. Dazu mussten die gereinigten Deckgläser mit einer ca. 5 nm dicken Titanschicht (120 mA, $1,3 \cdot 10^{-2}$ mbar, 30 s) sowie einer 10 nm dicken Goldschicht (60 mA, $5 \cdot 10^{-2}$ mbar, 10 s) beschichtet werden. Hierzu wurde der Sputter Coater (MED 020 Coating System Sputter; Bal-Tec, Liechtenstein) verwendet. Die goldbeschichteten Deckgläser konnten dann mit einer $25 \mu\text{M}$ Peptidlösung für 4 h inkubiert werden. Nach der Inkubation wurden die Oberflächen über Nacht in MilliQ Wasser gewaschen, bevor sie nach zusätzlichem Waschen mit MilliQ und sterilem PBS für die Zellexperimente verwendet wurden.

3.3 Herstellung von nanostrukturierten Oberflächen

Zur Herstellung der nanostrukturierten Oberflächen wurde die Mizellare-Blockcopolymer-Nanolithografie (BCML) genutzt (Glass et al., 2003). Dabei werden amphiphile Diblockcopolymerere verwendet, die sich aus einem unpolaren Polystyrol- (PS) und einem polaren Poly(2-vinylpyridin)-Block (P2VP) zusammensetzen. Aufgrund ihrer Polarität bilden Diblockcopolymerere in unpolaren Lösungsmitteln unter geeigneten Bedingungen inverse, sphärische Mizellen aus (Gao und Eisenberg, 1993). Die Mizellenformierung ist ein Enthalpie getriebener Prozess, wobei sich die unpolaren Blöcke nach außen orientieren und den polaren Kern abschirmen, sodass die thermodynamisch ungünstigen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel minimiert werden (Gao und Eisenberg, 1993; Riess, 2003). Bei der Beobachtung des Lösungsvorgangs der Diblockcopolymerere zeigt sich, dass sie unterhalb einer kritischen Mizellkonzentration (cmc, critical micelle concentration) zunächst in ihrer monomeren Form vorliegen und erst ab dieser cmc zu inversen Mizellen assoziieren, wobei deren Polymerketten bei steigender Konzentration im dynamischen Gleichgewicht mit den freien Ketten in Lösung stehen (siehe Abbildung 3.4).

Die Bipolarität der hier verwendeten PS-*b*-P2VP-Mizellen ermöglicht deren Funktion als Nanoreaktoren. Dabei wird eine Beladung mit anorganischen Metallsalzen ermöglicht, welche durch eine Säure-Base-Reaktion zwischen dem entsprechenden Salz und dem basischen P2VP-Kern der Mizelle erfolgt, was zu einer gleichzeitigen Stabilisierung der Mizellen führt (Spatz et al., 1996, 1999; Kästle et al., 2003).

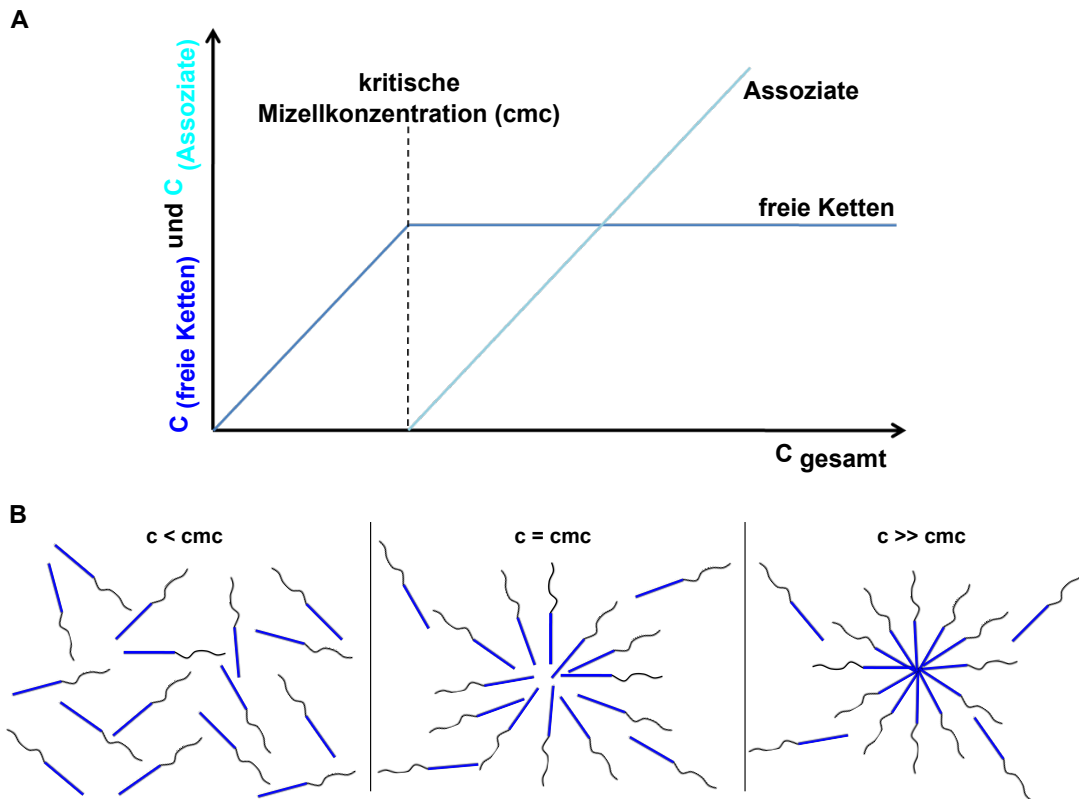


Abbildung 3.4: Verhalten mizellerer Lösungen in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration (A) und Assoziationsprozess freier Blockcopolymerketten (B). Abbildung basierend auf Gao und Eisenberg (1993).

3.3.1 Herstellung der mizellaren Goldlösung

Das Polymer PS-*b*-P2VP wurde in ein, mit Caroscher Säure gereinigtes, Glasgefäß eingewogen und für 24 h bei RT mit der entsprechenden Menge Toluol (p. a.; Merck, Deutschland) gerührt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Polymer PS(110000)-*b*-P2VP(52000) (Polymer Source, Kanada) verwendet, welches 1056 PS-Einheiten und 495 PVP-Einheiten besitzt. Anschließend wurde als Metallsalz die Tetrachlorgoldsäure HAuCl_4 (Gold(III)chloride trihydrate, 393,83 g/mol; Sigma Aldrich, Deutschland) zur Lösung zugegeben und unter Lichtausschluss bis zur vollständigen Lösung der Goldsäure (ca. 24 h) gerührt. Die Einwaage von HAuCl_4 wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der P2VP-Einheiten und der Beladung L (Verhältnis von AuCl_4^- zu P2VP-Einheiten) nach folgender Formel berechnet:

$$m(\text{Metallsalz}) = \frac{m(\text{Polymer}) \cdot M(\text{Metallsalz}) \cdot \text{Anzahl}(\text{PVP}_{\text{Einheiten}}) \cdot L}{M(\text{Polymer})} \quad (3.1)$$

In dieser Arbeit wurden Lösungen mit einem Ladungsparameter von 0,3 oder 0,5 verwendet. Um Polymeraggregate sowie nicht vollständig gelöstes Metallsalz zu entfernen, wurden die Lösungen vor der ersten Verwendung durch einen PTFE-Filter mit einer Porengröße von $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Deutschland) gefiltert. Die Lösungen wurden unter Lichtausschluss gelagert.

3.3.2 Tauchbeschichtungsprozess und Plasmabehandlung

Zur Beschichtung der gereinigten Deckgläser wurde das Tauchbeschichtungsverfahren („dip-coating“) verwendet. Hierbei wurden die Substrate senkrecht in die Mizellare Goldlösung getaucht und mit einer speziell angefertigten Apparatur unter einer konstanten Geschwindigkeit wieder herausgezogen. Die Mizellen in der Lösung ordnen sich aufgrund der durch Verdunstung des Lösungsmittels wirkenden Kapillarkräfte somit gleichmäßig in einer geordneten Monolage auf dem Substrat quasi-hexagonal an (Dimitrov und Nagayama, 1996; Denkov et al., 1992). Die Beschichtung der Oberflächen wurde bei RT durchgeführt. Nach dem vollständigen Verdampfen des Lösungsmittels wurden die gedippten Deckgläser 45 min lang einem Mikrowellen induzierten Wasserstoffplasma (600 W; $p(\text{H}_2) = 0,3$ mbar) (PS 210 Microwave Plasma System; TePla, Deutschland) ausgesetzt. Durch die Behandlung des monomizellaren, geordneten Films auf der Substratoberfläche mit einem reaktiven Plasma werden strukturierte Goldpartikel im Nanometerbereich generiert. Dabei werden durch den Plasmaprozess die organischen Mizellreste entfernt, sowie die Tetrachloroaurationen zu elementarem Gold reduziert, ohne die Position der Partikel auf der Substratoberfläche zu beeinflussen (Spatz et al., 2000). Die Größe der Goldnanopartikel kann mithilfe der zugegebenen Menge an Goldsäure von 1-15 nm eingestellt werden. Der Abstand der Goldnanopartikel kann durch das Molekulargewicht der Blockcopolymeren, die Konzentration der Lösung und der Retraktionsgeschwindigkeit des „Dip coatings“ im Bereich von 25-250 nm variiert werden (Glass et al., 2004; Girard et al., 2007).

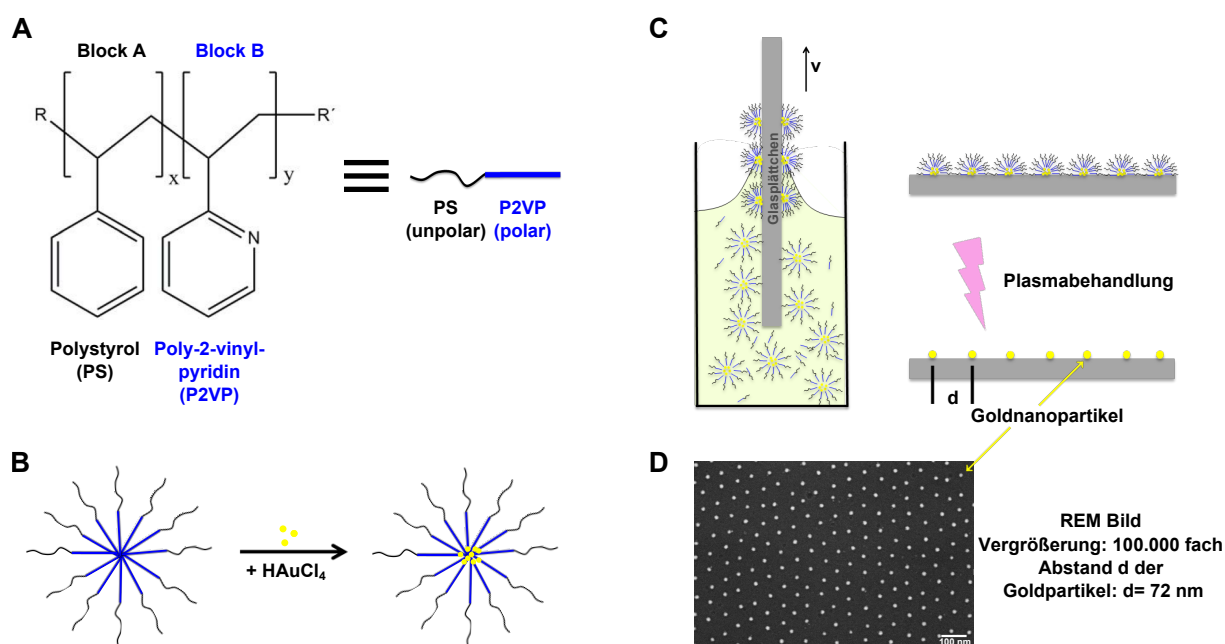


Abbildung 3.5: Schematische Übersicht zur Strukturbildung der Goldnanopartikel auf Substratoberflächen. (A) zeigt die chemische Zusammensetzung des amphiphilen Diblockcopolymeren Polystyrol-*b*-Poly(2-vinylpyridin) (PS-*b*-P2VP). In (B) ist die Beladung des Mizellenkerns mit Goldsäure $\text{H[AuCl}_4\text{]}$ aufgezeigt. Die Goldsäure diffundiert in den Kern der Mizelle. (C) zeigt den Tauchbeschichtungsprozess zur Abscheidung des Mizellenfilms auf der Substratoberfläche. Durch eine anschließende Plasmabehandlung werden die organischen Polymerreste entfernt und die Goldsäure zu elementarem Gold reduziert. Die Oberflächen können nachfolgend im Rasterelektronenmikroskop charakterisiert werden (D).

Aus jeder hergestellten Charge der nanostrukturierten Oberflächen wurde mindestens eine Pro-

be im Rasterelektronenmikroskop charakterisiert (siehe nächster Abschnitt 3.3.3). Mikroskopisch lassen sich die Goldnanopartikel indirekt beobachten. Abbildung 3.6 zeigt die Aufnahme einer nanostrukturierten Oberfläche im Bereich der Dippkante mittels Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie. Aufgrund der nanoskaligen Anordnung der Goldpunkte auf der Glasoberfläche verändert sich deren Brechungseigenschaft. Die Goldpunkte streuen das Licht, wodurch der Kontrast der Bilder verschlechtert wird. Der nanostrukturierte Bereich der Oberfläche erscheint im RIKM-Modus viel dunkler als der unstrukturierte Bereich. Die Streuung des Lichtes ist wellenlängenabhängig. Bei der Beobachtung der nanostrukturierten Oberflächen mittels 2λ -RIKM ist der nanostrukturierte Bereich bei der grünen Wellenlänge $\lambda_2 = 546$ nm viel dunkler als bei der Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm (Daten nicht gezeigt), was darauf zurückzuführen ist, dass Goldnanopartikel hauptsächlich grünes Licht streuen (Stoller et al., 2004).

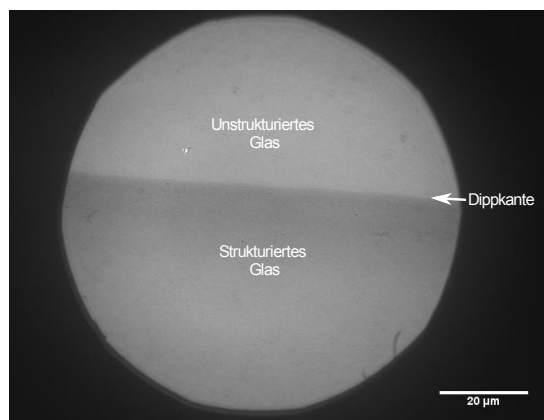


Abbildung 3.6: RIKM-Bild eines gedippten Deckglases. Der ungedippte Teil des Deckglases besitzt keine Nanostrukturierung. Die Dippkante beschreibt den Übergang zum nanostrukturierten Teil des Deckglases. Der Kontrastunterschied ist auf die Nanostrukturierung zurückzuführen. Aufnahmen mit einer Wellenlänge von $\lambda = 593$ nm.

Alle nanostrukturierten Oberflächen wurden nach der Plasmabehandlung noch drei Tage lang in einem Ofen von 300 °C getempert bevor sie für Zellexperimente genutzt wurden. Durch das Tempern der Oberflächen konnte die Stabilität der Goldpunkte auf dem Glas verbessert werden.

3.3.3 Charakterisierung der nanostrukturierten Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (REM) (Leo1530; Zeiss, Deutschland) durchgeführt, bei dem der Elektronenstrahl mittels einer Feldemissionskathode (Schottky Emitter) erzeugt wird. Typische Beschleunigungsspannungen lagen bei 3-5 kV und der Druck unterhalb $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Zur Untersuchung der nanostrukturierten Glasoberflächen mussten diese leitfähig gemacht werden. Dazu wurde mit einem Sputter Coater (MED 020 Coating System Sputter; Bal-Tec, Liechtenstein) eine ca. 5 nm dicke Grafitschicht auf die nanostrukturierten Oberflächen aufgebracht. Die REM-Bilder der nanostrukturierten Oberflächen wurden dazu genutzt, die Qualität und die Ordnung der erzeugten quasi-hexagonalen Goldnanostrukturen, sowie die Abstände der Goldnanopartikel zu bestimmen (zur Bildanalyse siehe Abschnitt 3.7.5).

Prinzip REM

Basierend auf der Abraasterung einer Probenfläche durch einen fein gebündelten Elektronenstrahl ermöglicht die Rasterelektronenmikroskopie die Abbildung der Probenoberfläche mit einer Auflösung im Nanometerbereich, indem die Wechselwirkungsprozesse zwischen den Elektronen und der Probenoberfläche detektiert werden.

Die Hauptkomponenten eines REMs sind das elektronenstrahlerzeugende System, bestehend aus einer Kathode, einem Wehneltzylinder und einer Anode, das Linsensystem, die Detektoren zur Registrierung der durch Elektronenbeschuss erzeugten Sekundärsignale, die Signalverstärkereinheit und zu guter Letzt die Abbildungseinheit. Der Elektronenstrahl wird durch eine Kathode erzeugt und im Vakuum durch ein elektrisches Feld von bis zu 30 kV zur Anode hin beschleunigt und mithilfe des Wehneltzylinders und dem Linsensystem als schmalbandiger Primärstrahl auf das Substrat fokussiert. Durch einen Rastergenerator und Ablenkspulen erfolgt eine zeilenweise Abtastung der Probenoberfläche mit dem Primärelektronenstrahl und synchron hierzu wird auch der Leuchtschirm einer Bildröhre mit einem Elektronenstrahl (Schreibstrahl) abgetastet.

Auf der Probe entstehen durch die inelastischen und elastischen Wechselwirkungen der hochenergetischen Primärelektronen mit der Probenmaterie verschiedene Sekundärsignale, die von spezifischen Detektoren erfasst und zur synthetischen Abbildung der Probe genutzt werden. Eine Probenstelle, an der z.B. viele Sekundärelektronen erzeugt werden, erscheint auf dem Bild heller als Stellen mit geringerer Elektronenemission. Primärelektronen, die durch elastische Stöße mit den positiven Atomkernen in der Probe zwar abgelenkt werden aber dabei kaum Energie verlieren, können durch Einfach- oder Mehrfachstreuung die Probe wieder verlassen und werden als Rückstreuelektronen bezeichnet. Diese Rückstreuelektronen werden mittels eines über der Probe positionierten InLens-Detektor erfasst. Durch die Detektion dieser Elektronen kann der Materialkontrast der Probe gut sichtbar gemacht, wobei Rückstreuelektronen, die von Atomen mit großer Ordnungszahl zurückgestreut werden, heller erscheinen. Bei der unelastischen Streuung infolge der Wechselwirkung von den Primärelektronen mit Hüllenelektronen, werden Sekundärelektronen (SE) mit Energien kleiner 50 eV erzeugt. Die Sekundärelektronen werden nochmals in SE1-Elektronen, welche die Probe wieder innerhalb der Einstrahlzone verlassen, und den SE2-Elektronen aufgeteilt. Die SE2-Elektronen werden mehrfach gestreut und verlassen die Probe in einem gewissen Abstand zur Einstrahlzone und werden dann durch einen Sekundärelektronendetektor, der oft seitlich über der Probe positioniert ist, detektiert. Durch diese seitliche Anordnung des Detektors wird ein hoher räumlicher Kontrast und eine topografische Abbildung erzielt. Informationen über den Materialkontrast sind hierbei geringer, da die Anzahl an Sekundärelektronen nahezu unabhängig von der Ordnungszahl des Materials ist (Egerton, 2005; Schmidt, 2010).

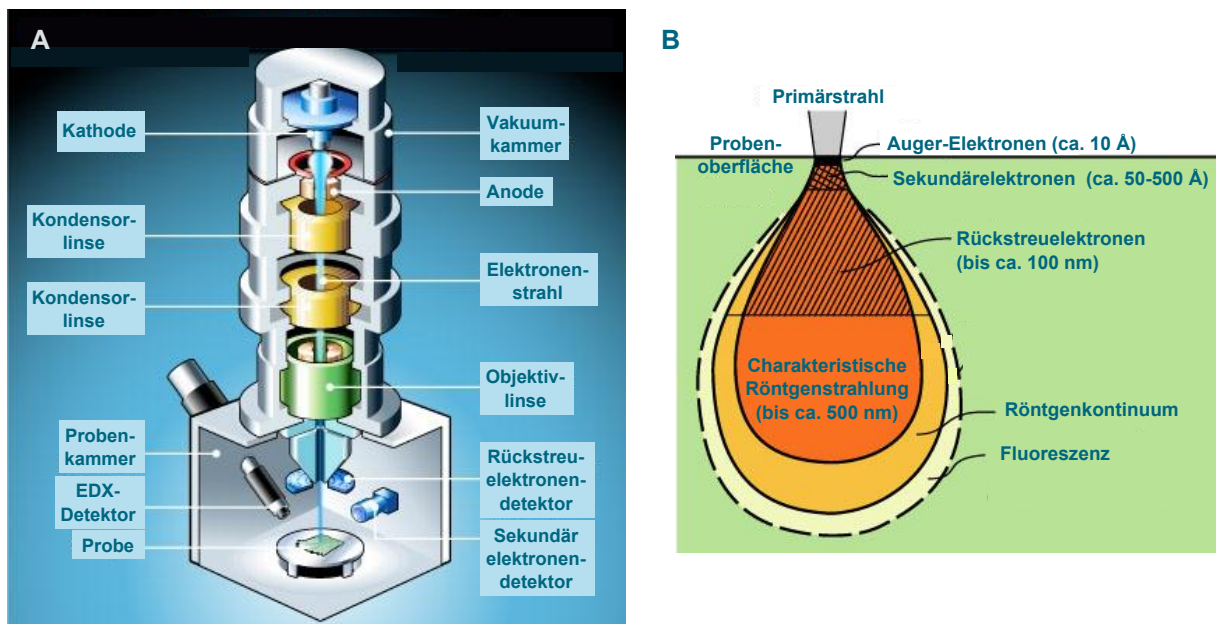


Abbildung 3.7: Rasterelektronenmikroskopie. (A) zeigt schematisch den Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. In (B) sind schematisch die Wechselwirkungen des Primärelektronenstrahls mit der Probenoberfläche gezeigt. Abbildung A modifiziert übernommen von (Howstuffworks, 2012), Abbildung B von (Uni-Stuttgart, 2012).

3.3.4 Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen

Zur Verhinderung unspezifischer Adsorption von Proteinen oder Zellen auf den freien Glasflächen zwischen den Goldnanopartikeln müssen diese Flächen mit einer dünnen, proteinabweisenden Polymerschicht versehen werden. Diese Vermeidung der Adsorption von Proteinen, welche im folgenden als Passivierung bezeichnet wird, spielt auch in den Bereichen der Medizin, Bioanalytik und Nanotechnologie eine große Bedeutung, wobei standardmäßig Monolagen sterisch anspruchsvoller Polyether, sogenannte Polyethylenglykole (PEG) verwendet werden (Zalipsky und Harris, 1997). Die passivierende Wirkung der PEG-Schichten beruht auf verschiedenen Theorien, wie z.B. dem Modell der sterischen Repulsion, bei dem die schnellen Bewegungen der langen PEG-Polymere in Wasser die sich nähernden Proteine abstoßen (Karlström und Engkvist, 1997).

Zur Passivierung der nanostrukturierten Glasoberflächen wurde auch PEG verwendet, wobei dieses auf zwei unterschiedliche Methoden an das Glas angebunden wurde (siehe Abbildung 3.8). Einerseits können die PEG-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche adsorbieren, andererseits können sie auch über Ankergruppen kovalent an die Oberfläche angebunden werden. In den nächsten beiden Abschnitten sind die Methoden der elektrostatischen Anbindung eines Poly(L-Lysin)-grafted-Poly(ethylenglykol) Copolymers (PLL-*g*-PEG) und der kovalenten Anbindung eines mPEG-triethoxysilan-2000-urea (PEG2000) beschrieben.

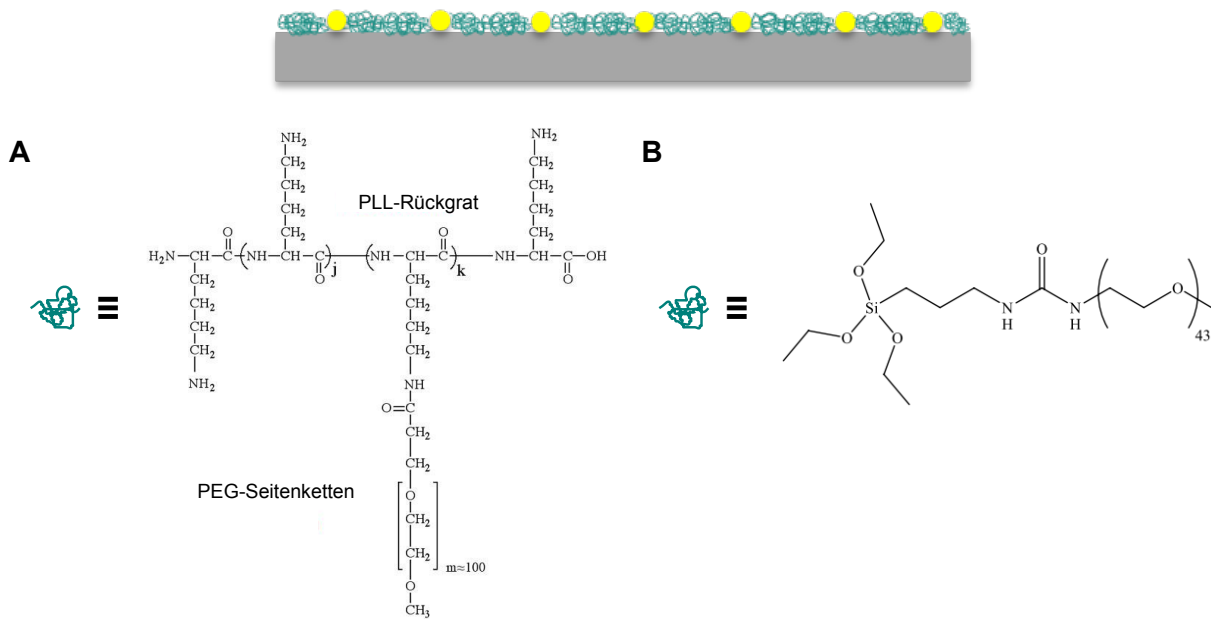


Abbildung 3.8: Schematische Übersicht zur Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen. Die Glasoberfläche zwischen den Goldnanopartikel wird mit einer proteinabweisenden Polyethylenglykol (PEG)-Schicht passiviert. Es gibt zwei Möglichkeiten das PEG an die Glasoberfläche anzubinden. Die elektrostatische Anbindung eines PLL-*g*-PEGs (**A**) oder die kovalente Anbindung eines mPEG-triethoxysilan-2000-urea (**B**).

Elektrostatische Anbindung von PLL-*g*-PEG

Für die elektrostatische Anbindung proteinabweisender Makromoleküle an die negativ geladene Glasoberfläche der nanostrukturierten Oberfläche wurde das polykationische Poly(L-Lysin)-Poly(ethylenglykol)-Copolymer (PLL-*g*-PEG) verwendet (PLL(20kDa)-*g*[3.5]-PEG(2kDa); [3.5]=3.5 Lysine pro PEG Kette; Surface SolutionS, Schweiz). Das PLL-*g*-PEG besteht aus einem PLL-Rückgrat und vielen PEG-Seitenketten, die sich über die positive Ladungen des PLLs über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene Glasoberfläche anbinden, sodass die PEG-Ketten in Richtung der wässrigen Umgebung ragen (Elbert und Hubbell, 1998; Kenausis et al., 2000; VandeVondele et al., 2003). Kenausis et al. (2000) konnten zeigen, dass die Passivierung der negativ geladenen Oberflächen mit dem PLL-*g*-PEG effektiv die Proteinadsorption blockiert.

Die Anbindung an die nanostrukturierten Glasoberflächen erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die Oberflächen in einem Sauerstoffplasma (150 W, $p(\text{O}_2) = 0,4$ mbar) (PS 100-E; TePla, Deutschland) 5 min aktiviert, sodass sich negativ geladene OH^- auf der Oberfläche bildeten. Nach der Aktivierung der Oberflächen wurden diese mit 170 μl PLL-*g*-PEG-Lösung für 30 min inkubiert. Die PLL-*g*-PEG Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml wurde in HEPES-Puffer angesetzt (10 mM HEPES, 6 M NaOH in destilliertem Wasser; der pH: 7,4). Nach der Inkubationszeit wurden die Oberflächen mit MilliQTM-Wasser ab gespült und anschließend in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die passivierten Oberflächen wurden sofort weiterverwendet und für die Zellexperimente biofunktionalisiert (Abschnitt 3.3.5).

Kovalente Anbindung von mPEG-triethoxysilan

Für die kovalente Anbindung proteinabweisender Makromoleküle an die nanostrukturierten Glasoberfläche wurde das mPEG-triethoxysilan-2000-urea⁵ verwendet, was im weiteren nur noch als PEG2000 bezeichnet wird.

Die Anbindung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die nanostrukturierten Oberflächen in einem Wasserstoffplasma (150W, $p(\text{H}_2) = 0,4$ mbar) (PS 100-E; TePla, Deutschland) 10 min aktiviert. Danach wurden die nun hydrophilen Substrate unter Stickstoffatmosphäre in einem gereinigten Glaskolben in einer 0,25 mM Lösung des PEG2000 in trockenem Toluol⁶ in Gegenwart von 2,5 μM Triethylamin (p. a.; Fluka, Schweiz) für 20 h im Ölbad bei 80 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Glaskolben mit den passivierten Plättchen dreimal mit Ethylacetat (p. a.; Merck, Deutschland) gespült und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde jedes Plättchen einzeln aus dem Kolben genommen, noch einmal mit Ethylacetat und einmal mit Methanol (p. a.; Merck, Deutschland) abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Oberflächen wurden sofort für die Biofunktionalisierung weiterverwendet oder für höchstens 24 h unter Argonatmosphäre bei RT gelagert.

3.3.5 Biofunktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen

In diesem Abschnitt wird die Funktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen beschrieben. Dabei wurden größtenteils thiolierte Peptidsequenzen an die Goldnanopartikel angebunden. Durch das selektive Adressieren von bestimmten Rezeptortypen mittels Verwendung verschiedener Peptidsequenzen kann somit eine bessere Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen erreicht werden. Neben der Anbindung von thiolierten Peptidsequenzen wurde auch ein Peptidfragment über eine Thiolierungsreaktion an die nanostrukturierten Oberflächen gebunden. Ein Vorteil der Biofunktionalisierung der Goldnanopartikel ist, dass durch ihren kleinen Durchmesser von ca. 8 ± 1 nm verhindert wird, dass mehr als ein Integrin pro Goldnanopartikel binden kann, da der Durchmesser eines Integrins in der Zellmembran zwischen 8-12 nm beträgt ([Erb et al., 1997](#); [Xiong et al., 2001, 2002](#)). Somit gibt der Abstand der Goldnanopartikel die mögliche Entfernung zwischen benachbarten Integrinen vor.

⁵In einer einstufigen Reaktion aus 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan und ω -Aminopolyethylenglykolmonomethylether hergestellt von Dr. Theresa Pohl und Dr. Nicole Plath.

⁶Getrocknet über ein 3 Å Molekularsieb (Carl Roth, Deutschland).

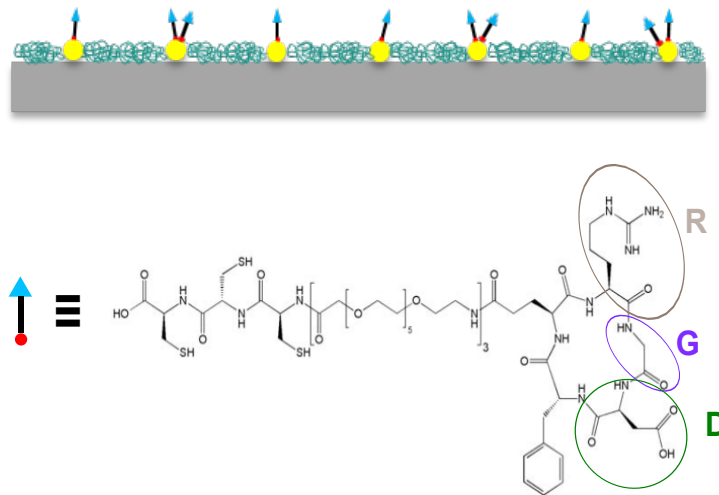


Abbildung 3.9: Schematische Übersicht zur Biofunktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen. An die Goldnanopartikel auf der passivierten Glasoberfläche können mittels Thiolchemie verschiedene Liganden angebunden werden. Hier ist die Anbindung des zyklischen RGDs gezeigt.

Funktionalisierung mit verschiedenen Peptidsequenzen

Es wurden verschiedene Peptidsequenzen aus dem Fibronectin an die Goldnanopartikel angebunden. Alle Peptidsequenzen wurden kovalent über eine Thiolreaktion an die Goldnanopartikel angebunden. Dabei sind Verbindungsmoleküle (Linker) nötig, um die Anordnung der Peptidsequenzen in räumlichen Mikrodomänen für eine gute Zelladhäsion zu ermöglichen (Hersel und Kessler, 2003). RGD-Bindungsseiten können von allen Peptiden erreicht werden, die ca. 11-32 Å aus der Oberfläche hervorstehen, wohingegen Abstände von ca. 46 Å benötigt werden, um nahezu alle Rezeptoren erreichen zu können (Beer et al., 1992). In dieser Arbeit wurden ein zyklisches RGD mit einem Linker der Länge 25 Å (cRGD-T1) und eines mit einem Linker der Länge 75 Å (cRGD-T3)⁷ verwendet.

Zyklisches RGD

Für die Adressierung der Zellbindungsdomäne des Fibronectins wurde das zyklische Pentapeptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Phenylalanin-Lysin (c-Arg-Gly-Asp-(Phe)Ala-Lys) verwendet, welches als c(RGDfK) oder kurz als cRGD bezeichnet wird. Es enthält die zelladhäsionsfördernde RGD-Sequenz, welche von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen mit hoher Affinität erkannt wird (Pfaff et al., 1994; Haubner und Kessler, 1997). Das cRGD wird über den Linker (Aminohexansäuremercaptopropionsäure) mittels einer Thiolbindung an die Goldnanopartikel angebunden. Zur Funktionalisierung der Goldnanopartikel wurden die nanostrukturierten Oberflächen 4 h in einer 25 μM cRGD-Lösung (50 μl) inkubiert. Um nicht kovalent angebundene cRGD-Moleküle zu entfernen, wurden die Oberflächen nach der Inkubation über Nacht in MilliQTM-Wasser gewaschen, bevor sie nach zusätzlichem Waschen mit MilliQ und sterilem PBS für die Zellexperimente verwendet wurden.

Lineares RGD

Als weiteres Motiv des Fibronectins, das die zelladhäsionsfördernde RGD-Sequenz erhält, wurde das Oligopeptid GRGD(PEG5)-3SPC (Peptide Specialty Laboratories, Deutschland) verwen-

⁷Die beiden cRGDs wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Kessler, TU München, zur Verfügung gestellt.

det. Es ist ein lineares Peptid mit den Aminosäuren Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure, die über einen dreifachen PEG-Linker (3x PEG₅-Linker, Novabiochem, Länge 3 x 2,2 nm; Merck, Deutschland) mit den Aminosäuren Serin-Prolin-Cystein verbunden sind, wobei das Cystein für die Immobilisierung des Peptids über Thiolbindung mit dem Goldnanopartikel genutzt wird. Im Folgenden wird dieses Oligopeptid als lineares RGD (IRGD) bezeichnet. Die Funktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen mit dem IRGD erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für das cRGD. Die Präsentation eines GRGDSP beeinflusst die Spezifität des Integrinrezeptors. Ergebnisse von [Ochsenhirt et al. \(2006\)](#) haben gezeigt, dass Integrine, die eine β_1 -Untereinheit besitzen, in höherem Maße die Adhäsion zu einem linearen RGD vermitteln als es $\alpha_v\beta_3$ -Integrine tun, die bevorzugt an ein cRGD binden.

PHSRN

Auch die synergistische Stelle des Fibronektins wurde als Peptidsequenz PHSRN, mit den Aminosäuren Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin für die Anbindung an die Goldnanopartikel genutzt. Das Oligopeptid besitzt den gleichen Linker wie das IRGD und wurde nach der gleichen Vorgehensweise angebunden. Durch die Präsentation des Peptids PHSRN in Kombination mit dem Peptid RGD kann die Adhäsion über $\alpha_5\beta_1$ -Integrine gesteigert werden ([Aota und Yamada, 1994](#)).

Funktionalisierung mit einem Peptidfragment

Ein Fibronektinfragment FNIII₉₋₁₀⁸, welches die aktive Zellbindungsdomäne RGD und die synergistische Domäne PHSRN enthält ([Staunton et al., 2009](#)), wurde zur Funktionalisierung der nanostrukturierten Oberflächen verwendet. Da dieses Fragment nicht thioliert ist, d.h. keine SH-Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Goldpunkte besitzt, muss dieses noch über ein 2-Iminothiolan (Traut's Reagenz, 2-Iminothiolane*HCl, Thermo Scientific) thioliert werden. Das Traut's Reagenz reagiert mit primären Aminen, beispielsweise mit dem N-Terminus eines Peptids oder innerhalb eines Peptids mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin, unter Ringöffnung und Bildung eines Thiols. Beim Einbau der Sulfhydrylgruppen wird die Ladungseigenschaft der Aminogruppe nicht verändert (siehe Abbildung 3.10). Die Reaktion wird bei RT in gepufferter wässriger Lösung bei pH: 7-10 durchgeführt.

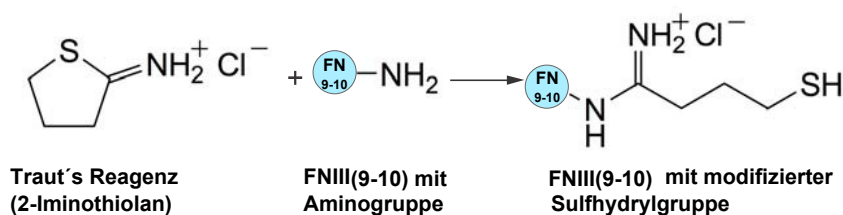


Abbildung 3.10: Reaktionsschema des Traut's Reagenz mit dem Fibronektinfragment FNIII₉₋₁₀.

Abbildung 3.11 zeigt die 3D-Struktur des Fibronektins FNIII₉₋₁₀. Das Fragment besitzt drei freie Lysine (K) an die das Traut's Reagenz binden kann.

⁸Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von David Staunton, Abteilung Biochemie, Universität Oxford.

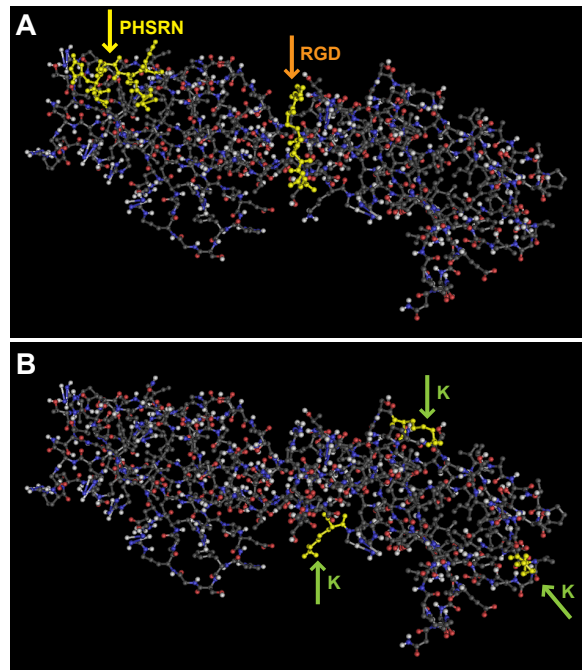


Abbildung 3.11: Dreidimensionale Struktur des Fibronektinfragments FNIII₉₋₁₀. In (A) sind die Zellbindungsdomäne RGD (oranger Pfeil) und die synergistische Domäne PHSRN (gelber Pfeil) des Fibronektins farbig markiert. Die grünen Pfeile in (B) weisen auf die drei freien Lysine (gekennzeichnet mit K), die für die Traut's Reaktion zugänglich sind. Die Struktur wurde mit dem Programm Cn3D (Version 4.3, www.ncbi.nlm.nih.gov) dargestellt. Quelle der Strukturinformation: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=suid=56162>.

Zur Komplexierung zweiwertiger Metallionen wurden 5 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, für die Molekularbiologie; Sigma Aldrich, Deutschland) zu 1 mg/ml FNIII₉₋₁₀ gegeben. Damit kann die Oxidation der -SH Gruppen verhindert werden. Das Traut's Reagenz wurde in PBS gelöst und in einem ca. 10 fach molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die nanostrukturierten Oberflächen wurden danach mit dieser Lösung für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Oberflächen unter sterilen Bedingungen mit PBS abgespült.

3.4 Herstellung von Bead-Lösungen

Die Stocklösungen der Polystyrolkugeln (=Beads) (Durchmesser 25 μ m bzw. 5-100 μ m; Polysciences, USA) wurden vor der Verdünnung in Wasser (1:200) „gevortext“, um die Agglomeration der Beads aufzulösen. Zur Reinigung der Bead-Lösung und der Eliminierung von Schwebstoffen wurde die verdünnte Bead-Lösung abzentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei die Menge an abgenommen Überstand in Form von frischem Wasser wieder zugegeben wurde.

3.5 Herstellung von Flusszellen

Die Flusszellen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) (Sylgard 184; Dow Corning, USA) wurden mit standardisierter Softlithografie hergestellt (Duffy et al., 1998; Xia und Whitesides, 1998). PDMS ist ein Polymer auf Siliziumbasis, ein Silikon, welches farblos, optisch transparent, ungiftig und chemisch inert ist. Weitere Vorteile von PDMS für die Mikrofluidik sind die Gaspermeabilität, was vor allem in Hinblick auf Versuche mit lebenden Zellen sehr wichtig ist (Squires und Quake, 2005), sowie die Regulierung der Elastizität des Kanals. Die Mastermaske, welche sich auf einem Deckglas befindet, und als Vorlage für den Abguss der Flusszelle dient, wurde von Timo Maier zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Flusszelle mit einem Kanal der Ausmaße (25 mm x 3 mm x 40 μm) gewählt. Das verwendete Silikon wurde als zwei Komponenten geliefert, dem Siloxan sowie einem Vernetzungsreagenz Hydrosilan, die im Verhältnis 10:1 gemischt wurden. Die fertige Mischung wurde im Exsikkator entgast bevor sie auf das Deckglas mit der Mastermaske aufgebracht wurde. Auch nach dem Aufbringen auf die Maske wurde das ganze noch einmal im Exsikkator für ca. 15 min entgast, um alle Luftblasen, die die Strukturbildung behindern könnten, zu entfernen. Der Abguss musste anschließend für mindestens 4 h bei 65 °C getrocknet werden, um die vollständige Vernetzung des Elastomers und somit die Aushärtung, zu gewährleisten.

Danach konnte der PDMS-Block mit der Struktur von der Maske abgelöst und zurecht geschnitten werden. Um die Zu- und Ableitung von Flüssigkeiten zu ermöglichen wurden in den 3-4 mm dicken PDMS-Block entsprechend der Kanalform mit einem Kernbohrer (Harris Uni-Core, 2,00 mm; Sigma-Aldrich, Deutschland) drei Löcher gestanzt. Dies ermöglichte die Einführung von Teflonschläuchen mit einem Aussendurchmesser von ca. 0,16 cm und einem Innendurchmesser von ca. 0,08 cm (PTFE; Vici®, Schweiz). Zum Zusammenbau des Flusskanals wurde der PDMS-Block mit der Kanalstruktur und ein gereinigtes Deckglas (24x60 mm; Carl Roth, Deutschland) für 60 s in einem Sauerstoffplasma (150 W, $p(\text{O}_2) = 0,5$ mbar) (Plasmagerät 100-E; PVA TePla, Deutschland) aktiviert und danach zusammengefügt. Die Plasmabehandlung zerstört die endständigen Gruppen des Siloxans und ermöglicht so die kovalente Bindung von PDMS-Block und Deckglas. Um die Flusszelle vor dem Eindringen von Luft, besonders an den Anschlussstellen der Schläuche zu schützen, wurde die Flusszelle zusätzlich mit Twinsil versiegelt (siehe Abbildung 3.12).

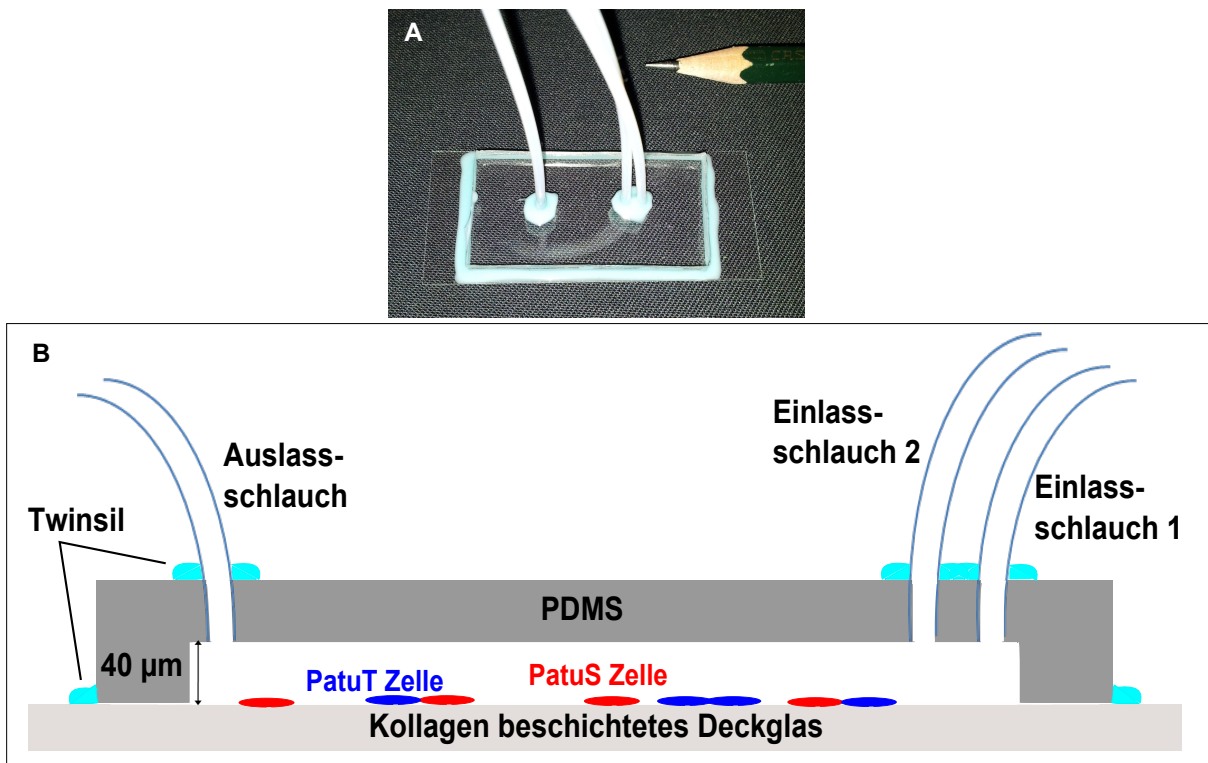


Abbildung 3.12: Bild und schematische Darstellung einer fertigen Flusszelle. Auf dem Foto der Flusszelle (A) ist der PDMS-Block auf dem Deckglas zu sehen. Die Flusszelle ist mit zwei Einlass- und einem Auslassschlauch ausgestattet. In der schematischen Darstellung (B) sind beispielhaft die beiden unterschiedlich Fluoreszenz markierten Zelllinien auf dem Kollagen beschichteten Deckglas innerhalb des 40 µm hohen Kanals gezeigt. Das blaue Twinsil dient als Abdichtung der Anschlussstellen der Schläuche.

Vorbereitung der Flusszellen für die Flusseperimente

Die Flusszellenexperimente wurden an einem inversen Olympus Epifluoreszenzmikroskop (Delta Vision; Applied Precision, USA) durchgeführt. Der Fluss in der Flusszelle wurde mittels Pumpen (Model AL-1000; World precision instruments, USA) gesteuert. Abhängig von den verwendeten Spritzen kann die Pumpe Flussraten zwischen 0,73 µl/h und 1699 ml/h erzeugen. Für das Experiment wurden die Spritzen (10 ml; Braun, Deutschland) mittels Kanülen (0,9x40 mm, Sterican; Braun, Deutschland) an die Schläuche angeschlossen und dann in die Pumpvorrichtung eingespannt. Beide Einlassschläuche, der eine für die Zellsuspension, der andere für das Zellkulturmedium, wurden mit Pumpen verbunden. Da auch diese Experimente unter Zellkulturbedingungen ablaufen sollten, wurde die Pumpe, welche das Zellkulturmedium (mit 1 % Serum) zur Spülung enthielt, innerhalb der Inkubationskammer des Mikroskops aufbewahrt. Die Pumpe, die die Zellsuspension enthielt wurde nur kurz zum Einspülen der Zellen gebraucht, sodass diese aus Platzgründen nicht innerhalb der Inkubationskammer untergebracht wurde (siehe Abbildung 3.13). Die Kollagenlösung zur Beschichtung des Deckglases wurde über den Auslassschlauch manuell mit einer Spritze in den Kanal befördert und dort 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Kanal über den Einlassschlauch 1 mit MilliQ-Wasser für 15 min gespült. Bevor die Zellsuspension mit einer Flussrate von 20 µl/min über den Einlassschlauch 1 eingespült wurde, wurde der Kanal mit Zellkulturmedium durchgespült. Erst 90 min nach Einfluss der Zellen wurde mit dem Flusseperiment begonnen, um eine Adhäsion der Zellen auf dem Kollagen beschichte-

ten Deckglas innerhalb des Kanals zu gewährleisten. Nach der Adhäsionszeit wurde zuallererst das Zellkulturmedium mit einem Fluss von $20 \mu\text{l}/\text{min}$ am Einlassschlauch 2 eingepumpt um alle nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Danach wurde die Flussrate schrittweise um je $40 \mu\text{l}/\text{min}$ erhöht. Jede Flussstufe wurde für eine Minute angelegt und danach wurden jeweils die Bilder von den Zellen im Durchlicht, und in den beiden Fluoreszenzkanälen aufgenommen.

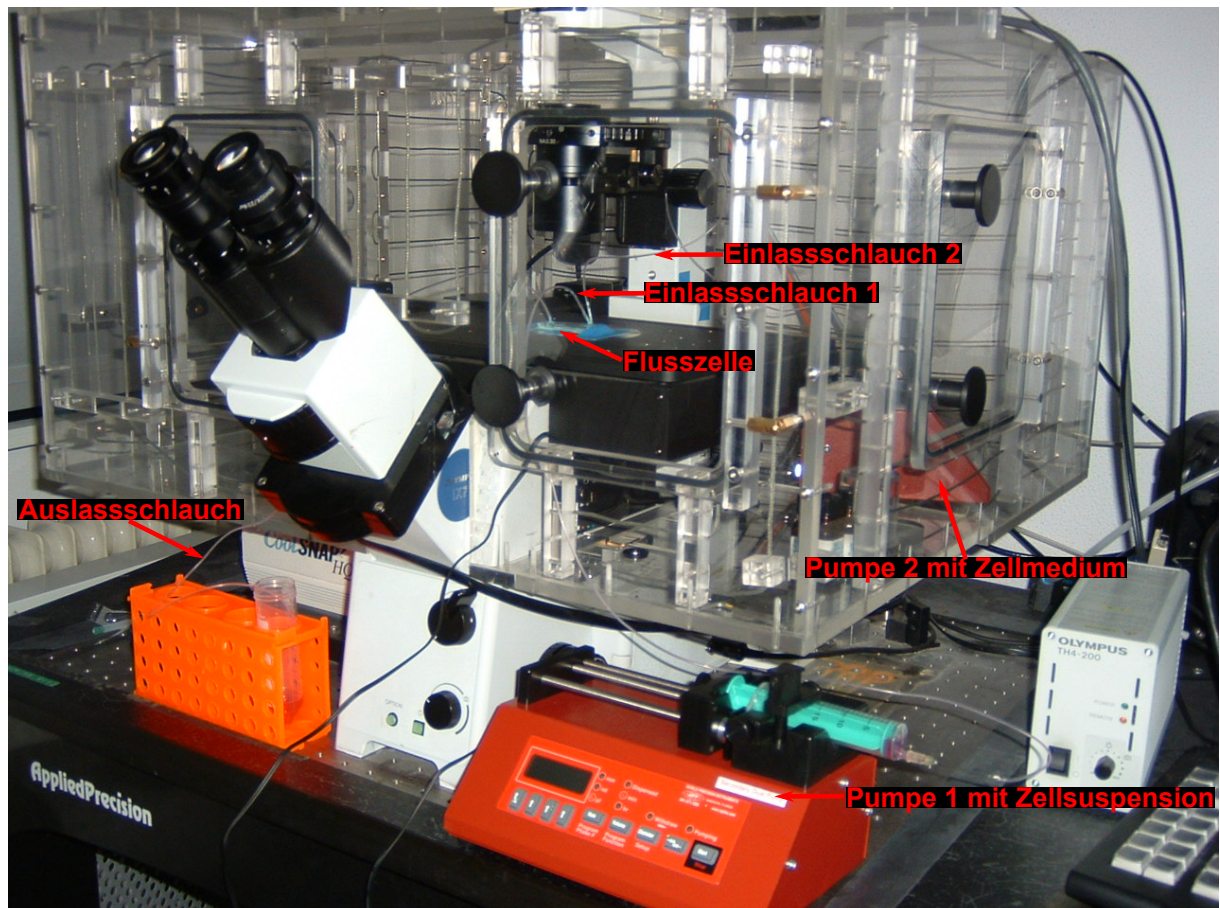


Abbildung 3.13: Foto vom Aufbau des Flussexperimentes am Mikroskop. Die Pumpe mit dem Einlassschlauch 1 ist außerhalb der Inkubationskammer platziert. Die Pumpe 2, mit der das Zellkulturmedium mit sich steigenden Flussraten in die Flusszelle gepumpt wird, wurde innerhalb der Inkubationskammer des Mikroskops platziert. Der Auslass führt in einen Behälter, in dem das Zellkulturmedium aufgefangen wird.

3.6 Mikroskopie

Die RIKM-Bilder wurden an dem eigens aufgebauten RIKM-Setup durchgeführt. Dieser Aufbau wird in Abschnitt 4.1.1 genauer beschrieben.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Phasenkontrastaufnahmen bei den Flusszellexperimenten und den Zellexperimenten auf nanostrukturierten Oberflächen wurden an einem inversen Olympus Epifluoreszenzmikroskop (Delta Vision; Applied Precision, USA) durchgeführt, ausgestattet mit folgenden Objektiven: 10x/0.3 Ph 1 EC Plan-Neofluar (Zeiss), 20x/0.50 Ph 1 UPlanFl (Olympus), 40x/0.50 Ph 2 Aplan, 60x/1.4 UPlanApo Öl-Immersion (Olympus). Die Aufnahmen

wurden mit einer CCD Coolsnap Kamera (Photometrix, Australien) aufgenommen, die Beleuchtung erfolgte über einer HBO Lampe.

3.7 Bildanalysen

Zur Auswertung der Rohdaten der RIKM-Bilder wurde die Image Processing Toolbox der Software MATLAB (MATLAB software R2007b, 1994-2011 The MathWorks) verwendet.

Weitere Bildanalysen der RIKM-Bilder, sowie die Analyse der REM-Bilder von nanostrukturierten Oberflächen wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (MBF_ImageJ for Microscopy; Version 1.43m; W. Rasband, National Institutes of Health, USA)⁹ durchgeführt.

3.7.1 Auswerterroutine für RIKM-Bilder

Zur Segmentierung der Zellen in den RIKM-Bildern wurde ein Segmentierungsalgorithmus in MATLAB erstellt. Der MATLAB Code ist im Anhang A.1.1 angegeben. Auch die Addition der Grenzwertbilder der beiden verwendeten Wellenlängen zur Bestimmung der resultierenden Adhäsionsfläche aus den beiden Wellenlängen wurde mit MATLAB durchgeführt (siehe Anhang A.1.2).

3.7.2 Untersuchung der Größenverteilung der Adhäsionspatches

Zur Untersuchung der Größenverteilung der Adhäsionspatches wurden die Grenzwertbilder der Zellen in ImageJ mit dem Analysewerkzeug „Analyze particles“ charakterisiert. Zur Visualisierung der unterschiedlichen Größen der Adhäsionspatches wurde das Plug-in „Roi color coder“ (T. Ferreira, 2012)¹⁰ verwendet.

3.7.3 Untersuchung der Radialverteilung

Das ImageJ Plug-in „Radial Profile Plot“ (P. Baggethun, 2002, USA)¹¹ erstellt ein Profilplot der normalisierten, integrierten Intensitäten in einem Kreis als Funktion des Abstandes von einem Punkt im Bild. Der Punkt wird automatisch definiert als Zentrum eines Rechtecks welches den Kreis also den gesetzten ROI (Region of interest) umschließt. Dieser Punkt kann aber auch manuell über eine Dialogbox verändert werden. Die Intensität an jedem beliebigen Abstand von diesem Punkt repräsentiert die Summe aller Pixelwerte auf diesem Kreis. Die aufintegrierte Intensität wird durch die Anzahl der Pixel im Kreis dividiert um normierte, vergleichbare Werte zu erhalten.

⁹<http://www.machbiophotonics.ca/downloads.htm>

¹⁰http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=macro:roi_color_coder

¹¹<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/radial-profile.html>

3.7.4 Berechnung der Fraktalen Dimension

Zur Berechnung der fraktalen Dimension der RIKM-Bilder wurde das ImageJ Plug-in „FracLac_2.5q“ (A. Karperien, FracLac for ImageJ, Version 2.5, 1999-2007)¹² verwendet. Die fraktale Dimension beschreibt den Grad der Irregularität einer Struktur, die ohne fraktale Analyse nicht mit konventioneller Geometrie zu quantifizieren ist. Es gibt verschiedene Algorithmen um die fraktale Dimension zu bestimmen. Das verwendete Plug-in beruht auf der Anwendung der Boxcounting-Methode (BCM), bei der mehrere Gitter mit Boxen sinkender Boxgröße ϵ über ein Bild gelegt, und die Anzahl der Boxen $N(\epsilon)$, die benötigt werden um das Bild zu bedecken, gezählt werden. Die Daten werden für jede Box eines jeden Gitters erfasst. Die Box-Dimension D_B kann dann mit Hilfe der Formel 3.2 bestimmt werden (Karperien, 2004–5).

$$D_B = - \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log(N_\epsilon)}{\log(\epsilon)} \right] \quad (3.2)$$

Die Gleichung 3.2 kann als Limes des Verhältnis des Logarithmus der Anzahl der Boxen bei einer bestimmten Skalierung über dem Logarithmus dieser Skalierung gelesen werden.

Die Box-Dimension kann auch als Steigung der Regressionslinie für den Log-Log-Plot der Boxgröße ϵ (oder der Skalierung) und der Anzahl der Boxen N mit der Formel 3.3 ausgedrückt werden, wobei $x = \log(N_\epsilon)$ und $y = \log(\epsilon)$, darstellen.

$$-m = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -D_B \quad (3.3)$$

Eine nichtlineare Steigung würde dabei das Fehlen einer fraktalen Dimension implizieren. D_B ist somit eine Näherung an die fraktale Dimension FD, da die fraktale Dimension nur für deterministische Fraktale berechnet werden kann. Für ein Objekt mit einer deterministischen Selbstähnlichkeit, ist seine FD gleich seiner Box-Dimension D_B . Da in der Natur aber keine idealen, deterministischen Fraktale auftreten, ist D_B eine Näherung an FD (Li et al., 2009a).

Die Fraktalanalyse wurde unter drei verschiedenen Untersuchungsaspekten durchgeführt:

1. Konturanalyse (Binärbild)
2. Globale Kontur-Strukturanalyse (Kontur und RIKM-Bild = Graustufenbild)
3. Interne Strukturanalyse (RIKM-Bild = Graustufenbild)

Für die Analyse unter Punkt 2 wurden die RIKM-Bilder (Größe 1344x1024 Pixel) je nach Zellgröße auf eine der vier gewählten Bildgrößen (320x320, 500x500, 600x600, oder 650x650 Pixel) zugeschnitten. Während im ersten Ansatz ein Binärbild mit der Kontur der Zelle untersucht wird, zielen die beiden anderen Ansätze auf die Informationen des RIKM-Bildes mit seinen Grauwertstufen ab, weshalb hier eine andere Berechnungsmethode angewendet werden muss. Im Binärbild können die Pixel nur zwei verschiedene Werte annehmen (weiß oder schwarz), wobei weiß den Hintergrund und schwarz den Vordergrund, hier die Kontur der Zelle, angibt. In den Grauwertbildern hingegen gibt es 255 verschiedene Werte für die Pixel, wobei keiner dieser Pixel vernachlässigt werden kann, da jeder zum Vordergrund gehört. Der Binärs캔 zählt die Boxen, in denen eine Vordergrundinformation steckt. Bei Anwendung dieses Scans auf ein Graustufenbild

¹²<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fractalac.htm>

würde jede Box gezählt werden und jede Box wäre voll mit jedem ϵ gleich der Anzahl der Boxen über das ganze Bild hinweg, was das Ergebnis der Analyse unbrauchbar macht. Dementsprechend müssen die Grauwertbilder mit einem differentiellen Scan analysiert werden, bei dem die Unterschiede in den Intensitäten I der Pixel in jeder Box der Größe ϵ an jedem Ort mit den Koordinaten i, j berechnet werden:

$$I_{i,j,\epsilon} = I_{M_{i,j,\epsilon}} - I_{m_{i,j,\epsilon}} \quad (3.4)$$

Die Box Dimension der differentiellen Methode lässt sich dann schreiben als:

$$D_{B(\text{differenziell})} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\ln(I_{i,j,\epsilon} + 1)}{\ln\left(\frac{1}{\epsilon}\right)} \quad (3.5)$$

Für alle drei Ansätze wurde ein Standard Boxcount mit 12 Gitterpositionen durchgeführt. Für den Ansatz 1 wurde eine minimale Gittergröße von 10 Pixeln und bei den Ansätzen 2 und 3 eine minimale Gittergröße von 2 Pixeln festgesetzt¹³. In allen drei Fällen wurde als maximale Gittergröße 45 % des ROI angegeben.

3.7.5 Bestimmung des Abstandes und des Ordnungsparameters der Goldnanopartikel

Die Qualität der Ordnung der erzeugten quasi-hexagonalen Goldnanostrukturen sowie die Abstände der Goldnanopartikel wurden anhand von REM-Bildern einer Vergrößerung von 50000 mit Hilfe eines ImageJ Plug-ins ausgewertet¹⁴. Mit dem Plug-in kann der mittlere Abstand benachbarter Goldnanopartikel und ein Ordnungsparameter Ψ bestimmt werden, wobei der Ordnungsparameter Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. $\Psi = 1$ stellt dabei eine perfekte Ordnung der quasi hexagonalen Goldnanostrukturen dar. In dieser Arbeit wurden nur nanostrukturierte Oberflächen verwendet, die einen Ordnungsparameter $\Psi > 0,55$ aufwiesen.

3.8 Datenauswertung

Die Datenauswertung, alle mathematischen Modellierungen und statistischen Tests wurden mit der Software OriginPro8.6G (OriginLab, Northampton, MA) durchgeführt.

3.8.1 Fehlerrechnung

Wenn nicht anders im Text erwähnt beziehen sich die Ergebnisse immer auf den Mittelwert der Daten mit Angabe des Standardfehlers.

3.8.2 Statistik

Zum Test der Signifikanz der Daten wurde eine Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Sie ist eine Verallgemeinerung des t-Tests im Falle von mehr als zwei Gruppen. Für $k=2$ ist die

¹³Nach Absprache mit A. Karperien.

¹⁴Das Plug-in „Dot analyzer“ wurde von Dr. Philippe Girard geschrieben nach der Theorie von Kansal et al. (2000).

ANOVA äquivalent mit dem t-Test. Die voraussetzende Normalverteilung der Stichprobenvariablen wurde mit einem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft.

Zur Überprüfung der Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Datengruppen wurde der dimensionslose Pearson Korrelationskoeffizient bestimmt. Der Korrelationskoeffizient r nimmt Werte zwischen -1 und $+1$ an. Ist der Korrelationskoeffizient $r > 0$, so liegt ein positiver, ist $r < 0$ ein negativer Zusammenhang vor. Bei $r = 0$ gibt es keinen linearen Zusammenhang und je dichter r bei 0 liegt, desto schwächer ist der lineare Zusammenhang.

Ergebnisse und Diskussion

RIKM-Bilder erlauben vielseitige Aussagen über Charakteristika einer Zelle, wie z.B. der Form der Zelle oder deren Adhäsionsfläche bzw. Topografie, die durch zeitliche Untersuchung auch Aufschlüsse über das dynamische Verhalten der Zellen gibt. Die Untersuchung der charakteristischen Eigenschaften einer Zelle stellt die Basis dar, diese zur Erstellung eines neuartigen Zellklassifizierungssystems zu nutzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS auf unterschiedlichen Substraten ein Drei-Wellenlängen-RIKM aufgebaut (Kapitel 4.1). Für die Analyse der RIKM-Bilder der untersuchten Zellen wurde ein Auswertalgorithmus erstellt, der eine automatische Generierung der zu untersuchenden Parameter erlaubt (Kapitel 4.2). Für die Betrachtung der Adhäsionsflächen der Zellen musste ein Grenzwert in der Intensität gefunden werden, der es erlaubt zwischen adhärenen und nicht adhärenen Bereichen innerhalb der Zelle zu unterscheiden (Kapitel 4.3). Nach der Validierung des Aufbaus und der Erstellung der verschiedenen Auswertmethoden wurden die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS mittels RIKM insbesondere auf ihr Adhäsions- und Spreitverhalten auf Kollagen beschichteten Glasoberflächen untersucht (Kapitel 4.4).

Die ausführliche Analyse des Adhäsionsverhaltens der beiden Geschwisterzelllinien mittels RIKM wurde zusätzlich mit einer direkten Methode, einem mikrofluidischen Ablöseassays, bestimmt, der gleichzeitig auch ein Verfahren zur Separation der Zellen darstellt (Kapitel 4.5). Der Ablöseassay sollte dazu dienen die Hypothese, dass das Adhäsionsvermögen von Zellen unter Flussbedingungen direkt mit der Zelladhäsionsfläche und nicht nur mit der projizierten Zellfläche korreliert ist, zu überprüfen.

Um die Adhäsionsstärke der Zellen direkt aus den RIKM-Bildern abschätzen zu können, wurde ein mathematisches Modell erstellt, welches die Zellgröße, den Anteil an Adhäsionsfläche an der projizierten Zellfläche und die räumliche Verteilung der Adhäsionspatches berücksichtigt (Kapitel 4.6).

Für eine genauere Charakterisierung der beiden Zelllinien bezüglich ihres Malignitätsgrades wurden RIKM-Bilder zur Untersuchung der fraktalen Dimension der beiden Zelllinien anhand verschiedener Untersuchungsaspekte im RIKM-Bild eingesetzt (Kapitel 4.7).

Um das spezifische Adhäsionsverhalten der Zellen zu erhöhen können nanostrukturierte Oberflächen eingesetzt werden. Mit einem alternativen Zelllinienpaar (MCF7 und MCF10A Zellen) wurde der Einfluss verschiedener Parameter der nanostrukturierten Oberflächen auf die Zelladhäsion untersucht (Kapitel 4.8).

4.1 Aufbau eines Drei-Wellenlängen-RIKM

4.1.1 Konzeptioneller Aufbau

Die Komponenten zum Aufbau eines Drei-Wellenlängen-RIKMs (3λ -RIKMs), in Anlehnung an Richter et al. (2007) und Boehm (2009), wurden neu an einem unmotorisierten, inversen IX71 Mikroskop (Olympus, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Timo Maier aufgebaut. Durch die Ausstattung mit einer motorisierten Bühne (SCAN IM 112x74; Märzhäuser Wetzlar, Deutschland), sowie einer x-y-z-Piezobühne (P-563.3CD; Physik Instrumente, Deutschland) erlaubt der neue Aufbau Bewegungen im Milli- als auch im Nanometerbereich.

Der Aufbau beinhaltet zwei biophysikalische Messtechniken, die in dieser Arbeit genutzte RIKM und eine optische Pinzette (OT), die in einem anderen Forschungsprojekt verwendet wird. Bei der optischen Pinzette können dielektrische Objekte, wie z.B. Polystyrolkugeln oder Zellen im Größenbereich von $1\text{-}10\ \mu\text{m}$ mittels eines nicht-invasiven Infrarot-Lasers (Ventus IR 1064 nm; Laser Quantum34, England) gefangen und bewegt werden. An diesem Setup wird sie zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften von quasi 2-dimensionalen Aktin Netzwerken genutzt (Maier, 2008). Die Komponenten der RIKM, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im schematischen Aufbau der Abbildung 4.1 farbig hinterlegt.

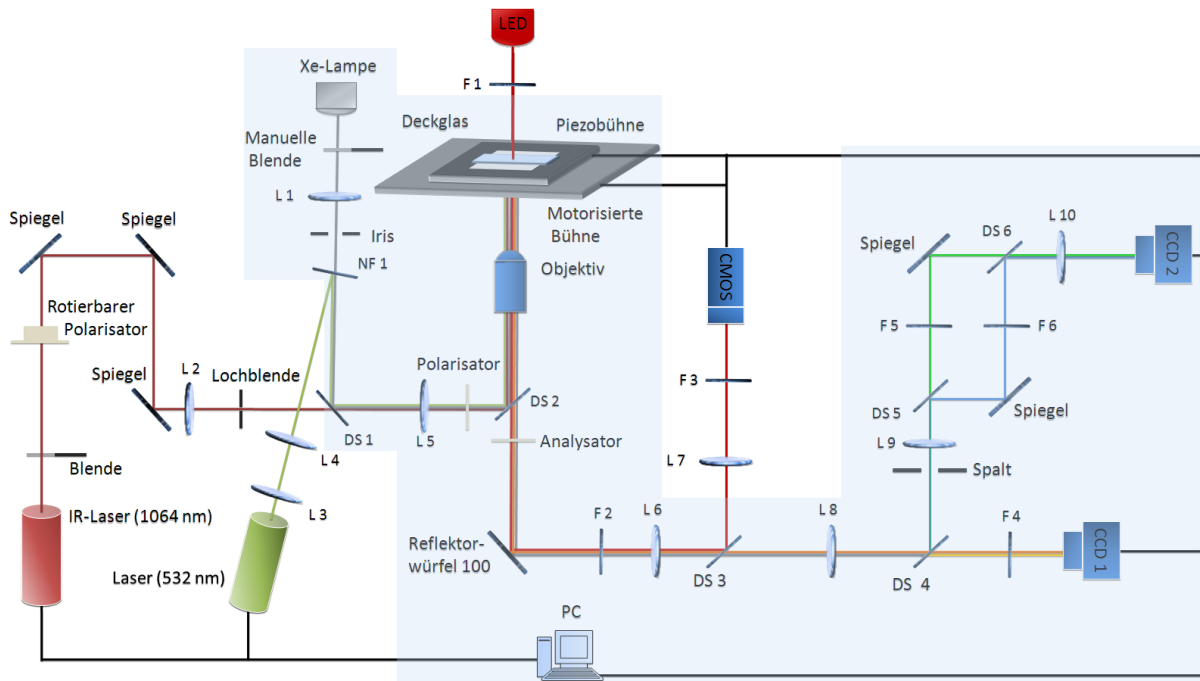


Abbildung 4.1: Schematische Sicht auf den Strahlengang des OT/RIKM-Aufbaus, wobei der Teil des 3λ -RIKMs farbig hinterlegt ist. DS1-DS6: dichroitische Spiegel; L1-L9: verschiedene Linsen; F1-F5: verschiedene Filter (zur genaueren Beschreibung siehe Tabelle 4.1).

Beim OT/RIKM-Aufbau wurde zur Verbesserung der Bildqualität der Beleuchtungsstrahlengang komplett vom Abbildungsstrahlengang getrennt. Zur Beleuchtung wurden drei verschiedene Lichtquellen eingebunden:

- eine fasergekoppelte (400 μm ; Ocean optics, USA) 100 Watt Xenon Kurzbogenlampe (XBO R 100W/45C OFR; Osram, Deutschland) für die RIKM,
- ein 70 mW Laser (DPSSL-70, $\lambda = 532$ nm; Roithner Lasertechnik, Österreich) zur Fluoreszenzanregung,
- und eine Licht emittierende Diode (LED) (M660L2-C1; Thorlabs, USA) für eine mögliche simultane Durchlichtbeleuchtung während der Fluoreszenzaufnahmen.

Es wurde eine Xenon-Lampe als Beleuchtungseinheit für die RIKM gewählt, da sie ein quasi-kontinuierliches Spektrum mit einem sehr guten Farbwiedergabe-Index (>95) bietet ([Osram-Produktinfo, 2012](#)). Diese homogene Intensitätsverteilung ist wichtig, da bei der 3λ -RIKM zwei Wellenlängen auf einer Kamera abgebildet werden. Zur Bildgebung mehrerer Wellenlängen wurden drei verschiedene Kameras implementiert:

- zwei CCD Kameras (Orca-R2; Hamamatsu, Japan) zur Aufnahme der Fluoreszenz- (CCD1) und der RIKM-Signale (CCD1 und CCD2),
- eine CMOS Kamera (A602f; Basler, Deutschland) zur Detektion des LED Signals.

Um drei Wellenlängen gleichzeitig detektieren zu können, wurde eine Wellenlänge auf der CCD-Kamera 1 und die beiden anderen Wellenlängen vertikal gesplittet auf der CCD-Kamera 2 abgebildet. Der komplette optische Aufbau wurde über ein, durch Stangen arretierbares, Bausystem (Thorlabs, USA) montiert und justiert. Die einzelnen Komponenten des optischen Systems sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Die zuvor in Kapitel 2.7.1 beschriebene Antiflextechnik ([Ploem, 1975](#)) zur Anwendung der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie wurde mit einem 63x Antiflex-Immersionsobjektiv (Neofluar Antiflex, NA = 1,25; Zeiss, Deutschland), welches mit einem Lambdaviertelplättchen ($\lambda/4$ -Plättchen) an der Frontlinse bestückt ist, und der Verwendung von zwei gekreuzten Polarisatoren realisiert (Polarisator/Analysator in Abbildung 4.1). Das $\lambda/4$ -Plättchen des Objektivs ist für die Wellenlänge von 546 nm ausgelegt ([Limozin und Sengupta, 2009](#)). Um zusätzlich das Streulicht für die RIKM zu minimieren wurde in den Beleuchtungsstrahlengang eine Irisblende eingebaut. Das an der Probe reflektierte Licht wurde durch einen Reflektorwürfel aus dem Mikroskop ausgekoppelt und in den Abbildungsstrahlengang geleitet. Für die RIKM wurde das Licht durch einen dichroitischen Spiegel (DS4, Abbildung 4.2) auf die beiden Kameras aufgeteilt. Licht der Wellenlängen $\lambda = 570\text{-}800$ nm wird transmittiert und trifft über einen Filter F4 (593/40 nm) auf die CCD-Kamera 1. Das reflektierte Licht der Wellenlängen $\lambda = 410\text{-}550$ nm wurde durch einen Spalt in ein weiteres Strahlteilersystem (DS5 und DS6) geleitet, bei dem das Licht in seine blauen und grünen Bestandteile aufgetrennt werden kann. Aufgrund des zuvor eingesetzten Spalts, konnte das Bild der beiden Wellenlängen vertikal gesplittet auf einer CCD-Kamera (CCD 2) dargestellt werden. Mit der objektorientierten Programmiersprache Python (Python Software Foundation, USA) wurden auf Seiten der Software verschiedene Programme entwickelt, um mittels modifizierter Hardware die Bild- und Positionsdaten aufzunehmen¹. Dadurch konnte die Kamera getriggert angesteuert werden, sowie die Piezo- und die motorisierte Bühne gesteuert werden. Zusätzlich ermöglichte das Programm die Aufnahme und das Aufrufen von mehreren gespeicherten Bildpunkten, die dann zyklisch in einer Zeitschleife immer wieder abgefragt werden konnten.

¹Die einzelnen Programme wurden von Dr. Tamás Haraszti und Timo Maier programmiert.

Tabelle 4.1: Auflistung der optischen Bauelemente des OT/RIKM-Aufbaus. Alle Linsen und Spiegel wurden von der Firma Thorlabs (USA) bezogen, alle Filter von der Firma AHF Analysetechnik (Deutschland).

R: Reflexionsbereich; T: Transmissionsbereich; f: Brennweite der Linse; AR: Antireflexionsbeschichtung.

Bauteil	Bezeichnung	Eigenschaften
L1	AC254-050-A1	f = 50 mm; AR
L2	LA1509-C	f = 100 mm; AR
L3	-	f = 12,5 mm; AR
L4	LA1461	f = 250 mm
L5	AC254-300-A1	f = 300 mm; AR
L6	AC254-150-A1	f = 150 mm; AR
L7	AC254-150-A1	f = 150 mm; AR
L8	AC254-150-A1	f = 150 mm; AR
L9	LA1986	f = 125 mm
L10	LA1986-A1	f = 125 mm; AR
F1	-	T 632 ± 22 nm
F2	-	T 580 - 720 nm
F3	-	T 600 - 640 nm
F4	HC 593/40	T 593 ± 20 nm
F5	FB 546/10	T 546 ± 5 nm
F6	FB 490/10	T 490 ± 5 nm
NF 1	single notch	T 532 nm
DS1	770 DCXR	R 450-750 nm > 90 %; T 785-1100 nm > 90 %; AR
DS2	Q565 LP-1064	R 530-560 nm > 90 %; T 575-1100 nm > 90 %; AR ; 50 % Spiegel
DS3	Q620 SPXR	R 640-850 nm > 90 %; T 500-606 nm > 90 %
DS4	560 DCXR	R 410-550 nm > 90 %; T 570-800 nm > 90 %; AR
DS5	505 DCLP	R 450-500 nm > 90 %; T 515-580 nm > 90 %
DS6	505 DCLP	R 450-500 nm > 90 %; T 515-580 nm > 90 %

Um die RIKM auch für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von lebenden Zellen nutzen zu können, wurde das Mikroskop mit einer beheizbaren, abgeschlossenen Plexigaskammer umgeben und mit einer Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Zufuhr versehen, sodass Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) bei den Versuchen gewährleistet waren. Es musste darauf geachtet werden, dass vor einem Lebendzellexperiments die Heizung der Kammer frühzeitig eingeschaltet wurde, um eine konstante Temperatur innerhalb der Kammer zu erreichen, sodass thermische Driften des Objektivs und somit des Fokus, ein wichtiger Aspekt bei der RIKM, verhindert wurden. Zur Verhinderung von Streulicht wurde der komplette Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang lichtdicht verschlossen (siehe Abbildung 4.2).

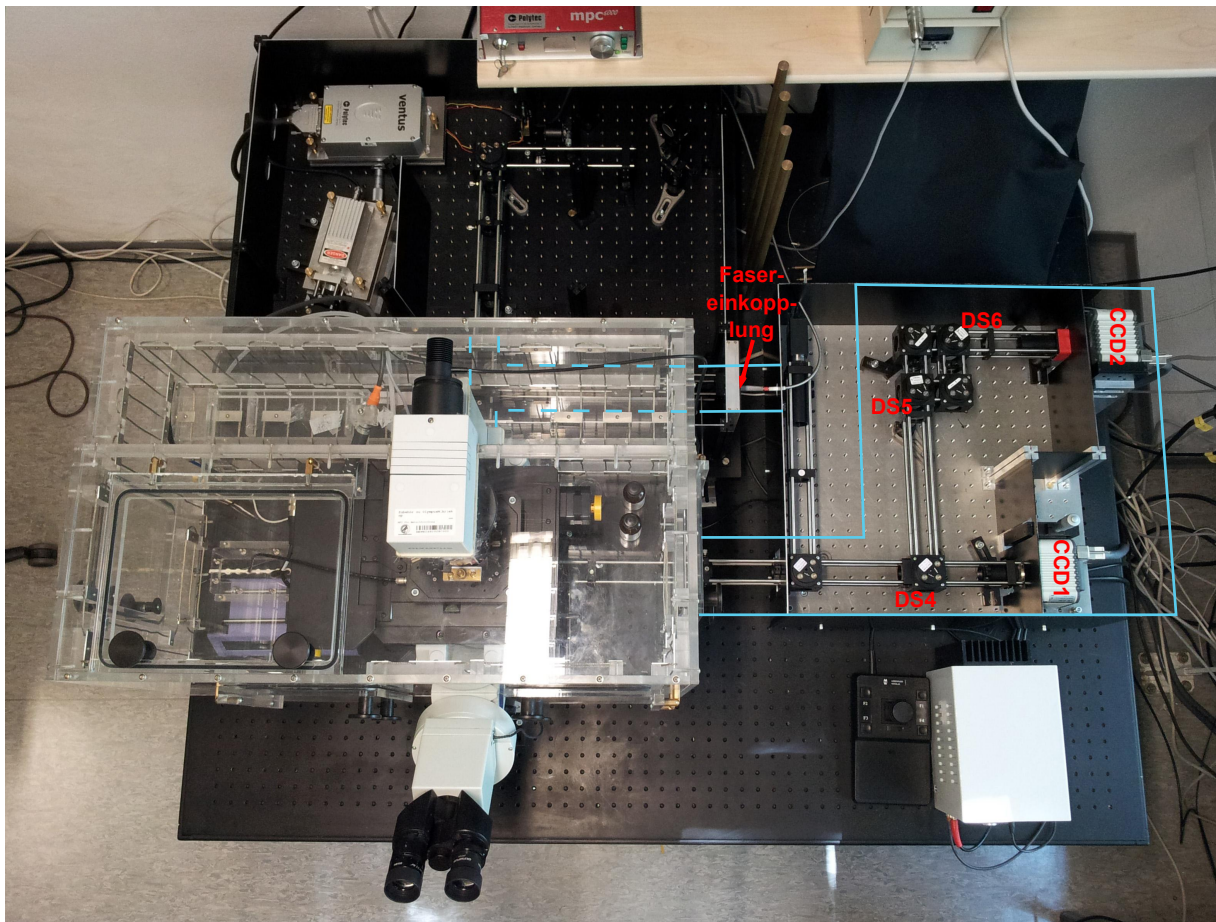


Abbildung 4.2: Aufsicht auf das Mikroskop und das optische System. Das Mikroskop ist von einer beheizbaren, abgeschlossenen Kammer umgeben. Das optische System des OT/RIKM-Aufbaus kann durch schwarze Abdeckplatten verschlossen werden um den Einfluss von Streulicht zu vermeiden. Die Komponenten des RIKM-Aufbaus sind hellblau umrandet. Der Beleuchtungsstrahlengang wird bei dieser Aufnahme von der Kammer des Mikroskops bedeckt. Die Einkopplung der Faser in den Strahlengang ist im Bild gekennzeichnet.

4.1.2 Etablierung des RIKM-Aufbaus

Die Kombination von optischer Pinzette und RIKM an einem Mikroskop führte dazu, dass, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, mehrere Lichtquellen ins Mikroskop eingekoppelt werden mussten, was die exakte Justierung der Lichtstrahlen erschwerte. Für die Einkopplung des Fluoreszenzlasers musste ein extrem schmalbandiger single notch-Filter verwendet werden, der unter einem Winkel kleiner als 14° die eingestrahlte Wellenlänge reflektiert und somit nicht das Spektrum der Xe-Lampe unterbricht, wie es bei dem Einbau eines dichroitischen Spiegels der Fall gewesen wäre. Bei der Justierung der RIKM-Komponenten musste auf eine genaue, parallele und senkrechte Ausrichtung des Strahls geachtet werden.

Erhöhung des Bildkontrastes durch die Anwendung der Antiflextechnik

Die Validierung des RIKM-Modus erfolgte anhand der Untersuchung von Polystyrolkugeln (= Beads) (Polysciences, USA). Die Erhöhung des Kontrastes der Bilder wurde durch die An-

wendung der Antiflextechnik garantiert (siehe Abbildung 4.3). Bild 4.3A zeigt das normale Hellfeldbild des Polystyrolbeads, das mit einem 60x Wasser-Objektiv aufgenommen wurde. Das Bild 4.3B hingegen wurde auch mit dem 60x Wasser-Objektiv aufgenommen, jedoch im RIKM-Modus, mit eingesetzten Polarisatoren. Die Tatsache, dass auch hier schon Interferenzringe des Beads zu sehen sind, obwohl noch nicht die komplette Antiflextechnik mit Gebrauch eines $\lambda/4$ -Plättchens genutzt wurde, spricht für eine gute Justierung des Strahlenganges (wenig Streulicht) und für die kleinen Bandbreiten der Filter vor den Kameras. Vergleicht man dieses Bild 4.3B mit dem Bild 4.3C des Beads im optimalen RIKM-Modus (Verwendung des Antiflex-Objektivs und Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens im 45° -Winkel zur Polarisationsrichtung), so ist klar ersichtlich wie die Anwendung der Antiflextechnik den Kontrast des Interferenzbildes erhöht.

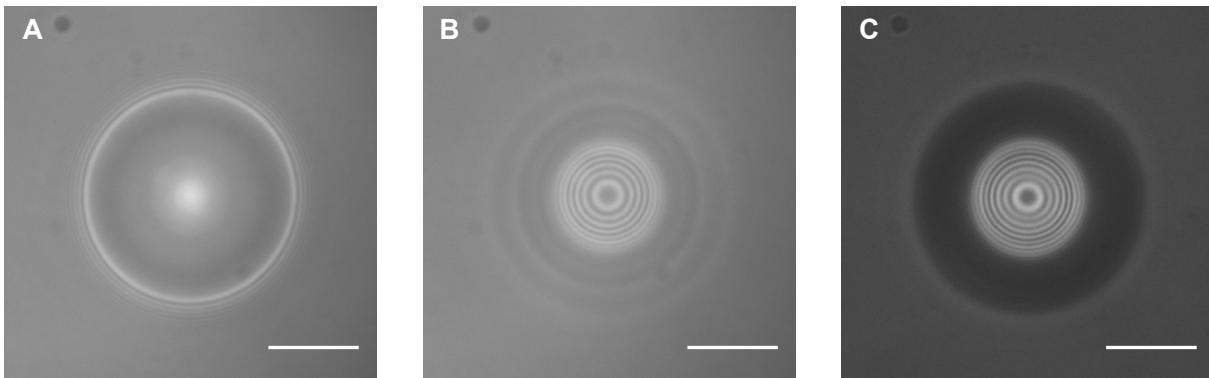


Abbildung 4.3: Anwendung der Antiflextechnik auf das RIKM-Bild eines Polystyrolbeads. (A) zeigt den Polystyrolbead im Hellfeld, aufgenommen mit einem 60x Wasser-Objektiv, (B), aufgenommen mit einem 60x Wasser-Objektiv im RIKM-Modus (mit Polarisatoren). (C) zeigt das RIKM-Bild, aufgenommen mit dem 63x Antiflex-Objektiv bei komplett geöffnetem $\lambda/4$ -Plättchen (45° -Winkel zur Polarisationsrichtung = optimaler RIKM-Modus). Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Justierung der Antiflexeinstellungen

Es muss darauf geachtet werden, dass die Achse des $\lambda/4$ -Plättchens im 45° -Winkel zur Polarisationsrichtung orientiert ist, um die optimalen RIKM-Bedingungen zu erreichen. In Abbildung 4.4 ist der Einfluss der Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens auf das RIKM-Bild eines $25 \mu\text{m}$ großen Beads gezeigt. In den Bildern 4.4 (A-D) wird der Einfluss der Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens bei der RIKM deutlich, da sich der Kontrast der Interferenzstruktur bei falscher Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens verschlechtert. Je mehr die Orientierung von der optimalen 45° -Stellung abweicht (siehe Abbildung 4.4A), desto stärker wird auch das Licht beim Durchtritt durch das Plättchen elliptisch polarisiert. In der 0° -Stellung wird das Licht nicht mehr elliptisch polarisiert, sondern es bleibt nur noch die Komponente des linear polarisierten Lichtes übrig. In dieser Stellung treten Kreuze im RIKM-Bild auf (siehe Abbildung 4.4D).

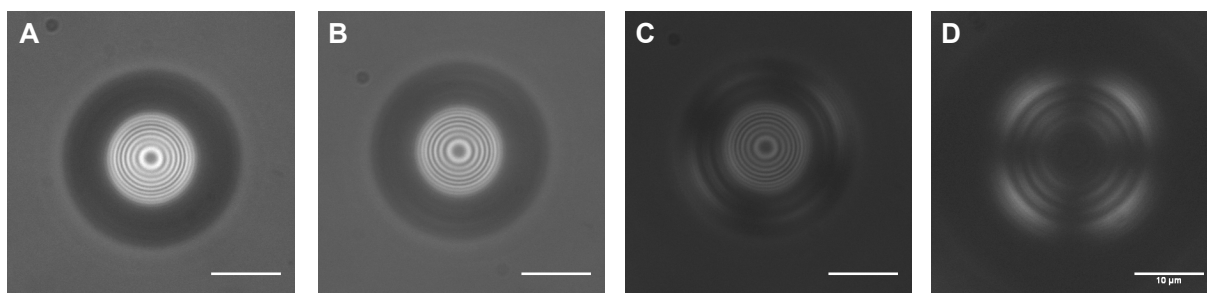


Abbildung 4.4: Einfluss der Orientierung des $\lambda/4$ -Plättchens auf das RIKM-Bild eines Polystyrolbeads. (A) zeigt das RIKM-Bild, aufgenommen mit dem 63x Antiflex-Objektiv bei komplett geöffnetem (45° -Winkel zur Polarisationsrichtung = optimaler RIKM-Modus), (B) bei halb geöffneten, und (C) bei fast ganz geschlossenem $\lambda/4$ -Plättchen. Im Bild (D) ist das $\lambda/4$ -Plättchen komplett geschlossen (0° -Winkel zur Polarisationsrichtung). Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Ursprung von Kreuzen im RIKM-Bild

Im Allgemeinen wird die Polarisationsmikroskopie genutzt um optische Eigenschaften wie die Doppelbrechung, den Dichroismus und optische Konstanten von Materialien zu bestimmen. Da die Doppelbrechung und der Dichroismus die Eigenschaften des Materials aufzeigen, die unter der optischen Auflösung der Lichtmikroskope liegt, dient die Polarisationsmikroskopie dazu, submikroskopische Strukturen zu untersuchen (Inoue und Hyde, 1957). Bei der Konoskopie wird im Gegensatz zur normalen orthoskopischen Betrachtungsweise bei der Polarisationsmikroskopie kein vergrößertes Bild des Objekts, sondern ein indirektes Bild der Lichtquelle, ein Interferenz- oder Achsenbild beobachtet. In dieser Anwendung wird die Entstehung von sogenannten Malteser-Kreuzen (wie in Abbildung 4.4D) bei doppelbrechenden Materialien dazu genutzt, die optischen Eigenschaften des Materials, wie z.B. Informationen über die Kristallstruktur, zu untersuchen (Bergmann, 2003). Da es sich bei den hier untersuchten Polystyrolbeads aber nicht um ein doppelbrechendes Material handelt, muss es noch eine andere Ursache für die Entstehung der Kreuze geben. Bei Experimenten mit einer Bead-Lösung, die Beads mit Durchmessern von $5\text{--}100 \mu\text{m}$ enthielten, konnten simultan Beads mit und ohne Kreuzstruktur beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Größe bzw. die Krümmung der Objekte eine Rolle spielen könnte. Das Phänomen der Kreuzerscheinung beruht auf einer Diffraktionsanomalie von Polarisationsmikroskopen (Inoue und Kubota, 1958; Shribak et al., 2002). In einem konventionellen Polarisationsmikroskop ist das beleuchtete Feld zwischen zwei gekreuzten Polarisatoren niemals komplett dunkel, sondern es ist ein Polarisationskreuz sichtbar, das durch Licht hervorgerufen wird, welches nicht durch die gekreuzten Polarisatoren ausgelöscht wird, sondern doch eine Rotation seiner Polarisationssebene zwischen den beiden Grenzflächen erfährt und dadurch den Analysator passieren kann. Die Stärke des Kreuzes ist abhängig von der Krümmung und dem Brechungsindex des Objektes.

Untersuchungen der Kreuzstruktur an drei verschiedenen Beadgrößen ($\phi = 15, 25$ und $45 \mu\text{m}$) mit allen drei Wellenlängen zeigten, dass das Kreuz mit zunehmendem Durchmesser des Beads immer weiter nach außen wandert. Die Berechnungen des Verhältnisses von Beaddurchmesser und dem Durchmesser des „kreuzfreien“ Bereichs des Interferenzmusters ergaben im Mittel $0,30 \pm 0,03$, was bedeutet, dass die Kreuze immer ab einem Krümmungswinkel α des Objektes von $\alpha = 17,4^\circ \pm 1,7^\circ$ auftraten. Bei der Beobachtung von Zellen in komplett geschlossener Stellung des $\lambda/4$ -Plättchens traten keine Kreuze auf, was darauf schließen lässt, dass die Zellen einen kleineren Krümmungswinkel besitzen.

4.1.3 Ausleuchtung der Proben

Für die Überprüfung der Ausleuchtung der Proben wurden auch die Interferenzaufnahmen von Beads genutzt. Anhand der auftretenden Ringstruktur und der Konzentrität der Ringe im Bead kann auf die Homogenität der Ausleuchtung geschlossen werden (siehe Abbildung 4.5A). Die Intensitätsverteilung der Interferenzstruktur des Beads kann anhand vom Linienplots durch das Zentrum des Beads in beiden Ausrichtungen visualisiert und überprüft werden (Abbildung 4.5B).

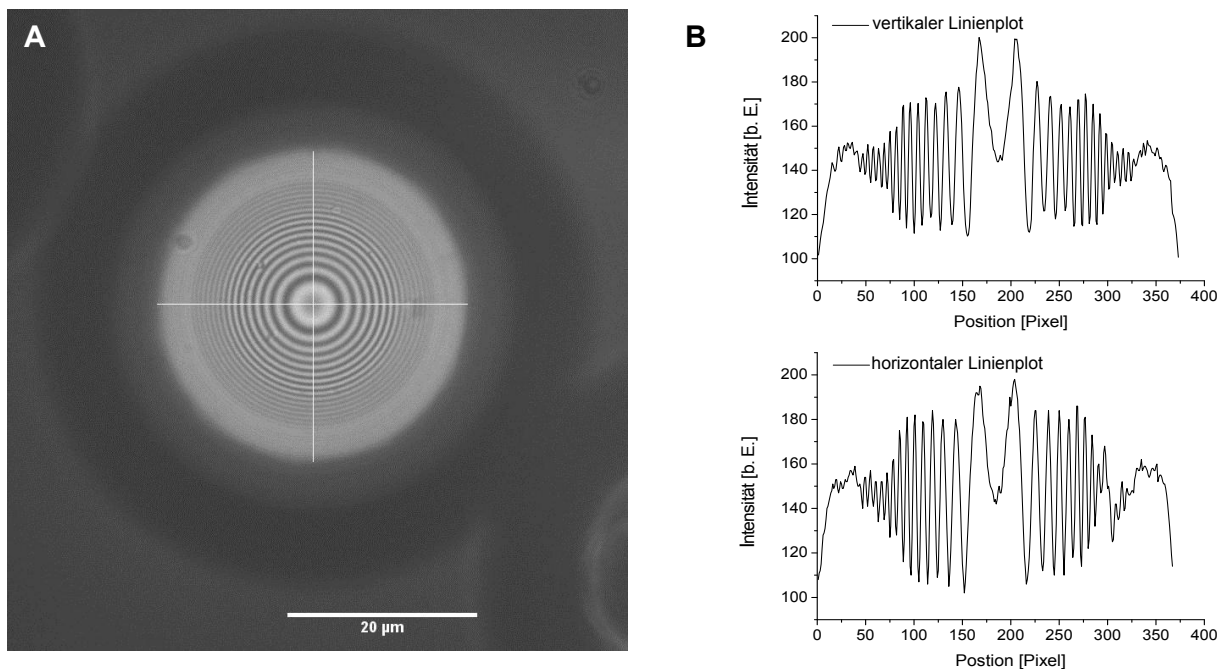


Abbildung 4.5: Interferenzstruktur eines Beads und dessen Intensitätsverteilung. (A) zeigt das RIKM-Bild eines Beads und (B) die Intensitätsverteilung entlang der beiden weißen Linien in Bild A durch den Mittelpunkt.

4.1.4 Abgleich der beiden Kameras

Für die Mehrwellenlängen-RIKM mussten die beiden CCD-Kameras exakt aufeinander justiert werden. Die erste CCD-Kamera (CCD1) diente als Referenzkamera, da diese so justiert war, dass sie mit der Fluoreszenzkamera CMOS des optischen Pinzetten-Aufbaus übereinstimmte. Um die zweite CCD-Kamera (CCD2) bei der verwendeten Vergrößerung pixelgenau zur CCD1 einstellen zu können, wurde diese an einen Linsenhalter mit μm -Einstellung gekoppelt. Für die Justierung wurden RIKM-Bilder von schwarzen Strichen (mit Edding aufgemalt) auf Deckgläsern verwendet. Auf der zweiten Kamera CCD2 wurde nur das Bild einer Wellenlänge dargestellt um es mit dem Bild der CCD1 mit einer Wellenlänge überlagern und somit exakt ausrichten zu können. Dafür wurden Bilder aufgenommen und mit Hilfe des Programms ImageJ als zwei Farbkanäle überlagert (siehe Abbildung 4.6).

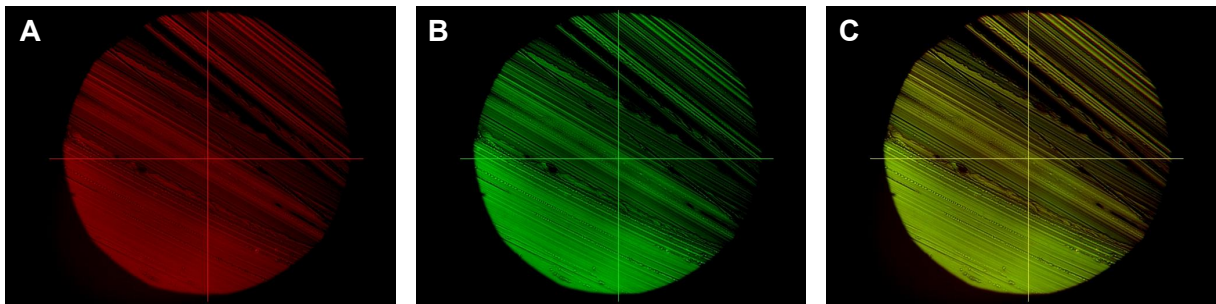


Abbildung 4.6: Aufnahmen zur Justierung der beiden Kameras. Das Objekt wurde in (A) mit der Kamera CCD1 und in (B) mit CCD2 aufgenommen. Die beiden Bilder wurden mit Hilfe von ImageJ als zwei Farbkanäle (rot und grün) überlagert. (C) zeigt die Überlagerung der beiden Bilder in Gelb. Die beiden farbigen Linien in den jeweiligen Bildern markieren die Stelle, an denen die Linienplots in senkrechter und waagerechter Position zur Auswertung gemacht wurden.

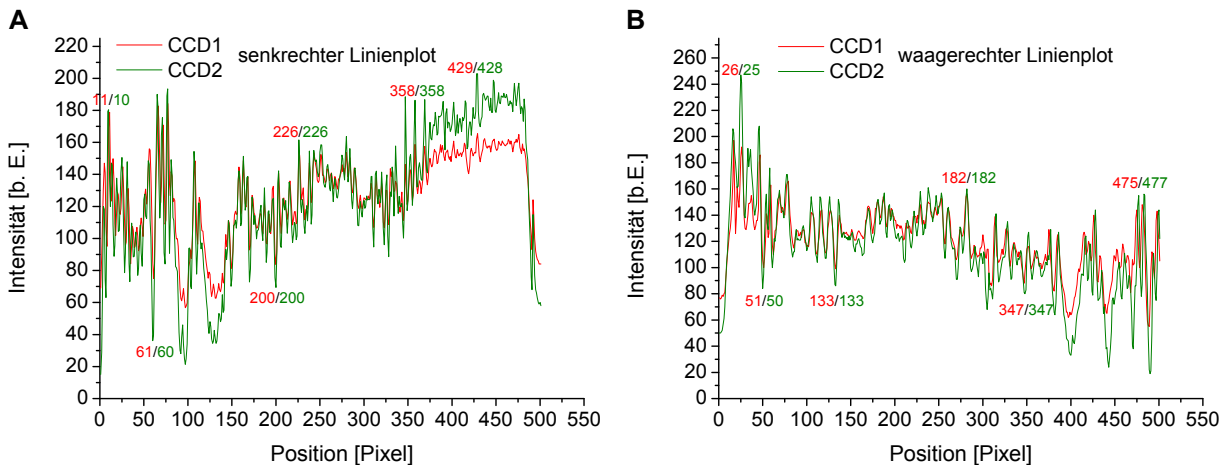


Abbildung 4.7: Linienplots der in Abbildung 4.6 gezeigten Linien. (A) zeigt den senkrechten und (B) den waagerechten Linienplot für je beide Kameras CCD1 und CCD2.

Aus den Linienplots in Abbildung 4.7 ergibt sich, dass die Kameras im relevanten Bildzentrum perfekt aufeinander eingestellt werden können. Nur im Randbereich der Kameras tritt eine Abweichung von einem Pixel zwischen CCD1 und CCD2 auf, was darauf hindeutet, dass der Bildausschnitt der CCD2 um einen Pixel vergrößert bzw. verzerrt ist. Im Bildzentrum tritt keine Pixelverschiebung auf, weshalb die Analyse und der Vergleich der RIKM-Bilder von beiden Kameras möglich ist.

4.2 Auswerterroutine zur Zellsegmentierung

Die Segmentierung von kontrastarmen Bildern, wie z.B. Hellfeld-Mikroskopiebilder, ist im Vergleich zu kontrastreichen Bildern, wie z.B. bei Fluoreszenzaufnahmen, schwierig. Auch bei den RIKM-Bildern, bei denen die Zelle als Objekt mit verschiedenen grauen und dunklen Intensitätsbereichen auf einem einheitlichen grauen Hintergrund dargestellt ist, sind Anforderungen an das Segmentierungsverfahren notwendig, um zuverlässig alle relevanten Parameter aus den Interferenzmustern der Zellen auslesen zu können. Eine einfache histogrammbasierte Bildsegmen-

tierung über die Anwendung eines Intensitätsgrenzwertes ist hier nämlich nicht möglich, da das Interferenzmuster der Zelle Intensitäten mit helleren und dunkleren Werten als die Hintergrundintensität besitzt. Das Bildanalyseprogramm muss die Zellen auf den RIKM-Bildern detektieren und segmentieren können und danach möglichst automatisiert die Zelldaten generieren. Grundsätzlich gibt es verschiedene Ansätze zur Segmentierung eines Bildes. Diese Ansätze sind kanten-, regionen-, histogramm- oder clusterbasierte Verfahren. Im folgenden Abschnitt wird der in dieser Arbeit verwendete Segmentierungsalgorithmus vorgestellt.

Als Grundlage für den hier entwickelten Auswertungsalgorithmus diente der Segmentierungsalgorithmus mit Kantendetektionsoperatoren des Programms MATLAB (R2007b; The MathWorks, USA), der im Rahmen dieser Arbeit für die RIKM-Bilder und die auftretenden Fragestellungen modifiziert wurde. Kantendetektionsoperatoren detektieren Unterschiede im Kontrastverhältnis zwischen dem Objekt und dem Hintergrund und berechnen daraus ein entsprechendes Kantenbild. Dazu wird jeder Bildpunkt durch eine Berechnung mittels einer Matrix neu gesetzt. Es werden aber keine Matrixoperationen, sondern eine diskrete Faltung durchgeführt, weshalb man die Matrix eher als Filtermaske ansehen kann. Es gibt verschiedene Kantendetektionsoperatoren, die unterschiedliche Filtermasken verwenden.

Die Segmentierung der Zelle im RIKM-Bild erfolgte in acht Schritten, die in Abbildung 4.8 anhand eines RIKM-Bildes einer PatuS Zelle gezeigt sind. Beim ersten Schritt (Bild 4.8A) wurde das RIKM-Bild eingelesen.

Im zweiten Schritt (Bild 4.8B) wurde eine binäre Gradientenmaske vom Originalbild erstellt. Durch den Unterschied im Kontrastverhältnis zwischen Zelle und Hintergrund ist es möglich mit Operatoren diese Kontraständerungen zu detektieren und die Informationen in eine binäre Gradientenmaske umzuwandeln. Für die Anwendung der Gradientenmaske standen verschiedene Operatoren wie z.B. der Roberts-, Canny-, Prewitt- oder der Sobel-Operator zur Verfügung. Nach Testen der verschiedenen Operatoren fiel die Wahl auf den Sobel Operator. Dieser berechnet die erste Ableitung der Bildpunkt-Helligkeitswerte, wobei gleichzeitig orthogonal zur Ableitungsrichtung geglättet wird. Durch die Faltung mittels einer 3x3-Matrix erzeugt der Algorithmus ein Gradientenbild. Dabei sind die Bereiche der größten Intensität dort, wo sich die Helligkeit des Originalbildes am stärksten ändert und somit die größte Kante darstellt. Nach der Faltung wird ein Schwellwert angewendet, um festzulegen ab welcher Gradientenstärke die Kante erkannt werden soll. Dieser Schwellwert kann auch manuell je nach Bildqualität angepasst werden.

In Schritt 3 des Segmentierungsalgorithmus (Bild 4.8C) wurde eine morphologische Operation der Gradientenmaske, die Dilatation, ausgeführt. Die Dilatation führt zur Schließung von Vordergrundsegmenten und zum Verbinden von nahe beieinander liegenden Segmenten, sodass die Segmente größer werden. Das binäre Bildobjekt wird so systematisch durch die Dilatation ausgedehnt, indem ein Strukturelement (horizontal und vertikal) als eine Art Filtermaske mit dem Befehl der Änderung eines Pixel von 0 zu 1, wenn mindestens ein Nachbapixel 1 ist, über alle Bildpositionen geschoben wird. Die Kontur ist nach Schritt 3 besser zu erkennen.

Die dunklen Stellen innerhalb der Kontur des Objektes wurden im vierten Schritt (Bild 4.8D) aufgefüllt, d.h. von 0 auf 1 gesetzt.

In Schritt 5 (Bild 4.8E) wurden mit der „imclearborder“-Funktion alle zusammen hängenden Objekte, die Kontakt zu mindestens einem Bildrand hatten, gelöscht (d.h. von 0 auf 1 gesetzt).

Um die isolierten Störpixel zu entfernen und das Objekt natürlicher aussehen zu lassen, wurde im nächsten Schritt (Bild 4.8F) eine zweifache Erosion mit einem Diamant-Strukturelement durchgeführt. In diesem Schritt wurde auch die Ausdehnung der Kontur durch die Dilatation von Schritt 3 wieder rückgängig gemacht, sodass die Kontur der Zelle nun wieder deckungsgleich

mit der Kontur der Zelle im RIKM-Bild war.

In Schritt 7 (Bild 4.8G) wurden alle Objekte, die kleiner als eine bestimmte, festgelegte Größe sind, eliminiert. Somit konnten kleine Strukturen im Bild außerhalb der Zelle entfernt werden.

Im letzten Schritt (Bild 4.8H) wurde das segmentierte Bild angezeigt. Stimmt die errechnete Umrandung noch nicht exakt mit der Kontur der Zelle überein, so musste in Schritt 2 der Schwellenwert der Sobel-Operation geändert werden.

Mit den Informationen der Umrandung der Zelle, konnten nun Parameter aus dem RIKM-Bild der Zelle ausgelesen werden. Wichtige Parameter für die Analyse und Identifikation des Adhäsionsverhaltens waren z.B.:

- Zellfläche.
- Länge der Haupt- und Nebenachse einer, an die Zelle gefitteten Ellipse.
- Umfang der Zelle.
- Exzentrizität. Sie gibt Informationen über die Form der Zelle. Sie wird berechnet über das Verhältnis des Abstandes der beiden Brennpunkte und der Hauptachse einer Ellipse. Ist der Wert 0 so liegt ein Kreis vor, bei einem Wert von 1 handelt es sich um eine Linie. Damit können Aussagen über die Polarisation der Zelle getroffen werden.
- Minimaler (I_m) und maximaler (I_M) Intensitätswert. Diese beiden Werte werden zur Grenzwertberechnung (siehe Abschnitt 4.3.2) für die Unterscheidung von adhärennten und nicht adhärennten Bereichen der Zelle, gebraucht.
- Histogramm der Intensitätswerte. Nach der Analyse der Histogramme können auch Schwellenwerte gesetzt werden um eine Unterscheidung von adhärennten und nicht adhärennten Bereichen der Zelle zu treffen.
- 3D-Oberflächenplot.

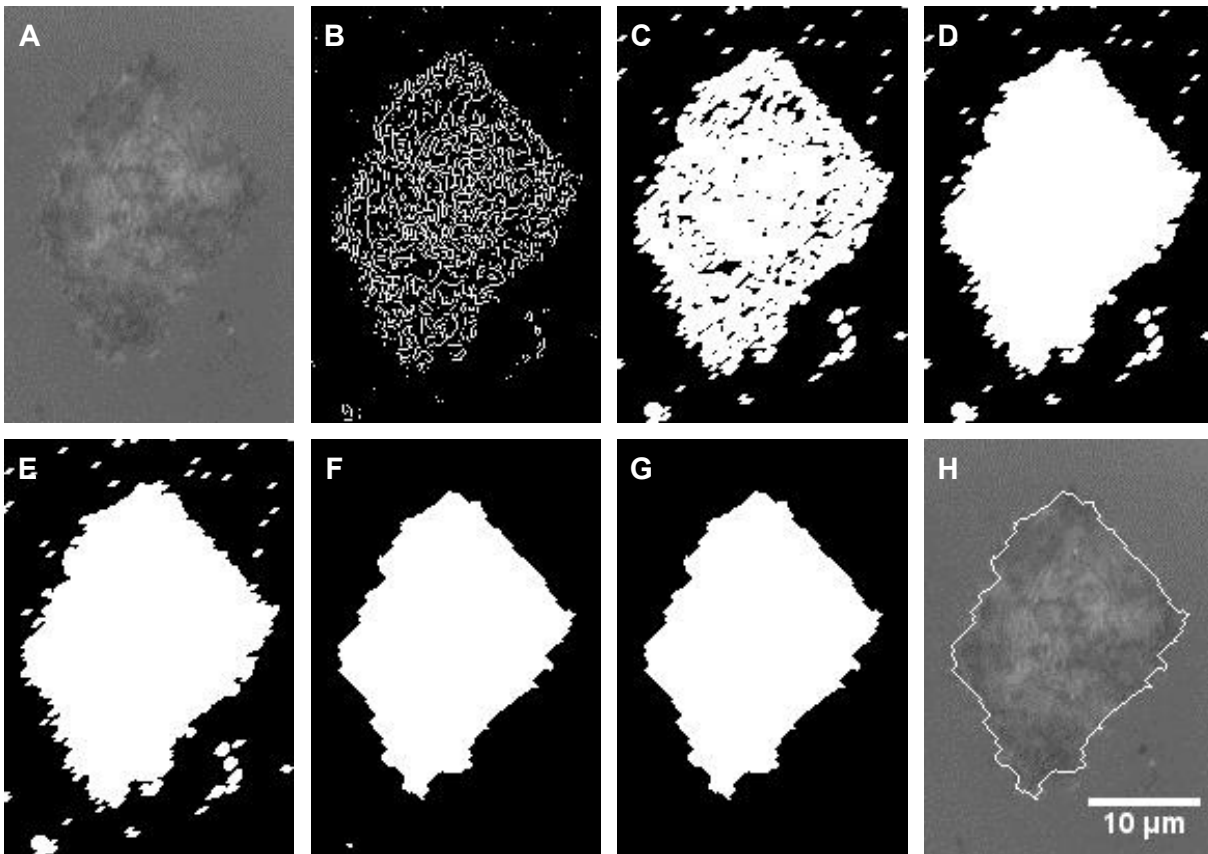


Abbildung 4.8: Bildbearbeitungsschritte zur Segmentierung einer Zelle im RIKM-Bild. Die Segmentierung verläuft in acht Schritten. (A): Originalbild, (B): Gradientenmaske, (C): Dilatation, (D): Auffüllung von Pixeln innerhalb der Kontur, (E): Eliminierung von Pixeln am Bildrand, (F): Erosion, (G): Eliminierung von kleinen Objekten außerhalb der Kontur, (H): Segmentiertes Bild. Das RIKM-Bild zeigt eine PatuS Zelle. Maßstab: 10 μm .

4.3 Analyse und Bestimmung der adhäsiven Zellbereiche

Ein wichtiger Aspekt für die Analyse von Adhäsionskinetiken der Zellen ist die Beobachtung der adhärennten Fläche. Da die interferometrische RIKM die Visualisierung von Kontaktzonen ermöglicht, können mit der Analyse der RIKM-Bilder diese Informationen ausgelesen und genutzt werden. Als Schwierigkeit stellt sich jedoch heraus, den Abstand zu bestimmen ab dem man von Adhäsionsbereichen der Zelle sprechen kann. Prinzipiell ist in der Literatur eine Einteilung in drei Kontaktbereiche (sehr eng, eng und fern) weit verbreitet (Izzard und Lochner, 1976; Chen et al., 1997; Truskey et al., 1992; Adams, 1997).

Izzard und Lochner (1976) klassifizierten die verschiedenen Grautöne eines Interferenzreflexionsmikroskopie (IRM)-Bildes, was vergleichbar mit einem RIKM-Bild, aber kontrastarmer ist (siehe Abschnitt 2.7.1). Dunkelgraue oder schwarze Regionen bezeichneten sie als sehr enge Kontakte, die einen Zell-Substrat-Abstand von 15-30 nm repräsentieren. Graue bis hellgraue Bereiche, die aber noch dunkler als der Hintergrund sind, repräsentieren Bereiche mit intermediärem Kontakt zum Substrat (30-50 nm) und wurden als enge Kontakte deklariert. Weiße Regionen wurden als ferne Kontakte bezeichnet und stellen den größten Zell-Substrat-Abstand von zirka 100 nm dar. Bereiche, in denen die Zelle nicht in Kontakt mit dem Substrat ist (>100 nm) entsprechen der

Farbe des Hintergrunds. Enge Kontakte sind generell diffuse, irregulär geformte Strukturen, die in ihrer Größe und Verteilung variieren. Im Gegensatz dazu sind Regionen des sehr engen Kontakts, in Form von FAs, definierter. FAs erscheinen als dunkle Streifen, die normalerweise senkrecht zu den hinteren Enden der Lamellen sind, wo die Einziehbewegung der Zelle stattfindet.

Da die FA aufgrund ihres Aussehens klar differenzierbare Strukturen darstellen, wurden FAs auch schon früher als dunkle Stellen im RIKM-Bild (Abercrombie und Dunn, 1975; Riveline et al., 2001; Holt et al., 2008) und als Regionen engen Kontakts zum Substrat in der Transmissionselektronenmikroskopie (Chen und Singer, 1982) identifiziert. Case und Waterman (2011) zeigten in einem kombinierten Experiment mit TIRFM und IRM, dass das Auftreten von Integrin-Wellen räumlich und zeitlich mit propagierenden Regionen der IRM-Intensität übereinstimmt. Aufgrund der vielfachen Untersuchung der FA stellen diese einen geeigneten Marker für die Klassifizierung von festen Adhäsionen dar.

Um die Übereinstimmung von dunklen Bereichen im RIKM-Bild mit fokalen Adhäsionen zu überprüfen, wurden 2λ -RIKM-Bilder der PatuT Zellen mit Fluoreszenzaufnahmen von FAs verglichen. Dabei wurde für die immunzytochemische Anfärbung das mit Fokaladhäsionen assoziierte Protein Paxillin verwendet. Paxillin dient als Andockprotein um Signalmoleküle zu den fokalen Adhäsionen zu rekrutieren (Schaller, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die fokalen Adhäsionen mit dunklen Stellen im RIKM-Bild für beide verwendeten Wellenlängen übereinstimmen (siehe Abbildung 4.9). Welchen Anteil die FA an der Adhäsionsfläche der Zelle einnehmen wird später im Abschnitt 4.4.3 näher erläutert.

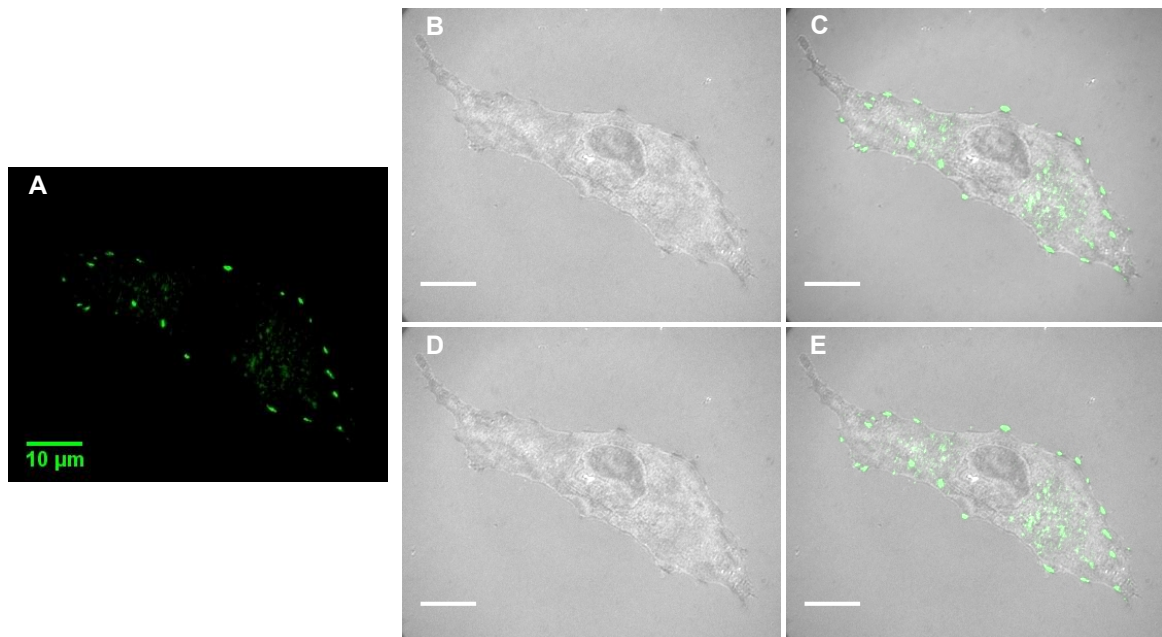


Abbildung 4.9: Vergleich eines Fluoreszenzbildes von fokalen Adhäsionen mit RIKM-Bildern. (A) zeigt eine fixierte PatuT Zelle, in der Paxillin immunzytochemisch, fluoreszierend angefärbt wurde. (B) und (D) zeigen die dazugehörigen RIKM-Bilder für die beiden Wellenlängen $\lambda_1 = 593$ nm und $\lambda_2 = 545$ nm. (C) und (E) zeigen die jeweiligen Überlagerungen mit dem Fluoreszenzbild. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Es zeigt sich, dass mit der Theorie der RIKM und mit der aus der Literatur bekannten Untersuchungen zu Zellabständen (Abercrombie und Dunn, 1975; Izzard und Lochner, 1976; Adams,

2001; Case und Waterman, 2011) die dunklen Bereiche im RIKM-Bild als Bereiche angesehen werden können, bei denen sich die Membran der Zelle nahe am Substrat befindet. Je näher die Zelle dem Substrat kommt, desto dunkler sind die Bereiche im RIKM-Bild, weshalb die dunklen Bereiche als Merkmal für feste Adhäsionen der Zelle angenommen werden kann. Somit kann über die Bestimmung von Intensitätswerten im RIKM-Bild, zwischen verschiedenen Abständen der Zelle zum Substrat differenziert werden.

4.3.1 Einfluss unterschiedlicher Wellenlängen auf die Analyse der RIKM-Bilder

Bei der Festsetzung eines Intensitätsgrenzwertes für das RIKM-Bild, muss beachtet werden, dass der eingesetzte Intensitätswert bei unterschiedlichen Wellenlängen auf unterschiedliche Abstände führt. Je kleiner die verwendete Wellenlänge bei der RIKM ist, desto sensibler reagiert sie auf Variationen im Zell-Substrat-Abstand. Die Abbildung 4.10, in der die relative Intensität der beiden verwendeten Wellenlängen bei der Untersuchung eines reflektierenden Objektes mit einem Abstand von 0-100 nm zur Oberfläche dargestellt ist, zeigt, dass bei Anwendung eines Intensitätsgrenzwertes unterschiedliche Abstandsbereiche bei den verschiedenen Wellenlängen mit einbezogen werden. Bei dem Intensitätsgrenzwert von 0,4 für die relative Intensität werden beispielsweise für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm Zellbereiche mit Abständen von 0-49 nm als adhärenente Bereiche deklariert, wohingegen für die Wellenlänge $\lambda_2 = 546$ nm nur die Bereiche als adhärenent angesehen werden, bei der die Zelle einen Abstand von 0-45 nm zur Oberfläche besitzt. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit eine andere Herangehensweise zu Berechnung eines Grenzwertes für Bestimmung von Adhäsionsbereichen der Zelle verwendet. Dabei wurde ein fester Abstand festgesetzt, unter dem die Zelle als adhärenent angesehen wird, und der dazugehörige Intensitätsgrenzwert für die beiden verwendeten Wellenlänge bestimmt, was im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

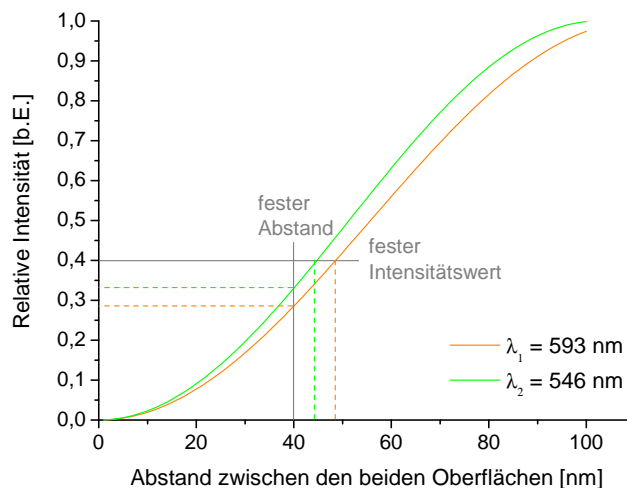


Abbildung 4.10: Ausschnitt der Intensitätsplots der beiden verwendeten Wellenlängen in der RIKM für die Abstände 0-100 nm zwischen der Oberfläche und dem reflektierenden Objekt. Die Anwendung eines Grenzwertes der Intensität weist für verschiedene Wellenlängen unterschiedlich große Abstandsbereiche auf. Für diese Arbeit wurde ein fixer Zell-Substrat-Abstand von 40 nm festgesetzt und die jeweilige Grenzwertintensität der beiden Wellenlängen bestimmt.

4.3.2 Bestimmung eines Grenzwertes zur Darstellung der Adhäsionsbereiche als Binärbild (Min-Max-Methode)

Die Grauwerte im RIKM-Bild von Zellen werden im Gegensatz zu Vesikeln oder Beads nicht nur durch den Abstand zwischen Zelle und Substrat bestimmt. Zellen sind inhomogener im Hinblick auf ihre internen Brechungsindizes, da z.B. der Brechungsindex des Intrazellulärraums zwischen 1,36 und 1,4 schwanken kann (Bereiter-Hahn et al., 1979) oder der Brechungsindex der Membran durch interne Strukturen wie z.B. Stressfasern oder durch Variationen der Membranzusammensetzung unterschiedlich sein kann. Außerdem können zusätzliche Reflexionen von inneren membrangebundenen Strukturen, wie z.B. dem Zellkern auftreten. Ein weiterer Aspekt, der bei der Interpretation der RIKM-Bilder berücksichtigt werden muss ist, dass auch Reflexionen von der Oberseite der Zelle, insbesondere von dünnen Strukturen der Zellen, wie z.B. Lamellipodien, auftreten können (Bereiter-Hahn et al., 1979; Verschueren, 1985).

Aufgrund dieser Aspekte, die bei der Interpretation der RIKM-Bilder von Zellen beachtet werden müssen, wurde in dieser Arbeit eine semi-quantitative Methode zur Analyse der Adhäsionsfläche angewandt (Pierres et al., 2002; Limozin und Sengupta, 2009). Dabei wird durch die Eingabe eines Grenzwertes der Intensität (I_G) zwischen adhärennten und nicht adhärennten Bereichen unterschieden und diese als Binärbild visualisiert. Dabei wird nicht ein Intensitätswert des RIKM-Bildes genau einem Abstand von Zelle und Substrat zugeordnet, sondern viel mehr ein bestimmter Intensitätsbereich einem Bereich, der die Adhäsionsfläche widerspiegelt, zugeordnet. Je höher der Grenzwert I_G gesetzt wird, desto mehr Stellen im RIKM-Bild werden als adhärennte Bereiche markiert (siehe Abbildung 4.11).

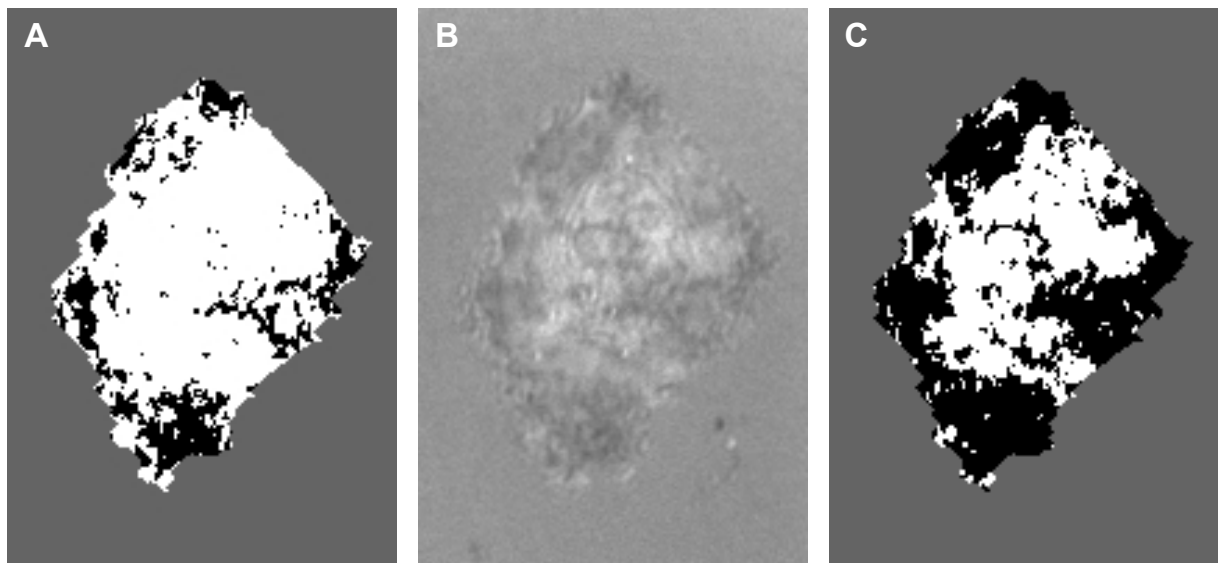


Abbildung 4.11: Einfluss der Anwendung eines Grenzwertes auf das RIKM-Bild einer PatuS Zelle. (A) zeigt das Binärbild bei Anwendung eines niedrigen, (C) bei Anwendung eines hohen Grenzwertes auf das RIKM-Bild (B).

Die Formel zur Bestimmung eines Grenzwertes für die RIKM-Bilder wird im Folgenden hergeleitet. Als Ausgang dient die Formel 2.4 aus Abschnitt 2.7.1 zur Berechnung der Intensität I am Punkt (x,y) im Interferogramm:

$$I(h(x, y), \lambda) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi nh(x, y)}{\lambda} + \phi\right) \quad (4.1)$$

Sie kann bei der Verwendung der Abkürzungen für die Summe S ($S = I_M + I_m$) und die Differenz D ($D = I_M - I_m$) der maximalen Intensität I_M (Formel 4.2) und der minimalen Intensität I_m (Formel 4.3) und der Gegebenheit, dass die Phasenänderung ϕ des Lichtes bei Reflexion gleich π ist ($\phi = \pi$), in Formel 4.4 umgeschrieben werden.

$$I_M = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \quad (4.2)$$

$$I_m = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1 I_2} \quad (4.3)$$

$$2I = S - D \cos\left(\frac{4\pi nh}{\lambda}\right) = I_M + I_m - \left[(I_M - I_m) \cos\left(\frac{4\pi nh}{\lambda}\right)\right] \quad (4.4)$$

Nach Umstellung der Formel 4.4 erhält man die Formel 4.5, in der man den linken Term vereinfacht als x darstellt (Formel 4.6):

$$\frac{2I - I_M - I_m}{I_M - I_m} = -\cos\left(\frac{4\pi nh}{\lambda}\right) \quad (4.5)$$

$$x = -\cos\left(\frac{4\pi nh}{\lambda}\right) \quad (4.6)$$

Da der Brechungsindex n des Mediums und die Wellenlänge λ im Experiment bekannt sind, kann nun durch Festlegung eines kritischen Abstandes (h) zwischen Zelle und Substrat der Wert für x berechnet und in Formel 4.5 mit $I = I_G$ eingesetzt werden, sodass man die Grenzwertformel 4.7 erhält:

$$I_G = \frac{I_M(x + 1) + I_m(1 - x)}{2} \quad (4.7)$$

Für die in dieser Arbeit verwendeten Parameter a) $\lambda = 546$ nm; $n = 1,33$ und b) $\lambda = 593$ nm; $n = 1,33$ und der Annahme eines Abstandes von Zelle und Substrat von $h = 40$ nm, erhält man die beiden Grenzwertformeln 4.8 und 4.9:

$$a) I_G = 0,331 I_M + 0,669 I_m \quad (4.8)$$

$$b) I_G = 0,285 I_M + 0,715 I_m \quad (4.9)$$

Alle Pixel im RIKM-Bild der segmentierten Zelle mit einer Intensität $I < I_G$ werden somit als Adhäsionsbereiche der Zelle definiert. Diese Pixel werden schwarz und die Pixel mit einer höheren Intensität $I > I_G$, weiß dargestellt. Somit entsteht ein Binärbild der Zelle, das den Anteil und die Verteilung der Kontaktzonen innerhalb der Zelle aufzeigt. [Davies et al. \(1993\)](#) bestimmten mit

Tandem-Scanning-Konfokalmikroskopie, dass der Abstand von Kontaktzonen zwischen epithelialen Zellen und einem Substrat immer kleiner als 50 nm ist. Andere experimentelle Studien zeigten einen Abstand zwischen 20 und 40 nm, was vereinbar ist mit den, aus der Literatur bekannten Längen von Adhäsionsrezeptoren (Heath, 1982; Dustin und Cooper, 2000; Pierres et al., 2002). Die Arbeiten von Kanchanawong et al. (2010) führten mit Hilfe hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie zu dem Ergebnis, dass die Integrine und das Aktin vertikal durch einen ca. 40 nm breiten „Fokaladhäsionskern“ getrennt sind, der aus vielen, teilweise sich überlappenden, proteinspezifischen Schichten zusammengesetzt ist. Diese Informationen aus der Literatur dienen dazu, dass in dieser Arbeit der Abstand h zwischen Zelle und Substrat, der zur Aufteilung von adhärennten und nicht adhärennten Bereichen der Zelle genutzt wird, auf $h = 40$ nm festgesetzt wurde.

Ein entscheidender Vorteil dieser Grenzwertmethode ist, dass Formel 4.5 auch gültig bleibt, wenn alle Intensitäten z.B. einer linearen Transformation (Hintergrundsubtraktion oder Histogrammexpansion) unterzogen werden. Da die Formel auch das Verhältnis von minimaler und maximaler Intensität berücksichtigt, kompensiert dies z.B. Intensitätsschwankungen der Xe-Lampe, sodass auch Grenzwertbilder von Zellen verschiedener Experimentiertage verglichen werden können, in denen die Hintergrundintensität, aufgrund von Schwankungen der Xe-Lampe, vielleicht nicht exakt gleich war. Statistische Fehler in der Bestimmung der minimalen und maximalen Intensität können durch Auftreten von einzelnen Störpixeln im Bild vorkommen, und kann durch Filterung des RIKM-Bildes mit einem Medianfilter deutlich reduziert werden (Pierres et al., 2002).

Vergleich der Min-Max-Methode zur Grenzwertbestimmung mit der Min-Hintergrund-Methode

Eine weitere Möglichkeit den Grenzwert für die Berechnung der adhärennten Flächen zu bestimmen, ist über die Einbeziehung der Hintergrundintensität und der minimalen Intensität der Zelle. Der Hintergrund des RIKM-Bildes besitzt die Intensität bei der keine Reflexion am Objekt stattfindet. Die dunklen Stellen innerhalb des RIKM-Bildes der Zelle besitzen den Intensitätswert, der durch destruktive Interferenz der reflektierten Strahlen am Glas und an der Zelle zustande kommt. Als Grenzwert für die Intensität könnte der Mittelwert zwischen der Hintergrundintensität (wo kein Kontakt der Zelle mit dem Substrat vorliegt) und der minimalen Intensität (wo die Zelle den engsten Kontakt ausbildet) gesetzt werden, da man bei diesem Wert genau zwischen den beiden, hier relevanten, möglichen Extremen liegt. Zum Test wurde die Zeitreihe einer Zelle mit je 116 Bildern für beide Wellenlängen mit der Min-Hintergrund-Methode und mit der in dieser Arbeit verwendeten Min-Max-Methode zur Grenzwertbestimmung (siehe Abschnitt 4.3.2) verglichen. Dazu wurde für die beiden verwendeten Wellenlängen die Hintergrundintensität der Bilder von einer Fläche von ca. 2200 Pixeln am oberen und unteren Bildbereich bestimmt und gemittelt. Dieser Wert wurde durch die minimale Intensität im Bild geteilt und dann mit den in den Formeln 4.8 und 4.9 berechneten Grenzwerten verglichen (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Vergleich von verschiedenen Grenzwertberechnungen der Intensität, mit der Min-Max-Methode und der Min-Hintergrund-Methode. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung.

Wellenlänge λ [nm]	Grenzwert I_G der Min-Max-Methode	Grenzwert I_G der Min-Hintergrund-Methode
546	$112,3 \pm 11,9$	$111,8 \pm 2,7$
593	$145,0 \pm 7,2$	$137,6 \pm 3,6$

Innerhalb der Fehlerbalken stimmen die berechneten Grenzwertintensitäten der beiden Methoden überein. Somit erweisen sich beide Methoden als geeignet zur Grenzwertbestimmung. Die Min-Max-Methode besitzt den Vorteil, dass man je nach Untersuchungsschwerpunkt, den Abstandsbereich durch Angabe eines Wertes für h frei wählen kann, wohingegen bei der Min-Hintergrund-Methode kein definierter Abstand eingesetzt werden kann, sondern nur eine Näherung (Mittelwert zwischen engstem Kontakt und keinem Kontakt) vorliegt.

4.3.3 Verfahren zur Berechnung der Adhäsionsfläche aus zwei Wellenlängen

Aufgrund der schon in Abschnitt 4.3.2 erläuterten Aspekte, dass Veränderungen im Brechungsindex der Zellmembran auch zu Variationen in der Intensitätsverteilung des RIKM-Bildes führen, ist es nötig scheinbare Unterschiede im Abstand zwischen Zelle und Substrat durch Berücksichtigung einer zweiten Wellenlänge auszuschließen (siehe Abschnitt 2.7.2). Dazu werden die Grenzwertbilder beider untersuchten Wellenlängen durch einen Additionsprozess verglichen. Die Fläche der Zelle ist als Binärbild mit weißen und schwarzen Bereichen dargestellt. Nur die Flächen, die in den Binärbildern der Zellen beider Wellenlängen schwarz sind und somit Adhäsionsbereiche der Zelle darstellen, werden auch im Additionsbild schwarz angezeigt und damit als adhärenter Bereich deklariert.

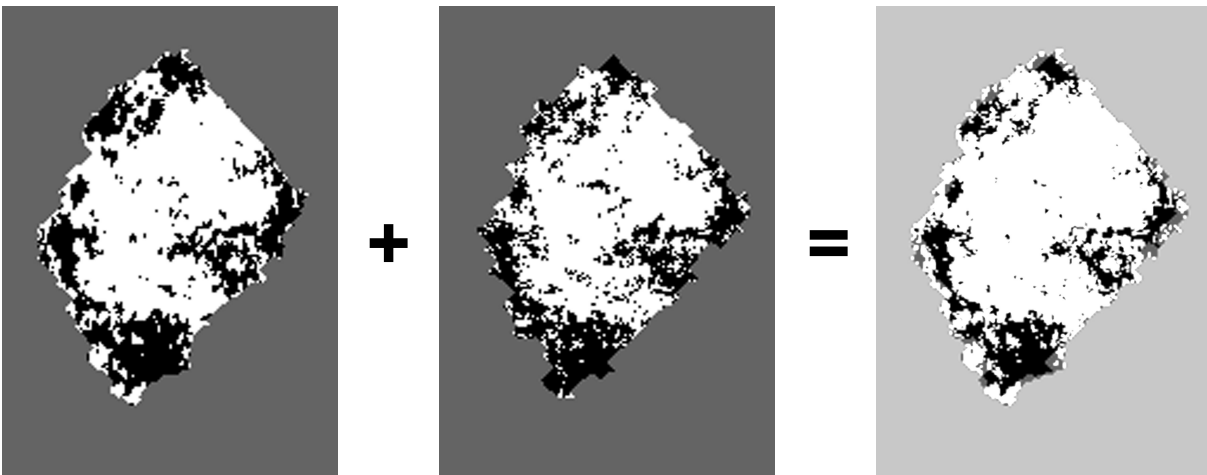


Abbildung 4.12: Addition der beiden Grenzwertbilder. Die Grenzwertbilder der beiden Wellenlängen ($\lambda_1 = 593$ nm und $\lambda_2 = 546$ nm) zeigen die Zelle als Binärdarstellung mit schwarzen Adhäsionsbereichen und weißen Bereichen, die weiter als 40 nm von der Oberfläche entfernt sind. Durch Addition der beiden Bilder können aus dem resultierenden Bild die Adhäsionsbereiche ausgelesen werden. Nur die Bereiche, die in beiden Grenzwertbildern schwarz gekennzeichnet waren, sind auch im Additionsbild schwarz und stellen somit Adhäsionsbereiche dar.

Nur die Addition von zwei schwarzen Bereichen resultiert auch in einem schwarzen Bereich im Additionsbild. Die aus den beiden Wellenlängen berechnete Adhäsionsfläche ist geringer als die Adhäsionsflächen der einzelnen Wellenlängen. Durch den Additionsprozess kann sie nur kleiner bzw. im optimalen Fall gleich groß wie die Flächen in den beiden Ursprungsbildern sein. Diese verkleinerte Adhäsionsfläche deutet darauf hin, dass es bei den unterschiedlichen Wellenlängen durch Unterschiede im Brechungsindex der Zellmembran zu unterschiedlichen Grauwertverteilungen im RIKM-Bild kommt. Dies zeigt, dass es für die Bestimmung von Zelladhäsionsflächen sinnvoll ist zwei Wellenlängen zu verwenden. Man muss jedoch beachten, dass bei nicht deckungsgleichen Kameras, der Wert der aus den zwei Wellenlängen resultierenden Adhäsionsfläche verfälscht werden kann, worauf bei der Justierung immer geachtet werden muss.

4.3.4 Zusammenfassung: Methodischer Teil der RIKM

Mit dem Aufbau der Dreiwellenlängen-RIKM ist es möglich die Topografie von Vesikeln und Beads über einem Substrat zu visualisieren und dadurch exakte Abstandsinformationen zwischen dem Objekt und dem Substrat zu gewinnen. Bei der Untersuchung von Zellen muss aufgrund der Inhomogenität des Brechungsindex der Zelle auf eine nicht absolute, sondern relative Abstandsinformation zurückgegriffen werden. Je mehr Wellenlängen genutzt werden, desto größer wird die Spanne ab welchem Punkt keine eindeutige Abstandsinformation mehr möglich ist. Liegt diese Spanne bei der Einwellenlängen-RIKM noch bei 100 nm, kann sie bei der Verwendung von zwei Wellenlängen schon auf mehrere hundert Nanometer erhöht werden (Monzel et al., 2009; Picart et al., 2004). Um Objekte höher als 800 nm messen zu können muss eine dritte Wellenlänge betrachtet werden (Schilling et al., 2004).

Für die Zellexperimente wurden zwei der drei möglichen Wellenlängen des Setups genutzt. Da sich bei der Untersuchung von Zellen die adhärierende Zellmembran zwangsläufig an der Oberfläche befindet, ist keine verbesserte Höheninformation, die man mit drei Wellenlängen erreicht, nötig, da im Fall der Zelladhäsion der relevante Abstandsbereich zwischen 0-100 nm liegt (Bruinsma et al., 2000). Den Abstandsbereich von 0-100 nm könnte man bei Objekten mit homogenem Brechungsindex, auch schon mit einer Wellenlänge absolut bestimmen, bei Zellen jedoch nicht. Da das verwendete Antiflex-Objektiv vom Typ „plan-Neofluar“ ist, erzeugt es zwar hochqualitative Abbildungen bei der Anwendung mit monochromatischem Licht, weist aber chromatische Aberrationen bei mehrfarbiger Anwendung auf. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit bei der 2λ -RIKM zwei Kameras genutzt.

Die Auswertung der RIKM-Bilder von Zellen konnte durch den ausgewählten Segmentierungsalgorithmus automatisiert erfolgen. Die Grenzwertbestimmung mit der semi-quantitativen Min-Max-Methode stellte ein gutes Verfahren zur Visualisierung von Adhäsionsbereichen der Zelle dar. Mit dem Vergleich der Grenzwertbilder von zwei Wellenlängen konnte eine genauere Quantifizierung der Adhäsionsbereiche der Zellen erreicht werden.

4.4 Adhäsionsverhalten der Zelllinien PatuT und PatuS auf biofunktionalisierten Oberflächen

In Vorversuchen für die RIKM wurde das Adhäsionsverhalten der beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS auf, mit verschiedenen Proteinen beschichteten, Deckgläsern untersucht. Da-

bei wurden die Faserproteine Kollagen, Laminin und Fibronectin, welche die Hauptkomponenten der EZM darstellen, getestet, um herauszufinden auf welchem Protein das beste Adhäsionsverhalten vorliegt (Daten nicht gezeigt). Diese drei Proteine wurden gewählt, da beide Zelllinien die nötigen Integrinrezeptoren für diese Art der Adhäsion exprimieren (siehe Abbildung 3.3). In guter Übereinstimmung mit [Vogelmann et al. \(1999\)](#) konnte die beste Adhäsion der Zellen auf der Kollagenbeschichtung erzielt werden, weshalb die weiteren RIKM-Messungen auf Kollagen beschichteten Glasoberflächen durchgeführt wurden. Ein weiterer Grund für die Wahl der Kollagenbeschichtung lag darin, dass hier für beide Zelllinien bei der gleichen Kollagenkonzentration die besten Ergebnisse erzielt werden konnten ([Vogelmann et al., 1999](#)).

Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und des Zellspreitens der beiden Geschwisterzelllinien wurden Kollagen beschichtete Deckgläser, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellen darauf ausgesät. Das Adhäsionsverhalten wurde über sechs Stunden mittels der 2λ -RIKM beobachtet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in der ersten Stunde nach Aussaat im Zweiminutentakt, in den restlichen Stunden, im Fünfminutentakt. Die Analyse der RIKM-Bilder wurde mit den in Abschnitt 4.2 und 4.3.2 beschriebenen Bildbearbeitungen und Grenzwertberechnungen durchgeführt. Zur Übersicht des dynamischen Verhaltens der beiden Geschwisterzelllinien ist in Abbildung 4.13 der zeitliche Verlauf des Wachstums der projizierten Zellfläche und der Adhäsionsfläche innerhalb der ersten sechs Stunden nach Aussaat auf dem Substrat gezeigt. Die projizierte Zellfläche stellt dabei die gesamte Zellfläche mit adhärenen und nicht adhärenen Bereichen dar, wohingegen die Adhäsionsfläche nur den Anteil angibt, der bei der Grenzwertberechnung als adhärenter Bereich deklariert wurde. Dabei wurden in der Abbildung beispielhaft nur die Daten der projizierten Zellfläche und der Adhäsionsfläche für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm gezeigt. Die 2λ -Adhäsionsfläche stellt die Fläche dar, die nach dem Additionsprozess der beiden Binärbilder von λ_1 und λ_2 (siehe Abschnitt 4.3.3) als Adhäsionsfläche ausgegeben wird.

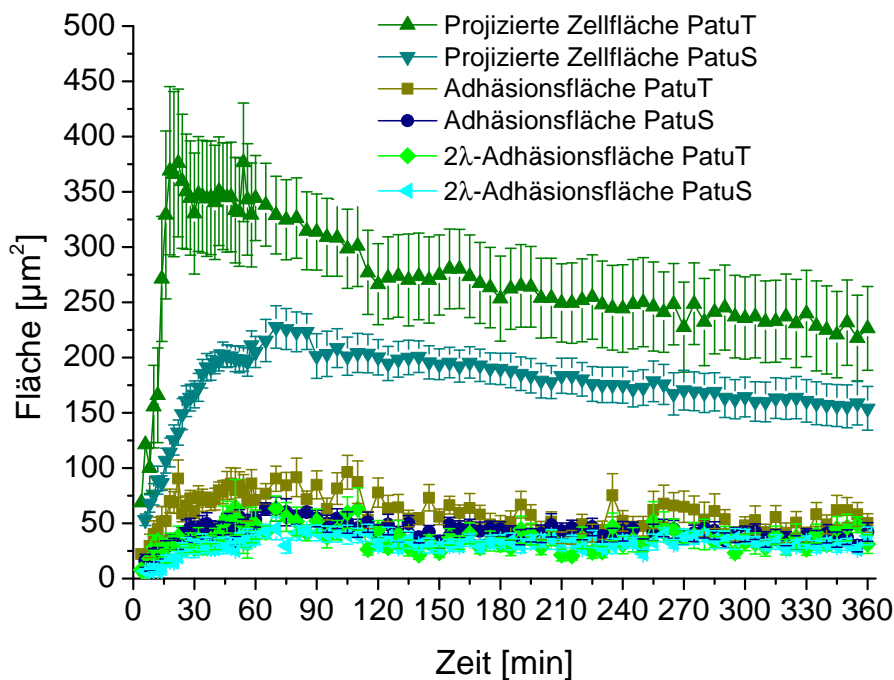


Abbildung 4.13: Kinetisches Verhalten der beiden Geschwisterzelllinien in Bezug auf ihre projizierte Zellfläche, ihre Adhäsionsfläche und ihre 2λ -Adhäsionsfläche über einen Zeitraum von 6 h. Gezeigt sind die Auswertungen für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm. Die Kurven stellen Mittelwertskurven, mit Angabe des Standardfehlers, dar.

In Abbildung 4.14 sind beispielhaft die RIKM-Bilder mit den dazugehörigen Grenzwertbildern einer ausgewählten *PatuT* und einer *PatuS* Zelle gezeigt. Dabei wurden Bilder aus der initialen Phase der Zelladhäsion innerhalb der ersten 60 Minuten, mit den Zeitpunkten 16, 30 und 60 min nach Aussaat, und die späte Adhäsion 360 min nach Aussaat ausgewählt. Zu allen Zeitpunkten unterschieden sich die beiden Zelllinien bezüglich ihrer projizierten Zellfläche und der Verteilung ihrer Adhäsionsbereiche. Die *PatuT* Zelle besitzt aber weniger dunkelgraue bis schwarze Bereiche im RIKM-Bild, was auch in den binären Grenzwertbildern der Zelle zu sehen ist. In den weiteren Abschnitten wird auf die Charakteristik der beiden Zelllinien hinsichtlich der verschiedenen, die Adhäsion betreffenden Parameter, eingegangen. Dabei wird auch gezielt ein Augenmerk auf die initiale Phase der Adhäsion, innerhalb der ersten Stunde nach Aussaat der Zellen, gelegt.

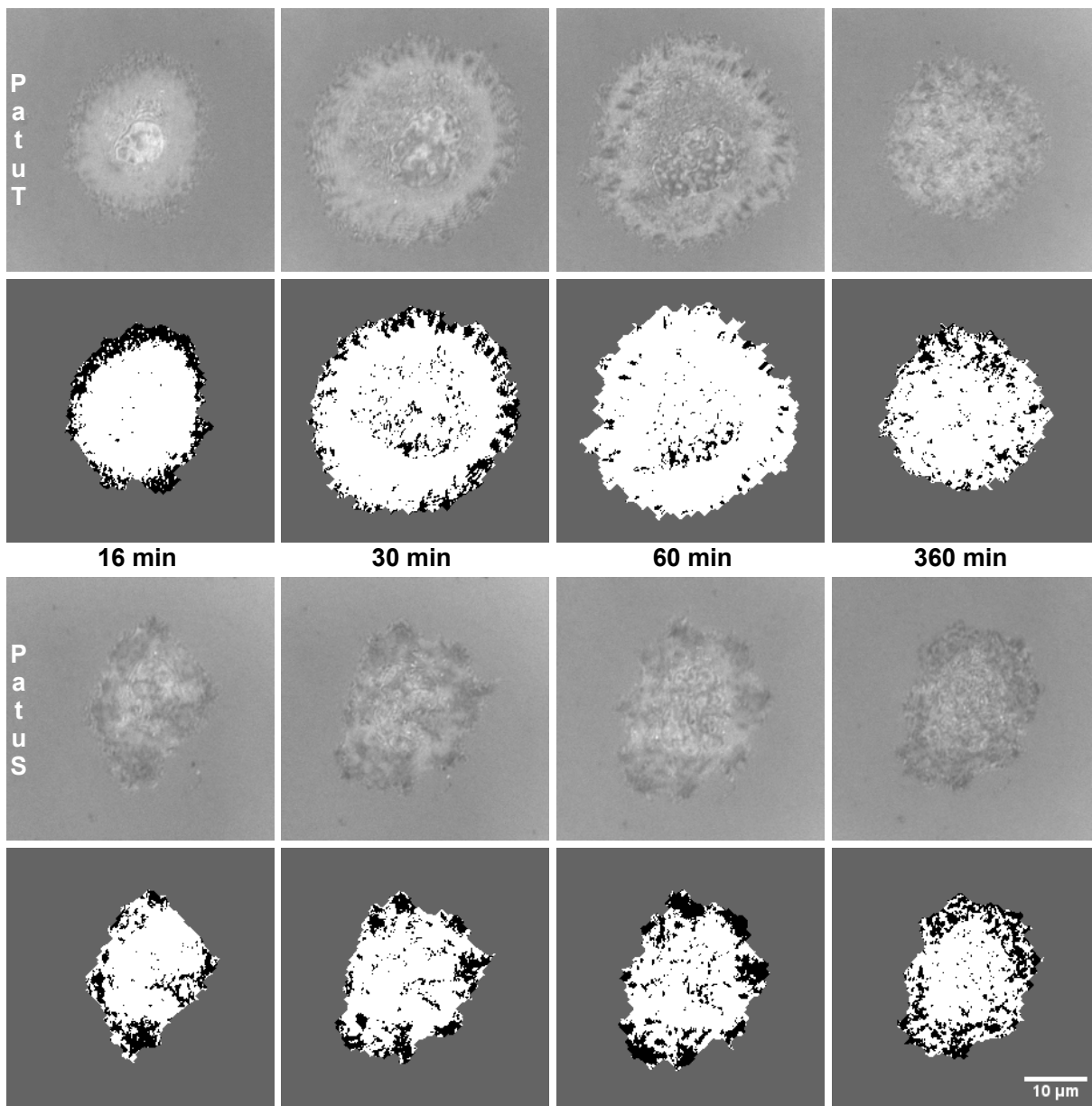


Abbildung 4.14: RIKM-Bilder und dazugehörige Grenzwertbilder nach bestimmten Adhäsionszeitpunkten (16, 30, 60 und 360 min nach Aussaat) für eine ausgewählte PatuT (oben) und eine PatuS Zelle (unten). Gezeigt sind die Auswertungen für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm. Maßstab: 10 μ m.

4.4.1 Unterschiede in der projizierten Zellfläche der beiden Geschwisterzelllinien

Die projizierte Zellfläche der beiden Zelllinien unterscheidet sich in der Größe und in der zeitlichen Entwicklung (siehe Abbildung 4.15). Die PatuT Zellen erreichen eine ca. 40 % größere Zellfläche als die PatuS Zellen. Weiterhin erreichen die PatuT Zellen ihre maximale projizierte Zellfläche nach ca. 20 min, dreimal so schnell wie ihre Geschwisterzelllinie nach ca. 70 min. Der Abfall in der projizierten Fläche nach Erreichen des Maximums ist bei den PatuT Zellen ausgeprägter als bei den PatuS Zellen (siehe Abbildung 4.15A). Das initiale Wachstum der Fläche ist für die PatuT

Zellen viel schneller und steiler als für die PatuS Zellen (siehe Abbildung 4.15B). Die PatuT Zellen starten mit einer Fläche von ca. $60 \mu\text{m}^2$ vier Minuten nach Aussaat und verdoppeln ihre Fläche innerhalb von zwei Minuten. PatuS Zellen starten mit einer kleineren Fläche von ca. $50 \mu\text{m}^2$ sechs Minuten nach Aussaat und benötigen zehn Minuten um ihre Zellfläche zu verdoppeln.

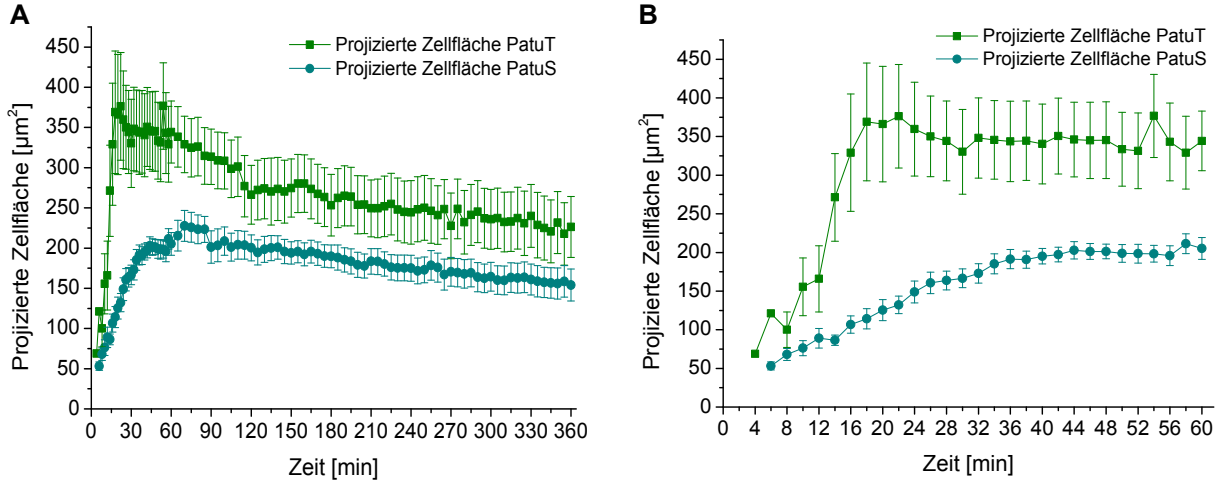


Abbildung 4.15: Zeitlicher Verlauf der projizierten Zellfläche für die beiden Zelllinien. (A) zeigt den Verlauf über die gesamte Beobachtungsdauer von 0-360 min, (B) zeigt nur den Bereich von 0-60 min. Gezeigt sind die Auswertungen für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593 \text{ nm}$.

Quantitative Beschreibung des Zellspreitens

Das Modell von [Döbereiner et al. \(2004\)](#), welches das Spreitverhalten der Zellen als Drei-Phasen-Prozess beschreibt (siehe Abschnitt 2.2), wird in dieser Arbeit für die Beschreibung des Spreitverhaltens der beiden Geschwisterzelllinien genutzt. Bei der doppelt logarithmischen Auftragung der projizierten Zellfläche der beiden Geschwisterzelllinien über die Zeit erkennt man auch hier, dass der Prozess des Zellspreitens in mehrere Wachstumsphasen aufgeteilt und als Potenzfunktion der Form

$$A = a \cdot t^{b_i} \quad (4.10)$$

gefittet werden kann, bei der sich die projizierte Zellfläche A proportional zur Zeit t^b verhält (siehe Abbildung 4.16). Die Proportionalitätskonstante a besitzt die Dimension $\mu\text{m}^2/\text{s}$ was mit der Dimension einer Diffusionskonstanten vergleichbar ist ([Döbereiner et al., 2004](#); [Sengupta et al., 2006](#); [Cuvelier et al., 2007](#)). Für beide Zelllinien sind klare Wachstumsphasen erkennbar, jede mit einem unterschiedlichen Exponenten b . Generell können auch hier 2-3 Phasen unterschieden werden. Eine initiale, schnelle Wachstumsphase gefolgt von einer langsameren Sättigungsphase (b_3), wobei die schnelle Phase noch einmal in eine etwas langsamere Anfangsphase (b_1) und eine schnellere Hauptphase (b_2) aufgeteilt werden kann (vergleiche die Exponenten b_{1-3} in den drei Fits). Die Exponenten b unterscheiden sich bei den beiden Zelllinien, zeigen aber den gleichen zuvor beschriebenen Wachstumstrend von

$$b_1 < b_2 > b_3; b_1 > b_3 \quad (4.11)$$

Alle drei Wachstumsphasen der PatuT und PatuS Zellen unterscheiden sich in ihrer Steigung voneinander. In der schnellen Hauptphase (t_2) des initialen Spreitens ist der Exponent b_2 für die PatuT Zellen ($b_{2PatuT} = 2,360 \pm 0,562$) fast dreimal so groß wie bei den PatuS Zellen ($b_{2PatuS} = 0,827 \pm 0,047$). Die Fitparameter sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. Aufgrund der unterschiedlichen Spreitdynamik der beiden Zelllinien, sind die Zeitspannen der drei einzelnen Wachstumsphasen bei den beiden Zelllinien unterschiedlich gewählt. Während bei den PatuT Zellen die Wachstumsphase nach ca. 1320 s abgeschlossen ist und ein Plateaubereich eintritt, dauert die Wachstumsphase der PatuS Zellen bis ca. 2640 s an. Die erste Phase des Zellspreitens (t_1) dauert bei beiden Zelllinien ungefähr gleich lang, beginnt bei den PatuT Zellen aber früher. Die zweite und dritte Phase des Zellspreitens sind bei den PatuT Zellen innerhalb $t_2 \approx 240$ s bzw. $t_3 \approx 360$ s beendet, wohingegen die zweite Phase bei den PatuS Zellen $t_2 \approx 1080$ s und die dritte $t_3 \approx 600$ s dauert.

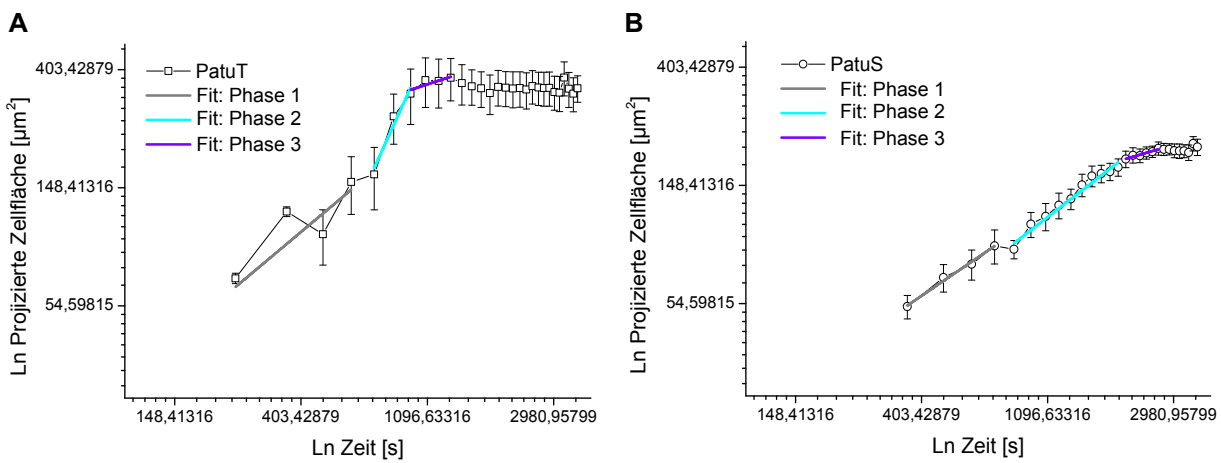


Abbildung 4.16: Doppellogarithmischer Plot der projizierten Zellfläche über die Zeit. Die verschiedenen Wachstumsphasen der projizierten Fläche wurden mit einer allometrischen Formel der Form $A = a \cdot t^b$ gefittet. (A) zeigt die gefittete Kurve für die projizierte Zellfläche der PatuT Zellen, (B) für die PatuS Zellen.

Tabelle 4.3: Fitparameter der in Abbildung 4.16 gezeigten Fits für die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS. Als Fehler ist die Standardabweichung des Fits angegeben.

Fitparameter	Phase 1	Phase 2	Phase 3
PatuT			
t	240 - 600 s	720 - 960 s	960 - 1320 s
a	-0,762	-10,360	3,435
b	$0,898 \pm 0,433$	$2,360 \pm 0,562$	$0,349 \pm 0,151$
Korr. R-Quadrat	0,52	0,89	0,59
PatuS			
t	360 - 720 s	840 - 1920 s	2040 - 2640 s
a	0,740	0,345	17,01
b	$0,727 \pm 0,049$	$0,827 \pm 0,047$	$0,314 \pm 0,042$
Korr. R-Quadrat	0,99	0,97	0,92

Die Dynamik des Zellspreitens

Um weitere Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien herauszustellen, wurde die Dynamik des Zellwachstums mit Hilfe der ersten Ableitung der Zellfläche über die Zeit untersucht (siehe Abbildung 4.17). Dabei zeigen die PatuT Zellen einen diskontinuierlichen Verlauf des Zellwachstums innerhalb der ersten 25 Minuten nach Aussaat, wohingegen die Zellfläche der PatuS Zellen gleichmäßiger wächst. Die größere Wachstumsdynamik der PatuT Zellen, mit großen Veränderungen in der Zellform und der Zellfläche, weist auf das invasive Potential und somit auf die höhere Malignität dieser Zelllinie hin.

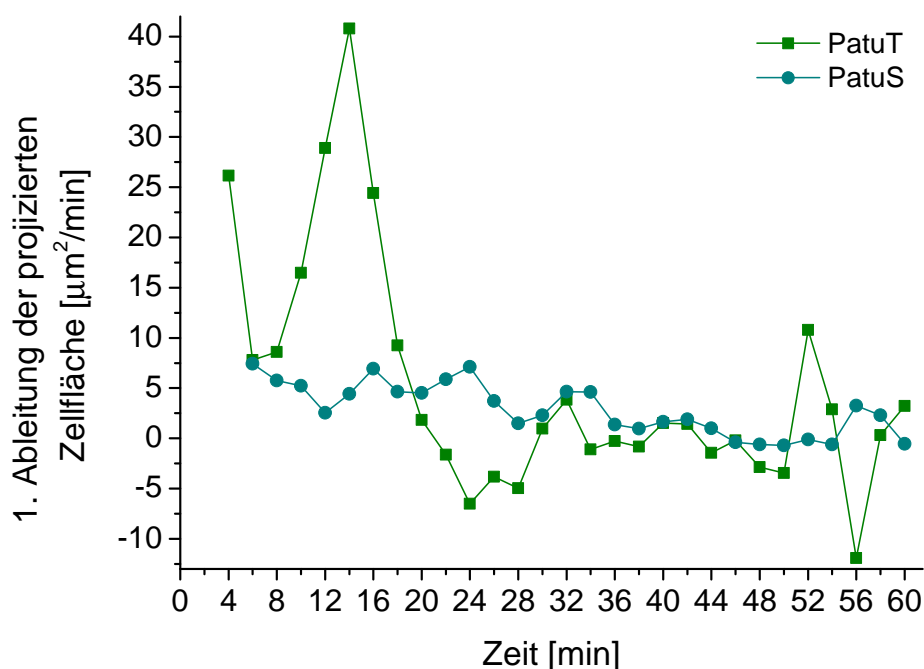


Abbildung 4.17: Erste Ableitung der projizierten Zellfläche über die Zeit für die beiden Zelllinien PatuT und PatuS. Es sind die Daten der Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm gezeigt.

Untersuchung der Zellform zur Interpretation des Stadiums der Zellpolarisation

Die Untersuchung der Exzentrizität der Zelle kann dazu genutzt werden, Informationen über die Polarisation der Zelle zu gewinnen. Die Polarisation der Zelle ist, neben der Bildung von Zellausläufern (Protrusions), wichtig für die Initiierung der Migration und resultiert aus der stark polarisierten Organisation des Zytoskeletts. Es hat sich in Studien gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von Zellpolarisation und dem invasiven Potential von Krebszellen gibt (Sedivy und Mader, 1997).

Die Exzentrizität kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, was der Form eines Kreises bzw. einer Linie entspricht. Sie wird dadurch bestimmt, dass eine Ellipse an die Zelle gefittet und das Verhältnis des Abstands der beiden Brennpunkte der Ellipse zu deren Hauptachse berechnet wird. Im Fall der Analyse von Zellen, stellen Werte nahe 1 eine starke Polarisation der Zelle dar,

wohingegen Werte gegen 0 einer runden, unpolarisierten Zelle entsprechen. Im Fall der PatuS Zellen liegt die Exzentrizität im Mittel, für alle Zellen und einem Zeitraum von sechs Stunden, bei $0,59 \pm 0,04$. Die PatuT Zellen zeigen eine etwas niedrigere Exzentrizität mit einem mittleren Wert von $0,51 \pm 0,06$ (siehe Abbildung 4.18). Die geringere Exzentrizität der PatuT Zellen ist somit in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen negativen Zusammenhang zwischen Zellpolarisation und der Invasivität der Zellen. Abbildung 4.18 zeigt auch, dass die Veränderungen in der Exzentrizität und somit in der Form der Zellen, bei den PatuT Zellen ausgeprägter ist. Dies fügt sich in die Beobachtungen der Dynamik des Zellspreitens ein (siehe Abbildung 4.17), bei der eine höhere Variabilität der Zellfläche auf die höhere Malignität und das höhere invasive Potential der PatuT Zellen zurückgeführt wurde.

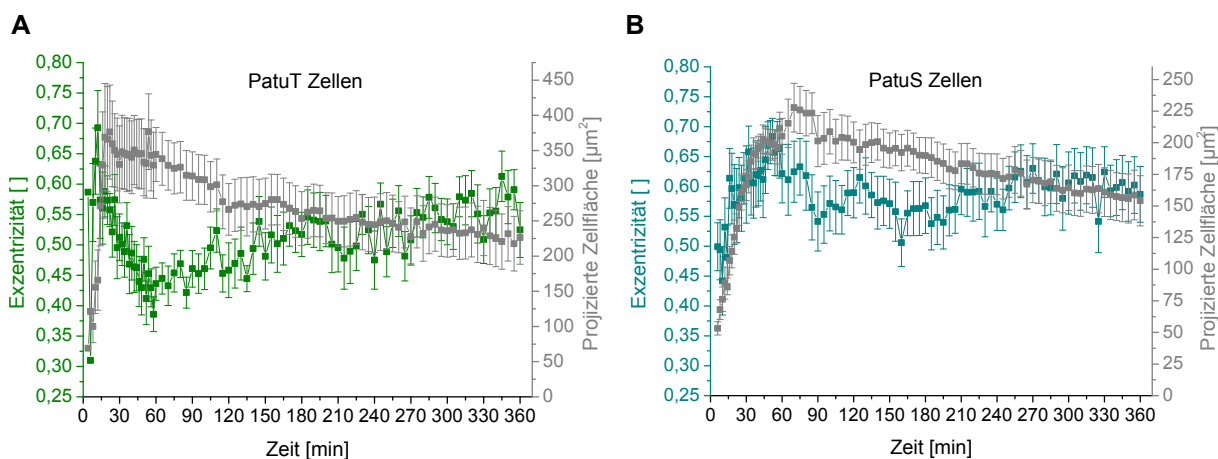


Abbildung 4.18: Zeitlicher Verlauf der Exzentrizität im Vergleich zur projizierten Zellfläche. Gezeigt ist der Verlauf über die gesamte Beobachtungsdauer von 360 min für die PatuT (A) und PatuS Zellen (B). Die Daten spiegeln die Ergebnisse der Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm wider.

4.4.2 Unterschiede in der Gesamtadhäsionsfläche der beiden Zelllinien

Im Gegensatz zu den unterschiedlichen Zeitpunkten des Erreichens der maximalen projizierten Zellfläche für die beiden Zelllinien, wird die maximale Adhäsionsfläche ungefähr nach der gleichen Zeit erreicht (siehe Abbildung 4.19). Die Gesamtadhäsionsfläche der PatuT Zellen ist nur circa 30 % größer als die der PatuS Zellen. Für die dedifferenzierten E-Cadherin negativen PatuT Zellen ist das Verhältnis der Adhäsionsfläche zur gesamten Zellfläche (= projizierte Zellfläche) kleiner als für die benigneren, hoch differenzierten, E-Cadherin exprimierenden PatuS Zellen, was auf einen Verlust von adhäsiven Parametern für die malignere Zelllinie PatuT schließen lässt. Es ist bekannt, dass sich die Adhäsionsstärke zwischen Zelle und Substrat mit steigendem Metastasierungspotential verringert (Indra et al., 2011). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass metastasierende Zellen auch weniger FAs zur Signalkaskade bilden, vielleicht um in einen weniger adhäsionsabhängigen Modus der Migration zu gelangen. Mit dem in der Literatur beschriebenen linearen Zusammenhang zwischen Kraftausübung der Fläche von fokalen Adhäsionen (Balaban et al., 2001; Schwarz et al., 2002) lässt sich schlussfolgern, dass die maligne Zelllinie PatuT eine, verhältnismäßig zu ihrer Zellgröße, geringere Adhäsionskraft zum Substrat ausübt als ihre benigne Geschwisterzelllinie PatuS.

Balaban et al. (2001) konnten die ausübende Kraft einer Zelle auf das unterliegende Substrat bis hin zum Level einer einzelnen Adhäsionsstelle berechnen. Sie nutzten hierzu die Elastizitätstheo-

rie, basierend auf den Messungen der Dislokation hochaufgelöster mikrostrukturierter, durchsichtiger Elastomeren bezüglich der Stellen von fokalen Adhäsionen anhand von GFP-Vinculin (Vinculin ist mit einem grün fluoreszierenden Protein markiert). Die lineare Abhängigkeit zwischen Adhäsionskraft und Fläche der FAs zeigt, dass eine konstante Kraft durch die FAs der Zelle ausgeübt wird, trotz großer Variationen in der Fläche und der Form der Zellen. In einer Modell-Membran-Studie mit Riesenvesikeln und festkörpergestützten Membranen berechneten [Albersdörfer und Sackmann \(1997\)](#) für die Adhäsionsenergie von engen Adhäsionen (= tight adhesions) einen um drei Größenordnungen höheren Wert als für Stellen mit schwachen Adhäsionen.

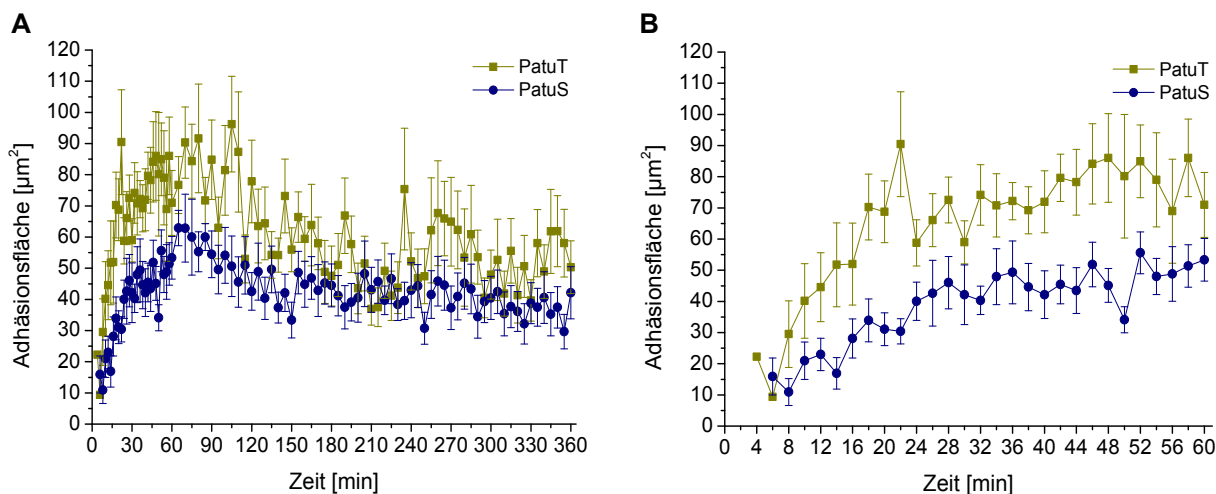


Abbildung 4.19: Zeitlicher Verlauf der Adhäsionsfläche für die beiden Zelllinien. (A) zeigt den Verlauf über die gesamte Beobachtungsdauer von 0-360 min, (B) zeigt nur den Bereich von 0-60 min. Gezeigt sind die Auswertungen für die Wellenlänge $\lambda_1 = 593$ nm.

Quantitative Beschreibung des Adhäsionsverhaltens

Die Bildung von Adhäsionsbereichen folgt im Vergleich zum allgemeinen Zellspreiten, welches durch eine Potenzfunktion beschrieben werden kann (vergleiche Abbildung 4.17), keiner linearen Dynamik, sondern weist vielmehr ein oszillierendes Verhalten auf (siehe Abbildung 4.20). Diese Oszillationen repräsentieren die nicht statische, sondern transiente Bildung von engen Zellkontakten. Bereiche enger Zellkontakte sind sehr mobil und zeigen ein kontinuierliches Verhalten zwischen Bildung und Auflösung der Kontakte ([Sengupta et al., 2006](#)). Oft wird die Bildung der Kontaktzonen in den ersten Minuten nach der Zellaussaat untersucht und beschrieben ([Sengupta et al., 2006](#); [Pierres et al., 2008](#)), da die Zellen innerhalb kürzester Zeit (< 1 min) auf den Oberflächen adhären und Kontaktzonen ausbilden können. Die ersten Minuten der Kontaktbildung zwischen Zelle und Substrat sind assoziiert mit transversalen Membrandeformationen, hervorgerufen durch die auftretenden Abstoßungskräfte der Puffermoleküle der Glykokalyx zwischen den einzelnen Kontaktstellen. Die Fluktuationen der Kontaktzonen resultieren in einem kontinuierlichen Abfall des Abstandes zwischen Zelle und Substrat. Da sich der dynamische Prozess der Adhäsion über Stunden bis Tage erstrecken kann, ist auch bei der Beobachtung der Veränderungen der Adhäsionsfläche innerhalb der ersten Stunde nach Aussaat immer noch ein dynamisches, oszillierendes Verhalten der Adhäsionsfläche zu beobachten (siehe Abbildung 4.20), welches die Bildung von neuen Kontaktzonen und die Vergrößerung der initialen Kontaktflächen durch die Ausrichtung der Zellmembran beschreibt. Außerdem kann die topographische

Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Zellen innerhalb von Minuten, Stunden oder Tagen eine mögliche Rolle für die periodischen Veränderungen der Adhäsionsfläche spielen (Pierres et al., 2002).

Die zeitliche Veränderung der Adhäsionsfläche zeigt zwar ein oszillierendes Verhalten, jedoch ist dieses nicht periodisch. Dennoch ist die Tendenz erkennbar, dass die Änderungen der PatuT Zellen in kürzeren Perioden erfolgen als die der PatuS Zellen. Außerdem findet die Oszillation zwischen den Extrempunkten bei den PatuT sechsmal innerhalb von 2 min statt, wohingegen bei den PatuS Zellen nur zweimal solch kurze Abstände auftreten.

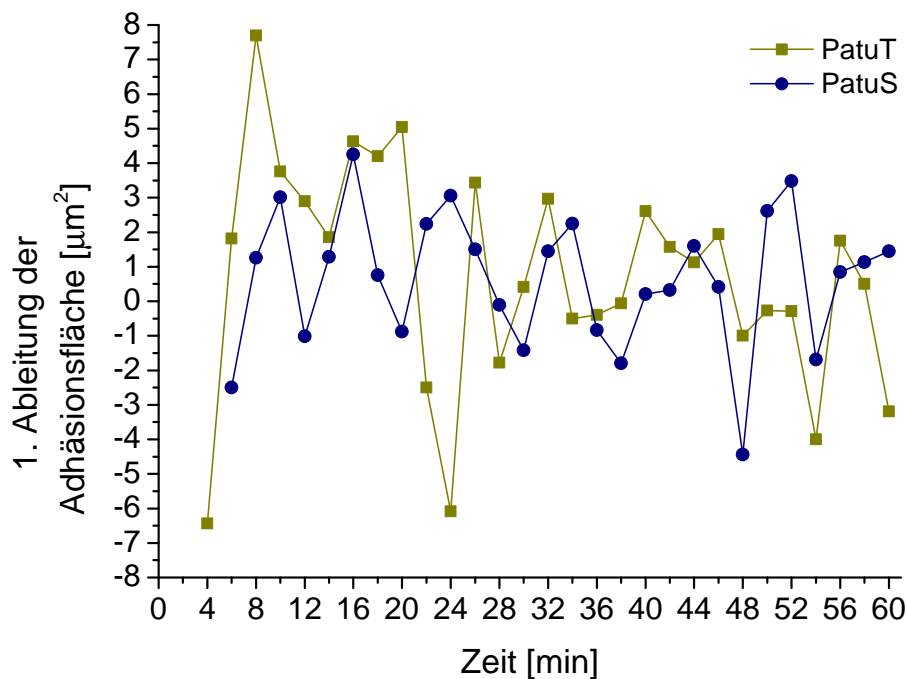


Abbildung 4.20: Erste Ableitung der Adhäsionsfläche über die Zeit für die beiden Zelllinien PatuT und PatuS.

Das Verhältnis von projizierter Zellfläche zur Adhäsionsfläche

Die beiden Geschwisterzelllinien zeigen beim Vergleich des Verhältnisses zwischen der projizierten Zellfläche und der Adhäsionsfläche über nahezu den gesamten Beobachtungszeitraum einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 4.21). Im Mittel ist bei den PatuT Zellen die projizierte Zellfläche über den Beobachtungszeitraum von sechs Stunden $8,36 \pm 0,38$ -mal größer als die Adhäsionsfläche, wohingegen das Verhältnis bei den PatuS Zellen nur $5,97 \pm 0,14$ beträgt. Die Unterschiede der beiden Zelllinien im Verhältnis von projizierter Zellfläche zur Adhäsionsfläche könnten ein erstes Indiz dafür sein, dass sich die beiden Zelllinien auch in ihrer Adhäsionsstärke unterscheiden.

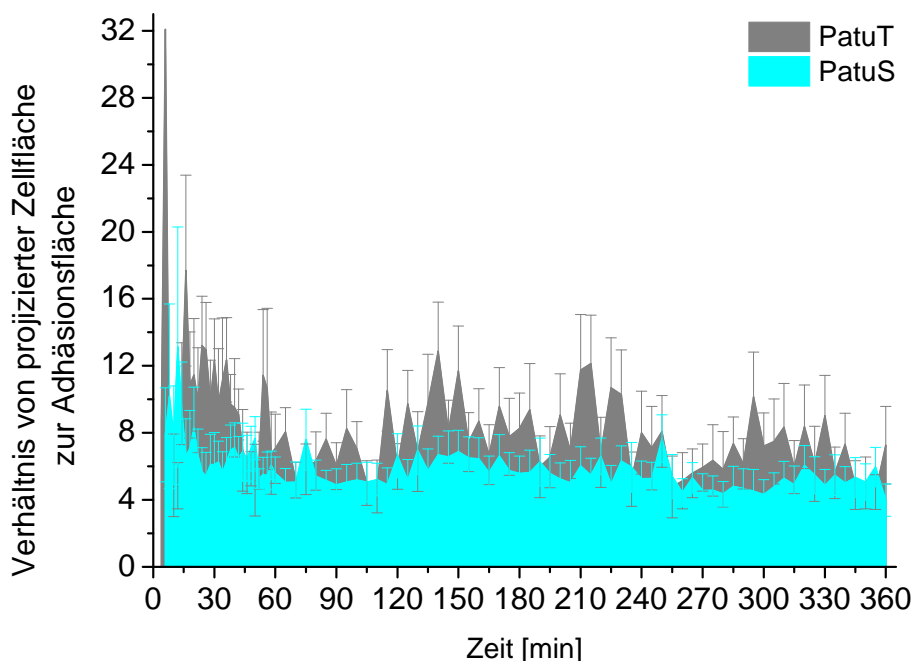


Abbildung 4.21: Verhältnis zwischen projizierter Zellfläche zur Adhäsionsfläche für beide Zelllinien über den Beobachtungszeitraum von 360 min. Zur Berechnung des Verhältnisses wurde die 2λ -Adhäsionsfläche verwendet.

4.4.3 Interpretation der experimentell bestimmten Adhäsionsflächen

In den vorherigen Abschnitten wurden die Verhältnisse zwischen der projizierten Zellfläche und der Adhäsionsfläche untersucht. Als Grundlage für die Trennung zwischen adhärenen und nicht adhärenen Bereichen diente die Grenzwertformel, bei der ein Abstand von 40 nm als Separationsgrenze angesetzt wurde (siehe Kapitel 4.3). Bei dieser Berechnung der Adhäsionsfläche muss bedacht werden, dass dabei nicht nur die sehr engen Kontakte (fokale Adhäsionen), sondern auch die engen Kontakte (tight adhesions) mit eingerechnet wurden. Dabei sind es die fokalen Adhäsionen, die maßgeblich für die Adhäsionskraft einer Zelle verantwortlich sind (Balaban et al., 2001). Um den Anteil der FA an der projizierten Zellfläche bzw. der Adhäsionsfläche zu bestimmen, wurden Fluoreszenzaufnahmen von fixierten PatuT Zellen 24 h nach Aussaat auf Kollagen gemacht und die Fläche der FAs bestimmt. Dabei wurde Paxillin immunocytochemisch angefärbt (siehe Abbildung 4.9), da Paxillin insbesondere in FA auftritt (Zamir et al., 2000). Das Verhältnis der FA-Fläche zur projizierten Zellfläche betrug dabei $A_{FA/Proj} = 0,02 \pm 0,01$, das Größenverhältnis zur Adhäsionsfläche $A_{FA/Adh} = 0,33 \pm 0,22$ und die Relation zwischen der Adhäsionsfläche und der projizierten Zellfläche betrug $A_{Adh/Proj} = 0,13 \pm 0,13$ (angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung von 13 Zellen).

Hunter et al. (1995) bestimmten auch über Fluoreszenzmessungen die Fläche der Adhäsionspatches und erhielten ein Verhältnis der beiden Flächen im Bereich von $A_{FA/Proj} = 0,02-0,05$. Eine genauere Unterscheidung der Adhäsionsfläche den Separationsabstand betreffend, führten Truskey et al. (1992) durch, die mit TIRM und Fluoreszenzmikroskopie das Verhältnis zwischen der Adhäsionsfläche und der projizierten Fläche bestimmten. Dabei erhielten sie

bei der Betrachtung der Adhäsionsfläche für den Abstandsbereich von 15-30 nm ein Verhältnis von $A_{Adh_{15-30nm}/Proj} = 0,04 \pm 0,03$ und für einen Abstandsbereich von 30-65 nm $A_{Adh_{30-65nm}/Proj} = 0,29 \pm 0,13$. Auch diese Werte liegen im Bereich der in dieser Arbeit bestimmten Verhältnisse, wobei beachtet werden muss, dass die Anzahl und Fläche der FA für verschiedene Zelllinien unterschiedlich ist.

Für die Interpretation der weiteren Ergebnisse, in denen die Adhäsionsstärke der Zellen betrachtet wird (siehe Kapitel 4.5), kann festgehalten werden, dass ca. 1/3 der berechneten Adhäsionsfläche, Adhäsionen mit sehr engem Kontakt, also FAs, darstellen. Neben dem linearen Zusammenhang zwischen der Fläche der FA und der ausübenden Kraft (Balaban et al., 2001), ist auch die Anzahl und Verteilung der Adhäsionspatches wichtig, was zunächst in den nächsten beiden Abschnitten 4.4.4 und 4.4.5 näher untersucht wird.

4.4.4 Größenverteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zellen

Ein weiterer entscheidender Parameter zur Identifizierung der Tumorzellen stellt die Größenverteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zelle dar. Eine genaue Analyse dient dazu, das Adhäsionsvermögen der Zellen, d.h. ihre Adhäsionsstärke, die neben der Größe, noch von der Anzahl und der Verteilung der FAs abhängig ist, einschätzen zu können. Zur Visualisierung sind in Abbildung 4.22 die Unterschiede der beiden Zelllinien in Hinblick auf die Größe und die Verteilung ihrer Adhäsionspatches beispielhaft mittels einer farbcodierten Darstellung gezeigt. Die PatuT Zellen besitzen viele kleine Adhäsionspatches, wohingegen die PatuS Zellen weniger aber dafür größere Adhäsionspatches zeigen.

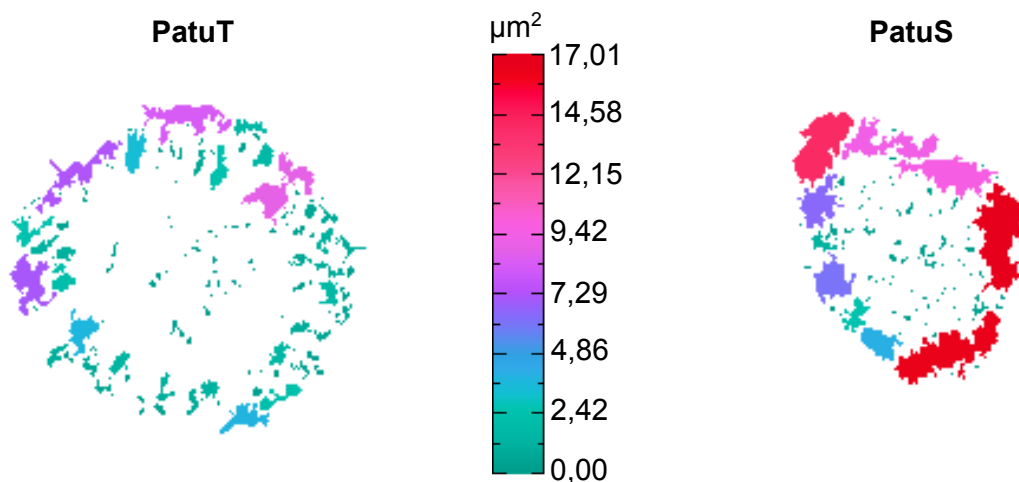


Abbildung 4.22: Farbcodierte Darstellung der Adhäsionspatches für eine ausgewählte PatuT Zelle (links) und eine ausgewählte PatuS Zelle (rechts) nach einer Beobachtungszeit von 60 min.

Für die Adhäsionszeitpunkte 16 und 60 Minuten nach Aussaat der Zellen wurden die Adhäsionsbereiche der Grenzwertbilder (vergleiche Abbildung 4.14) auf ihre Größe hin analysiert. Dazu wurde das Analysewerkzeug „Analyze particles“ von ImageJ verwendet (siehe Abschnitt 3.7.2).

Flächen, die nur einen Pixel groß waren, wurden als Störpixel angesehen und in der Analyse nicht beachtet. Für beide beobachteten Adhäsionszeiten sind ca. 90 % der Adhäsionspatches $0,1-1,7 \mu\text{m}^2$ groß (siehe Abbildung 4.23)

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Größenverteilung der Adhäsionspatches zeigt, dass nach einer Adhäsionszeit von 16 min auf den Kollagen beschichteten Deckgläsern in dem mittleren Patchgrößenbereiche von $3,3-13,3 \mu\text{m}^2$ die Patches der PatuS Zellen mit insgesamt ca. 5,2 % gegenüber den PatuT Zellen mit ca. 4,5 % dominieren. Die Adhäsionspatches der Größe $3,3-5,0 \mu\text{m}^2$ zeigen dabei den größten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (siehe Abbildung 4.23A). Auch in den Bereichen größerer Adhäsionspatches von $> 13,4 \mu\text{m}^2$ finden sich signifikant mehr Patches bei den PatuS Zellen mit 1,9 % als bei den PatuT Zellen (ca. 1,2 %), wobei aber im Bereich von $20,1-23,4 \mu\text{m}^2$ ein Peak bei den PatuT Zellen zu sehen ist. Patches im kleineren Pixelbereich von $1,7-3,3 \mu\text{m}^2$ sind bei beiden Zelllinien gleich viel vertreten.

Nach einer Adhäsionszeit von 60 min ist bei den PatuS Zellen eine Umverteilung und ein Wachstum der Adhäsionspatches zu erkennen (siehe Abbildung 4.23B). Während der Anteil im kleinen Patchgrößenbereich von $1,7-3,3 \mu\text{m}^2$ (auf ca. 3,2 %) und im mittleren Bereich (auf ca. 3,5 %) sinkt, treten nun mehr Adhäsionspatches im Größenbereich von $>13,4 \mu\text{m}^2$ auf (ca. 3,5 %). Bei den PatuT Zellen kommt es in allen drei Bereichen zu Abnahmen, nur der Anteil an den kleinsten Adhäsionspatches von $0,1-1,7 \mu\text{m}^2$ nimmt um ca. 3 % zu. Nur im Größenbereich von $3,3-5,0 \mu\text{m}^2$, der nach 16 min von den PatuS Zellen dominiert war, finden sich nach der Adhäsionszeit von 60 min mehr Adhäsionspatches der PatuT Zellen. Bei den beiden untersuchten Adhäsionszeiten sind für die Adhäsionspatches der Größen $0,1-1,7 \mu\text{m}^2$ und $1,7-3,3 \mu\text{m}^2$ die geringsten Unterschiede zwischen den beiden Geschwisterzelllinien zu erkennen. Bei den kleinsten Adhäsionspatches der Größe $0,1-1,7 \mu\text{m}^2$ könnte es sich um transiente Adhäsionspatches handeln, die von Ryzhkov et al. (2010) beschrieben wurden. Sie charakterisierten diese Adhäsionspatches, die eventuell fusionieren um das Spreiten der Zelle zu initiieren mit einer typischen Größe von $(1,0 \pm 0,4) \mu\text{m}$ und einer Lebenszeit von $(33 \pm 12) \text{ s}$. Da im Falle der Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS die kleinen Adhäsionspatches den größten zahlenmäßigen Anteil bei beiden Beobachtungszeitpunkten darstellen, könnte man davon ausgehen, dass die Zellen sich noch in der Spreitphase befinden. Dagegen spricht nach der untersuchten Spreitkinetik in Abbildung 4.15, dass die PatuT Zellen nach 60 min schon ihre maximale projizierte Zellfläche erreicht haben. Vielleicht ist der Patchgrößenbereich von $0,1-1,7 \mu\text{m}^2$ Pixeln zu grob gewählt und müsste für diese Betrachtung noch weiter aufgetrennt werden.

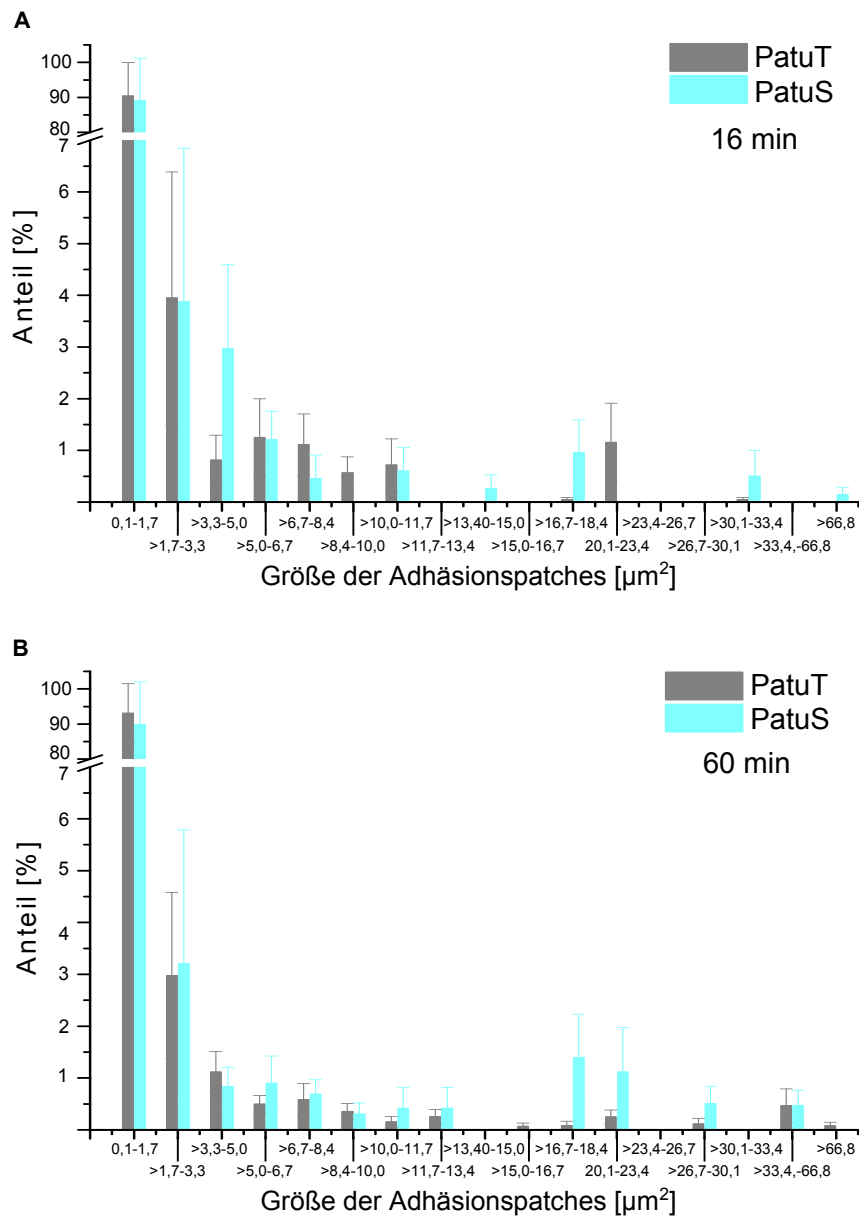


Abbildung 4.23: Histogramm der Größen der Adhäsionspatches analysiert mit den Grenzwertbildern der beiden Zelllinien. (A) zeigt die Verteilung nach dem Adhäsionszeitpunkt 16 min, (B) nach 60 min. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Für einen besseren Überblick der Veränderungen in der Patchgrößenverteilung bei einer Adhäsionszeit von 16 min auf 60 min sind die drei Größenbereiche ($1,7-3,3 \mu\text{m}^2$; $3,4-13,4 \mu\text{m}^2$; $>13,4 \mu\text{m}^2$) noch einmal als Kreisdiagramm in Abbildung 4.24 dargestellt. Dabei wurde der Pixelbereich von 2-50 Pixeln prozentual nicht mit eingerechnet. Innerhalb der Adhäsionszeit von 60 min verdoppelt sich bei beiden Zelllinien der Anteil der Adhäsionspatches mit den Größen $>13,4 \mu\text{m}^2$, jedoch besitzen die PatuS Zellen anteilig doppelt so viele große Adhäsionspatches als die PatuT Zellen. Während das zahlenmäßige Wachstum der größten Adhäsionspatches bei den PatuS mit einem zahlenmäßigen Rückgang der beiden anderen Patchgrößenbereiche einhergeht, und somit eine Umlagerung zu größeren Patchgrößen stattfindet, kommt es bei den PatuT Zellen

bei den kleinsten und größten Adhäsionspatches zu einer Zunahme auf Kosten der mittelgroßen Adhäsionspatches.

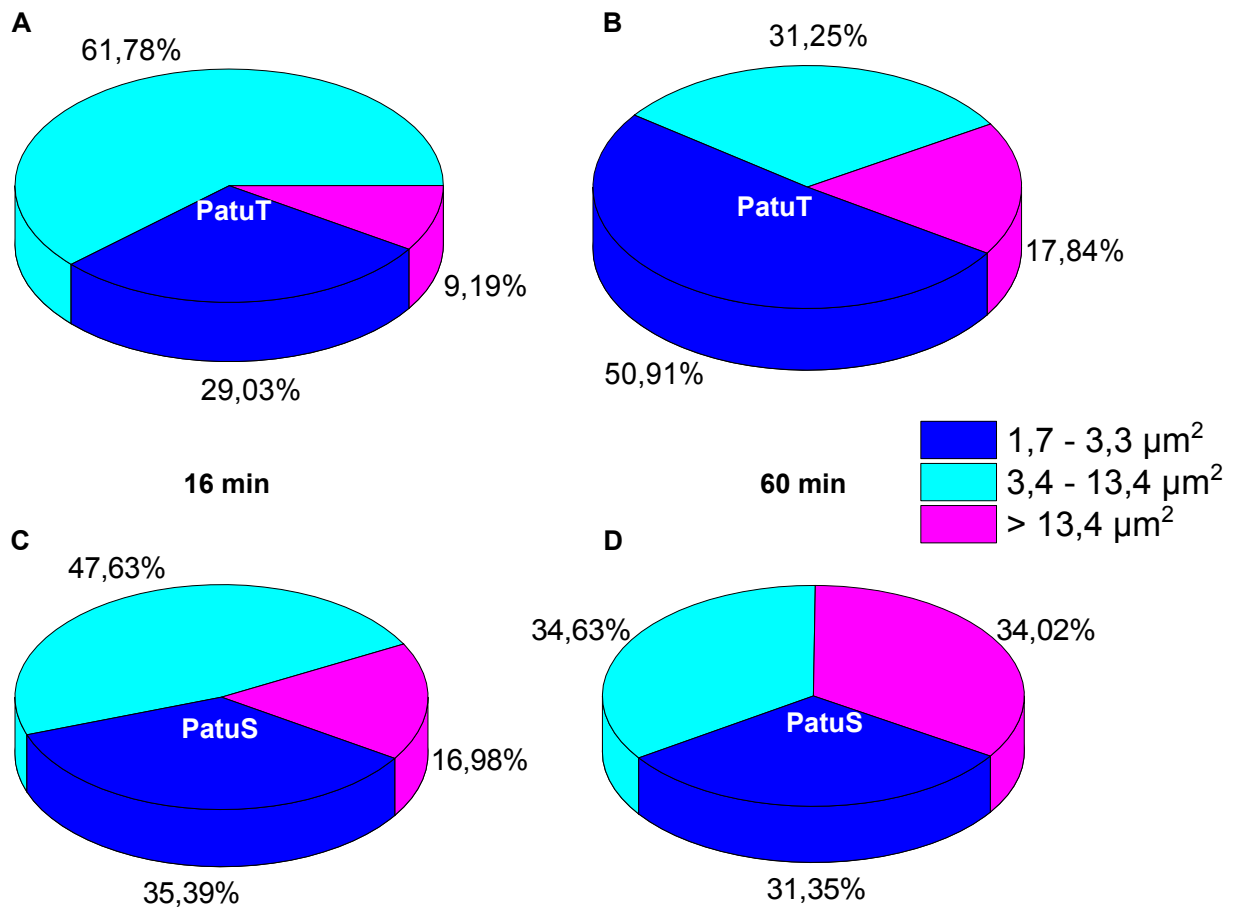


Abbildung 4.24: Kreisdiagramme mit drei verschiedenen Größenbereichen der Adhäsionspatches für die PatuT und PatuS Zellen zu zwei unterschiedlichen Adhäsionszeitpunkten. (A) und (B) zeigen die mengenmäßige Verteilung der Adhäsionspatches der PatuT Zellen nach 16 bzw. 60 min, (C) und (D) die der PatuS Zellen nach den jeweiligen Zeitpunkten. Es wurden hierbei nur die Bereich der Patchgrößen von 1,7-3,3 μm^2 ; 3,4-13,4 μm^2 ; >13,4 μm^2 berücksichtigt.

4.4.5 Räumliche Verteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zellen

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Charakterisierung der Zelladhäsion stellt die räumliche Verteilung der Adhäsionspatches innerhalb der Zelle dar. Genauso wie die Größenverteilung der Adhäsionspatches müsste sich auch die räumliche Verteilung der Adhäsionspatches in der Stärke der Zelladhäsion widerspiegeln. Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Adhäsionsbereiche innerhalb der Zelle wurden die binären Grenzwertbilder der Zellen mit Hilfe des ImageJ Plug-ins „Radial profile plot“ (siehe Abschnitt 3.7.3) als Radialprofile dargestellt. Durch die Darstellung der normierten, integrierten Intensität der Grenzwertbilder stellen niedrige Werte im Graph einen höheren Anteil an Adhäsionsfläche dar (siehe Abbildung 4.25). Für die Analyse wurden auch hier die Adhäsionszeitpunkte 16, 30 und 60 min nach Aussaat genutzt. Die PatuT Zellen besitzen, wie man es auch schon beispielhaft in Abbildung 4.14 sehen konnte, kleine, über die ganze Zelle homogen verteilte Adhäsionsbereiche. Die relativ homogene Verteilung der Ad-

häsionsbereiche über die gesamte Zelle spiegelt sich bei den PatuT Zellen in den Radialprofilen durch einen relativ gleichförmigen Kurvenverlauf ohne Extrempunkte wider (siehe Abbildung 4.25A). Über die Zeit nimmt die normierte integrierte Intensität ab, was bedeutet, dass mehr Adhäsionsbereiche (schwarze Pixel im Binärbild der Zelle) bei dem späteren Adhäsionszeitpunkt von 60 min vorhanden sind. Die PatuS Zellen (siehe Abbildung 4.25B) zeigen in ihren Radialprofilen geringere Werte für die normierte integrierte Intensität als die PatuT Zellen, was mit der, verhältnismäßig zur Gesamtfläche, höheren Adhäsionsfläche der PatuS Zellen zu erklären ist. Außerdem weisen die Radialprofile für alle drei Adhäsionszeitpunkte einen deutlichen Tiefpunkt im Radialprofil auf, welcher mit steigender Adhäsionszeit weiter in Richtung der Peripherie der Zellen wandert. Es ist daher bei den benignen PatuS Zellen eine Festigung bzw. Entwicklung von Adhäsionskontakten über die Zeit zu erkennen, wohingegen bei den malignen PatuT Zellen keine Entwicklung zu erkennen ist. Bei den PatuT Zellen verändert sich die räumliche Verteilung der Adhäsionspatches nicht wesentlich über den Zeitraum von 60 min. Da sich die Adhäsionspatches wohl eher statisch verhalten, ist die natürliche Festigung der Zelladhäsion durch Clustering von Adhäsionspatches nicht möglich.

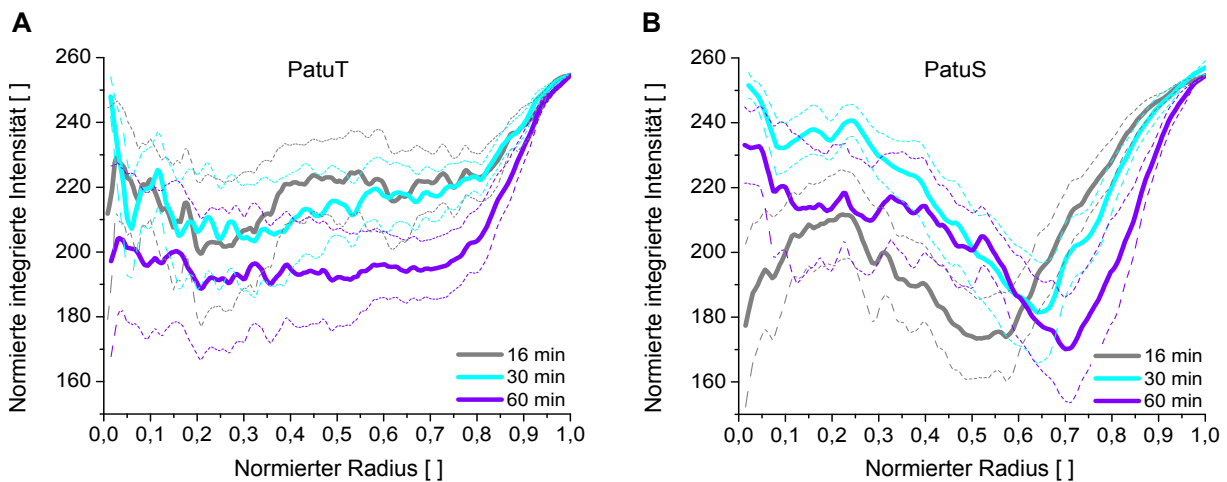


Abbildung 4.25: Radialverteilung der Adhäsionsbereiche, gemittelt über alle PatuT (A) und PatuS Zellen (B) für die Adhäsionszeitpunkte 16, 30 und 60 min nach Aussaat. Aufgetragen ist die normierte, integrierte Intensität gegenüber dem normierten Radius. Der Radius mit dem Wert 0 stellt den Mittelpunkt der Zelle, der Wert 1 den äußeren Rand der Zelle dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden keine Fehlerbalken eingezeichnet, sondern nur gestrichelte Linien, die jeweils die Grenzen des Standardfehlers angeben.

4.4.6 Zusammenfassung: Zellexperimente mit RIKM

Die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie ist ein Werkzeug zur Visualisierung von Kontaktzonen und kleinster Zellausläufer, die in der Hellfeld-Mikroskopie komplett unsichtbar bleiben. Sie stellt die einzige Methode dar, die es erlaubt markerfrei die räumlichen und zeitlichen Adhäsionsmuster und das Zellspreiten zu untersuchen. Durch die Analyse verschiedenster Parameter kann mit der RIKM ein charakteristischer Fingerabdruck der untersuchten Zellen erstellt werden, was zu einer Zellunterscheidung und Zellklassifizierung genutzt werden kann.

Die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS unterschieden sich in ihrer projizierten Zellfläche und in der Dynamik des Zellspreitens. Die PatuT Zellen erreichten eine deutlich größere projizierte Zellfläche und diese auch viel früher als die PatuS Zellen. In der Gesamtadhäsionsfläche der beiden Zelllinien, war der Größenunterschied nicht mehr so deutlich. Zur Betrachtung der

Gesamtadhäsionsfläche wurde, durch die Wahl eines Grenzwertes vom Abstand 40 nm, die aktive Kontaktfläche der fokalen Adhäsionen und auch der passive Membrankontakt (tight adhesions) herangezogen. Die zur gesamten Zellfläche verhältnismäßig kleinere Adhäsionsfläche der PatuT Zellen wird in Abbildung 4.26 mittels 3D-Intensitätsplots nochmals visualisiert. Der Farbgradient von blau zu rot spiegelt den Abstand zwischen der Zelle und dem Substrat von klein zu groß wider, sodass die Darstellung als „Adhäsionskarte“ angesehen werden kann. Verhältnismäßig zur Gesamtfläche zeigen die Intensitätsplots der PatuS Zellen mehr blaue Intensitätsbereiche als die PatuT Zellen, die eher im grünen Farbbereich liegen. Damit weist die PatuS Zelle einen engeren Kontakt zum Substrat auf. Mit diesen Ergebnissen können die beiden Zelllinien schon anhand ihres Aussehens und ihres Verhaltens beim Zellspreiten und ihres Adhäsionsverhaltens unterschieden werden.

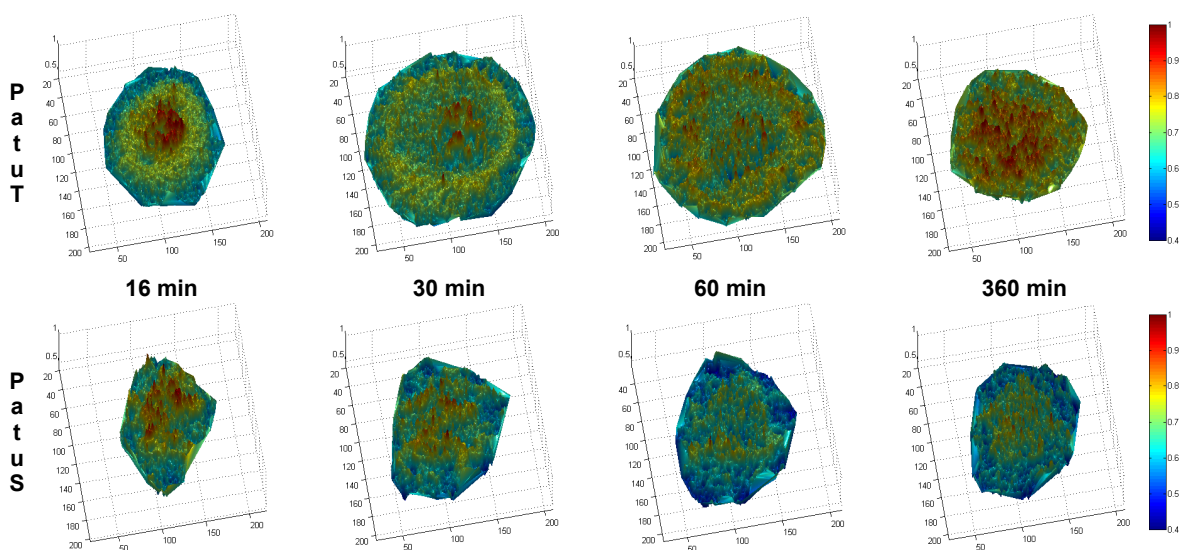


Abbildung 4.26: Charakteristische „Adhäsionskarte“ der beiden Geschwisterzelllinien nach bestimmten Adhäsionszeitpunkten (16, 30, 60 und 360 min nach Aussaat) für eine ausgewählte PatuT (oben) und eine PatuS Zelle (unten). Gezeigt ist das Intensitätsprofil der RIKM-Bilder in Falschfarben. Die Intensitätswerte der RIKM-Bilder wurden auf den größten, in der Zelle vorkommenden, Intensitätswert normiert. Diese Darstellung kann als Adhäsionskarte angesehen werden: je dunkler die Farben im Bild sind, desto geringer ist der Abstand zwischen der Zelle und der Oberfläche.

Neben der Untersuchung der gesamten Zell- und Adhäsionsfläche wurden die Adhäsionspatches der beiden Zelllinien näher charakterisiert. Dabei konnten Unterschiede in der räumlichen Verteilung, der Größenverteilung und in der zeitlichen Bildung beobachtet werden. Während bei den PatuT Zellen die Adhäsionspatches kleiner und über die ganze Zelle verteilt waren, traten bei den PatuS Zellen größere Patches auf, die sich an der Peripherie der Zelle befanden. Über den Beobachtungszeitraum von 60 min wurden bei den PatuT Zellen kleine Adhäsionspatches neu gebildet, bei den PatuS Zellen wuchsen hingegen die kleinen Patches zu größeren Adhäsionspatches an.

Die beiden Zelllinien zeigen charakteristische Unterschiede im Adhäsionsmuster. Diese Informationen sind essentiell für die Etablierung eines Zellklassifizierungs-Modell in Hinblick auf den Tumorgrad der untersuchten Zelllinien. Mit den charakteristischen Adhäsionsmustern bezüglich des Anteils an Adhäsionsbereichen im Vergleich zur Zellfläche, der Verteilung und der Größe der Adhäsionsbereiche können auch Informationen über die Adhäsionskraft der Zellen abgeleitet

werden. Es ist zu beachten, dass es sich bei den hier untersuchten Adhäsionsbereichen nicht nur um die engsten Kontakte, die FAs, sondern auch um enge Kontakte handelt. Aufgrund des beobachteten Größenbereichs können die Aussagen nicht als Ergebnisse auf molekularer Ebene der Bindungsdynamiken im Adhäsionscluster angesehen werden. Trotzdem kann durch die mikroskopische Betrachtung in Bezug auf Größe und Verteilung der Adhäsionsbereiche mit den Annahmen, dass $1/3$ der Adhäsionsfläche FA sind, und die Anzahl an Rezeptoren N_t in einem Adhäsionscluster durch seine Größe A begrenzt ist ($N_t = A/A_0$; mit A_0 als Fläche die von der Bindung eingenommen wird) bestimmt ist, Aussagen über das Adhäsionsverhalten mit dem Wissen über die Bindungsdynamiken auf molekularer Ebene erklärt werden.

Goffin et al. (2006) und Selhuber-Unkel et al. (2010) beispielsweise konnten mittels AFM und Mikroskopieaufnahmen zeigen, dass die Adhäsionsstärke durch die Adhäsionsfläche, die Integrin-Cluster und die Zusammensetzung der Adhäsionsbereiche bestimmt wird.

Die oben genannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die projizierte Zellfläche allein keine Rückschlüsse auf die Adhäsionsstärke gibt, sondern vielmehr das darunter liegende komplexe Adhäsionsmuster. Die Hypothese, dass die PatuS Zellen, die verhältnismäßig zu ihrer Zellfläche mehr Adhäsionsfläche und größere Adhäsionspatches an der Peripherie besitzen als die PatuT Zellen, auch einer hydrodynamischen Kraft besser standhalten können, wurde im nächsten Abschnitt untersucht.

4.5 Untersuchung des Adhäsionsvermögens mittels eines mikrofluidischen Ablöseexperiments

Um die Aussagen über das Adhäsionsverhalten der beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS, die in den RIKM-Experimenten getroffen wurden, genauer zu charakterisieren und um eine direkte Adhäsionskraft der Zellen zu bestimmen, wurden mikrofluidische Ablöseassays durchgeführt. In Mikrofluidikexperimenten werden Zellen einem Fluss, also einer Scherkraft innerhalb eines Flusskanals, ausgesetzt, und die Adhäsionskraft der Zellen durch das Ablöseverhalten bei angelegtem Fluss bestimmt. Vorteile der mikrofluidischen Ablöseassays sind die kontrollierte Variation der angelegten Kräfte und die Applikation dieser Kräfte direkt an der Probe. Sie können direkt unter dem Mikroskop durchgeführt werden, sodass die Probe nicht, wie z.B. bei Zentrifugationsassays, für die Auswertung des Experiments bewegt werden muss, was besonders bei der Beobachtung von schwach adhärenen Zellen von Vorteil ist. Die kontrollierte Variation der Scherkräfte kann durch die Variation der Flussgeschwindigkeiten (Wankhede et al., 2006; Kwon et al., 2007; Christophis et al., 2010), oder durch die Veränderung der Geometrie des Flusskanals (Rupprecht et al., 2012) erfolgen.

Die in dieser Arbeit verwendete Mikrofluidikeinheit bestand aus zwei Komponenten, einem Deckglas und einem Flusskanal aus optisch transparenten PDMS, die miteinander verbunden wurden. Die Zellen im Flusskanal konnten während des Ablöseassays direkt am Mikroskop beobachtet werden. Um die mikrofluidischen Untersuchungen zum Adhäsionsvermögen der beiden Geschwisterzelllinien mit den Adhäsionsuntersuchungen der RIKM-Experimente vergleichen zu können, wurde das Deckglas der Mikrofluidikeinheit auch mit Kollagen beschichtet.

Das Adhäsionsvermögen der beiden Geschwisterzelllinien wurde simultan innerhalb eines Ablöseassays untersucht. Um die beiden Zelllinien im Flusskanal unterscheiden zu können, wurden diese mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in einer Flusszelle mit Kollagen beschichteter Glasoberfläche ausgesät. Um sicherzustellen, dass die Zellen auf der Oberfläche

adhäriert sind, wurde des Ablöseassay erst 90 min nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Nach dieser Zeit kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen ihre Adhäsionsflächen ausgebildet haben (siehe RIKM-Experimente, Abbildung 4.19A). Aufgrund der Tatsache, dass thermische Driften die charakteristischen Flusseigenschaften des Kanals z.B. durch Auftreten eines Temperaturgradienten innerhalb des Kanals beeinflussen können, wurden die Messungen an einem Mikroskop mit Inkubationskammer durchgeführt. Auch die Pumpe mit dem Zellmedium zum Anlegen der Flussraten wurde innerhalb der Kammer platziert. Der angelegte Fluss beginnend mit $20 \mu\text{l}/\text{min}$, wurde in $40 \mu\text{l}/\text{min}$ Schritten bis hin zu einer Rate von $700 \mu\text{l}/\text{min}$ erhöht. Je höher der angelegte Fluss, desto größer ist die Scherkraft im Kanal. Der Fluss wurde für je eine Minute angelegt und dann gestoppt, um die Mikroskopieaufnahmen der Zellen durchzuführen. Abbildung 4.27 zeigt beispielhaft eine Bildserie des Ablöseexperiments.

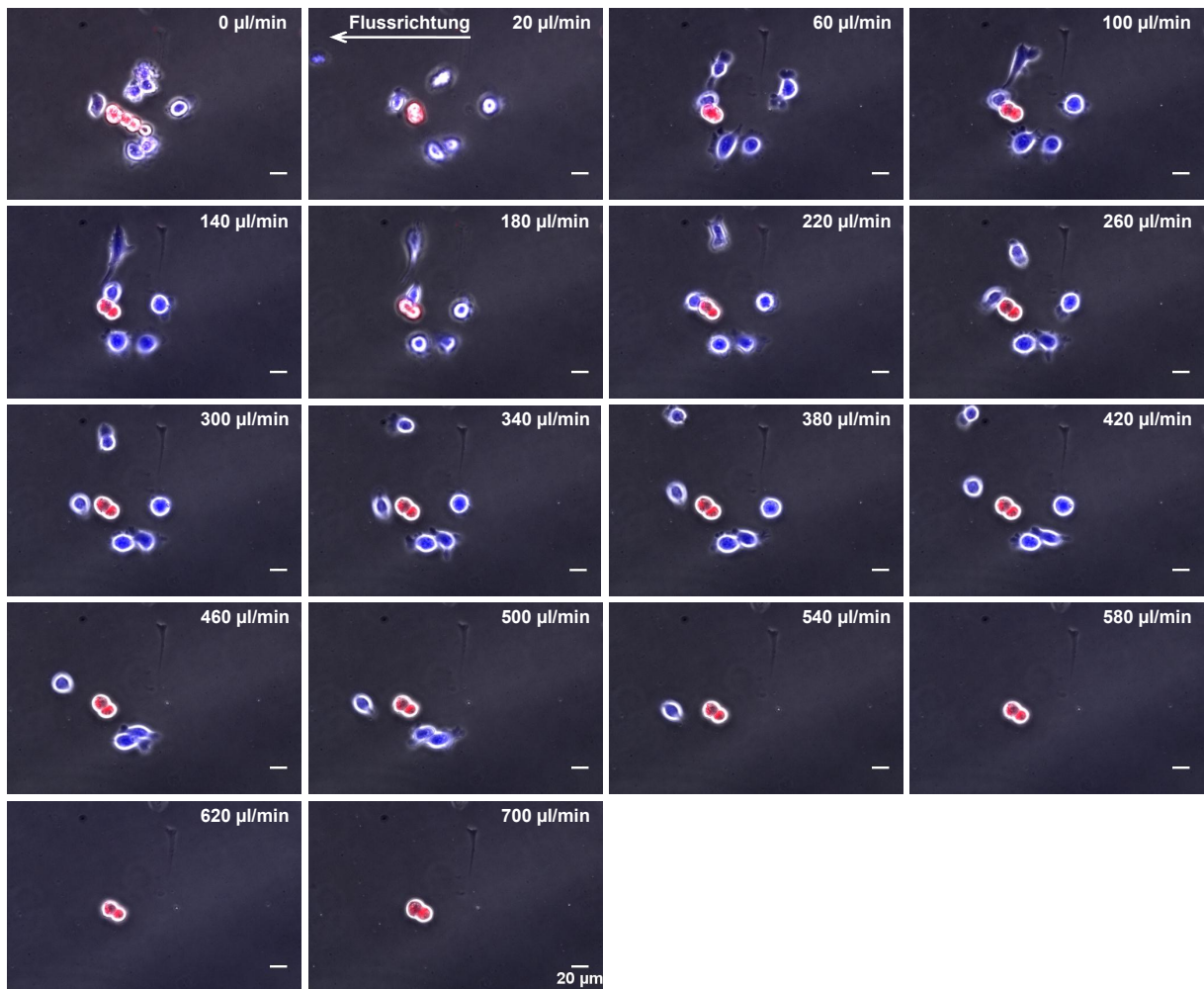


Abbildung 4.27: PatuT und PatuS Zellen im Flusskanal nach den verschiedenen angelegten Flussraten. Die PatuT Zellen wurden vor Beginn der Flusseexperimente mit einem blau fluoreszierenden Farbstoff und die PatuS Zellen mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff gefärbt. Die Bildserie zeigt die Überlagerung des Hellfeldbildes mit den beiden Fluoreszenzkanälen, jeweils eine Minute nach Stopp des angelegten Flusses aufgenommen. Der Fluss verlief von rechts nach links. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

4.5.1 Unterschiede im Adhäsionsverhalten der beiden Geschwisterzelllinien unter Flussbedingungen

Für die Auswertung der Daten zum Adhäsionsvermögen der Zellen wurde die Zellzahl, der nach jeder Flussrate verbliebenen Zellen bestimmt und auf den Anfangswert normiert. Es wurde als Anfangswert aber nicht die Zellzahl vor Beginn des Flussexperimentes gewählt, sondern die Zellzahl nach einem Fluss der Rate $20 \mu\text{l}/\text{min}$. Vor Flussbeginn ist es schwierig eine klare Unterscheidung zwischen adhärenen Zellen und Zellen, die evtl. auf anderen Zellen sitzen und somit keinen direkten Kontakt zur kollagenbeschichteten Oberfläche besitzen, oder die sich noch in Suspension befinden, zu treffen. Mit einem Fluss der Rate $20 \mu\text{l}/\text{min}$ lassen sich lose Zellen entfernen, sodass dies einen guten Start- und Normierungswert für die Analyse darstellt.

Abbildung 4.28 zeigt den Anteil adhärenen Zellen, normiert auf den Anfangswert von $20 \mu\text{l}/\text{min}$, gegenüber der angelegten Flussrate. Ab einer Flussrate von $180 \mu\text{l}/\text{min}$ zeigten die beiden Geschwisterzelllinien ein unterschiedliches Ablöseverhalten. Die PatuT Zellen lösten sich ab dieser Flussrate schneller ab als ihre Geschwisterzelllinie PatuS.

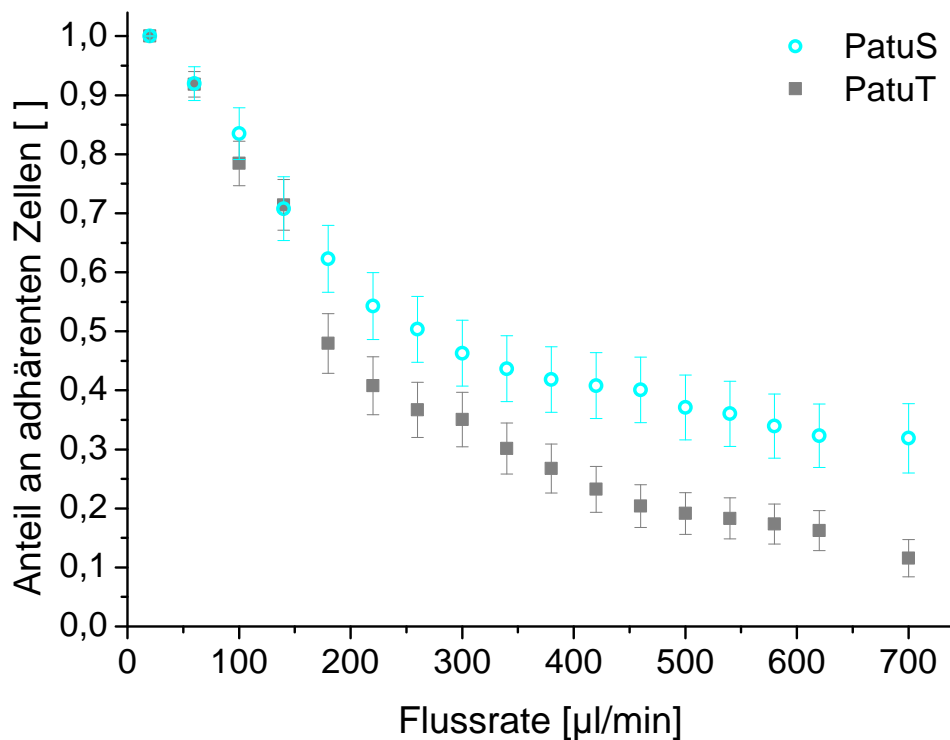


Abbildung 4.28: Anteil an adhärenen Zellen in Abhängigkeit von der angelegten Flussrate. Die PatuT und PatuS Zellen wurden gleichzeitig in einer Flusszelle untersucht. Die Daten sind auf den Anfangswert des Spülvorgangs mit einer Flussrate von $20 \mu\text{l}/\text{min}$ normiert, der nach einer Adhäsionszeit von 90 min durchgeführt wurde. Die Flussrate wurde danach schrittweise um je $40 \mu\text{l}/\text{min}$ erhöht. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Betrachtet man den Ablösevorgang auf molekularer Ebene, so erfolgen im Allgemeinen die Bindungsbrüche in der Zelle zufällig. Die statistischen Lebensdauern der spezifischen Bindungen

fallen dabei unter Krafteinwirkung exponentiell ab (Sackmann und Merkel, 2010). Einzelne spezifische Bindungen können immer brechen, in welcher Zeitspanne dies geschieht, hängt von der angelegten mechanischen Kraft ab. Es zeigt sich, dass es einen Schwellwert für das Ablösen gibt, da erst ab einer Flussrate von $140 \mu\text{l}/\text{min}$ ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen ist.

Das Ergebnis dieses schnelleren Ablöses der PatuT Zellen ist korreliert mit den getroffenen Aussagen aus den RIKM-Experimenten (Abschnitt 4.4.2). Das schnellere Ablösen der PatuT Zellen könnte somit auf den zur Zellfläche anteilig kleineren Betrag der Adhäsionsfläche, die zusätzlich in kleinere, in der Zelle räumlich gleich verteilte Adhäsionspatches fraktioniert ist, zurückzuführen sein. Betrachtet man wieder die Bindungstheorie auf molekularer Ebene, so könnte dieses Verhalten wie folgt erklärt werden: Einzelne Bindungen brechen immer auch ohne äußere Krafteinwirkung, die Zeitskala in der dies bei Krafteinfluss geschieht, hängt vom Maß der äußeren Krafteinwirkung ab (Gao et al., 2011). Eine stabile Bindung kann nicht durch eine einzige Bindung erzeugt werden, es sind viele spezifische Bindungen in der Nähe nötig, dass sich auch neue Bindungen ausbilden können, auch wenn eine äußere Kraft einwirkt. Die PatuT Zellen mit kleineren Adhäsionsbereichen lösen sich deswegen schneller vom Substrat ab, als die PatuS Zellen mit den größeren Adhäsionsbereichen. Die Lebensdauer solcher Adhäsionscluster ist nach Erdmann und Schwarz (2004a,b) auch nicht unendlich, erhöht sich aber monoton mit der Größe der Cluster. Aufgrund dessen kommt es bei den PatuS Zellen erst bei höheren Scherkräften zu einem Ablösen (siehe Abschnitt 4.5.3). Die Größe der Adhäsionspatches scheint daher eine Rolle zu spielen. In theoretischen Untersuchungen zur Effizienz der Bildung von Kontaktzonen einer mit Rezeptoren bestückten Kugel auf einer mit Liganden bestückten Oberfläche unter Einfluss einer hydrodynamischen Scherkraft, konnte auch gezeigt werden, dass durch eine erhöhte Anzahl an Rezeptoren die Effizienz gesteigert werden kann (Korn und Schwarz, 2006).

Bei höheren Flussraten nimmt der Anteil an adhärennten Zellen nicht mehr so schnell ab, wie es zu Beginn des Experimentes bei noch kleineren Raten der Fall war. Dies kann mit der erstaunlichen Fähigkeit der Mechanosensorik von Zellen, die zur Adaption der Form, der Adhäsionsstärke und der Struktur des Aktinkortexes bei äußeren Krafteinwirkungen führt, erklärt werden (Davies et al., 1994; Tzima et al., 2005). Die Stimulation mit einer externen hydrodynamischen Scherspannung kann auch ein Wachstum der FA induzieren, sodass die Zellen der externen Kraft besser standhalten können (Riveline et al., 2001; Besser und Safran, 2006; Paul et al., 2008). Einige Proteine des Zytoskeletts, wie z.B. Myosin oder Integrin zeigen unter Krafteinfluss eine erhöhte Affinität zu ihren Liganden, was als „Catch bonding“ bezeichnet wird (Sokurenko et al., 2008; Kong et al., 2009).

4.5.2 Berechnung der angelegten Scherspannung

Die Scherspannung τ entlang der Kanalwände innerhalb der Flusszelle, generiert durch den Fluss des Mediums, kann nach dem Poiseuilleschen Modell für einen Fluss innerhalb paralleler Platten mit der Formel 4.12 näherungsweise beschrieben werden:

$$\tau = \frac{6\eta Q}{h^2 w} \left[\frac{\text{kg}}{\text{ms}^2} \right] \quad (4.12)$$

Mit Q : Volumenfluss (=Flussrate) [m^3/s], η : Viskosität der Flüssigkeit [kg/ms] und der Höhe h und Breite w des Flusskanals.

Die Scherspannung wird im Allgemeinen in der Einheit $[\tau] = [1 \text{ dyn/cm}^2] = [1 \cdot 10^{-1} \text{ Pa}]$ angegeben, mit $1 \text{ dyn} = [1 \text{ g cm/s}^2]$. Diese eindimensionale Näherung kann angewendet werden, wenn die Kanalbreite w viel größer als die Kanalhöhe h ist ($w > 10h$), was in der hier verwendeten Flusszelle mit den Dimensionen $25 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 40 \text{ }\mu\text{m}$ (Länge \times Breite \times Höhe), der Fall war. Außerdem musste die Flusszelle so konzipiert sein, dass bei den angelegten Flussraten eine laminare Strömung innerhalb des Kanals (siehe Formel 2.8) vorliegt, die auch völlig ausgebildet sein muss (siehe Formel 2.12). Diese beiden Voraussetzungen wurden für die höchste in dieser Arbeit angelegten Flussrate von $Q = 700 \text{ }\mu\text{l/min}$ überprüft. Für die Viskosität des Zellmediums bei 37°C wurde der von Young et al. (2007) bestimmte Wert von $\eta \approx 0,72 \cdot 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{ms}}$ und für die Dichte, näherungsweise die Dichte von Wasser bei 37°C ($\rho \approx 993,32 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$), verwendet. Für diese Parameter erhält man eine maximale Reynoldszahl von $Re = 10,7$, welche zwei Größenordnungen von der kritischen Reynoldszahl und somit vom Übergang von laminaren in turbulente Strömungen entfernt ist. Der Fluss war nach einer Länge von $L_e = 42 \text{ }\mu\text{m}$ vollständig entwickelt, was einem sehr kleinen Anteil bezüglich der kompletten Kanallänge von 25 mm entspricht, sodass nahezu die komplette Kanallänge zwischen den Öffnungen zur Beobachtung der Zellen genutzt werden konnte. Mit diesem Ergebnis zeigt sich, dass alle Voraussetzungen erfüllt sind um die Formel 4.12 zur Berechnung der Scherspannung anwenden zu können.

Die Formel 4.12 beschreibt zwar ein vereinfachtes Modell, zeigte aber gute Übereinstimmungen (zw. 95-100 %) mit komplexen dreidimensionalen, analytischen Berechnungen (Lu et al., 2004). Young et al. (2007) beschrieben mit Hilfe der Purday Näherung die Scherspannung mit $\tau = \frac{2\eta Q}{h^2 w} \left(\frac{m+1}{m}\right) \left(\frac{n+1}{1}\right)$, wobei $m = 1,7 + 0,5(h/w)^{-1,4}$ und $n = 2$ empirische Konstanten hinsichtlich des Dimensionsverhältnisses des Kanals darstellen, vorausgesetzt $h/w < 1/3$. Für unsere Dimensionen des Flusskanals erhalten wir somit eine Scherspannung von $\tau = 1,005 \cdot (6\eta Q/h^2 w)$. Vergleicht man die von Young beschriebene Formel mit der für diese Arbeit verwendeten Näherungsformel 4.12 so ergibt sich ein Unterschied des Faktors 1,005. Der geringe Unterschied von nur 0,5 % kann vernachlässigt und die Formel 4.12 ohne Probleme angewendet werden. Tabelle 4.4 zeigt die wirkenden Scherspannungen bei den angelegten Flussraten.

Tabelle 4.4: Umrechnung der angelegten Flussraten in die auf die Zellen wirkende Scherspannung. Zur Umrechnung wurde Formel 4.12 verwendet.

Flussrate [$\mu\text{l/min}$]	20	60	100	140	180	220	260	300	340
Scherspannung [dyn/cm^2] = [10^{-1} Pa]	3	9	15	21	27	33	39	45	51
Flussrate [$\mu\text{l/min}$]	380	420	460	500	540	580	620	...	700
Scherspannung [dyn/cm^2] = [10^{-1} Pa]	57	63	69	75	81	87	93	...	105

4.5.3 Berechnung des Adhäsionsvermögens der Zellen

Mikrofluidische Ablöseexperimente dienen dazu, die Adhäsionsstärke von adhären Zellen auf einer Oberfläche zu beschreiben. Dabei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten dieses Adhäsionsvermögen bzw. diese Adhäsionsstärke zu quantifizieren. Die erste Möglichkeit stellt eine fundamentale Beschreibung des Ablöseverhaltens dar. Dabei benötigt die Abschätzung der Bindungsstärke grundlegende Berechnungen, wie z.B.: die Bestimmung der Anzahl an Bindungen, der Zellkontaktfläche, sowie Modelle zur Beschreibung der Bindungs- und Kraftverteilungen. Die

zweite Möglichkeit, auf die zunächst näher eingegangen wird, ist eine globale Untersuchung, welche die Präferenzen eines Zelltyps für eine bestimmte Oberfläche beschreibt. Dabei wird der Anteil an Zellen bestimmt, der bei einer bestimmten Flussrate abgelöst wurde. Sie ist somit sehr anschaulich und ideal für Testläufe zur Untersuchung der Biokompatibilität von Materialien in Bezug auf die Zelladhäsion und somit der Bestimmung der Stärke des Adhäsionsvermögens (Young und Simmons, 2010).

Bei der Untersuchung des Adhäsionsvermögens gibt es verschiedene Herangehensweisen. Die Adhäsionskraft kann gleich der Scherspannung gesetzt werden, bei dem sich die einzelne Zelle ablöst (Christ et al., 2010) oder aber es wird eine kritische Scherspannung angegeben, bei dem sich 50 % der Zellen losgelöst haben (Gallant et al., 2005; Christophis et al., 2010). In beiden Fällen wird die Adhäsionskraft einem Druck gleichgesetzt.

Adhäsionsvermögen der beiden Geschwisterzelllinien

Das Ablöseverhalten der beiden Zelllinien wurde mit einem polynomiellen Fit 3. Grades angenähert (siehe Abbildung 4.29) und die Scherspannung τ_{50} , bei der sich 50 % der Zellen von der Oberfläche abgelöst hatten wurde bestimmt. Sie betrug für die PatuT Zellen $\tau_{50,PatuT} = 3,14$ Pa und für die PatuS Zellen $\tau_{50,PatuS} = 4,25$ Pa. Es zeigt, dass die PatuT nur ca. 74 % der Adhäsionsstärke von den PatuS Zellen besitzen. Mit diesem Ergebnis konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die PatuT Zellen trotz größerer projizierter Zellfläche aufgrund des geringeren Anteils an Adhäsionsfläche im Vergleich zu den PatuS geringeres Adhäsionsvermögen besitzen.

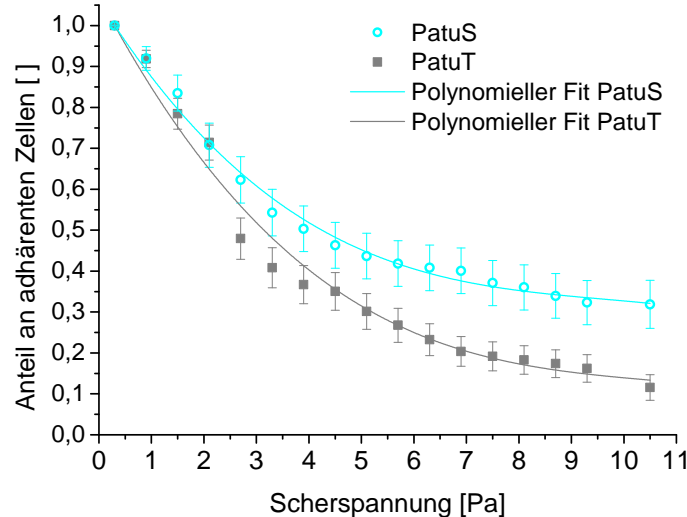


Abbildung 4.29: Anteil an adhärennten Zellen in Abhängigkeit von der Scherspannung. Die Daten wurden mit einem polynomiellen Fit angenähert. Die Fehlerbalken der Daten geben den Standardfehler an.

Die ermittelten Scherspannungen bei denen sich 50 % der Zellen ablösen stimmen in der Größenordnung mit den in der Literatur beschriebenen Scherspannung überein (Kwon et al., 2007; Christophis et al., 2010; Rupprecht et al., 2012). Kwon et al. (2007) untersuchten auch das Ablöseverhalten eines Zelllinienpaares und konnten bei der malignen Brustkrebszelllinie MCF7 eine geringere Scherspannung von im Mittel $\tau_{50} \approx 2,5$ Pa als bei der benignen Brustepithelzelllinie

MCF10A feststellen. Bei der Untersuchung der metastatischen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit vergleichbaren Flussbedingungen (0-10 Pa) und Substratbedingungen (auf Kollagen beschichteten Oberflächen) zu dieser Arbeit, berechneten [Rupprecht et al. \(2012\)](#) eine Scherspannung von $\tau_{50} \approx 2,5$ Pa, was sehr gut mit der bestimmten Scherspannung der malignen PatuT Zelllinie übereinstimmt. Die Kurve des Ablösevorgangs mit einem sigmoiden Verlauf zu fitten, wie es in mehreren Arbeiten ([Gallant et al., 2005](#); [Wankhede et al., 2006](#)) gemacht wurde, führten zu keinem guten Fitergebnis (Daten nicht gezeigt).

4.5.4 Theorien zur Interpretation des Adhäsionsvermögens der Zellen

Dimension der Zelle

Das Ablöseverhalten der Zellen unter einer Scherspannung im Flusskanal kann durch die Adhäsionsfläche, die Adhäsionsstärke pro Fläche und durch die Flussangriffsfläche, also die Höhe und Breite der Zelle beschrieben werden. In verschiedenen Studien hat sich gezeigt, dass gerade die Zellfläche und Zellform maßgeblich das Ergebnis des Ablösevorgangs beeinflussten. [Christophis et al. \(2010\)](#) fielen bei Messungen der projizierten Zellflächen auf, dass die bestimmte Adhäsionskraft speziell bei kleineren Zellen ($< 700 \mu\text{m}^2$) kleiner war als bei Zellen mit größere Zellfläche. Mit den in dieser Arbeit untersuchten Zellen mit einer projizierten Zellfläche kleiner $400 \mu\text{m}^2$ könnte somit der soeben beschriebene Effekt eine Rolle spielen. Auch [Christ et al. \(2010\)](#) untersuchten die Adhäsionskraft von Zellen bei einem angelegten Fluss und konnten eine positive Korrelation zwischen Adhäsionskraft und den beiden Zellcharakteristika Fläche und Zirkularität beschreiben. Diese wurden in computerbasierten Fluidodynamik-Analysen der Scherkräfte auf Zellen mit verschiedenen Zellflächen und Zellhöhen, wobei das Zellvolumen konstant gehalten wurde, untersucht (siehe Abbildung 4.30). Runde Zellen mit einer kleinen Kontaktfläche erfahren hierbei eine größere Scherspannung als größere, flache Zellen, die sich adhärent auf der Oberfläche ausgebreitet hatten. Außerdem ist der Größenbereich der Scherspannung bei den kleineren Zellen viel größer als bei den großen, flachen Zellen.

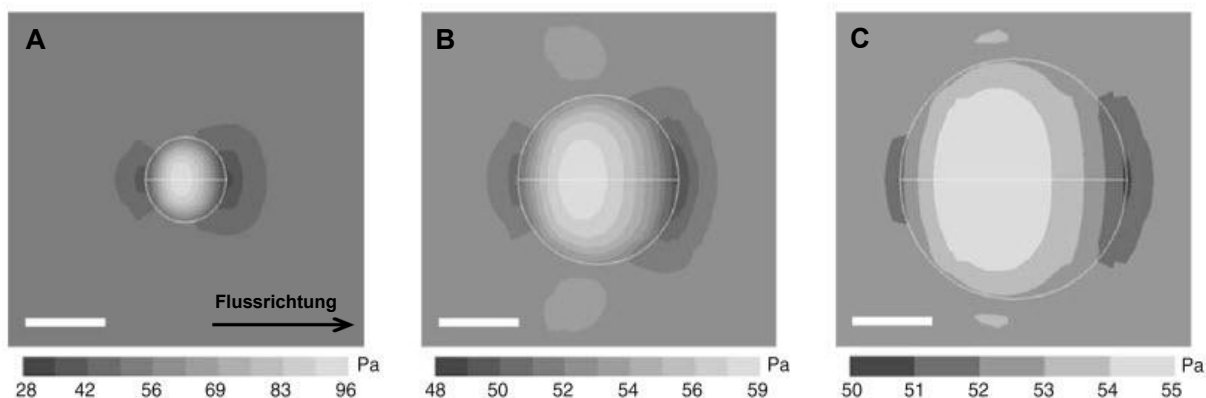


Abbildung 4.30: Modellierter Verteilung der Scherspannungen für verschiedene Zellformen bei einem angelegten Fluss. Die Zellen wurden als sphärische Kugelsegmente mit Flächen von 500 (A), 2000 (B) und $4000 \mu\text{m}^2$ (C) mit den dazugehörigen Höhen von $3,5$, $0,9$, und $0,45 \mu\text{m}$ simuliert. Die Zellgrenze ist weiß umrandet und die Linie durch den Mittelpunkt der Zelle kennzeichnet die Symmetrieachse, welche für die Simulation benötigt wird. Die simulierte Flussrate von links nach rechts betrug $Q \approx 1666 \mu\text{l}/\text{min}$. Man beachte die unterschiedlichen Größenbereiche der Scherspannung in den drei Bildern. Maßstab: $25 \mu\text{m}$. Abbildung übernommen von [Christ et al. \(2010\)](#).

Olivier und Truskey (1993) simulierten den Ablösevorgang und stellten fest, dass die Zugkraft nur wenig von der Zellform abhängig ist, wohingegen das Torsionsmoment eine große Abhängigkeit von der Zellform zeigt. Außerdem beschrieben sie einen zeitabhängigen Parameter, da beachtet werden muss, dass die Größe der Adhäsionsstärke im Verlauf des Zellspreitens aufgrund der größeren Kontaktfläche und steigender Rezeptordichte innerhalb der Kontaktfläche, zunimmt. Während des Spreitens wird die Zugkraft um einen Faktor 2, das Torsionsmoment aber um einen Faktor 20 kleiner.

In Hinblick auf die eben beschriebenen Abhängigkeiten zwischen Adhäsionsvermögen und der Dimension der Zelle, stimmen diese Aussagen nicht mit dem hier dargestellten Ergebnis des Ablöseexperimentes überein. Die Zelllinie PatuT, die sich bei niedrigeren Scherspannungen abgelöst hat als ihre Geschwisterzelllinie PatuS, zeigte in den RIKM-Experimenten aus Abschnitt 4.4.1 zwar über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant höhere projizierte Zellfläche, aber anteilig weniger Adhäsionsfläche (siehe Abschnitt 4.4.2).

Somit zeigt sich, dass nicht nur die projizierte Zellfläche bzw. die Zellform, sondern auch die Adhäsionsfläche und somit die Bindungsparameter eine große Rolle spielen. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Olivier und Truskey (1993) bestätigt, die die wirkenden Scherkräfte auf eine Zelle innerhalb eines Flusskanals unter Rücksicht der Zellform (Höhe, Radius), der Bindungsdichte, der Anzahl an Bindungen und der Zell-Substrat Kontaktfläche anhand vier verschiedenen Modellzellen simulierten. Auch in ihren numerischen Lösungen wurde die Zelle mit größerer Zellfläche aber geringerer Bindungsdichte schneller abgelöst.

Steifigkeit der Zelle

Das Adhäsionsvermögen von Zellen wird auch durch die Steifigkeit der Zelle maßgeblich beeinflusst (Simson et al., 1996). Die Steifigkeit des Aktinzytoskeletts wird durch eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen, die die Verlinkung mit FAs und die Bündelung von Aktinfilamenten steuern, bestimmt. Die laterale Spannung und die Bindungsenergie der Zellmembran haben somit einen großen Einfluss auf die Adhäsion der Zelle. Je elastischer die Zellen sind, desto mehr können diese schwingen, was zu abstoßenden Kräften führt und die Adhäsionsenergie reduziert (Zilker und Sackmann, 1987; Rädler et al., 1995). Simson et al. (1998) konnten zeigen, dass in Talin-defizienten Zellen der Biegefaktor und die laterale Spannung stark reduziert sind und die Adhäsionsenergie nur noch ein Viertel der Energie von normalen Zellen beträgt. Talin ist bekannt dafür, eine Schlüsselrolle bei der Kopplung des Aktinzytoskeletts an FAs zu spielen (Bouaouina et al., 2012).

In AFM Studien zur Steifigkeit und Elastizität von Tumorzellen stellten Cross et al. (2008) fest, dass metastatische Tumorzellen mehr als 80 % weicher sind als benigne Zellen. Außerdem konnten sie eine um 33 % verringerte Adhäsion bei Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen feststellen. Bei Messungen zur Elastizität der beiden Geschwisterzelllinien mit dem „optical stretcher“ konnten die PatuT Zellen um 5,4 % ihres Radius, die PatuS allerdings nur um 2,8 % zusammen gedrückt werden (Schnekenburger et al., 2008).

Das Ergebnis des schnelleren Ablöses der maligneren PatuT Zellen mit der Tatsache der geringeren Steifigkeit weist auf das metastatische Potential dieser Zellen hin. Mit den Flussexperimenten konnte dies bekräftigt werden.

4.5.5 Adhäsionsmodelle

Es gibt zwei verschiedene Modelle um das Ablösen der Zellen vom Substrat unter hydrodynamischen Druck zu beschreiben. Das gleichmäßige Beanspruchungsmodell nimmt an, dass sich die Zellen zu dem Zeitpunkt loslösen, an dem alle Bindungen gleichzeitig brechen. Beim Abzieh-Modell hingegen wird angenommen, dass das Loslösen der Zelle an der Zellperipherie initiiert wird und nicht alle Bindungen gleichzeitig brechen, sondern dass sich brechende Bindungszonen vom Rand der Zelle zum Inneren der Zelle hin ausbreiten, und so die Zelle vom Substrat abgezogen wird.

Bei dem Beanspruchungsmodell kommt es zu keiner Beeinflussung der räumlichen Verteilung der Bindungen auf die Adhäsionsstärke, da die kritische Scherspannung dem Wert entspricht bei dem die totale Bindungsstärke überschritten wird. Bei dem Abzieh-Modell hingegen, beeinflusst die Lage der Bindungen die Stärke der Adhäsion. [Olivier und Truskey \(1993\)](#) bestimmten durch Simulationen die kritischen Scherspannungen auf Zellen mit verschiedener Form und verschiedenen Adhäsionsflächen anhand beider Modelle. Für alle betrachteten Fälle wird für das gleichmäßige Beanspruchungsmodell eine größere kritische Scherspannung benötigt, um die Zellen abzulösen.

Bei dem Abzieh-Modell wird angenommen, dass die vertikale Kraft auf die Bindungen exponentiell mit dem Abstand von der Zellperipherie abnimmt. Es ist ersichtlich, dass dadurch auch die Verteilung der Adhäsionsflächen in Hinblick auf die projizierte Zellfläche eine große Rolle spielt. Ruft man sich die charakteristischen Adhäsionsmuster der PatuS Zellen in Form von großen Adhäsionszonen in der Nähe der Zellperipherie ins Gedächtnis (siehe [Abbildung 4.25](#) und [4.26](#)), so ist verständlich, dass diese Zellen einer höheren Scherkraft standhalten konnten als die PatuT Zellen. Bei den PatuS Zellen müssen erstmas viele Bindungen im Randbereich gebrochen werden, bevor die Zelle losgelöst werden kann. Bei den PatuT Zellen, die viele kleine, gleichmäßig über die ganze Zellfläche verteilte Adhäsionsbereiche besitzen werden somit geringere Kräfte benötigt.

Vergleicht man die in dieser Arbeit experimentell erhaltenen kritischen Scherspannungen, die im Bereich von $\tau_{50} = 3,1 - 4,3$ Pa liegen, mit den von [Olivier und Truskey \(1993\)](#) simulierten kritischen Scherspannungen, so liegen die Werte in der gleichen Größenordnung wie die für das Abzieh-Modell. Die Werte des Beanspruchungsmodells sind um eine Größenordnung höher als die hier experimentell ermittelten Werte. Daher kann man davon ausgehen, dass die beschriebenen Prozesse im Abzieh-Modell die realistischen Gegebenheiten besser beschreiben als im Beanspruchungsmodell.

Auch [Schmid-Schoenbein et al. \(1975\)](#) und [Evans \(1985a,b\)](#) beschrieben die normale Kraftverteilung als Funktion der Position. Ein wichtiger Punkt dieser Analyse des Abzieh-Modells ist, dass die Adhäsionsstärke, die dem hydrodynamischen Fluss standhalten muss, durch eine kleine Fläche der gesamten Zell-Substrat-Kontaktfläche, lokalisiert an der Zellperipherie, gegeben ist. Basierend auf früheren Analysen des Abzieh-Modells von Membranen ([Dembo et al., 1988](#); [Ward und Hammer, 1993](#)) wird die Reaktion der Bindungen auf einen Kräfteinfluss für unterschiedliche Organisationen der Bindungen beschrieben. Bei gleichmäßig verteilten und bei geclusterten Bindungen nimmt die Kräfteinwirkung exponentiell mit dem Abstand vom Angriffspunkt der Kraft ab, wohingegen für FA, die Bindungen als „steif“ bezeichnet werden und alle gleichzeitig brechen.

4.5.6 Zusammenfassung: Zellexperimente in der Mikrofluidik

Die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS zeigten während des Ablöseassays im Flusskanal unterschiedliches Ablöseverhalten. Die maligneren PatuT Zellen, welche eine größere projizierte Zellfläche besitzen, lösten sich bei einer geringeren Scherspannung als die kleineren PatuS Zellen ab. Dadurch zeigt sich, dass eine direkte Korrelation von projizierter Zellfläche mit der Adhäsionsstärke nicht immer richtig ist, sondern die Adhäsionsfläche direkt in Betracht gezogen werden muss. Wie schon durch die charakteristischen Adhäsionsmuster der beiden Zelllinien in den RIKM-Experimenten vermutet, trägt der Anteil der Adhäsionsfläche an der Gesamtfläche, sowie die räumliche Verteilung der Adhäsionspatches maßgeblich zur Adhäsionsstärke der Zellen bei. Dies konnte mit dem mikrofluidischen Ablöseassay bestätigt werden. Die Scherspannung, bei der sich 50 % der Zellen von der Oberfläche abgelöst hatten, war bei den PatuT Zellen mit $\tau_{50,PatuT} \approx 3,14$ Pa deutlich geringer als bei den PatuS Zellen mit $\tau_{50,PatuS} \approx 4,25$ Pa. Dies bedeutet, dass die PatuT Zellen nur ca. 74 % der Adhäsionsstärke der PatuS Zellen besitzen.

Viele beschriebenen Theorien zum Adhäsionsvermögen der Zellen unter Flussbedingungen basieren auf dem Einfluss der Zellfläche und Zellform, ziehen jedoch nicht speziell die Adhäsionsfläche der Zellen in die Rechnungen mit ein. Zellen mit größerer Zellfläche werden als adhärenter und somit als flacher angesehen, weshalb ihnen ein besseres Adhäsionsvermögen innerhalb des Flusskanals aufgrund des stark verringerten Torsionsmomentes und der geringeren Scherspannung (Olivier und Truskey, 1993) zugeschrieben wird (Christ et al., 2010; Christophis et al., 2010). In den hier durchgeführten Experimenten hat sich jedoch gezeigt, dass die PatuT Zellen trotz einer größeren projizierten Zellfläche als die PatuS Zellen, bei einer geringeren Scherspannung von der Oberfläche abgelöst werden konnten. Somit bestätigt sich die Hypothese, dass die Adhäsionsfläche ausschlaggebend für die Stärke der Adhäsion im Flusskanal ist und nicht die projizierte Zellfläche.

Der Beitrag der Adhäsionsfläche zur Adhäsionsstärke hängt dabei nicht unbedingt von der absoluten Adhäsionsfläche ab, sondern wird durch den prozentualen Adhäsionsflächenanteil an der Gesamtzellfläche und die räumliche Verteilung der Adhäsionsbereiche bestimmt. Würde man nämlich die Größe der Adhäsionsflächen der beiden Zelllinien zahlenmäßig vergleichen, so wäre diese bei den größeren PatuT Zellen größer als bei den PatuS Zellen. Bei Betrachtung der Verteilung der Adhäsionspatches finden sich jedoch bei den PatuS Zellen mehr größere Adhäsionspatches an der Zellperipherie.

Somit konnten hier erstmals die Adhäsionskarten von Zellen aus RIKM-Experimenten mit den Ergebnissen aus Mikrofluidikexperimenten korreliert werden. Im nächsten Abschnitt wird ein Modell zur Berechnung der Adhäsionsstärken erstellt, bei dem die Informationen aus den RIKM-Bildern bezüglich der Verteilung und Größe der Adhäsionspatches beachtet werden.

Auch die Steifigkeit der Zellen beeinflusst ihr Adhäsionsvermögen (Simson et al., 1996). Die PatuT Zellen sind elastischer als die PatuS Zellen, da sie bei Messungen mit einem „optical stretcher“ um 5,4 % ihres Radius, die PatuS allerdings nur um 2,8 % zusammen gedrückt werden konnten (Schnekenburger et al., 2008). Das Ergebnis des schnelleren Ablöses der maligneren PatuT Zellen mit der Tatsache der geringeren Steifigkeit weist auf das metastatische Potential dieser Zellen hin. Mit den Flussexperimenten konnte dies bekräftigt werden.

Die Mikrofluidik stellt eine gute Methode zur Untersuchung des Adhäsionsvermögens der Zellen dar. Im Vergleich zu anderen Techniken wie z.B. der AFM basierten Kräftermessungen (Micoulet et al., 2005; Selhuber-Unkel et al., 2010) oder die Mikropipettentechnik (Hochmuth, 2000), wird bei der Mikrofluidik eine gleichmäßige Kraft über die gesamte Zelle und nicht nur

auf einen kleinen Bereich der Zelle ausgeübt. Da sich viele Zellen *in vivo* in fluiden Umgebungen befinden und dort ständig einer hydrodynamischen Kraft ausgesetzt sind, stellt die Mikrofluidik ein physiologisch relevantere Methode zur Messung der Adhäsionskraft als z.B. die Messung mit harten Messsensoren bei der Rasterkraftmikroskopie, dar.

4.6 Modell zur Berechnung von Adhäsionsstärken auf der Basis von RIKM-Bildern

Die Betrachtung der charakteristischen Adhäsionsmuster der beiden Geschwisterzelllinien in den RIKM-Experimenten lässt vermuten, dass die PatuS Zellen ein besseres Adhäsionsvermögen als die PatuT Zellen besitzen, da sie anteilig zur Gesamtzellfläche mehr Adhäsionsfläche besaßen, die zusätzlich in Form von größeren Adhäsionspatches an der Zellperipherie lokalisiert war. Diese Vermutung konnte mit den Mikrofluidik-Experimenten bestätigt werden. Um nun die Adhäsionsstärke der Zellen direkt anhand der RIKM-Bilder abschätzen zu können, wurde ein mathematisches Modell erstellt. Es basiert auf den Grundlagen des von Gallant et al. (2005) beschriebenen Modells zur Zelladhäsionsverstärkung, bei dem die Kraft eines Adhäsionspatches bezüglich der Verteilung der Bindungen, sowie der Beschaffenheit des Adhäsionspatches betrachtet wurde.

In unserem Modell soll anhand der Adhäsionskarten der RIKM-Bilder die Adhäsionskraft berechnet werden, die von der gesamten Zelle ausgeübt wird. Wie schon bei den Ergebnissen der Mikrofluidikexperimente beschrieben (siehe Abschnitt 4.5), gehen wir beim Ablöseverhalten der Zellen vom Abzieh-Modell aus (Olivier und Truskey, 1993; Gallant et al., 2005), weil damit die experimentellen Mikrofluidikdaten am besten beschrieben werden konnten. Das Abzieh-Modell nimmt an, dass das Loslösen der Zelle an der Zellperipherie initiiert wird und dass sich die Zelle nicht erst löst, wenn alle Bindungen gleichzeitig gebrochen wurden. Erst wenn die Kraft an der Zellperipherie die maximale Bindungsstärke der peripheren Bindungszonen übersteigt, brechen die Bindungen an dieser Stelle und die brechenden Bindungszonen verschieben sich während des Abziehprozesses in Richtung des Zellmittelpunkts. Diese Verschiebung der Bindungszonen resultiert in einem Abziehen der Zelle von der Oberfläche. Darauf basierend wird angenommen, dass der vertikale Bindungsstress exponentiell mit dem Abstand von der Zellperipherie abnimmt (Olivier und Truskey, 1993).

Zur Berechnung der Adhäsionskraft wird für das hier vorgestellte Modell die Zelle von der Peripherie bis zum Mittelpunkt in i radiale Segmente untergliedert. Die Kraft F_i eines jeden Segmentes i kann mit Formel 4.13 und die Adhäsionskraft F_{Zelle} der gesamten Zelle als Summe aller Kräfte aus den einzelnen Segmenten (Formel 4.14) beschrieben werden:

$$F_i = fB_i [\epsilon + (1 - \epsilon) \exp(1 - i)] \quad (4.13)$$

$$F_{Zelle} = \sum_i F_i \quad (4.14)$$

f bezeichnet die spezifische Bindungsstärke zwischen einem Integrinrezeptor und seinem Liganden und B_i die Anzahl an Bindungen im Segment i . ϵ gibt den Anteil an Bindungen im Adhäsionsbereich an, der mit FA assoziiert ist. Mit dem letzten Term der Formel 4.13 wird der exponentielle Abfall der Krafteinwirkung mit dem Abstand vom Angriffspunkt beschrieben, der

durch den Faktor ϵ beeinflusst wird.

Die Bindungen in FAs werden in theoretischen Modellen aufgrund der Kopplung mit dem Zytoskelett, in paralleler Anordnung beschrieben, d.h. die Kraft wird auf alle Bindungen in der FA gleich verteilt, sodass auch alle Bindungen gleichzeitig brechen (Besser und Safran, 2006; Erdmann und Schwarz, 2007). Dies würde bedeuten, dass man von einem komplett „steifen“ Zytoskelett ausgehen müsste, wenn alle Bindungen mit FA assoziiert wären. Dieser Extremfall wird durch Einsetzen von $\epsilon = 1$ in Formel 4.13 beschrieben. Die Kraft F_{Zelle} würde dann nur von der Anzahl an Bindungen B_i im Adhäsionsbereich und der spezifischen Bindungsstärke f abhängen ($F = fB_i$), nicht aber von der Position der Adhäsionspatches innerhalb der Zelle.

Bei gleichmäßig verteilten und bei geclusterten Bindungen, die noch nicht mit FA assoziiert sind, muss $\epsilon = 0$ gesetzt werden. Die Kraft fällt exponentiell mit dem Abstand vom Angriffspunkt ab und ist abhängig von der Position, d.h. dem Segment i , der Adhäsionspatches ($F = fB_i \exp(1 - i)$).

Die in dieser Arbeit wichtige Fragestellung war, wie man anhand der Größe und der räumlichen Lage der Adhäsionspatches die Adhäsionskraft der Zelle abschätzen kann. Für das Modell wurde deswegen die komplette Zelle von der Zellperipherie bis hin zum Zellmittelpunkt in 10 Segmente ($i=1-10$) untergliedert. Im Folgenden wird das Modell anhand der in Abschnitt 4.4 präsentierten Ergebnissen der RIKM-Messungen für den Adhäsionszeitpunkt von 60 min vorgestellt.

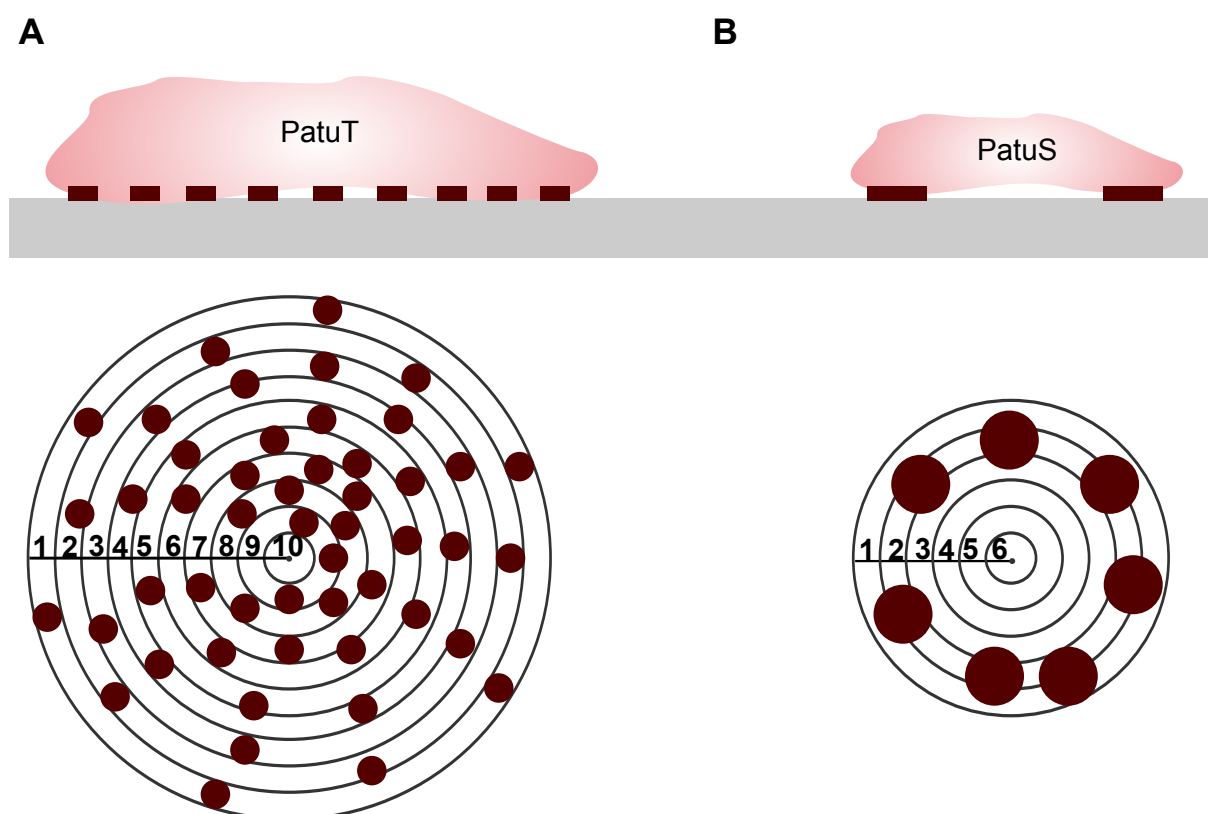


Abbildung 4.31: Skizzierung der untersuchten Parameter für das mathematische Modell der Berechnung der Adhäsionsstärken aus den RIKM-Bildern. (A) zeigt die Ausgangslage der PatuT Zellen. Es sind viele kleine Adhäsionspatches über die gesamte Zelle verteilt. In (B) sind die Charakteristika der PatuS Zellen aufgezeigt. Sie besitzen nur 60 % der projizierten Zellfläche von den PatuT Zellen, weswegen sie in weniger Segmente aufgeteilt werden. Ihre einzelnen Adhäsionspatches sind größer und liegen an der Peripherie der Zelle.

In der Abbildung 4.31 sind die beiden Fälle skizziert, die bei der Betrachtung der Adhäsionsmuster der beiden Zelllinien PatuT und PatuS auftraten. Die PatuT Zellen zeigten kleinere Adhäsionspatches, die über die gesamte Zelle gleichmäßig verteilt waren (Abbildung 4.31A), wohingegen die PatuS Zellen größere Adhäsionspatches zeigten, die an der Peripherie der Zelle auftraten (Abbildung 4.31B). Aufgrund der Tatsache, dass die PatuS kleiner als die PatuT Zellen und nur ca. 60 % der projizierten Zellfläche der PatuT Zellen besitzen, werden im Modell für die PatuS Zellen nur 6 Segmente in die Berechnung integriert: $F_{PatuT} = \sum_{i=1}^{10} F_i$; $F_{PatuS} = \sum_{i=1}^6 F_i$.

Um die Lage der Adhäsionspatches zu bestimmen wurden die Informationen aus den Radialplots (siehe Abbildung 4.25) genutzt. Mit Hilfe dessen wurde der prozentuale Anteil an adhärenter Fläche in Abhängigkeit vom normierten Zellradius r bestimmt und auf dem Gesamtanteil normiert (der Intensitätswert 255 auf der y -Achse entspricht dabei einem Anteil von 0 % Adhäsionsfläche und der Intensitätswert 0, einem Adhäsionsanteil von 100%). Mit den Positionsinformationen aus dem normierten Radius, kann so der normierte prozentuale Anteil an Adhäsionsfläche den Segmenten zugeordnet werden. Bei den PatuT Zellen, die mit 10 Segmenten modelliert werden, wird der Radius $0 \geq r \leq 0,1$ dem Segment $i = 10$ und der Radius $0,9 \geq r \leq 1$ dem Segment $i = 1$ zugeteilt. Bei den PatuS Zellen, die mit 6 Segmenten modelliert werden, wird der Radius $0 \geq r \leq 0,166$ dem Segment $i = 6$ und der Radius $0,833 \geq r \leq 1$ dem Segment $i = 1$ zugeteilt.

Für die Anwendung der Formel 4.13 muss die Anzahl an Bindungen in jedem Segment bestimmt werden. In dieser Modellrechnung gehen wir von insgesamt 26000 Bindungen bei den PatuT Zellen und von 19500 Bindungen bei den PatuS Zellen aus. Die Anzahl der Bindungen ist für die beiden Zelllinien unterschiedlich, da berücksichtigt wurde, dass die PatuS Zellen zum Zeitpunkt 60 min eine ca. 25 % kleinere Adhäsionsfläche als die PatuT besitzen und damit auch über weniger Bindungen verfügen. Diese gewählte Anzahl an Bindungen ist angenähert durch Betrachtung der Adhäsionsfläche der PatuT Zellen nach 60 min und der Annahme, dass die Integrine, mit einem Durchmesser von ca. 9 nm (Xiong et al., 2001) in einem Abstand von ca. 50 nm im Adhäsionspatch vorliegen. Der Abstand 50 nm wurde gewählt, da dies die Größenordnung von intrazellulären FA-Proteinen, wie z.B. Talin ist, die die Integrine miteinander verbinden (Kanchanawong et al., 2010; Bouaouina et al., 2012). Mit diesen Annahmen liegt die Rezeptordichte bei $3,7 \cdot 10^{10}/\text{cm}^2$, was im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Dichten von 10^7 - $10^{11}/\text{cm}^2$ liegt (Cozens-Roberts et al., 1990). Die Anzahl der Bindungen wurde dann anhand der bestimmten Prozentzahl an Adhäsionsfläche in Abhängigkeit des Radius auf die einzelnen Segmente verteilt (siehe Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Verteilung der Bindungen auf die einzelnen Segmente. Bei den PatuT Zellen wurde eine Gesamtzahl von 26000 Bindungen bei den PatuT Zellen und 19500 Bindungen bei den PatuS Zellen angenommen.

Zelllinie	Gesamtzahl	Segment 1	2	3	4	5
PatuT	26000	445	1871	2817	2980	3043
PatuS	19500	1307	5078	4578	3247	2928
Zelllinie		6	7	8	9	10
PatuT		3057	3037	3158	2867	2724
PatuS		2361	0	0	0	0

Mit den Werten aus Tabelle 4.5 kann nun die Adhäsionskraft der einzelnen Segmente und der ge-

samtigen Zelle berechnet werden. Es werden nun verschiedene Fälle betrachtet, die durch Änderung des Faktors ϵ moduliert werden können:

1. Fall: Abzieh-Modell $\Rightarrow \epsilon = 0 \Rightarrow F_{PatuT} = 0,43 F_{PatuS}$
2. Fall: Gleichmäßiges Beanspruchungsmodell $\Rightarrow \epsilon = 1 \Rightarrow F_{PatuT} = 1,33 F_{PatuS}$
3. Fall: 1/3 der Adhäsionsfläche sind FA $\Rightarrow \epsilon = 0,33 \Rightarrow F_{PatuT} = 1,06 F_{PatuS}$

Geht man vom Abzieh-Modell aus (Fall 1), besäßen die PatuT Zellen nur ca. 43 % der Adhäsionskraft der PatuS Zellen ($F_{PatuT} = 0,43 F_{PatuS}$). Nimmt man das gleichmäßige Beanspruchungsmodell (Fall 2) an, so besäßen die PatuT Zellen eine 33 % größere Adhäsionskraft als die PatuS Zellen $F_{PatuT} = 1,33 F_{PatuS}$. Berücksichtigt man den Aspekt, dass 1/3 der Gesamtadhäsionsfläche FA sind, wie es anhand von Immunofluoreszenzfärbungen in Abschnitt 4.4.3 bestimmt wurde (Fall 3), so hätten die PatuT Zellen nach Berechnung eine um 6 % größere Adhäsionskraft als die PatuS Zellen $F_{PatuT} = 1,06 F_{PatuS}$.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen aus den Mikrofluidikexperimenten (Abschnitt 4.5.3), wo die PatuT nur ≈ 74 % der Adhäsionsstärke der PatuS besaßen (Mikrofluidik: $\mathbf{F}_{PatuT} = 0,74 \mathbf{F}_{PatuS}$), so liegt dieser Wert genau zwischen den beiden Annahmen von Fall 1 und Fall 3.

Jedoch muss beachtet werden, dass der Aspekt, dass sich die Größenverteilung der Adhäsionspatches bei den beiden Geschwisterzelllinien unterscheidet, bis jetzt noch nicht im Modell berücksichtigt wurde. Die in Abschnitt 4.4.4 bestimmte Einordnung der Adhäsionspatches in kleine, mittlere und große, kann dazu genutzt werden, das Modell zu modifizieren. Dafür müssen für die drei Größenbereiche individuelle Annahmen getroffen werden, welche mit ϵ moduliert werden können:

1. Die **kleinen** Adhäsionspatches sind noch nicht genügend geclustert und haben deswegen noch keine feste Verankerung zum Zytoskelett gebildet \Rightarrow die Ablösung erfolgt exponentiell mit dem Abstand $\Rightarrow \epsilon = 0$
2. Die **mittleren** Adhäsionspatches liegen im Größenbereich der FA \Rightarrow in diesem Größenbereich tragen 2/3 der Fläche zu dem bestimmten Gesamtanteil an FA (FA/Adh=1/3) bei $\Rightarrow \epsilon = 2/9$
3. Bei den **großen** Adhäsionspatches müssen zwangsläufig auch weniger enge Kontakte ohne Verankerung vorhanden sein, da es solch große FA nicht gibt \Rightarrow dieser Bereich trägt nur zu einem Drittel am FA-Anteil bei $\Rightarrow \epsilon = 1/9$.

Bei den Annahmen wurde darauf geachtet, dass 1/3 der Gesamtadhäsionsfläche FA darstellen, d.h. dass die Summe der festgelegten ϵ der drei Größenbereiche wieder 1/3 ergeben müssen ($\epsilon_{gesamt} = 0,33$). Berechnet man nun mit diesen Annahmen und der Informationen aus der Größenverteilung (PatuT: 50,91 % kleine, 31,25 % mittlere und 17,84 % große Patches; PatuS: 31,35 % kleine, 34,63 % mittlere und 34,02 % große Patches) die Kraft aus, so würden die PatuT Zellen ca. 71 % der Adhäsionskraft der PatuS Zellen besitzen ($\mathbf{F}_{PatuT} = 0,71 \mathbf{F}_{PatuS}$). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Werten aus den Mikrofluidik-Experimenten überein.

Da die Zellen bei den RIKM-Experimenten auf Kollagen beschichteten Oberflächen ausgesät wurden, kann die spezifische Bindungsstärke mit einer Integrin-Kollagen-Bindung angenähert werden. Nimmt man für die Bindungsstärke f die Stärke einer Bindung des $\alpha2\beta1$ -Integrins mit Kollagen-TypI von $f \approx 50$ pN an (Taubenberger et al., 2007), so besitzen die PatuT Zellen eine Adhäsionsstärke von $F_{PatuT} \approx 207$ nN, die PatuS Zellen eine Adhäsionsstärke von

$F_{PatuS} \approx 290$ nN. Für Fibroblasten konnten mittels AFM Studien Adhäsionskräfte von 350-580 nN bestimmt werden (Marcotte und Tabrizian, 2008). Die etwas kleineren Werte der Adhäsionsstärke der PatuT und PatuS Zellen lässt sich mit dem verminderten Adhäsionsvermögen von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen erklären.

Zusammenfassung

Anhand der Formel 4.13 kann die Adhäsionskraft der Zellen mithilfe der RIKM-Bilder abgeschätzt werden. Das hier erstellte Modell berücksichtigt dabei die Größenunterschiede in den zu untersuchenden Zelllinien bezüglich ihrer projizierten Zellfläche und ihrer Adhäsionsfläche, die Position der Adhäsionspatches und der Adhäsionspatchgröße.

Die Größenunterschiede in der projizierten Zellfläche der Zelllinien werden dabei mit der Einteilung der Zelle in Segmente berücksichtigt, die größenabhängig gegliedert werden können. Die Größenunterschiede in der Gesamtadhäsionsfläche werden durch die verfügbare Gesamtzahl an Bindungen moduliert.

Der Anteil an Adhäsionsfläche und die Position der Adhäsionspatches wird mittels Informationen aus dem Radialplot bestimmt und kann dann in Form von der Bindungsanzahl in den einzelnen Segmenten übertragen werden.

Mit dem Faktor ϵ können verschiedene Fälle des Ablöseverhaltens moduliert werden, wo beispielsweise für das Abzieh-Modell $\epsilon = 0$ und für das gleichmäßige Beanspruchungsmodell $\epsilon = 1$ eingesetzt werden muss. Bei den Berechnungen hat sich gezeigt, dass eine genauere Einteilung des Faktors ϵ in Abhängigkeit von den Adhäsionspatchgrößen wichtig ist, um mit den modellierten Berechnungen die experimentellen Daten (hier aus den Flussexperimenten) gut beschreiben zu können. Abbildung 4.32 verdeutlicht nochmals den Einfluss des Faktors ϵ auf die Adhäsionsstärke.

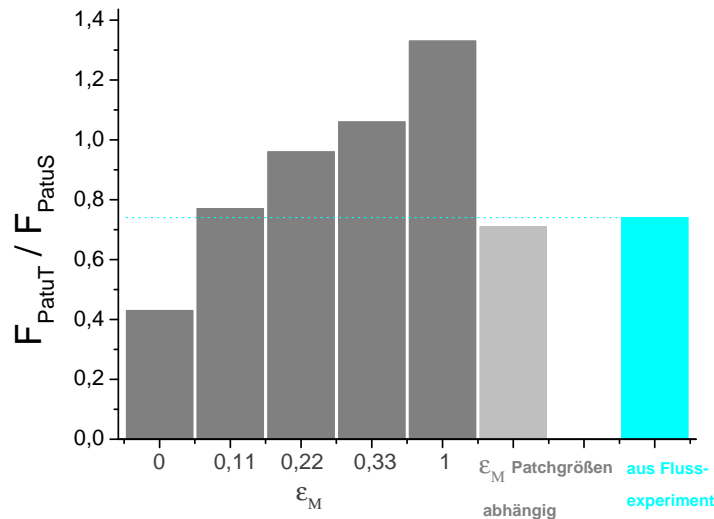


Abbildung 4.32: Verhältnis der Adhäsionsstärke von PatuT zu PatuS Zellen. Dabei wurden verschiedene ϵ eingesetzt, oder das ϵ unter Berücksichtigung der Größenverteilung der Adhäsionspatches gewählt. Der hellblaue Balken zeigt die Ergebnisse aus den Flussexperimenten.

Beim Abzieh-Modell spielt die Lage der Adhäsionspatches eine Rolle, wohingegen bei dem gleich-

mäßigen Beanspruchungsmodell nur die totale Größe der Adhäsionspatches (=Gesamtadhäsionsfläche) die Adhäsionsstärke bestimmt. Durch die Informationen über die Position aber auch die Größenverteilung der Adhäsionspatches aus den RIKM-Bildern, sowie der Größe der Zellen, kann mit diesem Modell die Adhäsionsstärke der Zellen gut abgeschätzt werden. Unter Annäherung der spezifischen Bindungsstärke von Rezeptor und Ligand, kann so auch ein direkter Wert für die Adhäsionsstärke der Zellen angegeben werden. Die Adhäsionsstärke betrug somit bei den PatuT Zellen $F_{PatuT} \approx 207$ nN, bei den PatuS Zellen $F_{PatuS} \approx 290$ nN.

Durch die Änderungen des Grenzwertes in den RIKM-Bildern, mit dem die Adhäsionsbereiche der Zelle bestimmt werden, können so auch detailliertere Untersuchungen zu den verschiedenen Arten von Kontaktzonen durchgeführt werden. Dazu könnten man beispielsweise den Grenzwert auf einen Abstand von $d=15$ nm setzen um so nur die FA beobachten zu können und ihre Adhäsionsstärke zu berechnen.

4.7 Untersuchung der fraktalen Dimension der Zelllinien PatuT und PatuS anhand von RIKM-Bildern

Lebende Zellen können als komplexe adaptive Systeme angesehen werden, die nicht lineare Dynamiken und fraktale Merkmale besitzen. Diese fraktalen Strukturen wurden bis jetzt nur anhand von pathologischen Schnitten (Mashiah et al., 2008; Vasilescu et al., 2012) oder aber mittels AFM-Bildern von Oberflächenabbildungen („surface adhesion maps“) einzelner Zellen untersucht (Dokukin et al., 2011). In dieser Arbeit wurde nun die fraktale Dimension der Oberflächentopografie der Zelle, dargestellt durch die RIKM-Bilder, analysiert. Dabei stellte sich die Frage, ob die beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS anhand der fraktalen Struktur des Adhäsionsmusters unterschieden werden können und ob zusätzlich Informationen über den Malignitätsgrad der Zellen herausgelesen werden können.

Zur Untersuchung der fraktalen Dimension des Adhäsionsmusters der beiden Geschwisterzelllinien wurden die RIKM-Bilder der PatuT und PatuS Zellen mittels eines ImageJ Plug-ins zur Fraktalanalyse (siehe Abschnitt 3.7.4) analysiert. Um einen Eindruck davon zu gewinnen welche Informationen der RIKM-Bilder fraktale Dimensionen (FD) der Zellen aufzeigen, wurde die Analyse der FD unter drei verschiedenen Aspekten durchgeführt:

1. „Konturaspekt“
2. „Globaler Kontur-Strukturaspect“
3. „Interner Strukturaspect“

Bei der Analyse der FD unter dem Konturaspekt (siehe Abbildung 4.33A) wurde nur die Kontur der Zelle berücksichtigt. Die Analyse der Zellkontur mittels RIKM-Bildern besitzt dabei den Vorteil, dass mit der RIKM die Zellränder klar wiedergegeben werden und somit feinste Strukturen, wie z.B. Filopodien erst aufgelöst werden können, die in der normalen Hellfeldmikroskopie unsichtbar bleiben. Unter dem globalen Kontur-Strukturaspect wurde das segmentierte RIKM-Bild auf schwarzem Hintergrund untersucht, wobei die Kontur und die Struktur der Zelle, gegeben durch die verschiedenen Grauwerten, berücksichtigt wurden (siehe Abbildung 4.33B). Unter dem internen Strukturaspect wurden nur die Informationen der Grauwerte des RIKM-Bildes, also das Adhäsionsmuster innerhalb der Zelle, zur Analyse der FD herangezogen (siehe Abbildung 4.33C). In den folgenden Abschnitten werden die drei Aspekte näher erläutert und die resultierenden Ergebnisse präsentiert.

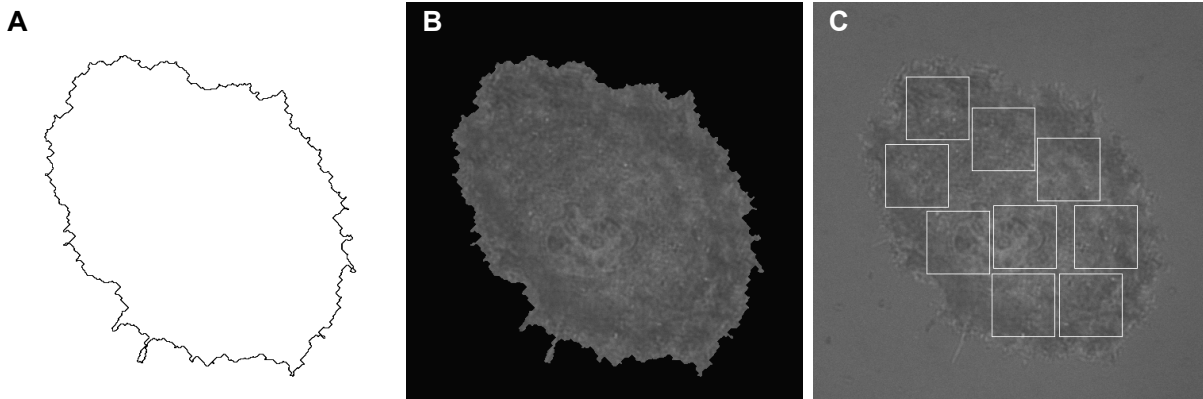


Abbildung 4.33: Übersicht der drei verschiedenen Aspekte, unter denen die fraktale Dimension der PatuT und PatuS Zellen bestimmt wurde. Bei der Analyse der FD unter dem Konturaspekt wird nur die Kontur der Zelle betrachtet (A). Unter dem globalen Kontur-Strukturaspekt wird das segmentierte RIKM-Bild auf schwarzem Hintergrund untersucht, wobei die Kontur und die Struktur der Zelle, gegeben durch die verschiedenen Grauwerte im RIKM-Bild, berücksichtigt wird (B). Unter dem internen Strukturaspekt wurden nur die Informationen der Grauwerte des RIKM-Bildes innerhalb der Zelle zur Analyse der FD herangezogen. Dazu wurden in einer Zelle mehrere FD bestimmt, immer in Bereichen von der Größe 80x80 Pixel (C).

4.7.1 Analyse der FD unter dem Konturaspekt

Die Analyse der FD unter dem Konturaspekt berücksichtigt nur die Kontur der Zelle. Dazu wurden die RIKM-Bilder, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, segmentiert. Die Kontur der Zelle, wurde dann mit der Boxcounting-Methode des ImageJ Plug-ins (siehe Abschnitt 3.7.4) analysiert, um die FD der Kontur der beiden Zelllinien zu bestimmen. Die PatuT Zellen zeigten in ihrer Kontur eine hoch signifikant ($p < 0,001$) größere fraktale Dimension $FD_{PatuT} = 1,218 \pm 0,005$ als die PatuS Zellen mit $FD_{PatuS} = 1,171 \pm 0,004$. Die Verteilung der Werte verlief bei beiden Zelllinien nach einer Gaussverteilung (siehe Abbildung 4.34A). Um Unterschiede in der FD nur aufgrund von Differenzen in der Zellgröße der beiden Zelllinien auszuschließen, wurde die FD in Abhängigkeit vom Umfang der Kontur untersucht. Das in Abbildung 4.34B präsentierte Streudiagramm der FD in Abhängigkeit von dem Umfang der Kontur zeigte, dass die Höhe der FD nicht von der Größe der Zelle beeinflusst wurde. Es liegt keine lineare Korrelation zwischen der Größe der Kontur und dem Wert der FD vor (Pearson-Korrelationskoeffizient: $Korr_{PatuT} = 0,04$; $Korr_{PatuS} = 0,37$). Somit können die unterschiedlichen Werte für die FD durch die unterschiedliche fraktale Kontur der beiden Zelllinien erklärt werden.

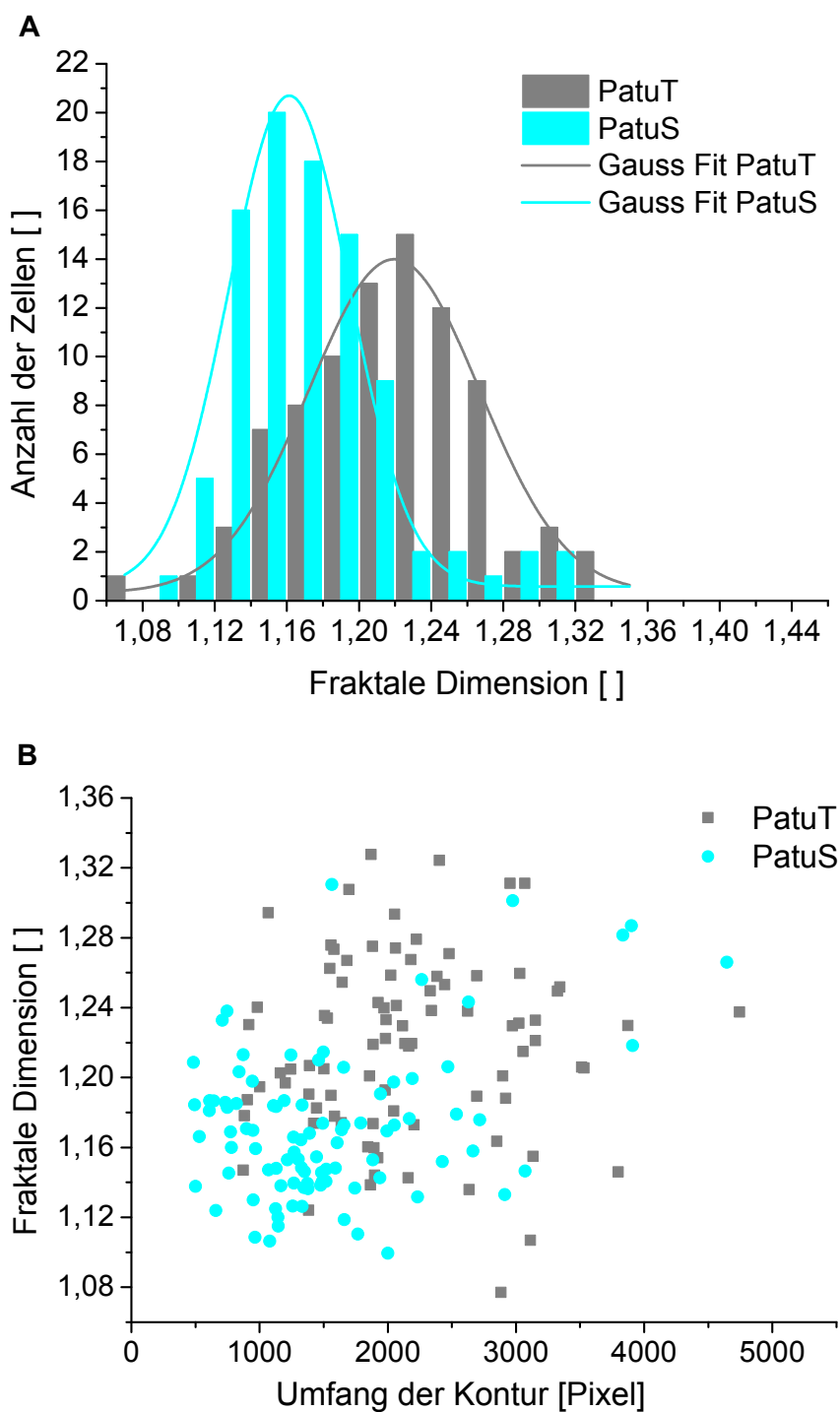


Abbildung 4.34: Fraktale Dimension für die Kontur der PatuT und PatuS Zellen. Für die Bestimmung wurden die Informationen unter dem Konturaspekt verwendet. (A) zeigt das Histogramm der FD. Die Verteilungen konnten mit einer Gaussfunktion gefittet werden. Die fraktale Dimension der beiden Geschwisterzelllinien unterscheidet sich hoch signifikant (Signifikanz: $p < 0,001$). In (B) ist die FD in Abhängigkeit vom Umfang der Kontur gezeigt.

4.7.2 Analyse der FD unter dem globalen Kontur-Strukturasspekt

Bei der Analyse der FD unter dem globalen Kontur-Strukturasspekt wurde neben der Kontur der Zelle auch die Struktur des Adhäsionsmusters, gegeben durch die Grauwerte des RIKM-Bildes, berücksichtigt. Für die Auswertung wurde der Hintergrund außerhalb der segmentierten Zelle schwarz gesetzt. Da die FD-Analyse mit der Box-Counting Methode durchgeführt wurde, die auf der Verwendung von rechteckigen Boxen beruht, werden auch Informationen des schwarzen Hintergrunds in die Analyse der FD mit einbezogen. Um den Anteil an schwarzem Hintergrund in den zu analysierenden Bildern möglichst gleich zu halten, wurden die Original-RIKM-Bilder anhängig von der Zellgröße zugeschnitten und zwar in Bilder der Größen 320x320, 500x500, 600x600 oder 650x650 Pixeln. Auch bei der FD-Analyse unter diesem kombinierten Kontur-Strukturasspekt zeigten die PatuT Zellen eine größere fraktale Dimension mit $FD_{PatuT} = 1,353 \pm 0,004$ als ihre Geschwisterzelllinie PatuS mit einer fraktalen Dimension von $FD_{PatuS} = 1,312 \pm 0,005$. Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist zwar kleiner als bei der Analyse unter dem Konturasspekt, ist aber trotzdem noch hoch signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Die Verteilungen lassen sich nicht optimal mit einer Gaussfunktion fitten (siehe Abbildung 4.35A). Bei der Betrachtung der FD in Abhängigkeit von der Bildgröße fällt auf, dass bei der kleinsten Bildgröße fast der komplette Bereich der möglichen Werte für FD ausgeschöpft wird (siehe Abbildung 4.35B). Es ist aber eine Tendenz bei größeren Bildgrößen zu höheren FD zu erahnen. Trotzdem liegen die FD der PatuT Zellen, ungeachtet der Bildgröße, immer etwas höher als die der PatuS Zellen, was darauf hindeutet, dass auch unter dem globalen Kontur-Strukturasspekt, die Unterschiede der FD auf Unterschiede in den Zelllinien zurückzuführen sind.

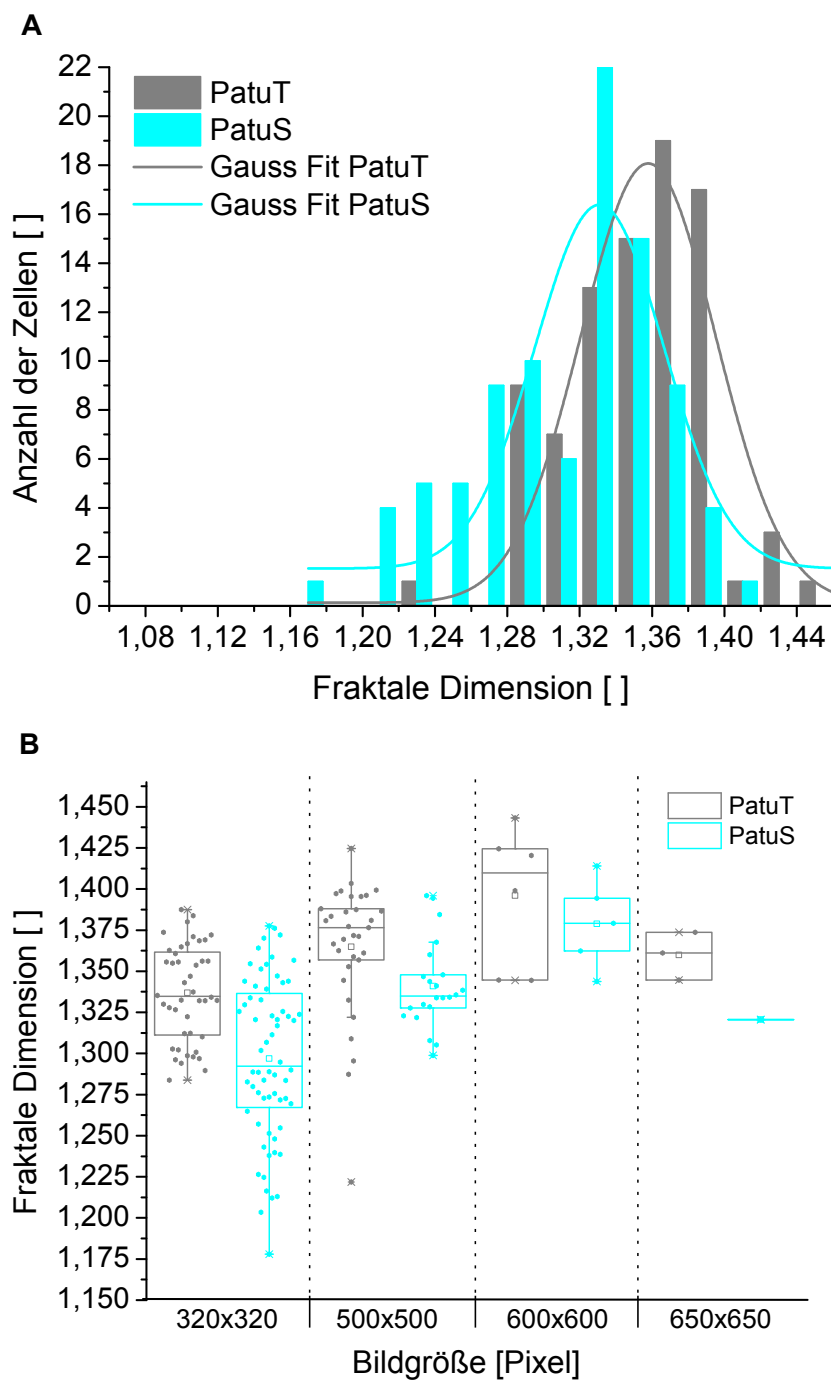


Abbildung 4.35: Fraktale Dimension für die Kontur und Struktur der PatuT und PatuS Zellen. Für die Bestimmung wurden die Informationen unter dem globalen Kontur-Strukturaspekt verwendet. **(A)** zeigt das Histogramm der FD. Bei der Fraktalanalyse wurde das RIKM-Grauwertbild der Zellen ausgewertet. Die Verteilungen wurden mit einer Gaussfunktion gefittet. Die fraktale Dimension der beiden Geschwisterzelllinien unterscheidet sich hoch signifikant (Signifikanz: $p < 0,001$). **(B)** zeigt einen Boxplot der FD in Abhängigkeit von der Bildgröße, wobei die RIKM-Bilder in der Vorbearbeitung zur Fraktalanalyse je nach Zellgröße auf vier verschiedene Bildgrößen zugeschnitten wurden. (Boxplot: Box: 50 % der Daten; Whisker: 1,5x Interquartilabstand; kleines rechteckiges Kästchen: Mittelwert).

4.7.3 Analyse der FD unter dem internen Strukturaspekt

Nachdem nun die Fraktalanalyse der beiden Geschwisterzelllinien in Bezug auf den Konturaspekt und den globalen Kontur-Strukturaspekt untersucht wurde, stellte sich nun die Frage ob das Adhäsionsmuster der Zellen, also die Grauwerte im RIKM-Bild, allein schon eine fraktale Dimension besitzt, die für die beiden untersuchten Zelllinien unterschiedlich ist.

Da nun nur der interne Strukturaspekt bei der Analyse der FD berücksichtigt werden sollte, wurden Boxen einer Größe von 80x80 Pixeln gesetzt in denen die FD bestimmt wurden. Es wurde in jede Zelle die größtmögliche Anzahl an Boxen, die innerhalb der Kontur der Zelle positioniert werden konnte, gesetzt. Dabei wurden keine Randbereiche der Zelle ausgewählt, sodass die Kontur keine Rolle bei der Analyse spielt, sondern nur der interne Strukturaspekt, d.h. das Adhäsionsmuster der kompletten Zelle inklusive Zellkern. Aufgrund der größeren projizierten Zellfläche der PatuT Zellen ist die Anzahl an analysierten 80 x 80 pixelgroßen Boxen größer als bei den kleineren PatuS Zellen (siehe Abbildung 4.36). Auch bei dieser Analyse konnten Unterschiede in der FD der beiden Geschwisterzelllinien beobachtet werden. Die malignen PatuT Zellen besitzen, wie auch schon bei den beiden anderen Verfahren gezeigt, mit $FD_{PatuT} = 1,297 \pm 0,002$ eine größere fraktale Dimension als die benignen PatuS Zellen mit einer FD von $FD_{PatuS} = 1,286 \pm 0,002$. Der Unterschied ist zwar kleiner als in den beiden vorangegangenen Analysen, aber trotzdem noch signifikant. Die Verteilung der FD konnte mit einer Gausskurve gefittet werden. Somit können die unterschiedlichen Werte für die FD der internen Struktur und somit dem Adhäsionsmuster der Zellen, auf Unterschiede in den beiden Zelllinien zurückgeführt werden.

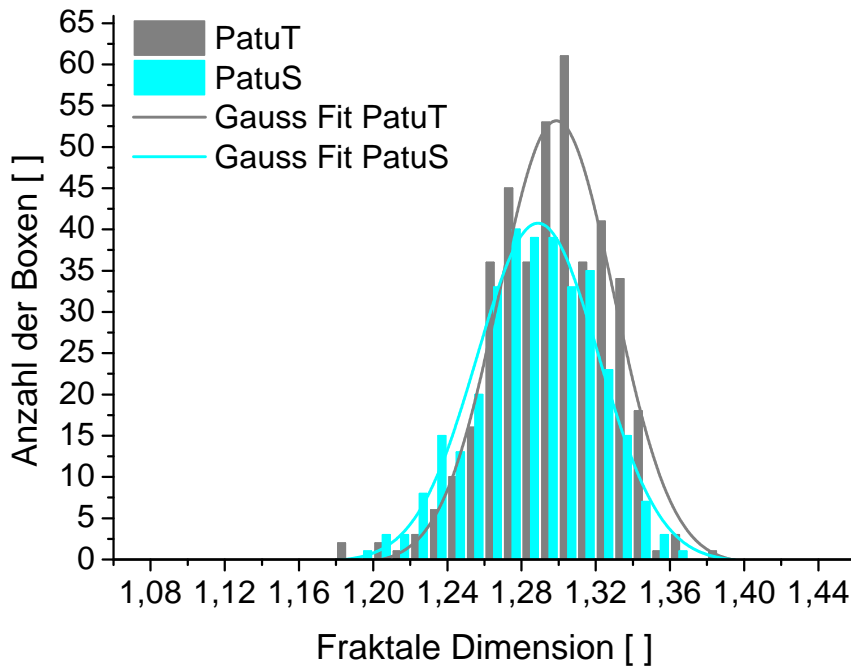


Abbildung 4.36: Fraktale Dimension für die interne Struktur der PatuT und PatuS Zellen im RIKM. Die Verteilungen wurden mit einer Gaussfunktion gefittet. Die fraktale Dimension der beiden Geschwisterzelllinien unterscheidet sich signifikant (Signifikanz: $p < 0,001$).

4.7.4 Zusammenfassung: Fraktalanalyse der RIKM-Bilder

In den Analysen der FD hat sich gezeigt, dass anhand von RIKM-Daten die beiden Geschwisterzelllinien in ihrer fraktalen Dimension unterschieden werden können. Bei allen drei aus den RIKM-Bildern ausgelesenen Untersuchungsaspekten, wie der Kontur, der globalen Kontur-Struktur und der internen Struktur, konnten Unterschiede in der FD der beiden Zelllinien festgestellt werden. Der deutlichste Unterschied in der FD der beiden Zelllinien konnte unter dem Strukturaspekt erzielt werden, was darauf hinweist, dass die Kontur die meiste Information über die FD beinhaltet. Auch [Smith Jr. et al. \(1996\)](#) beschrieben, dass bei der Fraktalanalyse von zellulären Formen, die Kontur die detailliertesten Informationen zur FD liefert. Unter allen drei Untersuchungsaspekten zeigten die maligneren PatuT Zellen eine signifikant höhere FD ($FD_{PatuT} = 1,22 - 1,35$) als ihre benigne Geschwisterzelllinie PatuS ($FD_{PatuS} = 1,17 - 1,31$) (siehe Tabelle 4.6). Eine höhere FD bei bösartigen Zellen im Gegensatz zu gesunden Zellen konnte schon bei der Untersuchung verschiedenster Parameter, wie z.B. der Zellkernform ([Mashiah et al., 2008](#)), der Chromatinverteilung im Zellkern ([Vasilescu et al., 2012](#)), bei der Untersuchung von „adhesion maps“ mittels AFM ([Dokukin et al., 2011](#)), oder aber in Gewebeschnitten ([Landini und Rippin, 1996](#); [Landini et al., 2000](#)), bewiesen werden.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung zur Analyse der fraktalen Dimension der beiden Geschwisterzelllinien unter den drei verschiedenen Untersuchungsaspekten.

Untersuchungsaspekt	Konturaspekt	Globaler Kontur-Struktur-aspekt	Interner Struktur-aspekt
PatuT			
FD	1,218	1,353	1,297
Standardfehler	0,005	0,004	0,002
Standardabweichung	0,051	0,039	0,030
N	86	86	405
PatuS			
FD	1,171	1,312	1,286
Standardfehler	0,004	0,005	0,002
Standardabweichung	0,043	0,050	0,032
N	91	91	331

Die unterschiedlichen Mittelwerte der fraktalen Dimension beim Vergleich der drei Untersuchungsaspekte kommen dadurch zustande, dass zur Berechnung der FD auf unterschiedliche Informationen, nämlich auf die Kontur, die globale Kontur-Struktur und auf die interne Struktur, zurückgegriffen wurde. Die höheren Werte bei der Analyse der FD unter dem globalen Kontur-Struktur-aspekt lassen sich damit erklären, dass hier auch der schwarze, rechteckige Hintergrund im RIKM-Bild bei der Analyse mit eingerechnet wurde. Da die fraktale Dimension eines schwarz gefüllten Rechtecks 2 und die eines ungefüllten Rechtecks 1 ist, ist eine Verschiebung der Werte in Richtung 2 zu erwarten. Damit lässt sich auch erklären, weshalb die Werte für die FD unter dem internen Struktur-aspekt, zwischen der FD für die Kontur und der FD des globalen Kontur-Struktur-aspekts liegen. Eine Zelle besitzt somit nicht nur eine fraktale Dimension, sondern diese ist für verschiedene untersuchte Parameter unterschiedlich. [Vasilescu et al. \(2012\)](#) beschrieben bei Untersuchungen von Gewebeschnitten des Pankreastumors unterschiedliche Werte der fraktalen Dimension für ein und dieselben Zellen aber unter verschiedenen Untersuchungsaspekten

(Zellkernform: $FD = 1,66$; Chromatinverteilung: $FD = 1,78$), welche aber wiederum einen signifikanten Unterschied zwischen den zu vergleichenden benignen und malignen Geweben, zeigte.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die berechneten Werte der fraktalen Dimension nicht nur abhängig vom zu untersuchenden Parameter, sondern auch abhängig von der verwendeten Methode zur Bestimmung der FD sind. Auch der gewählte Bereich, die Größenordnung und die optische Auflösung des Bildes spielen dabei eine Rolle. Somit ist die Bestimmung der fraktalen Dimension keine absolute Bestimmung. Aufgrund dessen müssen die Parameter, die mit der bestimmten FD assoziiert sind, immer beschrieben werden, um so Berechnungen reproduzieren und vergleichen zu können (Buczowski et al., 1998). Obwohl theoretische Dimensionen nicht skalenabhängig sind, sind Bilder es aber schon (Karperien, 2004–5). Digitale Bilder sind endlich, da sie durch ihre Auflösung limitiert sind. Das Bild beinhaltet eine endliche Anzahl an Punkten. Somit gibt es ein Höchstlimit, welches durch die Bildgröße vorgegeben ist, und eine untere Grenze, gegeben durch die Pixelgröße. Sämtliche Verfahren zur Berechnung der fraktalen Dimension anhand von digitalisierten Bildern sind deswegen nur näherungsweise. Sie haben alle gemeinsam, dass sie auf verschiedenen Skalierungsstufen durchgeführt werden und über eine Ausgleichsrechnung den Wert für FD annähern (Landini und Rippin, 1996; Buczowski et al., 1998; Li et al., 2009b).

Die Fraktalanalyse stellt beim Vergleich unterschiedlicher Zelllinien, eine Hilfe zur Charakterisierung der Zellen und zur Bestimmung deren Malignitätsgrades dar (Sarkar und Chaudhuri, 1994; Vilela et al., 1995; Mashiah et al., 2008; Vasilescu et al., 2012).

Die Charakterisierung konnte in dieser Arbeit an der Untersuchung der FD zweier Zelllinien unterschiedlichen Malignitätsgrades anhand verschiedenster Informationen aus den RIKM-Bildern gezeigt werden. Die RIKM stellt dabei eine der besten Methoden dar, um die Kontur der Zellen exakt darzustellen, da mit ihr auch kleinste Zellausläufer, wie Filopodien visualisiert werden können. Außerdem ist diese Methode in dem Sinne einzigartig, dass Karten von Adhäsionsmustern zur Fraktalanalyse verwendet werden können. Somit kann die Methode der RIKM in die Liste der Techniken, die Informationen für die Fraktalanalyse bereitstellen, eingefügt werden. Die RIKM stellt in Verbindung mit der Fraktalanalyse ein verlässliches Werkzeug zur Zellklassifizierung, also der Einordnung der Zellen anhand ihres Tumorgades, dar.

4.8 Adhäsionsverhalten von Zellen auf nanostrukturierten, biofunktionalisierten Oberflächen

Für die Etablierung des RIKM-Auswertalgorithmus wurden die ersten Adhäsionsanalysen der beiden Geschwisterzelllinien auf den homogen beschichteten Oberflächen durchgeführt. Diese automatisierte Diagnostikmethode sollte im nächsten Schritt für Adhäsionsanalysen auf nanostrukturierten Oberflächen verfeinert werden. Neben der Oberflächenchemie spielt auch die nanoskalige Topografie der Oberfläche eine entscheidende Rolle für die Physiologie und damit auch für das Adhäsionsvermögen der Zellen (Arnold et al., 2004; Cavalcanti-Adam et al., 2006). Minimale Änderungen im Abstand der präsentierten Liganden können die Zelladhäsion drastisch verändern (Arnold et al., 2008), wobei das Ausmaß für Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorausstattung verschieden sein kann. Durch die Präsentation von Liganden, die hoch spezifisch für einen Rezeptortyp sind, ist so eine höhere Differenzierung im Adhäsionsverhalten ähnlicher Zelllinien zu erwarten. Außerdem können mit den nanostrukturierten Oberflächen, durch Variation der Goldpartikelabstände und somit dem festgesetzten Integrin-Muster, Clusteringeffekte untersucht werden. Erste Zelladhäsionsversuche auf den nanostrukturierten Oberflächen wurden mit

den beiden Patu Zelllinien durchgeführt, allerdings war die Adhäsion auf den nanostrukturierten Oberflächen nicht ausreichend, um eine verbesserte Differenzierung im Adhäsionsverhalten zu beobachten. Aufgrund dessen wurde mit einem anderen Zelllinienpaar, der metastasierenden MCF7 Zelllinie (Brustadenokarzinom) und der nicht metastasierenden MCF10A Zelllinie (fibrös-zystische Mastopathie), der Einfluss von nanostrukturierten Oberflächen mit deren Passivierungen und Biofunktionalisierungen auf die Zelladhäsion untersucht. Dabei wurden zuerst verschiedene Liganden in Form von verschiedenen Peptidsequenzen mit Linker an die Goldpartikel angebunden. Dies sollte dazu dienen Unterschiede im Adhäsionsvermögen zu erkennen und den besten Liganden für die beiden Zelllinien zu finden. Im Anschluss wurde der Einfluss der Linkerlänge des Liganden, sowie der Einfluss verschiedener Passivierungsmethoden für den Goldpartikelzwischenraum auf das Adhäsionsvermögen untersucht. Zuletzt wurde der Effekt eines Peptidfragments auf das Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien betrachtet.

4.8.1 Einfluss verschiedener Biofunktionalisierungen auf das Adhäsionsvermögen von Zellen

Für die Untersuchung verschiedener Liganden auf das Adhäsionsvermögen der beiden Brustepithelzelllinien, wurden die Goldnanopartikel mit verschiedenen Peptidsequenzen funktionalisiert. Der Abstand der Goldpunkte betrug für alle Experimente 50-60 nm und als Passivierung der Glasflächen wurde das elektrostatisch angebundene PLL-*g*-PEG gewählt.

Um eine Aussage über das Adhäsionsvermögen der Zellen auf verschiedenen Liganden, d.h. auf verschieden biofunktionalisierten nanostrukturierten Oberflächen zu treffen, wurden die Zellen 24 h nach Aussaat auf den nanostrukturierten Oberflächen mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht (DeltaVision Mikroskop, 10x Objektiv). Zur Quantifizierung des Adhäsionsverhaltens wurde das Verhältnis zwischen adhären (gespreiteten) und nicht adhären (runden) Zellen bestimmt.

In Abbildung 4.37 ist das Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A dargestellt, bei dem die Fragestellung untersucht werden sollte, ob mit einer Biofunktionalisierung aus einer Kombination von zwei adhäsionsvermittelnden Molekülen, dem zyklischen RGD (cRGD-T1), einer modifizierten Peptidsequenz mit Linker, und dem PHSRN, einer Peptidsequenz mit Linker, das Adhäsionsvermögen verbessert werden kann. Beide Peptide stellen eine Sequenz aus dem Fibronectin dar. Die zentrale Bindedomäne über die Fibronectin an Integrine bindet enthält die RGD-Sequenz, die sich im Modul III-10 befindet und eine Interaktion mit $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen fördert. Für eine maximale Bindungsaffinität von Fibronectin an die $\alpha_5\beta_1$ -Integrine wird ein Synergieeffekt mit der Sequenz PHSRN beschrieben, die sich benachbart zum RGD-Motiv im Modul III-9 befindet und die Bindung an die Integrine verstärken soll (Aota und Yamada, 1994). Zur Kontrolle der Experimente dienten nanostrukturierte Oberflächen, die entweder nicht biofunktionalisiert (nur passiviert) oder nur mit der Peptidsequenz PHSRN funktionalisiert waren. Bei den MCF7 Zellen konnte keine Verbesserung der Zelladhäsion auf dem Mix der beiden Liganden erzielt werden (siehe Abbildung 4.37A). Die Adhäsion der MCF7 war auf den nanostrukturierten Oberflächen mit dem zyklischen RGD am besten. Auch wurde deutlich, dass PHSRN alleine keine Zelladhäsion initiieren kann, denn das erzielte Verhältnis zwischen adhären und nicht adhären Zellen unterschied sich nicht signifikant von dem auf unfunktionalisierten, passivierten Oberflächen. Die MCF10A Zellen reagierten scheinbar auf die Peptidsequenz PHSRN, da hier der Anteil an adhären Zellen größer war als auf unfunktionalisierten Oberflächen. Der PHSRN-Sequenz alleine schreibt man aber eigentlich keine fördernden Eigenschaften be-

züglich der Zelladhäsion zu (Hojo et al., 2001). Bei der Präsentation von einem Mix der beiden Peptidsequenzen adhärten die MCF10A Zellen genauso gut wie auf reinem cRGD-T1 (siehe Abbildung 4.37B). Eine Verbesserung der Adhäsion mit der Kombination der beiden Sequenzen, wie es z.B. von Aota und Yamada (1994) für die Fibronektin vermittelnde Adhäsion von Babyhamster-Nierenzellen beschrieben wurde, konnte jedoch nicht erzielt werden. Beim Vergleich des Adhäsionsvermögens der beiden Zelllinien ist zu beachten, dass auf den nanostrukturierten Oberflächen, die Adhäsion der MCF10A Zellen viel schlechter als bei den MCF7 Zellen war.

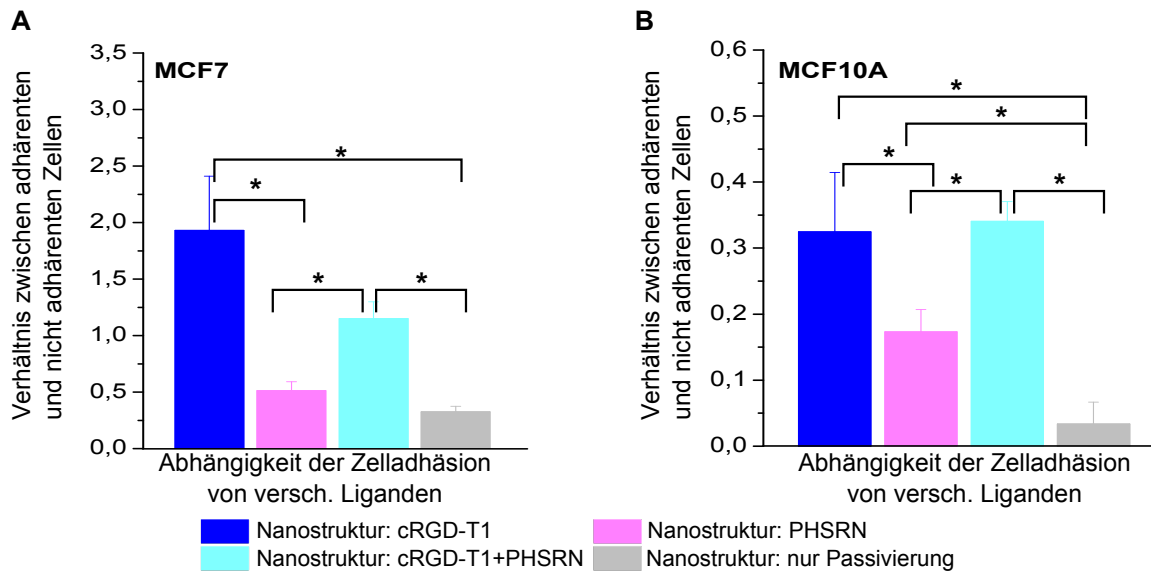


Abbildung 4.37: Ligamentests zum Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A auf nanostrukturierten Oberflächen mit Goldnanopartikelabständen <60 nm. Die MCF7 (A) und MCF10A Zellen (B) wurden auf nanostrukturierten Oberflächen mit verschiedenen Liganden (cRGD, PHSRN, Mix aus cRGD und PHSRN), sowie auf unfunctionalisierten nanostrukturierten Oberflächen (nur Passivierung) ausgesät und das Verhältnis zwischen adhären und nicht adhären Zellen 24 h nach Aussaat der Zellen bestimmt. Signifikanz: $p < 0,05$.

Bei den Experimenten mit dem Mix aus RGD und PHSRN wurden die beiden Sequenzen, die jeweils einen Linker mit Thiolanker besitzen, zusammen gegeben und die Lösung auf den nanostrukturierten Oberflächen inkubiert. Somit waren die beiden Peptide zufällig räumlich verteilt und bei der Annahme, dass an jeden Goldpunkt nur eine Peptidsequenz binden würde, wären die beiden Peptidsequenzen im Idealfall 50 - 60 nm voneinander entfernt (= Abstand der Goldpunkte). Da bei diesen Konstellationen keine Verbesserung der Adhäsion erzielt werden konnte, lässt sich darauf schließen, dass eine bestimmte räumliche Orientierung der beiden Sequenzen zur Förderung der Adhäsion notwendig ist (Aota und Yamada, 1994). Im Fibronektin befinden sich die RGD-Schleife und die synergistische Stelle in einem Abstand von 30 - 40 Å, der von einem einzelnen Integrin überspannt werden kann und damit eine Interaktion mit beiden Gruppen möglich ist (Leahy et al., 1996). Aufgrund dieser Tatsache lässt sich erklären, warum keine signifikante Verbesserung der Adhäsion auf den nanostrukturierten Oberflächen mit dem Mix der beiden Liganden erzielt werden konnte. Um die Förderung der Adhäsion bei Präsentation beider Sequenzen ausnutzen zu können, müssten Liganden verwendet werden, in denen die beiden Sequenzen über einen Linker miteinander verbunden sind, die der Größe des nativen Abstandes im Fibronektin entsprechen, wie es z.B. Kao et al. (2001) mit der Verwendung eines Glycin-Hexamers als

Linker oder Hojo *et al.* (2001) mit einem PEG-Linker durchgeführt haben. Ein anderer Ansatz, bei dem eine Fibronectinfragment, das beide Domänen enthält (Staunton *et al.*, 2009), an die nanostrukturierten Oberflächen angebunden wird, wird in Abschnitt 4.8.3 näher untersucht.

Da in diesem Ligamentest keine Verbesserung der Adhäsion mithilfe der Kombination aus den beiden Peptidsequenzen cRGD und PHSRN zu erkennen war, wurden die weiterführenden Untersuchungen nur mit dem Peptid cRGD durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde daher das Adhäsionsvermögen der Zellen hinsichtlich verschiedener Linkerlängen des zyklischen RGDs untersucht. Es standen zwei Linkerlängen zu Verfügung, der kurze Linker T1 mit einer Länge von $l = 2,5$ nm und der Linker T3 mit einer Länge von $l = 7,5$ nm. Beide Zelllinien zeigten bei der Präsentation des cRGDs mit dem längeren Linker (cRGD-T3) ein verbessertes Adhäsionsvermögen (siehe Abbildung 4.38).

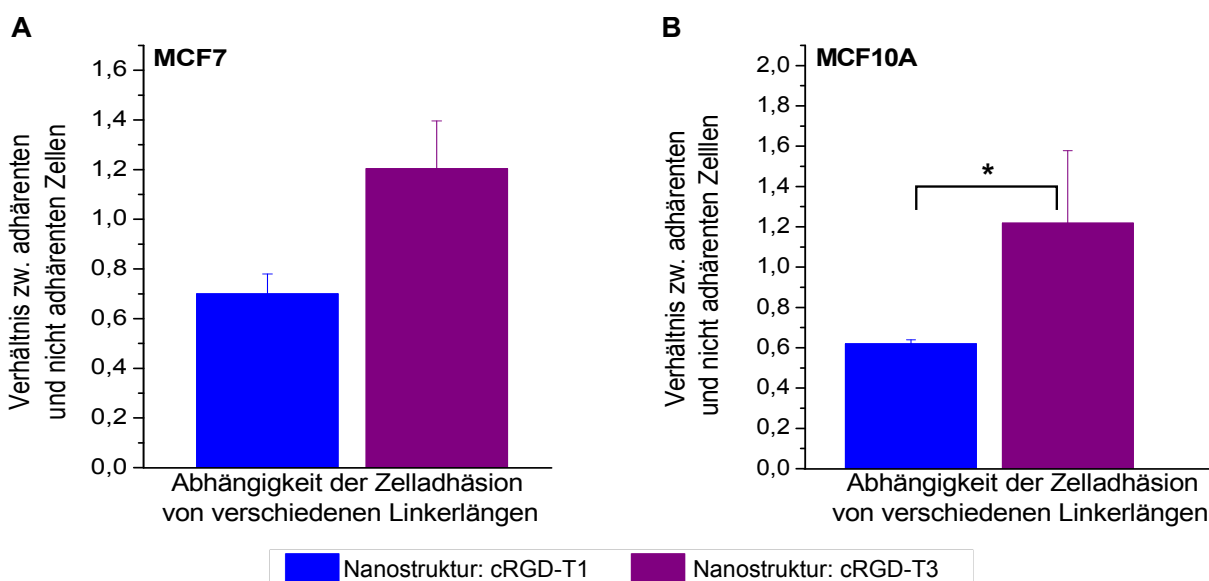


Abbildung 4.38: Einfluss der Linkerlänge des cRGDs auf das Adhäsionsvermögen der beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A. Die MCF7 (A) und MCF10A Zellen (B) wurden auf nanostrukturierten Oberflächen (mit Goldnanopartikelabständen < 60 nm), die mit einem cRGD verschiedener Linkerlänge funktionalisiert waren, ausgesät und das Verhältnis zwischen adhären und nicht adhären Zellen 24 h nach Aussaat der Zellen bestimmt. Signifikanz: $p < 0,05$.

Vergleicht man jedoch das Adhäsionsvermögen der Zellen auf den nanostrukturierten Oberflächen mit dem auf homogenen Goldoberflächen, die mit den gleichen Liganden funktionalisiert wurden, so ist deutlich erkennbar dass, am Beispiel der MCF10A Zellen, das Adhäsionsvermögen auf den nanostrukturierten Oberflächen sehr gering war (siehe Abbildung 4.39).

Aufgrund der unzureichenden Adhäsion der beiden Zelllinien auf den cRGD-Verbindungen, welches die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelte Adhäsion begünstigt (Hersel und Kessler, 2003), wurden vom Projektpartner Qiagen des BMBF Projektes Cell@Nano Expressionsanalysen durchgeführt, um eventuell andere Integrine zu finden, die von den beiden Zelllinien höher exprimiert werden. Das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin wurde von beiden Zelllinien höher exprimiert als das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Narz, 2008). Die $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelte Adhäsion sollte in den folgenden Versuchen mit der Präsentation eines linearen RGDs begünstigt werden. Dafür wurde ein lineares RGD (lRGD) verwendet, das einen Linker mit ungefähr der gleichen Länge wie der T3 Linker des cRGDs besitzt. Die MCF7

Zellen zeigten jedoch keine signifikante Verbesserung der Adhäsion auf den nanostrukturierten Oberflächen mit IRGD (siehe Abbildung 4.40).

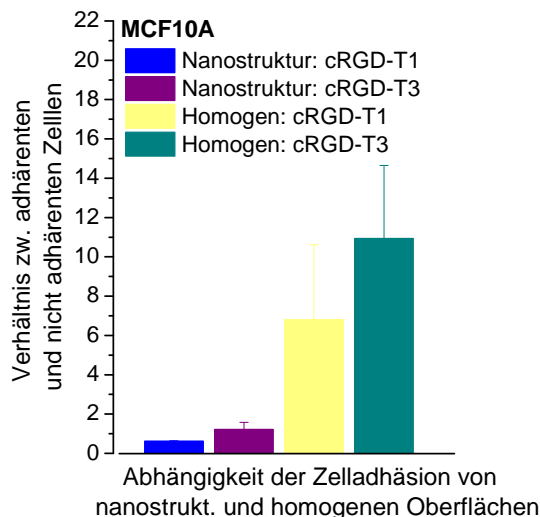


Abbildung 4.39: Vergleich des Adhäsionsvermögens der MCF10A Zellen auf nanostrukturierten, funktionalisierten Oberflächen (mit Goldnanopartikelabständen <60 nm) und homogenen, funktionalisierten Goldoberflächen. Es ist ein klarer Unterschied im Adhäsionsvermögen der MCF10A Zellen zwischen den nanostrukturierten Oberflächen und den homogenen Goldoberflächen zu erkennen. In beiden Fällen ist das Adhäsionsvermögen auf dem cRGD mit langem Linker (T3) besser als auf dem kurzen cRGD-T1. Signifikanz: $p < 0,05$.

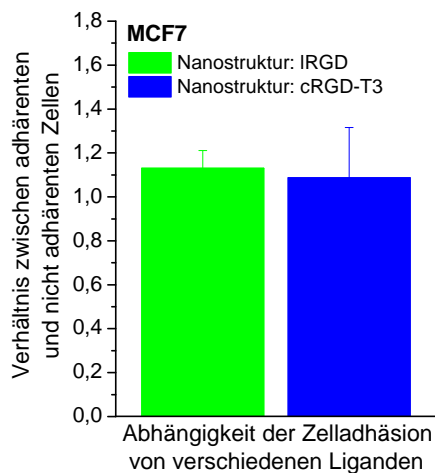


Abbildung 4.40: Vergleich des Adhäsionsvermögens der MCF7 Zellen auf nanostrukturierten Oberflächen (mit Goldnanopartikelabständen <60 nm), funktionalisiert mit zyklischem oder linearem RGD (cRGD oder IRGD). Das cRGD fördert die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelte Adhäsion, wohingegen das IRGD die $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelte Adhäsion begünstigt. Mit den beiden Liganden ist kein signifikanter Unterschied des Adhäsionsvermögens der MCF7 Zellen zu erzielen.

4.8.2 Einfluss verschiedener Passivierungen auf das Adhäsionsvermögen von Zellen

In den bisherigen Versuchen aus Abschnitt 4.8.1 wurden die nanostrukturierten Oberflächen immer mit dem elektrostatisch angebondenen PLL-*g*-PEG passiviert. Nun wurde untersucht, ob auch die Passivierungsmethode der Glasfläche der nanostrukturierten Oberfläche, das Adhäsionsvermögen der Zellen beeinflussen kann. Aufgrund dessen wurden die Versuche auf PLL-*g*-PEG passivierten und auf PEG2000 passivierten Oberflächen durchgeführt (zur Methode der Passivierungen siehe Abschnitt 3.3.4). Für diese Versuche wurden die MCF7 Zellen verwendet, da diese in den vorherigen Untersuchungen eine bessere Adhäsion als die MCF10A auf den nanostrukturierten Oberflächen gezeigt hatten.

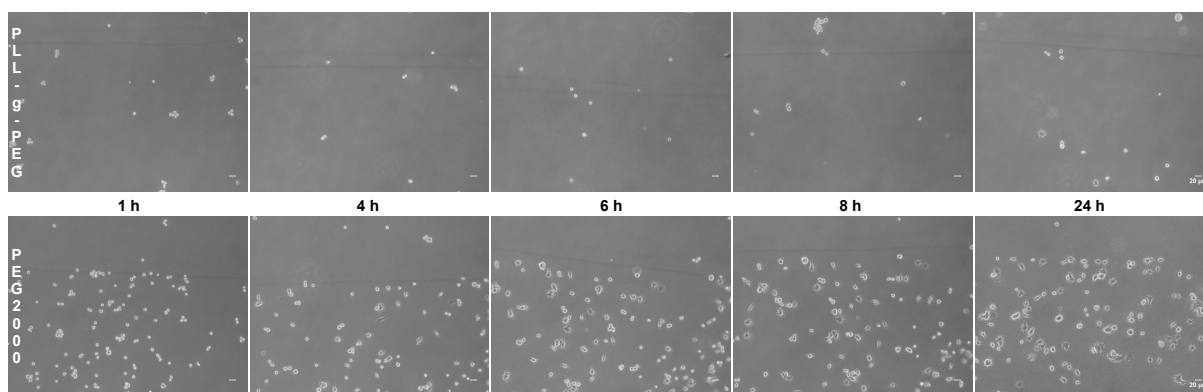


Abbildung 4.41: Hellfeldbilder der MCF7 Zellen auf unterschiedlich passivierten nanostrukturierten Oberflächen mit Goldnanopartikelabständen <60 nm nach verschiedenen Zeitpunkten der Aussaat der Zellen (1, 4, 6, 8 und 24 h). In allen Bildern der Serie ist der Bereich der Dippkante gezeigt, wobei der untere Teil funktionalisiert und der obere unfunktionalisiert ist. Die nanostrukturierten Oberflächen wurden entweder mit PLL-*g*-PEG oder mit PEG2000 passiviert und beide Versuchsansätze mit dem Liganden cRGD-T3 funktionalisiert. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

Das Adhäsionsvermögen der MCF7 konnte durch die Passivierung der nanostrukturierten Oberflächen mit dem PEG2000 verbessert werden. Auf diesen nanostrukturierten Oberflächen adhärten die MCF7 Zellen schon nach einer Stunde, im Gegensatz zu den PLL-*g*-PEG passivierten nanostrukturierten Oberflächen, auf denen auch nach 24 h nur wenige Zellen adhären waren (siehe Abbildung 4.41). Schon eine Stunde nach Aussaat der Zellen war auf den PEG2000 passivierten Proben eine „Dippkante“ zu sehen, was bedeutet, dass die Zellen auf dem funktionalisierten Bereich der Nanostruktur adhären konnten, wohingegen dies auf dem passivierten Bereich aufgrund des Protein abweisenden Charakters des Polyethylenglykols nicht möglich war. Mit „Dippkante“ bezeichnet man die Grenze zwischen dem strukturierten und unstrukturierten Bereich des Glases durch den Tauchbeschichtungsprozess bei der BCML. Die Zellen auf den PLL-*g*-PEG passivierten nanostrukturierten Proben zeigten auch nach 24 h nur minimale Adhäsion. Ein genauere morphologische Betrachtung der Zellen auf den beiden unterschiedlich passivierten nanostrukturierten Oberflächen ist in Abbildung 4.42 anhand von sechs Beispielbildern gezeigt. Die MCF7 Zellen auf dem PLL-*g*-PEG passivierten Oberflächen sind auch noch 24 h nach Aussaat sehr abgerundet und zeigen wenig Zellausläufer, wohingegen sie auf den PEG2000 passivierten Oberflächen gespreitet sind und viele Zellausläufer zeigen.

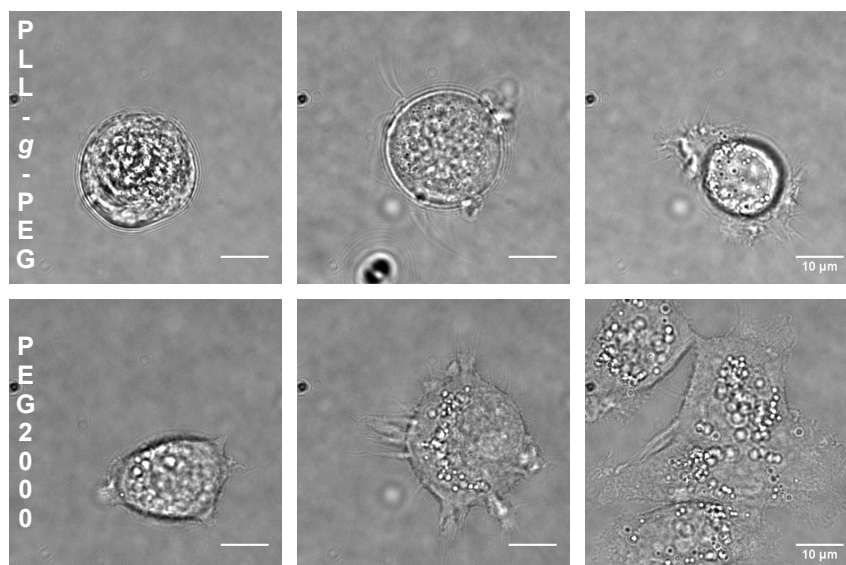


Abbildung 4.42: Hellfeldaufnahmen der MCF7 Zellen auf unterschiedlich passivierten nanostrukturierten Oberflächen mit Goldnanopartikelabständen < 60 nm 24 h nach Aussaat der Zellen. Die nanostrukturierten Oberflächen wurden entweder mit PLL-*g*-PEG oder mit PEG2000 passiviert und beide Versuchsansätze mit dem Liganden cRGD-T3 funktionalisiert. Die MCF7 Zellen auf den PLL-*g*-PEG passivierten Proben zeigen nach 24 h immer noch eine runde Form und sind wenig gespreitet (siehe obere Reihe), wohingegen die MCF7 Zellen auf den PEG2000 passivierten Proben viel mehr gespreitet sind und Zellausläufer gebildet haben (siehe untere Reihe). Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Das verbesserte Adhäsionsvermögen der MCF7 auf den PEG2000 passivierten Oberflächen könnte damit erklärt werden, dass sich die Höhe der PEG-Schicht bei den beiden Passivierungsansätzen unterscheidet. Die PEG2000-Schicht ist mit einer Dicke von ca. $5,0$ nm (Blümmel et al., 2007) dünner als die ca. $8,2$ nm dicke Schicht des PLL-*g*-PEGs (Pasche et al., 2005; Heuberger et al., 2005), weshalb die auf den Goldpunkten angebondenen Peptide auf der dünneren PEG2000 Schicht besser erkennbar und zugänglich für die MCF7 Zellen sein könnten. Damit lässt sich auch erklären, dass auf den PLL-*g*-PEG passivierten Oberflächen die Adhäsion bei Präsentation des cRGDs mit dem längeren Linker (T3) verbessert werden konnte, da das kurze cRGD (cRGD-T1) nicht weit genug aus der PEG-Schicht herausragen konnte um die Integrin vermittelte Adhäsion zu fördern.

4.8.3 Adhäsionsvermögen bei Anbindung eines Peptidfragments an die nanostrukturierten Oberflächen

Neben der Präsentation verschiedenster kleiner Peptidsequenzen wurde auch ein Peptidfragment zur Funktionalisierung der Goldpunkte verwendet. Als Fragment wurde das neunte und zehnte Modulpaar im Fibronectin (FNIII₉₋₁₀) gewählt. Es ist das kleinste Konstrukt, welches volle Aktivität bezüglich der $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelten Adhäsion mit der Bindungsseite an den Enden des RGDs (Aminosäuren 1493-1495 im FN) in der 10. Schleife des FNIII zeigt. Für eine kontrollierte Anbindung des Fibronectinfragments an die Goldpunkte musste das FNIII₉₋₁₀ mit einem Linkersystem ausgestattet werden. Hierzu wurde das FNIII₉₋₁₀ über das Traut's Reagenz thioiliert (siehe Abschnitt 3.3.5). Die MCF7 Zellen zeigten auf den, mit FNIII₉₋₁₀ funktionalisierten nanostrukturierten Oberflächen ein verbessertes Adhäsionsvermögen im Vergleich zu nanostrukturierten Oberflächen mit cRGD (siehe Abbildung 4.43). Dies könnte darauf hindeuten, dass

durch die Präsentation des Fibronektinfragments mit dem RGD und dem PHSRN der zuvor beschriebene synergistische Effekt der beiden Sequenzen vorliegt, der die Adhäsion der Zellen erhöhte.

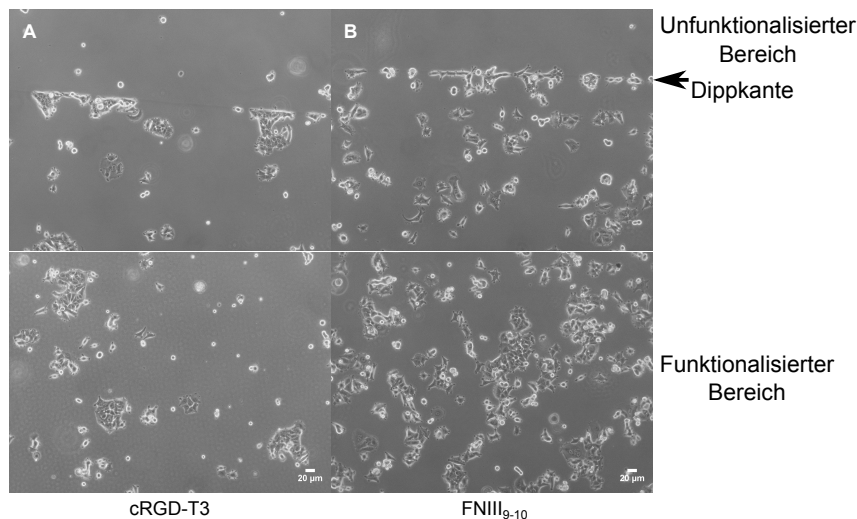


Abbildung 4.43: Hellfeldeaufnahmen der MCF7 Zellen auf unterschiedlich funktionalisierten nanostrukturierten Oberflächen (mit Goldnanopartikelabständen <60 nm) 24 h nach Aussaat der Zellen. Die nanostrukturierten Oberflächen wurden mit PEG2000 passiviert und entweder mit cRGD-T3 (**A**) oder mit einem Fibronektinfragment FNIII₉₋₁₀ (**B**) funktionalisiert. Im oberen Teil der Abbildung ist der Bereich der Dippkante, im unteren Teil der funktionalisierte Bereich der nanostrukturierten Oberfläche zu sehen. Maßstab: 20 μm .

In Kontrollexperimenten wurde das FNIII₉₋₁₀ ohne vorherige Behandlung mit dem Traut's Reagenz, d.h. ohne Thiolierung, auf die nanostrukturierten Oberflächen gegeben. Die MCF7 Zellen zeigten bei dieser Kontrolle aber eine bessere Adhäsion als auf den mit cRGD funktionalisierten Oberflächen. Dies lässt vermuten, dass sich das Fibronektinfragment aufgrund seiner Größe über die Goldpunkte spannt und die Zellen somit nicht auf die nanoskalige Präsenz der RGD und PHSRN Sequenz reagieren, sondern eine homogene Schicht des Fibronektinfragments vorfinden. Das Adhäsionsvermögen war nämlich vergleichbar mit dem auf homogenen beschichteten Oberflächen.

4.8.4 Zusammenfassung: Zelleexperimente auf nanostrukturierten Oberflächen

Neben der Oberflächenchemie spielt auch die nanoskalige Topografie der Oberfläche eine entscheidende Rolle für die Physiologie und damit auch für das Adhäsionsvermögen der Zellen (Arnold et al., 2004; Cavalcanti-Adam et al., 2006). Um die Adhäsionsanalysen auf den homogen beschichteten Oberflächen zu spezifizieren, sollten die Zelleexperimente auf nanostrukturierten Oberflächen durchgeführt werden. Zur Herstellung der nanostrukturierten Oberflächen wurde die BCML-Technik verwendet mit der definiert Liganden präsentiert werden, die von nicht adhäsiven Regionen begrenzt sind. Durch diese definierte molekulare Anordnung verschiedener Liganden, die jeweils hoch spezifisch für einen Rezeptortyp sind, ist eine höhere Differenzierung im Adhäsionsverhalten ähnlicher Zelllinien zu erwarten, wodurch die in dieser Arbeit vorgestellte Diagnostikmethode mittels RIKM erweitert werden könnte. Es wurden in den Experimenten nanostrukturierte Oberflächen mit einem Goldabstand von 50-60 nm verwendet. Dieser Abstand liegt unter dem von Arnold et al. (2004) beschriebenen kritischen Abstand von 73 nm, ab dem

die Adhäsion und das Spreiten der Zellen abnimmt und weniger FAs gebildet werden. Trotzdem zeigten die Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS keine ausreichende Adhäsion um diese mit der RIKM untersuchen zu können.

Bei den Zellexperimenten mit dem Zelllinienpaar MCF7 und MCF10A zeigte die malignen MCF7 Zellen ein besseres Adhäsionsverhalten als die MCF10A Zellen. Der in der Literatur beschriebene Synergieeffekt im Adhäsionsvermögen der Zellen bei der Präsentation der beiden Peptidsequenzen cRGD und PHSRN (Aota und Yamada, 1994) konnte bei den hier durchgeführten Experimenten nicht erzielt werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die beiden Sequenzen nicht über einen Linker miteinander verbunden waren. Es ist aber eine räumliche Orientierung der beiden Sequenzen zur Förderung der Adhäsion notwendig (Aota und Yamada, 1994), da sich die RGD-Schleife und die synergistische Stelle im Fibronectin in einem Abstand von 30 - 40 Å befinden, der von einem einzelnen Integrin überspannt werden kann (Leahy et al., 1996).

Untersuchungen zu verschiedenen Passivierungsmethoden zeigten, dass das Adhäsionsvermögen der MCF7 von der Wahl der Passivierung abhängt. Auf Oberflächen mit dem kovalent angebondenen PEG2000 war eine bessere Adhäsion der MCF7 Zellen auf den nanostrukturierten Oberflächen zu erzielen als auf Oberflächen mit Passivierungen des elektrostatisch angebondenen PLL-*g*-PEGs. Die bessere Adhäsion der Zellen bezieht sich dabei auf den funktionalisierten Bereich der Oberfläche. Auf dem unfunktionalisierten Bereich der Glasoberfläche waren die proteinabweisenden Eigenschaften des PEGs vorhanden. Damit lässt sich ausschließen, dass das bessere Adhäsionsverhalten bei der PEG2000-Passivierung auf Defekte in der Passivierungsschicht zurückzuführen wäre. Beim Vergleich der Schichtdicken der unterschiedlichen PEG-Schichten ergibt sich, dass die PEG2000-Schicht mit einer Dicke von ca. 5,0 nm (Blümmel et al., 2007) dünner ist als die ca. 8,2 nm dicke Schicht des PLL-*g*-PEGs (Pasche et al., 2005; Heuberger et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass die auf den Goldpunkten angebondenen Peptide auf der dünneren PEG2000 Schicht besser erkennbar und zugänglich für die Zellen sind und somit für weitere Versuche die Passivierung mit PEG2000 die bessere Wahl ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Seit Langem ist bekannt, dass Zelladhäsion und Tumormetastasierung in sehr engem Zusammenhang stehen, denn im Verlauf des Metastasierungsprozesses müssen einzelne Tumorzellen ihre Zell- und Matrixkontakte lösen, was sich in einem veränderten adhäsiven Verhalten widerspiegelt. Diese Korrelation von verminderter Adhäsion mit erhöhter Malignität des Tumors wurde allerdings bisher noch nicht für diagnostische Zwecke genutzt.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Tumorzelllinien mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Metastasierungsgrad mittels der markerfreien Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM). Die RIKM ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Adhäsionsparametern, aus welchen sich zu jedem einzelnen Zelltyp ein charakteristischer Fingerabdruck ableiten lässt. Dieser Fingerabdruck kann zur Identifizierung einer Tumorzelllinie dienen und gestattet so eine Zuordnung in eine Tumorgradskala. In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Modell erarbeitet anhand dessen aus dem Adhäsionsmuster von RIKM-Bildern die Adhäsionsstärken von Zellen abgeschätzt werden können. Experimentell bestätigt wurde dies durch Mikrofluidikmessungen, mit denen direkte Aussagen über die Adhäsionsstärke der Zelle getroffen werden können. Weiterhin konnte das erste Mal gezeigt werden, dass die Adhäsionsstadienbilder der RIKM als einfaches Werkzeug für die Bestimmung der fraktalen Dimension einer Zelle genutzt werden können und somit ein direkter Zusammenhang zur Malignität der Tumorzelle gezogen werden kann. Die Etablierung eines neuen Tumorgradmodells anhand von RIKM-Bildern stellt eine vollkommen neue Art der Diagnostik dar, welche sehr schnell, kostengünstig und größtenteils automatisiert ablaufen könnte.

Als Modellsystem wurde hier das Zelllinienpaar PatuT und PatuS des humanen Pankreasadenokarzinoms gewählt. Mit ihm liegen zwei Zelllinien vor, die genetisch den gleichen Hintergrund besitzen, aber einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen, was sie für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen sehr interessant macht.

Zur Beobachtung des Adhäsions- und Spreitverhaltens von Zellen wurde die RIKM gewählt, da mit ihr die Kontaktflächen von Objekten auf einer Oberfläche visualisiert werden können. Während die laterale Auflösung durch die Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie gegeben ist, kann in axialer Richtung eine Auflösung von bis zu 2 nm erreicht werden ([Limozin und Sengupta, 2009](#)). Vorteil dieser Technik ist, dass die zu untersuchenden Objekte nicht modifiziert, d.h. markiert werden müssen. Der Kontrast des Bildes entsteht allein durch die Interferenz der Lichtstrahlen, die an den unterschiedlichen Grenzflächen reflektiert werden. Mit dieser nicht-invasiven Methode sind somit Studien in Echtzeit über einen längeren Beobachtungszeitraum möglich.

Ein bestehendes Mikroskop wurde so aufgerüstet und umgebaut, dass die RIKM mit mehreren Wellenlängen unter Zellkulturbedingungen möglich wurde. Die Validierung der Technik erfolgte mittels Messungen an Polystyrolkugeln, bevor sie zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Zellen genutzt wurde. Es wurde ein Auswertalgorithmus entwickelt, der die Segmentierung der Zelle im RIKM-Bild und das Auslesen verschiedener, charakteristischer Zellparameter ermöglichte. Für die Untersuchung der adhäsiven Kontaktbereiche zwischen Zelle und Substrat musste ein Grenzwert gefunden werden, mit dem eine Einteilung zwischen adhärennten und nicht adhärennten Zellbereichen getroffen werden konnte. Dafür wurde eine semi-quantitative Methode (Pierres et al., 2002) gewählt, bei der ein Abstandsbereich als Grenzwert für die Einordnung genutzt wurde, der alle engen und sehr engen Kontakte näher als $h = 40$ nm einbezog. Überdies konnte durch den Einsatz der Zweiwellenlängen-RIKM die Ungenauigkeit in der Abstandsinformation, die bei der RIKM mit nur einer Wellenlänge auftritt, behoben werden.

RIKM-Bilder erlauben vielseitige Aussagen über die Charakteristika einer Zelle, wie z.B. deren Form oder deren Adhäsionsfläche bzw. Topografie. Die RIKM-Analyse in Echtzeit ermöglicht dabei einen Einblick in das dynamische Verhalten der Zellen bei der Interaktion mit dem Substrat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Adhäsionsverhalten der beiden Geschwisterzelllinien PatuT und PatuS auf Kollagen beschichteten Glasoberflächen untersucht. Dabei wurden dynamische Charakteristika, wie die Kinetik des Zellspreitens (Parameter: projizierte Zellfläche), die Kontaktformierung (Parameter: Adhäsionsfläche) und damit sich ableitende Parameter wie z.B. die Zellpolarisierung, aber auch statische Charakteristika, wie z.B. die Größe und die räumliche Verteilung der Adhäsionsbereiche anhand einer „Adhäsionskarte“, analysiert. Außerdem wurden erstmals RIKM-Bilder zur Bestimmung der fraktalen Dimension der Zellen genutzt. Mit all diesen Parametern konnten zelllinienspezifische Fingerabdrücke erstellt werden, die zur Charakterisierung und der Unterscheidung der beiden Zelllinien, sowie zur Abschätzung deren Tumorgrades genutzt werden konnten.

Bei der Beobachtung der Zellen auf den Kollagen beschichteten Oberflächen unterschieden sich die PatuT und PatuS Zellen in der Kinetik sowie im Ausmaß des Zellspreitens: nach Kontakt mit der Oberfläche erreichten die PatuT Zellen ihre maximale projizierte Zellfläche dreimal so schnell wie die PatuS Zellen, darüber hinaus war sie um ca. 40 % größer als die der PatuS Zellen. Weiterhin waren die PatuT Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Stunden weniger polarisiert. Bei der Untersuchung der Adhäsionsflächen zeigten die größeren PatuT Zellen zwar eine größere Adhäsionsfläche als die PatuS Zellen. Das Verhältnis von Adhäsionsfläche zur projizierten Zellfläche war jedoch geringer als bei ihrer Geschwisterzelllinie. Das schnellere Wachstum, die geringere Polarität und die verringerte Adhäsionsfläche -all diese Charakteristika weisen auf den höheren Tumorgrad der PatuT Zellen hin.

Bemerkenswerte unterschiedliche Ergebnisse zeigten die beiden Zelllinien bei der Analyse der Morphologie der Adhäsionsbereiche. Die PatuT Zellen wiesen flächenmäßig zwar mehr Adhäsionsbereiche als die PatuS Zellen auf, im Vergleich zum Anteil an der Gesamtzellfläche besaßen sie aber weniger Adhäsionsfläche. Außerdem waren die Adhäsionsbereiche der PatuT als viele kleinere Kontaktzonen gleichmäßig über die Zelle verteilt, wohingegen bei den PatuS Zellen größere Kontaktzonen zu beobachten waren, die sich nahe der Zellperipherie befanden. Aufgrund der Größe und der Verteilung der Adhäsionspatches wurde auf ein geringeres Adhäsionsvermögen der PatuT Zellen im Vergleich zu den PatuS Zellen geschlossen. Wir stellten deswegen die Hypothese auf, dass die PatuT Zellen trotz ihrer größeren projizierten Zellfläche und Adhäsionsfläche aufgrund des Gesamtanteils, der Größe und Verteilung ihrer Adhäsionspatches ein verringertes Adhäsionsvermögen besitzen und überprüften diese mit einem mikrofluidischen Ablöseassay.

Beim Ablöseassay wurde auf beide Geschwisterzelllinien simultan ein hydrodynamischer Fluss ausgeübt und das jeweilige Ablöseverhalten untersucht. Gegen den allgemeinen Konsens, dass das Adhäsionsvermögen mit der projizierten Zellfläche korreliert, d.h. gespreitete Zellen einem stärkeren Fluss standhalten können, konnte hier gezeigt werden, dass der Anteil und die räumliche Verteilung der Adhäsionsbereiche direkt mit dem Adhäsionsvermögen von Zellen unter Flussbedingungen korrelieren. Die zwar größeren PatuT Zellen, denen anhand der RIKM-Untersuchungen eine anteilig geringere Adhäsionsfläche, mit kleineren über die Zelle verteilten Adhäsionspatches zugeschrieben wurde, lösten sich bei einer geringeren Scherspannung als die PatuS Zellen ab. Die Scherspannung τ , bei der 50 % der Zellen von der Oberfläche abgelöst waren, betrug bei den PatuT Zellen $\tau_{50,PatuT} \approx 3,14$ Pa. Damit besaßen die PatuT nur ca. 74 % der Adhäsionskraft der PatuS Zellen, die erst bei einer Scherspannung von $\tau_{50,PatuS} \approx 4,25$ Pa abgelöst wurden.

Nachdem die Hypothese durch die Mikrofluidik-Experimente bestätigt werden konnte, wurde der Zusammenhang zwischen den „Adhäsionskarten“ der Zellen und deren Adhäsionsstärke in einem mathematischen Modell zusammengefasst, das es erlaubt die Adhäsionsstärke direkt anhand der Adhäsionsmuster der Zellen aus den RIKM-Bildern abzuschätzen. Das Modell berücksichtigt dabei Informationen wie die Gesamtgröße der projizierten Zellfläche und der Adhäsionsfläche und die Größe und räumliche Verteilung der Adhäsionspatches, die alle aus den RIKM-Bildern ausgelesen werden können. Weiterhin können im Modell durch die Variation eines Faktors verschiedene Fälle des Ablöseverhaltens moduliert werden, welche durch Unterschiede in der Art der Kontaktzonen (z.B. der Anteil an sehr engen Kontakten gegenüber engen Kontakten) hervorgerufen werden. Mit dem Modell konnte berechnet werden, dass die PatuT Zellen nur ca. 71 % der Adhäsionskraft der PatuS Zellen besitzen, was gut mit den experimentellen Ergebnissen aus den Mikrofluidikexperimenten übereinstimmte. Somit bietet die RIKM mit der Erstellung von „Adhäsionskarten“ eine sehr einfache und schnelle Möglichkeit das Adhäsionsvermögen von Zellen abzuschätzen.

In dieser Arbeit wurden erstmals RIKM-Bilder zur Analyse der fraktalen Dimension (FD) der Zellen herangezogen. Änderungen in der strukturellen Organisation und der funktionellen Koordination bei Krebszellen manifestieren sich in Form einer erhöhten morphologischen Komplexität. Die Fraktalanalyse erlaubt es somit Aussagen über den Tumorgrad einer Zelle zu treffen, da die FD mit zunehmendem Malignitätsgrad steigt ([Sarkar und Chaudhuri, 1994](#); [Vilela et al., 1995](#); [Mashiah et al., 2008](#); [Vasilescu et al., 2012](#)). Die RIKM-Bilder der Zellen wurden unter den folgenden Aspekten, nämlich dem „Konturaspekt“, dem „globalen Kontur-Strukturaspekt“ und dem „internen Strukturaspekt“ untersucht. Alle drei Auswertungskonzepte führten zu signifikanten Ergebnissen mit einer höheren FD für die PatuT Zellen, wobei die Ergebnisse unter dem Konturaspekt am eindeutigsten waren. Erst durch die RIKM kann die Kontur der Zellen sehr gut wiedergegeben werden, da mit ihr feinste Zellausläufer wie z.B. Filopodien visualisiert werden können, die beispielsweise in der Hellfeldmikroskopie nicht sichtbar sind. Aber auch anhand des internen Strukturaspekts, bei dem die Informationen aus den „Adhäsionskarten“ der RIKM-Bilder zur Fraktalanalyse genutzt wurden, konnten die beiden Geschwisterzelllinien unterschieden und deren Tumorgrad eingeschätzt werden. Die RIKM stellt in Verbindung mit der Fraktalanalyse ein verlässliches Werkzeug zur Bestimmung der FD und somit zur Klassifizierung von Zellen anhand ihres Tumorgrades dar. Weiterhin ist die Fraktalanalyse mittels RIKM schnell und preiswert und in dem Sinne einzigartig, dass „Adhäsionskarten“ zur Bestimmung der FD genutzt werden können.

Eine Weiterentwicklung der automatisierten Diagnostikmethode sollte im nächsten Schritt durch die Adhäsionsanalysen auf nanostrukturierten Oberflächen erfolgen. Mit der räumlich

definierten Präsentation von Liganden, die hoch spezifisch für einen Rezeptortyp sind, ist eine höhere Differenzierung im Adhäsionsverhalten ähnlicher Zelllinien zu erwarten. Denn neben der Oberflächenchemie spielt auch die nanoskalige Topografie der Oberfläche eine entscheidende Rolle für die Physiologie und damit auch für das Adhäsionsvermögen der Zellen ([Arnold et al., 2004](#); [Cavalcanti-Adam et al., 2006](#)). Da mit den PatuT und PatuS Zellen keine ausreichende Adhäsion auf den Nanostrukturen erzielt werden konnte, um RIKM-Analysen durchführen zu können, wurde ein alternatives Zelllinienpaar (MCF7- und MCF10A-Zelllinie) ausgewählt. Durch die Optimierung einiger Parameter der nanostrukturierten Oberflächen, wie z.B. die Passivierungsart, die Wahl der Adhäsionsmoleküle sowie deren Linkerlängen konnte bereits eine Verbesserung der Zelladhäsion erzielt werden.

Es hat sich gezeigt, dass die RIKM eine leistungsstarke Technik zur Zellklassifizierung darstellt. Mit ihr können charakteristische Parameter zur Kinetik des Zellspreitens und der Adhäsion, zu den Adhäsionsmustern sowie zur fraktalen Dimension ausgelesen werden. Mit dem Zusammentragen der einzelnen Parameter könnte ein „Tumorgrad-Korrelationsfaktor“ (TKF) erstellt werden, bei dem die einzelnen Parameter anhand ihrer Relevanz als Tumormarker mit unterschiedlicher Gewichtung zum TKF beitragen. Dabei würden solche Parameter, die in hohem Maße mit dem Differenzierungsgrad korreliert werden können, wie z.B. die FD, stärker gewichtet werden. Darüber hinaus sollten auch andere Merkmalen aus der Literatur, wie mechanische Eigenschaften (z.B. Steifigkeit der Zellmembran) oder Expressionsanalysen (z.B. E-Cadherin-Expression) zur Bestimmung des TKFs mit einbezogen werden. Mit einer Tumorgradskala des TKFs könnte so eine Diagnostikdatenbank erstellt werden, mit der die verschiedenen Zelllinien bezüglich ihres Tumorgrades klassifiziert werden könnten.

Die Diagnostikdatenbank könnte anhand einer systematischen Veränderung des Metastasierungspotentials einer Zelllinie validiert werden. Mit der Überexpression oder der Herunterregulierung verschiedener Proteine, könnte eine Korrelation mit den charakteristischen Parametern aus den RIKM-Analysen gezogen werden. Das aktinbindende Protein Fascin, das bei der Formation und Stabilisierung von Filopodien, aber auch bei der Krebsentwicklung eine große Rolle spielt ([Yamashiro et al., 1998](#)), könnte beispielsweise dazu genutzt werden. Ist die Expression in gesundem Epithelium gering oder sogar fehlend, wird es in verschiedenen epithelialen Tumoren von Brust, Haut, Darm oder Lunge hoch reguliert. So konnten [Xing et al. \(2011\)](#) zeigen, dass eine Herunterregulierung des Fascin-Levels die Zelladhäsion erhöht und die Proliferation verringert, wohingegen bei einer erhöhten Fascin-Expression die Adhäsion an Fibronectin vermindert und die Zellproliferation erhöht war. Weiterhin kann die Zellmorphologie, das Aktinzytoskelett und die Zellmotilität durch Regulierung der Fascin-Expression verändert werden ([Yamashiro et al., 1998](#)). Als Modellsystem könnte die Brustkrebszelllinie MCF7, die eine hohe Fascin-Expression aufweist ([Guvakova et al., 2002](#)), verwendet werden, um so die Effekte der gezielten Regulierung dieses Gens zu untersuchen und die Änderungen der oben genannten Untersuchungsparameter aus den RIKM-Analysen mit dem Tumorgrad der Zelle zu korrelieren.

Anhang

A.1 Verwendete MATLAB Codes

A.1.1 Auswerteroutine zur Zellsegmentierung

```

% Image Processing for phase RICM images
% Based on an Algorithm from Cell Segmentation Toolbox

%Katharina Klein, University of Heidelberg 2009

% *** GIVE HERE THE PATH AND IMAGE NAMES IF THERE ARE MORE THAN ONE IMAGES

basisfilename='y';
for i=2:2
    filename=[basisfilename ,num2str(i),'.tif']
    I=imread(['xx','\ ',filename]);

%*** GIVE HERE THE PATH AND IMAGENAME (ONLY ONE IMAGE)

%filename=['orca1-dunkel.tif']
%I=imread(filename);

% *** WRITE HERE THE NAME OF THE FILE YOU WANT TO SAVE YOUR DATA IN

nametxt=['xx.txt'];
nametxt2=['xx.txt'];

I=I(:, :, 1);
figure(1), imshow(I), title('original_image'); %HIER

pathname=['xx\'];

```

```
basisfilename5 = 'original'
imwrite(I,[pathname basisfilename5 ,num2str(i),'.tif']);

% * Detect Entire Cell

[junk threshold] = edge(I, 'sobel');

% *** DEFINE HERE THE FUDGEFACTOR FOR CELL EDGE DETECTION

fudgeFactor =.55
BWs = edge(I, 'sobel', threshold * fudgeFactor);
figure(2), imshow(BWs), title('binary_gradient_mask');
pathname=['xx\'];
basisfilename6 = 'binary'
imwrite(BWs,[pathname basisfilename6 ,num2str(i),'.tif']);

% * Fill Gaps

se90 = strel('line', 3, 6000);
se0 = strel('line', 3, 0);

% * Dilate the Image

BWsdil = imdilate(BWs, [se90 se0]);
figure(3), imshow(BWsdil), title('dilated_gradient_mask');
pathname=['xx\'];
basisfilename7 = 'dillated'
imwrite(BWsdil,[pathname basisfilename7 ,num2str(i),'.tif']);

% pause

% * Fill Interior Gaps

BWdfill = imfill(BWsdil, 'holes');
figure(4), imshow(BWdfill), title('binary_image_with_filled_holes');
pathname=['xx\'];
basisfilename8 = 'fill'
imwrite(BWdfill,[pathname basisfilename8 ,num2str(i),'.tif']);

% pause

% * Remove Connected Objects on Border

BWnobord = imclearborder(BWdfill, 4);
```

```
figure(5), imshow(BWnobord), title('cleared_border_image');  
pathname=['xx\'];  
basisfilename9 = 'border'  
imwrite(BWnobord,[pathname basisfilename9 ,num2str(i),'.tif']);
```

```
% pause
```

```
% * Smooth the Object
```

```
seD = strel('diamond',2);  
BWfinal = imerode(BWnobord,seD);  
BWfinal = imerode(BWfinal,seD);  
figure(6), imshow(BWfinal), title('segmented_image');  
pathname=['xx\'];  
basisfilename10 = 'erfinal'  
imwrite(BWfinal,[pathname basisfilename10 ,num2str(i),'.tif']);
```

```
% pause
```

```
% *** REMOVES SMALL PARTICLES WITH SIZES SMALLER THAN SMALL_SIZE
```

```
small_size=500;  
BWfinal=bwareaopen(BWfinal,small_size);  
figure(7), imshow(BWfinal), title('final_black/white_image');  
pathname=['xx\'];  
basisfilename11 = 'final'  
imwrite(BWfinal,[pathname basisfilename11 ,num2str(i),'.tif']);
```

```
% * Outline the Cell in Original Image
```

```
BWoutline = bwperim(BWfinal);  
Segout = I;  
Segout(BWoutline) = 255;  
figure(8), imshow(Segout), title('outlined_original_image');
```

```
% *** GIVE HERE THE PATHNAME AND FILENAME FOR SAVING THE OUTLINED IMAGE
```

```
pathname=['xx\'];  
basisfilename2 = 'oultine'  
imwrite(Segout,[pathname basisfilename2 ,num2str(i),'.tif']);
```

```
[B,L] = bwboundaries(BWfinal,'noholes');  
[B,L];
```

```
hold on
for k = 1:length(B)
    boundary = B{k};
    plot(boundary(:,2), boundary(:,1), 'r', 'LineWidth', 1)

result3=[boundary];
pathname=['xx\'];
basisfilename5='boundary'
dlmwrite([pathname basisfilename5 ,num2str(i),'.txt'],result3,'newline','pc',
,'delimiter','\t');

end

stats = regionprops(L, 'Centroid', 'Orientation', 'Area', 'Eccentricity',
'MajorAxisLength', 'MinorAxisLength', 'Perimeter', 'EulerNumber', 'Extrema',
'PixelList', 'PixelIdxList', 'Image' );

% loop over the boundaries

for k = 1:length(B)

% obtain (X,Y) boundary coordinates corresponding to label 'k'

boundary = B{k};

% obtain the area calculation corresponding to label 'k'

area = stats(k).Area;
orientation= stats(k).Orientation;
eccentricity = stats(k).Eccentricity;
ma_ax_length=stats(k).MajorAxisLength;
mi_ax_length=stats(k).MinorAxisLength;
centroid=stats(k).Centroid;
orientation=stats(k).Orientation;
perimeter=stats(k).Perimeter;
eulernumber=stats(k).EulerNumber;
extrema=stats(k).Extrema;
pixelList=stats(k).PixelList;
linearIndices = stats(k).PixelIdxList;

% *** INTENSITY VALUES WITHIN BOUNDARY

C=pixelList(:,1);
R=pixelList(:,2);
Int=impixel(I,C,R);
```

```

Int=Int (: ,1);

IntM=max(Int);
Intm=min(Int);

h=(546/(4*pi*1.3321))*acos((2*Int(1:length(Int))-Intm-IntM)/(Intm-IntM));

M=[C,R,Int ,h];

% *** Calculate the area above a certain threshold 'thresh'

%thresh = 0.669*Intm+0.331*IntM; %for CCD2
thresh = 0.715*Intm+0.285*IntM; %for CCD1
%thresh= 0.649*Intm+0.351*IntM; %for CCD1 und fixierte Proben mit
%n=Mittel aus Glycerin und Glas
%thresh= 0.638*Intm+0.362*IntM; %for CCD1 und fixierte Proben mit n=Glas

pixels_bigger = 0;

indicesForSegmentation = zeros(length(linearIndices), 1);
j = 1;
s_xy = size(I);
s_x = s_xy(2);
s_y = s_xy(1);

for v = linearIndices'
if I(v) > thresh
pixels_bigger = pixels_bigger + 1;
indicesForSegmentation(j) = v;
j = j + 1;

end
end

% Nulleinträge entfernen

indicesForSegmentation = indicesForSegmentation (find(indicesForSegmentation > 0));
I_seg = zeros(s_y, s_x);
I_seg(:) = 100;
I_seg(linearIndices) = 0;
%I_seg = logical(I_seg);
I_seg(indicesForSegmentation) = 255;
I_seg = uint8(I_seg);
%I_seg(BWoutline) = 255;

figure (15), imshow(I_seg), title('Pixels_higher_than_threshold');

```

```
assignin('base', 'biggerPixelsPercent', pixels_bigger/area*100);
% percent of Pixels higher than tresh

pathname=['xx\'];
basisfilename3= 'tresh'
imwrite(I_seg,[pathname basisfilename3 ,num2str(i),'.tif']);

% * Save the results

result=[i, area, centroid, orientation, eccentricity, ma_ax_length,
mi_ax_length, fudgeFactor, perimeter, eulernumber,IntM,Intm,
biggerPixelsPercent];
dlmwrite(nametxt, result, 'newline', 'pc', '-append', 'delimiter', '\t');

% * Save vector M

result2=[M];
dlmwrite(nametxt2, result2, 'newline', 'pc', '-append', 'delimiter', '\t');

% *** HISTOGRAM

figure(9), title('Histogram');

hist(Int(1:length(Int)),1),255)

pathname=['xx\'];
basisfilename4='histo'
figure_name=[pathname basisfilename4 ,num2str(i),'.tif'];
saveas(gcf,figure_name);

end
end
```

A.1.2 Auswerteroutine zur Bestimmung der tatsächlichen Adhäsionsfläche

*% Addition process of the two threshold images
%Katharina Klein, University of Heidelberg 2009*

*% *** GIVE HERE THE PATH AND IMAGE NAMES IF THERE ARE MORE THAN ONE IMAGES*

```
basisfilename='xx';
for i= 1:1
filename=[basisfilename ,num2str(i) ,'.tif']
I=imread(['threshold1 ','\ ',filename]);
I=I (: ,: ,1);
figure(1) , imshow (I);
I2=imread(['threshold2 ','\ ',filename]);
I2=I2 (: ,: ,1);
figure(2) , imshow (I2);

% *** ADDITION

beide= imadd(I ,I2);
figure(3) , imshow (beide);
pathname=['xx\'];
basisfilename3= 'kombibild'

imwrite(beide ,[pathname basisfilename3 ,num2str(i) ,'.tif']);

% * Histogram

[ counts ,x]= imhist (beide);
R=[x ,counts];
M(:,i)=R(:,2);

nametxt5=['xx.txt'];
dlmwrite(nametxt5 , M, 'newline' , 'pc' , '-append' , 'delimiter' , '\t');

end
```


Literaturverzeichnis

- [Abercrombie und Ambrose 1958] ABERCROMBIE, M. ; AMBROSE, E.: Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. In: *Exp Cell Res* 15 (1958), Nr. 2, S. 332 – 345
- [Abercrombie und Dunn 1975] ABERCROMBIE, M. ; DUNN, G.: Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. In: *Exp Cell Res* 92 (1975), Nr. 1, S. 57–62
- [Adams 1997] ADAMS, J.: Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. In: *Mol Biol Cell* 8 (1997), Nr. 11, S. 2345–2363
- [Adams 2001] ADAMS, J.: Cell-matrix contact structures. In: *Cell Mol Life Sci* 58 (2001), Nr. 3, S. 371–392
- [Akiyama et al. 1995] AKIYAMA, S. K. ; OLDEN, K. ; YAMADA, K. M.: Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. In: *Cancer Metastasis Rev* 14 (1995), Nr. 3, S. 173–189
- [Albersdörfer und Sackmann 1997] ALBERSDÖRFER, T. ; SACKMANN, E.: Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study. In: *Biophys J* 73 (1997), Nr. 1, S. 245–257
- [Alberts et al. 2002] ALBERTS, B. ; WILSON, J. H. ; HUNT, T.: *Molecular biology of the cell*. New York [u.a.] : Garland, 2002
- [Albertson et al. 2003] ALBERTSON, D. G. ; COLLINS, C. ; MCCORMICK, F. ; GRAY, J. W.: Chromosome aberrations in solid tumors. In: *Nat Genet* 34 (2003), Nr. 4, S. 369–376
- [Aota und Yamada 1994] AOTA, M. ; YAMADA, K.: The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 40, S. 24756–24761
- [Arnold et al. 2004] ARNOLD, M. ; CAVALCANTI-ADAM, E. ; GLASS, R. ; BLÜMMEL, J. ; ECK, W. ; KANTLEHNER, K. ; KESSLER, H. ; SPATZ, J.: Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces. In: *Chem Phys Chem* 5 (2004), S. 383–388
- [Arnold et al. 2008] ARNOLD, M. ; HIRSCHFELD-WARNEKEN, V. ; LOHMÜLLER, T. ; HEIL, P. ; BLÜMMEL, J. ; CAVALCANTI-ADAM, E. ; LOPEZ-GARCIA, M. ; WALTHER, P. ; KESSLER, H. ; GEIGER, B. ; SPATZ, J.: Induction of Cell Polarization and Migration by a Gradient of Nanoscale Variations in Adhesive Ligand Spacing. In: *Nano Letters* 8 (2008), S. 2063–2069
- [Balaban et al. 2001] BALABAN, N. Q. ; SCHWARZ, U. S. ; RIVELINE, D. ; GOICHBURG, P. ; TZUR, G. ; SABANAY, I. ; MAHALU, D. ; SAFRAN, S. ; BERSHADSKY, A. ; ADDADI, L. ; GEIGER, B.: Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic

- micropatterned substrates. In: *Nat Cell Biol* 3 (2001), Nr. 5, S. 466–472
- [Balmain et al. 2003] BALMAIN, A. ; GRAY, J. ; PONDER, B.: The genetics and genomics of cancer. In: *Nat Genet* 33 Suppl (2003), S. 238–244
- [Bardsley und Aplin 1983] BARDSLEY, W. G. ; APLIN, J. D.: Kinetic analysis of cell spreading - I. Theory and modelling of curves. In: *J Cell Sci* 61 (1983), S. 365–373
- [Bedin et al. 2010] BEDIN, V. ; ADAM, R. L. ; DE SÁ, B. C. ; LANDMAN, G. ; METZE, K.: Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. In: *BMC Cancer* 10 (2010), S. 260–265
- [Beer et al. 1992] BEER, J. H. ; SPRINGER, K. T. ; COLLER, B. S.: Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. In: *Blood* 79 (1992), Nr. 1, S. 117–128
- [Bell 1978] BELL, G. I.: Models for the specific adhesion of cells to cells. In: *Science* 200 (1978), Nr. 4342, S. 618–627
- [Bendas und Borsig 2012] BENDAS, G. ; BORSIG, L.: Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. In: *International Journal of Cell Biology* 2012 (2012)
- [Bereiter-Hahn et al. 1979] BEREITER-HAHN, J. ; FOX, C. ; THORELL, B.: Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. In: *J Cell Biol* 82 (1979), Nr. 3, S. 767–779
- [Bergmann 2003] BERGMANN, A.: *Polarisations-Lichtmikroskopie*, Universität Regensburg, Diplomarbeit, 2003
- [Besser und Safran 2006] BESSER, A. ; SAFRAN, S. A.: Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions. In: *Biophys J* 90 (2006), Nr. 10, S. 3469–3484
- [Birchmeier 1995] BIRCHMEIER, W.: E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. In: *Bioessays* 17 (1995), Nr. 2, S. 97–99
- [Bischofs et al. 2008] BISCHOF, I. B. ; KLEIN, F. ; LEHNERT, D. ; BASTMEYER, M. ; SCHWARZ, U. S.: Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. In: *Biophys J* 95 (2008), Nr. 7, S. 3488–3496
- [Bissell et al. 2002] BISSELL, M. J. ; RADISKY, D. C. ; RIZKI, A. ; WEAVER, V. M. ; PETERSEN, O. W.: The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. In: *Differentiation* 70 (2002), Nr. 9-10, S. 537–546
- [Blümmel et al. 2007] BLÜMMEL, J. ; PERSCHMANN, N. ; AYDIN, D. ; DRINJAKOVIC, J. ; SURREY, T. ; LOPEZ-GARCIA, M. ; KESSLER, H. ; SPATZ, J. P.: Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO₂-based interfaces. In: *Biomaterials* 28 (2007), Nr. 32, S. 4739 – 4747
- [Boehm 2009] BOEHM, H.: *Micromechanical Properties and Structure of the Pericellular Coat of Living Cells Modulated by Nanopatterned Substrates*, Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Dissertation, 2009
- [Bouaouina et al. 2012] BOUAOUINA, M. ; HARBURGER, D. S. ; CALDERWOOD, D. A.: Talin and signaling through integrins. In: *Methods Mol Biol* 757 (2012), S. 325–347
- [Bruinsma et al. 2000] BRUINSMA, R. ; BEHRISCH, A. ; SACKMANN, E.: Adhesive switching of membranes: Experiment and theory. In: *Physical Review E* 61 (2000), S. 4253 – 4267

- [Buczowski et al. 1998] BUCZKOWSKI, S. ; HILDGEN, P. ; CARTILIER, L.: Measurements of fractal dimension by box-counting: a critical analysis of data scatter. In: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 252 (1998), S. 23 – 34
- [Case und Waterman 2011] CASE, L. B. ; WATERMAN, C. M.: Adhesive F-actin Waves: A Novel Integrin-Mediated Adhesion Complex Coupled to Ventral Actin Polymerization. In: *PLoS ONE* 6 (2011), Nr. 11, S. e26631
- [Cavalcanti-Adam et al. 2007] CAVALCANTI-ADAM, E. A. ; VOLBERG, T. ; MICOULET, A. ; KESSLER, B. ; SPATZ, J. P.: Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. In: *Biophys. J.* 92 (2007), S. 2964–2974
- [Cavalcanti-Adam et al. 2006] CAVALCANTI-ADAM, E. A. ; MICOULET, A. ; BLÜMMEL, J. ; AUERNHEIMER, J. ; KESSLER, H. ; SPATZ, J. P.: Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. In: *Eur. J. Cell Biol.* 85 (2006), S. 219–224
- [Chamaroux et al. 2005] CHAMARAUX, F. ; FACHE, S. ; BRUCKERT, F. ; FOURCADE, B.: Kinetics of cell spreading. In: *Phys Rev Lett* 94 (2005), Nr. 15, S. 158102–1 – 158102–4
- [Channavajjala et al. 1997] CHANNAVAJJALA, L. S. ; EIDSATH, A. ; SAXINGER, W. C.: A simple method for measurement of cell-substrate attachment forces: application to HIV-1 Tat. In: *J Cell Sci* 110 ((1997), S. 249–256
- [Chen et al. 1997] CHEN, C. S. ; MRKSICH, M. ; HUANG, S. ; WHITESIDES, G. M. ; INGBER, D. E.: Geometric control of cell life and death. In: *Science* 276 (1997), Nr. 5317, S. 1425–1428
- [Chen und Singer 1982] CHEN, W. T. ; SINGER, S. J.: Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell-substratum and cell-cell contacts in cultured fibroblasts. In: *J Cell Biol* 95 (1982), Nr. 1, S. 205–222
- [Christ und Turner 2010] CHRIST, K. V. ; TURNER, K. T.: Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates. In: *Journal of Adhesion Science and Technology* 24 (2010), Nr. 13-14, S. 2027–2058
- [Christ et al. 2010] CHRIST, K. V. ; WILLIAMSON, K. B. ; MASTERS, K. S. ; TURNER, K. T.: Measurement of single-cell adhesion strength using a microfluidic assay. In: *Biomed Microdevices* 12 (2010), Nr. 3, S. 443–455
- [Christophis et al. 2010] CHRISTOPHIS, C. ; GRUNZE, M. ; ROSENHAHN, A.: Quantification of the adhesion strength of fibroblast cells on ethylene glycol terminated self-assembled monolayers by a microfluidic shear force assay. In: *Phys Chem Chem Phys* 12 (2010), Nr. 17, S. 4498–4504
- [Claridge et al. 1992] CLARIDGE, E. ; HALL, P. N. ; KEEFE, M. ; ALLEN, J. P.: Shape analysis for classification of malignant melanoma. In: *J Biomed Eng* 14 (1992), Nr. 3, S. 229–234
- [Cozens-Roberts et al. 1990] COZENS-ROBERTS, C. ; QUINN, J. A. ; LAUFFENBERGER, D. A.: Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the Radical-Flow Detachment Assay. In: *Biophys J* 58 (1990), Nr. 1, S. 107–125
- [Cross 1997] CROSS, S. S.: Fractals in pathology. In: *The Journal of Pathology* 182 (1997), Nr. 1, S. 1–8
- [Cross et al. 2008] CROSS, S. E. ; JIN, Y.-S. ; TONDRE, J. ; WONG, R. ; RAO, J. ; GIMZEWSKI, J. K.: AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. In: *Nanotechnology* 19 (2008),

Nr. 38, S. 384003

- [Crutchfield et al. 1986] CRUTCHFIELD, J. P. ; FARMER, J. D. ; PACKARD, N. H. ; SHAW, R. S.: Chaos. In: *Scientific American* 255 (1986), Nr. 6, S. 46–57
- [Curtis 1964] CURTIS, A. S. G.: The mechanism of adhesion of cells to glass: a study by Interference Reflection Microscopy. In: *J Cell Biol* 20 (1964), Nr. 2, S. 199–215
- [Cuvelier et al. 2007] CUVELIER, D. ; THÉRY, M. ; CHU, Y.-S. ; DUFOUR, S. ; THIÉRY, J.-P. ; BORNENS, M. ; NASSOY, P. ; MAHADEVAN, L.: The universal dynamics of cell spreading. In: *Curr Biol* 17 (2007), Nr. 8, S. 694–699
- [Dalby et al. 2004] DALBY, M. J. ; PASQUI, D. ; AFFROSSMAN, S.: Cell response to nano-islands produced by polymer demixing: a brief review. In: *IEE Proc Nanobiotechnol* 151 (2004), Nr. 2, S. 53–61
- [Danen et al. 1995] DANEN, E. H. ; AOTA, S. ; VAN KRAATS, A. A. ; YAMADA, K. M. ; RUITER, D. J. ; VAN MUIJEN, G. N.: Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin alpha 5 beta 1. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 37, S. 21612–21618
- [Davies et al. 1997] DAVIES, P. F. ; BARBEE, K. A. ; VOLIN, M. V. ; ROBOTOWSKYJ, A. ; CHEN, J. ; JOSEPH, L. ; GRIEM, M. L. ; WERNICK, M. N. ; JACOBS, E. ; POLACEK, D. C. ; DEPAOLA, N. ; BARAKAT, A. I.: Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. In: *Annu Rev Physiol* 59 (1997), S. 527–549
- [Davies et al. 1993] DAVIES, P. F. ; ROBOTOWSKYJ, A. ; GRIEM, M. L.: Endothelial cell adhesion in real time. Measurements in vitro by tandem scanning confocal image analysis. In: *J Clin Invest* 91 (1993), Nr. 6, S. 2640–2652
- [Davies et al. 1994] DAVIES, P. F. ; ROBOTOWSKYJ, A. ; GRIEM, M. L.: Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. In: *J Clin Invest* 93 (1994), Nr. 5, S. 2031–2038
- [Döbereiner et al. 2004] DÖBEREINER, H.-G. ; DUBIN-THALER, B. ; GIANNONE, G. ; XENIAS, H. S. ; SHEETZ, M. P.: Dynamic phase transitions in cell spreading. In: *Phys Rev Lett* 93 (2004), Nr. 10, S. 108105–1 – 108105–4
- [Döbereiner et al. 2005] DÖBEREINER, H.-G. ; DUBIN-THALER, B. J. ; GIANNONE, G. ; SHEETZ, M. P.: Force sensing and generation in cell phases: analyses of complex functions. In: *J Appl Physiol* 98 (2005), Nr. 4, S. 1542–1546
- [Dee et al. 1998] DEE, K. C. ; ANDERSEN, T. T. ; BIZIOS, R.: Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. In: *J Biomed Mater Res* 40 (1998), Nr. 3, S. 371–377
- [Dembo et al. 1988] DEMBO, M. ; TORNEY, D. C. ; SAXMAN, K. ; HAMMER, D.: The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. In: *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 234 (1988), Nr. 1274, S. 55–83
- [Demtröder 2009] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 2- Elektrizität und Optik*. Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [Denkov et al. 1992] DENKOV, N. ; VELEV, O. ; KRALCHEVSKI, P. ; IVANOV, I. ; YOSHIMURA, H. ; NAGAYAMA, K.: Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles

- on substrates. In: *Langmuir* 8 (1992), Nr. 12, S. 3183–3190
- [Dimitrov und Nagayama 1996] DIMITROV, A. S. ; NAGAYAMA, K.: Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces. In: *Langmuir* 12 (1996), Nr. 5, S. 1303–1311
- [Discher et al. 2005] DISCHER, D. E. ; JANMEY, P. ; WANG, Y.-L.: Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. In: *Science* 310 (2005), Nr. 5751, S. 1139–1143
- [Dokukin et al. 2011] DOKUKIN, M. E. ; GUZ, N. V. ; GAIKWAD, R. M. ; WOODWORTH, C. D. ; SOKOLOV, I.: Cell surface as a fractal: normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behavior of surface adhesion maps at the nanoscale. In: *Phys Rev Lett* 107 (2011), Nr. 2, S. 028101–1 – 028101–4
- [Dubin-Thaler et al. 2004] DUBIN-THALER, B. J. ; GIANNONE, G. ; DÖBEREINER, H.-G. ; SHEETZ, M. P.: Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. In: *Biophys J* 86 (2004), Nr. 3, S. 1794–1806
- [Duffy et al. 1998] DUFFY, D. C. ; McDONALD, J. C. ; SCHUELLER, O. J. ; WHITESIDES, G. M.: Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). In: *Anal Chem* 70 (1998), Nr. 23, S. 4974–4984
- [Dustin und Cooper 2000] DUSTIN, M. L. ; COOPER, J. A.: The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. In: *Nat Immunol* 1 (2000), Nr. 1, S. 23–29
- [Egerton 2005] EGERTON, R.: The Scanning Electron Microscope. In: *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer, 2005, S. 125–153
- [Elbert und Hubbell 1998] ELBERT, D. L. ; HUBBELL, J. A.: Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers. In: *Chem Biol* 5 (1998), Nr. 3, S. 177–183
- [Erb et al. 1997] ERB, E. M. ; TANGEMANN, K. ; BOHRMANN, B. ; MÜLLER, B. ; ENGEL, J.: Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 24, S. 7395–7402
- [Erdmann und Schwarz 2004a] ERDMANN, T. ; SCHWARZ, U. S.: Stability of adhesion clusters under constant force. In: *Phys Rev Lett* 92 (2004), Nr. 10, S. 108102
- [Erdmann und Schwarz 2007] ERDMANN, T. ; SCHWARZ, U. S.: Impact of receptor-ligand distance on adhesion cluster stability. In: *Eur Phys J E Soft Matter* 22 (2007), Nr. 2, S. 123–137
- [Erdmann und Schwarz 2004b] ERDMANN, T. ; SCHWARZ, U. S.: Stochastic dynamics of adhesion clusters under shared constant force and with rebinding. In: *J Chem Phys* 121 (2004), Nr. 18, S. 8997–9017
- [Evan A. Evans 1983] EVAN A. EVANS, V. A. P.: Energetics of membrane deformation and adhesion in cell and vesicle aggregation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 416 (1983), S. 13–33
- [Evans 2001] EVANS, E.: Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30 (2001), S. 105–128
- [Evans 1985a] EVANS, E. A.: Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and sepa-

- ration. I. Continuum of molecular cross-bridges. In: *Biophys J* 48 (1985), Nr. 1, S. 175–183
- [Evans 1985b] EVANS, E. A.: Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation. II. Discrete kinetically trapped molecular cross-bridges. In: *Biophys J* 48 (1985), Nr. 1, S. 185–192
- [Fang et al. 2005] FANG, N. ; ZHU, A. ; CHAN-PARK, M. B. ; CHAN, V.: Adhesion contact dynamics of fibroblasts on biomacromolecular surfaces. In: *Macromol Biosci* 5 (2005), Nr. 10, S. 1022–1031
- [Frisch und Thoumine 2002] FRISCH, T. ; THOUMINE, O.: Predicting the kinetics of cell spreading. In: *J Biomech* 35 (2002), Nr. 8, S. 1137–1141
- [Galbraith et al. 2002] GALBRAITH, C. G. ; YAMADA, K. M. ; SHEETZ, M. P.: The relationship between force and focal complex development. In: *J Cell Biol* 159 (2002), Nr. 4, S. 695–705
- [Gallant und García 2007] GALLANT, N. D. ; GARCÍA, A. J.: Model of integrin-mediated cell adhesion strengthening. In: *J Biomech* 40 (2007), Nr. 6, S. 1301–1309
- [Gallant et al. 2005] GALLANT, N. D. ; MICHAEL, K. E. ; GARCÍA, A. J.: Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. In: *Mol Biol Cell* 16 (2005), Nr. 9, S. 4329–4340
- [Gao et al. 2011] GAO, H. ; QIAN, J. ; CHEN, B.: Probing mechanical principles of focal contacts in cell-matrix adhesion with a coupled stochastic-elastic modelling framework. In: *J R Soc Interface* 8 (2011), Nr. 62, S. 1217–1232
- [Gao und Eisenberg 1993] GAO, Z. ; EISENBERG, A.: A model of micellization for block copolymers in solutions. In: *Macromolecules* 26 (1993), Nr. 26, S. 7353–7360
- [Garcia et al. 1997] GARCIA, A. J. ; DUCHEYNE, P. ; BOETTIGER, D.: Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. In: *Biomaterials* 18 (1997), Nr. 16, S. 1091 – 1098
- [Geiger et al. 2001] GEIGER, B. ; BERSHADSKY, A. ; PANKOV, R. ; YAMADA, K. M.: Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), Nr. 11, S. 793–805
- [Gentile et al. 2010] GENTILE, F. ; TIRINATO, L. ; BATTISTA, E. ; CAUSA, F. ; LIBERALE, C. ; FABRIZIO, E. M. di ; DECUZZI, P.: Cells preferentially grow on rough substrates. In: *Biomaterials* 31 (2010), Nr. 28, S. 7205–7212
- [Giaever und Keese 1993] GIAEVER, I. ; KEESE, C. R.: A morphological biosensor for mammalian cells. In: *Nature* 366 (1993), Nr. 6455, S. 591–592
- [Gingell und Todd 1979] GINGELL, D. ; TODD, I.: Interference reflection microscopy. A quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement. In: *Biophys J* 26 (1979), Nr. 3, S. 507–526
- [Girard et al. 2007] GIRARD, P. P. ; CAVALCANTI-ADAM, E. A. ; KEMKEMER, R. ; SPATZ, J. P.: Cellular chemomechanics at interfaces: sensing, integration and response. In: *Soft Matter* 3 (2007), S. 307–326
- [Glass et al. 2004] GLASS, R. ; ARNOLD, M. ; CAVALCANTI-ADAM, E. ; BLÜMMEL, J. ; HAFFERKEMPER, C. ; DODD, C. ; SPATZ, J.: Block copolymer micelle nanolithography on non-conductive substrates. In: *New Journal of Physics* 6 (2004), S. 101

- [Glass et al. 2003] GLASS, R. ; MOLLER, M. ; SPATZ, J. P.: Block copolymer micelle nanolithography. In: *Nanotechnology* 14 (2003), Nr. 10, S. 1153–1160
- [Goffin et al. 2006] GOFFIN, J. M. ; PITTET, P. ; CSUCS, G. ; LUSSI, J. W. ; MEISTER, J.-J. ; HINZ, B.: Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. In: *J Cell Biol* 172 (2006), Nr. 2, S. 259–268
- [Guvakova et al. 2002] GUVAKOVA, M. A. ; BOETTIGER, D. ; ADAMS, J. C.: Induction of fascin spikes in breast cancer cells by activation of the insulin-like growth factor-I receptor. In: *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002), Nr. 6, S. 685–698
- [Hammer und Lauffenburger 1989] HAMMER, D. A. ; LAUFFENBURGER, D. A.: A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces in viscous shear flow. In: *Cell Biophys* 14 (1989), Nr. 2, S. 139–173
- [Hao et al. 2006] HAO, P.-F. ; YAO, Z.-H. ; HE, F. ; ZHU, K.-Q.: Experimental investigation of water flow in smooth and rough silicon microchannels. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16 (2006), Nr. 7, S. 1397–1402
- [Hategan et al. 2004] HATEGAN, A. ; SENGUPTA, K. ; KAHN, S. ; SACKMANN, E. ; DISCHER, D. E.: Topographical pattern dynamics in passive adhesion of cell membranes. In: *Biophys J* 87 (2004), Nr. 5, S. 3547–3560
- [Haubner und Kessler 1997] HAUBNER, R. ; KESSLER, I. H.: Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des Alpha-v Beta3-Integrins für eine neuartige Krebstherapie. In: *Angewandte Chemie* 109 (1997), Nr. 13-14, S. 1440–1456
- [Hazan et al. 2004] HAZAN, R. B. ; QIAO, R. ; KEREN, R. ; BADANO, I. ; SUYAMA, K.: Cadherin switch in tumor progression. In: *Ann N Y Acad Sci* 1014 (2004), S. 155–163
- [Heath 1982] HEATH, J.: Adhesions to substratum and locomotory behavior of fibroblastic and epithelial cells in culture. In: *Cambridge University Press VIII+615P* (1982), S. 77–108
- [Herr et al. 2006] HERR, J. K. ; SMITH, J. E. ; MEDLEY, C. D. ; SHANGGUAN, D. ; TAN, W.: Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. In: *Anal Chem* 78 (2006), Nr. 9, S. 2918–2924
- [Hersel und Kessler 2003] HERSEL, C. ; KESSLER, H.: RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 24, S. 4385–4415
- [Heuberger et al. 2005] HEUBERGER, M. ; DROBEK, T. ; SPENCER, N. D.: Interaction forces and morphology of a protein-resistant poly(ethylene glycol) layer. In: *Biophys J* 88 (2005), Nr. 1, S. 495–504
- [Higuchi und Tsukamoto 2004] HIGUCHI, A. ; TSUKAMOTO, Y.: Cell separation of hepatocytes and fibroblasts through surface-modified polyurethane membranes. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71A (2004), Nr. 3, S. 470–479
- [Höök et al. 1998] HÖÖK, F. ; RODAHL, M. ; BRZEZINSKI, P. ; KASEMO, B.: Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance. In: *Langmuir* 14 (1998), Nr. 4, S. 729–734
- [Hänggi et al. 1990] HÄNGGI, P. ; TALKNER, P. ; BORKOVEC, M.: Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. In: *Rev. Mod. Phys.* 2 (1990), S. 251–341
- [Hochmuth 2000] HOCHMUTH, R. M.: Micropipette aspiration of living cells. In: *J Biomech*

33 (2000), Nr. 1, S. 15–22

- [Hojo et al. 2001] HOJO, K. ; SUSUKI, Y. ; MAEDA, M. ; OKAZAKI, I. ; NOMIZU, M. ; KAMADA, H. ; YAMAMOTO, Y. ; NAKAGAWA, S. ; MAYUMI, T. ; KAWASAKI, K.: Amino acids and peptides. Part 39: a bivalent poly(ethylene glycol) hybrid containing an active site (RGD) and its synergistic site (PHSRN) of fibronectin. In: *Bioorg Med Chem Lett* 11 (2001), Nr. 11, S. 1429–1432
- [Holt et al. 2008] HOLT, M. R. ; CALLE, Y. ; SUTTON, D. H. ; CRITCHLEY, D. R. ; JONES, G. E. ; DUNN, G. A.: Quantifying cell-matrix adhesion dynamics in living cells using interference reflection microscopy. In: *J Microsc* 232 (2008), Nr. 1, S. 73–81
- [Howstuffworks 2012] HOWSTUFFWORKS: *Schematische Darstellung eines Rasterelektronenmikroskops.* 2012. – URL <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>
- [Hunter et al. 1995] HUNTER, A. ; ARCHER, C. W. ; WALKER, P. S. ; BLUNN, G. W.: Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. In: *Biomaterials* 16 (1995), Nr. 4, S. 287–295
- [Hynes 1992] HYNES, R. O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. In: *Cell* 69 (1992), Nr. 1, S. 11–25
- [Hynes 2002] HYNES, R. O.: Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. In: *Cell* 110 (2002), Nr. 6, S. 673 – 687
- [Indra et al. 2011] INDRA, I. ; UNDYALA, V. ; KANDOW, C. ; THIRUMURTHI, U. ; DEMBO, M. ; BENINGO, K. A.: An in vitro correlation of mechanical forces and metastatic capacity. In: *Phys Biol* 8 (2011), Nr. 1, S. 015015
- [Inoue und Hyde 1957] INOUE, S. ; HYDE, W. L.: Studies on depolarization of light at microscope lens surfaces. II. The simultaneous realization of high resolution and high sensitivity with the polarizing microscope. In: *J Biophys Biochem Cytol* 3 (1957), Nr. 6, S. 831–838
- [Inoue und Kubota 1958] INOUE, S. ; KUBOTA, H.: Diffraction anomaly in polarizing microscopes. In: *Nature* 182 (1958), Nr. 4651, S. 1725–1726
- [Ito et al. 1991] ITO, Y. ; KAJIHARA, M. ; IMANISHI, Y.: Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. In: *J Biomed Mater Res* 25 (1991), Nr. 11, S. 1325–1337
- [Ito und Shinomiya 2001] ITO, Y. ; SHINOMIYA, K.: A new continuous-flow cell separation method based on cell density: principle, apparatus, and preliminary application to separation of human buffy coat. In: *J Clin Apher* 16 (2001), Nr. 4, S. 186–191
- [Izzard und Lochner 1976] IZZARD, C. S. ; LOCHNER, L. R.: Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. In: *J Cell Sci* 21 (1976), Nr. 1, S. 129–159
- [Janes und Watt 2006] JANES, S. M. ; WATT, F. M.: New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. In: *Nat Rev Cancer* 6 (2006), Nr. 3, S. 175–183
- [Kanchanawong et al. 2010] KANCHANAWONG, P. ; SHTENGEL, G. ; PASAPERA, A. M. ; RAMKO, E. B. ; DAVIDSON, M. W. ; HESS, H. F. ; WATERMAN, C. M.: Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. In: *Nature* 468 (2010), Nr. 7323, S. 580–584

- [Kansal et al. 2000] KANSAL, A. ; TRUSKETT, T. ; TORQUATO, S.: Nonequilibrium hard-disk packings with controlled orientational order. In: *J. of chemical physics* 113 (2000), S. 4844–4851
- [Kao et al. 2001] KAO, W. J. ; LEE, D. ; SCHENSE, J. C. ; HUBBELL, J. A.: Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: the role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains. In: *J Biomed Mater Res* 55 (2001), Nr. 1, S. 79–88
- [Karlström und Engkvist 1997] KARLSTRÖM, G. ; ENGKVIST, O.: *Theory of Poly(ethylene glycol) in Solution*. Kap. 3, S. 16–30. In: *Poly(ethylene glycol)*, 1997
- [Karp 2005] KARP, G.: *Molekulare Zellbiologie*. Kap. Wechselwirkungen zwischen Zellen und ihrer Umgebung, S. 309–352, Springer Verlag, 2005
- [Karperien 2004–5] KARPERIEN, A.: *FracLac for ImageJ - FracLac Advanced User's Manual*. Charles Sturt University Australia (Veranst.), 2004-5. – URL <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fracLac/fracLac-manual.pdf>
- [Kenausis et al. 2000] KENAUSIS, G. L. ; VÖRÖS, J. ; ELBERT, D. L. ; HUANG, N. ; HOFER, R. ; RUIZ-TAYLOR, L. ; TEXTOR, M. ; HUBBELL, J. A. ; SPENCER, N. D.: Poly(l-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 104 (2000), Nr. 14, S. 3298–3309
- [Kim et al. 2006] KIM, J.-H. ; KIM, J.-S. ; CHOI, H. ; LEE, S.-M. ; JUN, B.-H. ; YU, K.-N. ; KUK, E. ; KIM, Y.-K. ; JEONG, D. H. ; CHO, M.-H. ; LEE, Y.-S.: Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting. In: *Anal Chem* 78 (2006), Nr. 19, S. 6967–6973
- [Kong et al. 2009] KONG, F. ; GARCÍA, A. J. ; MOULD, A. P. ; HUMPHRIES, M. J. ; ZHU, C.: Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. In: *J Cell Biol* 185 (2009), Nr. 7, S. 1275–1284
- [Korn und Schwarz 2006] KORN, C. ; SCHWARZ, U. S.: Efficiency of initiating cell adhesion in hydrodynamic flow. In: *Phys Rev Lett* 97 (2006), Nr. 13, S. 138103–1 – 138103–4
- [Kramers 1940] KRAMERS, H.: Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. In: *Physica* 7 (1940), Nr. 4, S. 284 – 304
- [Kästle et al. 2003] KÄSTLE, G. ; BOYEN, H.-G. ; WEIGL, F. ; LENGEL, G. ; HERZOG, T. ; ZIEMANN, P. ; RIETHMÜLLER, S. ; MAYER, O. ; HARTMANN, C. ; SPATZ, J. ; MÖLLER, M. ; OZAWA, M. ; BANHART, F. ; GARNIER, M. ; OELHAFEN, P.: Micellar Nanoreactors-Preparation and Characterization of Hexagonally Ordered Arrays of Metallic Nanodots. In: *Advanced Functional Materials* 13 (2003), Nr. 11, S. 853–861
- [Kwon et al. 2007] KWON, K. W. ; CHOI, S. S. ; LEE, S. H. ; KIM, B. ; LEE, S. N. ; PARK, M. C. ; KIM, P. ; HWANG, S. Y. ; SUH, K. Y.: Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 11, S. 1461–1468
- [Landini et al. 2000] LANDINI, G. ; HIRAYAMA, Y. ; LI, T. J. ; KITANO, M.: Increased fractal complexity of the epithelial-connective tissue interface in the tongue of 4NQO-treated rats. In: *Pathol Res Pract* 196 (2000), Nr. 4, S. 251–258
- [Landini und Rippin 1996] LANDINI, G. ; RIPPIN, J. W.: How important is tumour shape? Quantification of the epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected

- fractal dimension analysis. In: *J Pathol* 179 (1996), Nr. 2, S. 210–217
- [Leahy et al. 1996] LEAHY, D. J. ; AUKHIL, I. ; ERICKSON, H. P.: 2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. In: *Cell* 84 (1996), Nr. 1, S. 155–164
- [Lehnert et al. 2004] LEHNERT, D. ; WEHRLE-HALLER, B. ; DAVID, C. ; WEILAND, U. ; BALLESTREM, C. ; IMHOF, B. A. ; BASTMEYER, M.: Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. In: *J Cell Sci* 117 (2004), Nr. Pt 1, S. 41–52
- [Leiss et al. 2008] LEISS, M. ; BECKMANN, K. ; GIRÓS, A. ; COSTELL, M. ; FÄSSLER, R.: The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. In: *Curr Opin Cell Biol* 20 (2008), Nr. 5, S. 502–507
- [Lekka et al. 2012] LEKKA, M. ; GIL, D. ; POGODA, K. ; DULIŃSKA-LITEWKA, J. ; JACH, R. ; GOSTEK, J. ; KLYMENKO, O. ; PRAUZNER-BECHCICKI, S. ; STACHURA, Z. ; WILTOWSKA-ZUBER, J. ; OKOŃ, K. ; LAIDLER, P.: Cancer cell detection in tissue sections using AFM. In: *Arch Biochem Biophys* 518 (2012), Nr. 2, S. 151–156
- [Li et al. 2009a] LI, J. ; DU, Q. ; SUN, C.: An improved box-counting method for image fractal dimension estimation. In: *Pattern Recognition* 42 (2009), Nr. 11, S. 2460 – 2469
- [Li et al. 2009b] LI, Y. ; SCHNEKENBURGER, J. ; DUIJS, M. H. G.: Intracellular particle tracking as a tool for tumor cell characterization. In: *J Biomed Opt* 14 (2009), Nr. 6, S. 064005–1 – 064005–7
- [Li et al. 2010] LI, Y. ; XU, G.-K. ; LI, B. ; FENG, X.-Q.: A molecular mechanisms-based biophysical model for two-phase cell spreading. In: *Applied Physics Letters* 96 (2010), Nr. 4, S. 043703–1 – 043703–3
- [Lieberman-Aiden et al. 2009] LIEBERMAN-AIDEN, E. ; VAN BERKUM, N. L. ; WILLIAMS, L. ; IMAKAEV, M. ; RAGOCZY, T. ; TELLING, A. ; AMIT, I. ; LAJOIE, B. R. ; SABO, P. J. ; DORSCHNER, M. O. ; SANDSTROM, R. ; BERNSTEIN, B. ; BENDER, M. A. ; GROUDINE, M. ; GNIRKE, A. ; STAMATOYANNOPOULOS, J. ; MIRNY, L. A. ; LANDER, E. S. ; DEKKER, J.: Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. In: *Science* 326 (2009), Nr. 5950, S. 289–293
- [Limozin und Sengupta 2007] LIMOZIN, L. ; SENGUPTA, K.: Modulation of vesicle adhesion and spreading kinetics by hyaluronan cushions. In: *Biophys J* 93 (2007), Nr. 9, S. 3300–3313
- [Limozin und Sengupta 2009] LIMOZIN, L. ; SENGUPTA, K.: Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. In: *Chem Phys Chem* 10 (2009), Nr. 16, S. 2752–2768
- [Lostumbo et al. 2006] LOSTUMBO, A. ; MEHTA, D. ; SETTY, S. ; NUNEZ, R.: Flow cytometry: a new approach for the molecular profiling of breast cancer. In: *Exp Mol Pathol* 80 (2006), Nr. 1, S. 46–53
- [Lotz et al. 1989] LOTZ, M. M. ; BURDSAL, C. A. ; ERICKSON, H. P. ; MCCLAY, D. R.: Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. In: *J Cell Biol* 109 (1989), Nr. 4 Pt 1, S. 1795–1805
- [Lu et al. 2004] LU, H. ; KOO, L. Y. ; WANG, W. M. ; LAUFFENBURGER, D. A. ; GRIFFITH, L. G. ; JENSEN, K. F.: Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. In:

- Anal Chem* 76 (2004), Nr. 18, S. 5257–5264
- [MacCalman et al. 1994] MACCALMAN, C. D. ; BRODT, P. ; DOUBLET, J. D. ; JEDNAK, R. ; ELHILALI, M. M. ; BAZINET, M. ; BLASCHUK, O. W.: The loss of E-cadherin mRNA transcripts in rat prostatic tumors is accompanied by increased expression of mRNA transcripts encoding fibronectin and its receptor. In: *Clin Exp Metastasis* 12 (1994), Nr. 2, S. 101–107
- [Maheshwari et al. 2000] MAHESHWARI, G. ; BROWN, G. ; LAUFFENBURGER, D. A. ; WELLS, A. ; GRIFFITH, L. G.: Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. In: *J Cell Sci* 113 (Pt 10) (2000), S. 1677–1686
- [Maier 2008] MAIER, T.: *Aufbau einer optischen Pinzette zur Bestimmung der Eigenschaften von künstlichen Aktin-Netzwerken*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 2008
- [Mandelbrot 1967] MANDELBROT, B.: How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension. In: *Science* 156 (1967), Nr. 3775, S. 636–638
- [Mandelbrot 1982] MANDELBROT, B.: *The fractal geometry of nature*. W.H. Freeman and Company, 1982
- [Marcotte und Tabrizian 2008] MARCOTTE, L. ; TABRIZIAN, M.: Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials. In: *IRBM* 29 (2008), S. 77 – 88
- [Marques et al. 2009] MARQUES, I. J. ; WEISS, F. U. ; VLECKEN, D. H. ; NITSCHKE, C. ; BAKKERS, J. ; LAGENDIJK, A. K. ; PARTECKE, L. I. ; HEIDECKE, C.-D. ; LERCH, M. M. ; BAGOWSKI, C. P.: Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. In: *BMC Cancer* 9 (2009), S. 128
- [Mashiah et al. 2008] MASHIAH, A. ; WOLACH, O. ; SANDBANK, J. ; UZIEL, O. ; RAANANI, P. ; LAHAV, M.: Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. In: *Acta Haematol* 119 (2008), Nr. 3, S. 142–150
- [McClay et al. 1981] MCCLAY, D. R. ; WESSEL, G. M. ; MARCHASE, R. B.: Intercellular recognition: quantitation of initial binding events. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981), Nr. 8, S. 4975–4979
- [Merkel et al. 1999] MERKEL, R. ; NASSOY, P. ; LEUNG, A. ; RITCHIE, K. ; EVANS, E.: Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. In: *Nature* 397 (1999), Nr. 6714, S. 50–53
- [Micoulet et al. 2005] MICOULET, A. ; SPATZ, J. P. ; OTT, A.: Mechanical Response Analysis and Power Generation by Single-Cell Stretching. In: *Chem Phys Chem* 6 (2005), S. 663–670
- [Monzel et al. 2009] MONZEL, C. ; FENZ, S. F. ; MERKEL, R. ; SENGUPTA, K.: Probing biomembrane dynamics by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. In: *Chem Phys Chem* 10 (2009), Nr. 16, S. 2828–2838
- [Narz 2008] NARZ, F.: Cell@Nano Projekt Meeting - Qiagen. In: *BMBF Projekt-Meeting Cell@Nano November 2008 (Hilden)*, 2008
- [Ochsenhirt et al. 2006] OCHSENHIRT, S. E. ; KOKKOLI, E. ; MCCARTHY, J. B. ; TIRRELL, M.: Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. In: *Biomaterials* 27 (2006), Nr. 20, S. 3863–3874
- [Olivier und Truskey 1993] OLIVIER, L. A. ; TRUSKEY, G. A.: A numerical analysis of forces

- exerted by laminar flow on spreading cells in a parallel plate flow chamber assay. In: *Biotechnol Bioeng* 42 (1993), Nr. 8, S. 963–973
- [Osram-Produktinfo 2012] OSRAM-PRODUKTINFO: *Specialty Light Sources for Medical and Industrial Applications*. März 2012. – URL http://www.osram.de/_global/pdf/Professional/Display_Optic/Display_Optic_NEU/XB0/123S001GB_PI_
- [Pasche et al. 2005] PASCHE, S. ; TEXTOR, M. ; MEAGHER, L. ; SPENCER, N. D. ; GRIESSER, H. J.: Relationship between interfacial forces measured by colloid-probe atomic force microscopy and protein resistance of poly(ethylene glycol)-grafted poly(L-lysine) adlayers on niobia surfaces. In: *Langmuir* 21 (2005), Nr. 14, S. 6508–6520
- [Paul et al. 2008] PAUL, R. ; HEIL, P. ; SPATZ, J. P. ; SCHWARZ, U. S.: Propagation of mechanical stress through the actin cytoskeleton toward focal adhesions: model and experiment. In: *Biophys J* 94 (2008), Nr. 4, S. 1470–1482
- [Perl et al. 1998] PERL, A. K. ; WILGENBUS, P. ; DAHL, U. ; SEMB, H. ; CHRISTOFORI, G.: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. In: *Nature* 392 (1998), Nr. 6672, S. 190–193
- [Pfaff et al. 1994] PFAFF, M. ; TANGEMANN, K. ; MÜLLER, B. ; GURRATH, M. ; MÜLLER, G. ; KESSLER, H. ; TIMPL, R. ; ENGEL, J.: Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 32, S. 20233–20238
- [Picart et al. 2004] PICART, C. ; SENGUPTA, K. ; SCHILLING, J. ; MAURSTAD, G. ; LADAM, G. ; BAUSCH, A. ; SACKMANN, E.: Microinterferometric Study of the Structure, Interfacial Potential, and Viscoelastic Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films on a Planar Substrate. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (2004), Nr. 22, S. 7196–7205
- [Pierres et al. 2002] PIERRES, A. ; BENOLIEL, A. ; BONGRAND, P.: Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. In: *European Cells and Materials* 3 (2002), S. 31–45
- [Pierres et al. 2008] PIERRES, A. ; BENOLIEL, A. ; TOUCHARD, D. ; BONGRAND, P.: How Cells Tiptoe on Adhesive Surfaces before Sticking. In: *Biophysical Journal* 94 (2008), S. 4114–4122
- [Pierres et al. 2003] PIERRES, A. ; EYMERIC, P. ; BALOCHE, E. ; TOUCHARD, D. ; BENOLIEL, A.-M. ; BONGRAND, P.: Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. In: *Biophys J* 84 (2003), Nr. 3, S. 2058–2070
- [Ploem 1975] PLOEM, J.: Reflection contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to glass surface. In: *Mononuclear phagocytes in immunity infection, and pathology*. Blackwell Scientific Publications (1975), S. 404–421
- [Rädler et al. 1995] RÄDLER ; FEDER ; STREY ; SACKMANN: Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. In: *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 51 (1995), Nr. 5, S. 4526–4536
- [Rädler und Sackmann 1992] RÄDLER, J. ; SACKMANN, E.: On the measurement of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy. In: *Langmuir* 8 (1992), Nr. 3, S. 848–853
- [Rädler und Sackmann 1993] RÄDLER, J. ; SACKMANN, E.: Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. In: *Journal de Physique II* 3

- (1993), S. 727–748
- [Reinhart-King et al. 2005] REINHART-KING, C. A. ; DEMBO, M. ; HAMMER, D. A.: The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. In: *Biophys J* 89 (2005), Nr. 1, S. 676–689
- [Richter et al. 2007] RICHTER, R. ; HOCK, K. ; BURKHARTSMEYER, J. ; BOEHM, H. ; BINGEN, P. ; WANG, G. ; STEINMETZ, N. ; EVANS, D. ; SPATZ, J.: Membrane-Grafted Hyaluronan Films: A Well-Defined Model System of Glycoconjugate Cell Coats. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), S. 5306–5307
- [Riess 2003] RIESS, G.: Micellization of block copolymers. In: *Progress in Polymer Science* 28 (2003), Nr. 7, S. 1107 – 1170
- [Riveline et al. 2001] RIVELINE, D. ; ZAMIR, E. ; BALABAN, N. Q. ; SCHWARZ, U. S. ; ISHIZAKI, T. ; NARUMIYA, S. ; KAM, Z. ; GEIGER, B. ; BERSHADSKY, A. D.: Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. In: *J Cell Biol* 153 (2001), Nr. 6, S. 1175–1186
- [Robert et al. 2008] ROBERT, P. ; SENGUPTA, K. ; PUECH, P.-H. ; BONGRAND, P. ; LIMOZIN, L.: Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion. In: *Biophys J* 95 (2008), Nr. 8, S. 3999–4012
- [Rupprecht et al. 2012] RUPPRECHT, P. ; GOLÉ, L. ; RIEU, J.-P. ; VÉZY, C. ; FERRIGNO, R. ; MERTANI, H. C. ; RIVIÈRE, C.: A tapered channel microfluidic device for comprehensive cell adhesion analysis, using measurements of detachment kinetics and shear stress-dependent motion. In: *Biomicrofluidics* 6 (2012), Nr. 1, S. 14107–1410712
- [Ryzhkov et al. 2010] RYZHKOV, P. ; PRASS, M. ; GUMMICH, M. ; KÜHN, J.-S. ; OETTMEIER, C. ; DÖBEREINER, H.-G.: Adhesion patterns in early cell spreading. In: *J Phys Condens Matter* 22 (2010), Nr. 19, S. 194106
- [Sackmann und Merkel 2010] SACKMANN, E. ; MERKEL, R.: *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH-Verlag, 2010 (Lehrbuch Physik)
- [Sackmann und Bruinsma 2002] SACKMANN, E. ; BRUINSMA, R. F.: Cell adhesion as wetting transition? In: *Chemphyschem* 3 (2002), Nr. 3, S. 262–269
- [Sarkar und Chaudhuri 1994] SARKAR, N. ; CHAUDHURI, B.: An efficient differential box-counting approach to compute fractal dimension of image. In: *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 24 (1994), Nr. 1, S. 115–120
- [Schaller 2001] SCHALLER, M. D.: Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. In: *Oncogene* 20 (2001), Nr. 44, S. 6459–6472
- [Schilling et al. 2004] SCHILLING, J. ; SENGUPTA, K. ; GOENNENWEIN, S. ; BAUSCH, A. R. ; SACKMANN, E.: Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. In: *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 69 (2004), Nr. 2 Pt 1, S. 021901–1 – 021901–9
- [Schindl et al. 1995] SCHINDL, M. ; WALLRAFF, E. ; DEUBZER, B. ; WITKE, W. ; GERISCH, G. ; SACKMANN, E.: Cell-substrate interactions and locomotion of Dictyostelium wild-type and mutants defective in three cytoskeletal proteins: a study using quantitative reflection interference contrast microscopy. In: *Biophys J* 68 (1995), Nr. 3, S. 1177–1190

- [Schmid-Schoenbein et al. 1975] SCHMID-SCHOENBEIN, G. W. ; FUNG, Y. C. ; ZWEIFACH, B. W.: Vascular endothelium-leukocyte interaction; sticking shear force in venules. In: *Circ Res* 36 (1975), Nr. 1, S. 173–184
- [Schmidt 2010] SCHMIDT, P. F.: *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. Bd. Kontakt und Studium, Band 444. Expert-Verlag GmbH, 2010
- [Schnekenburger et al. 2008] SCHNEKENBURGER, J. ; BREDEBUSCH, I. ; WOTTAWAH, F. ; GUCK, J. ; KAS, J. ; VONBALLY, G. ; KEMPER, B.: E-Cadherin dependent elasticity of pancreatic tumor cells detected by combined optical stretcher and digital holography Pancreas (Veranst.), 2008, S. 494–494
- [Schwarz et al. 2002] SCHWARZ, U. S. ; BALABAN, N. Q. ; RIVELINE, D. ; BERSHADSKY, A. ; GEIGER, B. ; SAFRAN, S. A.: Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. In: *Biophys J* 83 (2002), Nr. 3, S. 1380–1394
- [Sedivy und Mader 1997] SEDIVY, R. ; MADER, R. M.: Fractals, chaos, and cancer: do they coincide? In: *Cancer Invest* 15 (1997), Nr. 6, S. 601–607
- [Selhuber-Unkel et al. 2010] SELHUBER-UNKEL, C. ; ERDMANN, T. ; LÓPEZ-GARCÍA, M. ; KESSLER, H. ; SCHWARZ, U. S. ; SPATZ, J. P.: Cell adhesion strength is controlled by intermolecular spacing of adhesion receptors. In: *Biophys J* 98 (2010), Nr. 4, S. 543–551
- [Sengupta et al. 2006] SENGUPTA, K. ; ARANDA-ESPINOZA, H. ; SMITH, L. ; JANMEY, P. ; HAMMER, D.: Spreading of Neutrophils: From Activation to Migration. In: *Biophys J* 91 (2006), Nr. 12, S. 4638–4648
- [Shattil et al. 2010] SHATTIL, S. J. ; KIM, C. ; GINSBERG, M. H.: The final steps of integrin activation: the end game. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010), Nr. 4, S. 288–300
- [Shiba et al. 1989] SHIBA, Y. ; YAMADA, S. ; KANNO, Y.: Survival of 3T3-L1 cells induced by fibroblast growth factor depends on cell density and adhesion to the substratum. In: *Cell Struct Funct* 14 (1989), Nr. 4, S. 473–483
- [Shribak et al. 2002] SHRIBAK, M. ; INOUE, S. ; OLDENBOURG, R.: Polarization aberrations caused by differential transmission and phase shift in high-numerical-aperture lenses: theory, measurement, and rectification. In: *Optical Engineering* 41 (2002), Nr. 5, S. 943–954
- [Simon und Durrieu 2006] SIMON, A. ; DURRIEU, M.-C.: Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. In: *Micron* 37 (2006), Nr. 1, S. 1–13
- [Simson 1999] SIMSON, D.: *Entwicklung und Charakterisierung einer neuen mikromechanischen Methode zur Untersuchung der kraftinduzierten Dissoziation von einzelnen, spezifischen Bindungen zwischen Biomolekülen*. Utz, Wiss., 1999
- [Simson et al. 1996] SIMSON, R. ; ALBERSDÖRFER, A. ; SACKMANN, E.: Adhesion of Soft Biological Shells controlled by Bending Elasticity and Macromolecular Networks. In: *MRS Proceedings* 463 (1996), S. 3–13
- [Simson et al. 1998] SIMSON, R. ; WALLRAFF, E. ; FAIX, J. ; NIEWÖHNER, J. ; GERISCH, G. ; SACKMANN, E.: Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. In: *Biophys J* 74 (1998), Nr. 1, S. 514–522
- [Smith et al. 2008] SMITH, A.-S. ; SENGUPTA, K. ; GOENNENWEIN, S. ; SEIFERT, U. ; SACK-

- MANN, E.: Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), Nr. 19, S. 6906–6911
- [Smith Jr. et al. 1996] SMITH JR., T. ; LANGE, G. ; MARKS, W.: Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. In: *Journal of Neuroscience Methods* 69 (1996), Nr. 2, S. 123 – 136
- [Sokurenko et al. 2008] SOKURENKO, E. V. ; VOGEL, V. ; THOMAS, W. E.: Catch-bond mechanism of force-enhanced adhesion: counterintuitive, elusive, but ... widespread? In: *Cell Host Microbe* 4 (2008), Nr. 4, S. 314–323
- [Spatz et al. 1999] SPATZ, J. P. ; HERZOG, T. ; MÖSSMER, S. ; ZIEMANN, P. ; MÖLLER, M.: Micellar Inorganic-Polymer Hybrid Systems-A Tool for Nanolithography. In: *Advanced Materials* 11 (1999), Nr. 2, S. 149–153
- [Spatz et al. 2000] SPATZ, J. P. ; MÖSSMER, S. ; HARTMANN, C. ; MÖLLER, M. ; HERZOG, T. ; KRIEGER, M. ; BOYEN, H.-G. ; ZIEMANN, P. ; KABIUS, B.: Ordered Deposition of Inorganic Clusters from Micellar Block Copolymer Films. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 2, S. 407–415
- [Spatz et al. 1996] SPATZ, J. P. ; SHEIKO, S. ; MÖLLER, M.: Ion-Stabilized Block Copolymer Micelles: Film Formation and Intermicellar Interaction. In: *Macromolecules* 29 (1996), Nr. 9, S. 3220–3226
- [Squires und Quake 2005] SQUIRES, T. M. ; QUAKE, S. R.: Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. In: *Rev Mod Phys* 77 (2005), S. 977–1026
- [Staunton et al. 2009] STAUNTON, D. ; MILLARD, C. J. ; ARICESCU, A. R. ; CAMPBELL, I. D.: Preparation of recombinant fibronectin fragments for functional and structural studies. In: *Methods Mol Biol* 522 (2009), S. 73–99
- [Stoker et al. 1968] STOKER, M. ; O'NEILL, C. ; BERRYMAN, S. ; WAXMAN, V.: Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. In: *Int J Cancer* 3 (1968), Nr. 5, S. 683–693
- [Stoller et al. 2004] STOLLER, P. ; JACOBSEN, V. ; SEELIG, J. ; SANDOGHDAR, V.: Von der Einzelmolekülspektroskopie zur Verfolgung von Goldnanopartikeln - Particle Tracking. In: *Bulletin ETH Zürich* (2004), Nr. 295, S. 20–23
- [Taubenberger et al. 2007] TAUBENBERGER, A. ; CISNEROS, D. A. ; FRIEDRICH, J. ; PUECH, P.-H. ; MULLER, D. J. ; FRANZ, C. M.: Revealing early steps of alpha2beta1 integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy. In: *Mol Biol Cell* 18 (2007), Nr. 5, S. 1634–1644
- [Tennant 1999] TENNANT, D.: *Nanotechnology*. Kap. Limits of Conventional Lithography, S. 161–205. New York ; Berlin ; Heidelberg : Springer, 1999
- [Theodoly et al. 2010] THEODOLY, O. ; HUANG, Z.-H. ; VALIGNAT, M.-P.: New modeling of reflection interference contrast microscopy including polarization and numerical aperture effects: application to nanometric distance measurements and object profile reconstruction. In: *Langmuir* 26 (2010), Nr. 3, S. 1940–1948
- [Thoumine et al. 2000] THOUMINE, O. ; KOCIAN, P. ; KOTTELAT, A. ; MEISTER, J. J.: Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis. In: *Eur Biophys J* 29 (2000), Nr. 6, S. 398–408

- [Trichet et al. 2012] TRICHET, L. ; LE DIGABEL, J. ; HAWKINS, R. J. ; VEDULA, S. R. K. ; GUPTA, M. ; RIBRAULT, C. ; HERSEN, P. ; VOITURIEZ, R. ; LADOUX, B.: Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (2012), Nr. 18, S. 6933–6938
- [Truskey et al. 1992] TRUSKEY, G. A. ; BURMEISTER, J. S. ; GRAPA, E. ; REICHERT, W. M.: Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). II. Topographical mapping of relative cell/substratum separation distances. In: *J Cell Sci* 103 (Pt 2) (1992), S. 491–499
- [Truskey und Pirone 1990] TRUSKEY, G. A. ; PIRONE, J. S.: The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 24 (1990), Nr. 10, S. 1333–1353
- [Tözeren et al. 1992] TÖZEREN, A. ; SUNG, K. L. ; SUNG, L. A. ; DUSTIN, M. L. ; CHAN, P. Y. ; SPRINGER, T. A. ; CHIEN, S.: Micromanipulation of adhesion of a Jurkat cell to a planar bilayer membrane containing lymphocyte function-associated antigen 3 molecules. In: *J Cell Biol* 116 (1992), Nr. 4, S. 997–1006
- [Tzima et al. 2005] TZIMA, E. ; IRANI-TEHRANI, M. ; KIOSSES, W. B. ; DEJANA, E. ; SCHULTZ, D. A. ; ENGELHARDT, B. ; CAO, G. ; DELISSER, H. ; SCHWARTZ, M. A.: A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. In: *Nature* 437 (2005), Nr. 7057, S. 426–431
- [Uni-Stuttgart 2012] UNI-STUTT GART: *Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Primärelektronenstrahls mit der Substratoberfläche.* 2012. – URL <http://www.ipv.uni-stuttgart.de/forschung/messtechnik/REM.html#Theorie>
- [Usami et al. 1993] USAMI, S. ; CHEN, H. H. ; ZHAO, Y. ; CHIEN, S. ; SKALAK, R.: Design and construction of a linear shear stress flow chamber. In: *Ann Biomed Eng* 21 (1993), Nr. 1, S. 77–83
- [Valiokas 2012] VALIOKAS, R.: Nanobiochips. In: *Cell Mol Life Sci* 69 (2012), Nr. 3, S. 347–356
- [VandeVondele et al. 2003] VANDEVONDELE, S. ; VÖRÖS, J. ; HUBBELL, J. A.: RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. In: *Biotechnol Bioeng* 82 (2003), Nr. 7, S. 784–790
- [Vasilescu et al. 2012] VASILESCU, C. ; GIZA, D. E. ; PETRISOR, P. ; DOBRESCU, R. ; POPESCU, I. ; HERLEA, V.: Morphometrical differences between resectable and non-resectable pancreatic cancer: a fractal analysis. In: *Hepatogastroenterology* 59 (2012), Nr. 113, S. 284–288
- [Verschueren 1985] VERSCHUEREN, H.: Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications. In: *J Cell Sci* 75 (1985), Nr. 1, S. 279–301
- [Vilela et al. 1995] VILELA, M. J. ; MARTINS, M. L. ; BOSCHETTI, S. R.: Fractal patterns for cells in culture. In: *J Pathol* 177 (1995), Nr. 1, S. 103–107
- [Vogelmann et al. 1999] VOGELMANN, R. ; KREUSER, E. D. ; ADLER, G. ; LUTZ, M. P.: Integrin alpha6beta1 role in metastatic behavior of human pancreatic carcinoma cells. In: *Int J Cancer* 80 (1999), Nr. 5, S. 791–795
- [Vörös 2004] VÖRÖS, J.: The density and refractive index of adsorbing protein layers. In: *Biophys J* 87 (2004), Nr. 1, S. 553–561
- [Walter et al. 2006] WALTER, N. ; SELHUBER, C. ; KESSLER, H. ; SPATZ, J.: Cellular Unbin-

- ding Forces of Initial Adhesion Processes on Nanopatterned Surfaces Probed with Magnetic Tweezers. In: *Nano Letters* 6 (2006), S. 398–402
- [Wankhede et al. 2006] WANKHEDE, S. P. ; DU, Z. ; BERG, J. M. ; VAUGHN, M. W. ; DALLAS, T. ; CHENG, K. H. ; GOLLAHON, L.: Cell detachment model for an antibody-based microfluidic cancer screening system. In: *Biotechnol Prog* 22 (2006), Nr. 5, S. 1426–1433
- [Ward und Hammer 1993] WARD, M. D. ; HAMMER, D. A.: A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength. In: *Biophys J* 64 (1993), Nr. 3, S. 936–959
- [Wegener et al. 2001] WEGENER, J. ; JANSHOFF, A. ; STEINEM, C.: The quartz crystal microbalance as a novel means to study cell-substrate interactions in situ. In: *Cell Biochem Biophys* 34 (2001), Nr. 1, S. 121–151
- [Wegener et al. 2000] WEGENER, J. ; KEESE, C. R. ; GIAEVER, I.: Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. In: *Exp Cell Res* 259 (2000), Nr. 1, S. 158–166
- [West et al. 1999] WEST, G. B. ; BROWN, J. H. ; ENQUIST, B. J.: The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. In: *Science* 284 (1999), Nr. 5420, S. 1677–1679
- [Wiegand et al. 1998] WIEGAND, G. ; NEUMAIER, K. R. ; SACKMANN, E.: Microinterferometry: Three-Dimensional Reconstruction of Surface Microtopography for Thin-Film and Wetting Studies by Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM). In: *Appl Opt* 37 (1998), Nr. 29, S. 6892–6905
- [Wu et al. 1997] WU, Y. P. ; DE GROOT, P. G. ; SIXMA, J. J.: Shear-stress-induced detachment of blood platelets from various surfaces. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997), Nr. 11, S. 3202–3207
- [Xia und Whitesides 1998] XIA, Y. ; WHITESIDES, G. M.: Soft Lithography. In: *Angewandte Chemie International Edition* 37 (1998), Nr. 5, S. 550–575
- [Xing et al. 2011] XING, P. ; LI, J.-G. ; JIN, F. ; ZHAO, T.-T. ; LIU, Q. ; DONG, H.-T. ; WEI, X.-L.: Fascin, an actin-bundling protein, promotes breast cancer progression in vitro. In: *Cell Biochem Funct* 29 (2011), Nr. 4, S. 303–310
- [Xiong et al. 2001] XIONG, J. P. ; STEHLE, T. ; DIEFENBACH, B. ; ZHANG, R. ; DUNKER, R. ; SCOTT, D. L. ; JOACHIMIAK, A. ; GOODMAN, S. L. ; ARNAOUT, M. A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaV beta3. In: *Science* 294 (2001), Nr. 5541, S. 339–345
- [Xiong et al. 2002] XIONG, J.-P. ; STEHLE, T. ; ZHANG, R. ; JOACHIMIAK, A. ; FRECH, M. ; GOODMAN, S. L. ; ARNAOUT, M. A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaV beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. In: *Science* 296 (2002), Nr. 5565, S. 151–155
- [Yamashiro et al. 1998] YAMASHIRO, S. ; YAMAKITA, Y. ; ONO, S. ; MATSUMURA, F.: Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. In: *Mol Biol Cell* 9 (1998), Nr. 5, S. 993–1006
- [Young und Simmons 2010] YOUNG, E. W. K. ; SIMMONS, C. A.: Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. In: *Lab Chip* 10 (2010), Nr. 2, S. 143–160

- [Young et al. 2007] YOUNG, E. W. K. ; WHEELER, A. R. ; SIMMONS, C. A.: Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells in microfluidic channels. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 12, S. 1759–1766
- [Zalipsky und Harris 1997] ZALIPSKY, S. ; HARRIS, J. M.: *Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol)*. Kap. 2, S. 1–13. In: *Poly(ethylene glycol)*, 1997
- [Zamir et al. 2000] ZAMIR, E. ; KATZ, M. ; POSEN, Y. ; EREZ, N. ; YAMADA, K. M. ; KATZ, B. Z. ; LIN, S. ; LIN, D. C. ; BERSHADSKY, A. ; KAM, Z. ; GEIGER, B.: Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. In: *Nat Cell Biol* 2 (2000), Nr. 4, S. 191–196
- [Zamir 2001] ZAMIR, M.: Fractal dimensions and multifractality in vascular branching. In: *J Theor Biol* 212 (2001), Nr. 2, S. 183–190
- [Zhang et al. 2006] ZHANG, L. ; LIU, J. Z. ; DEAN, D. ; SAHGAL, V. ; YUE, G. H.: A three-dimensional fractal analysis method for quantifying white matter structure in human brain. In: *J Neurosci Methods* 150 (2006), Nr. 2, S. 242–253
- [Zilker und Sackmann 1987] ZILKER, H. ; SACKMANN, E.: Dynamic reflection interference contrast (RIC-) microscopy : a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. In: *Journal de Physique* 48 (1987), Nr. 12, S. 2139–2151
- [Zöllner 2010] ZÖLLNER, M.: Zellinvasion und Metastasierung. In: HIDDENMANN, W. (Hrsg.) ; BARTRAM, C. R. (Hrsg.): *Die Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2010, S. 308–324

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei all denjenigen bedanken, die zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein allererster Dank geht an Prof. Dr. Joachim Spatz, der mir die Möglichkeit gab ein so spannendes und interdisziplinäres Projekt zu bearbeiten. Ich hatte alle Freiheiten in der Behandlung des Themas und konnte die in der Gruppe vorhandenen, hervorragenden Arbeitsbedingungen nutzen.

Bei Prof. Dr. Rainer Fink bedanke ich mich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls geht mein Dank an Prof. Dr. Ulrich Schwarz und Prof. Dr. Dirk Dubbers für die Bereitschaft als Prüfer zu fungieren.

Bei Dr. Vera Hirschfeld-Warneken möchte ich mich für die tolle Betreuung über die gesamte Zeit bedanken. Für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, ihre vielen unterstützenden Inputs, die meine Arbeit maßgeblich voran getrieben haben und für die freundschaftliche Zusammenarbeit bin ich ihr sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön geht an die Projektpartner des Cell@Nano Projektes, für die vielen lehrreichen Diskussionen und die Bereitstellung der Zelllinien.

Timo Maier möchte ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit beim Aufbau des RIKM/OT-Setups danken. Durch seine verrückte aber liebenswerte Art ist er zu einem richtigen Freund geworden.

Bei Dr. Tamás Haraszti bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft bei computertechnischen und physikalischen Fragen. Ihm und Timo danke ich auch für die Programmierung der Steuerungssoftware für die Kameras und des Objektisches.

Herrn Jehle danke ich für die Konstruktion der Inkubationskammer des Mikroskops und den Mitarbeitern aus der Werkstatt, für die Fertigstellung der Kammer und für die Anfertigung verschiedener Bauteile für den Mikroskopaufbau. Auch den Elektronikexperten Herrn Meusch und Herr Jeschka danke ich für die Hilfe.

Für die zuverlässige Unterstützung bei administrativen Angelegenheiten möchte ich mich bei Frau Ulshöfer, Frau Hess und Frau Pfeilmeier bedanken.

Unserer Seele der Zellkultur Sigrid Riese danke ich sehr herzlich für ihre Unterstützung und die Organisation des Laboralltags, sowie Ling Cheng für Übernahmen organisatorischer Laborangelegenheiten.

Dr. Peter Kaiser danke ich, dass er mich in das Projekt eingeführt hat und mir die Laborarbeit am MPI in Stuttgart gezeigt hat.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Amin Rustom, der mich für die Idee des „Biogenerators“

begeisterte und mich in diesem Nebenprojekt betreute.

Herzlichen Dank gilt Dr. Theresa Pohl, Dr. Rebecca Medda, Dr. Mercedes Dragovits, Timo Maier und Martin Streichfuss, die mir bei chemischen, biologischen oder physikalischen Fragen immer zur Seite standen.

Der ganzen Arbeitsgruppe Spatz danke ich für die gute gemeinsame Zeit, die wir während der Arbeitszeit oder bei verschiedenen Gruppenseminaren hatten. Dem „Kochclub“ des Kaffeezimmers möchte ich dabei besonders erwähnen, da mit ihm die Mittagspausen lustig, schön und kulinarisch wurden.

Ich danke all meinen jetzigen und früheren Bürokolleginnen für die schöne Zeit und die angenehme Atmosphäre im „Mädchenbüro“.

Ich danke allen, die Teile dieser Arbeit Korrektur gelesen haben.

Abschließend möchte ich meinem Freund Frank herzlich danken, der immer für mich da war und mich gerade in den letzten Monaten der Arbeit immer wieder moralisch unterstützt und aufgebaut hat.

Ein ganz großer Dank gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mich immerwährend unterstützten und mir Rückhalt auf meinem Weg boten. Danke!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Katharina Klein, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe, und dass alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht wurden.

Heidelberg, September 2012

Unterschrift