

Reflektometrische Methoden zur Charakterisierung der Zelladsorption auf Oberflächen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Johanna Hutterer
aus Ebersberg

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

20.12.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Ralf Kemkemer

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz für das Thema dieser Arbeit, seine beständige Unterstützung, sein Engagement im Promotionskolleg, seine Offenheit, Ehrlichkeit und Geduld, sein unermüdliches Interesse und die vielen Anregungen, Ideen und Gespräche. Ich bedanke mich auch für das Vertrauen, das er meinen Fähigkeiten entgegen gebracht hat und die Möglichkeit diese weiter zu entwickeln. Zudem bedanke ich mich für die vielen Gelegenheiten, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Veranstaltungen präsentieren zu dürfen.

Allen Mitarbeitern im Arbeitskreis Gauglitz danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Allen Hilfswissenschaftlern und Studenten im Arbeitskreis danke ich für die engagierte und zuverlässige Unterstützung verschiedener Projekte. Besonderer Dank gilt Dr. Peter Fechner und Dr. Günther Proll für das Engagement für eine SCORE-Anlage, Diplom-Chemiker Johannes Riedt für seine Geduld und Jochen Mehne für seine wertvollen instrumentellen Tipps.

Den Mitgliedern des Promotionskollegs danke ich für eine schöne, interessante und lehrreiche Zusammenarbeit. Herrn Prof. Ralf Kemkemer danke ich für seine Arbeit als mein Zweitbetreuer, sowie seine stetige Unterstützung und seinen hilfreichen Anmerkungen zu meiner Arbeit. Ich bedanke mich bei Prof. Ralf Kemkemer und seinem Arbeitskreis zudem für die Möglichkeit, ein Zellkulturlabor mit nutzen zu dürfen. Besonderer Dank gilt hier Dipl.-Ing. Kiriaki Athanasopulu und M.Sc. Kerstin Frey für die Vor-Ort Unterstützung beim Arbeiten mit Zellen. Herrn Prof. Dr. Tilman E. Schäffer und seinem Arbeitskreis danke ich ebenfalls für die Möglichkeit ein Zellkulturlabor mit nutzen zu dürfen. Besonderer Dank gilt auch den Kollegen des Promotionskollegs M.Ing Ivana Mirsc, M.Sc Achim Junginger und M.Sc Ruben Daum für die spannende, freudvolle und fruchtbare Zusammenarbeit.

Auch Herrn Prof. Alexander N.R. Weber, PhD, seinem Arbeitskreis, sowie dem Interfakultäres Institut für Zellbiologie (IFIZ, Tübingen) danke ich für die Möglichkeit ein Zellkulturlabor mit nutzen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei der BioCopy AG für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit durch die Leihgabe einer SCORE-Anlage.

All jenen, die mir auf privater Seite zur Seite standen – meiner Familie und meinen Freunden – möchte ich meinen tiefen Dank dafür aussprechen, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich darin unterstützt haben, alle Seiten von mir zu leben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Theorie	5
2.1	Optische Grundlagen	5
2.1.1	Optische Grundbegriffe	5
2.1.2	Reflexion und Transmission an Grenzflächen	6
2.1.3	Interferenz an einer dünnen Schicht	7
2.1.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	11
2.1.5	Einwellenlängenreflektometrie	13
2.1.6	Fluoreszenz	15
2.1.7	Fluoreszenzmikroskopie	15
2.2	Kinetik und Gleichgewicht an Grenzflächen	16
2.2.1	Kinetik und Gleichgewicht von Reaktionen pseudoerster Ordnung	16
2.2.2	Kinetische Betrachtung mittels EvilFit	21
2.3	Dynamik der Zelladhäsion	23
3	Methoden und Materialien	27
3.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie der Zelladsorption	27
3.1.1	Vorbereitung der Interferenzgläser	27
3.1.2	Kultivierung der menschlichen embryonalen Nierenzellen	27
3.1.3	Reflektometrische Interferenzspektroskopie Messungen	28
3.1.4	Auswertung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie-Messungen	30
3.2	Einwellenlängenreflektometrie der Zelladsorption	32
3.2.1	Vorbereitung der Glas-Slides	32
3.2.2	Kultivierung der Maus-Endothel-Fibroblasten	33
3.2.3	Einwellenlängenreflektometrische Messungen	34
3.2.4	Bildauswertung in der Einwellenlängenreflektometrie	36
3.3	Zellfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	38
3.3.1	Durchführung	38
3.3.2	Auswertung der Mikroskopiebilder	38
3.4	Kinetische Untersuchung der Zelladsorption	39

3.4.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie-Messungen und Auswertung	39
3.4.2	Einwellenlängenreflektometrische Messungen und Auswertung .	40
3.5	Statistische Auswertung	42
4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie der Zelladsorption	43
4.1.1	Zelladsorption auf Proteine gemessen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie	43
4.1.2	Langzeitmessung der Zelladsorption mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie	48
4.1.3	Machbarkeitsstudie zur kinetischer Auswertung der Zelladsorptionsmessungen	49
4.1.4	Vorüberlegungen zum Messen bei einer Wellenlänge	54
4.2	Einwellenlängenreflektometrie der Zelladsorption	59
4.2.1	Zelladsorption auf Proteine gemessen mit Einwellenlängenreflektometrie	59
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie adhärenter Zellen	61
4.2.3	Validierung und Bewertung der Einwellenlängenreflektometrie für Zelladsorption	63
4.2.4	Charakteristiken der Zell-Protein-Interaktion	64
4.2.5	Reproduzierbarkeit und Variation der Ergebnisse der Einwellenlängenreflektometrie für Zelladsorption	66
4.2.6	Beobachtung morphologischer Veränderungen der adhärenten Zellen mittels Einwellenlängenreflektometrie	68
4.2.7	Machbarkeitsstudie zur kombinierten Untersuchung der Adhäsionskräfte von Zellen auf Oberflächen	75
4.3	Kinetik der Zelladsorption	77
4.3.1	Einwellenlängenreflektometrie für kinetische Untersuchungen der Zelladsorption	78
4.3.2	Auswertung nach einem Modell der Kinetik pseudoerster Ordnung	82
4.3.3	Verwendung des EvilFits zur Berechnung kinetischer Parameter	101
4.3.4	Dynamik der Zelladhäsion	108
5	Zusammenfassung und Ausblick	113
6	Anhang	129
6.1	Ergebnisse der Berechnung kinetischer Parameter	129
6.2	Abkürzungen	142
6.3	Publikationen	143

6.3.1	Publikationen	143
6.3.2	Vorträge	144
6.3.3	Poster	144

1 EINLEITUNG

Die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung spielt eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl ständig ablaufender Prozesse in lebenden Organismen. Die Adsorption an und die Interaktion der Zellen mit der extrazelluläre Matrix sind essenziell für das Überleben, die Teilung, die Fortbewegung und die Differenzierung der Zellen. Kommt es zu Fehlern bei der Regulierung dieser komplexen Vorgänge, ist eine pathophysiologische Veränderung des Gewebes und des Verhaltens von Zellen die Folge. Mögliche daraus resultierende Krankheiten sind verschiedene Formen von Fibrosen, Kardiomyopathie, Arteriosklerose, entzündliche Krankheiten, Krebserkrankungen und Autoimmunerkrankungen [1].

Das Verständnis der komplexen Vorgänge der Adsorption und Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung sind zudem zentral für die Entwicklung erfolgreicher Implantate [2]. Wird ein Fremdkörper in den menschlichen Körper eingebracht, antwortet dieser mit einer Fremdkörperreaktion (Abb. 1.1). In den ersten Millisekunden bis Sekunden kommt das Implantat mit den Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe und Speichel in Kontakt. In dieser Zeit adsorbieren Proteine und andere Bestandteile der Körperflüssigkeiten an die Oberfläche des Implantates. Daraufhin kommt es zur Aggregation von Thrombozyten an der Implantatoberfläche. Eine sogenannte provisorische Matrix entsteht. Während der akuten Entzündungsphase ist das Komplementsystem des Immunsystems aktiviert und Granulozyten, Monozyten und Makrophagen werden über Chemotaxis von der Wunde angezogen. Granulozyten und Makrophagen interagieren mit der Oberfläche während Monozyten nach der Adsorption an die Oberfläche zu Makrophagen differenzieren. Nach circa 1 Woche kommt es während der chronischen Entzündungsphase vermehrt zum Entstehen von Riesenzellen – der Fusion mehrerer Makrophagen – um eine Versiegelung des fremden Materials zu erreichen, da dieses vom Körper nicht abgebaut werden kann. Im weiteren Verlauf der Wundheilung wird das Implantat von Fibroblasten fibrös verkapselt. Das so neu entstandene Gewebe wird vaskularisiert und falls während dieses Prozesses keine Komplikationen aufgetreten sind, ist das Implantat vom Körper angenommen worden.

Große Anstrengungen werden aufgebracht, um biokompatible und bioaktive Implantatoberflächen zu entwickeln. Durch das Provozieren spezifischer Zellantworten wird eine Verbesserung der Funktionalität und Qualität sowie eine Verringerung von Komplikationen erwartet. Zu Beginn haben Forscher in diesem Forschungsfeld versucht, allgemein gültige Lösungen zur Verbesserung der Biokompatibilität von Implan-

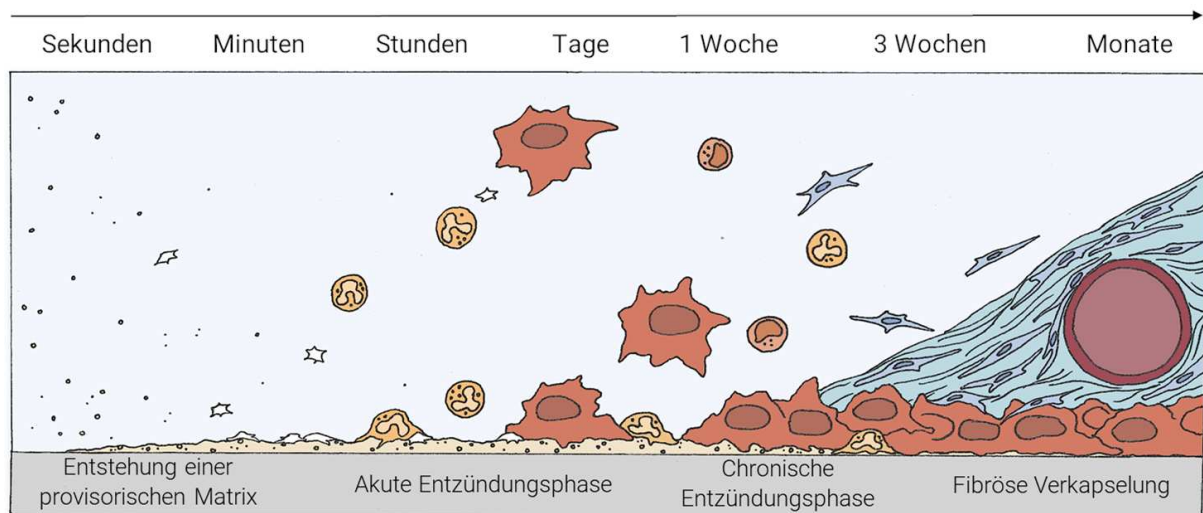


Abbildung 1.1: Fremdkörperreaktion an Implantatoberflächen. Zu Beginn adsorbieren Proteine und andere Bestandteile der Körperflüssigkeiten sowie Thrombozyten an die Oberfläche. Eine provisorische Matrix entsteht. Während der akuten Entzündungsphase ist das Komplementsystem des Immunsystems aktiv und verschiedene Leukozyten interagieren mit der Oberfläche. Es kommt zur Entstehung von Riesenzellen durch die Fusion mehrerer Makrophagen und das Implantat wird damit versiegelt. Das Implantat wird von Fibroblasten verkapselt und das so neu entstandene Gewebe vaskularisiert.

tatmaterialien zu finden [3]. Mit dem Fortschreiten der Forschung wurde jedoch immer deutlicher, dass für die unterschiedlichen Funktionen und Anwendungsbereiche der Implantate genau angepasste Lösungen gefunden werden müssen. Dies erfordert wiederum die Beurteilung der Einflussfaktoren auf die Zellantwort für jede Implantatfunktion und jeden Anwendungsbereich.

Die Eigenschaften von Implantate werden durch die Geometrie des Implantates und damit einhergehende Flussdynamiken bei Implantaten beispielsweise im Herz-Kreislauf-System, durch die Oberflächenrauheit und Mikro- und Nanostrukturierung und anderen mechanischen Eigenschaften wie der Steifigkeit oder Viskoelastizität des Materials beeinflusst. Auch chemische Eigenschaften der Implantatoberfläche wie die Hydrophobizität oder die chemische Funktionalisierung der Oberfläche [4] durch die Beschichtung des Implantates mit einem anderen Material oder die Positionierung von bioaktiven Substanzen [5, 6] beeinflussen die Eigenschaften von Implantaten ausschlaggebend (Abb. 1.2).

Die Adsorption von Proteinen und anderen Bestandteilen von Körperflüssigkeiten im ersten Schritt der Fremdkörperreaktion an Implantaten kann durch die Anpassung der Hydrophobizität der Oberfläche reguliert werden. Diese Beeinflussung der initialen Proteinadsorption kann starke Auswirkungen auf das spätere Zellverhalten der adhären Zellen an der Oberfläche haben [7–9]. Auch die Beschichtung der Implantatoberfläche mit einem anderen Material dient oft dazu, die Adsorption von unerwünschten Proteinen oder anderen Substanzen zu verhindern. Um Oberflächen zu

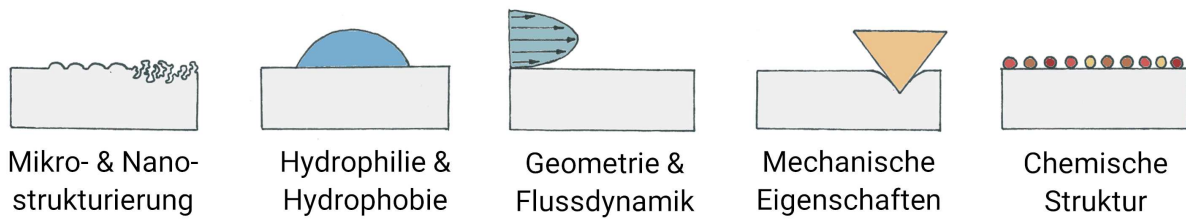


Abbildung 1.2: Übersicht über mögliche Einflussfaktoren auf die Eigenschaften von Implantaten. Mechanische und Geometrische Eigenschaften wie auch die Oberflächenstrukturierung und chemische Eigenschaften wie die Hydrophilizität und die Funktionalisierung der Oberfläche haben Einfluss auf die Eigenschaften und Funktion von Implantaten.

passivieren, werden oft Hydroxylapatit-Beschichtungen, Metalloxide oder Polyethylenglykol verwendet [10–12]. Diese Ansätze der Oberflächenmodifizierung sind vergleichsweise unspezifisch. Spezifisches Hervorrufen von bestimmten Reaktionen der Zellen an der Oberfläche kann hingegen durch die Beschichtung mit bioaktiven Substanzen erreicht werden [6, 13, 14]. Um die Adhäsion von spezifischen Zelltypen zu unterstützen, werden oft Proteine und Peptide, die in der extrazellulären Matrix vorkommen, genutzt. Während die Eigenschaften und die Einflüsse auf das Zellverhalten bei einigen Proteinen umfangreich untersucht wurden, wurde anderen Proteinen in der Forschung bisher weniger Aufmerksamkeit zuteil [15].

Um ein fundiertes Verständnis der Vorgänge während der Adsorption von Proteinen, Zellen und anderen Bestandteilen im Zuge der Fremdkörperreaktion an Implantatoberflächen zu generieren, müssen diese Prozesse beobachtbar und quantifizierbar gemacht werden. Dies ist die Grundlage zur schnellen und vielseitigen Entwicklung von optimierten Implantaten je nach Wirkungsort und Funktion. Die Untersuchung der verschiedenen Einflussfaktoren der Oberflächenbeschaffenheit eines Implantates auf das Zellverhalten ist jedoch ein komplexer und zeitaufwändiger Prozess.

Eine Vielzahl von analytischen Methoden steht zur Verfügung, um die Adsorption von Zellen an Oberflächen zu untersuchen. Beispielhaft sollen hier optische Mikroskopie, direkte optische Sensoren, Impedanzspektroskopie, Quarzkristall-Mikrowaagen-Sensoren und elektrochemische Sensoren genannt werden. All diese Methoden haben Vor- und Nachteile, was sie unterschiedlich geeignet für unterschiedliche Fragestellungen in diesem Forschungsfeld macht. Viele weit verbreitete Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie erlauben oft nur die Untersuchung von Momentaufnahmen – wenn beispielsweise Zellen für die Untersuchung zuvor fixiert wurden – und nutzen Markermoleküle, um bestimmte Strukturen sichtbar zu machen. Beim Einsatz von Markermolekülen muss jedoch immer auch damit gerechnet werden, dass diese mit den zu beobachtenden Prozessen interagieren und Ergebnisse verzerren können. Direkte optische Methoden, die einen Verzicht auf Markermoleküle erlauben, werden mehr und

mehr auch für die Entwicklung von zellbasierten Sensoren herangezogen und konnten sich als Methode zur Gewinnung nützlicher Informationen zur Zelladsorption bewähren [16–20]. In den meisten Fällen können mit ihnen auch Messungen mit einer hohen zeitlichen Auflösung aufgenommen und Zellen während der Adsorption an Oberflächen ungestört beobachtet werden. Vor allem photonische Kristalle [21], bildgebende Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) [22], und Gitterkoppler [23] wurden verwendet, um die Zelladhäsion oder Interaktion der Zellen mit der Oberfläche zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist, diesem Set an Methoden eine weitere hinzuzufügen und damit dazu beizutragen, aktuelle Schwierigkeiten mit diesen Methoden bei der Untersuchung von Zelladsorption auf Fremdkörper zu überwinden. Eine sehr attraktive direkte optische Messmethode ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS). Sie zeichnet sich im Vergleich zu anderen direkten optischen Methoden dadurch aus, dass das Messsignal kaum bis gar nicht von der Umgebungstemperatur abhängt und dass die Eindringtiefe des zur Auswertung verwendeten Lichtes vergleichsweise groß ist. Zudem wurde diese Methode bereits erfolgreich verwendet, um Zellverhalten an Oberflächen zu untersuchen [24–28]. Teil dieser Arbeit ist es, die RIfS auf ihre Möglichkeiten und Grenzen zur Erforschung der Zelladsorption auf Oberflächen hin zu bewerten. Zudem wird eine weitere Methode – die Einwellenlängenreflektometrie (single colour reflectometry (SCORE) oder imaging reflectometric interferometry (iRIf) oder 1-lambda reflectometry), eine Weiterentwicklung der RIfS – zum ersten Mal für das Untersuchen von Zellen an Oberflächen herangezogen. In diesem Kapitel wird diese Methode mit einer klassischen bildgebenden Methode verglichen, die Reproduzierbarkeit der Messungen bewertet und die gewonnenen Daten auf unterschiedliche Art und Weise betrachtet, was zu faszinierenden, erkenntnisreiche und umfassende Ergebnissen geführt hat. Auch die kombinierte Untersuchung von SCORE mit einer Methode zur Messung der Adhäsionskraft, wird in einem Proof-of-Principle Versuchsaufbau gezeigt. Da der kinetischen Untersuchung der Zelladsorption immer mehr Interesse entgegen gebracht wird, wurde in dieser Arbeit die Machbarkeit der kinetischen Untersuchung der Zelladsorption über diese beiden Methoden bewertet. Verschiedene kinetische Modelle wurden für die Auswertung herangezogen. Die Ergebnisse, Grenzen, Vor- und Nachteile der kinetischen Modelle bei dem vorliegenden Datensatz werden dargestellt und diskutiert. Zuletzt wird auch auf die Dynamik der Zelladhäsion eingegangen und Ergebnisse hierzu werden vorgestellt. Damit liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Lösungsfindung aktueller Probleme bei der Untersuchung von Zelladhäsion und der Bewertung der Nützlichkeit der RIfS und der SCORE, sowie verschiedener kinetischen Modelle für die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Zellen auf Oberflächen.

2 THEORIE

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Begriffe, Modelle und Methoden erklärt, die das Verständnis der Arbeit erleichtern sollen.

2.1 OPTISCHE GRUNDLAGEN

2.1.1 Optische Grundbegriffe

Da die verwendeten Methoden einige Effekte ausnutzen, die zwischen Materie und Licht auftreten, wird hier ein Überblick über relevante Grundbegriffe gegeben.

Als elektromagnetische Strahlung wird das Phänomen der Ausbreitung von Energie in Form von Wellen mit einem elektrischen und magnetischen Feldvektor bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Transversalwellen, deren elektrischer und magnetischer Feldvektor senkrecht aufeinander stehen und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes schwingen. Elektromagnetische Wellen breiten sich in Vakuum mit der Lichtgeschwindigkeit c_0 aus:

$$c_0 = f \cdot \lambda \quad (2.1)$$

λ steht für die Wellenlänge des Lichtes und f für die Frequenz des Lichtes. Die Lichtgeschwindigkeit c_0 in Vakuum ist eine Naturkonstante. In anderen Medien breitet sich elektromagnetische Strahlung langsamer – mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit c – aus. Das Verhältnis dieser beiden Geschwindigkeiten wird durch eine stoffspezifische Konstante des Mediums, dem Brechungsindex n , beschrieben:

$$n = \frac{c_0}{c} \quad (2.2)$$

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Medium, kann es zudem auch zur Absorption und damit einer Dämpfung der Welle im Medium kommen. Der Brechungsindex wird dann als komplexe Zahl dargestellt:

$$n = n_r - i \cdot \kappa \quad (2.3)$$

Hier ist der Imaginärteil κ proportional zum Absorptionskoeffizienten des Dielektrikum. Für transparente, farblose Stoffe ist der Absorptionskoeffizient im sichtbaren Bereich des Lichtes sehr klein und damit wird oft vereinfacht $n = n_r$ angenommen.

Sowohl der Realteil als auch der Imaginärteil des Brechungsindex sind von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes abhängig.

2.1.2 Reflexion und Transmission an Grenzflächen

Beim Übergang der elektromagnetischen Wellen von einem Medium in ein Medium mit unterschiedlichem Brechungsindex, bleibt die Frequenz des Lichtes erhalten. Es ändert sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit c und somit die Wellenlänge wie auch die Amplitude des Lichtes. Bei der Interaktion des Lichtes mit Materie kann das Licht transmittiert, reflektiert und absorbiert werden. Da in dieser Arbeit mit weitestgehend transparenten Materialien gearbeitet wurde, wird auf Absorptionseffekte nicht weiter eingegangen und nur die Transmission und Reflexion elektromagnetischer Wellen genauer betrachtet. Für die Reflexion gilt, dass der Einfallswinkel θ_i dem Ausfallwinkel θ_r des Lichtes entspricht [29]:

$$\theta_i = \theta_r \quad (2.4)$$

Der Anteil des reflektierten Lichtes im Vergleich zum eingestrahnten Licht, kann über den Reflexionskoeffizienten $R(\lambda)$ abgeschätzt werden. Im Falle senkrecht einfallenden Lichtes an einer Phasengrenze zweier unendlicher Halbräume mit dem Brechungsindex $n(\lambda)_1$ und $n(\lambda)_2$ gilt:

$$R(\lambda) = \left(\frac{n(\lambda)_1 - n(\lambda)_2}{n(\lambda)_1 + n(\lambda)_2} \right)^2 \quad (2.5)$$

Aus Gleichung (2.5) folgt ein Reflexionskoeffizient von circa 4 % an einer Grenzschicht zwischen Glas und Luft und von etwa 1 % an einer Grenzschicht zwischen Glas und Wasser. Werden wässrige Proben vermessen, stehen für die Analyse des reflektierten Lichtes nur wenige % des eingestrahnten Lichtes zur Verfügung. Damit werden bei Messmethoden die auf der Untersuchung reflektierten Lichtes beruhen oft hohe Anforderungen an die Detektivität der Messgeräte gestellt.

Im Falle der Transmission gilt für die Winkel der einfallenden (θ_i) und transmittierten (θ_t) Strahlen zur Flächennormalen nach dem Brechungsgesetz nach Snellius [29]:

$$n_1 \cdot \theta_i = n_2 \cdot \theta_t \quad (2.6)$$

Damit wird beim Übergang der elektromagnetischen Welle vom optisch weniger dichten Medium – dem Medium mit kleinerem n – ins optisch dichtere Medium, diese zur Normalen auf der Grenzfläche – dem Einfallslot – hin gebrochen. Tritt die elektromagnetische Welle vom optisch dichteren ins optisch weniger dichte Medium ein, wird sie dagegen vom Einfallslot weg gebrochen.

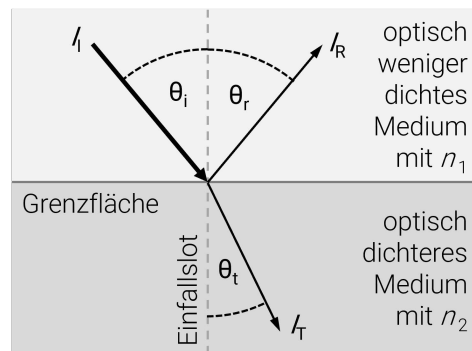


Abbildung 2.1: Reflexion und Brechung. Trifft ein Lichtstrahl I_I auf eine Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher optischer Dichte, wird ein Teil des Strahles reflektiert (I_R). Ein anderer Teil des Lichtes dringt in das Medium ein – wird transmittiert – (I_T) und dabei gebrochen. Der Ausfallwinkel des reflektierten Strahles θ_r entspricht dabei dem Einfallswinkel θ_i . Das Brechungsgesetz von Snellius beschreibt die Richtungsänderung der elektromagnetischen Welle beim Eintritt in ein anderes Medium (θ_i) in Abhängigkeit der Brechungsindizes der beteiligten Medien. Gezeigt ist die Projektion der Strahlen einer der zur Einfallsebene senkrecht polarisierten elektromagnetischen Welle.

2.1.3 Interferenz an einer dünnen Schicht

Besteht das System, auf welches das Licht eingestrahlt wird, aus einer oder mehreren Schichten, wird das Licht in den meisten Fällen an jeder Grenzfläche teilweise reflektiert und transmittiert (Abb. 2.2). Weitere Einflüsse auf die Lichtintensität $I(\lambda)$ durch Absorption oder Beugung sollen hier in erster Näherung vernachlässigt und stattdessen ideal transparente Materialien angenommen werden.

Nach Gleichung (2.5) ist die Intensität der reflektierten Teilstrahlen abhängig von den Brechungsindizes der beteiligten Materialien. Da die Intensitäten der mehrfach reflektierten Teilstrahlen oft sehr gering sind (wenige Prozent oder Promille der ursprünglichen Intensität) können diese in vielen Fällen vernachlässigt werden.

Ist das Schichtsystem hinreichend dünn, interferieren die reflektierten Teilstrahlen und ergeben eine resultierende reflektierte Welle. Dünnes Schichtsystem bedeutet in diesem Zusammenhang eine Schichtdicke d im Bereich der Kohärenzlänge des eingestrahlt Lichtes – bei Weißlicht wenige μm [30]. Die zweite reflektierte Welle (an der Phasengrenze n_2 - n_3) hat im Vergleich zur ersten reflektierten Welle (an der Phasengrenze n_1 - n_2) einen längeren Weg, der zweifachen optischen Dicke $2n_2d$ des Mediums 2, durchlaufen. Bei der Überlagerung dieser beiden Teilstrahlen, kommt es in Abhängigkeit von der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung und des Gangunterschieds (also der optischen Dicke des Mediums 2) zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz. Dies zeigt sich in der Intensität der resultierenden reflektierten Welle. Die Abhängigkeit der destruktiven und konstruktiven Interferenz der Teilstrahlen von λ des Lichtes führt dazu, dass das zu Beginn eingestrahlte weiße Licht nun farbig wahrgenommen werden kann. So entsteht aufgrund der Überlagerung der reflektierten Teil-

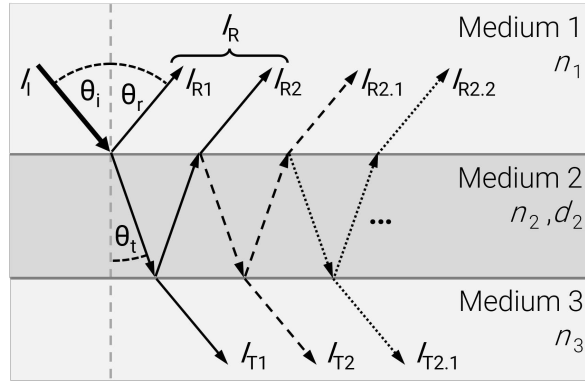


Abbildung 2.2: Lichtinterferenz an einer dünnen Schicht. Licht wird mit einer Intensität I_I auf das Schichtsystem eingestrahlt. Das Licht wird an jeder Phasengrenze (zwischen Medium 1, n_1 und Medium 2, n_2, d_2 und zwischen Medium 2, n_2, d_2 und Medium 3, n_3) teilweise transmittiert ($I_{T1}, I_{T2}, I_{T2.1}$) und teilweise reflektiert ($I_{R1}, I_{R2}, I_{R2.1}, I_{R2.2}$). Die Intensität der Lichtstrahlen ist abhängig von der Wellenlänge λ . Die reflektierten Teilstrahlen I_{R1} und I_{R2} überlagern sich und ergeben I_R .

strahlen ein Interferenzspektrum. Im Alltag kann man diesen Effekt beim Farbenspiel eines dünnen Ölfilms auf einer Pfütze oder einer Seifenblase beobachten. Wird Licht bei nur einer Wellenlänge auf die dünne Schicht eingestrahlt, ist die Intensität der resultierenden reflektierten Welle von der optischen Schichtdicke des Medium 2 $n_2 d_2$ abhängig.

Unter senkrechtem Einfall des Lichtes und unter der Annahme, dass nur eine Interferenzschicht beteiligt ist und keine Phasensprünge an den Phasengrenzen auftreten, kann die resultierende Intensität I_R der überlagerten reflektierten Teilstrahlen I_{R1} und I_{R2} durch

$$I_R = I_{R1} + I_{R2} + 2\sqrt{I_{R1} \cdot I_{R2}} \cdot \cos \frac{4\pi(n \cdot d)}{\lambda} \quad (2.7)$$

beschrieben werden. Die mittlere Intensität, um die sich das Interferenzspektrum ausbildet, ist durch den Term $I_{R1} + I_{R2}$ gegeben. Daher wird die Intensität des reflektierten Lichtes durch die Reflexionskoeffizienten der beteiligten Schichtübergänge nach Gleichung (2.5) beeinflusst. Das Interferenzglied der Gleichung (2.7) – der Term $2\sqrt{I_{R1} \cdot I_{R2}} \cdot \cos \frac{4\pi(n \cdot d)}{\lambda}$ – beschreibt die Form des Interferenzspektrums. Für die maximale bzw. minimale Lichtintensität im Interferenzspektrum I_{max} bzw. I_{min} wird der Kosinusterm $\cos \frac{4\pi(n \cdot d)}{\lambda}$ zu 1 bzw. -1. Daher ergibt sich der Signalhub $I_{max} - I_{min}$ zu:

$$I_{max} - I_{min} = 4\sqrt{I_{R1} \cdot I_{R2}} \quad (2.8)$$

Damit hängt der Signalhub vom geometrischen Mittel der Intensität der reflektierten Teilstrahlen ab.

Trägt man die Intensität des an einer dünnen Schicht teilweise reflektierten Lichtes über die Wellenlänge auf, so erkennt man die typische Form einer $\cos(\frac{1}{x})$ -Funktion des Interferenzspektrums (Abb. 2.3). Trägt man die Intensität über die Wellenzahl ν , dem

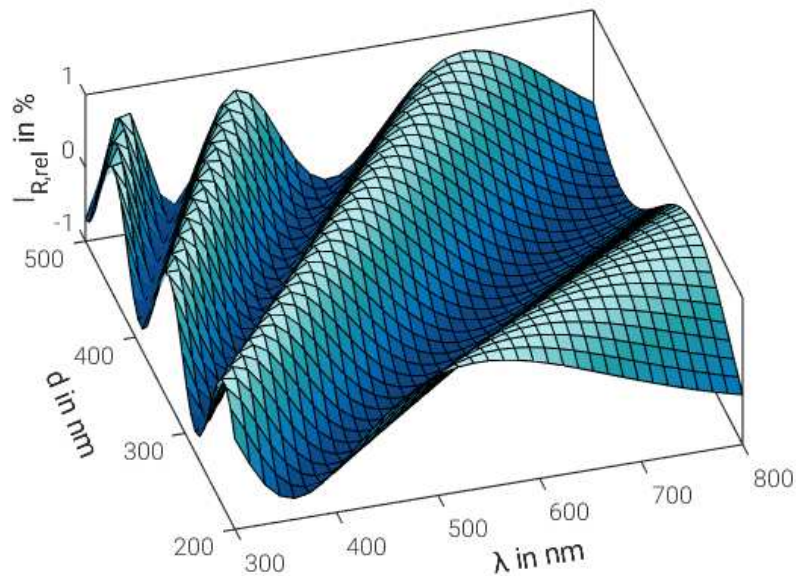


Abbildung 2.3: Interferenzspektrum bei unterschiedlicher Schichtdicke. Simulierte Interferenzspektren nach Gleichung (2.7) im Wellenlängenbereich λ von 300 nm bis 800 nm und der Schichtdicke der Interferenzschicht d_2 (Medium 2) zwischen 200 nm und 500 nm. Für die Intensitäten der reflektierten Teilstrahlen I_{R1} und I_{R2} wurde ein Wert von 0,36 % der eingestrahlten Intensität I_I und für den Brechungsindex n_2 ein Wert von 1,35 angenommen.

Kehrwert der Wellenlänge auf, so ergibt sich eine $\cos(x)$ -Funktion. Dies kann für die Analyse des Spektrums von Vorteil sein, da durch die Symmetrie der Funktion u.a. die Bestimmung eines Extrempunktes erleichtert wird.

In Abb. 2.3 ist deutlich erkennbar, dass das Interferenzspektrum bei dünneren Schichten weiter „gestreckt“ ist, als bei dickeren Schichten. In vielen optischen Messmethoden ist die Veränderung des Schichtsystems bei kleinen Änderungen der optischen Schichtdicke Δnd von Interesse. Bei dünnen Schichtsystemen kann zur Beschreibung der Änderung des Interferenzspektrums die „Verschiebung“ eines Extrempunktes herangezogen werden. Hier stehen viele Datenpunkte zur Bestimmung eines Extrempunktes zur Verfügung und kleine Änderungen in der optischen Schichtdicke und damit der Schichtdicke d führen zu einer größeren „Verschiebung“ des Extrempunktes. Bei vergleichsweise dickeren Schichten fallen deutlich mehr Extrempunkte in den Spektralbereich des sichtbaren Lichtes und damit stehen weniger Messpunkte für eine genaue Bestimmung des Extrempunktes zur Verfügung. Auch die „Verschiebung“ der Extrempunkte ist weniger stark ausgeprägt. Daher bietet sich bei vergleichsweise dickeren Schichten die Analyse des Interferenzspektrums mittels Fourier-Transformation an.

Im Folgenden wird die „Verschiebung“ eines Extrempunktes herangezogen, um auf Änderungen der Dicke der Interferenzschicht zu schließen: Für die periodisch alternierenden Maxima und Minima des Interferenzspektrums folgt aus Gleichung (2.7), dass die Phasenverschiebung der beiden reflektierten Teilstrahlen ein ganzzahliges Vielfa-

ches von π ist. Solange an der Grenzfläche keine Phasensprünge auftreten, folgt für das Auftreten von Maxima:

$$\frac{2nd}{\lambda} = \{1, 2, 3, \dots\} = m \quad (2.9)$$

und für das Auftreten von Minima [31]:

$$\frac{2nd}{\lambda} = \{0, 5, 1, 5, 2, 5, \dots\} = m \quad (2.10)$$

So ergibt sich das erste Minima bei einem Wert von 0,5 für $\frac{2nd}{\lambda}$. Dieser Wert wird im Weiteren als Ordnungszahl m bezeichnet. Aus Gleichungen (2.9) und (2.10) folgt, dass benachbarte Extrempunkte einen Unterschied in der Ordnungszahl von 0,5 aufweisen. Damit kann aus der Lage zweier Extrempunkte und deren Differenz die Ordnungszahl eines Extremwertes berechnet werden:

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (2.11)$$

Für die Lage der Extrempunkte stehen λ_1 und λ_2 und für die Differenz der Ordnungszahlen Δm mit $\Delta m = m_1 - m_2$. Mit der Bestimmung der Ordnungszahl lässt sich aus der Verschiebung eines Extrempunktes die Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta(nd)$ berechnen:

$$\Delta nd = \frac{\Delta \lambda \cdot m}{2} \quad (2.12)$$

Abb. 2.3 verdeutlicht auch, dass es bei einer Zunahme der Schichtdicke der Interferenzschicht immer zu einer „Verschiebung“ des Interferenzspektrums und damit der Extrempunkte des Interferenzspektrums hin zu höheren Wellenlängen kommt. Dies setzt voraus, dass sich die Brechungsindizes der beteiligten Materialien nicht ändern und dass die Interferenz des Lichtes durch eine einzige Interferenzschicht erzeugt wurde.

In der Praxis kommt es jedoch auch vor, dass es sich bei dem untersuchten System um zwei oder mehreren Schichten handelt. Da der Aufwand für die Analyse der Daten für ein Mehrschichtsystem oft nicht durch den Nutzen der dadurch gewonnenen Daten aufgewogen wird, bleibt in sehr vielen Fällen die Analyse der Daten anhand eines Einschicht-Modells die Methode der Wahl. Zudem ist nicht für alle Methoden die mathematische und messtechnische Lösung für die Behandlung von Mehrschichtsystemen vorhanden. Werden jedoch Mehrschichtsysteme zu einem Einschichtsystem vereinfacht, besteht das Risiko, dass die gewonnenen Ergebnisse nicht die tatsächlichen Vorgänge widerspiegeln.

2.1.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die RIfS verwendet, um die Anlagerung von Zellen an Oberflächen zu untersuchen. Die RIfS ist eine direkte optische Methode, mit der Anlagerungsprozesse an einer Grenzfläche beobachtet werden können. Sie beruht auf den beschriebenen Phänomenen der Lichtinterferenz, von an einem Mehrschichtsystem teilweise reflektiertem weißen Licht.

Um Interaktionsprozesse an Oberflächen über die Interferenz reflektierter Teilstrahlen untersuchen zu können, wird ein Schichtsystem – auch Transducer genannt – benötigt. Das Schichtsystem besteht aus dem Trägermaterial aus Glas, auf welches eine reflektierende Schicht aus Tantalpentoxid und eine Interferenzschicht aus Glas aufgedampft ist. An der Grenzfläche zwischen dem Trägermaterial und der reflektierenden Schicht wird der erste Teilstrahl I_{R1} reflektiert. Durch die Überlagerung des zweiten reflektierten Teilstrahles an der Oberfläche des Transducers I_{R2} entsteht die wellenlängenabhängige Modulation der Intensität des reflektierten Strahles I_R (Abb. 2.4, a). Das reflektierte Licht I_R wird mittels eines Lichtwellenleiters zu einem Spektrometer geleitet. Dieses nimmt in definierten Zeitabständen das Interferenzspektrum auf (Abb. 2.4 c). Kommt es nun zu einer Anlagerung von beispielsweise Proteinen oder Zellen an der Oberfläche, ändert sich der optische Weg $n \cdot d$ des zweiten reflektierten Teilstrahles I_{R2} (Abb. 2.4 b). Hierbei wird angenommen, dass der Brechungsindex der Zellen gleich dem Brechungsindex der Interferenzschicht ist. Damit kommt es zu einer „Verschiebung“ des Interferenzspektrums (Abb. 2.4 d), die nach Gleichung (2.12) auf Änderungen der optischen Schichtdicke Δnd schließen lässt. Werden die berechneten Werte für Δnd über die Zeit aufgetragen, spricht man von einer Bindungskurve (Abb. 2.4 e). In dieser Arbeit wird als Maß für die Oberflächenbeladung Γ , die sich aus der kinetischen Betrachtung der Bindungskurven ergibt, Δnd verwendet (siehe Abschnitt 2.2).

Die RIfS weist die Vorteile optischer, markierungsfreier Methoden (kostengünstig, hohe zeitliche Auflösung, keine Interaktion mit Markierungsmolekülen, etc.) auf und ist eine etablierte Methode im Bereich der biomolekularen Interaktionsanalyse [16, 32, 33]. Im Vergleich mit anderen direkten optischen Messverfahren, welche auf der Beobachtung evaneszenter Felder beruhen, gibt es deutliche Unterschiede in der Art und Weise, wie das Signal durch Interaktionsprozessen beeinflusst wird. Evaneszente Felder haben eine vergleichsweise geringe Eindringtiefe und die Amplitude fällt mit dem Abstand zur Grenzfläche exponentiell ab. Daher können nur Prozesse sehr nahe – im Bereich von wenigen nm bis zu wenigen hundert nm – an der Grenzfläche beobachtet werden [95, 96]. Im Falle von reflektometrischen optischen Methoden wie die RIfS, ist die Eindringtiefe durch die Kohärenzwellenlänge der verwendeten Strahlung begrenzt und das Signal wird unabhängig vom Abstand zur Grenzfläche beeinflusst. Mit den verwendeten optischen Elementen in der RIfS kann eine Eindringtiefe bis in den kleinen

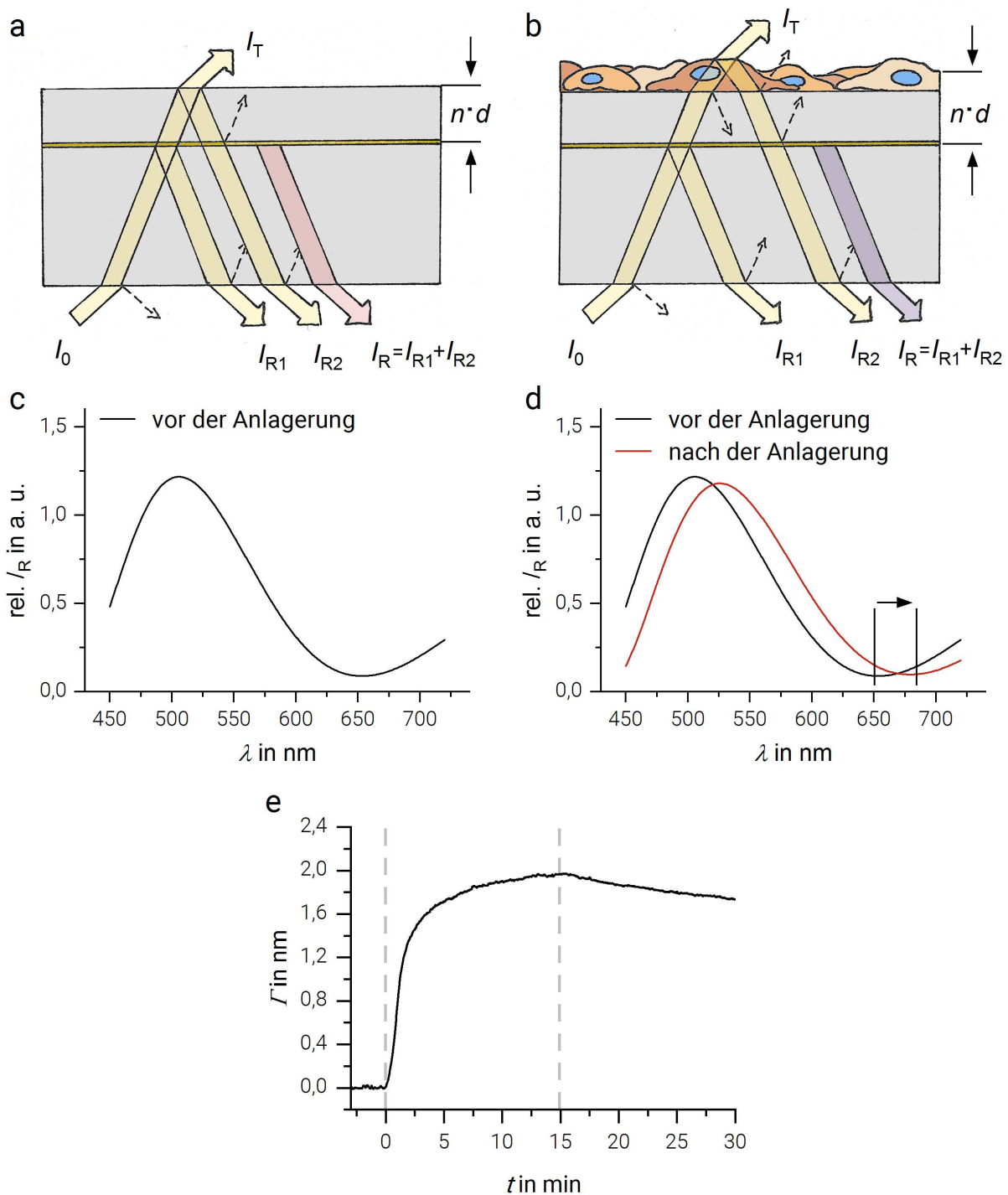


Abbildung 2.4: Detektionsprinzip der RIFS. a) Einstrahlung des Weißlichtes auf das Mehrschichtsystem des Transducers mit dem sich daraus ergebenden Interferenzspektrum. Die Einstrahlung erfolgt senkrecht – ist hier jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit mit einem Winkel gezeichnet. Die, im verwendeten Modell berücksichtigten Strahlen sind farblich hinterlegt. Weitere mögliche aber vernachlässigte Strahlen sind als gestrichelte Pfeile illustriert. b) Anlagerung des Analyten an der Oberfläche des Transducers. c), d) resultierendes Interferenzspektrum. e) Aus der Verschiebung des Extrempunktes berechnete Bindungskurve des Analyten – Γ in nm über die Zeit t – mit den Phasen Basislinie ($t < 0$ s), Assoziation ($15 \text{ s} > t > 0 \text{ s}$) und Dissoziation ($t > 15 \text{ s}$).

zweistelligen μm -Bereich erwartet werden [93, 94]. Damit ist diese Methode besonders gut geeignet die Anlagerung auch von größerer Partikel an eine Oberfläche zu messen. Daher wurde diese Methode erfolgreich für Messungen von Zelladsorption an Oberflächen verwendet [24–28].

2.1.5 Einwellenlängenreflektometrie

Aus dem Wunsch nach einem einfacheren Messaufbau, bei dem man auf den Einsatz teurer Spektrometer verzichten kann, und den Vorteilen des Multiplexings heraus hat sich die Weiterentwicklung von RIfS hin zur SCORE [34, 35] etabliert. In dieser Methode wird der Transducer mit einer schmalbandigen Lichtquelle beleuchtet (Abb. 2.5 a). Kommt es zur Anlagerung des Analyten an der Oberfläche, überlagern sich die reflektierten Teilstrahlen I_{R1} und I_{R2} , und die Intensität des reflektierten Strahles I_R ändert sich (Abb. 2.5 a, b). Bei der Betrachtung der theoretisch entstehenden Interferenzspektren vor und nach der Anlagerung des Analyten (Abb. 2.5 c, d), erschließt sich diese Änderung der Intensität bei einer Wellenlänge. Befindet man sich im linearen Bereich des Sensors (nahe dem Wendepunkt des Interferenzspektrums), so ist die Änderung der Lichtintensität des reflektierten Strahles I_R proportional zur Änderung der optischen Schichtdicke Δnd . Daher kann die Änderung der Lichtintensität des reflektierten Strahles I_R als Maß für die Oberflächenbeladung Γ angesehen werden. Stellt man die normierte und damit dimensionslose Intensität des reflektierten Strahles I_R über die Zeit dar, so erhält man auch mit dieser Methode eine Bindungskurve (Abb. 2.5 e).

Ein aktueller Vergleich der SCORE mit anderen Interferenztechniken ist von Peter Fechner et al. gegeben [36]

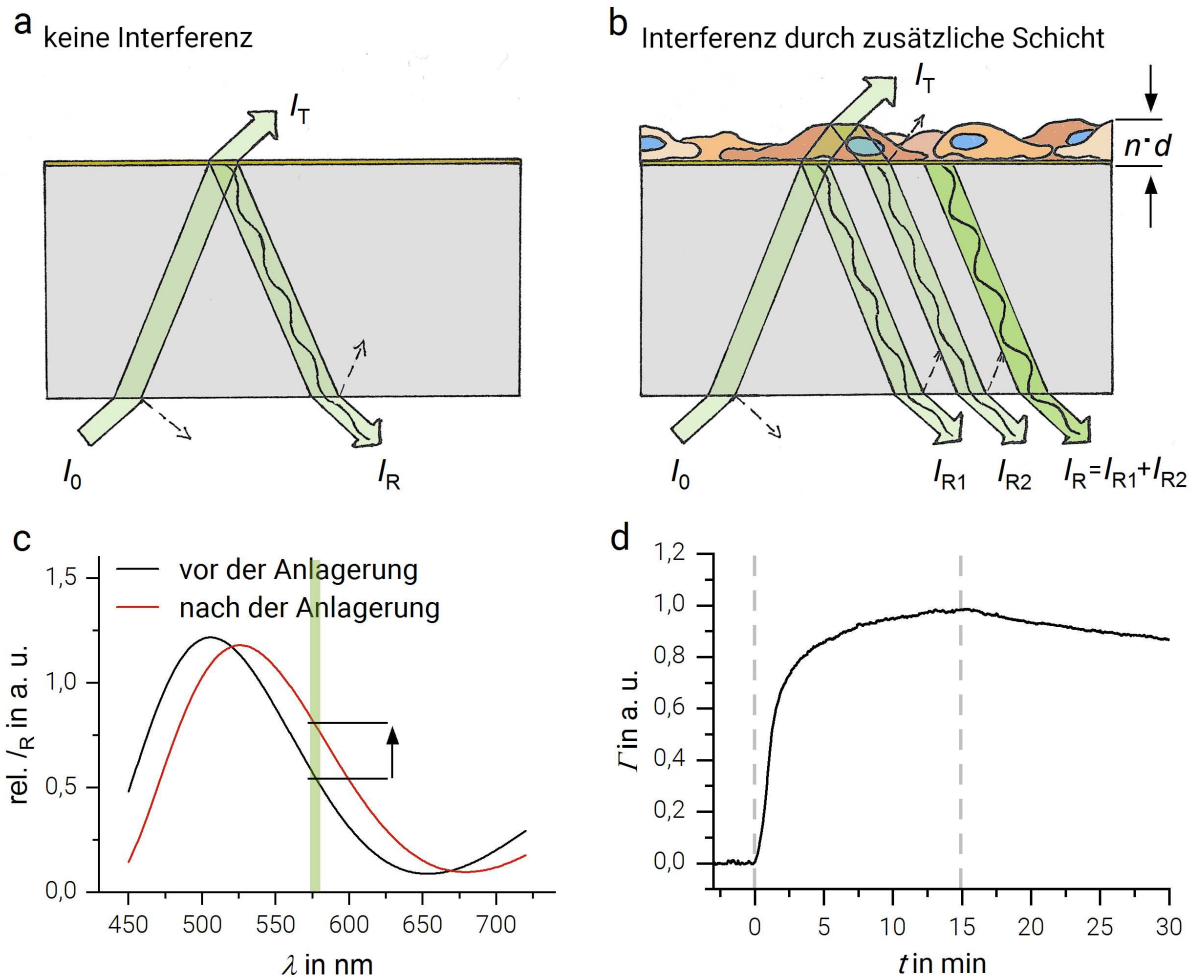


Abbildung 2.5: Detektionsprinzip der SCORE. a) Einstrahlung des Lichtes bei einer Wellenlänge auf den Transducer mit dem sich daraus ergebenden reflektierten Teilstrahl. Die Einstrahlung erfolgt senkrecht – ist hier jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit mit einem Winkel gezeichnet. Die, im verwendeten Modell berücksichtigten Strahlen sind farblich hinterlegt. Weite mögliche aber vernachlässigte Strahlen sind als gestrichelte Pfeile illustriert. b) Anlagerung des Analyten an der Oberfläche des Transducers mit den zugehörigen reflektierten Teilstrahlen und deren Überlagerung. c) Die Intensitätsänderung des eingestrahlichten Lichtes bei einer Wellenlänge ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. d) Die, aus der Intensitätsänderung des reflektierten Lichtes berechnete, Bindungskurve des Analyten in Γ in a.u. mit den Phasen Basislinie ($t < 0s$), Assoziation ($15s > t > 0s$) und Dissoziation ($t > 15s$).

2.1.6 Fluoreszenz

Trifft eine elektromagnetische Welle – ein Photon – auf Materie, kann sie mit dieser interagieren. Das Photon kann durch einem elastischen oder unelastischen Stoß an einem Materieteilchen gestreut oder von einem Materieteilchen absorbiert werden, wodurch Elektronen im Atom oder Molekül angeregt werden. Sie werden dann in ein Orbital eines höheren Energiezustandes versetzt. Meistens wird die überschüssige Energie nach der Absorption in ungeordneter thermischer Bewegung an die Umgebung abgegeben. In manchen Fällen wird die Anregungsenergie jedoch als Lichtquant abgegeben. Diesen Vorgang nennt man Lumineszenz. Dabei fällt das angeregte Elektron in ein Orbital geringerer Energie zurück, wobei ein Photon emittiert wird. Liegt die Wellenlänge des emittierten Photons im sichtbaren Bereich, kann man ein kurzes Aufleuchten des Stoffes bei Beleuchtung erkennen. Diesen Effekt macht man sich in der Fluoreszenzmikroskopie zu nutzen.

2.1.7 Fluoreszenzmikroskopie

Eine von vielen Methoden, die Fluoreszenzphänomene nutzen, ist die Fluoreszenzmikroskopie [41]. Sie ist unter anderem ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung biologischer Fragestellungen. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie können in diese Methode einzelne Organelle und andere Strukturen der Zellen gesondert abgebildet werden. Dies erlaubt eine genauere Untersuchung von Zellbestandteilen, die unter dem Lichtmikroskop nicht differenziert werden können – wie etwa die Stressfasern des Zytoskeletts. Der Aufbau des Zytoskells kann hilfreiche Informationen zur Struktur und Adhärenz von Zellen liefern. Auch die Zellkerne können über Fluoreszenzmikroskopie gut sichtbar gemacht werden, was ein automatisiertes Zählen der Zellen erleichtert.

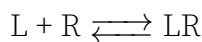
In der Fluoreszenzmikroskopie werden an Strukturen der zu untersuchenden Organismen oder Gewebeproben Fluoreszenzmarker angebunden. Im nächsten Schritt können diese Strukturen unter dem Mikroskop durch Anregung der Fluorophore sichtbar gemacht werden. Häufig wird als Fluorophor zur Markierung des Zellkerns 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet [42]. Diese Verbindung lagert sich an Adenin/Thymin-reiche Bereiche der Desoxyribonukleinsäure (DNA) an. Auch das Gift des grünen Knollenblätterpilzes Phalloidin findet Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie. Das Phalloidin weist eine hohe Affinität zu filamentösem (F-)Aktin auf und kann daher genutzt werden, um Anteile des Zytoskells zu markieren [43]. Zu diesem Zweck wird ein zuvor mit Fluorophoren – wie etwa Fluoresceinisothiocyanat (FITC) [44] – markiertes Phalloidin genutzt.

2.2 KINETIK UND GLEICHGEWICHT AN GRENZFLÄCHEN

Im Verlauf dieser Arbeit werden verschiedene Methoden zur Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Konstanten der Interaktionsanalyse von Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) herangezogen. Viele dieser Methoden legen eine Reaktion pseudoerster Ordnung zugrunde und fußen auf der Annahme einer Langmuir-Adsorptionsisotherme. Um ein besseres Abbild der Realität zu schaffen, wurde dieses Modell in vielfältiger Weise weiterentwickelt. Zudem gibt es in diesem Bereich auch Methoden, die kein mathematisches Modell voraussetzen. Ausgewählte Modelle sollen nun im Folgenden erklärt und die jeweiligen Unterschiede aufgezeigt werden.

2.2.1 Kinetik und Gleichgewicht von Reaktionen pseudoerster Ordnung

Betrachtet man die Gleichgewichtsreaktion eines Liganden L mit einem Rezeptor R zum Ligand-Rezeptor-Komplex LR



kann die Geschwindigkeit der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes LR $\frac{dc_{RL}}{dt}$ wie folgt formuliert werden:

$$\frac{dc_{RL}(t)}{dt} = k_a \cdot c_R(t) \cdot c_L(t) - k_d \cdot c_{RL}(t) \quad (2.13)$$

Es stehen k_a und k_d für die Assoziationsratenkonstante bzw. die Dissoziationsratenkonstante und c_L , c_R und c_{RL} für die Konzentrationen des Liganden, des Rezeptors bzw. des Komplexes. Die Affinität der Reaktionspartner wird über die Affinitätskonstante K beschrieben. Sie ist definiert durch:

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad (2.14)$$

Bei sehr großen Werten für K , wie man sie beispielsweise im Avidin-Biotin-System findet, ist die Assoziation nahezu irreversibel. Das Gleichgewicht liegt dann praktisch vollständig auf der Seite des Ligand-Rezeptor-Komplexes.

Wird die Interaktion zwischen einem fest an einer Oberfläche gebundenen und einen frei verfügbaren Reaktionspartner – sprich in heterogener Phase – betrachtet, folgt aus Gleichung (2.13):

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c(t) \cdot (\Gamma_{max} - \Gamma(t)) - k_d \cdot \Gamma(t) \quad (2.15)$$

Hier symbolisiert Γ den Ligand-Rezeptor-Komplex an der Oberfläche. Hierauf wird sich zukünftig mit dem Begriff Oberflächenbeladung bezogen. Die Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche ist durch $\Gamma_{max} - \Gamma(t)$ beschrieben, wobei Γ_{max} die maximale Beladung der Oberfläche darstellt. Die Konzentration $c(t)$ steht für die Konzentration des Reaktionspartners in Lösung – der Konzentration des Liganden. Stellt man nun experimentell sicher, dass sich die Konzentration des Liganden c über den Reaktionsverlauf nicht ändert, erhält man eine Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung. Nach Umformulierung von Gleichung (2.15) zu

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{max} - (k_a \cdot c + k_d) \cdot \Gamma(t) \quad (2.16)$$

erhält man eine inhomogene Differenzialgleichung mit der Lösung:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot (t-t_0)}) \quad (2.17)$$

Für die scheinbaren Ratenkonstante k_s gilt:

$$k_s = k_a \cdot c + k_d \quad (2.18)$$

Analog zur Langmuir Adsorptionsisotherme [45] gilt für die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} :

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \cdot \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (2.19)$$

Γ_{GG} steht für jene Oberflächenbeladung, die bei Einstellung des Reaktionsgleichgewichts erreicht wird. Das Reaktionsgleichgewicht ist dann erreicht, wenn die Geschwindigkeit der Hinreaktion (k_a) der der Rückreaktion (k_d) entspricht. Die Annahme einer Reaktion pseudoerster Ordnung bringt die Notwendigkeit mit sich, experimentell sicherzustellen, dass c über den untersuchten Reaktionsverlauf konstant bleibt. Dies kann prinzipiell über einen sehr großen Überschuss des Liganden oder über die Etablierung eines kontinuierlichen Flusses der Ligandenlösung erfolgen. Somit können kinetische Analysen basierend auf Gleichung (2.15) an den Daten vorgenommen werden. Durch die Bindung der Liganden an die Oberfläche bildet sich ein Konzentrationsgradient senkrecht zur Grenzfläche aus. Weitere Liganden werden aus dem Bulkvolumen durch Diffusion nachgeliefert. Einen guten Überblick hierzu geben Todd M. Squires et al. [46]. Der Einfluss des Massentransportes der mobilen Komponente an die Oberfläche kann in dem verwendeten Modell berücksichtigt werden und erlaubt dann eine kinetische Analyse der Daten [47–49]. Soll ein Einfluss der Diffusion auf die untersuchte Interaktion ausgeschlossen werden, können die experimentellen Einstellungen so gewählt werden, dass die Geschwindigkeit des Massentransportes die Geschwindigkeit der Reaktion deutlich übersteigt. Dies ist grundsätzlich mit einer hohen

Konzentration des Reaktionspartner in der mobilen Phase gegenüber einer geringen Konzentration des an der Oberfläche gebundenen Reaktionspartners zu erreichen.

Berechnung der Affinitätskonstante

Möchte man K für diese Affinitätsreaktion berechnen, stehen einem grundsätzlich zwei Wege offen. Mit dem Wissen um die Werte für k_a und k_d kann über Gleichung (2.14) K berechnet werden. Wie die Werte für k_a und k_d aus den aufgenommenen Bindungskurven – die Veränderung von Γ über die Zeit – ermittelt werden können, wird im folgenden Kapitel erklärt. Wie aus Gleichung (2.19) deutlich wird, kann K auch thermodynamisch über die Beobachtung von Γ_{GG} bei unterschiedlichen Konzentrationen erfolgen. Mit dem Anstieg der verwendeten c steigt auch Γ_{GG} . Legt man ein Adsorptionsverhalten nach Langmuir zugrunde, erhält man beim Auftragen von Γ_{GG} über c eine sogenannte Langmuir-Adsorptionsisotherme (Abb. 2.6 a). Stellt man c in dieser Darstellung auf einer logarithmischen Skala dar (Abb. 2.6 b), kann K über eine sigmoidale Anpassung oder eine Anpassung nach Gleichung (2.19) an die Messdaten bestimmt werden [50, 51]. Die Bestimmung von Γ_{GG} bei unterschiedlichen Konzentrationen kann entweder über Einzelmessungen oder in Form von Stufenmessungen, bei denen Analytkonzentrationen in aufsteigender Reihenfolge direkt nacheinander auf die Oberfläche geleitet werden, bis sich jeweils das Gleichgewicht der Affinitätsreaktion eingestellt hat, erfolgen [52].

Eine weitere Möglichkeit K zu bestimmen wurde von George Scatchard schon im Jahr 1949 beschrieben [53] und findet bis heute Anwendung [54]. Hier wird eine Linearisierung der Adsorptionsisotherme über die Auftragung von $\frac{\Gamma_{GG}}{c}$ über Γ_{GG} erreicht. Der Wert für K lässt sich dann aus der negativen Steigung der angepassten linearen Anpassung ermitteln (Abb. 2.6 c). Neben der Linearisierung nach Scatchard stehen noch weitere Linearisierungsmethoden zur Bestimmung von K über Γ_{GG} zur Wahl. Einige wurden von Xuan Guo und Jianlong Wang verglichen, wobei die Linearisierung nach Scatchard in dieser Studie die korrektesten Ergebnisse lieferte [55].

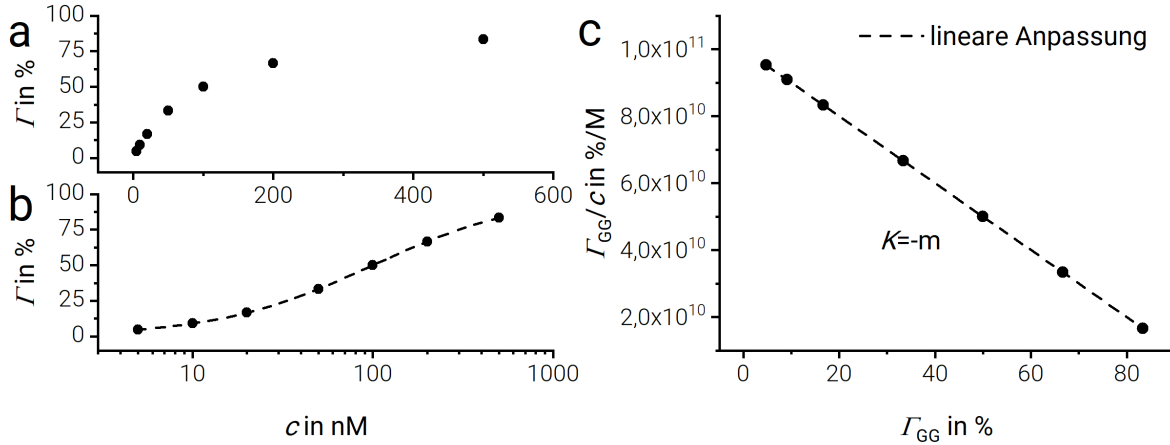


Abbildung 2.6: Langmuir-Adsorptionsisotherme und Linearisierung nach Scatchard. a) Langmuir-Adsorptionsisotherme. b) Logarithmische Auftragung der Langmuir-Adsorptionsisotherme. Der Kehrwert des Wendepunkts der logistischen Anpassung entspricht der Affinitätskonstante $K = \frac{1}{m}$. c) Linearisierung nach Scatchard. Die negative Steigung m der angepassten Gerade entspricht der Affinitätskonstante $K = -m$.

Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante

Sind die Daten der Anbindung des Analyten an die Oberfläche zeitlich gut genug aufgelöst, kann nicht nur die Affinitätskonstante K aus den Daten bestimmt werden, sondern auch die Kinetik dieser Reaktion beschrieben werden. Wie aus Gleichung (2.17) und Gleichung (2.18) hervorgeht, überlagert die Dissoziation die Assoziation des Analyten an der Oberfläche. Daher kann nicht direkt vom Signalverlauf der Assoziation bei einer Messung auf k_a geschlossen werden. Beim Messen der Bindungskurven bei unterschiedlichen Konzentrationen c kann jedoch k_a und k_d durch den Zusammenhang in Gleichung (2.18) bestimmt werden.

Mit zunehmender Konzentration c ist die Krümmung im Signalverlauf der Assoziationsphase stärker ausgeprägt und der Wert für Γ_{GG} strebt zu höheren Werten (Abb. 2.7 a). Mit der Anpassung von Gleichung (2.17) an die Messdaten kann k_s bestimmt werden. Nach Gleichung (2.18) erlaubt die Linearisierung von k_s über die Konzentration c die Bestimmung von k_a aus der Steigung und k_d aus dem y-Achsenschnittpunkt der angepassten Geraden (Abb. 2.7 a)[56].

Fasst man Gleichungen (2.17) und (2.18) zusammen kann der Signalverlauf während der Assoziationsphase auch durch

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-(k_a \cdot c + k_d) \cdot (t - t_0)}) \quad (2.20)$$

beschrieben werden. Durch eine globale Anpassung der beiden freien Parameter k_a und k_d der Gleichung (2.20) können diese dann direkt aus dem Signalverlauf während der Assoziation ermittelt werden. Hier werden die freien Parameter k_a und k_d zugleich

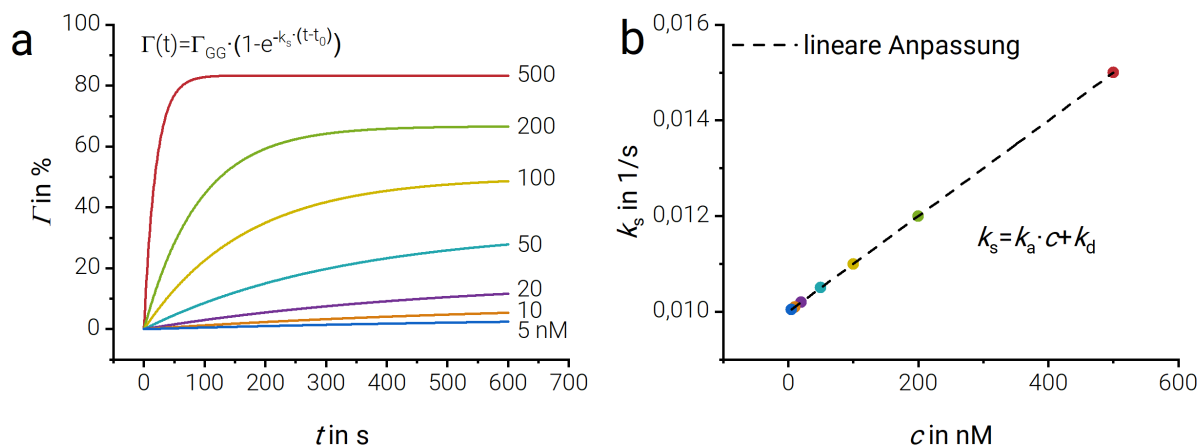


Abbildung 2.7: Linearisierung von k_s zur Bestimmung von k_a und k_d . a) Oberflächenbeladung $\Gamma(t)$ aufgetragen über die Messzeit. Diese theoretischen Bindungskurven ($k_a = 1 \cdot 10^6$, $k_d = 0,01$) sind für Analytkonzentrationen von 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM dargestellt. b) Auftragung von k_s über die Konzentration c . Durch Anpassung einer Geraden an die aus den Bindungskurven ermittelten k_s kann k_a aus der Steigung und k_d aus dem y-Achsenabschnitt der angepassten Geraden abgelesen werden.

bei allen Messungen verschiedener Konzentration angepasst [57]. In einer Studie mit simulierten Bindungskurven zeigten die Ergebnisse bei Verwendung einer globalen Anpassung kleinere Abweichungen bei der Bestimmung von k_a und k_d , als die Ergebnisse bei Verwendung der Linearisierung von k_s [58].

Neben der oben genannten Methode der Bestimmung von k_s über eine exponentielle Anpassung nach Gleichung (2.17) an die Bindungskurven, kann k_s auch über Integration oder Ableitung der Oberflächenbeladung bestimmt werden [59]. Nach Ableitung der Gleichung (2.17) erhält man:

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{max} - k_s \cdot \Gamma(t) \quad (2.21)$$

Stellt man $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ dar, kann k_s aus der negativen Steigung der Geraden entnommen werden (Abb. 2.8 b). Da mit der aktuell zur Verfügung stehenden Rechenleistung eine exponentielle Anpassung an die Bindungskurven kein Hindernis mehr darstellt, wird im Normalfall auf den Zwischenschritt der Bildung des Integrals oder der Ableitung zur Bestimmung von k_s verzichtet. Die Betrachtung von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ bietet jedoch eine sehr gute Hilfestellung in der Bewertung des vorliegenden Datensatzes. Wie in Abb. 2.8 b deutlich wird, ist eine Kinetik pseudoerster Ordnung nach Gleichung (2.17) sehr gut daran erkennbar, dass sich die Daten der Bindungskurve auf einer Geraden befinden. Werden die Messdaten durch weitere Einflüsse wie etwa Diffusion oder Konvektion beeinflusst, folgt die Reaktion einer anderen Reaktionsordnung oder erfolgt die Anbindung des Analyten in mehreren Schritten, ist dies an einem Abweichen des linearen Verlaufs der Daten leicht für das Auge erkennbar.

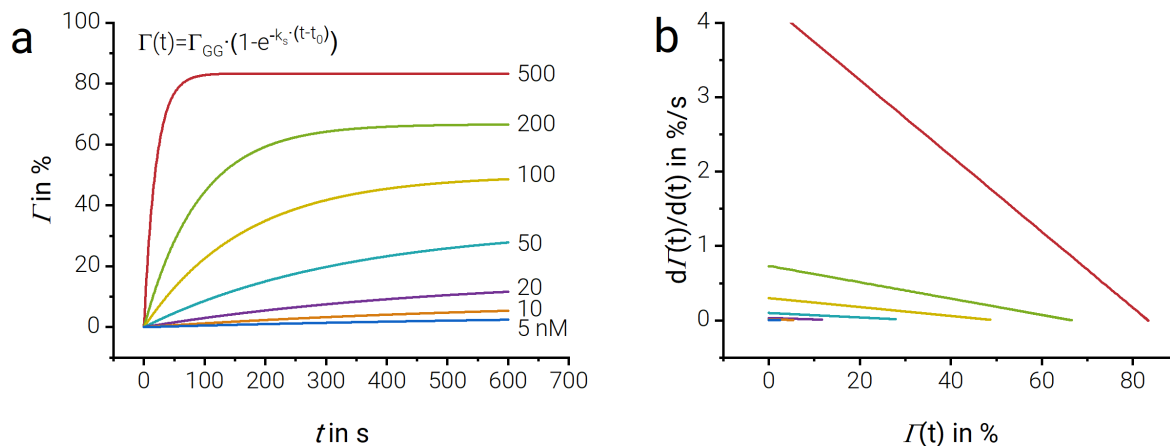


Abbildung 2.8: Differenzial der Bindungskurven. a) Oberflächenbeladung $\Gamma(t)$ aufgetragen über die Messzeit. Diese theoretischen Bindungskurven ($k_a = 1 \cdot 10^6$, $k_d = 0,01$) sind für Analytkonzentrationen von 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM dargestellt. Darstellung der Daten in der Form $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$. Liegt eine ungestörte Kinetik pseudoerster Ordnung vor, liegen die Daten auf einer Geraden mit negativer Steigung.

Neben den oben genannten Methoden stehen noch weitere Methoden zur Verfügung um k_d zu bestimmen. Analog zu Gleichung (2.17) kann die inhomogene Differenzialgleichung (2.16) für die Dissoziation gelöst werden:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot (t-t_0)}) \quad (2.22)$$

Wird nach der Assoziation des Analyten an die Oberfläche auch die Dissoziation des Analyten von der Oberfläche in ausreichender zeitlicher Auflösung aufgezeichnet, kann aus dem Signalverlauf durch Anpassung einer Exponentialfunktion entsprechend Gleichung (2.22) auf k_d geschlossen werden. Da die Dissoziation in diesem Modell nicht durch weitere Prozesse überlagert ist, kann der Wert für k_d theoretisch aus einer Bindungskurve ermittelt werden. Da die Dissoziation bei Messungen mit größeren Änderungen der Oberflächenbeladung einen stärkeren Einfluss auf den Signalverlauf zeigt, als bei kleinen Änderungen der Oberflächenbeladung, werden für diese Analyse meist die Messungen mit den höchsten Konzentrationen herangezogen.

2.2.2 Kinetische Betrachtung mittels EvilFit

Um Inhomogenitäten der Analyten in Lösung oder der Liganden an der Oberfläche bei der Bestimmung der Affinität und der Ratenkonstanten zu berücksichtigen, haben Peter Schuck et al. die Methode EvilFit entwickelt [60–62]. Hier wird angenommen, dass eine Vielzahl von Reaktionen pseudoerster Ordnung (siehe Abschnitt 2.2.1) parallel ablaufen und dass das Bindungssignal proportional zur gesamten Oberflächenbeladung ist. Eine Voraussetzung ist, dass Messungen bei verschiedenen Analyt-Konzen-

trationen vorliegen. Das Ergebnis dieser Methode ist eine zweidimensionale Verteilung von k_d und der Dissoziationskonstante K_d , dem Kehrwert der Assoziationskonstante K (Abb. 2.9). Die Methode EvilFit wurde nach dem Aphorismus „God made the solid state, he left the surface to the devil“ von Enrico Fermi oder Wolfgang Pauli benannt [63].

Die verschiedenen Phasen der Bindungskurve - Basislinie ($t < t_0$), Assoziationsphase ($t_0 \leq t < (t_0 + t_c)$) und Dissoziationsphase ($t \geq (t_0 + t_c)$) - werden folgendermaßen beschrieben:

$$\Gamma(k_a, K, c, t) = \begin{cases} b_0 & \text{falls } t < t_0 \\ \Gamma_A(k_a, K, c, t) = \Gamma_{GG}(K, c) \cdot e^{-k_a \frac{c+1}{K}(t-t_0)} + b_c & \text{falls } t_0 \leq t < (t_0 + t_c) \\ \Gamma_D(k_a, K, c, t) = \Gamma_A(k_a, K, c, t) \cdot e^{-\frac{k_a}{K}(t-t_c)} + b_0 & \text{falls } t \geq (t_0 + t_c) \end{cases} \quad (2.23)$$

Um Brechungsindexsprünge beim Wechsel der Injektionslösung in optischen Sensoren zu kompensieren, wurden die Basislinie-Offset Parameter b_0 und b_c eingeführt.

Mit der Annahme, dass die immobilisierten Liganden an der Oberfläche aus einer Mischung verschiedener Bindungsstellen mit unterschiedlichen K und k_a bestehen, kann man eine Differenzialverteilung der immobilisierten Liganden $P(k_a, K)$ so formulieren, dass das Integral $P(k_a^*, K^*)dk_a dK$ die Oberflächenbeladung mit einer Assoziationsratenkonstante zwischen k_a^* und $k_a^* + dk_a$ und einer Affinität zwischen K^* und $K^* + dK$ beschreibt. Die maximale Oberflächenbeladung der gesamten Oberfläche (mit allen verschiedenen Bindungsstellen) ergibt sich dann zu:

$$\Gamma_{max} = \int_{K_{min}}^{K_{max}} \int_{k_{a,min}}^{k_{a,max}} P dk_a dK \quad (2.24)$$

Der gesamte Bindungsvorgang kann damit zu

$$\Gamma_{tot}(c, t) = \int_{K_{min}}^{K_{max}} \int_{k_{a,min}}^{k_{a,max}} \Gamma(k_a, K, c, t) \cdot P(k_a, K) dk_a dK \quad (2.25)$$

formuliert werden. Der Kernel $\Gamma(k_a, K, c, t)$ ist in Gleichung (2.23) gegeben (mit normiertem $\Gamma_{max} = 1$ ausgewertet). Die Gleichung (2.25) ist ein Fredholm-Integral. Mit vertauschten Bindungskurven und einer kleinen Anzahl an Bindungskurven bei wenigen Konzentrationen c wird eine direkte Inversion des Integrals in Gleichung (2.25) instabil. Um dieses inverse Problem zu lösen, haben die Entwickler von EvilFit Regularisierungstechniken (Tikhonov-Phillips und maximum entropy regularization) verwendet, um die Verteilung von P einzuschränken. Das Ergebnis ist damit die einfachste Verteilung von P , die den Daten mit einer vordefinierten Abweichung entspricht [60]. Diese Verteilung wird über die Darstellung der Häufigkeit von k_d - K - d -Wertepaaren graphisch veranschaulicht (Abb. 2.9).

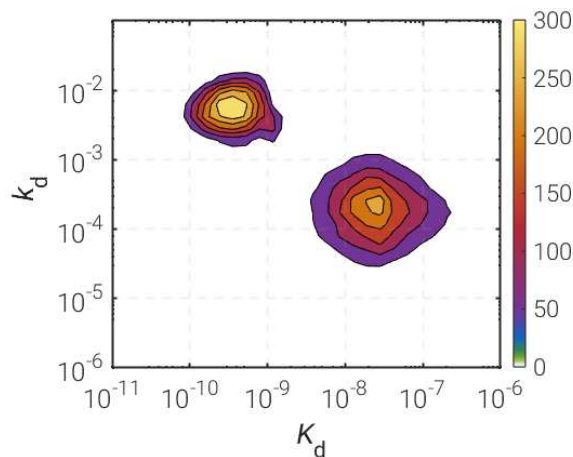


Abbildung 2.9: Ergebnis einer kinetischen Analyse einer fiktiven Affinitätsreaktion mittels EvilFit. In einer Falschfarbendarstellung der k_d und K_d Verteilung werden die Verteilungsspitzen deutlich. Da hier zwei Verteilungsspitzen auftreten kann daraus abgeleitet werden, dass sehr wahrscheinlich zwei Interaktionen parallel ablaufen. Aus der Lage der Verteilungssitzen können die zugehörigen kinetischen und thermodynamischen Parameter k_d , k_a und K_d bestimmt werden.

Kleinere Verteilungsspitzen mit steilen Flanken sprechen für spezifische Interaktionen zwischen ggf. verschiedenen Analyten in der Lösung und den an der Oberfläche befindlichen Rezeptoren. Großflächigere Verteilungen sind hingegen ein Hinweis auf unspezifischere Interaktionen der Reaktionspartner. Bei der Charakterisierung von Biosensor-Oberflächen kann dies auf ein unvollständiges Passivieren der Sensoroberfläche hindeuten.

Da aktuell noch nicht alle rechnerischen Schwierigkeiten zur kinetischen Analyse der Bindung von heterogenen Analyten an gleichförmige Bindungsstellen an der Oberfläche ausgeräumt wurden, steht die Methode EvilFit bisher nur für die Analyse von Interaktionen an heterogenen Liganden an der Oberfläche zur Verfügung. Dennoch bietet diese Methode viele Möglichkeiten und wurde unter anderem zur kinetischen Untersuchung von Antikörpern [64], Goldnanopartikeln mit Proteinen [65], Reparaturmechanismen fehlerhafter DNA [66], Protein-Protein-Interaktionen von Cadherinen des Innenohrs [67] und der Rolle von Galectinen bei idiopathischer pulmonaler Fibrose [68] herangezogen. Diese und viele weitere Beispiele zeigen, dass die Methode EvilFit eine vielversprechende Erweiterung der einfacheren Methoden zur Untersuchung der Kinetik pseudoerster Ordnung darstellt.

2.3 DYNAMIK DER ZELLADHÄSION

Die Anlagerung von Zellen an Oberflächen ist ein in unserem Körper ständig ablaufender Prozess, der eine genaue Abstimmung vieler verschiedener molekularer Interaktionen erfordert. Die Adsorption von Zellen an Oberflächen ist essenziell für das

Überleben, die Differenzierung, die Teilung und die Bewegung vieler Zelltypen. Wie in der Einleitung herausgestellt, führt eine fehlerhaft ablaufende Zelladsorption im Menschen zu vielen pathophysiologischen Veränderungen des Gewebes. Der Ablauf der Zelladhäsion auf Oberflächen wird oft vereinfacht in 3 Phasen beschrieben (Abb. 2.10) [69–71]:

- 1) Kontakt mit der Oberfläche und Bindung der Zelle an die Oberfläche
- 2) Ausbildung weiterer Kontaktpunkte und Ausspreiten der Zelle auf der Oberfläche
- 3) Ausbildung von fokalen Adhäsionen und Umstrukturierung des Zytoskeletts

Diese Phasen sind keine klar abgegrenzten Schritte, sondern gehen fließend ineinander über. Der erste Schritt der Anlagerung beruht auf dem zufälligen Annähern der Zelle an die Oberfläche und den damit auftretenden unspezifischen Wechselwirkungen – wie z.B. elektrostatische Wechselwirkungen oder Van-der-Waals Wechselwirkungen –, sowie den zufälligen Interaktionen von Zelladhäsionsmolekülen und den entsprechenden Liganden an der Oberfläche. Integrine sind die größte Familie der Zelladhäsionsmoleküle und stellen wichtige Rezeptoren für die Bindung und deren Regulierung der Zelle an die Umgebung dar. Die Familie der Integrine besteht aus 24 verschiedenen $\alpha\beta$ Heterodimeren, die aus 18 α und acht β bisher bekannten Untereinheiten aufgebaut sind [72]. Sie ermöglichen die Anbindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix oder binden an freie Liganden oder Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen. Je nachdem aus welchen Untereinheiten die Integrine aufgebaut sind, binden sie an unterschiedliche Bestandteile der extrazellulären Matrix. Beispielsweise hat $\alpha_1\beta_1$ eine spezifische Affinität zu Kollagen, $\alpha_5\beta_1$ zu Fibronectin, $\alpha_7\beta_1$ zu Laminin und $\alpha_v\beta_3$ zu Vitronectin [73]. Diese erste Interaktion der Zelle mit der Oberfläche über Zelladhäsionsmoleküle wird oft als Gleichgewichtsreaktion mit „Schlüssel-Schloss“ Prinzip betrachtet. Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle haben unterschiedliche Affinitäten zu den an der Oberfläche befindlichen Liganden und bilden nach gewisser Zeit eine konstante Zahl an Bindungen, während Zelladhäsionsmoleküle mit der Ratenkonstante k_a Bindungen eingehen und sie mit der Ratenkonstante k_d wieder lösen. In dieser Phase kann über thermodynamische Betrachtungen des Gleichgewichtszustandes die Bindungsenergie der Zellen an die Oberfläche ermittelt werden [74]. Ein weiterer Ansatz, um diese Interaktionsprozesse beschreiben und besser verstehen zu können, ist das In-Kontakt-Bringen der Zellen mit möglichen Interaktionspartnern und darauffolgendes Entfernen durch Krafteinwirkung. Über die Menge an aufgebrachter Kraft, um die Bindung zwischen der Zelle und den Interaktionspartnern zu lösen, erhält man ein Maß für die Adhäsionskräfte der Zelle. Um diese Interaktionskräfte auch zu Beginn der Interaktion von Zellen mit Bestandteilen ihrer Umgebung zu testen, werden oft verschiedene Versuchsaufbauten der Rasterkraftmikroskopie (AFM) angewandt [75].

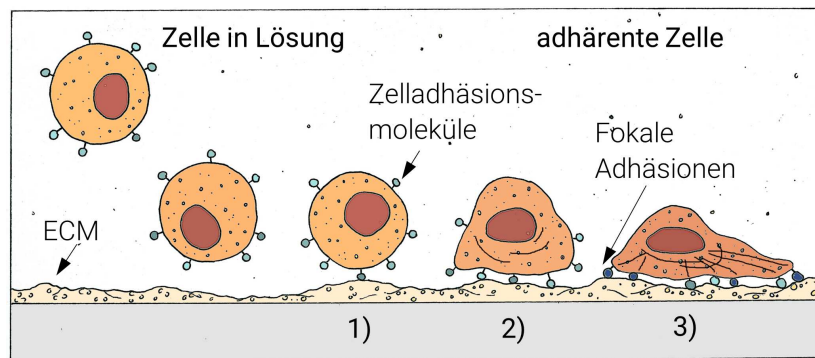


Abbildung 2.10: Phasen der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix. Beim Anlagern von Zellen aus einer Lösung an die Oberfläche 1) entsteht ein Kontakt mit der Oberfläche und Bindung einzelner Zelladhäsionsmoleküle an die Oberfläche 2) bilden sich weitere Bindungen zwischen der Zelle und der Oberfläche aus und die Zelle spreitet sich auf der Oberfläche aus 3) kommt es zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen und das Zytoskelett wird umstrukturiert.

Zunehmend rückt die kinetische Betrachtung dieser Interaktionen in den Fokus der Forschung, da hier detaillierte und komplementäre Informationen zu den bisher verwendeten Methoden erhalten werden können [76].

In der nächsten Phase der Zelladhäsion ist die Bindung weiterer Zelladhäsionsmoleküle an die Oberfläche wahrscheinlicher, da sich durch die erste Bindung weitere Interaktionspartner in räumlicher Nähe befinden [76]. Sind die Interaktionen zwischen Zelle und deren Umgebung stark genug, nimmt die Anzahl der Bindungen der Zelle an die Oberfläche stetig zu. Die Zelle spreitet sich auf der Oberfläche aus. Sind die Interaktionskräfte eher gering, kann es auch zu einer Art Rollbewegung der Zellen über die Oberfläche kommen, wenn stetig neue Bindungen ausgebildet werden, während sich andere wieder lösen. Zu beobachten ist dieser Effekt vor allem bei externer Krafteinwirkung. Ein Beispiel hierfür sind Scherkräfte, verursacht durch den Blutfluss bei der Adsorption von Immunzellen [77, 78] oder Tumorzellen [79] an Endothelgewebe. Da Integrine und andere Zelladhäsionsmoleküle oft mehrere Bindungsstellen für gleiche und/oder unterschiedliche Liganden aufweisen, kommt es häufig zur Ausbildung synergetischer Bindungen durch verschiedene Bindungsstellen der Zelladhäsionsmoleküle an ihre Umgebung. Unter anderem dadurch werden die ursprünglichen Bindungen stabilisiert und/oder Signalkaskaden angestoßen, die das Verhalten der Zelle und deren Interaktion mit der Umwelt regulieren [80, 81]. Diese Phase der Zelladhäsion ist geprägt durch viele unterschiedliche, parallel ablaufende Prozesse. Daher ist die Untersuchung dieser Prozesse sehr komplex und kann mit den oben erwähnten Methoden und kinetischen Modellen schlecht beschrieben werden. Deshalb schlagen unter anderem Ning Li et al. und Cheng Zhu vor, eine zweidimensionale Kinetik der Zelladsorption zugrunde zu legen, da die Interaktionspartner nicht frei in Lösung zur Verfügung stehen, sondern in die Zellmembran eingebunden sind [76, 82]. Andere Autoren liefern verschiedene mathematische Modelle um die Kinetik des Spreitens der Zellen an der

Oberfläche zu beschreiben [83–86].

Mit fortschreitender Zeit spreitet sich die Zelle aktiv weiter aus und bildet fokale Adhäsionen – Integrin enthaltende Multiproteinstrukturen – aus. Im Vergleich zu anderen Zelladhäsionsmolekülen bilden sie sich vor allem nahe der Lamellipodien und Lamellien aus und sind deutlich größer. Über sie werden mechanische Kräfte und Signale zur Zellregulierung zwischen der umgebenden extrazellulären Matrix und den Zellen übertragen [87]. Im Zuge der Adhäsion der Zelle an die Oberfläche wird das Zytoskelett umstrukturiert. Der Actomyosin Kortex wird verformt und Stressfasern werden ausgebildet. Sie bilden ein Netz aus, mit dem die Zelle Zugspannung aufbauen und auf ihre Umgebung übertragen kann [88]. Diese Zugspannung kann beispielsweise mittels „traction force microscopy“ genauer untersucht werden [89]. Auch in diesem fortgeschrittenen Stadium der Zelladsorption, wird die Interaktion der Zelle mit der Oberfläche oft untersucht, indem die Zelle durch Einwirkung von Kraft von der Oberfläche entfernt und damit auf die Bindungskräfte der adhärenen Zellen geschlossen wird. Die morphologischen Veränderungen unterscheiden sich stark zwischen verschiedenen Zelltypen und auch die umgebende extrazelluläre Matrix wird von den Zellen unterschiedlich beeinflusst.

3 METHODEN UND MATERIALIEN

3.1 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE DER ZELLADSORPTION

3.1.1 Vorbereitung der Interferenzgläser

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Interferenzgläser verwendet. Diese sind aus dem Glas BK7 mit einer aufgedampften Schicht Tantalpentoxid der Dicke 10 nm gefolgt von einer weiteren Schicht amorphen Glases einer Dicke von 375 nm oder 330 nm aufgebaut. Vor den Messungen wurden die Interferenzgläser gereinigt. Hierzu wurden diese 1 min in 6 M KOH geschwenkt und in 3 Schritten mit Milli-Q-Wasser gereinigt. Darauffolgend wurden die Interferenzgläser 15 min lang in frisch hergestellter Piranha-Lösung im Ultraschallbad behandelt, sorgfältig in 3 Schritten mit Milli-Q-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Gelagert wurden die Interferenzgläser bei Raumtemperatur.

3.1.2 Kultivierung der menschlichen embryonalen Nierenzellen

Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293) (zur Verfügung gestellt von Alex Weber, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D5796, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt mit mit 10 % Fetalem Kälberserum (A3160801, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (15070063, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) und 1 % L-Glutamin in T-25 oder T-75 Kulturflaschen kultiviert. Sobald die Zellen 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden diese im Verhältnis von 1:8 passagiert. Für die RfS-Messungen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% nach einem Waschschritt mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Trypsin-EDTA (25300054, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Germany) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und im Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 300 rcf 5 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpallet nach Abgießen des Überstandes in Leibovitz' L-15 Medium (21083027, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Dadurch wurde eine CO₂-unabhängige Pufferung des pH-Wertes während der RfS-

Messung sichergestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Zellsuspension für die RfS-Messungen wurden durch Zellzählung der Zellsuspension in der Neubauer Zählkammer und entsprechender Zugabe an Leibovitz' L-15 Medium auf $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt.

3.1.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie Messungen

Der Aufbau einer RfS-Anlage wurde unter anderem von Günther Proll et al. beschrieben [90]. Die genaue Konfiguration des Aufbaus ist im Folgenden beschrieben und in Abb. 3.1 schematisch veranschaulicht. Als Weißlichtquelle wurde eine Halogenlampe verwendet (5 V, 10 W Halogenlampe, Osram). Das ausgestrahlte Licht wurde mittels eines Spiegels, Linsen und Positionieroptik (Spindler & Hoyer) auf den Lichtwellenleiter (Polymethylmethacrylate, 1 mm Durchmesser, 5050 Y-Faserkoppler, Laser Components) fokussiert. Um zu vermeiden, dass schädliche UV-Strahlung und Wärmestrahlung mit den Zellen interagiert, wurde ein Bandpass-Filter (Spindler & Hoyer) vor der Fokussierung des Lichtes eingesetzt, um nur das Licht im erwünschten Spektralbereich passieren zu lassen. Über einen Arm des Y-Lichtwellenleiters wurde das Licht senkrecht von unten auf das Interferenzglas eingestrahlt. Das reflektierte Licht wurde über den zweiten Arm des Lichtwellenleiters zum Spektrometer (Diodenarray-Spektrometer, SPEKOL 1100, Analytik Jena AG) geleitet. Um die Adsorptionsprozesse der Proteine und Zellen an der Oberfläche untersuchen zu können, wurde alle 5 s ein Spektrum aufgenommen und Δnd nach Gleichung (2.12) berechnet. Die jeweilige Analytlösung wurde mit einer Peristaltikpumpe (Ismatec) durch dünne Schläuche und die Flusszelle über die Interferenzglasoberseite gepumpt. Die Flussrate betrug generell $0.5 \mu\text{l/s}$. Der Weg zwischen Probegefäß und Flusszelle über den Schlauch wurde so kurz wie möglich gehalten um Diffusionseffekte und das Abkühlen der Zellsuspension im Schlauch zu minimieren. Für einen Wechsel der Analytlösung wurde der Fluss kurz unterbrochen und der Probenschlauch manuell in dem neuen Probengefäß positioniert. Um eine mögliche Schädigung der Zellen durch die mechanische Belastung durch die Peristaltikpumpe zu vermeiden, wurde diese nach der Flusszelle in das System eingebaut.

Im ersten Schritt der Messung wurde 8 min lang PBS injiziert, um eine Basislinie aufzunehmen und damit Drifteffekte während der Messung auszuschließen. Daraufhin wurde die Oberfläche mit dem gewünschten Protein (Fibronektin, nativem Kollagen oder denaturiertem Kollagen) bei einer Konzentration von 10 mg/ml funktionalisiert. Nach Erreichen eines Plateaus nach circa 10 min und damit vollständiger Absättigung der Glasoberfläche, wurde die so funktionalisierte Oberfläche mit dem Zellkulturmedium 10 min lang blockiert. Dadurch wird sichergestellt, dass die folgende beobachtbare Δnd nicht durch Bestandteile des Zellkulturmediums, sondern durch die Anlagerung der Zellen verursacht wird. Über die so vorbereitete Oberfläche wurde circa

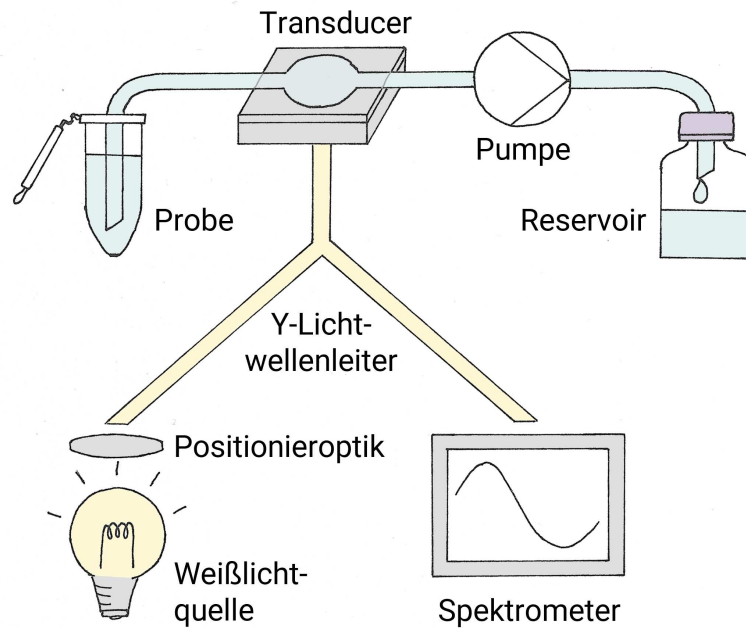


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau einer RfS Anlage. Die Analytlösung wird mit Hilfe einer Pumpe über die Transduceroberfläche geleitet. Die Analytlösung wird nach der Messung in einem Reservoir aufgefangen. Der Transducer wird senkrecht von unten mittels Positionieroptik und eines Y-Lichtwellenleiters mit Weißlicht bestrahlt. Das reflektierte Licht wird über den zweiten Arm des Y-Lichtwellenleiters zum Spektrometer geführt. Durch die Analyse der erhaltenen Interferenzspektren können zeitaufgelöste Bindungskurven aufgenommen werden.

17 min lang die Zellsuspension geleitet und Δnd beobachtet. Im nächsten Schritt wurde die Desorption der Zellen beobachtet, wobei circa 13 min das Zellkulturmedium injiziert wurde. Hierauf folgend wurden die Oberflächen des Interferenzglases, der Flusszelle, der Schläuche und der Pumpe gereinigt, indem Trypsin-EDTA und PBS durch das System geleitet wurde. Nach einer Messserie wurde die Anlage zusätzlich mit Ethanol 70 %ig und PBS gespült.

Langzeitmessung

Der Messaufbau, die Vorbereitung der Interferenzgläser, die Schritte der Zellkultivierung und die Reinigung waren analog zu denen der vorangegangenen Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.3 beschriebenen. Lediglich der Messablauf wurde wie folgt modifiziert: Nach dem Aufnehmen der Basislinie wurde 10 min lang die Transduceroberfläche mit denaturiertem Kollagen bei einer Konzentration von 10 mg/ml funktionalisiert. Das Absättigen der Transduceroberfläche mit Zellkulturmedium erfolgte 20 min lang. Daraufhin wurde die Zellsuspension 25 min lang über die Oberfläche des Transducers geleitet. Um eine verlängerte Dissoziationsphase aufzunehmen, wurde erneut das Zellkulturmedium 3 h lang injiziert.

3.1.4 Auswertung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie-Messungen

Spektrale Auswertung der reflektometrischen Interferenzspektroskopie-Messungen

Die Analyse der Interferenzspektren erfolgte über die Berechnung von Δnd durch die „Verschiebung“ eines Extrempunktes. Die Lage der Extrempunkte wurde über die Anpassung einer Parabel an den Bereich von λ um den Extremwert bestimmt. Im nächsten Schritt wurde die Ordnungszahl des Extrempunktes nach Gleichung (2.11) ermittelt. Die Berechnung von Δnd aus der „Verschiebung“ des Extrempunktes erfolgte nach Gleichung (2.12). Für die Auswertung wurden die Programme MEASURE und IFZ verwendet. Für die Darstellung der Daten wurde die Software OriginPro (OriginLab Corporation, OriginPro 2018) herangezogen.

Auswertung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie Messungen bei einer Wellenlänge

Die Auswertung der RIfS bei einer Wellenlänge wurde mittels einer für diesen Zweck erstellten MATLAB-Funktion durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Daten der Intensität des reflektierten Lichtes aus dem Wellenlängen-Bereich in den Wellenzahl-Bereich transformiert. Damit liegen die Daten als $\sin(x)$ -Funktion anstelle einer $\frac{1}{\sin(x)}$ -Funktion vor. An die Bereiche um die Extrempunkte des Spektrums wurde eine Parabel angepasst und die genaue Lage des Extrempunktes bestimmt. Nach der Ermittlung der Ordnungszahl wurde Δnd aus der „Verschiebung“ des Extrempunktes nach Gleichung (2.12) berechnet. Für die Ergebnisse der Analyse der Daten bei einer Wellenlänge wurden die oft verwendeten Wellenlängen 530 nm und 630 nm herangezogen. Für die Auswertung wurde die gemessene Intensität bei diesen Wellenlängen über die Zeit aufgetragen. Zudem wurden zwei Methoden angewandt, um die Auswahl der Wellenlängen zu optimieren. Rüdiger Frank stellte eine Methode der Bestimmung der optimalen Wellenlänge zur Auswertung vor, bei der die Größe des Signalhubes optimiert wird [91]. Hierfür wurden die Intensitätsänderungen über die Zeit bei Wellenlängen in Abstand von 1 nm betrachtet und jene Wellenlänge ausgewählt, die den größten Signalhub liefert (Abb. 3.2). Auch für diese Wellenlänge wurde die Intensitätsänderung über die Messzeit aufgetragen. Als zweite Methode wurde eine Wendepunkt-Analyse durchgeführt (Abb. 3.3).

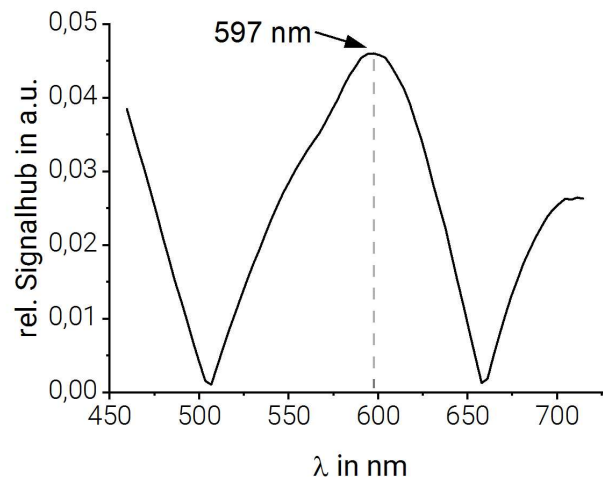


Abbildung 3.2: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der optimalen Wellenlänge über die Maximierung des Signalhubes. Für die Wellenlängen des Interferenzspektrums im Abstand von 1 nm wurde der Signalhub ermittelt, der durch die Anlagerung der Zellen an die Oberfläche verursacht wurde. Die Wellenlänge mit maximalem Signalhub ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und die grau gestrichelte Linie zeigt auf die entsprechende Wellenlänge.

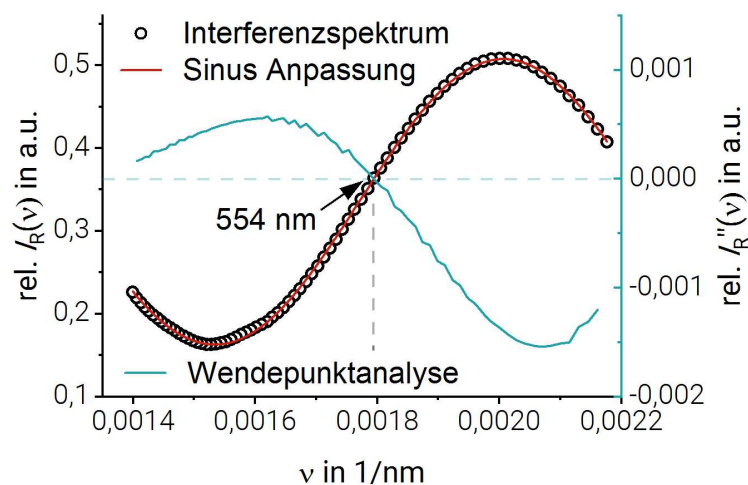


Abbildung 3.3: Bestimmung der optimalen Wellenlänge zur Auswertung der spektralen Daten der RIfS. An die spektralen Daten (schwarze Kreise) wurde eine $\sin(x)$ -Funktion angepasst (rote Linie). Der Schnittpunkt der zweiten Ableitung (blaue Linie) der angepassten Funktion mit der x-Achse (hellblau gestrichelte Linie) zeigt die Lage des Wendepunkts der spektralen Daten (grau gestrichelte Linie).

Am Wendepunkt der $\sin(x)$ -Funktion ist die Flanke am steilsten und es kann mit einer starken und linearen Intensitätsänderung bei Anlagerungsprozessen an die Oberfläche gerechnet werden. Hierfür wurde an die Daten der Intensität über die Wellenzahl eine $\sin(x)$ -Funktion angepasst. Die angepasste Funktion wurde zweimal abgeleitet. Aus dem Schnittpunkt der zweiten Ableitung der angepassten $\sin(x)$ -Funktion mit der x-Achse wurde die optimale Wellenzahl für die Auswertung ermittelt. Diese wurde dann wieder durch den Zusammenhang $\nu = \frac{1}{\lambda}$ in die entsprechende Wellenlänge überführt.

3.2 EINWELLENLÄNGENREFLEKTOMETRIE DER ZELL- ADSORPTION

3.2.1 Vorbereitung der Glas-Slides

SCORE-kompatible Glas-Slides (zur Verfügung gestellt von BioCopy GmbH, Emmendingen, Deutschland) wurden zuerst mit einem Waschprozess von Verunreinigungen durch den Herstellungsprozess befreit. Hierzu wurden die Glas-Slides zuerst 10 min lang in einem Ultraschallbad bei 80 °C in Waschlösung 1 (1 Teil Konzentrierte Natronlauge, 5 Teile Wasserstoffperoxid, 20 Teile Milli-Q-Wasser, 80 °C) getaucht. Daraufhin wurden die Glas-Slides gründlich mit Milli-Q-Wasser (80 °C) gespült. Im zweiten Waschschrift wurden die Glas-Slides 10 min lang in einem Ultraschallbad bei 80 °C in Waschlösung 2 (1 Teil konzentrierte Salzsäure, 5 Teile Wasserstoffperoxid, 20 Teile Milli-Q-Wasser, 80 °C) getaucht. Nach einem erneuten Spülen der Slides mit Milli-Q-Wasser wurden die Slides im Stickstoffstrom getrocknet und staubfrei gelagert. Polydimethylsiloxan (PDMS)-Schablonen wurden verwendet, um die unterschiedlichen Proteinbeschichtungen auf dem Glas-Slide im auslesbaren Bereich der SCORE zu positionieren. Hierzu wurden aus einem 2 mm dicken PDMS-Lappen (zur Verfügung gestellt von BioCopy GmbH, Emmendingen, Deutschland) mit Hilfe einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 2 mm an den vorgesehenen Positionen der späteren Protein-Spots Löcher gestanzt (Abb. 3.4, links). Diese PDMS-Schablonen wurden 5 min lang in Aceton und 5 min lang in einer 0,5 %igen Sodiumdodecyl-Lösung bei pH 1,5 im Ultraschallbad gewaschen. Rückstände der Waschreagenzien wurden mit deionisiertem Wasser entfernt und die PDMS-Schablonen im Stickstoffstrom getrocknet. Um die PDMS-Schablone an der korrekten Stelle auf dem Transducer zu positionieren, wurde ein markiertes Glas-Slide verwendet. Die rechte obere Ecke wurde auf diesem Glas-Slide gekennzeichnet und die gewünschte Position der PDMS-Schablone wurde markiert. Aufgrund der Transparenz der Glas-Slides, konnte somit beim Ausrichten des markierten Glas-Slides genau über dem Messtransducer, die PDMS-Schablone korrekt aufgebracht wer-

den (Abb. 3.4, Mitte). Es wurden 20 verschiedene Spots aufgebracht, die aus 5 verschiedenen Proteinen mit jeweils 4 Replika zusammengesetzt waren. Für das Beschichten der Glasoberfläche mit den ausgewählten Proteinen Fibronectin (F1056, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Vitronectin (SRP3186, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Kollagen (C6745, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Laminin (L4544, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Albumin (A1653, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden diese auf eine Konzentration von 6 µg/ml in Phosphat gepufferter Saline (PBS, 14190094, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Nachdem die PDMS-Schablone auf dem auslesbarem Bereich der SCORE platziert wurde, wurden jeweils 2 µl der entsprechenden Proteinlösung in die so entstandenen Kavitäten gegeben (Abb. 3.4, rechts). Die Proteine wurden 25 min lang bei 37 °C auf der Glasoberfläche getrocknet. Vor der SCORE-Messung wurden die PDMS-Schablonen entfernt und Protein- und PDMS-Rückstände vorsichtig wenige Sekunden lang mit deionisiertem Wasser abgewaschen.

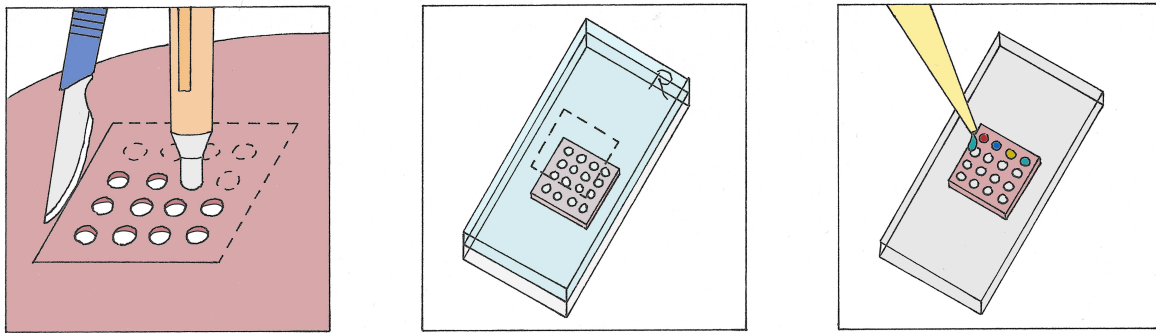


Abbildung 3.4: Vorbereitung der Glas-Slides für die SCORE der Zelladsorption. links: Herstellung der PDMS-Schablonen aus einem PDMS-Lappen mittels Skalpell und Biopsiestanze. Mitte: Positionierung der PDMS-Schablone auf den Glas-Slides unter Zuhilfenahme eines transparenten markierten Glas-Slides. rechts: Spotting der Glas-Slides, indem verschiedene Proteinlösungen in die Kavitäten der PDMS-Schablone pipettiert wurden.

3.2.2 Kultivierung der Maus-Endothel-Fibroblasten

Wildtyp-Maus-Endothel-Fibroblasten (MEF) (zur Verfügung gestellt von Tilman E. Schäfer, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) wurden in DMEM (D5796, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (A3160801, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (15070063, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) kultiviert. Sobald eine Konfluenz von 70 % erreicht wurde, wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit Trypsin-EDTA (25300054, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Germany) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und im Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 10 min lang

bei 1000 rpm zentrifugiert und nach dem Abgießen des Überstands wurde das Zellpallet in Leibovitz' L-15-Medium (21083027, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert, um einen konstanten pH-Wert während der Messzeit sicherzustellen, ohne die CO₂-Konzentration in der Umgebung regeln zu müssen. Die Anzahl der Zellen wurde durch eine Zellzählung in der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Konzentration der Zellsuspension für die SCORE-Messungen auf $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml gebracht. Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen in einer Dichte von 500 Zellen/mm² auf die mit Proteinen gespotteten Glas-Slides aufgebracht und 15 min, 1 h oder 24 h lang inkubiert.

3.2.3 Einwellenlängenreflektometrische Messungen

Wie in [34] beschrieben, wurde der Glastransducer senkrecht mit einer grünen Leuchtdiode (LED) (530 nm) beleuchtet, die mit einem telezentrischen Linsensystem verbunden ist. Die Intensität des reflektierten Lichtes wurde mittels einer CCD-Kamera (2 Megapixel) [92] mit einer Rate von 1,076 frames/s (Abb. 3.5 und 3.6) aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Software CamWare (CamWare V3.00) aufgenommen. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Reglio Dig. MS/CA2-8C, Schlauchdurchmesser: 0.76 mm, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) wurden die Analytlösungen mit einer Geschwindigkeit von 0,37 ml/min über die Transduceroberfläche geleitet. Die Pumpe wurde mit dem Auslass der Flusszelle verbunden, um eine Schädigung der Zellen durch die mechanische Belastung in der Pumpe vor der Messung zu verhindern. Beim Wechsel der Analytlösung wurde der Fluss unterbrochen und das Probengefäß manuell gewechselt. Alle Analytlösungen wurden über den gesamten Messzeitraum mittels eines temperierten Wasserbads auf einer konstanten Temperatur von 37 °C gehalten.

Zu Beginn der Messung wurde unter Verwendung von PBS als Probenflüssigkeit eine Basislinie aufgenommen. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit dem Zellkulturmedium 10 min lang blockiert, um die spätere Anbindung der Zellen von derer anderer Komponenten im Zellkulturmedium unterscheiden zu können. Dann wurde die Zellsuspension ($10 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Leibovitz's L-15-Medium) 15 min lang injiziert. Die Desorption der Zellen von der Oberfläche und das Adhären und Ausspreiten der Zellen wurde in der 45 minütigen Desorptionsphase mit dem Leibovitz's L-15 Medium als Probenflüssigkeit beobachtet. Die Zellen wurden unter der Einwirkung von PBS 15 min lang und Trypsin-EDTA 10 min lang von der Oberfläche abgelöst. Um die Anlage nach den Messungen zu reinigen, wurde Guanidiniumhydrochlorid (0,5 %, pH 1,5) und PBS verwendet. Zusätzlich wurde Ethanol (70 %ig) und deionisiertes Wasser zum Reinigen der Anlage nach einer Messreihe verwendet.

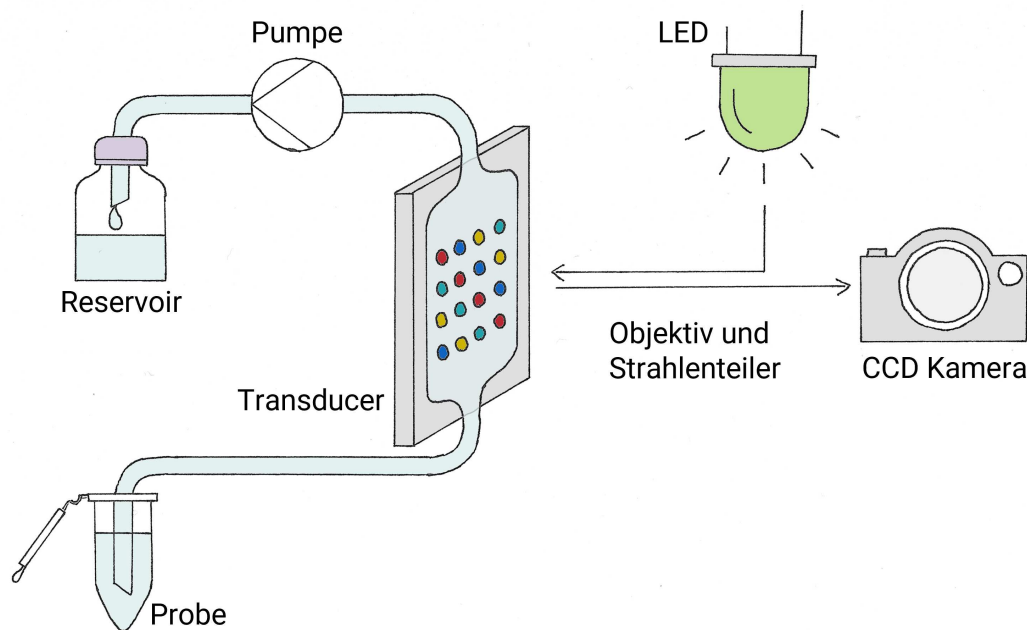


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Messprinzips der SCORE für Zelladsorptionsmessungen. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe können verschiedene Analytlösungen über die Transduceroberfläche geleitet werden. Der senkrecht stehende Transducer mit den immobilisierten Protein-Spots wird im rechten Winkel von der Unterseite mit einer grünen LED beleuchtet. Das grüne Licht (I_0) wird an der Phasengrenze zwischen der Transduceroberfläche und der Flüssigkeit in der Flusszelle teilweise reflektiert (I_R). Die Intensität der reflektierten Strahlen wird mittels eines Objektivs und einer CCD-Kamera aufgenommen.

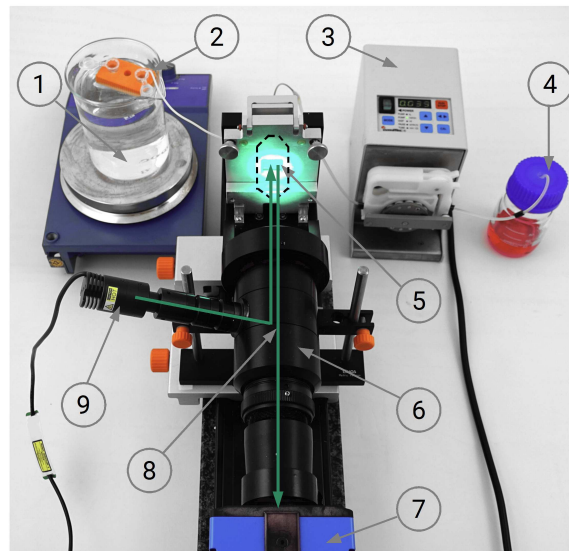


Abbildung 3.6: Bild des verwendeten Messaufbaus. 1: Wasserbad für die Regelung der Temperatur der Probenflüssigkeiten, 2: Probe, 3: Peristaltikpumpe, 4: Abfall, 5: Transducer mit Protein-Spots innerhalb des Fensters der Transducerhalterung, 6: Objektiv, 7: Kamera, 8: Strahlteiler, 9: LED. Die grüne Linie stellt den optischen Weg des Lichtes im Setup dar. Die Position der Flusszelle ist durch die schwarz gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Messablauf zur kombinierten Untersuchung der Adsorptionskinetik und der Zell-Adhäsionskräfte

Die Messungen zur kombinierten Untersuchung der Adsorptionskinetik und der Zell-Adhäsionskräfte wurden bis auf folgende Änderungen analog zu den Messungen in Abschnitt 3.2.3 beschrieben durchgeführt: Um ein Maß für die Stärke der Zell-Adhäsionskräfte zu erhalten, wurde in dieser Messung während der Dissoziationsphase die Pumpgeschwindigkeit von 0,04 ml/min nach den ersten 12 min der Dissoziationsphase in zwei Stufen von je 5 min auf 0,31 ml/min und danach auf 0,59 ml/min erhöht. Das Signal der SCORE wurde aufgenommen, um mögliche Änderungen der Signalintensität verursacht durch das Ablösen der Zellen infolge der gesteigerten Scherkräfte an der Oberfläche zu registrieren.

3.2.4 Bildauswertung in der Einwellenlängenreflektometrie

Die Software ImageJ (ImageJ 1.48v) wurde verwendet, um die Bilder der SCORE zu bearbeiten und auszuwerten. Das mittlere Signal $\bar{S}$ wurde aus den Signalwerten S der einzelnen Pixel n innerhalb des Proteinspots zu jedem Zeitpunkt t nach folgender Gleichung

chung berechnet:

$$\bar{S}(t) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n S_i(t) \quad (3.1)$$

Um die Inhomogenitäten der Belichtung zu kompensieren, wurde das mittlere Signal beim Start der Zelladsorption $\bar{S}_{t=0 \text{ min}}$ vom mittleren Signal $\bar{S}(t)$ abgezogen. Eine Normierung des Signals auf den Hintergrund wurde durchgeführt, um Variationen zwischen den Versuchen, die durch abweichende Konzentration der Zellsuspension und dem jeweiligen Zustand der Zellen hervorgerufen wurden, zu berücksichtigen. Hierfür wurde das gemittelte Signal von 6 Kreisflächen $\bar{R}$ zum Zeitpunkt $t=15 \text{ min}$ symmetrisch um den Spot verteilt verwendet (Abb. 3.7). Das Signal *norm. Γ* wurde wie folgt berechnet:

$$\text{norm. } \Gamma(t) = \frac{\bar{S}(t) - \bar{S}_{t=0 \text{ min}}}{\sum_{i=1}^6 (\bar{R}_{i, t=15 \text{ min}} - \bar{R}_{i, t=0 \text{ min}})} \quad (3.2)$$

Die Ergebnisse dieser Berechnungen für die unterschiedlichen Proteinspots wurden als Sensorgramme dargestellt. Für die Berechnung der Intra-Assay-Variation wurde das SCORE-Signal nach 15 min Messzeit *norm. Γ* der vier Replika der jeweiligen Proteinspots verwendet. Um die Inter-Assay-Variation zu berechnen, wurden die Daten von 3 Messungen mit jeweils 4 Replika gepoolt.

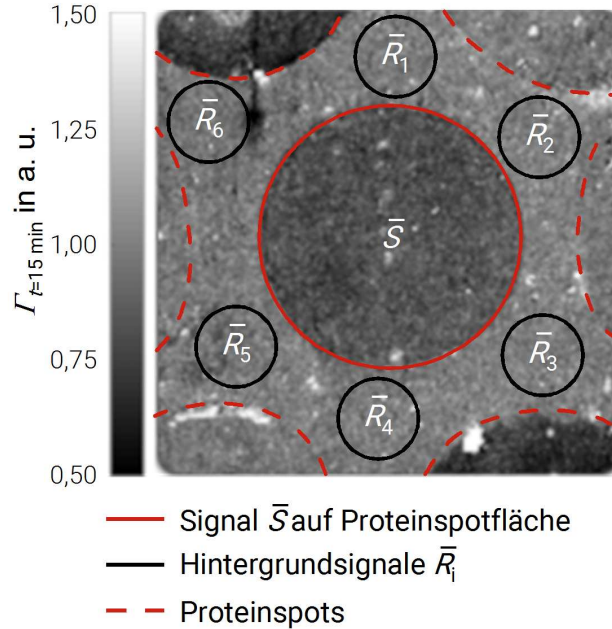


Abbildung 3.7: Bildauswertung und Normierung des SCORE-Signals. Der rote Kreis kennzeichnet den Bereich innerhalb eines Proteinspots. Die Signalwerte der einzelnen Pixel wurden zum mittleren Signal $\bar{S}$ zusammengefasst. Die gestrichelten roten Linien zeigen die Bereiche benachbarter Proteinspots an. Für die Normierung des Signals wurden mittlere Signalwerte von unbeschichteten Bereichen auf dem Transducer $\bar{R}_1, \bar{R}_2, \bar{R}_3, \bar{R}_4, \bar{R}_5$ und $\bar{R}_6$ zum Zeitpunkt $t=15 \text{ min}$ herangezogen. Diese Bereiche sind jeweils mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet.

3.3 ZELLFÄRBUNG UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE

3.3.1 Durchführung

Nach einer Inkubation von 15 min, 1 h oder 24 h wurden die Zellen für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit HISTOFIX (4 %, P087.6, Carl Roth, Deutschland) 15 min lang fixiert. Die fixierten Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und einer 1 %igen TritonX Lösung (8059.0250, Th.Geyer, Renningen, Germany) ausgesetzt. Hierauf folgend wurden die Zellen 30 min lang in AktinGreen (R37110, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und 20 min lang in NucBlue (R37605, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland) im Dunklen inkubiert. Nach vorsichtigem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit ProLong™ Gold Antifade Mountant (P10144, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Germany) und einem Deckglas abgedeckt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Mikroskopiebilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss AXIO-OBSERVER, 1025388774, Zeiss) aufgenommen. Es wurden Übersichtsbilder über den gesamten auslesbaren Bereich der SCORE mit einem 10x-Objektiv aufgenommen. Damit Bilder der Zellen bei leichtem Verkippen der Mikroskopiegläser im Halter im Fokus aufgenommen werden konnten, wurden Stacks mit einem maximalen Abstand von 6 µm aufgenommen.

3.3.2 Auswertung der Mikroskopiebilder

Mit der Software Zen (ZEN Microscopy Software, Zeiss) wurden im ersten Schritt die einzelnen Bilder des Übersichtsbilds aneinander ausgerichtet, um das Übersichtsbild zu erhalten. Aus dem Übersichtsbild wurden dann die Bereiche der einzelnen Spots ausgeschnitten und die Ebenen mit Zellen im Fokus ausgewählt. Die einzelnen Ebenen wurden über den Max.-Projection-Algorithmus der Zen-Software verschmolzen. Um Inhomogenitäten durch den Färbeprozess und Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe über die lange Messzeit auszugleichen, wurde der Kontrast in den einzelnen Farbkanälen in jedem Teilbild angeglichen.

Die Zählung der Zellkerne pro Flächeneinheit A ergab die Zahl der adhärennten Zellen. Die Zahl der adhärennten Zellen auf den jeweiligen Proteinspots wurde auf die Zahl der Zellen im Hintergrund, dem Bereich außerhalb der Proteinspots normiert:

$$norm. Zellzahl = \frac{Zellzahl_{Proteinspot}}{A_{Proteinspot}} \cdot \frac{A_{Hintergrund}}{Zellzahl_{Hintergrund}} \quad (3.3)$$

Die Zellkernzählung wurde in ImageJ durchgeführt. Hierfür wurde zuerst die Fläche

der Proteinspots und des dazugehörigen Hintergrunds bestimmt. Daraufhin wurde ein Threshold-Bild im blauen Farbkanal erzeugt. Über den Watershed-Algorithmus wurden Zellkerne, die bei der Bildung des Threshold-Bildes verschmolzen sind, wieder getrennt. Über die Partikel-Analyse-Funktion in ImageJ wurde die Anzahl der Partikel mit geforderter Größe und Rundheit auf dem Proteinspot und auf dem Hintergrund gezählt.

Für die Bestimmung der Zellfläche wurde analog zur Zellkernzählung vorgegangen. Statt des blauen Kanals wurden für die Bildung des Threshold-Bildes der blaue und der grüne Kanal verwendet. Anstelle der Anzahl der Partikel wurde zur Untersuchung der Zellfläche die mittlere Größe der Partikel berechnet.

3.4 KINETISCHE UNTERSUCHUNG DER ZELLADSORPTION

3.4.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie-Messungen und Auswertung

Messungen zur Machbarkeitsstudie zur kinetischen Auswertung der Zelladsorption mittels RIFS folgten den Beschreibungen in Abschnitt 3.1 mit folgenden Änderungen:

Untersuchung der Zellkonzentration während der Zelladsorptionsmessung

Parallel zu den durchgeführten Messungen der Zelladsorption wurde die Konzentration der Zellsuspension am Outlet bestimmt. Proben wurden im Abstand von 2 min entnommen. Der Zeitpunkt der Probennahme wurde notiert und auf den Zeitpunkt der Analytlösung in der Flusszelle am Transducer zurück gerechnet. Die Zellkonzentration wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 4 Proben ausgezählt und daraus die mittlere Konzentration der Zellsuspension mit zugehöriger Standardabweichung bestimmt.

Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen der Zellsuspension

Für die Untersuchungen der Zelladsorption bei verschiedenen Konzentrationen wurde die Assoziationsphase auf 10 min und die Dissoziationsphase auf 6 min verkürzt. Zellsuspensionen einer Konzentration von $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden für diese Messungen verwendet.

Affinitätstitration mittels Stufenmessungen

Für die Stufenmessungen wurden Zellsuspensionen bei unterschiedlichen Konzentrationen benötigt. Daher wurde eine Stammlösung der Zellen im Kulturmedium von $20 \cdot 10^6$ Zellen/ml angesetzt. Hieraus wurde eine Konzentrationsreihe von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $3,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $6,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $13,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $16,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $20 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt. In aufsteigender Reihenfolge wurden sie in der Assoziationsphase circa 8-16 min lang injiziert. Zeitpunkte des Probenwechsels wurden notiert. Die Zellsuspensionen wurden im Inkubator gelagert und regelmäßig und in jedem Fall kurz vor der Messung geschwenkt, um sedimentierte Zellen wieder in Suspension zu bringen. Die Messungen wurden auf verschiedenen Transducern mit einer Interferenzschicht von entweder 370 nm oder 330 nm mit einer Beschichtung mit Fibronectin durchgeführt.

3.4.2 Einwellenlängenreflektometrische Messungen und Auswertung

Messungen wurden analog zu den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Messungen in der SCORE durchgeführt. Da für die Untersuchung der Kinetik nach dem Modell pseudoerster Ordnung Messungen bei unterschiedlicher Analytkonzentration nötig sind, wurde in einem Vorversuch getestet, welcher Konzentrationsbereich hierfür messbar ist. Die höchste Konzentration war diejenige, die über den Zeitraum der Messung hinweg noch nicht zu starker Ansäuerung des Zellkulturmediums geführt hat. Der Konzentrationsbereich wurde nach unten durch die Konzentration, bei der gerade noch ein Signal erkennbar war, begrenzt. Damit wurden die Zellkonzentrationen $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml für die kinetische Untersuchung der Zelladsorption ausgewählt.

Bildauswertung in der Einwellenlängenreflektometrie

Auch die Bildauswertung der SCORE wurde analog zu dem in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Prozess durchgeführt (Abb. 3.8). Auf die Normierung auf den Hintergrund musste in diesem Fall verzichtet werden, da auch das Signal des Hintergrundes durch die Konzentration der Zellen stark beeinflusst wird. Die Berechnung des Signals der SCORE $\Gamma(t)$ wurde daher wie folgt berechnet:

$$\Gamma(t) = \bar{S}(t) - \bar{S}_{t=0 \min} \quad (3.4)$$

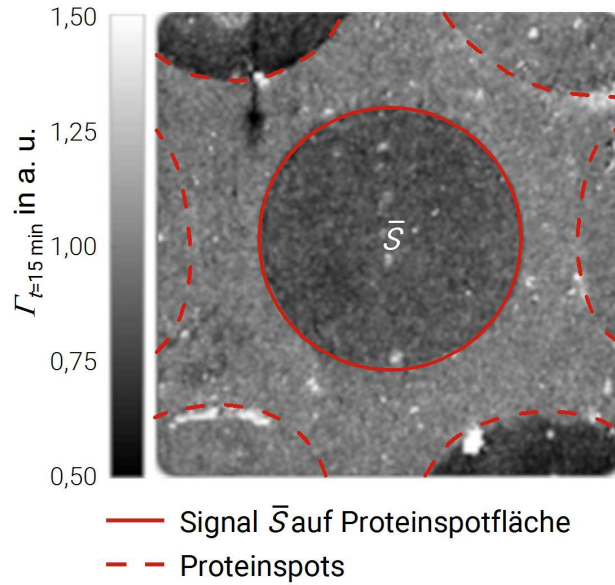


Abbildung 3.8: Bildauswertung des Signals der SCORE bei kinetischen Untersuchungen der Zelladsorption. Der rote Kreis kennzeichnet den Bereich innerhalb eines Proteinspots. Die Signalwerte der einzelnen Pixel wurden zum mittleren Signal $\bar{S}$ zusammengefasst. Die gestrichelten roten Linien zeigen die Bereiche benachbarter Proteinspots an.

Auswertung mit dem Modell Kinetik pseudoerster Ordnung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software OriginPro (OriginLab Corporation, OriginPro 2018 und OriginPro 2021). Für die kinetische Auswertung der Messdaten nach einem Modell Kinetik pseudoerster Ordnung wurden eine Mono-Exponentialfunktion nach Gleichung (2.17) an die Daten der Assoziationsphase angepasst. Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus wurde als Iterationsalgorithmus verwendet. Verschiedene Datenbereiche wurden für die Anpassung der Exponentialfunktion an die Messungen der 4 Replika ausgewählt. Das Ergebnis der Anpassung für k_s bei verschiedenen Konzentrationen der Zellsuspension wurde im nächsten Schritt verwendet, um k_a und k_d zu bestimmen. Nach dem Zusammenhang $k_s = k_a \cdot c + k_d$ (Gleichung (2.18)) wurde über eine lineare Anpassung an k_s über c , k_a aus der Steigung der angepassten Geraden und k_d aus deren Schnittpunkt mit der y-Achse bestimmt.

Für die Festlegung des reduzierten Auswertebereichs wurde das Differenzial $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ aufgetragen. Nach Gleichung (2.21) liegen in dieser Darstellung die Messdaten auf einer Geraden mit negativer Steigung ($-m = k_s$), wenn die Messdaten einem Modell Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Bereiche in denen die Messdaten einem nahezu linearen Verlauf bei allen Replika aufweisen, wurden aus diesen Darstellungen bestimmt und für die Auswertungen mit reduziertem Datenbereich verwendet. Das Differenzial wurde in OriginPro mit dem Glättungsalgorithmus Savitzky-Golay (Ord-

nung der Polynome: 2, Stützpunkte im Fenster: 20) ermittelt.

Die Auswertung der Daten mittels einer globalen Anpassung, wurde analog zu der oben beschriebenen Anpassung einer Mono-Exponentialfunktion an die Daten der Assoziationsphase durchgeführt. Anstelle einer Mono-Exponentialfunktion entsprechend Gleichung (2.17) wurde eine Mono-Exponentialfunktion nach Gleichung (2.20) verwendet. Die Anpassung der Funktion wurde statt an jede einzelne Messkurve, an alle Messkurven mit unterschiedlichen Konzentration der Zellsuspension mit den geteilten Parametern k_a und k_d durchgeführt.

Zur Bestimmung von k_d wurden noch weitere Methoden herangezogen: Einerseits wurde k_d direkt aus der Anpassung einer abfallenden Mono-Exponentialfunktion nach Gleichung (2.22) im Bereich der Dissoziationsphase von 15-20 min und 15-30 min bestimmt. Dabei wurde der Levenberg-Marquardt-Algorithmus als Iterationsalgorithmus verwendet. Andererseits wurde k_d über die vorangegangene Bestimmung von K über die Linearisierung nach Scatchard und den Zusammenhang $K = \frac{k_a}{k_d}$ (Gleichung (2.14)) abgeschätzt. Die Ergebnisse der Anpassung der Mono-Exponentialfunktion an die einzelnen Messkurven für Γ_{GG} wurden für die Auftragung von $\frac{\Gamma_{GG}}{c}$ über Γ_{GG} verwendet. Um K zu bestimmen, wurde eine lineare Regression der Daten durchgeführt und K aus der negativen Steigung der angepassten Geraden abgelesen.

Kinetische Auswertung mittels EviFit

Die Datenauswertung wurde mit der Software EVILFIT (Peter Schuck, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering - NIH, evilfit standalone V3) [60] in MATLAB Umgebung (Mathworks, MATLAB R2020a) durchgeführt. Der größtmögliche sinnvolle Datenbereich wurde für die Auswertung verwendet. Die Basislinie der Assoziations- und der Dissoziationsphase wurde individuell angepasst. Da die präparierten Transducer nicht mehrfach verwendet wurden, wurde kein Verlust von Bindungsstellen an der Oberfläche zwischen den Messungen angenommen. Das Konfidenzniveau wurde auf 0,95 festgesetzt. Für die Verteilungsberechnung von k_d und K_d wurden jeweils 30,0 Stützpunkte verwendet. Die Integration über verschiedene Spitzen in der Verteilung erfolgte ebenfalls mit der Software EVILFIT.

3.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Sofern nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse dieser Arbeit als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung der Daten wurde eine einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit den Signifikanzniveaus von 0,05, 0,01 und 0,001 in Origin (OriginPro 2021, OriginLab, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dieser Teil der Arbeit gliedert sich in drei Kapitel. Im ersten Kapitel wird beschrieben, wie sich RIfS dazu eignet, Adsorptionsprozesse von Zellen auf Oberflächen zu messen. Vorteile und Limitierungen dieser Methode werden aufgezeigt. Auch die Möglichkeit für kinetische Untersuchungen der Zelladsorption wird hier behandelt. Im folgenden Kapitel wird die SCORE herangezogen, um Limitierungen der RIfS bei Messungen des Adsorptionsverhaltens von Zellen zu überwinden. Die hier erzielten Ergebnisse werden mit mikroskopischen Untersuchungen der adhären Zellen verglichen. Es wird diskutiert, wie sich die unterschiedlichen Phasen der Zelladhäsion im Signal der SCORE widerspiegeln. Das letzte Kapitel befasst sich mit der kinetischen Auswertung der Zelladsorption auf Oberflächen.

4.1 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE DER ZELLADSORPTION

Da RIfS eine direkte optische Methode ist, mit der Interaktionen an Grenzflächen untersucht werden können, ist die Anwendung dieser Methode bei der Untersuchung von Interaktionsprozessen von Zellen mit Oberflächen von großem Interesse. Die Notwendigkeit einer Markierung, die viele andere Methoden mit sich bringen, entfällt. Zudem können die Adsorptionsprozesse zeitaufgelöst und in Echtzeit aufgezeichnet werden.

4.1.1 Zelladsorption auf Proteine gemessen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie

Vor den Zelladsorptionsmessungen mittels RIfS wurde sichergestellt, dass die Versuchsbedingungen pH-Pufferung, Temperatur, mechanische Belastung durch das Pumpen der Zellsuspension durch die Schläuche und die starke Bestrahlung mit Weißlicht die Sterblichkeit der Zellen während des Untersuchungszeitraums (1,5 h) nicht beeinflussen.

In Abb. 4.1 ist exemplarisch die Messung der Adsorption von HEK-Zellen auf eine mit Fibronektin beschichtete Oberfläche gezeigt. Nach dem konstanten Signal während der Basislinie mit PBS-Puffer, erkennt man deutlich den Signalanstieg, der durch

den Schichtdickenzuwachs an der Grenzfläche durch die Immobilisierung von Fibronectin verursacht wird. Auch das Absättigen der Oberfläche mit dem Zellkulturmedium hat einen Signalanstieg zur Folge. In dieser Phase binden Bestandteile des Mediums an die Fibronectin-Oberfläche. Dieser Schritt ist wesentlich, um die spätere Anbindung der Zellen an die Oberfläche, von der Anbindung anderer Bestandteile des Zellkulturmediums unterscheiden zu können. In der hier gezeigten Messung wurde das Zellkulturmedium im Bereich 0-17 min injiziert. Auch hier ist ein Anstieg der optischen Dicke und damit Γ zu erkennen. Nach einem anfänglich steilen Anstieg flacht die Kurve über den Messverlauf ab. Während der Desorptionsphase, in der erneut das Zellkulturmedium ohne Zellen über die Oberfläche geleitet wird, ist ein kleiner Signalabfall zu erkennen. Hier lösen sich schwach gebundene Zellen wieder von der Oberfläche ab. Die Reinigung des Transducers und des Setups führt zu einer deutlichen Signalreduktion, die nahezu auf den Anfangswert zurückgeht. Daher kann gefolgert werden, dass mittels Trypsin-EDTA und Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (1 M, pH=1,5) die Zellen, die Proteine und andere Mediumsbestandteile effektiv entfernt werden können.

Die Messung zeigt, dass RIfS eine hervorragende Zeitauflösung bei gleichzeitig sehr gutem Signal-Zu-Rausch-Verhältnis (SNR) bietet. Die Vorteile der Echtzeitmessung zeigten sich darin, dass die Beschichtung der Glasoberfläche mit Proteinen überwacht werden konnte und Transducer mit fehlerhafter Beschichtung sofort erkannt werden konnten. Das durch die Zelladsorption verursachte Signal in RIfS von circa 1 nm beweist, dass der optische Weg der reflektierten Teilstrahlen in RIfS durch die Anlagerung der Zellen ausreichend beeinflusst wird, um eine sehr deutliche Signaländerung zu verursachen. Da in RIfS die Reflexion von Licht ausgenutzt wird, kann eine sehr große Eindringtiefe im Vergleich zu refraktiven Methoden erzielt werden. Refraktive Methoden haben – bedingt durch den exponentiellen Abfall des evaneszenten Feldes – eine sehr viel kleinere Eindringtiefe von beispielsweise circa 100 nm bei SPR bis in den Bereich von 1 μm [95, 96] in den speziell für tiefe Eindringtiefen weiterentwickelten Methoden der SPR (LRSPR). In RIfS verursacht die Veränderung des optischen Weges des reflektierten Teilstrahles die Veränderung im Signal. Damit können Interaktionen an der Grenzfläche mit einer Eindringtiefe innerhalb der Kohärenzlänge des verwendeten Lichtes gemessen werden. Im Falle der hier verwendeten Halogenlampe als Weißlichtquelle, ist die Kohärenzlänge im Bereich von wenigen μm bis in den kleinen zweistelligen μm -Bereich zu erwarten [93, 94]. Die hier verwendeten Endothelzellen sind circa 0,5-3 μm hoch. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Änderung des RIfS-Signals von der gesamten Zelle verursacht wird.

In Hinblick auf die Anwendung von RIfS zur Untersuchung der Interaktion von Zellen mit verschiedenen Biomaterialien, ist von großem Interesse, inwiefern sich Unterschiede in den Oberflächen im gemessenen RIfS-Signal widerspiegeln. Hierfür wur-

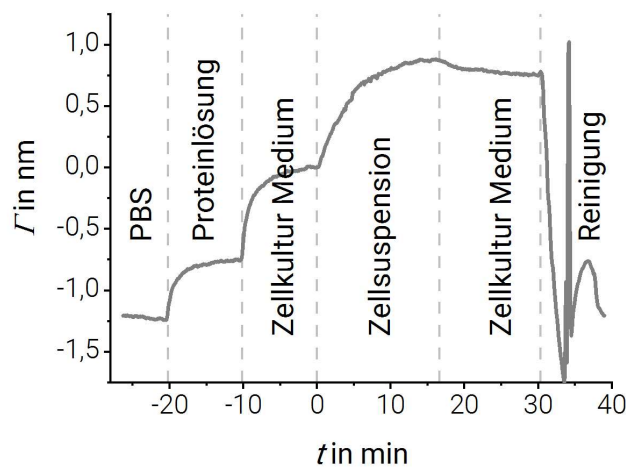


Abbildung 4.1: Sensorgramm der Immobilisierung der Proteine und anschließender Zelladhäsionsmessung. Zu Beginn der Messung wurde 8 min lang PBS-Puffer injiziert, um auf Drifteffekte zu testen. War das Signal der Basislinie konstant, wurde im nachfolgenden Schritt die Oberfläche mit Proteinen funktionalisiert. Hierfür wurde Fibronektin oder natives oder denaturiertes Kollagen verwendet. Nach der Ausbildung einer stabilen Proteinschicht auf der Transducer-Oberfläche – gekennzeichnet durch das Erreichen eines Plateaus nach 7-10 min – wurde das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet. Der Signalanstieg während dieser Messphase weist auf unspezifische Bindung der Mediumsbestandteile mit der Oberfläche hin. Nach dem Erreichen des Plateaus nach 10 min kann davon ausgegangen werden, dass ein weiterer Signalzuwachs durch die Anlagerung der Zellen an die Oberfläche hervorgerufen wird. Dieser Signalzuwachs ist im nächsten Schritt zu beobachten und weist darauf hin, dass die Zellen mit der Transducer-Oberfläche interagieren. Darauf folgt die Desorptionsphase in der erneut das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet wird. Zuletzt wird die Transducer-Oberfläche und das Setup gereinigt.

de die praxisnahe Oberflächenmodifikation durch Physisorption verschiedener Proteine als Modellsystem gewählt. Für diese Versuchsreihe wurden die Proteine Fibronectin und Kollagen verwendet. Diese sind Bestandteil der extrazellulären Matrix und gewährleisten die Anbindung der Zellen an die umgebenden Strukturen. Da sie Bindungsstellen für Integrine in der Zytoplasmamembran der Zellen aufweisen, ermöglichen sie die spezifische Anbindung der Zellen und werden daher eingesetzt, um die Bindung von Zellen auf Oberflächen zu fördern. Kollagen wurde sowohl in nativer Form, als auch in denaturierter Form verwendet. Beim Aufschmelzen der Dreifach-Helix-Struktur von Kollagen durch den Denaturierungsprozess werden Bindungsstellen für die Zellen besser zugänglich [97, 98]. Daher werden andere Bindungscharakteristiken der Zellen auf natives und denaturiertes Kollagen erwartet.

Die Adsorption der HEK-Zellen auf mit denaturiertem Kollagen beschichtetem Glas zeigt einen deutlich stärkeren Signalanstieg in RIfS als die Messungen auf dem mit Fibronectin und nativen Kollagen beschichteten Glastransducer (Abb. 4.2 und 4.3). Der mittlere Schichtdickenzuwachs auf der Oberfläche aus denaturiertem Kollagen beträgt circa 2 nm nach der Zelladsorption, während auf den Oberflächen aus Fibronectin und nativem Kollagen ein mittlerer Schichtdickenzuwachs von circa 0,8 nm gemessen wurde. Auf der Oberfläche mit nativem Kollagen ist eine Desorption der Zellen kaum erkennbar. Auch auf dem mit Fibronectin beschichteten Transducer ist in Messung 1 und 2 kaum eine Desorption der Zellen sichtbar. Die dritte Messung zeigt jedoch einen deutlichen Signalabfall während der Dissoziationsphase. Auf denaturiertem Kollagen ist eine Desorption der Zellen bei allen Messungen deutlich. Diese Messungen zeigen, dass es möglich ist, unterschiedliches Adsorptionsverhalten von HEK-Zellen auf unterschiedlichen Proteinen der extrazellulären Matrix aufzuzeichnen.

Die teilweise großen Schwankungen des RIfS-Signals zwischen den Wiederholversuchen zeigten die Varianzen in der Beschichtung der Oberfläche und im Absorptionsverhalten der Zellen. Der Beitrag durch die Oberflächenbeschichtung wird in diesem Versuchsaufbau durch die Immobilisierungsstrategie minimiert, da in Echtzeit am Schichtdickenzuwachs in der Beschichtungsphase erkennbar ist, ob die Beschichtung erfolgreich durchgeführt wurde. Der jeweilige Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Messung hat jedoch einen großen Einfluss auf die Ergebnisse. Die Expression der Integrine, der Ankermoleküle, mit denen die Zellen an die Proteine binden, ist nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, Zelllinien und Kulturbedingungen [15] unterschiedlich, sondern auch abhängig von den aktuellen Umgebungsbedingungen, dem Stadium der Zellteilung und der Trypsin-EDTA-Behandlung. Die Kombination der genannten Unsicherheiten auf das Bindungsverhalten der Zellen ist für die vergleichsweise große Varianz zwischen den Ergebnissen verantwortlich.

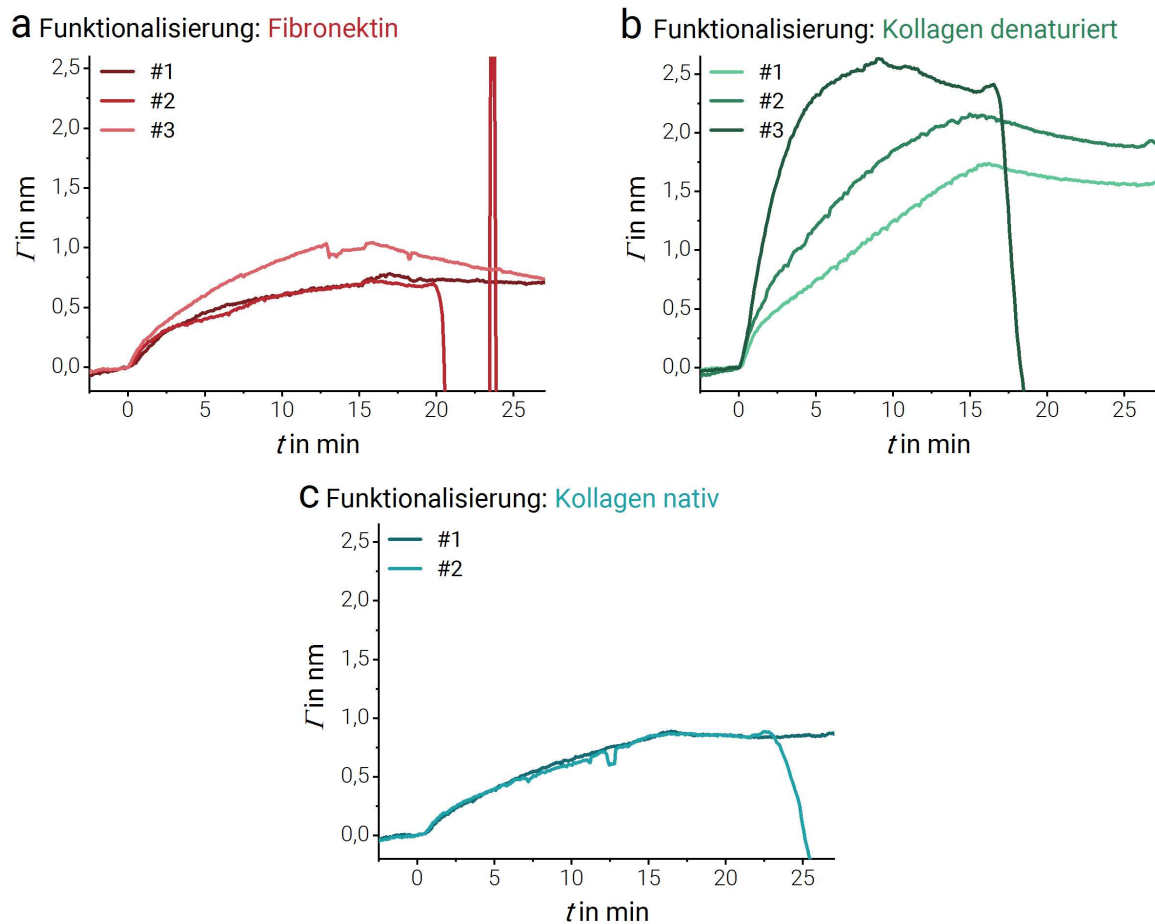


Abbildung 4.2: Zelladsorption und -desorption auf mit unterschiedlichen Proteinen modifizierten Glasoberflächen. Nach der Immobilisierung von a) Fibronektin, b) denaturiertem Kollagen und c) nativem Kollagen und dem Absättigen mit Zellkulturmedium, wurde zum Zeitpunkt 0 s die Zellsuspension injiziert. Daraufgehend wurde die Zelldesorption unter Verwendung des Zellkulturmediums als Probenflüssigkeit untersucht. Es wurden 3 Wiederholmessungen auf den Oberflächen durchgeführt. In der Messreihe mit nativem Kollagen modifizierten Glasoberflächen wurde aufgrund starker Messartefakte Messung #3 von der Analyse ausgeschlossen.

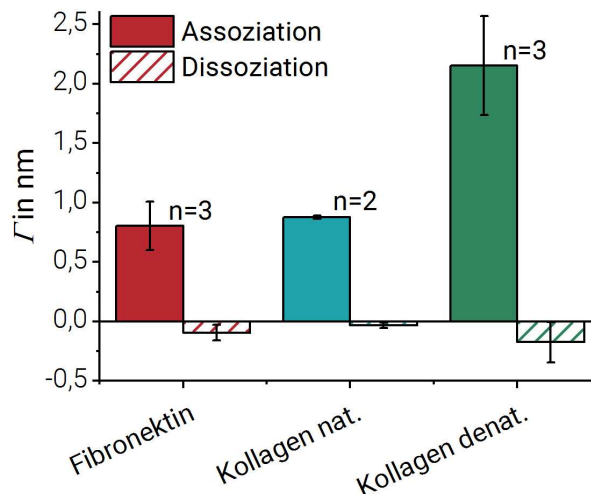


Abbildung 4.3: Änderung der Oberflächenbeladung Γ während der Assoziationsphase (gefüllter Balken) und der Dissoziationsphase (gestreifter Balken) auf den unterschiedlichen Funktionalisierungen der Transducer-Oberfläche.

4.1.2 Langzeitmessung der Zelladsorption mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie

Für Fragestellungen, die einen größeren Zeitbereich umfassen, wie beispielsweise die Proliferation der Zellen auf Oberflächen, ist es von großem Interesse, dass die Interaktionsprozesse zwischen Zellen und Biomaterialien auch über einen längeren Zeitraum mit RIfS gemessen werden können. Auch für die Planung weiterer Versuche ist wichtig zu wissen, wie stabil sich das gewählte Modellsystem über die Zeit verhält. In Abb. 4.4 ist exemplarisch eine Adsorptionsmessung von HEK-Zellen auf einem mit denaturiertem Kollagen beschichteten Glastransducer abgebildet. Sie zeigt eine sehr stabile Zelladsorption über mehrere Stunden hinweg. Nach einer Messdauer von circa 2,5 h verstärkt sich der Signalabfall während der Dissoziation leicht. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass nach 2,5 h die Umgebungsbedingungen außerhalb eines Inkubators Auswirkungen auf die Adhäsion der Zellen haben. Daher wird eine Versuchsdauer von 2,5 h bei weiteren Versuchen mit diesem Modell nicht überschritten. Diese Daten zeigen, dass es sehr gut möglich ist, mittels RIfS das Verhalten von Zellen auf Oberflächen auch über längere Zeiträume zu untersuchen. Durch die Verwendung von RIfS entstehen keine Einschränkungen oder Anforderungen, die über die Anpassung der Umgebungsbedingungen für die jeweilige Zellkultur hinausgehen. Da es Inkubatoren auch in Bauweisen gibt, die es ermöglichen, dass das RIfS-Setup darin platziert werden kann, ist eine technische Umsetzung der Anpassung der Umgebungsbedingungen leicht möglich.

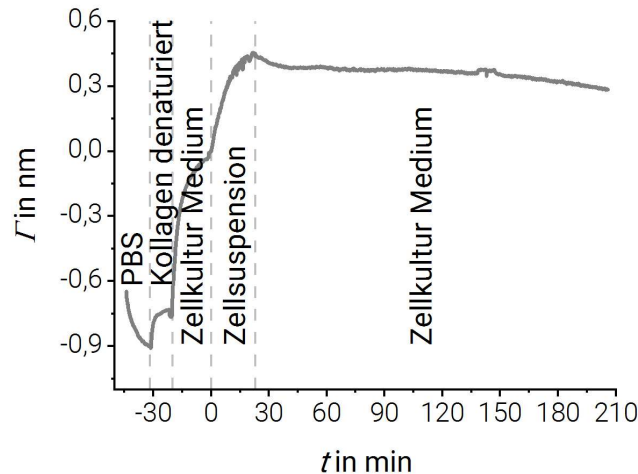


Abbildung 4.4: Langzeitmessung der Zelladsorption auf einem mit denaturiertem Kollagen funktionalisierten Glastransducer. Nach dem Einschwingen der Basislinie mit PBS-Puffer, wurde die Oberfläche mit denaturiertem Kollagen funktionalisiert. Hierauf folgte das Absättigen der Oberfläche mit Zellkulturmedium 20 min lang. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension 25 min lang injiziert. Der deutliche Signalanstieg zeigt die Anlagerung der Zellen an die Transducer-Oberfläche. Die Dissoziationsphase wurde auf 3 h verlängert. Nach einem Signalabfall zu Beginn der Dissoziationsphase bleibt Γ circa 2 h konstant, bevor ein schwacher stetiger Signalabfall bis zum Ende der Messung zu beobachten ist.

4.1.3 Machbarkeitsstudie zur kinetischer Auswertung der Zelladsorptionsmessungen

Wie beschrieben, ist ein wesentlicher Vorteil der RI_{FS} zur Untersuchung der Zelladsorption die hohe zeitliche Auflösung. Dies erlaubt – im Gegensatz zu vielen anderen Methoden – die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Anbindung. Auch die Untersuchung der Adsorptionskinetik ist daher grundsätzlich möglich.

Damit eine gute Untersuchung der Kinetik nach dem Modell pseudoerster Ordnung und darauf basierende Modelle realisierbar wird, muss die Konzentration der Zellen über den Messverlauf konstant bleiben. Zudem muss eine Abhängigkeit des gemessenen Signals von der Zellkonzentration vorliegen. Diese beiden Bedingungen werden im Folgenden untersucht und bewertet.

Grundlegende Untersuchungen

Die Konzentration der Zellsuspension wurde in Fraktionen von je circa 2 min am Outlet in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abb. 4.5). Nach einer Messzeit von circa 5 min erreicht die Zellkonzentration nahezu den erwarteten Wert. Die niedrigeren Konzentrationen zuvor kommen dadurch zustande, dass sich viele Zellen an die Transducer-Oberfläche wie den Oberflächen der Schläuche und der Pumpe im Setup anlagern. Nach einem Ausreißer bei circa 7 min, der durch ein abgelöstes Zellcluster verursacht wurde, pendelt die gemessene Zellkonzentration am Outlet um den erwarteten Wert.

Um die Zellkonzentration über die Messung noch besser konstant zu halten, wurden die Zellsuspensionen in allen folgenden Messung entweder mit einem Rührfisch kontinuierlich oder durch regelmäßiges Schütteln resuspendiert.

Es liegt eine Abhängigkeit des RIfS-Signals bei der Anlagerung von HEK-Zellen auf einen mit denaturiertem Kollagen beschichteten Glastransducer von der Zellkonzentrationen vor (Abb. 4.6). Bei einer Konzentration von $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml zeigt das RIfS-Signal den größten Schichtdickenzuwachs, gefolgt von der Analytlösung mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml und den geringsten Schichtdickenzuwachs bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml. In Anbetracht der teilweise großen Varianz zwischen den Wiederholversuchen auf den unterschiedlichen Oberflächen (Abb. 4.2) wird klar, dass bei jeder Konzentration eine größere Anzahl an Wiederholmessungen durchgeführt werden müsste, um aussagekräftige Daten für die unterschiedlichen Konzentrationen zu erhalten. Da die größten Varianzen durch die unterschiedlichen Zustände der verwendeten Zellen verursacht werden, ist es empfehlenswert, alle Konzentrationen der Zellsuspension aus der selben Zellprobe herzustellen und zu messen. Bei dem hier vorgestellten Setup und Messprotokoll übersteigt dies jedoch die Kapazitäten. Bei 7 verschiedenen Konzentrationen zur Bestimmung der Ratenkonstanten k_a und k_d über einen exponentiellen Fit der Adsorptions- und Dissoziationsphase, würden die Messungen 2-3 Tage in Anspruch nehmen. HEK-Zellen sind adhärent wachsende Zellen, können daher nicht lange in Suspension gehalten werden und wachsen und teilen sich über einen so langen Zeitraum, wodurch die Messungen nicht vergleichbar wären. Daher muss eine Möglichkeit gefunden werden, die Messdauer drastisch zu verkürzen, um das Vorhaben der kinetischen Untersuchungen praktisch durchführen zu können.

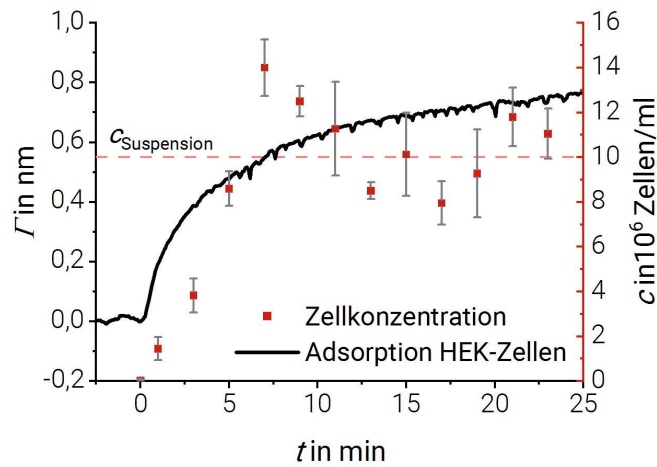


Abbildung 4.5: Untersuchung der Zellkonzentration während der Zelladsorptionsmessung. Die schwarze Linie stellt den Signalverlauf der Zelladsorptionsmessung in RIfS dar. Im Zeitraum 0-25 min erkennt man den zu Beginn steilen Anstieg des Signals, verursacht durch die Anlagerung der Zellen auf die Transducer-Oberfläche. Die mittlere Konzentration der Zellsuspensionsfraktionen am Outlet ist durch die roten Punkte mit dazugehöriger Standardabweichung ($n=4$) gekennzeichnet. Die rote gestrichelte Linie stellt die theoretische Konzentration der Zellsuspension dar.

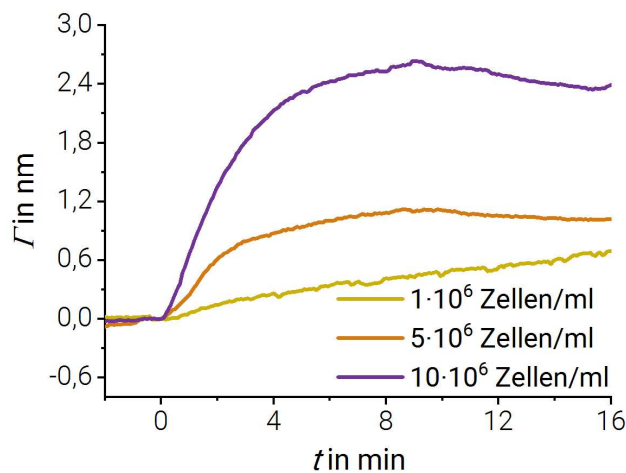


Abbildung 4.6: Sensorgramme der Adsorption und Desorption von Zellen auf mit denaturiertem Kollagen beschichteten Glasoberflächen bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen. Nachdem 10 min lang die Zellsuspension injiziert wurde, wurde das Zellkulturmedium verwendet, um das Desorptionsverhalten zu untersuchen. Die Konzentrationen der Zellsuspension $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (violette Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (orange Linie) und $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie) wurden untersucht.

Affinitätstitration mittels Stufenmessungen

Verzichtet man auf einen Teil der Information und bestimmt K anstelle von k_a und k_d der Interaktion der Zellen mit der Oberfläche, ist lediglich die Bestimmung von Γ_{GG} nötig (siehe Gleichung (2.19)). Γ_{GG} kann auch über die stufenweise Erhöhung der Konzentration innerhalb einer Messung bestimmt werden. Karlsson et al. beschreiben hingegen ein Modell, das auch eine kinetische Auswertung der Sensordaten einer Stufenmessung (Titration) mit Bestimmung von k_a und k_d möglich macht [52]. Unter anderem wurde diese Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen Immunglobulin G und verschiedenen Bindungspartnern bei der Bio-Layer-Interferometrie – einer der RIfS Technologie sehr ähnlichen Methode – angewandt [99]. Da dieses Vorgehen deutlich zeiteffizienter ist, als die vollständige Messung bei jeder einzelnen Konzentration, können mit diesem Ansatz Einschränkungen der zu langen Messdauer überwunden werden.

In Zeitintervallen von circa 10-15 min, wurde die Konzentration der Zellsuspension in sieben Schritten erhöht. Die jeweilige Plateauhöhe nach Erhöhung der Konzentration stellt ein Maß für Γ_{GG} dar. Zu erwarten ist ein stufenweiser Anstieg des Signals mit kurzen Plateauphasen, wobei die Höhe der Stufen im mittleren Konzentrationsbereich am größten ist. Abb. 4.7 zeigt, dass dies durch Messungen nicht bestätigt werden konnte. In Abb. 4.7 a sind weder Stufen noch ein sukzessiver Anstieg von Γ erkennbar. Da sich der starke Abfall von Γ ab circa 30 min nicht durch die Ablösung von Zellen und Zellclustern erklären lässt, muss davon ausgegangen werden, dass das Modell zur Berechnung von Δnd bei dem verwendeten Schichtsystem und den verwendeten Zellen die Realität nicht ausreichend widerspiegelt. Der beobachtete Signalabfall ist somit als Messartefakt zu bewerten. Bei Wiederholversuchen war auffällig, dass kaum Stufen im Signal erkennbar waren und dass das Signal mal zu und mal abnahm. Da mit dem verwendeten Schichtsystem keine reproduzierbaren und stichhaltigen Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde ein weiteres Schichtsystem für die Anwendung zur Messung von Zelladsorption herangezogen.

In Abb. 4.7 b ist eine Stufenmessung mit einer etwas dünneren Interferenzschicht von 330 nm abgebildet. Hier ist zu erkennen, dass sich Stufen im Signalverlauf bei der schrittweisen Injektion der Zellsuspensionen mit stufenweise steigender Konzentration ausbilden. Auch wird – wie erwartet – vorwiegend eine Signalzunahme mit steigender Konzentration gemessen. Wie jedoch ganz deutlich erkennbar ist, unterscheiden sich die Stufen im Kurvenverlauf sehr. Bei einer Konzentration von $16,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml ist der Anstieg sehr steil, wogegen die Krümmung der Kurve bei $20 \cdot 10^6$ Zellen/ml deutlich flacher ist. Zudem wurde bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml ein aus den Messbedingungen und dem verwendeten Modell heraus nicht erklärbarer Signalabfall gemessen.

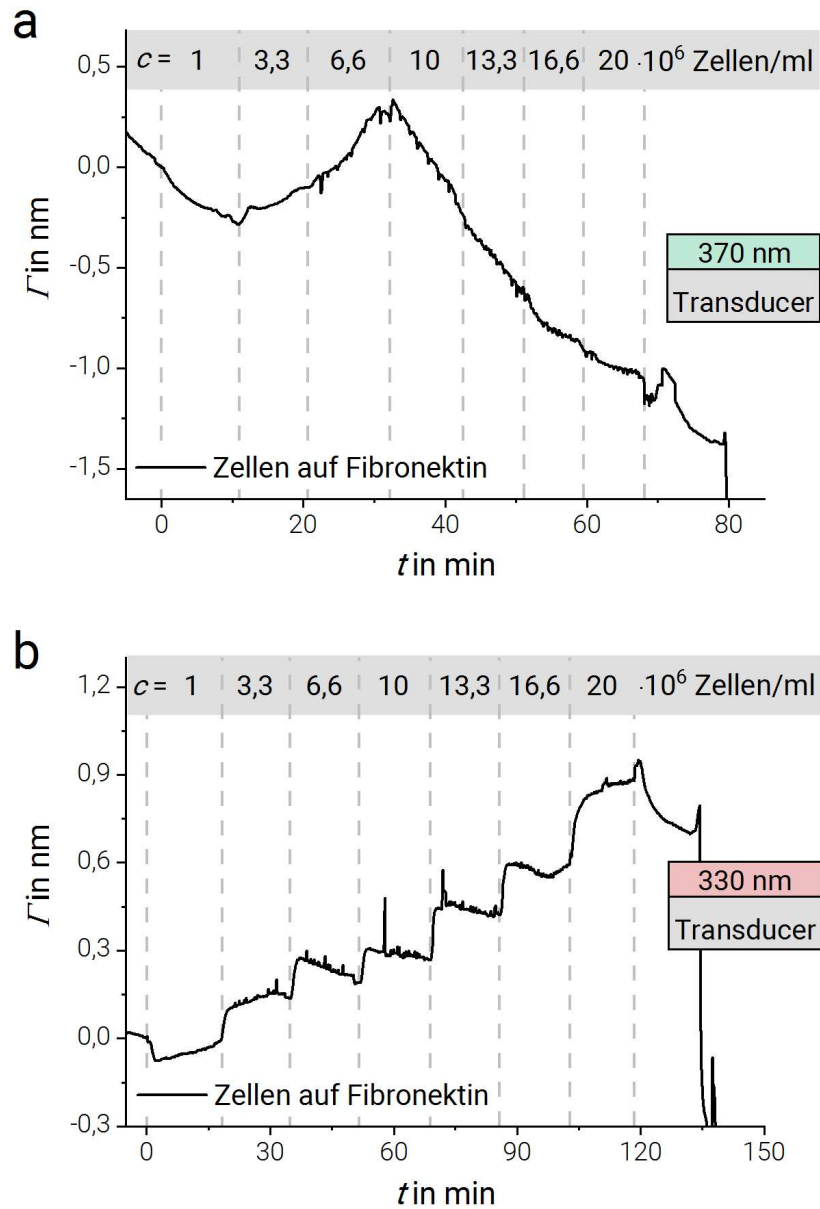


Abbildung 4.7: Affinitätstitration mittels Stufenmessung zur kinetischen Auswertung der Zelladsorption auf mit Fibronectin beschichtetem Glas auf einem Transducer mit einer Interferenzschicht von a) 370 nm und b) 330 nm. Die schwarze Kurve stellt jeweils den gemessenen Signalverlauf dar und die grau gestrichelten Linien zeigen die Zeitpunkte, an denen die Analytlösung zu Zellsuspensionen mit höherer Zellkonzentration gewechselt wurden.

Zusammenfassend ist das Bestimmen der kinetischen Parameter der Zelladsorption mittels RIfS theoretisch möglich und erste Ergebnisse zeigen, dass Voraussetzungen für ein kinetisches Modell pseudoerster Ordnung durch den Messaufbau erfüllt sind. Nach der klassischen Auswertemethode sind die Messungen praktisch jedoch nicht durchführbar, weil der Zeitaufwand den möglichen Zeitrahmen beim Messen mit Zellen bei diesen Bedingungen übersteigt. Bei verändertem Messablauf zur stufenweisen Erhöhung der Zellkonzentration in der Analytlösung wurden diese Probleme überwunden. Die erhaltenen Ergebnisse konnten jedoch nicht interpretiert werden und eine Anpassung des mathematischen Modells zur Auswertung der Änderungen im Interferenzspektrum ist nötig, um zukünftig kinetische Parameter der Zelladsorption mittels RIfS zu untersuchen.

4.1.4 Vorüberlegungen zum Messen bei einer Wellenlänge

Aus den vorangegangenen Kapiteln ist deutlich geworden, dass die Messung der Zelladsorption auf Oberflächen mittels RIfS sehr gut möglich ist und zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Jedoch ist auch klar geworden, dass beim Arbeiten mit Zellen mit einer vergleichsweise hohen Streuung der Messdaten zu rechnen ist und daher viele Replikate benötigt werden, um fundierte Aussagen über die Anbindungsprozesse zu treffen. Da große Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchstagen festgestellt wurden, birgt die Messung dieser Prozesse in einem Multiplexing-Aufbau, in dem viele Oberflächen zeitgleich untersucht werden können, großes Potential diese Schwierigkeiten zu überwinden.

Für Fragestellungen wie diese wurde RIfS dahingehend weiterentwickelt, dass anstelle der Verschiebung des Interferenzspektrums nun die Änderung der Intensität des reflektierten Lichtes bei einer Wellenlänge betrachtet wird. Hierbei „tauscht“ man den Informationsgehalt aus dem Interferenzspektrum gegen die Möglichkeit, orts aufgelöst messen und damit mehrere Oberflächen zeitgleich untersuchen zu können [34, 35].

Bevor die Messungen mit Zellen in dieser neuen Methode etabliert werden konnte, wurde zuerst untersucht, ob die Auswertung der spektralen Daten aus RIfS auch bei einer Wellenlänge sinnvolle Ergebnisse liefert. Hierfür wurden zwei gängige Wellenlängen (530 nm und 630 nm) verwendet. Zudem wurde die optimale Wellenlänge zur Auswertung bei dem hier verwendeten Schichtsystem und Zellen als Analyten bestimmt. Zwei Verfahren – die Optimierung des Signalhubes nach Rüdiger Frank [91] und die Wendepunktanalyse des Interferenzspektrums – wurden zu diesem Zweck herangezogen.

Bei der Auswertung der spektralen Daten ist deutlich erkennbar, dass aus der Verschiebung des Minimums und aus der Verschiebung des Maximums sehr ähnliche Änderungen der optischen Schichtdicke Γ berechnet wurden (Abb. 4.8 a, c).

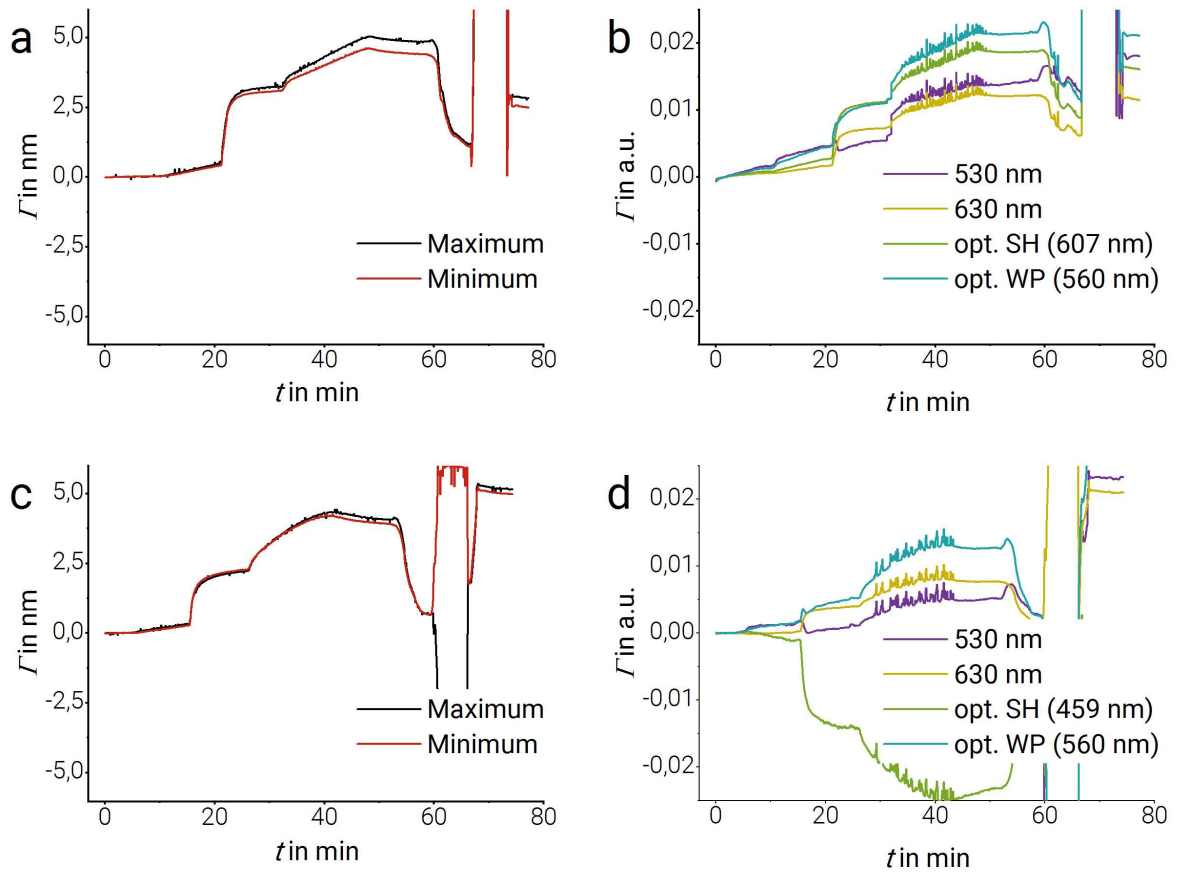


Abbildung 4.8: Vergleich der Änderung der optischen Schichtdicke, berechnet aus der Verschiebung des Interferenzspektrums (a, c), mit der Auswertung der Intensitätsänderung bei einer Wellenlänge (b, d). Die berechneten Sensorgramme sind exemplarisch für Versuch 1 (a, b) und Versuch 2 (c, d) dargestellt. Zu Beginn der Messung wurde 8 min lang PBS-Puffer injiziert. Im nachfolgenden Schritt wurde die Oberfläche mit denaturiertem Kollagen funktionalisiert. Ab dem Zeitpunkt 20 min wurde das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet. Nach dem Erreichen des Plateaus nach 10 min wurde die Zellsuspension injiziert. Darauf folgt die Desorptionsphase, in der erneut das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet wird. Zuletzt werden die Transducer-Oberfläche und das Setup gereinigt. Zur Berechnung der optischen Schichtdicke aus der Verschiebung des Interferenzspektrums (a, c) wurde sowohl die Verschiebung eines Maximums (schwarze Linie), als auch die Verschiebung eines Minimums (rote Linie) herangezogen. Für die Berechnung der Intensitätsänderung bei einer Wellenlänge (b, d) wurde die Signaländerung bei 530 nm (violette Linie), 630 nm (gelbe Linie) und den optimierten Wellenlängen durch Maximierung des Signalhubes (grüne Linie) und durch eine Wendepunktanalyse (blaue Linie) betrachtet.

Auch hier zeigen die Abweichungen der beiden Kurven voneinander, dass das hier verwendete Modell zur Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten nicht vollständig die Prozesse an der Oberfläche widerspiegelt. Vergleicht man die Ergebnisse der spektralen Analyse der Daten mit den Ergebnissen der berechneten Signaländerung durch die Intensitätsänderung bei einer Wellenlänge, wird deutlich, dass in beiden Verfahren das Signal während der Anlagerung der Zellen auf die Oberfläche im Vergleich zur Basislinie stärker schwankt. Im Falle der spektralen Analyse ist dieser Effekt mit dem Auge kaum erkennbar, während die Instabilität des Signals während der Zellanlagerung bei der Auswertung der Daten bei einer Wellenlänge sehr deutlich ist. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um, durch die Fluidik oder das Spektrometer verursachtes, erhöhtes Rauschen handelt, da die Signalschwankungen nicht zufällig um den Kurvenverlauf gestreut sind. Vielmehr sind spikeförmige Ausschläge des Signals hin zu höheren Signalen erkennbar, auch wenn die Analyse eine negative Signaländerung bei der Anlagerung der Komponenten und Zellen auf die Oberfläche ergibt. Daher wird darauf geschlossen, dass die gemessenen Effekte von der Interaktion der sich anlagernden Zellen mit dem eingestrahlteten Licht herrühren. L. Limozin und K. Sengupta zeigten, dass starke Signalfuktuationen bei der Adhäsion der Zellen durch die Formänderung der Zellen an der Oberfläche bei der Untersuchung mittels quantitativer Interferenzreflexionsmikroskopie bei einer Wellenlänge von 546 nm auftreten [100]. Diese Interferenzeffekte sind sehr stark ortsabhängig und da in dem hier verwendeten Setup das Signal über eine vergleichsweise große Fläche von circa 1 mm² gemittelt wird, sollten sich diese Effekte im Mittel gegenseitig kompensieren. In der „angle-resolved low-coherence interferometry“, der Durchflusszytometrie und anderen optischen Methoden wird Lichtstreuung im visuellen, infraroten und ultravioletten Spektralbereich genutzt, um Informationen über Zellgröße, Zellkerngröße und andere morphologische Charakteristika ohne den Einsatz von Markermolekülen zu erhalten [101–104]. Da in diesem Messsetup mit Licht einer Wellenlänge im Bereich der Größe von Zellkernen gearbeitet wird, ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten spikeförmigen Signalaussschläge durch Mie-Streuung am Zellkern und anderen Zellbestandteilen adhärenter oder sich in Lösung befindender Zellen ausgelöst werden.

Die Auswertung der RfS-Messungen durch die Signaländerung bei einer Wellenlänge lieferte unzureichende Ergebnisse. Im exemplarisch gezeigten Versuch 1 und 2 (Abb. 4.8 b, d) ist im Schritt der Proteinadsorption eine negative Änderung des Signals bei einer Wellenlänge von 530 nm zu erkennen. Dies würde für einen Rückgang der Oberflächenbeladung sprechen, was nicht zu erwarten ist. Auch ein vergleichsweise kleiner Signalhub wurde bei dieser Wellenlänge bei beiden Versuchen gefunden. Bei der Auswertung bei der Wellenlänge 630 nm des Versuchs 1 und 2 (Abb. 4.8 b, d) zeigen die Ergebnisse, dass ein vergleichsweise kleine Signaländerung während der Zelladsorption erzielt wurde. Daher wird die, durch die Zellanlagerung verursachte, Signal-

änderung im Vergleich zur Anlagerung des Kollagens an die Oberfläche unterschätzt.

Durch die Optimierung der Wellenlängen für die Auswertung der Intensitätsänderung, wurden überzeugende Ergebnisse erreicht, die den Kurvenverlauf der spektralen Auswertung sehr gut wiedergeben (Abb. 4.9 b, d). Durch die Optimierung der verwendeten Wellenlänge nach der Wendepunktanalyse, wurde ein sehr guter Signalhub erzielt und die Signaländerungen in den jeweiligen Messphasen sind sehr gut vergleichbar mit den berechneten Änderungen der optischen Schichtdicke. Die Wellenlänge 560 nm ist damit sehr gut dazu geeignet, die RIfS-Daten beim hier verwendeten Schichtsystem auszuwerten. Auch die Auswertung bei der, nach dem maximalen Signalhub optimierten, Wellenlänge lieferten überzeugende Ergebnisse. Diese zeigten erwartungsgemäß von allen ausgewerteten Messungen den größten Signalhub. Bei dieser Auswertemethode bestand jedoch bei dem hier verwendeten Schichtsystem das Risiko, dass auch Wellenlängen an den Rändern des Messbereichs als optimal beurteilt wurden. In Abb. 4.8 d ist beispielhaft die Auswertung einer Messung gezeigt, bei der die Optimierung der Wellenlänge für die Auswertung nach der Maximierung des Signalhubes eine Wellenlänge am Rand des untersuchten Spektralbereiches lieferte. Anders als im gezeigten Versuch 1 (Abb. 4.8 b) liegt in diesem Fall die optimale Wellenlänge auf der anderen Flanke des Extrempunktes im Interferenzspektrum. Dies führt zur horizontalen Spiegelung des Sensorgramms, da eine Zunahme der optischen Schichtdicke eine Verringerung der Intensität des reflektierten Lichtes bei dieser Wellenlänge zur Folge hat. Auch damit werden sinnvolle Ergebnisse erzielt, wobei die Ermittlung der optimalen Wellenlänge am Rand des untersuchten Spektralbereichs darauf hindeutet, dass das Optimum außerhalb des Messbereiches liegt. Dies bringt das Risiko mit sich, dass sich die Intensitätsänderung im Bereich der Änderung der optischen Schichtdicke nicht linear verhält.

Der Vorteil der Optimierung der Wellenlänge zur Auswertung nach der Wendepunktanalyse (Abb. 4.9) liegt im großen linearen Bereich des Signals bei Änderungen der optischen Schichtdicke. Die Ergebnisse der nach dem maximalen Signalhub optimierten Wellenlängen zeigten hingegen keine zufriedenstellende Linearität der Signaländerung bei Änderungen der optischen Schichtdicke. Die Auswertung nach den gängigen Wellenlängen 530 nm und 630 nm zeigten ebenfalls eine schlechte bzw. mäßige Linearität im Vergleich zur optimierten Wellenlänge nach der Wendepunktanalyse. Durch die sehr schlechte Linearität des Signals in Bezug auf die Änderung der optischen Schichtdicke, ist der unzutreffende Signalverlauf bei der Wellenlänge 630 nm zu erklären (Abb. 4.9).

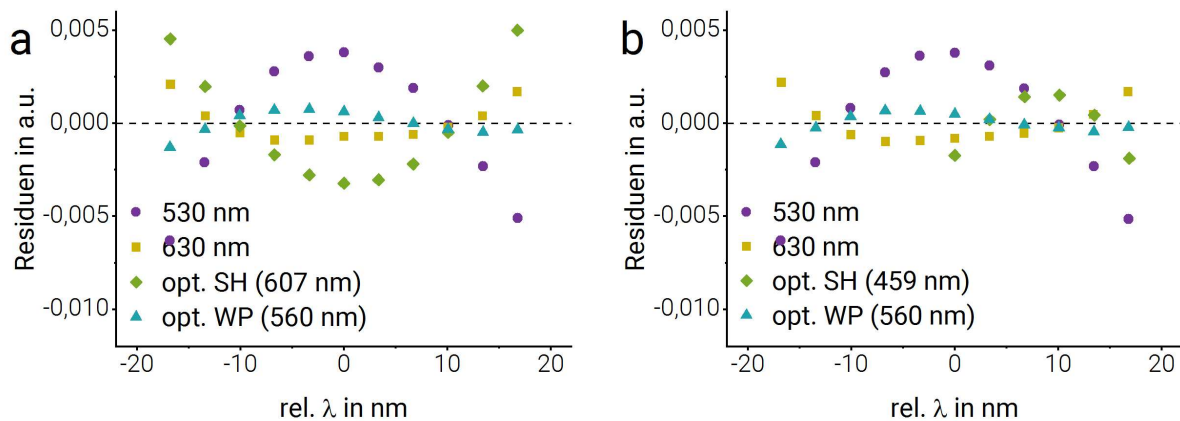


Abbildung 4.9: Bewertung der Linearität des berechneten Signals bei verschiedenen Wellenlängen in Bezug auf die Änderung der optischen Schichtdicke. An den Wellenlängen 530 nm, 630 nm und den optimierten Wellenlängen nach der Maximierung des Signalhubes oder der Wendepunktanalyse, wurde eine lineare Anpassung im Bereich ± 20 nm um die gewählte Wellenlänge durchgeführt. Die Abweichungen des Interferenzspektrums von der linearen Anpassung sind als Residuen um die Wellenlängen 530 nm (violette Symbole), 630 nm (gelbe Symbole), der optimierten Wellenlängen nach der Maximierung des Signalhubes (grüne Symbole) und der Wendepunktanalyse (blaue Symbole) dargestellt. Die grau gestrichelte horizontale Linie zeigt theoretisch vollständige Linearität.

Die Analyse des SNR während der Basislinie der Messung zeigt, dass sowohl mit der spektralen Auswertung, wie auch der Auswertung bei einer Wellenlänge, zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden (Tabelle 4.1). Beide Methoden eignen sich bei sorgfältiger Wahl der Wellenlänge zur Auswertung sehr gut, um valide Aussagen zum Signalverlauf treffen zu können. Die Ergebnisse der SNR-Analyse waren erwartungsgemäß für die spektrale Auswertung deutlich besser. Da das SCORE-Messsetup für die Auswertung bei einer Wellenlänge optimiert wurde, ist zu erwarten, dass das SNR mindestens vergleichsweise hoch ist, wie in den hier vorgestellten Ergebnissen.

Tabelle 4.1: Ergebnis der Analyse des Signal-Zu-Rausch-Verhältnisses der Basislinie für die Auswertung bei verschiedenen Wellenlängen und der spektralen Auswertung der Zelladsorption gemessen mittels RfS. Drei exemplarische Messungen – Versuch 1, Versuch 2 und Versuch 3 – wurden für die Analyse herangezogen.

	SNR Versuch 1	SNR Versuch 2	SNR Versuch 3
530 nm	1716	13643	2008
630 nm	1502	6154	1846
opt. SH	1586	8053	1967
opt. WP	1694	15763	1226
Maximum	29745	27387	7769
Minimum	68736	114940	9806

4.2 EINWELLENLÄNGENREFLEKTOMETRIE DER ZELL- ADSORPTION

Um die Limitierungen der Einzelplatz-RfS zu überwinden, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, mehrere Proben gleichzeitig zu messen. Mit einem Multiplexing-Aufbau kann der Einfluss des jeweiligen Zustands der Zellen bei kleinem Stichprobenumfang überwunden werden. Im Folgenden wird die Eignung von SCORE zur Beobachtung von Adsorptions- und Adhäsionsprozessen von Zellen an Proteinoberflächen untersucht. Zuerst werden die Ergebnisse der SCORE vorgestellt, gefolgt von dem Vergleich zu fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der adhärennten Zellen. Abschließend wird gezeigt, wie sich morphologische Veränderungen der Zelle während der Adhäsion auf das Signal der SCORE auswirken.

4.2.1 Zelladsorption auf Proteine gemessen mit Einwellenlängenreflektometrie

Die Glas-Slides wurden erfolgreich mit 20 Protein-Spots hergestellt und mit SCORE vermessen. Die Anlagerung der Zellen zeigte auf verschiedenen Oberflächen unterschiedliche Signale nach einer Messzeit von 60 min (Abb. 4.10 a). Während die Signaländerung auf Kollagen und LamininSpots vergleichsweise homogen über den gesamten Bereich beobachtbar ist, zeigen die Spots aus Albumin starke Inhomogenitäten. Diese werden auf Inhomogenitäten der Proteinbedeckung der Oberfläche zurückgeführt. Während des Spottings scheint das hydrophobe Albumin besser mit der PDMS-Schablone zu interagieren, als mit der Glasoberfläche. Dies führt zur beobachteten Donutform der Signaländerung auf den Albumin-Spots mit höherer Konzentration an Albumin und damit verringertem Signal an den Rändern. Die Inhomogenitäten auf den Oberflächen Vitronectin und Fibronectin sind auf Prozesse während der Zelladsorption zurückzuführen. Diese werden im Kapitel Abschnitt 4.2.6 genauer untersucht und diskutiert.

Die aufgenommenen Sensorgramme zeigen ein ausreichendes SNR-Verhältnis und eine sehr gute zeitliche Auflösung (Abb. 4.10 b). Damit sind die Ergebnisse von SCORE sehr gut geeignet, um Interaktionen von Zellen mit Oberflächen aufzunehmen. Vor der Injektion der Zellsuspension erreichte das Signal nach der Anlagerung des Zellkulturmediums ein Plateau. Daher wird die darauffolgende Zunahme des Signals nur durch die Anlagerung der Zellen an die Oberfläche verursacht. Nach der 15 minütigen Anlagerung der Zellen und der Beobachtung der Desorptionsphase mit Zellkulturmedium für weitere 45 min, wurden die Zellen mittels PBS und Trypsin-EDTA lysiert und von der Oberfläche abgelöst. Rückstände der Zellen und Proteine wurden in einem Reinigungsschritt aus der Anlage entfernt. Die Möglichkeit, die Probenflüssigkeiten während der

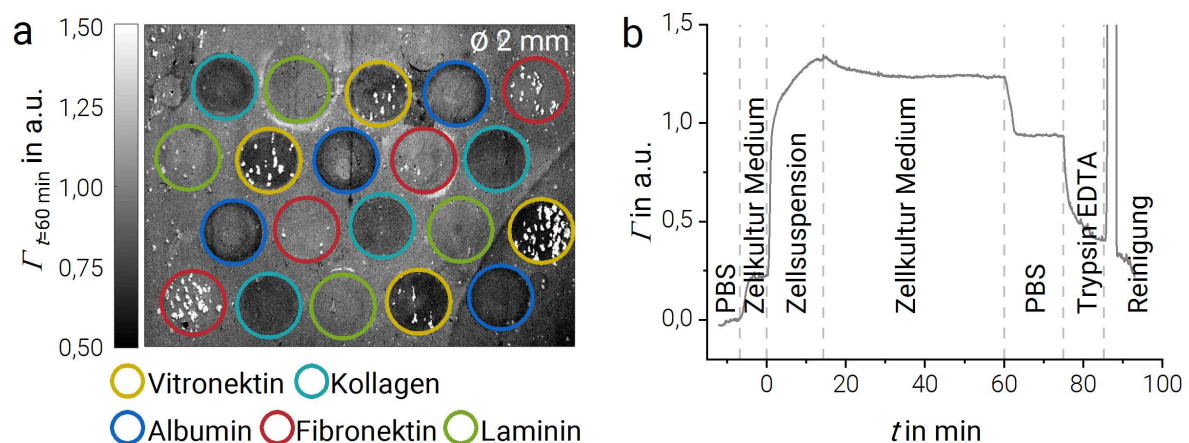


Abbildung 4.10: Typische Ergebnisse der Zelladhäsionsmessungen mittels SCORE. a) Illustration der Signaländerung auf den unterschiedlichen Spots an der Transduceroberfläche verursacht durch die Zellanlagerung. Die fünf untersuchten Proteine mit jeweils vier Replikaten wurden entsprechend der jeweiligen Farbe der Kreise immobilisiert. b) Sensorgramm der Zelladhäsionsmessung auf einem Laminin-Spot. Nach 3 min Basislinie, gekennzeichnet durch keine Veränderungen im Signal, wurde das Zellkulturmedium 8 min lang über die Transduceroberfläche geleitet. Hier zeichnet sich ein kleiner Signalanstieg ab, der auf unspezifische Wechselwirkung der Transduceroberfläche mit Komponenten des Zellkulturmediums hindeutet. Da das Signal hier ein Plateau erreicht, kann davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche vollständig abgesättigt ist und jede weitere Erhöhung des Signals allein durch die Anlagerung der Zellen an die Transduceroberfläche hervorgerufen wird. Danach wurde die Zellsuspension injiziert, die durch die Anlagerung der Zellen einen großen Signalanstieg zur Folge hat. Nach 15 min wurde weitere 45 min lang das Zellkulturmedium über die Transduceroberfläche gepumpt. In diesem Zeitraum können die Zellen an der Oberfläche weiter adhären und sich ausspreiten oder von der Oberfläche wieder dissoziieren - wobei letzteres zu einem Signalabfall führt. Die Zellen und Proteine an der Transduceroberfläche wurden mittels PBS und Trypsin-EDTA lysiert und abgelöst. Zuletzt wurde das Setup mit Guadiniumhydrochlorid und PBS gereinigt.

Messung problemlos wechseln zu können, erlaubt die Beobachtung der Einflüsse verschiedener Reagenzien auf die Adsorption und Adhäsion von Zellen auf Oberflächen. Hieran wird ein Vorteil gegenüber Mikrotiterplatten nutzende Methoden deutlich, bei denen die Zusammensetzung der Probe nur durch Zugabe von Reagenzien verändert werden kann.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie adhärenter Zellen

Um die vielversprechenden Ergebnisse der SCORE zu validieren, wurden die adhären-ten Zellen auf den jeweiligen Proteinoberflächen fixiert, angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Ergebnisse dienen dazu, die Signaländerungen in der SCORE mit der Anzahl und der Morphologie der Zellen auf der Oberfläche vergleichen zu können.

Die unterschiedlichen Oberflächen beeinflussen die Morphologie nach einer Inkubationszeit von 15 min vor der Zellfixierung nicht maßgeblich (Abb. 4.11). Die Zellen konnten auf allen untersuchten Oberflächen adhäreren und sich ausspreiten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h zeigen die Zellen auf allen Oberflächen – Glas beschichtet mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin oder Laminin – eine für MEF-Zellen typische Spindelform (Abb. 4.11).

Um die Anzahl der Zellen auf den Oberflächen zu untersuchen, wurde die Anzahl der adhären-ten Zellen über die Zählung der blau angefärbten Zellkerne, auf jeweils 12 Protein-Spots durchgeführt. Die Anzahl der adhären-ten Zellen zeigte nach einer Inkubationszeit von 24 h nur kleine Unterschiede zwischen den Oberflächen. Ein leichter Anstieg der Zellzahl von mit Vitronectin, Kollagen, Albumin und Fibronectin hin zu Laminin beschichtetem Glas ist erkennbar. Signifikante Unterschiede wurden zwischen der Vitronectin- und der Laminin- sowie zwischen der Vitronectin- und der Fibronectin-Oberfläche festgestellt (Abb. 4.12 b). Bei einer Inkubationszeit von 15 min vor der Fixierung der Zellen, wurde ein ähnlicher Verlauf der Zellzahl bei den verschiedenen Oberflächen beobachtet. Lediglich die mit Kollagen beschichtete Glasoberfläche zeigt eine deutlich erhöhte Zellzahl im Vergleich zu den Ergebnissen nach einer Inkubationszeit von 24 h. Die Unsicherheiten der Fixierung von nur schwach gebundenen Zellen spiegelt sich in den teilweise sehr großen Standardabweichungen der Zellkern-zählung nach 15 min Inkubationszeit wider (Abb. 4.12 a). Das Fixieren und Anfärben der Zellen erfordert einen mehrmaligen Wechsel der Flüssigkeiten, um die benötigten Reagenzien aufzubringen und Fixier- und Farbrückstände abzuwaschen. Diese vielen Pipetierschritte können leicht dazu führen, schwach gebundene Zellen von der Oberfläche abzulösen.

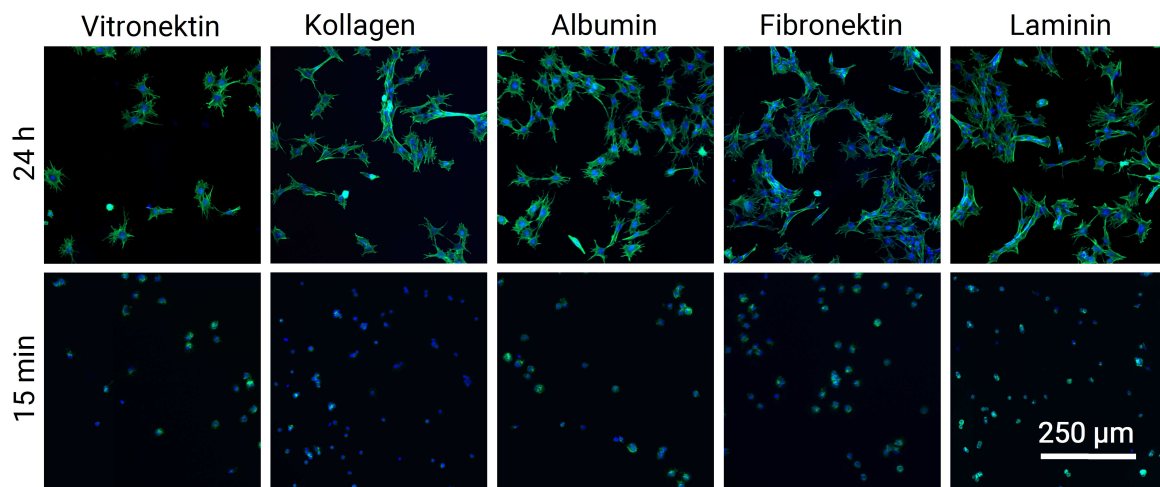


Abbildung 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der adhärenenten Zellen auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glassubstraten. Die Anzahl der blau angefärbten Zellkerne spiegelt die Anzahl der adhärenenten Zellen wider. Die Organisation des Zytoskeletts wurde durch die grüne Anfärbung von f-Aktin untersucht.

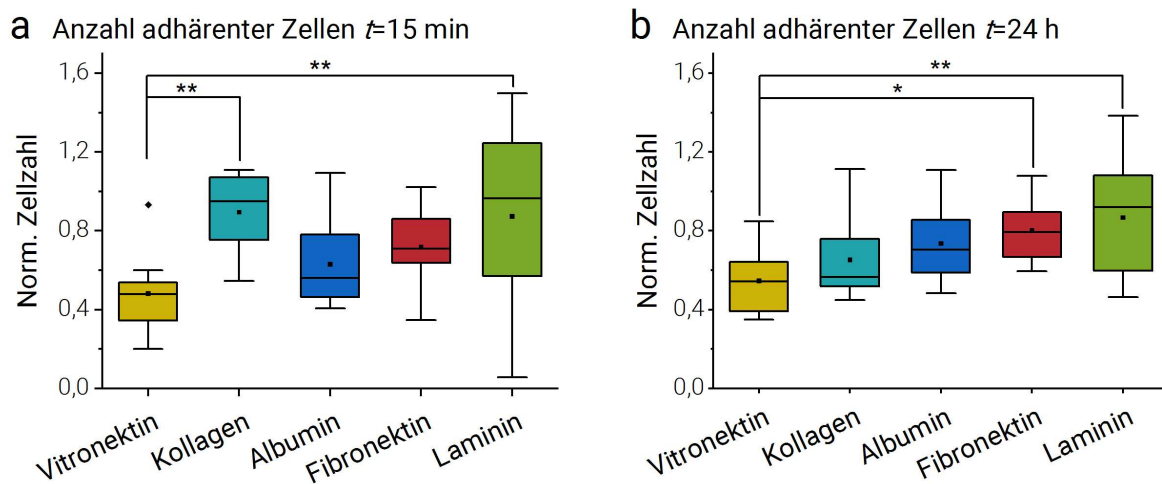


Abbildung 4.12: Normalisierte Anzahl adhärenenter Zellen auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glassubstraten nach a) 15 min und b) 24 h Inkubationszeit. Die Boxplots zeigen die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse der Daten ($n=12$, $p<0.05$, $p^{**}<0.01$). Die Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte und der Median durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die farbigen Flächen und die Fehlerbalken stehen jeweils für die 25 % und 75 % Quartile und den unteren und oberen „Whisker“.

4.2.3 Validierung und Bewertung der Einwellenlängenreflektometrie für Zelladsorption

Für den Vergleich der Ergebnisse der SCORE mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, wurde die Signaländerung nach 15 min Injektion der Zellsuspension verwendet. Zu diesem Zeitpunkt ist der Adsorptionsprozess weit fortgeschritten, während morphologische Änderungen der Zelle noch unwahrscheinlich sind. Als Maß für die Anzahl der Zellen an der Oberfläche wurde die normierte Zellzahl nach 24 h Inkubationszeit – bestimmt durch die Anzahl der blau gefärbten Zellkerne in den Mikroskopiebildern – herangezogen. Dieser spätere Zeitpunkt wurde aufgrund der oben beschriebenen Unsicherheiten der Zellzahlbestimmung nach einer Inkubationszeit von 15 min gewählt. Zu diesem Zeitpunkt hat die Proliferation der Zellen auf der Oberfläche nur einen geringen Einfluss auf die Zellzahl und daher wurde dieser spätere Zeitpunkt als robuster bewertet.

Die exzellente lineare Korrelation der Ergebnisse der SCORE und der Anzahl adherenter Zellen (Abb. 4.13) beweist, dass die Ergebnisse der SCORE die Bindungsprozesse der Zellen an der Oberfläche widerspiegeln. Mit den hier vorgestellten Geräteeinstellungen und experimentellen Bedingungen, liegt die Intensitätsänderung des reflektierten Lichtes durch die Zelladsorption an die Oberflächen im linearen Bereich der SCORE.

Zu betonen ist hier, dass die Ergebnisse der SCORE nach 15 min erhalten werden, wohingegen die Zellen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen 24 h lang kultiviert werden, einzelne Mikroskopie-Bilder aufgenommen und diese aufwendig nachbearbeitet und ausgewertet werden mussten. Zudem waren die Standardabweichungen der Messergebnisse bei der SCORE im Vergleich zu den mikroskopischen Auswertung kleiner. Dies zeigt, dass die Messung der Zelladsorption mittels SCORE sehr robust ist. Fehleranfällige Pipetier-, Fixier- und Färbeschritte werden nicht benötigt. Der homogene Fluss über die Transducer-Oberfläche stellt eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Oberfläche sicher. Zudem trägt der relativ große Untersuchungsbereich von Spots mit einem Durchmesser von 2 mm dazu bei, dass das Adsorptionsverhalten vieler Zellen gemittelt wird.

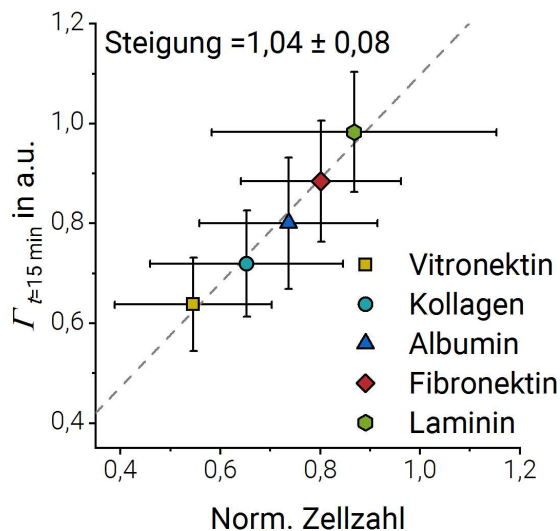


Abbildung 4.13: Lineare Korrelation zwischen dem gemessenen SCORE-Signal nach 15 min Zelladsorption und der Anzahl fixierter und angefärbter Zellen nach 24 h Inkubationszeit auf mit Proteinen beschichtetem Glas. Die Symbole zeigen die Mittelwerte von 12 Replikaten des SCORE-Signal gegenüber des Mittelwerts der normierten Zellzahl auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichtetem Glas. Die Fehlerbalken stehen für die jeweilige Standardabweichung. Die lineare Anpassung der Daten ist als graue gestrichelte Linie gezeigt.

4.2.4 Charakteristiken der Zell-Protein-Interaktion

Betrachtet man die Signaländerung in der SCORE der Adsorption von Zellen nach 15 min, wurde das größte Signal Γ auf der mit Laminin beschichteten Glasoberfläche erzielt. Auf den anderen Proteinen wurde eine geringere Signalzunahme mit abnehmender Reihenfolge von Fibronectin zu Albumin zu Kollagen und zu Vitronectin beobachtet (Abb. 4.14).

Bei näherer Betrachtung der zeitaufgelösten Messungen werden auch Unterschiede in der Adsorptionskinetik der Zellen auf den unterschiedlichen Oberflächen deutlich. Nach der 15 minütigen Injektion der Zellsuspension erreichte das Signal Γ auf den Glasoberflächen, die mit Laminin und Albumin beschichtet wurden, nahezu eine Gleichgewichtsbeladung. Auf mit Fibronectin und Vitronectin beschichtetem Glas ist nach 15 min Zellanlagerung weiterhin ein deutlicher Anstieg im Signal erkennbar. Auf letzteren beiden Oberflächen ist damit die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche langsamer im Vergleich zu Laminin, Albumin und Kollagen.

Auch die genauere Untersuchung der Desorptionsphase, in der durch die Injektion von Zellkulturmedium die Persistenz der Zelladsorption beobachtet werden kann, gibt Aufschluss über das Verhalten der Zellen an der Oberfläche. Der größte Signalabfall und damit das ausgeprägteste Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurde auf mit Laminin beschichtetem Glas beobachtet. Im Vergleich hierzu scheint die Bindung der

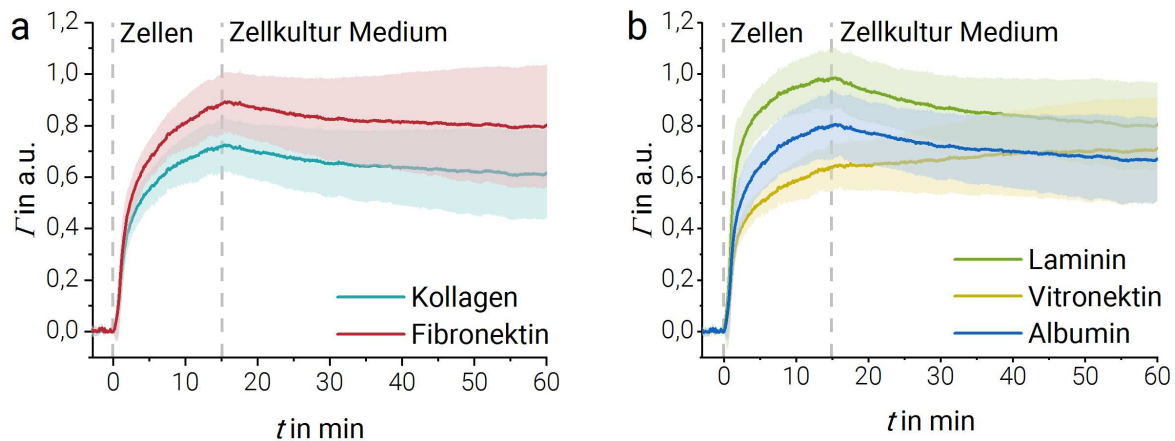


Abbildung 4.14: Sensorgramme der Adsorption von Zellen auf mit a) Kollagen und Fibronektin und b) Laminin, Vitronektin und Albumin beschichtetem Glas. Die Linien stehen für den Mittelwert zu jedem Zeitpunkt und die farbig hinterlegten Flächen für die dazugehörige Standardabweichung von 12 Replikaten. Die Zellsuspension wurde 15 min lang injiziert, woraufhin 45 min lang das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet wurde.

Zellen an Fibronektin stabiler zu sein, da sich auf dieser Oberfläche ein geringerer Signalabfall während der Desorptionsphase abzeichnet. Auffällig ist ein Signalzuwachs über den gesamten Zeitbereich der Desorption hinweg auf mit Vitronektin beschichtetem Glas. Dies legt nahe, dass – neben dem Ablösen der Zellen – weitere Prozesse an der Oberfläche das Signal der SCORE beeinflussen. Dies wird genauer im späteren Abschnitt 4.2.6 beschrieben und diskutiert.

Neben den oben beschriebenen Charakteristika ist ein anderes Merkmal die Geschwindigkeit der initialen Zelladsorption, um die Adsorptionsprozesse von Zellen an Oberflächen umfassend zu beschreiben. Daher wurde auch diese Phase der Zelladsorption genauer betrachtet. Hierzu wurde die Steigung während der anfänglichen Zelladsorption auf die Oberfläche im linearen Bereich der Adsorptionsphase berechnet. Es konnte eine signifikant schnellere Adsorption der Zellen auf Laminin beschichtetem Glas im Vergleich zu allen anderen untersuchten Oberflächen festgestellt werden (Abb. 4.15).

Durch die Untersuchung des Signals Γ nach 15 min Zelladsorption, des Erreichens einer Gleichgewichtsbeladung nach dieser Zeit, der Desorptionsphase und der initialen Zelladsorption, wurde ein umfassendes Bild der Charakteristiken der Interaktion zwischen Zellen und den jeweiligen Proteinen gegeben. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.2 gegeben. Bei der Verwendung anderer Methoden, ohne eine feine zeitliche Auflösung der Signaländerung über den Adsorptionsprozess hinweg, würden diese wertvollen Informationen nicht zur Verfügung stehen.

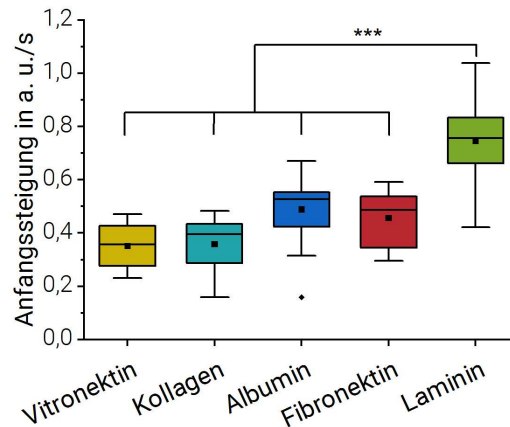


Abbildung 4.15: Steigung der initialen Zelladsorption – dem anfänglich linearen Bereich der Bindungskurven – an die mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin oder Laminin beschichtete Transducer-Oberfläche. Der Boxplot zeigt die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse der Daten ($n=12$, $p^{***}<0.001$). Die Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte und der Median durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die farbigen Flächen und die Fehlerbalken stehen jeweils für die 25 % und 75 % Quartile und den unteren und oberen „Whisker“.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Charakteristika der Interaktion zwischen MEF-Zellen und den Proteinen Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin.

	initiale Zelladsorption <i>in a. u./s</i>	Signal nach 15 min <i>in a. u.</i>	Gleichgewichts- beladung	Dissoziation
Vitronectin	$0,35 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,09$	Nein	Signalanstieg
Kollagen	$0,36 \pm 0,10$	$0,72 \pm 0,11$	Nahezu	Mittel
Albumin	$0,49 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,13$	Ja	Stark
Fibronectin	$0,46 \pm 0,11$	$0,89 \pm 0,12$	Nein	Gering
Laminin	$0,75 \pm 0,15$	$0,98 \pm 0,12$	Ja	Sehr Stark

4.2.5 Reproduzierbarkeit und Variation der Ergebnisse der Einwellenlängenreflektometrie für Zelladsorption

Ein wichtige Kenngröße zur Qualität in der Bioanalytik stellt die Intra- und Inter-Assay-Variation dar. Diese gibt Aufschluss darüber, wie stark die Streuungen zwischen den Replika eines Versuches sind und wie gut die Reproduzierbarkeit des Versuches ist. Dies ist in Bezug auf zellbasierte Analytik von besonderer Bedeutung, da hier größere Variationen zwischen den Replika und vor allem zwischen den einzelnen Versuchen zu erwarten sind.

In Abb. 4.16 a sind die Ergebnisse mit den zugehörigen Abweichungen der Signaländerung in der SCORE nach 15 min Zellsuspension-Injektion eines Versuches mit 4

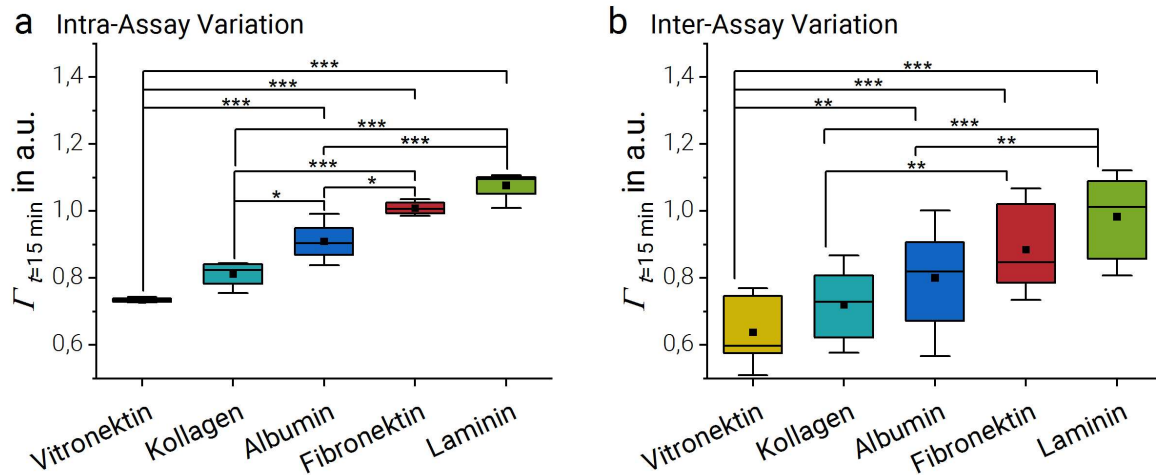


Abbildung 4.16: Vergleich der a) Intra-Assay-Variation (n=4) und der b) Inter-Assay-Variation (n=12). Die Boxplots illustrieren die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$) des SCORE-Signals auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glassubstraten. Die Mittelwerte sind durch die schwarzen Punkte und der Median durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die farbigen Flächen und die Fehlerbalken stehen jeweils für die 25 % und 75 % Quartile und den unteren und oberen „Whisker“.

Replika je Proteinbeschichtung gezeigt. Auch hier wird erneut deutlich, dass sich das Signal, das durch die Anlagerung der Zellen an die unterschiedlichen Oberflächen erzeugt wird, zwischen den Oberflächen unterscheidet. In folgender Reihenfolge ist eine Erhöhung des Signals auf den Oberflächen zu beobachten: Vitronektin < Kollagen < Albumin < Fibronektin < Laminin. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinbeschichtungen konnten in vielen Fällen festgestellt werden. Die Abweichungen zwischen den Replika innerhalb des Versuches waren sehr klein. Diese sind vor allem auf Inhomogenitäten in der Proteinbeschichtung zurückzuführen. Da ein sehr einfacher, anwendungsbezogener Beschichtungsprozess verwendet wurde, kommt es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Proteine innerhalb des Spots. Dies ist im besonderen Maße auf der mit Albumin beschichteten Glasoberfläche erkennbar. Bei der Beschichtung mit Albumin bildet sich keine homogene Bedeckung der Glasoberfläche aus (Abb. 4.10 a). Dies spiegelt sich auch in der erhöhten Streuung der Messpunkte im Vergleich zu den anderen untersuchten Oberflächen wieder (Abb. 4.16 a)

Betrachtet man nun die gepoolten Ergebnisse von drei Versuchen mit zugehörigen Abweichungen, wird deutlich, dass die Streuung der Ergebnisse deutlich größer ist, als im Falle eines einzelnen Versuches (Abb. 4.16 b). Hier zeigen sich die Schwankungen in der Zelladsorption, die von unterschiedlichen Zuständen der verwendeten Zellen verursacht werden. Mögliche Ursachen sind unterschiedliche Anteile der verwendeten Zellen in den jeweiligen Phasen der Zytokinese, verändertes Ansprechen auf die Trypsin-EDTA-Behandlung zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche und ge-

nerelle Veränderung der Zellen über den Zeitraum der Kultivierung hinweg. Jedoch wurden auch hier in sehr vielen Fällen signifikante Unterschiede in der Zelladsorption der Zellen auf die verschiedenen Proteinbeschichtungen festgestellt. Da die erhaltenen Mittelwerte der Ergebnisse innerhalb eines Versuches und bei der Kombination der Ergebnisse mehrerer Versuche sehr nahe beieinander liegen, sind die vorgestellten Ergebnisse sehr gut reproduzierbar. Hier tragen vor allem der homogene Fluss der Zellsuspension über den gesamten Untersuchungsbereich, wie auch die relativ große Spotfläche zu diesen guten Ergebnissen bei.

An diesen Ergebnissen wird deutlich, wie wichtig ein parallelisierter Messaufbau zur Untersuchung von Zelladsorptionsprozessen an Oberflächen ist. In einem einzigen Versuch können gleichzeitig unterschiedliche Oberflächenmodifikationen getestet und verglichen werden. Durch die Verwendung von Replika kann die Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifikation abgeschätzt werden. Da innerhalb eines Versuches die Einflüsse der Zellen auf die Streuung der Ergebnisse minimal gehalten wird, können auch Effekte untersucht werden, deren Auswirkungen auf die Zelladsorption sonst in der Streuung der Messwerte untergehen würde. Zudem sind Messungen mit Zellen mit einem relativ großem Ressourceneinsatz verbunden und die Möglichkeit viele Oberflächenmodifikationen parallel untersuchen zu können, erlaubt eine effektivere und nachhaltigere Nutzung der aufgewendeten Mittel.

4.2.6 Beobachtung morphologischer Veränderungen der adhären Zellen mittels Einwellenlängenreflektometrie

Sobald eine Zelle adsorbiert, werden interne Signalkaskaden angestoßen, die zur morphologischen Adaption der Zelle an das umgebende Milieu führt. Integrine – die Ankermoleküle der Zelle – binden an mögliche Liganden in direkter Umgebung und das Zytoskelett wird den veränderten Bedingungen angepasst. Mit der Zeit spreiten sich adhären wachsende Zellen auf der Oberfläche aus und bilden den jeweiligen Phänotyp aus. Im Falle der hier verwendeten Fibroblasten wird ein adhären wachsendes, weit ausgespreitetes und spindelförmiges Erscheinungsbild erwartet. Dies wurde mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.11) bestätigt. Diese morphologischen Änderungen führen zu Veränderungen in der Oberflächenbedeckung des Transducers mit Zellen und zu Veränderungen des Brechungsindex im Zytoplasma [105, 106]. Dies wiederum beeinflusst den optischen Weg, den das reflektierte Licht durchläuft und damit das Signal der SCORE. Im Gegensatz zu refraktometrischen Methoden (z. B. SPR oder Gitterkoppler), die auf Veränderungen des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Transduceroberfläche reagieren, wird das Signal in der SCORE durch die Größe der Zelle, wie auch durch den Brechungsindex innerhalb der gesamten Zelle beeinflusst.

Nach einer Anlagerung von 15 min zeigte sich ein kugelförmiges Erscheinungsbild der Zellen auf allen Oberflächen (Abb. 4.11). Die unterschiedlichen Proteinbeschichtungen haben demnach keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Aus diesem Grund konnte die hervorragende Korrelation zwischen dem Signal der SCORE und der normierten Zellzahl auf der Oberfläche festgestellt werden. Mit einem Fortschreiten der Zeit und damit dem Eintreten der aktiven Adhäsionsprozesse, werden morphologische Veränderungen der Zellen an der Oberfläche und damit Abweichungen von dieser Korrelation erwartet.

Auf der mit Vitronectin beschichteten Glasoberfläche wird ein Signalanstieg auch während der gesamten Desorptionsphase beobachtet (Abb. 4.17 a). Da in dieser Phase das Zellkulturmedium über die Oberfläche geleitet wird, kann ausgeschlossen werden, dass es zur Adsorption weiterer Zellen kommt. Daher muss die stetige Zunahme des Signals durch morphologische Änderungen der Zellen an der Oberfläche verursacht werden. Diese Annahme wird durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der adhären Zellen auf Vitronectin nach 15 min und 1 h (Abb. 4.17 a) bestätigt.

Auf den anderen untersuchten Oberflächen kam es während der Desorptionsphase zu einem Signalabfall (Abb. 4.14). Der Signalverlauf während der Dissoziation spiegelt einerseits wie oben beschrieben morphologische Veränderungen der Zellen an der Oberfläche wider, andererseits kann hier auch das Ablösen der Zellen – die Desorption – beobachtet werden. Letzteres führt zu dem beobachteten Signalabfall. Da sich während der Dissoziationsphase lediglich das Summensignal dieser beiden Prozesse beobachten lässt, können durch den Signalverlauf alleine keine Rückschlüsse über die morphologischen Veränderungen der Zellen auf den Oberflächen gezogen werden. Aus diesem Grund wurde die Größe der Zellen nach einer Inkubationszeit von 1 h an den Fluoreszenzmikroskopiebildern ausgemessen (Abb. 4.17 b). Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Flächenzunahme von den Zellen nach 15 min hin zu Zellen nach 1 h Inkubationszeit auf dem mit Vitronectin beschichteten Glas am stärksten ausgeprägt ist. Das weite Ausspreiten der Zellen in dieser relativ kurzen Zeit führt zu einem starken Signalanstieg, der den Signalabfall durch das Ablösen der Zellen überwiegt. Betrachtet man nun das mit Laminin beschichtete Glas, so wird deutlich, dass hier der entgegengesetzte Fall vorliegt. Wie in Tabelle 4.2 aufgeführt, wurde eine im Vergleich zu den anderen Oberflächen sehr starke Dissoziation der Zellen beobachtet. Auf der Laminin-Oberfläche hat die Fläche der adhären Zellen nach 1 h im Vergleich zu 15 min Inkubationszeit kaum zugenommen. Hier kann davon ausgegangen werden, dass sich das Desorptionsverhalten im Signalverlauf widerspiegelt, da die Änderungen in der Zellmorphologie im beobachteten Zeitraum nur sehr gering sind. Da die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h auf allen Oberflächen ausgespreitet vorliegen (Abb. 4.11), muss davon ausgegangen werden, dass die morphologischen Veränderungen auch auf dem mit Laminin beschichteten Glas auftreten, jedoch nicht im

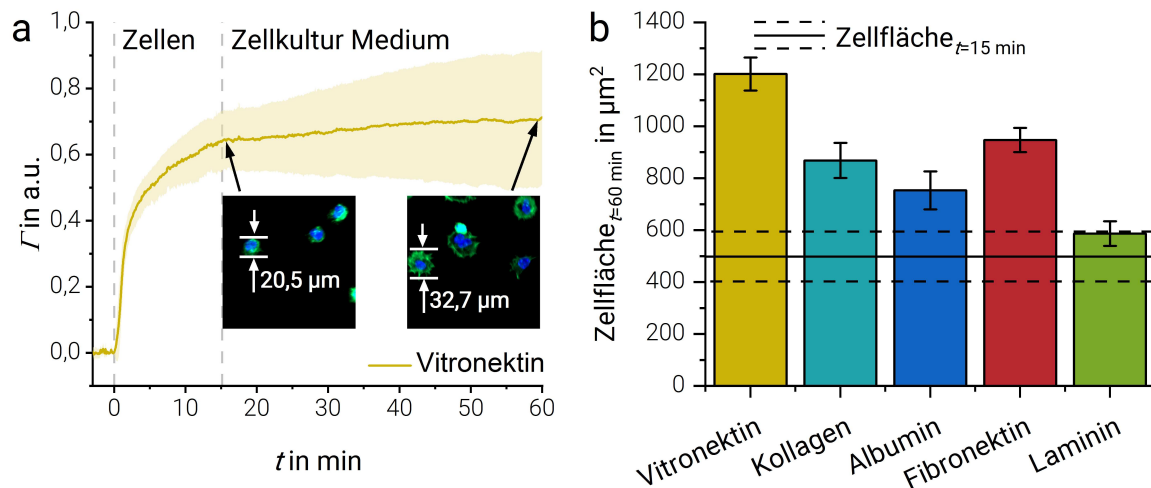


Abbildung 4.17: Einfluss des Spreitens der Zellen auf das Signal in der SCORE. a) Sensorgramm der mittleren Zelladhäsion auf mit Vitronektin beschichtetem Glas (gelbe Linie) und entsprechender Standardabweichung (farbig hinterlegter Bereich). Die Zellsuspension wurde 15 min lang injiziert, woraufhin 45 min lang das Zellkulturmedium über die Transducer-Oberfläche geleitet wurde. Die Morphologie der Zellen nach 15 min und 60 min Messzeit ist anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen gezeigt. Der Zellkern wurde blau und f-Aktin grün angefärbt b) Mittlere Größe und Standardabweichung (Fehlerbalken, $n=4$) der adhärenenten Zellen nach 60 min Inkubationszeit auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glassubstraten. Die mittlere Größe der noch abgerundeten Zellen nach 15 min Inkubationszeit, ist als schwarze Linie und die zugehörige Standardabweichung als gestrichelte Linie eingetragen.

beobachteten Zeitraum in der SCORE-Messung, sondern zu einem späteren Zeitpunkt. Auf den mit Kollagen, Albumin und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen kam es zu einem Spreiten der Zellen innerhalb des beobachteten Zeitraumes (Abb. 4.17 b) und zu einem Signalabfall im Sensorgramm. Hier überwiegt jeweils der Anteil am Signal, der durch die Dissoziation der Zellen hervorgerufen wird. Auf der Fibronektin-Oberfläche wurde ein vergleichsweise geringer Signalabfall und eine vergleichsweise größere Zunahme der Zellfläche festgestellt. Um das Spreiten der Zellen auf den Oberflächen eingehender zu untersuchen, wurden die Spots von Vitronektin und Fibronektin auf Glas genauer ausgewertet (Abb. 4.18 und 4.19).

Vor allem auf den mit Vitronektin und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen wurde nach einer Messzeit von 60 min eine Clusterbildung in der Signaländerung der SCORE beobachtet (Abb. 4.10, 4.18 und 4.19 a). Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen orts aufgelösten Clustern von einer Größe von ca. 50 μm - 700 μm , um adhärenenten Zellen bzw. Zellcluster handelt. Aus diesem Grund wurden Bereiche zwischen den Clustern, die Bereiche der Cluster und kleinere Bereiche im Zentrum der Cluster einzeln ausgewertet. Vergleicht man die Sensorgramme dieser Bereiche auf dem Vitronektin-Spot (Abb. 4.18 b), kann man erkennen, dass das Signal außerhalb der Cluster, während der Zellsuspension-Injektion von 0 - 15 min, anfänglich einen steilen Signalanstieg aufweist und dann einer Gleichgewichtsbeladung zustrebt. Nach 15 min – beim Wech-

sel der Probenflüssigkeit zum Zellkulturmedium und damit der Dissoziationsphase – kommt es zu einem sehr kleinen Signalabfall, der schnell in ein konstantes Signal bei 0.7 a. u. bis zum Zeitpunkt 60 min übergeht. Betrachtet man nun den Signalverlauf in den Bereichen der Cluster, wird deutlich, dass sich in diesen Bereichen das Signal zu Beginn der Messung sehr ähnlich wie das Signal außerhalb der Cluster verhält. Ab ca. 10 min nimmt das Signal im Bereich der Cluster deutlich stärker zu, als außerhalb der Cluster. Es steigt zunächst weiter an, bis es an die Beladung von ca. 2,7 a. u. konvergiert. Dieses Verhalten wird noch deutlicher im Bereich innerhalb der Cluster. Hier wird ein Signal von ca. 3.5 a. u. erreicht.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Clusteruntersuchung der Zelladsorption auf mit Vitronektin beschichtetem Glas mit den Ergebnissen auf mit Fibronektin beschichtetem Glas, wird deutlich, dass prinzipiell ähnliche Kurvenverläufe zu beobachten sind. Auf den Fibronektin-Oberflächen haben sich weniger und kleinere Cluster gebildet, als auf den Vitronektin-Oberflächen (Abb. 4.18 und 4.19 a). Der Zeitpunkt, an dem das Signal im Bereich der Cluster und im Zentrum der Cluster nach dem ersten Plateau wieder ansteigt, ist mit ca. 15 min auf mit Fibronektin beschichtetem Glas später, als auf den mit Vitronektin beschichtetem Glas. Das Signal der SCORE-Messung, im Bereich der Cluster auf Fibronektin, erreicht innerhalb des beobachteten Zeitraumes keine Gleichgewichtsbeladung, da das Anwachsen des Signals später einsetzt und etwas langsamer als auf dem mit Vitronektin beschichteten Glas verläuft (Abb. 4.18 und 4.19 b).

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass in den Bereichen der Cluster die unterschiedlichen Phasen der Zelladhäsion an die Oberfläche beobachtet werden können. Unter anderem haben Ramsden et al., Hong et al. und Szekacs et al. einem vergleichbar sigmoidalen Signalverlauf bei Zelladsorptionsmessungen einem aktiven Adhäsionsprozess zugewiesen [19, 70, 107]. Nach T. Santra und F. Tseng konnte man die verschiedenen Phasen der Zelladsorption mit unterschiedlichen Methoden untersuchen [108].

Auch in den hier vorgestellten Messungen ist die anfängliche Anlagerung der Zelle – auch Physisorption genannt – in den ersten Minuten anhand eines zuerst steilen Signalanstiegs, der bald einer Gleichgewichtsbeladung zustrebt, erkennbar. Während dieser exponentiellen Adsorptionsphase gleicht das Anlagerungsverhalten der Zellen anderen Adsorptionsprozessen, wie sie bei Ligand-Rezeptor-Interaktionen in heterogener Phase, der heterogenen Katalyse oder der Adsorption von Molekülen an Oberflächen beobachtet werden. In dieser ersten Phase der Adsorptionsphase findet die Interaktion der Zelle mit der Oberfläche hauptsächlich über elektrostatische, disperse und entropische und damit unspezifische Wechselwirkungen statt [109]. Im einfachsten Fall kann dieses Adsorptionsverhalten mit einer Langmuir Adsorptionsisotherme beschrieben werden. Nach diesem ersten Kontakt mit der Oberfläche werden

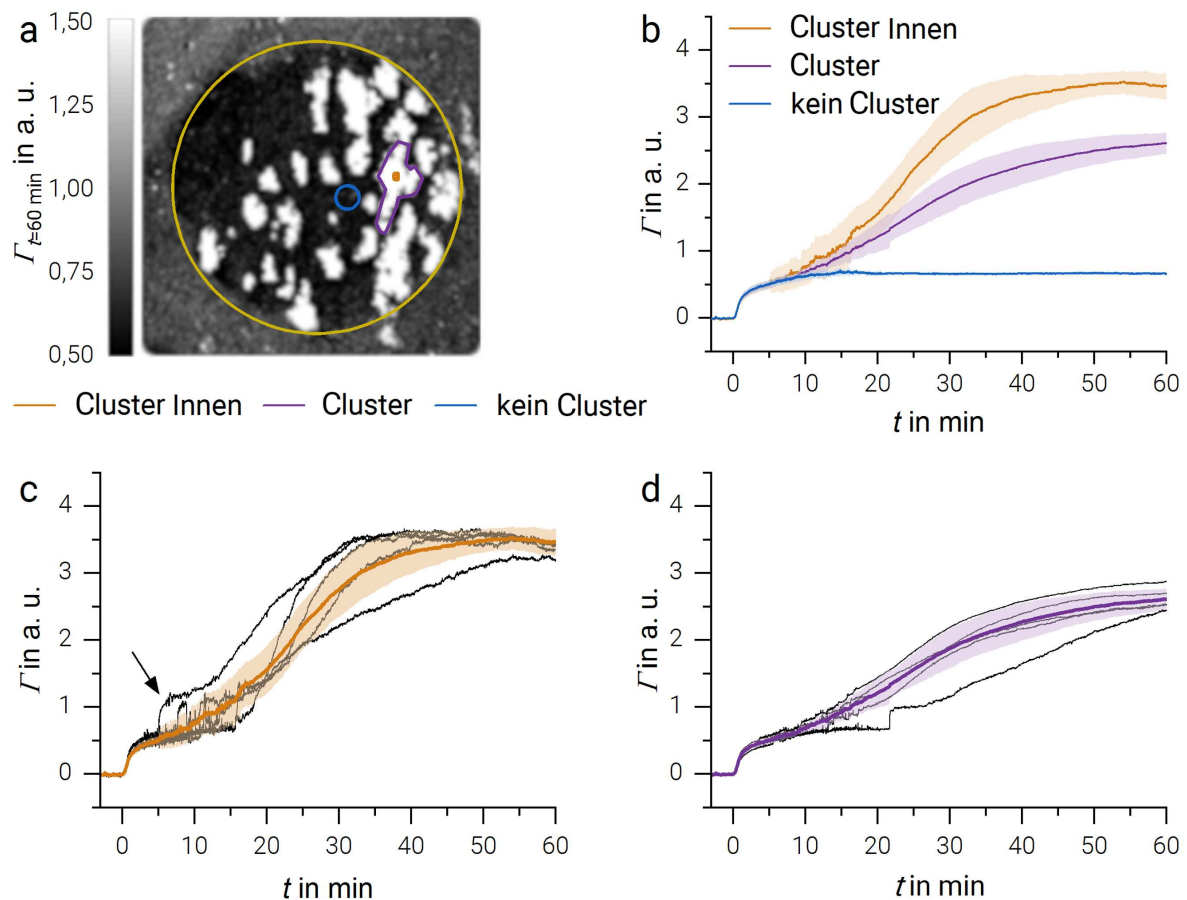


Abbildung 4.18: Untersuchung des Spreitens der Zellen auf mit **Vitronektin** beschichtetem Glas. a) Illustration der SCORE-Signaländerung auf einem exemplarischen Vitronektin-Spot, verursacht durch die Zellanlagerung. Die deutlich erkennbaren Cluster (weiß) mit sehr großer Signaländerung wurden für eine detailliertere Auswertung verwendet. Hierzu wurden zufällige Bereiche außerhalb der Cluster, der Bereiche der Cluster und kleine Bereiche im Inneren des Clusters auf dem Vitronektin-Spot (gelbe Linie) mit einem Durchmesser von 2 mm ausgewertet. Die blaue Linie zeigt exemplarisch einen Bereich außerhalb der Cluster, die violette Linie den Bereich eines Clusters und die orange Linie den Bereich im Inneren des Clusters. b) Signaländerung über die Zeit der Bereiche innerhalb der Cluster (orange Linie), im Bereich des Clusters (violette Linie) und außerhalb der Cluster (blaue Linie). Zum Zeitpunkt 0 s wurde die Zellsuspension injiziert, gefolgt von dem Spülen der Oberfläche mit Zellkulturmedium nach 15 min. Die Linien stellen den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung zum jeweiligen Zeitpunkt von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. c) Signalverlauf der Bereiche im Inneren der Cluster. Die orange Linie stellt den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. Die schwarzen Linien zeigen das Sensorgramm einzelner Bereiche innerhalb der Cluster. d) Signalverlauf im Bereich der Cluster. Die violette Linie stellt den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. Die schwarzen Linien zeigen das Sensorgramm einzelner Cluster-Bereiche.

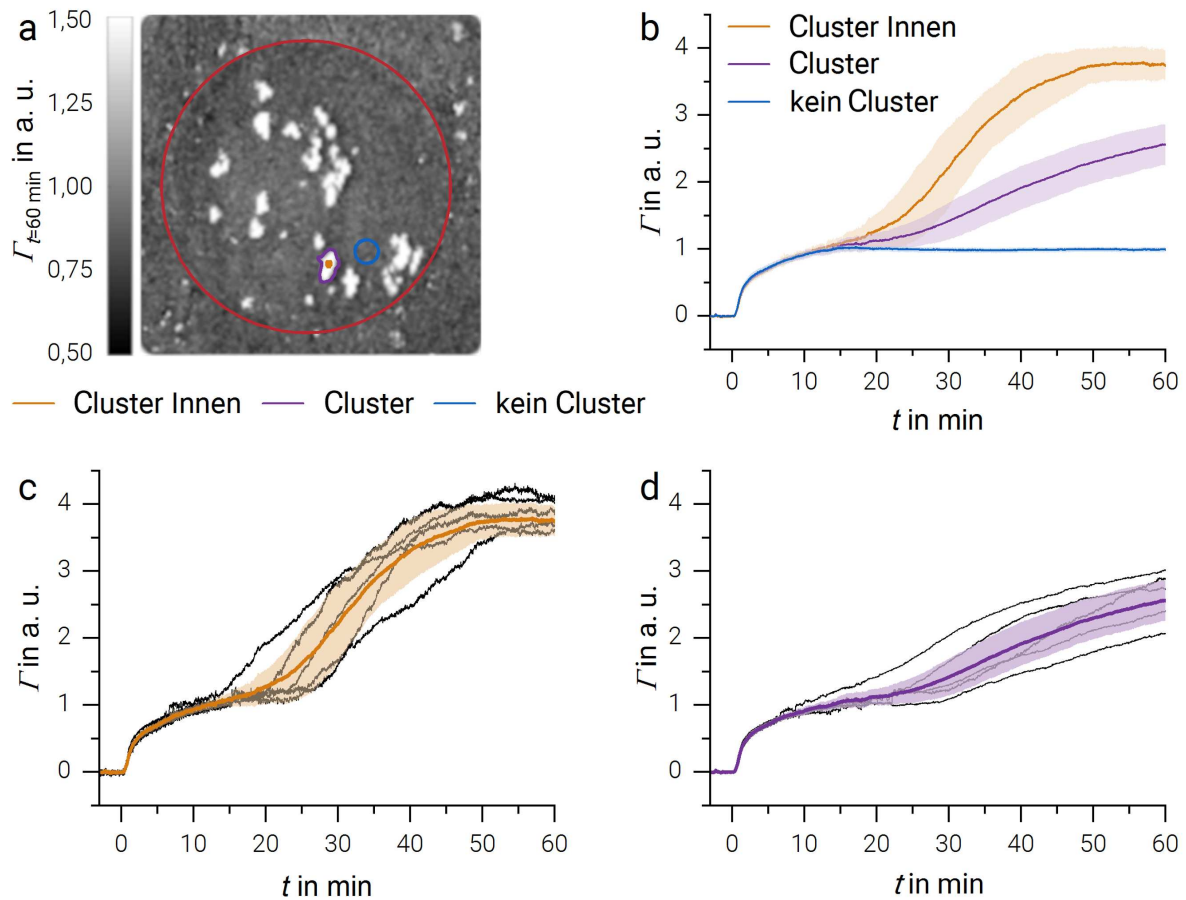


Abbildung 4.19: Untersuchung des Spreitens der Zellen auf mit **Fibronektin** beschichtetem Glas. a) Illustration der SCORE-Signaländerung auf einem exemplarischen Fibronektin-Spot, verursacht durch die Zellanlagerung. Die deutlich erkennbaren Cluster (weiß) mit sehr großer Signaländerung wurden für eine detailliertere Auswertung verwendet. Hierzu wurden zufällige Bereiche außerhalb der Cluster, der Bereiche der Cluster und kleine Bereiche im Inneren des Clusters auf dem Fibronektin-Spot (gelbe Linie) mit einem Durchmesser von 2 mm ausgewertet. Die blaue Linie zeigt exemplarisch einen Bereich außerhalb der Cluster, die violette Linie den Bereich eines Clusters und die orange Linie den Bereich im Inneren des Clusters. b) Signaländerung über die Zeit der Bereiche innerhalb der Cluster (orange Linie), im Bereich des Clusters (violette Linie) und außerhalb der Cluster (blaue Linie). Zum Zeitpunkt 0 s wurde die Zellsuspension injiziert, gefolgt von dem Spülen der Oberfläche mit Zellkulturmedium nach 15 min. Die Linien stellen den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung zum jeweiligen Zeitpunkt von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. c) Signalverlauf der Bereiche im Inneren der Cluster. Die orange Linie stellt den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. Die schwarzen Linien zeigen das Sensorgramm einzelner Bereiche innerhalb der Cluster. d) Signalverlauf im Bereich der Cluster. Die violette Linie stellt den Mittelwert und die farbige hinterlegte Fläche die Standardabweichung von 10 zufällig ausgewählten Bereichen dar. Die schwarzen Linien zeigen das Sensorgramm einzelner Cluster-Bereiche.

aktive Adhäsionsprozesse angeregt und die Zelle bindet mit Integrinen an mögliche Liganden und spreitet sich aus. Dieser Prozess kann in dem Signalanstieg nach dem ersten Erreichen der Gleichgewichtsbeladung beobachtet werden. Zu Beginn des Ausbreitens der Zelle werden Kontakte zum Substrat gebildet und die Zellen formen sich um. Der Signalanstieg kann in diesem Bereich hauptsächlich durch die größere Oberflächenbedeckung von abgeflachten statt runden Zellen erklärt werden. In der späteren Phase der Adhäsion kommt es vermehrt zu Aktin-Polymerisation und Myosin-Kontraktion [110], wodurch zusätzlich Veränderungen im Brechungsindex des Zytoplasmas auftreten können. Nach einer Adsorptionszeit von 40 min ist im Signalverlauf im Bereich des Zentrums der Cluster ein konstanter Wert erreicht. Das Signal im gesamten Bereich des Clusters wächst nur noch sehr langsam. Betrachtet man die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zellen nach 1 h Inkubationszeit auf Vitronectin (Abb. 4.17 a), weisen die Zellen noch nicht die charakteristische Spindelform auf und sind auch noch etwas kleiner als nach 24 h Inkubationszeit. Dies legt die Vermutung nahe, dass weitere Veränderungen der Morphologie eher am Rand des Clusters und deutlich langsamer stattfinden. Auch das Ausbilden der Zellausläufer und das Umstrukturieren des Zytoskelletes scheint ab einem bestimmten Zeitpunkt keinen großen Einfluss auf das SCORE-Signal zu haben. Die Beobachtung der Signaländerung in der SCORE über einen längeren Zeitraum hinweg, könnte hier die nötigen Daten liefern um diese Hypothese zu stützen.

Betrachtet man die Standardabweichung des Signals im Bereich der Cluster und im Zentrum der Cluster (Abb. 4.18 und 4.19 b), ist eine größere Abweichung vom Mittelwert in den Bereichen des Signalanstiegs nach dem ersten Plateau erkennbar. Die Signalverläufe im Bereich der einzelnen Cluster und innerhalb der einzelnen Cluster zeigen, dass sowohl der Zeitpunkt an dem der Signalanstieg beginnt, als auch die Geschwindigkeit, mit der ein neues Plateau erreicht wird, deutlich zwischen den einzelnen Clustern variiert (Abb. 4.18 und 4.19 c, d). Jedoch werden im Bereich des zweiten Plateaus sehr ähnliche Signale erhalten. Nach dem Spreiten besitzen die adhärenen Zellen im Bereich der Cluster also eine ähnliche Höhe und einen vergleichbaren Brechungsindex im Zytoplasma.

Die sehr gute zeitliche Auflösung in der SCORE erlaubt eine genaue Untersuchung der einzelnen Phasen der Zelladhäsion und die gleichzeitig sehr gute örtliche Auflösung die Auswahl einzelner Bereiche. Im Falle von sehr großen Zellen, wie den hier verwendeten MEF-Zellen, kann sogar das Verhalten einzelner Zellen untersucht werden. Auch können Bereiche, die keinen Beitrag zum untersuchten Prozess liefern, ausgeschlossen werden. Unterschiede in der Zelladhäsion auf örtlich sehr fein strukturierten Oberflächen – wie Proteinarrays mit deutlich mehr als den hier verwendeten Proteinen, oder Gradienten der Hydrophilizität oder Proteinkonzentrationen – können untersucht werden.

4.2.7 Machbarkeitsstudie zur kombinierten Untersuchung der Adhäsionskräfte von Zellen auf Oberflächen

Bisher konnte gezeigt werden, dass mittels der SCORE reproduzierbare, valide Ergebnisse mit hoher zeitlicher Auflösung zur Untersuchung von Zelladsorptionsprozessen erzielt werden können. Neben dem Signalanstieg und -abfall, der Steigung der initialen Zelladsorption und dem Auftreten einer Gleichgewichtsbeladung im beobachteten Zeitraum, gibt es noch weitere physikalische Größen, um die Interaktion zwischen Zellen und Oberflächen zu beschreiben. Die Berechnung von Ratenkonstanten des Adsorptions- und Desorptionsverhaltens und die Beurteilung der auftretenden Kräfte zwischen den Zellen und den Oberflächen, stellen hier vielversprechende Möglichkeiten dar. Viele Methoden wurden entwickelt, um die Interaktionskräfte zwischen Zellen und Oberflächen zu quantifizieren, da diese fundamentale Rollen in vielen Prozessen, wie der Tumor-Entwicklung, Wundheilung und Immunreaktion auf Pathogene oder auf andere Fremdkörper im Gewebe wie Implantate einnehmen. Verschiedene Methoden sind in einem Übersichtsartikel von Rita Ungai-Salánki et.al. beschrieben [111]. L. Marcotte et al. stellen in einem anderen Artikel Methoden zur Messung der Adhäsionskraft, wie auch der Dynamik der Zelladhäsion vor [112]. Einige Methoden nutzen das Auftreten von Scherkräften an Oberflächen bei der Applikation eines Flüssigkeitsstroms zur Bestimmung der Adhäsionskräfte von adhärent wachsenden Zellen [113–116]. Die kombinierte Untersuchung der Geschwindigkeiten der Adsorption und Desorption und der Bindungskräfte zwischen Zellen und den Oberflächen ist von hohem Interesse, da damit umfassende Informationen zu dem Interaktionsprozess erhalten werden können. Dies wurde mit der Kombination eines „resonant waveguide grating“ (RWG) optischen Biosensors mit „fluidic force microscopy“, einer AFM-basierten Kraftspektroskopiemethode, erreicht.

Da das SCORE-Setup mit einem Fluidik-System ausgestattet ist, kann über die Erhöhung des Flusses im Messkanal die Scherkraft auf die adhären Zellen erhöht werden. Damit stellt die Flussrate, bei der sich die Zellen von der jeweiligen Oberfläche lösen, ein Maß für die Bindungskräfte zwischen Zelle und Oberfläche dar. Bevor in den folgenden Kapiteln Möglichkeiten zur kinetischen Auswertung mit Berechnung der Ratenkonstanten der Zelladsorption auf Oberflächen aufgezeigt und diskutiert werden, werden in diesem Kapitel erste Ergebnisse zur Untersuchung der Bindungskraft zwischen den Zellen und den Oberflächen vorgestellt.

Während der Dissoziationsphase wurde die Flussrate stufenweise erhöht (Abb. 4.20). Bei der Erhöhung der Flussrate von 0,04 ml/min auf 0,31 ml/min wurde kein Einfluss auf den Signalverlauf durch erhöhte Scherkräfte auf die adhären Zellen festgestellt. Bei einer weiteren Erhöhung der Flussrate auf 0,59 ml/min zeigt sich jedoch auf allen untersuchten Oberflächen – mit Laminin, Fibronectin und Kollagen beschichte-

tem Glas – ein Signalabfall. Es ist zu erkennen, dass der stärkste Signalabfall durch das Ablösen adhärenter Zellen auf dem mit Fibronectin beschichtetem Glas, gefolgt von mit Kollagen beschichtetem Glas und der geringste Signalabfall auf mit Laminin beschichtetem Glas auftritt. Somit kann gefolgert werden, dass die Summe aller Wechselwirkungskräfte zwischen den MEF-Zellen und der mit Laminin beschichteten Glasoberfläche am stärksten sind. Im Vergleich dieser drei Oberflächen sind damit die Wechselwirkungen der Zellen mit Fibronectin beschichtetem Glas am schwächsten. Dies kann entweder an einer geringeren Anzahl an Bindungsstellen oder einer schwächeren Bindung der Integrine der MEF-Zellen an Fibronectin erklärt werden.

Wie im vorangegangenen Abschnitt 4.2.6 festgestellt wurde, wird das Bindungssignal durch morphologische Veränderungen der Zelle an der Oberfläche mit beeinflusst. Da die Veränderungen der Flussrate in diesem Versuch in einem Zeitraum stattfand, in dem bereits ein Einfluss der morphologischen Veränderungen der Zellen auf den Signalverlauf festgestellt wurde, sind auch die Ergebnisse bei verschiedenen Flussraten davon beeinflusst. Bezieht man die Einflüsse der morphologischen Veränderungen in die Bewertung der Ergebnisse mit ein, so verstärkt sich die zuvor gestellte Schlussfolgerung, dass die Summe aller Wechselwirkungskräfte der MEF-Zellen auf mit Laminin beschichtetem Glas am stärksten und auf mit Fibronectin beschichtetem Glas am schwächsten sind.

Wird die SCORE für Zellmessungen weiter optimiert und steht zukünftig die Möglichkeit der Kontrolle von Temperatur und CO_2 -Gehalt während der Messung zur Verfügung, können auch deutlich längere Messungen zu Adhäsionskräften von Zellen mit Oberflächen durchgeführt werden. Damit könnte die Messung der Adhäsionskraft erfolgen, wenn die morphologischen Veränderungen auf allen Oberflächen abgeschlossen ist. Betrachtungen kleiner Bereiche auf dem Transducer bis hin zu einzelnen Zellen können detailliertere Informationen zu den Adhäsionskräften liefern. Wird die Scherkraft, die auf der Oberfläche des Transducers auftritt, über Referenzmethoden bestimmt, können zukünftig nicht nur vergleichende Aussagen getroffen werden sondern die Adhäsionskraft der Zellen auch quantitativ beschrieben werden. Mit diesem Proof-of-Principle-Versuchsaufbau und den damit erhaltenen Ergebnissen konnte klar gezeigt werden, dass die kombinierte, simultane Untersuchung zu Adhäsionskräften von Zellen und deren Adhäsionskinetik mit SCORE sehr gut möglich ist. Im Vergleich zur Kombination des RWG-Biosensors mit „fluidic force microscopy“, besticht die kombinierte Untersuchung der Adsorptionskinetik und der Adhäsionskräften von Zellen mittels SCORE, mit einem sehr einfachen Versuchsaufbau und einfacher Durchführung. Mit kleinen Optimierungen im Versuchsaufbau und einer Referenzierung der Scherkräfte sind daher viele Anwendungsmöglichkeiten denkbar und vielversprechend.

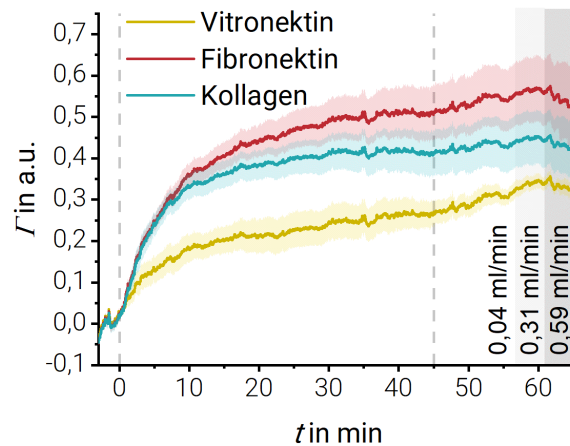


Abbildung 4.20: Untersuchung des Einflusses der Scherbelastung auf adhären wachsende Zellen gemessen mit der SCORE. Sensorgramme der Adsorption von Zellen auf mit Kollagen und Fibronectin und Vitronectin beschichtetem Glas. Die Linien stehen für den Mittelwert zu jedem Zeitpunkt und die farbig hinterlegten Flächen für die dazugehörige Standardabweichung von 3 Replikaten. Die Injektion der Zellsuspension erfolgte im Zeitbereich von 0-45 min. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium über die Oberflächen gepumpt. Um den Einfluss der Scherbelastung auf die adhären Zellen und damit ein Maß für die Adhäsionskräfte zu untersuchen, wurde die Pumpgeschwindigkeit in zwei Schritten von 0,04 ml/min auf 0,31 ml/min und 0,59 ml/min erhöht. Dies ist durch die grau schattierten Bereiche gekennzeichnet.

4.3 KINETIK DER ZELLADSORPTION

In dieser Arbeit wurden die Adsorptionsprozesse von Zellen auf unterschiedliche Oberflächen qualitativ verglichen und in Relation zueinander gesetzt. Die Bestimmung von kinetischen Parametern der Zelladsorption auf Oberflächen ermöglicht darüber hinaus einen quantitativen Vergleich der Interaktion zwischen Zellen innerhalb dieser Versuchsreihen und mit anderen Studien. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erleichtert zudem das physikalische Verständnis der komplexen Vorgänge während des Adsorptionsprozesses. Dies wiederum birgt das Potential, effizienter innovative Beschichtungen für Implantate, künstliche Organe und Gewebe und neue Medikamente entwickeln zu können. Dieses Forschungsfeld wird als sehr zukunftsweisend und lohnend bewertet und es sind vermehrt Studien zum Messen mit ganzen Zellen im Bereich der Sensorik durchgeführt und publiziert worden.

Dies lässt sich vor allem mit dem großen Anwendungspotential erklären. In der Grundlagenforschung wird die Interaktionsanalyse von ganzen Zellen mittels Sensoren eingesetzt, um den komplexen Vorgang der Zelladsorption besser verstehen zu können [117]. Auch in anwendungsbezogeneren Feldern, wie der wirkungsbezogenen (Umwelt-)Analytik [118, 119] und biomedizinischen Analytik [120, 121], um neue Verfahren zu entwickeln und die Notwendigkeit von Tierversuchen zu verringern, erkennt man zunehmend das Potential zellbasierter Messungen mittels optischer Sensoren.

Dem gegenüber steht ein sehr komplexer biologischer Vorgang, der mit Methoden und Modellen untersucht werden soll, die ursprünglich für die Untersuchung der Interaktion kleiner Moleküle in Gasphase miteinander oder mit Oberflächen entwickelt wurden. Seit diesen Anfängen der (Bio-)Analytik wurden die Methoden für die Untersuchung für komplexere Analyten und Zellen weiterentwickelt [16, 112]. Auch kinetische und thermodynamische Modelle wurden weiterentwickelt und erweitert um komplexere Proben messen und deren Interaktionsprozesse widerspiegeln zu können. Zum Beispiel wurde für die Untersuchung der Adsorption von Proteinen an Oberflächen eine Vielzahl an Modellen entwickelt, um für verschiedene vorherrschende Prozesse eine adäquate Interpretation der Messergebnisse zu liefern [122–125]. Im allgemeinen wird versucht, ein mathematisches Modell zur Bestimmung von spezifischen Parametern so einfach wie möglich und so komplex wie nötig zu gestalten, um einer Überinterpretation der Daten vorzubeugen. Diese Abwägung gestaltet sich bei biologischen Proben wie Proteinen in vielen Fällen sehr strittig, da detailliertes Wissen um die tatsächlichen Vorgänge an der Oberfläche nur für schon sehr gut untersuchte, ausgewählte Interaktionspartner zur Verfügung steht und die Messungen leicht durch Versuchsparameter beeinflusst werden können [126, 127]. Dies gilt umso mehr für das Messen mit ganzen Zellen. Hier ist die biologische Probe nochmals deutlich komplexer und es gibt weniger detailliertes Wissen zu den Vorgängen während der Adsorption.

Die hier gezeigten Ergebnisse sollen dazu dienen, einen kleinen Beitrag zum Verständnis dieser Vorgänge und der Beurteilung der möglichen Anwendung vorhandener mathematischer Modelle zur kinetischen Untersuchung zu liefern. Im ersten Kapitel wird die Anwendung eines sehr einfachen Modells bewertet. Im zweiten Kapitel wird eine Erweiterung dieses Modells zum ersten Mal zur Analyse der Adsorptionsprozesse von Zellen an Oberflächen angewandt und bewertet. Zuletzt wird die Dynamik des Adhäsionsprozesses der Zellen genauer untersucht.

4.3.1 Einwellenlängenreflektometrie für kinetische Untersuchungen der Zelladsorption

Basierend auf den hervorragenden Ergebnissen zur Messung der Zelladsorption mittels der SCORE, wurde auf dem beschriebenen Messsetup eine Konzentrationsreihe ($40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) aufgenommen (Abb. 4.21 und 4.22).

Abb. 4.21 zeigt die Bindungskurven der Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen auf dem mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin oder Laminin beschichteten Glas. Deutlich sind hier die Unterschiede sowohl in der Krümmung der Kurve, als auch in dem erreichten Wert für Γ in der Zelladsorption, was in den voran-

gegangenen Kapiteln bereits festgestellt wurde. Die Breite des Fehlerbandes wird stark durch die Homogenität des Flusses und der Homogenität und Reproduzierbarkeit der Proteinspots auf der Glasoberfläche beeinflusst. Starke Signalschwankungen – sprunghafte, kurzzeitige Signaleinbrüche – in Messungen mit $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind in Abb. 4.21 und 4.22 deutlich erkennbar. Beobachtungen während der Messungen und die Untersuchung einzelner Bilder der Transduceroberfläche zeigten auf, dass diese Messartefakte durch Mie-Streuungs-Effekte an Zellen, Zellbestandteilen und Zellclustern hervorgerufen werden.

Ein Anstieg von Γ mit steigender Konzentration wurde auf allen Oberflächen beobachtet (Abb. 4.22). Die Messungen bei einer Konzentration der Zellsuspension von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml fügen sich auf allen Oberflächen nicht immer in das erwartete Bild. Hieran zeigen sich die Herausforderungen beim Messen mit lebenden Zellen. Viele Einflussfaktoren können das Verhalten der Zellen leicht beeinflussen. In diesem Fall ist die wahrscheinlichste Quelle des veränderten Adsorptionsverhalten bei dieser Konzentration auf den variierenden Einfluss der Trypsin-Behandlung auf die Zellen zurückzuführen. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wird Trypsin/EDTA verwendet. Diese Lösung spaltet die Adhäsionsproteinen, durch welche sich die Zellen an der Oberfläche von Kulturgefäßen anhaften. Die Anbindung eben dieser Adhäsionsproteinen an die mit Proteinen funktionalisierten Oberflächen werden durch die abgebildeten SCORE-Messung untersucht. Zellkulturen können mit fortschreitender Kulturzeit eine steigende Toleranz zu Trypsin ausbilden. Daher muss die Inkubationszeit mit Trypsin ggf. angepasst werden um die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösen zu können. Die Dauer der Trypsin-Behandlung, das Ansprechen der Zelle auf das Trypsin sowie die Dauer nachfolgende Erholungsphase beeinflussen hingegen die Anzahl und Funktionalität der Adhäsionsproteinen an der Zelloberfläche. Kleinere Schwankungen in diesem schwer zu kontrollierenden Prozessen können daher einen starken Einfluss auf die Anzahl und Funktionalität der verfügbaren Bindungsstellen für die anschließende kinetische Analyse der Zell-Material Interaktion haben. Damit werden die Messfehler der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse kinetischer Analysen vorwiegend durch Schwankungen im biologischen System bestimmt.

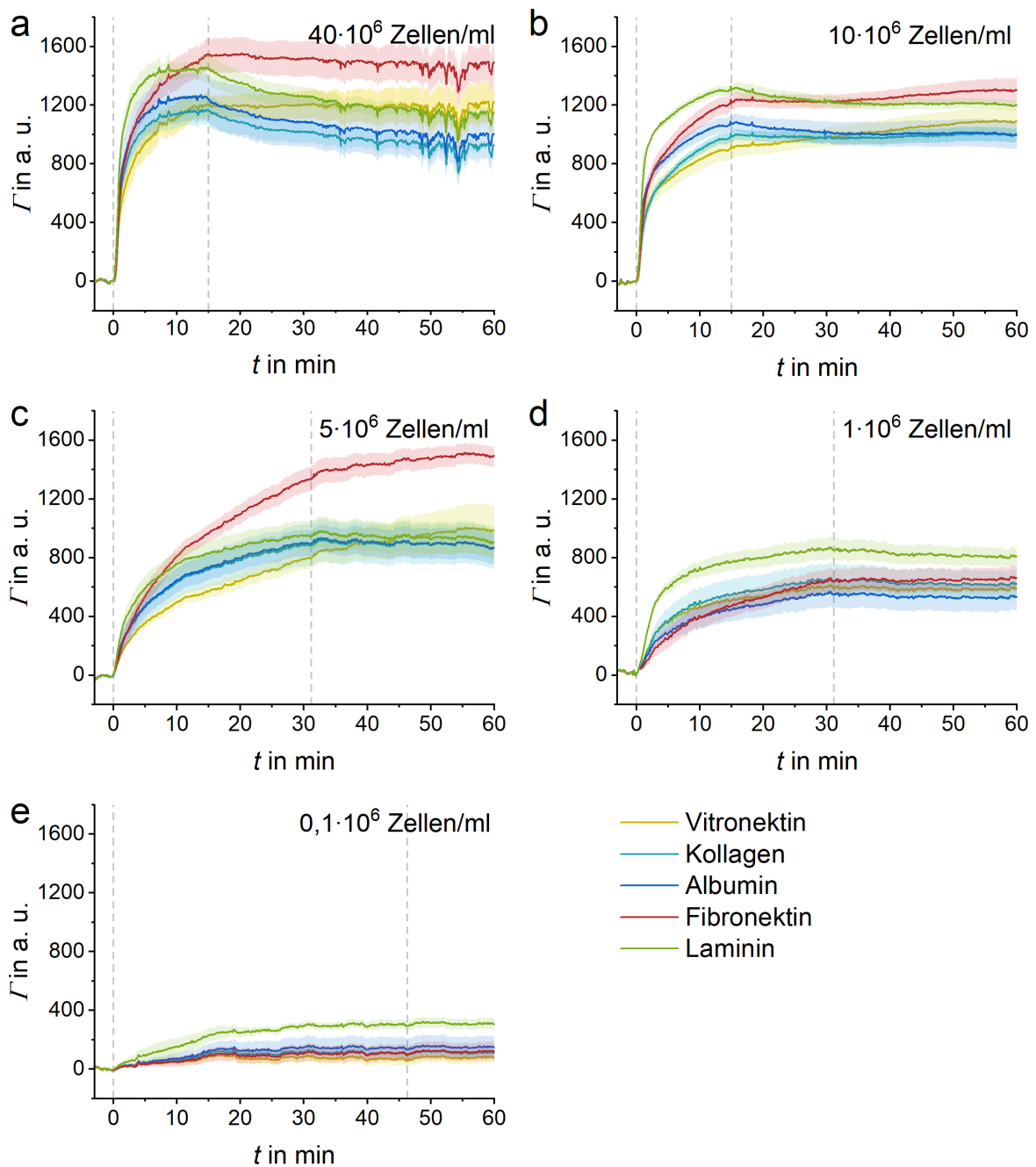


Abbildung 4.21: Sensorgramme der Adsorption von Zellen auf Glas, beschichtet mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin bei verschiedenen Konzentrationen. Die Zellsuspension mit der Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurde injiziert. Der Zeitbereich der Injektion der Zellsuspension ist durch grau gestrichelte Linien illustriert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium über die Oberfläche geleitet. Die farbigen Linien geben den Mittelwert der Änderung des SCORE-Signals und die farbige hinterlegten Flächen die zugehörige Standardabweichung von 4 Replika auf den unterschiedlichen Oberflächen wieder.

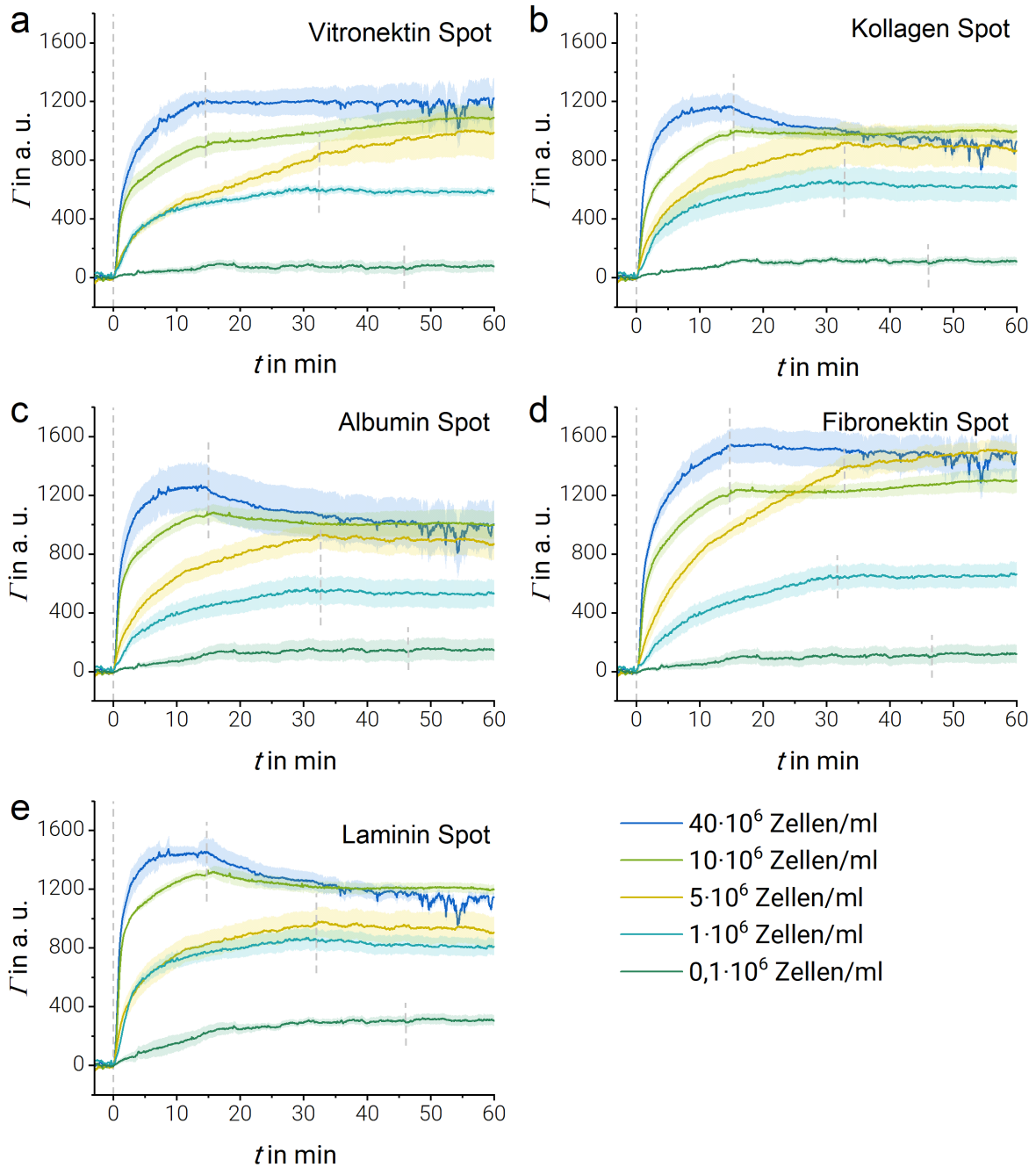


Abbildung 4.22: Konzentrationsreihen der Zelladsorption auf mit Proteinen beschichtetem Glas. Mittlere Signaländerung ($n=4$) (Linien) mit Standardabweichung (farbig hinterlegte Flächen) von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf mit a) Vitronektin, b) Kollagen, c) Albumin, d) Fibronektin und e) Laminin beschichtetem Glas durch die Adsorption von Zellen. Im mit grau gestrichelten Linien gekennzeichneten Zeitbereich wurde die jeweilige Zellsuspension injiziert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium über die Transduceroberfläche geleitet.

4.3.2 Auswertung nach einem Modell der Kinetik pseudoerster Ordnung

Kinetische und thermodynamische Modelle, die auf der Langmuir-Adsorptionsisotherme basieren und keine Erweiterungen aufweisen, können die Komplexität der Zell-Material-Interaktion nicht widerspiegeln. Diese Modelle beruhen auf folgenden Annahmen: Der Analyt kann als sehr kleines kugelförmiges Objekt mit einer Bindungsstelle, die bei allen Analyt-Teilchen identisch ist, betrachtet werden. Es gibt nur eine Sorte von Bindungsstellen mit gleichen Eigenschaften. Diese Bindungsstellen sind gleichmäßig über die Oberfläche verteilt und der Analyt kann nur mit den Bindungsstellen an der Oberfläche interagieren. Damit werden die Inhomogenität der Oberfläche, mehrere mögliche Bindungsstellen am Analyten und der Oberfläche, sterische Effekte während der Anbindung, die Interaktion der Analyten untereinander, eventuelles Ausbilden von mehreren Schichten und die Veränderung der Bindungsstellen über die Zeit durch beispielsweise die Umfaltung von Proteinen während der Adsorption, nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund stehen die Anwendung der Langmuir-Adsorptionsisotherme und Modelle für die Bestimmung der Ratenkonstanten über Kinetik pseudoerster Ordnung bei komplexeren Analyten und Systemen in starker Kritik [128]. Betrachtet man nun den komplexen Vorgang der Zelladsorption, können alle oben genannten und weitere Phänomene auftreten.

Dennoch haben einige Forscher zur Untersuchung der Zelladsorption und Zelladhäsion auf Oberflächen und Rezeptoren diese einfacheren Modelle herangezogen [129, 130]. Diese überzeugen mit leicht zugänglichem Know-How zur Durchführung der Messungen, bestehender Software zur Datenanalyse und einer weiten Verbreitung, was den Vergleich der Ergebnisse zwischen Arbeitsgruppen, den Messmethoden und Geräten ermöglicht. Man ist sich bei der Anwendung dieser einfachen Methoden darüber bewusst, dass sie eine starke Vereinfachung der Wirklichkeit darstellen, gibt sich damit jedoch zufrieden, wenn es vor allem darum geht, das Adsorptionsverhalten auf verschiedenen Oberflächen vergleichend zu betrachten und keine unumstrittenen Werte der Parameter zu bestimmen. Zudem kann zwar davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nicht ganz akkurat berechnet werden, jedoch auch keine Überinterpretation der Daten stattfindet. In einigen Fällen ist sehr schwer zu erkennen, welche Erweiterung des Modells die Prozesse am besten widerspiegelt. Viele Erweiterungen der Theorie um verschiedene Mechanismen abzubilden, wie verschiedene Bindungsstellen an Analyt und Bindungsstelle an der Oberfläche, Interaktionen zwischen den Analyten, Veränderung der Bindungsstellen über die Zeit etc. und Kombinationen dieser Erweiterungen sind denkbar. Die Analyse der Daten mit verschiedenen Modellen liefert oft in sich schlüssige, aber unterschiedliche Ergebnisse. Da komplexere Modelle oft deutlich mehr freie Parameter besitzen, die über das Anpassen des Modells an

die Daten bestimmt werden, ist oft eine große Übereinstimmung der Daten mit dem Modell zu beobachten, auch wenn das komplexere Modell die tatsächlichen Prozesse nicht widerspiegelt [123]. Somit gibt es ein großes Risiko einer Über- oder Fehlinterpretation der Daten, wenn kein detailliertes Wissen zur Interaktion der untersuchten Bindungspartner vorliegt. Die Anwendung von einfachen Modellen stellt damit einen guten Startpunkt für weitere Untersuchungen dar.

Auch in dieser Arbeit wird zu Beginn ein sehr schlankes, einfaches und weit verbreitetes Modell zur kinetischen Untersuchung von Wechselwirkungen an Grenzflächen auf Basis der Kinetik pseudoerster Ordnung verwendet. Es wird untersucht, wie gut dieses Modell die Adsorptionsprozesse der Zellen auf die Oberflächen in den hier vorgestellten Messungen widerspiegelt und wie sich die Auswahl des Datenbereichs und der mathematischen Verfahren auf die Ergebnisse auswirkt.

Bestimmung der Ratenkonstanten über lineare Regression der scheinbaren Ratenkonstante

Zunächst wurden die Ratenkonstanten k_a und k_d der Zelladsorption mit einem kinetischen Modell pseudoerster Ordnung berechnet. Verschiedene mathematische Verfahren zur Bestimmung der Ratenkonstanten und Unterschiede in der Auswahl des Datenbereiches wurden verwendet, um bewerten zu können, wie geeignet dieses sehr einfache Modell ist, um komplexere Interaktionsprozesse näherungsweise beschreiben zu können.

In Abb. 4.23 sind, stellvertretend für alle Oberflächen, die Sensorgramme der Zelladsorption bei unterschiedlichen Konzentrationen der Zellsuspension auf mit Kollagen beschichtetem Glas gezeigt – die Ergebnisse zu den anderen Oberflächen sind im Anhang zu finden. Die zugehörigen Kurvenanpassungen zur Bestimmung der kinetischen Ratenkonstanten sind als schwarze Kurven dargestellt. Der Auswertebereich von 0-15 min wurde gewählt, da in den vorangegangenen Kapiteln mittels fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte, dass sich der Einfluss auf das Messsignal durch das Spreiten der Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt einstellt. Damit ist dieser Zeitraum der längste, den man auf Basis der vorliegenden Ergebnisse bedenkenlos zur Auswertung der Kinetik heranziehen kann. Die zuvor (siehe Kapitel 3.3.2) dargestellten Gründe haben eine deutliche Abweichung der Anpassung des Modells an die Messdaten erwarten lassen. In Abb. 4.23 ist jedoch eine gute Anpassung des Modells an die Messdaten ersichtlich. Trotz dieser – für Messungen zur Zelladsorption – sehr guten Ergebnisse, zeigt eine genauere Betrachtung der Kurvenanpassungen, dass eine systematische Abweichung der Anpassung vor allem am Anfang und am Ende des Auswertebereichs gegenüber der Messdaten vorliegt.

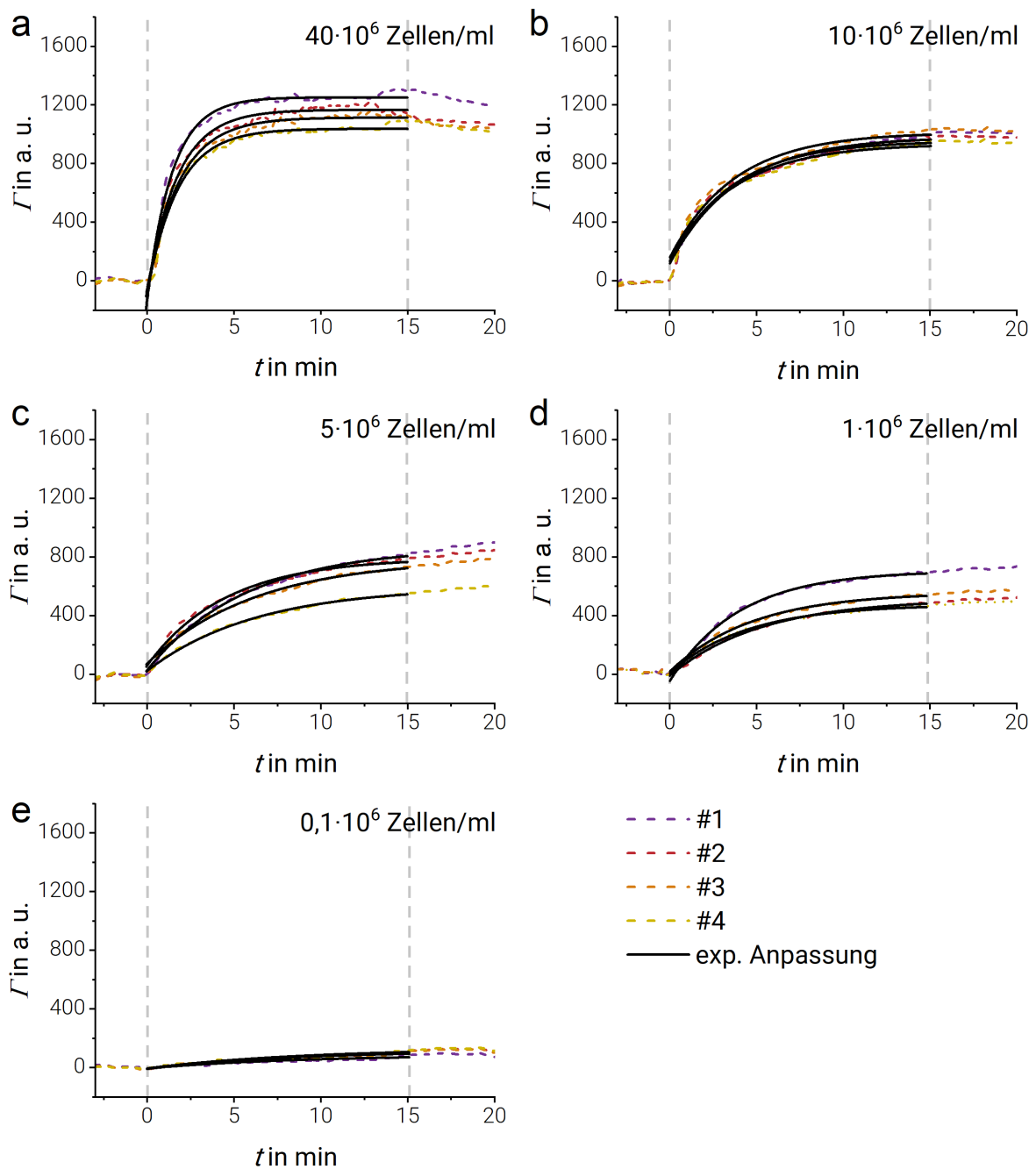


Abbildung 4.23: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde eine Einschränkung des Auswertebereiches vorgenommen. Hierfür wurde das Differenzial der Bindungskurven $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ betrachtet (Abb. 4.24). Liegt eine Kinetik pseudoerster Ordnung vor, lässt sich dies grafisch leicht daran erkennen, dass in der Darstellung der Bindungskurve $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ der Kurvenverlauf einer Geraden mit negativer Steigung folgt. Über diese Darstellung wurde der Bereich der Bindungskurve gewählt, in dem bei allen Replika ein weitestgehend linearer Kurvenverlauf erkennbar ist. Diese Bereiche sind im Falle der Analyse der Ergebnisse von mit Kollagen beschichtetem Glas in Abb. 4.24 hellgrau hinterlegt – die Ergebnisse der mit Vitronectin, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichteten Glasoberfläche sind im Anhang zu finden. Die Grenzwerte von Γ , ab denen ein weitestgehend linearer Verlauf in dieser Darstellung erkannt wurde, ist zu allen Oberflächen und Konzentrationen der Zellsuspension in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Mit Abnahme der Zellkonzentration und damit auch geringerem Signal Γ während der Anlagerung der Zellen an die Oberfläche, liegen auch die Grenzwerte für die Reduzierung des Auswertebereiches niedriger. Zwischen den Oberflächen lassen sich Unterschiede in den Grenzwerten erkennen. Da als Grenzwert jeweils jener Wert für Γ gewählt wurde, ab dem bei allen Replika ein linearer Verlauf erkennbar war, stellen diese Grenzwerte eine konservative Reduzierung des Auswertebereiches dar. Einzelne Messungen können den Grenzwert jedoch leicht in Richtung höherer Werte verschieben – wie in Abb. 4.24 a, Replika # 1 erkennbar ist.

Die Betrachtung der Kurvenverläufe in der Darstellung $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ zusammen mit den ermittelten Grenzwerten für die unterschiedlichen Oberflächen lässt jedoch folgende Aussagen zu: Die negative Steigung des Kurvenverlaufs – ein Äquivalent für k_s – während der Physisorption der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen zeigt Unterschiede. Auch die Beladungen $\Gamma(t)$, ab welcher vorherrschende Ratenkonstanten zu finden sind unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Proteinbeschichtungen. Dies lässt erwarten, dass im Folgenden für die unterschiedlichen Proteinbeschichtungen unterschiedliche Werte für k_a und k_d der Zelladsorption bestimmt werden, wie auch, dass die Wahl des Auswertebereiches die Ergebnisse beeinflusst.

Die Anpassung des Modells pseudoerster Ordnung an diesen verkürzten Auswertebereich ist in Abb. 4.25 dargestellt. Im Vergleich zur vorangegangenen Auswertung des gesamten Auswertebereiches, schlagen sich hier Diffusions- und Konvektionseffekte zu Beginn der Messung weniger stark auf die Berechnung der Ratenkonstanten nieder. Auch der Einfluss der Gleichgewichtsbeladung auf die Ergebnisse ist weniger stark ausgeprägt.

Eine Reduktion der Daten, und der damit einhergehende Informationsverlust, führt im Allgemeinen dazu, dass die Anpassung eines Modells an die Daten besser wird. Zudem wurden die Daten so ausgewählt, dass diese dem Modell möglichst gut folgen. In diesem Fall liefert die Reduzierung des Auswertebereichs daher scheinbar bessere

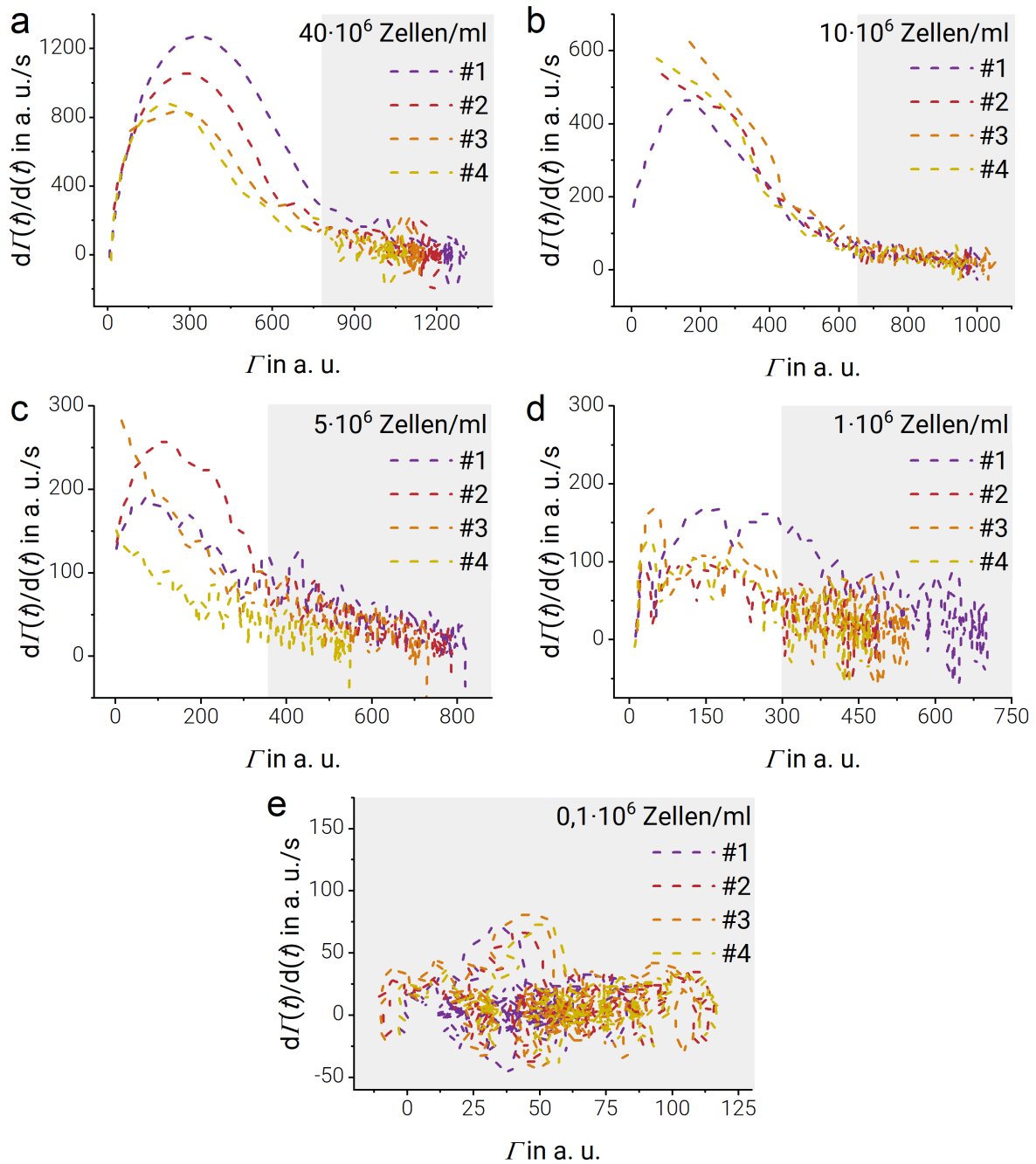


Abbildung 4.24: Einschränkung des Auswertebereiches zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas auf den Bereich, in dem die Sensorgramme nahezu einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Die Darstellung der Daten in Form von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ erlaubt die grafische Beurteilung, ob der Signalverlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die Ergebnisse zu den 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Der eingeschränkte Datenbereich, in dem die Daten in dieser Darstellung bei allen Replika weitestgehend einer Geraden mit negativer Steigung folgen, wurde ausgewählt und ist in den Abbildungen hellgrau hinterlegt. Bei der Konzentration von $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden alle Daten ausgewählt, da keine deutlichen Änderungen von k_s erkennbar sind.

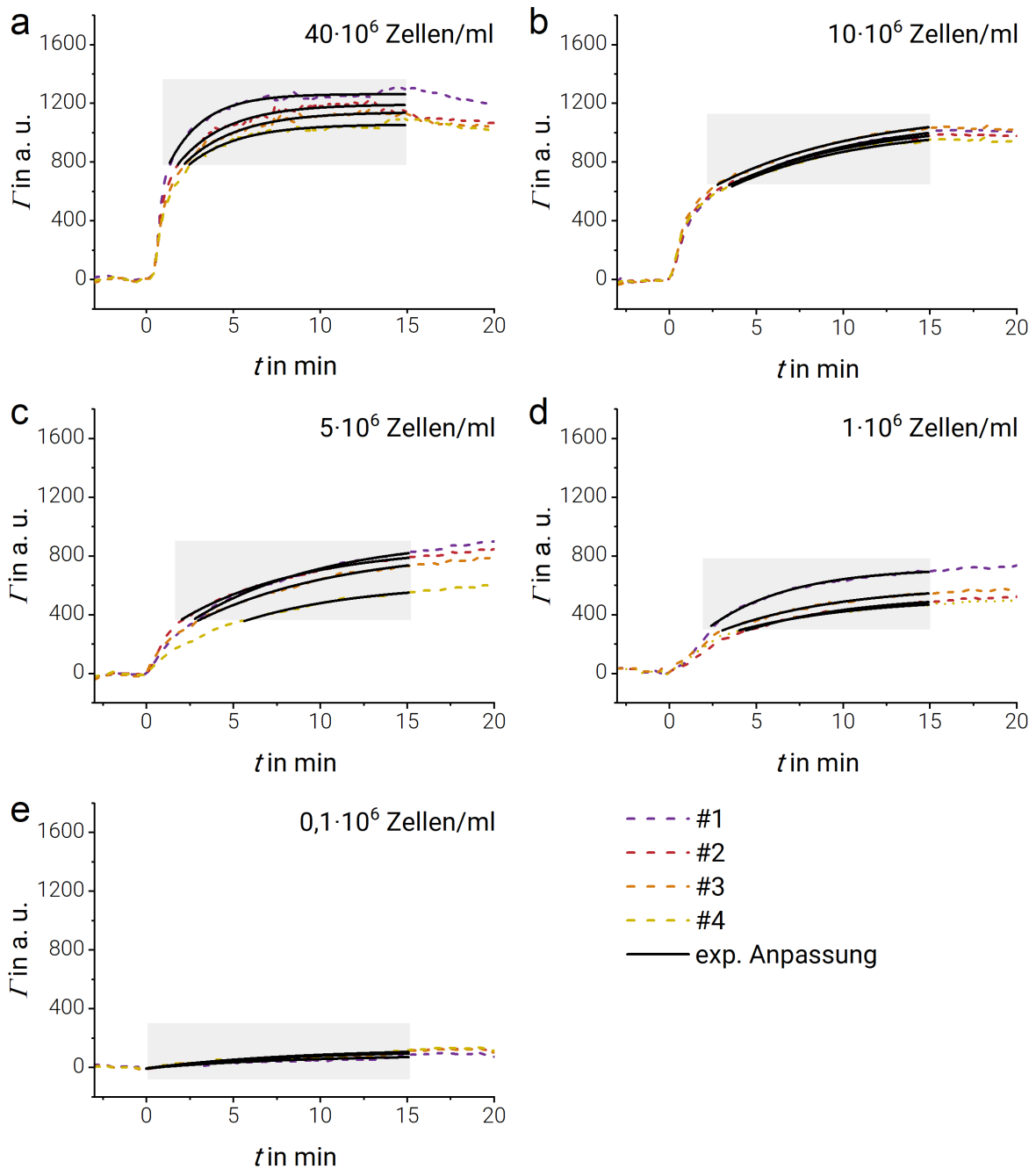


Abbildung 4.25: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, zuvor festgelegten Bereich herangezogen. Die Daten im reduzierten Auswertebereich sind hellgrau hinterlegt. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

Ergebnisse - wie auch im Vergleich der Residuen der Anpassungen im Auswertebereich 0-15 min und mit reduziertem Auswertebereich (Abb. 4.26) deutlich wird. Hier ist erkennbar, dass die Abweichungen der Daten von der angepassten Kurve im Falle des reduzierten Auswertebereichs im Vergleich zum Auswertebereich 0-15 min vor allem bei Messungen mit höheren Konzentrationen der Zellsuspension deutlich geringer ausfallen. Bei der Betrachtung der nachfolgenden Analyse der Ratenkonstanten sollte also berücksichtigt werden, dass diese im Falle des Auswertebereichs von 0-15 min die Kombination der vorliegenden Ratenkonstanten der Einzelreaktionen einer Kinetik pseudoerster Ordnung (oder scheinbaren Kinetik pseudoerster Ordnung) beschreibt. Im Fall der Auswertung mit reduziertem Auswertebereich werden dann jene Ratenkonstanten ermittelt, die den Kurvenverlauf in einer Kinetik pseudoerster Ordnung (oder scheinbaren Kinetik pseudoerster Ordnung) dominieren. Dies entspricht in beiden Fällen nicht einer Bestimmung der Ratenkonstanten der einzelnen Interaktionsprozesse der Physisorption der Zellen an die Oberfläche.

Tabelle 4.3: Grenzwert von Γ in a.u. ab dem bei allen Replika der Signalverlauf in der Darstellung der Bindungskurve $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ einer Geraden mit negativer Steigung folgt. Dies ist zu erwarten, wenn die Reaktion einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Diese Grenzwerte wurden verwendet, um den Auswertebereich der Datensätze zu reduzieren.

	Grenzwert $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml <i>in a. u.</i>	Grenzwert $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml <i>in a. u.</i>	Grenzwert $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml <i>in a. u.</i>	Grenzwert $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml <i>in a. u.</i>	Grenzwert $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml <i>in a. u.</i>
Vitronectin	760	680	330	310	0
Kollagen	780	650	360	300	0
Albumin	1000	820	320	270	0
Fibronectin	900	870	390	220	0
Laminin	1100	1020	220	320	0

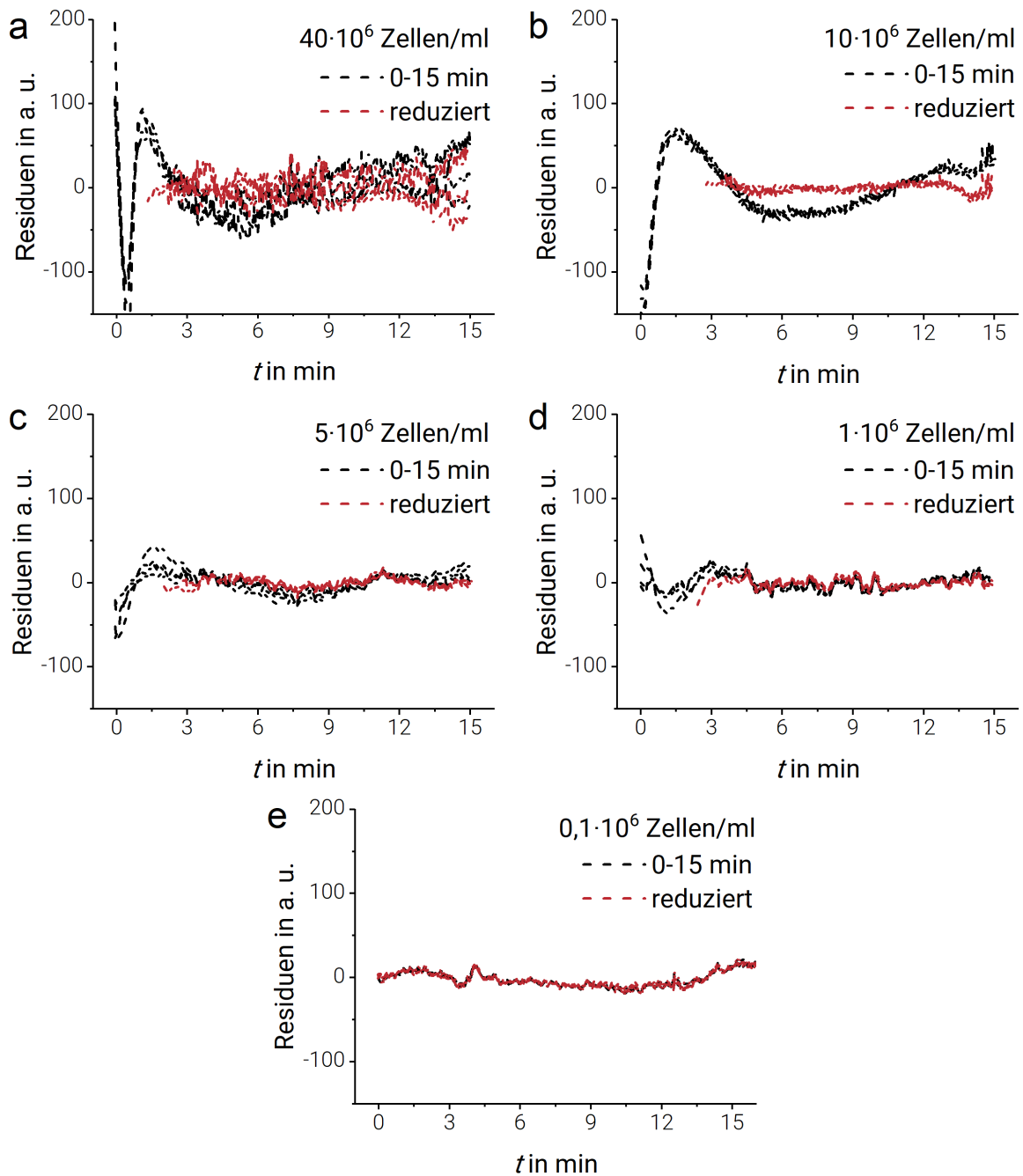


Abbildung 4.26: Vergleich der Residuen der exponentiellen Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas. Residuen der 4 Replika der exponentiellen Anpassung an die Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind für den Auswertebereich 0-15 min in schwarzen gestrichelten Linien und für den reduzierten Auswertebereich in roten gestrichelten Linien dargestellt.

Die Ratenkonstanten k_a und k_d wurden zunächst über eine lineare Anpassung von k_s – dem Ergebnis der Kurvenanpassung im vorangegangenen Schritt – über die Konzentration ermittelt (Abb. 4.27). Es ist erkennbar, dass die berechneten k_s -Werte in vielen Fällen nahe an der angepassten Geraden liegen. Die Steigung, und damit k_a der angepassten Geraden ist für alle Oberflächen im Falle der Auswertung mit reduziertem Auswertebereich kleiner (Abb. 4.27 und 4.28). Mit einem Blick zurück auf die Darstellung der Bindungskurven in der Form $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ in Abb. 4.24 ist dies nachvollziehbar. Jene Bereiche der Bindungskurven mit stärkerem Signalabfall und damit größerem k_a wurden aus der Auswertung mit reduziertem Auswertebereich ausgeschlossen, da der Signalabfall nicht konstant war. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Analyse der verschiedenen Auswertebereiche bestätigen die Vermutung, dass das sehr einfache Modell einer Kinetik pseudoerster Ordnung zur Analyse der Daten nicht geeignet ist, unumstrittene quantitative Ergebnisse zur Bestimmung der Ratenkonstanten der Zelladsorption auf mit ECM-Proteinen beschichteten Glasoberflächen zu ermitteln. Trotz der quantitativen Unterschiede der Bestimmung von k_a zwischen der Analyse der Ergebnisse im Auswertebereich 0-15 min und im reduzierten Auswertebereich, stehen die Ergebnisse im Vergleich der Oberflächen in einem sehr ähnlichem Verhältnis zueinander. Daher ist eine vergleichende Betrachtung zwischen den Oberflächen möglich. Die Geschwindigkeit der Hinreaktion (die Anbindung der Zellen auf die Oberfläche) ist insgesamt auf der mit Laminin beschichteten Glasoberfläche am schnellsten, gefolgt von Albumin und Kollagen und danach Fibronektin und Vitronektin. Die Ergebnisse der Bestimmung von k_d unterscheiden sich für die Physisorption der Zellen auf mit unterschiedlichen ECM-Proteinen beschichtetem Glas kaum (Abb. 4.29). Auch hier sind die Werte für k_d für jede Oberfläche im reduzierten Auswertebereich kleiner als im Auswertebereich 0-15 min.

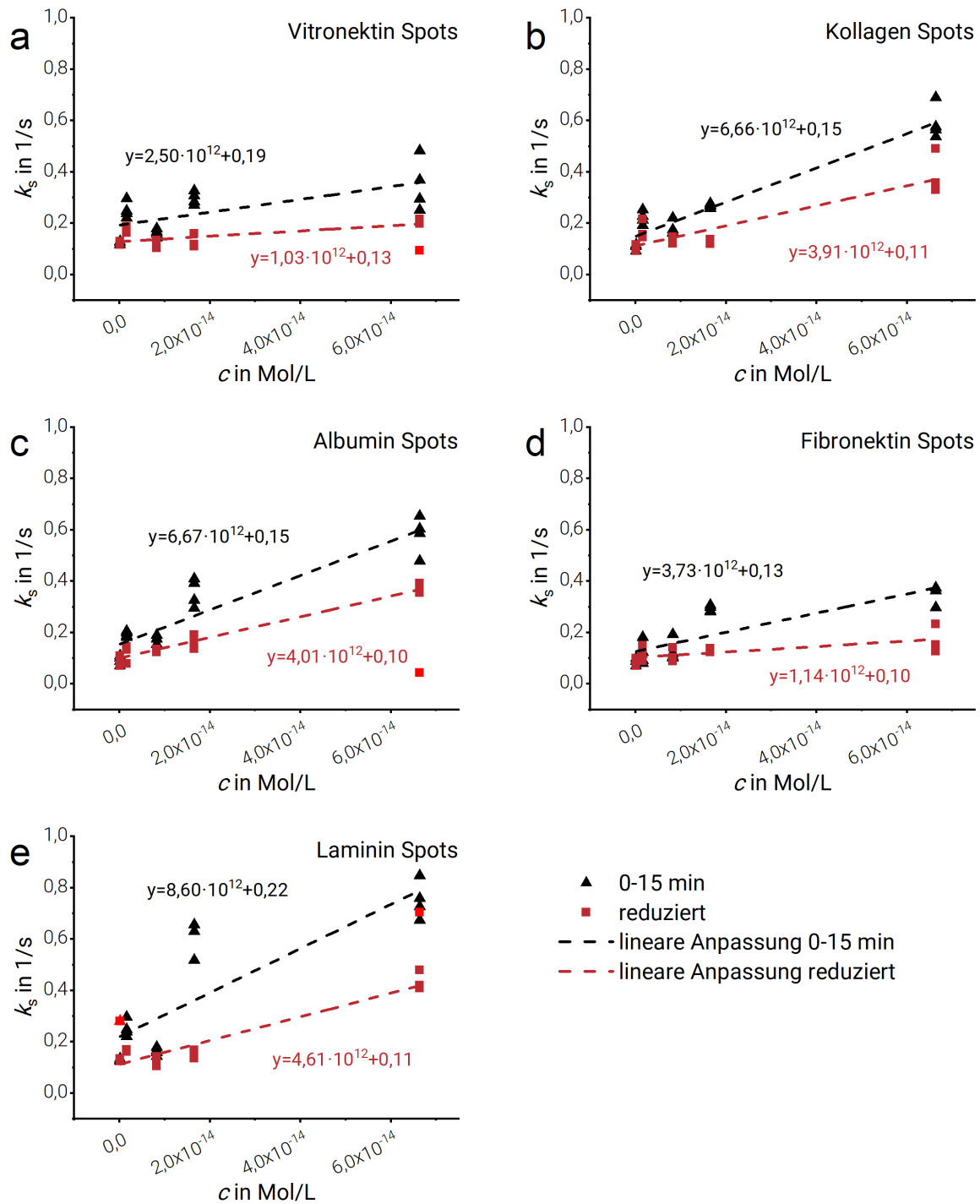


Abbildung 4.27: Lineare Regression der scheinbaren Ratenkonstanten über die Konzentration der Zellsuspension zur Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der Zelladsorption auf mit a) Vitronectin, b) Kollagen, c) Albumin, d) Fibronectin und e) Laminin beschichteten Glassubstraten. Die ermittelten k_s -Werte bei unterschiedlichen Konzentrationen ($n=4$) sind im Auswertebereich 0-15 min als schwarze Dreiecke und im reduzierten Auswertebereich als die roten Vierecke dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen die linearen Regressionen zur Bestimmung von k_a (Steigung) und k_d (y-Achsenabschnitt). Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Ergebnisse der Analyse mit dem Auswertebereich 0-15 min und die rote gestrichelte Linie die Ergebnisse der Analyse mit reduziertem Auswertebereich dar. Ausreißer (von der linearen Anpassung ausgeschlossen) sind in hellrot markiert.

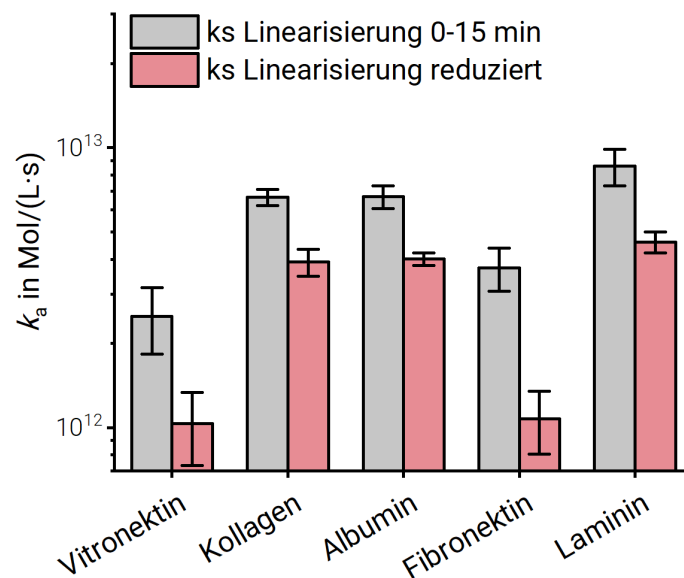


Abbildung 4.28: Assoziationsratenkonstante k_a der Zelladsorption auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glasoberflächen, bestimmt über lineare Regression der scheinbaren Ratenkonstanten über die Konzentration der Zellsuspension. Die grauen Balken zeigen die Ergebnisse beim Nutzen der Daten im Auswertebereich 0-15 min und die roten Balken die Ergebnisse mit reduziertem Auswertebereich. Die Fehlerbalken stellen die Unsicherheit der Anpassung (error of the fit) dar.

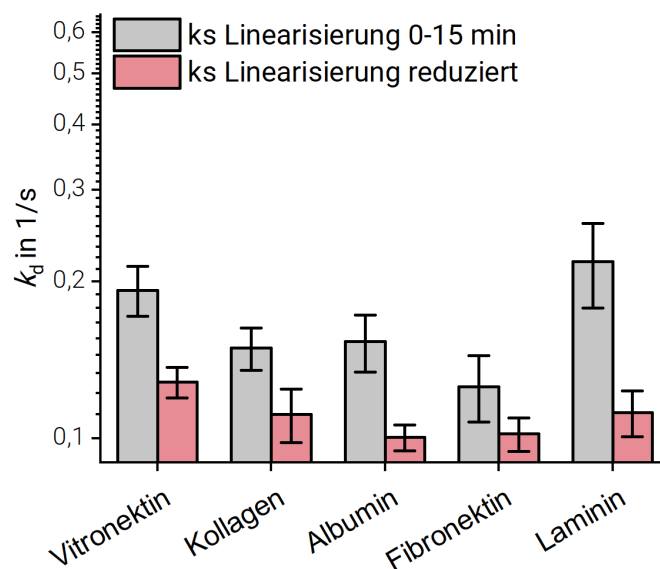


Abbildung 4.29: Dissoziationsratenkonstante k_d der Zelladsorption auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichteten Glasoberflächen, bestimmt über lineare Regression der scheinbaren Ratenkonstanten über die Konzentration der Zellsuspension. Die grauen Balken zeigen die Ergebnisse beim Nutzen der Daten im Auswertebereich 0-15 min und die roten Balken die Ergebnisse mit reduziertem Auswertebereich. Die Fehlerbalken stellen die Unsicherheit der Anpassung (error of the fit) dar.

Auswertung mittels globaler Anpassung

Im Folgenden werden die Daten mittels exponentieller globaler Anpassung – der gleichzeitige Anpassung aller Datensätzen bei unterschiedlichen Konzentrationen – analysiert und daraus k_a und k_d direkt bestimmt. Sowohl die Analyse im Auswertebereich 0-15 min, wie auch im reduzierten Auswertebereich, zeigen eine größere Abweichung der angepassten Kurven vom Verlauf der Bindungskurven als in der exponentiellen Anpassung zur Bestimmung von k_s mit nachfolgender Linearisierung von k_s (Abb. 4.30 und 4.31). Während sich in der vorangegangenen Auswertung die Abweichung des Modells von den Daten in den Abweichungen der exponentiellen Anpassung sowie in der Abweichung der Linearisierung von k_s niederschlägt, zeigt sich die Abweichung der Daten vom Modell bei globaler Anpassung der Daten nur in der exponentiellen Anpassung. Daher sind die beobachteten größeren Abweichungen in der Anpassung der Exponentialfunktion zu erwarten.

Die Bestimmung von k_a über eine globale Anpassung liefert Ergebnisse in vergleichbaren Werte-Bereichen wie die Bestimmung von k_a über die Linearisierung von k_s (Abb. 4.32). Die Reduzierung der Daten des Auswertebereiches beeinflusst die Ergebnisse in manchen Fällen kaum, wie auf mit Vitronektin, Kollagen und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen erkennbar ist. In anderen Fällen führt die Reduzierung der Daten des Auswertebereiches zu einem höheren k_a -Wert (mit Albumin beschichtetes Glas) oder zu einer starken Erhöhung des k_a -Wertes (mit Laminin beschichtetes Glas). Da die Ergebnisse in der globalen Anpassung nicht für jede Bindungskurve einzeln betrachtet werden, schlagen sich Abweichungen der tatsächlichen Konzentration von der theoretisch eingestellten in dieser Form der Auswertung anders auf die Ergebnisse nieder als im Falle der Linearisierung von k_s . Die über eine exponentielle globale Anpassung bestimmten k_d -Werte liegen für alle Oberflächen und Datenbereiche der Auswertung über den k_d -Werten, die über die Linearisierung von k_s ermittelt wurden (Abb. 4.33). Die starken Abweichungen zwischen den Auswertebereichen und Auswertemethoden zeigen, dass die Bestimmung von k_d in diesem Datensatz vergleichsweise unsicher ist. Um ein klareres Bild zur Bestimmung von k_d zu erhalten, wurden im Folgenden noch weitere Methoden zur Bestimmung von k_d auf den Datensatz angewandt.

Die Ergebnisse für k_a und k_d variieren zwischen den Auswertebereichen und Auswertemethoden bei Messungen mit Laminin-Funktionalisierung im Vergleich zu den anderen Oberflächen am stärksten (Abb. 4.32 und 4.33). Bei der Anpassung der exponentiellen Funktionen an die Daten und der Linearisierung über k_s zeigen sich vor allem bei einer Konzentration von $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml die größten Abweichungen (Abb. 4.27, 4.30 und 4.31). Nach einer Untersuchung der SCORE-Bilder konnte hierfür als wahrscheinlichste Ursache eine unregelmäßige Beschichtung der Glasoberfläche mit Laminin bei Messungen mit dieser Konzentration der Zellsuspension gefunden werden.

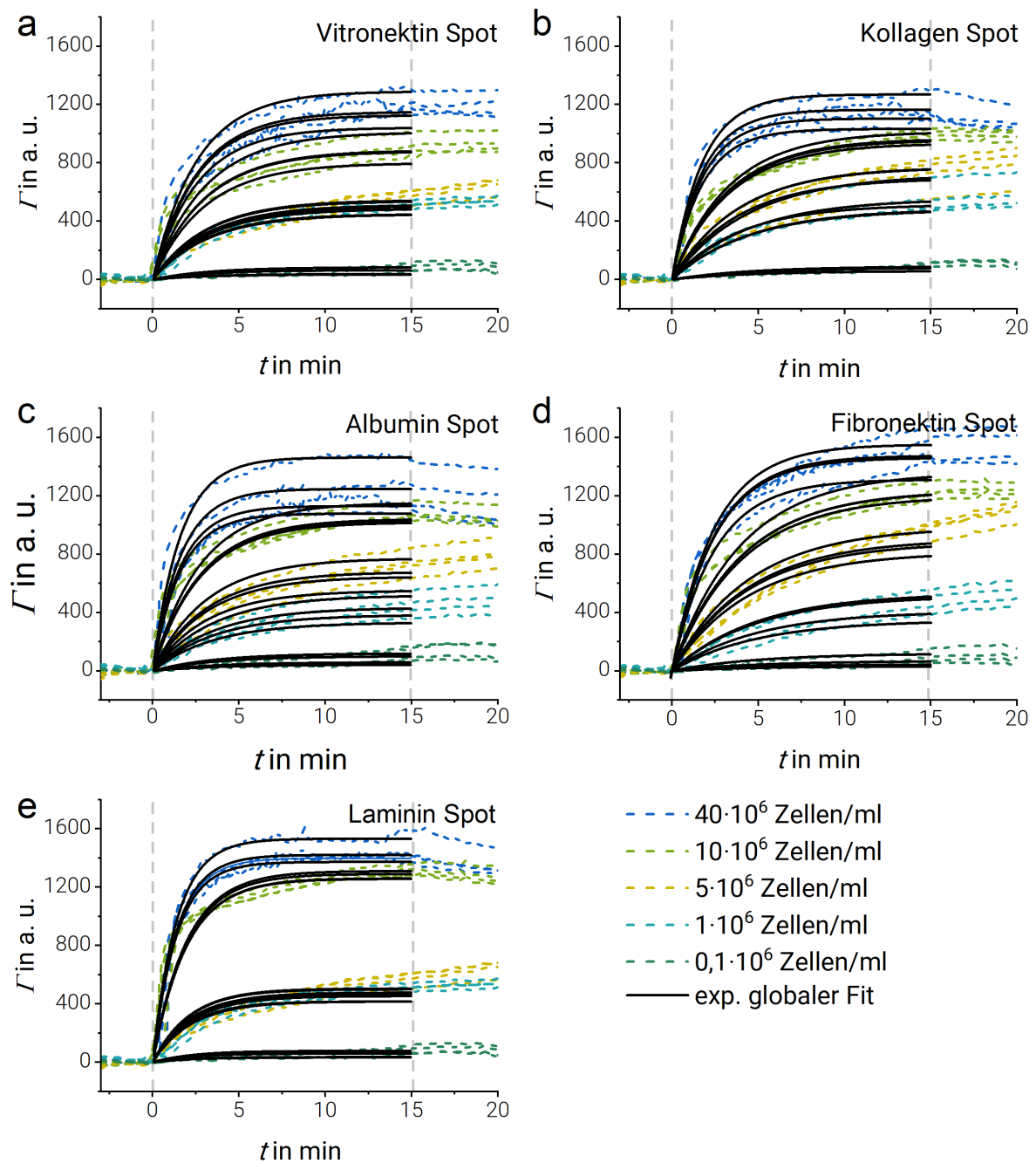


Abbildung 4.30: Bestimmung der Ratenkonstanten k_a und k_d der Zelladsorption auf mit a) Vitronectin, b) Kollagen, c) Albumin, d) Fibronectin und e) Laminin beschichteten Glassubstraten mittels globaler exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika der Zelladsorption bei einer Konzentration von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Die Ergebnisse der globalen exponentiellen Anpassung sind als schwarze Linien über den zugehörigen Daten dargestellt.

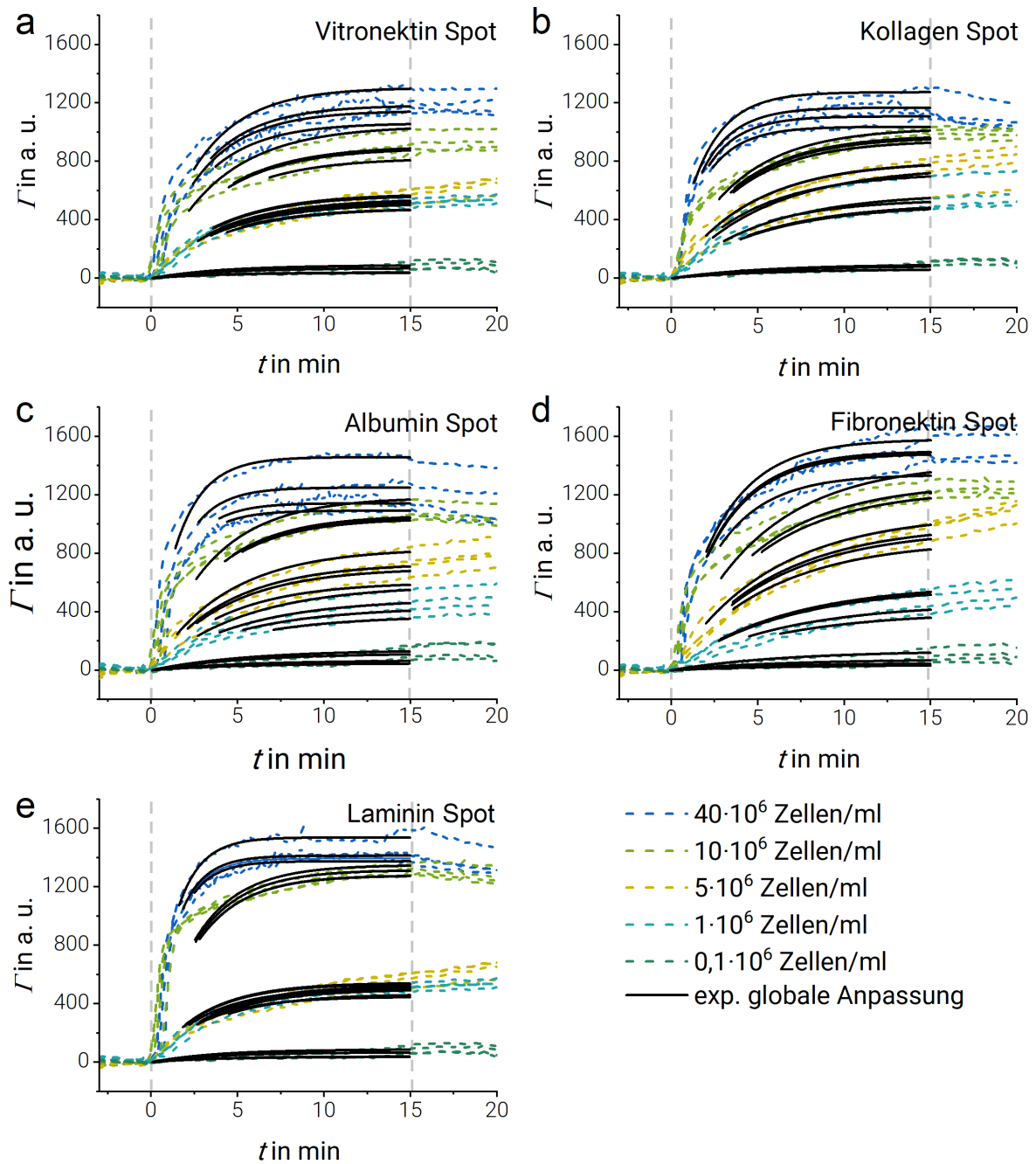


Abbildung 4.31: Bestimmung der Ratenkonstanten k_a und k_d der Zelladsorption auf mit a) Vitronectin, b) Kollagen, c) Albumin, d) Fibronectin und e) Laminin beschichteten Glassubstraten mittels globaler exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika der Zelladsorption bei einer Konzentration von 40 $\cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), 10 $\cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), 5 $\cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), 1 $\cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und 0,1 $\cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im zuvor, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, festgelegten Bereich herangezogen. Die Ergebnisse der globalen exponentiellen Anpassung sind als schwarze Linien über den zugehörigen Daten dargestellt.

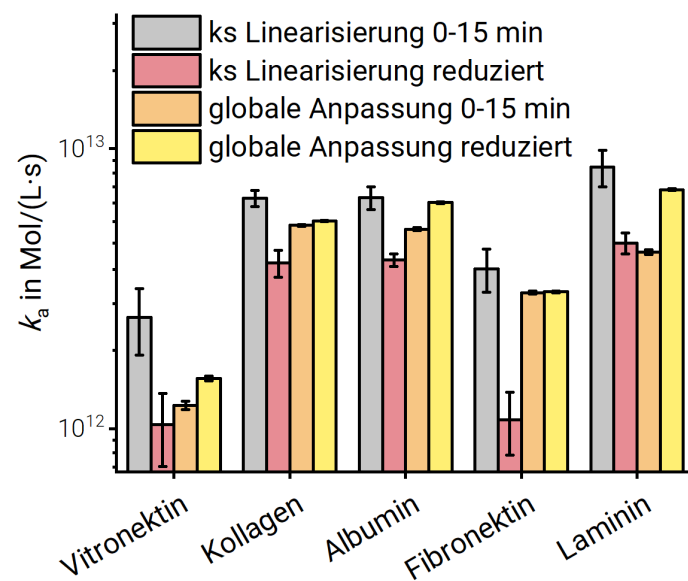


Abbildung 4.32: Assoziationsratenkonstante k_a der Zelladsorption auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichteten Glasoberflächen. Die grauen und roten Balken mit Fehlerbalken zeigen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der Linearisierung von k_s beim Nutzen der Daten im Auswertebereich 0-15 min und dem reduzierten Auswertebereich. Die orangen und gelben Balken mit Fehlerbalken stellen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der exponentiellen globalen Anpassung im Auswertebereich 0-15 min und im reduzierten Auswertebereich dar.

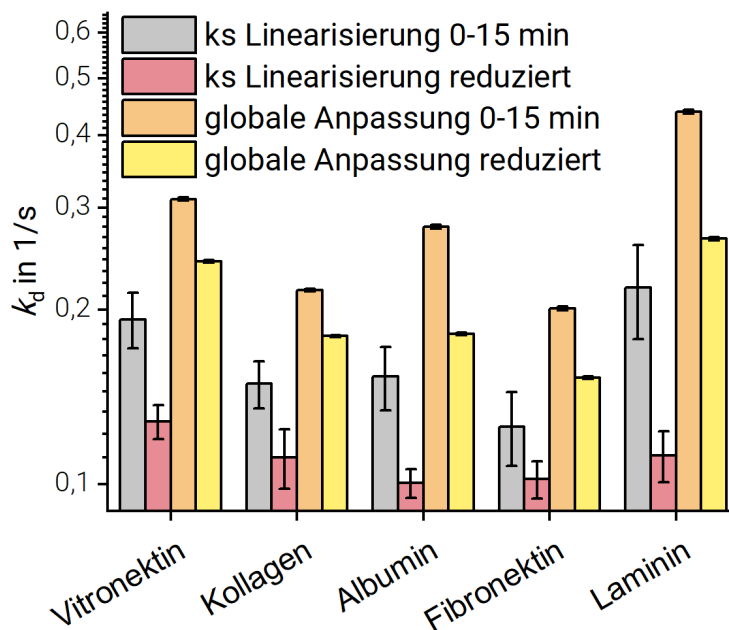


Abbildung 4.33: Dissoziationsratenkonstante k_d der Zelladsorption auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichteten Glasoberflächen. Die grauen und roten Balken mit Fehlerbalken zeigen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der Linearisierung von k_s beim Nutzen der Daten im Auswertebereich 0-15 min und dem reduzierten Auswertebereich. Die orangen und gelben Balken mit Fehlerbalken stellen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der exponentiellen globalen Anpassung im Auswertebereich 0-15 min und im reduzierten Auswertebereich dar.

Weitere Methoden zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante

Da die Bestimmung von k_d über die Linearisierung von k_s oft starken Unsicherheiten unterliegt und die Ergebnisse der Bestimmung von k_d über die Auswertemethoden sowie den verwendeten Auswertebereich stark variiert, wurden weitere Methoden zur Bestimmung von k_d auf diesen Datensatz angewandt.

Oft liefert die Anpassung einer exponentiellen Funktion an die Dissoziationsphase der Bindungskurven bei der höchsten gemessenen Konzentration die verlässlichsten Ergebnisse um k_d zu bestimmen. Die Anpassung der Funktion an die gemessenen Bindungskurven wurde im Bereich von 15-20 min und im Bereich 15-30 min vorgenommen (Abb. 4.34). Die angepassten Kurven folgen dem Signalverlauf sehr gut. Auf den mit Vitronektin und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen konnte nicht an allen Kurvenverläufe der 4 Replika eine abfallende Exponentialfunktion angepasst werden, da das Signal in diesem Bereich gestiegen ist.

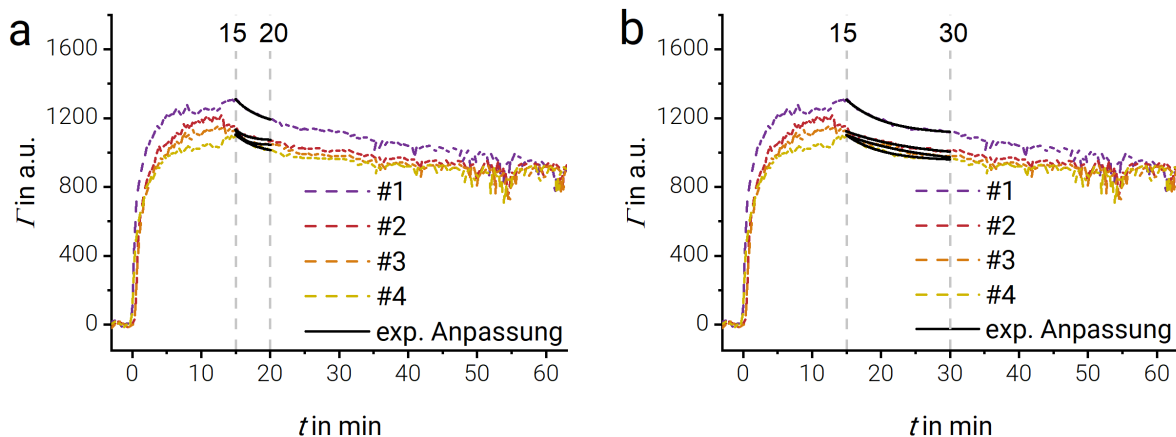


Abbildung 4.34: Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante k_d der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas über exponentielle Anpassung an die Dissoziationsphase (dem Bereich der Bindungskurve in dem nach der Applikation der Zellsuspension Zellkulturmedium über die Transduceroberfläche geleitet wurde) im Bereich a) 15-20 min und b) 15-30 min. Die Konzentration der Zellsuspension beträgt $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die vier Replika sind in lila, rot, orange und gelb dargestellt. Die schwarzen Linien verbildlichen das Ergebnis der Kurvenanpassung.

Wie in Abschnitt 4.2.6 diskutiert wurde und in Abb. 4.17 ersichtlich ist, haben morphologische Veränderungen der Zellen Einfluss auf das gemessene Signal. Mit zunehmendem Fortschritt der Messung nehmen die Einflüsse durch das Spreiten der Zellen auf das Signal zu. Bei der Betrachtung der Dissoziation über einen längeren Zeitraum besteht zunehmend das Risiko, dass die durch das Spreiten der Zellen auf den Oberflächen verursachte Signalzunahme die Signalreduktion durch das Ablösen – die Dissoziation – der Zellen überlagert. Daher wurden die k_d -Werte im Auswertebereich 15-30 min im Vergleich zu den k_d -Werte im Auswertebereich 15-20 min unterschätzt (Abb. 4.36).

Um den Einfluss der morphologischen Veränderungen der Zellen auf das Ergebnis der bestimmten k_d -Werte auszuschließen wurde eine weitere Methode angewandt die Werte für k_d aus der Assoziationsphase zu ermitteln. Über die Linearisierung nach Scatchard wurde in der Auftragung von $\frac{\Gamma_G G}{c}$ über Γ zunächst K aus der negativen Steigung der linearen Anpassung ermittelt (Abb. 4.35). Über den Zusammenhang $K = \frac{k_a}{k_d}$ wurde hieraus mit den oben bestimmten Werten für k_a der Wert für k_d abgeschätzt. Die Ergebnisse dieser Schätzung für k_d liegen bei allen Oberflächen circa eine Größenordnung unter den Werten für k_d , die durch die vorangegangenen Analysen erhalten wurden (Abb. 4.36).

Die starke Variation der durch verschiedene Auswertemethoden und Auswertebereiche erhaltenen Werte für k_d (Abb. 4.36) zeigt, dass im vorliegenden Datensatz die Dissoziation der Zellen von der Oberfläche nicht zufriedenstellend beschrieben werden kann. Diese Unsicherheiten in der Bestimmung von k_d wirken sich direkt auf die Unsicherheiten der Bestimmung von k_a aus. Als Ursache für die Schwierigkeiten in der Bestimmung der Ratenkonstanten, konnte die Komplexität der Interaktion und der Einfluss der morphologischen Veränderungen der Zellen auf den Oberflächen ausgemacht werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4.11) zeigten, dass die Zellen bis zu einem Zeitpunkt von 15 min nach der Injektion noch abgerundet und nicht ausgespreitet auf der Oberfläche vorliegen. Aus diesem Grund konnte dieser Zeitraum für die Analyse der Physisorption der Zellen an die Oberfläche herangezogen werden. Genauere Untersuchungen der Bindungskurven der Zellen auf mit Vitronectin und Fibronectin beschichteten Zellen zeigten jedoch, dass es in manchen Fällen auch zu einem Signalanstieg – verursacht durch morphologische Veränderungen der Zellen an der Oberfläche – zu einem etwas früheren Zeitpunkt kommen kann (Abb. 4.18 und 4.19). Dies führt zu einer Unterschätzung der k_d -Werte auf mit Vitronectin und Fibronectin beschichtetem Glas über die exponentielle Anpassung der Dissoziationsphase.

Zum ersten Mal wurden in dieser Arbeit die Möglichkeit und Grenzen der kinetischen Untersuchung anhand eines Modells pseudoerster Ordnung der Zellinteraktion an Oberflächen mittels der SCORE untersucht. Dieses einfache Modell lieferte in der Bestimmung von k_a zur vergleichenden Betrachtung der Assoziation auf den unterschiedlichen Oberflächen gute Ergebnisse. Es wurden Werte für k_a bestimmt, die einen Mittelwert aller vorliegenden k_a der möglichen unterschiedlichen Bindungsstellen, elektrostatischen Wechselwirkungen und entropischer Effekte widerspiegeln (Analysen im Auswertebereich 0-15 min). Zudem konnten Werte für k_a bestimmt werden, die die vorherrschenden Assoziationsprozesse beschreiben (Analysen im reduzierten Auswertebereich). Die Grenzen der Anwendung dieses einfachen Modells auf die komplexen Interaktionsvorgänge, waren vor allem in der Bestimmung von k_d deutlich ersichtlich. Trotz der stärkeren Schwankungen des Messsignals beim Messen mit

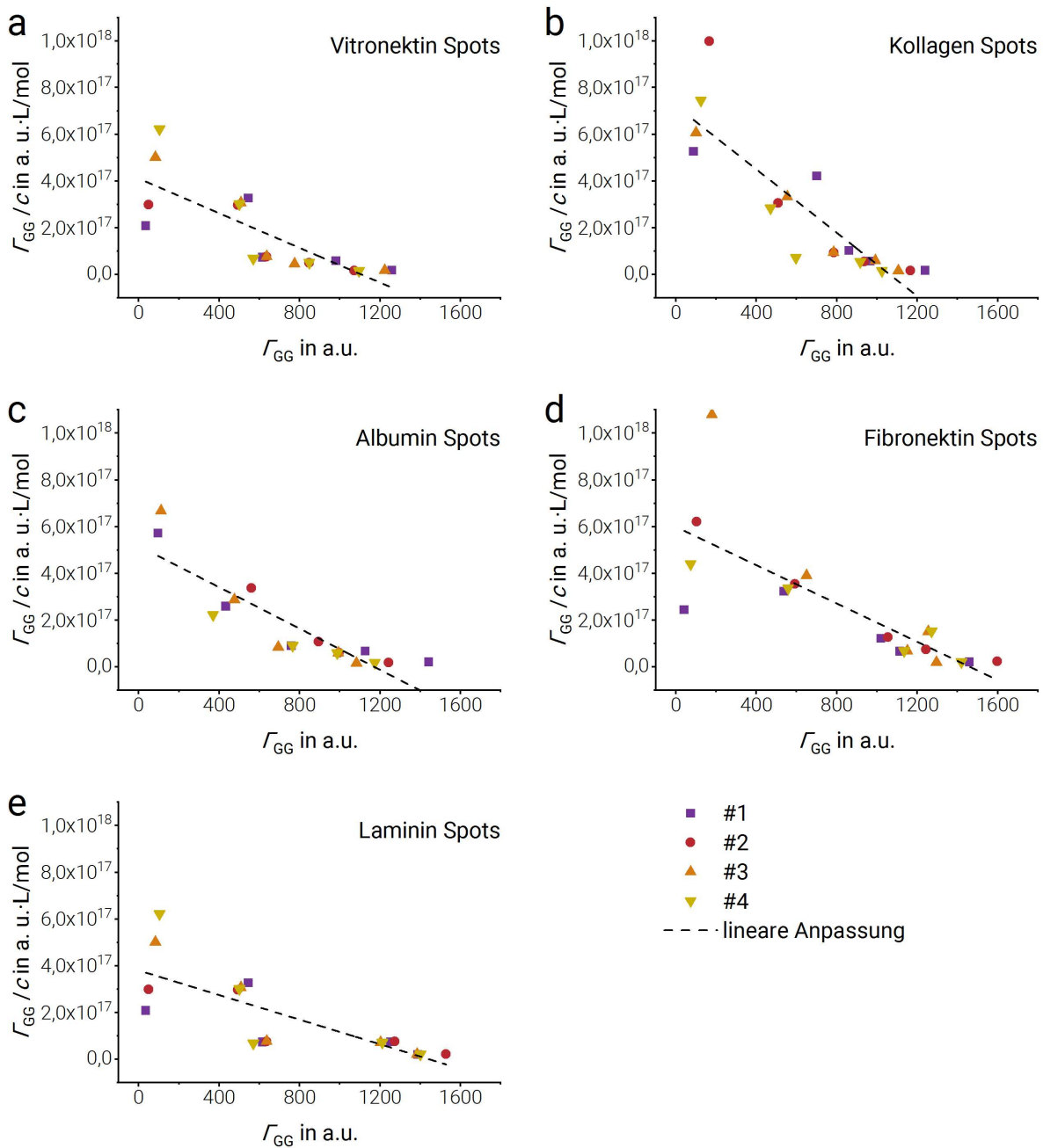


Abbildung 4.35: Bestimmung der Affinitätskonstante K der Zelladsorption auf mit a) Vitronectin, b) Kollagen, c) Albumin, d) Fibronectin und e) Laminin beschichtetem Glas über die Linearisierung nach Scatchard. Die Konzentrationen der Zellsuspension betragen $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die vier Replika sind in lila, rot, orange und gelb dargestellt. Die schwarzen Linien verbildlichen das Ergebnis der Kurvenanpassung.

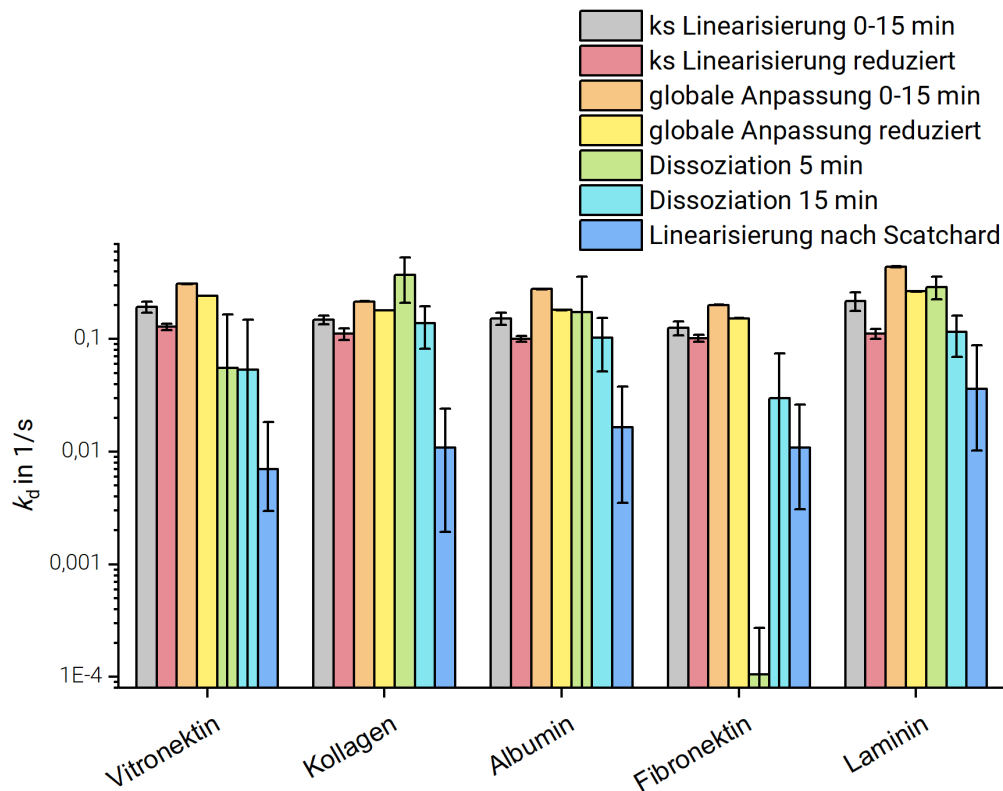


Abbildung 4.36: Dissoziationsratenkonstante k_d der Zelladsorption auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichteten Glasoberflächen. Die grauen und roten Balken mit Fehlerbalken zeigen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der Linearisierung von k_s beim Nutzen der Daten im Auswertebereich 0-15 min und dem reduzierten Auswertebereich. Die orangen und gelben Balken mit Fehlerbalken stellen die Ergebnisse und Unsicherheiten (error of the fit) der exponentiellen globalen Anpassung im Auswertebereich 0-15 min und im reduzierten Auswertebereich dar. Die grünen und hellblauen Balken und Fehlerbalken zeigen die Ergebnisse und die Standardabweichung der 4 Replika der exponentiellen Anpassung an die Dissoziationsphase im Bereich 15-20 min und 15-30 min bei einer Konzentration der Zellsuspension von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die dunkelblauen Balken und Fehlerbalken stehen für die Schätzung und deren Unsicherheit von k_d über die Linearisierung nach Scatchard.

Zellen, konnten die vorliegenden Daten gute Ergebnisse der kinetischen Analyse liefern. In zukünftigen Fragestellungen, die eine Beurteilung der Adsorptionskinetik mit sehr ähnlichen Reaktionspartnern beinhaltet, ist eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Daten wünschenswert. Durch instrumentelle Verbesserungen, eine genauere Kontrolle der Versuchsbedingungen und Verbesserungen in der Versuchsplanung, kann die Qualität der zur kinetischen Analyse zugrunde liegenden Daten verbessert werden. Instrumentelle Verbesserungen können durch eine genauere Kontrolle des laminaren Flusses in der Messkammer und durch Optimierung der Fluidik hin zu möglichst kurzen Schläuchen und einem großen Einstellbereich der Pumpgeschwindigkeit erreicht werden. Für eine genaue Analyse der Interaktion von Zellen mit Oberflächen ist eine Kontrolle der Temperatur und des pH-Wertes der Zellsuspension (auch bei hohen Konzentrationen an Zellen) zukünftig unumgänglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass bei der Untersuchung der Zelladsorption mittels der SCORE das Multiplexing ein Schlüssel zum Erfolg ist. Sowohl die Mittelung des Signals über vergleichsweise große Spots, als auch die Möglichkeit parallel mehrere Replika messen zu können, haben zur sehr guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geführt. Diese attraktiven Möglichkeiten des Multiplexings beim Messen von Zellinteraktionen mittels der SCORE können zukünftig voll ausgeschöpft werden, um belastbarere Ergebnisse in der kinetischen Untersuchung von Zellinteraktionen zu erhalten.

4.3.3 Verwendung des EvilFits zur Berechnung kinetischer Parameter

Nach der genauen Untersuchung der Möglichkeiten und Grenzen der kinetischen Auswertung der Zelladsorption über das einfache Modell der Kinetik pseudoerster Ordnung mittels Anpassung einer Mono-Exponentialfunktion wird in diesem Kapitel die Anwendung eines komplexeren Modells betrachtet. Hierfür wurde die Auswertung der Daten mithilfe des EvilFits gewählt. Damit stellt diese Arbeit die erste Anwendung dieses Modells auf die kinetische Untersuchung der Zelladsorption dar. Das Modell EvilFit basiert auf der Annahme, dass eine Vielzahl an Reaktionen pseudoerster Ordnung parallel ablaufen. Damit kann in diesem Modell berücksichtigt werden, dass die Liganden an der Oberfläche nicht homogen verteilt sind und/oder diese unterschiedliche Bindungsstellen aufweisen. Im Vergleich zu dem einfachen Modell der Kinetik pseudoerster Ordnung, stellt dies eine wichtige Weiterentwicklung dar, um komplexere Interaktionsprozesse zu untersuchen. Dies ist vor allem von hohem Interesse, wenn ein klar definierter Analyten auf eine komplexe Zusammensetzung von Liganden und andere Interaktionsmöglichkeiten an der Transduceroberfläche trifft. In dem hier untersuchten Fall weisen nicht nur die untersuchten Oberflächen einen hohen Komplexitätsgrad

auf, sondern auch die Zellen selbst stellen sehr komplexe Analyten dar. Diese können über unterschiedliche Ankermoleküle, elektrostatische Wechselwirkungen, entropische Effekte und unter Einfluss sterischer Effekte mit der Oberfläche wechselwirken. Noch ist keine Weiterentwicklung des EvilFits zur Berücksichtigung von Inhomogenitäten des Analyten frei zugänglich. Sollten die Entwickler die rechnerischen Schwierigkeiten überwinden und zukünftig auch Inhomogenitäten der Analyten im EvilFit mitberücksichtigt werden können, wird diese Methode noch attraktiver für die Auswertung von Zelladsorption an Oberflächen. Trotz dieser Einschränkung wurde der EvilFit auf den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Datensatz angewandt.

Zusätzlich zu der Untersuchung der Zelladsorption auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichtetem Glas, wurde auch die Zelladsorption auf unbeschichtetem Glas analysiert. Die Ergebnisse dieser Auswertung lieferte unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen von k_d und K_d für die unterschiedlichen Oberflächen (Abb. 4.37 bis 4.42).

Die Zelladsorption auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin und Laminin beschichteten Glasoberflächen zeigen drei Verteilungsspitzen bei ähnlichen k_d - K_d Werte-Paaren. Eine Verteilungsspitze findet sich im Bereich von $1,5 \cdot 10^{-2}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ für k_d und $1 \cdot 10^{-12}$ - $1 \cdot 10^{-14}$ für K_d . Diese Häufigkeitsverteilung hat in der gewählten Darstellung eine kreisförmig bis ellipsenähnliche Form und liegt parallel zur K_d -Achse (horizontal). Zwei weitere Verteilungsspitzen finden sich bei kleineren Werten für k_d (im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-6}$) und K_d (im Bereich von $3 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-17}$). Diese haben in dieser Darstellung eine ellipsenähnliche Form und verlaufen schräg zur K_d -Achse. Neben diesen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die Verteilungen auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin und Laminin beschichteten Glasoberflächen. Die Häufigkeit in der Verteilung im Bereich von $1,5 \cdot 10^{-2}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ für k_d und $1 \cdot 10^{-12}$ - $1 \cdot 10^{-14}$ für K_d ist für die Zelladsorption auf mit Vitronectin und Kollagen beschichtetem Glas gering. Auf mit Albumin beschichtetem Glas sind k_d - K_d Werte-Paare in diesem Bereich im Vergleich häufiger und bilden eine breitere Verteilung. Das Ergebnis der EvilFit Analyse für die Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas lieferte viel häufiger k_d - K_d Werte-Paare in diesem Bereich im Vergleich zu mit Vitronectin, Kollagen und Albumin beschichtetem Glas. Auch im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ für k_d und von $3 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d unterscheiden sich die Ergebnisse der Analyse der Zelladsorption auf die oben genannten Oberflächen mittels EvilFit. Beispielsweise ist die Verteilung für die Zelladsorption auf mit Fibronectin beschichtetem Glas deutlich breiter, als diejenige für die Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas. Im Kontrast zu den oben beschriebenen Oberflächen liefert die Analyse der Zelladsorption auf mit Fibronectin beschichtetem Glas nur eine breite Verteilungsspitze im Bereich von $2 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ für k_d und von $2 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d . Betrachtet man die Ergebnisse der Analyse für die Zelladsorption auf unbeschichtetem Glas, so ist auch hier nur eine Verteilungsspitze erkennbar. Diese befindet sich

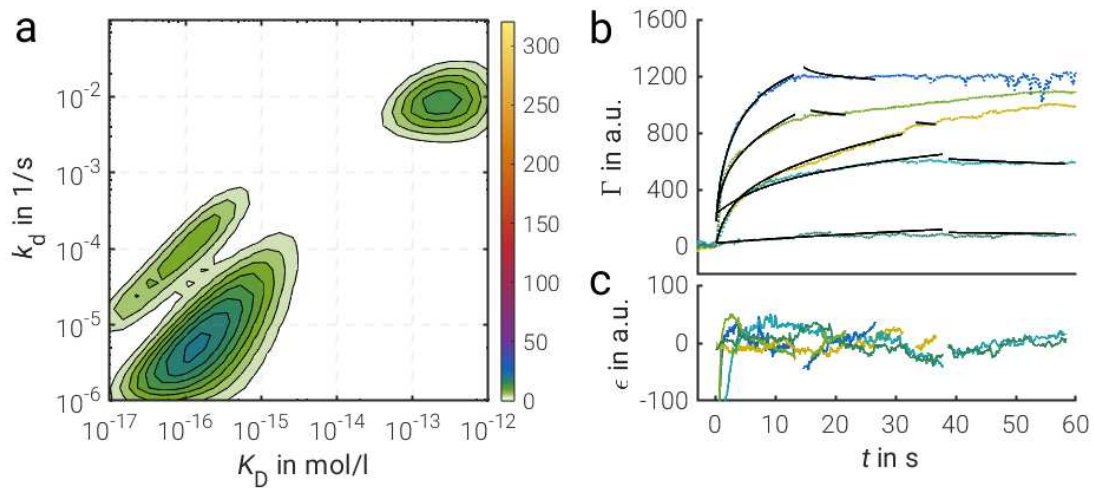


Abbildung 4.37: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf mit Vitronectin beschichtetem Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

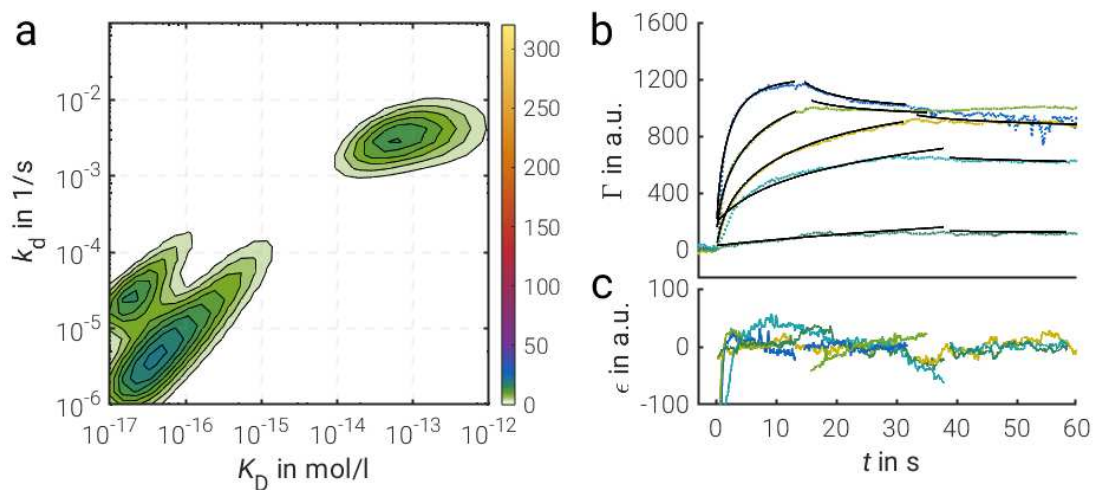


Abbildung 4.38: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf mit Kollagen beschichtetem Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

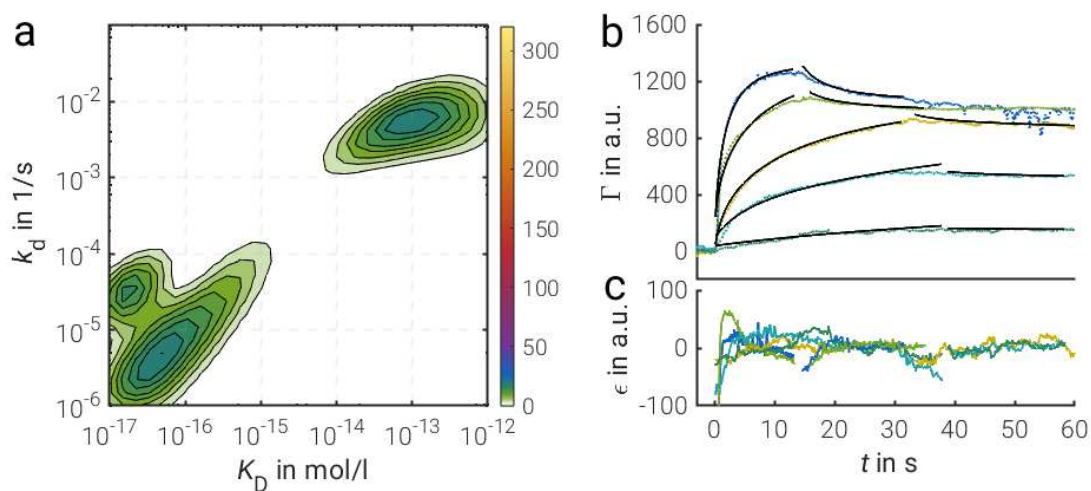


Abbildung 4.39: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf mit Albumin beschichtetem Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

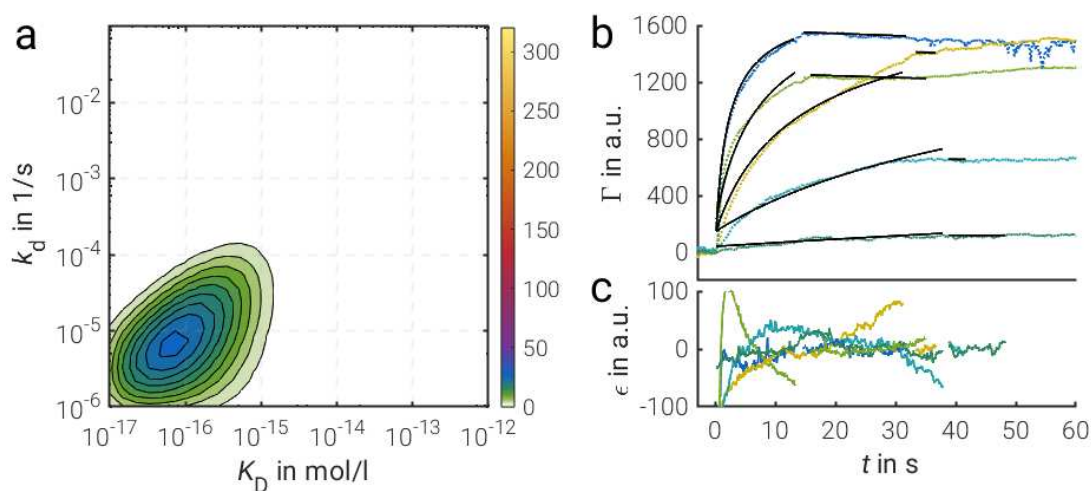


Abbildung 4.40: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf mit Fibronektin beschichtetem Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

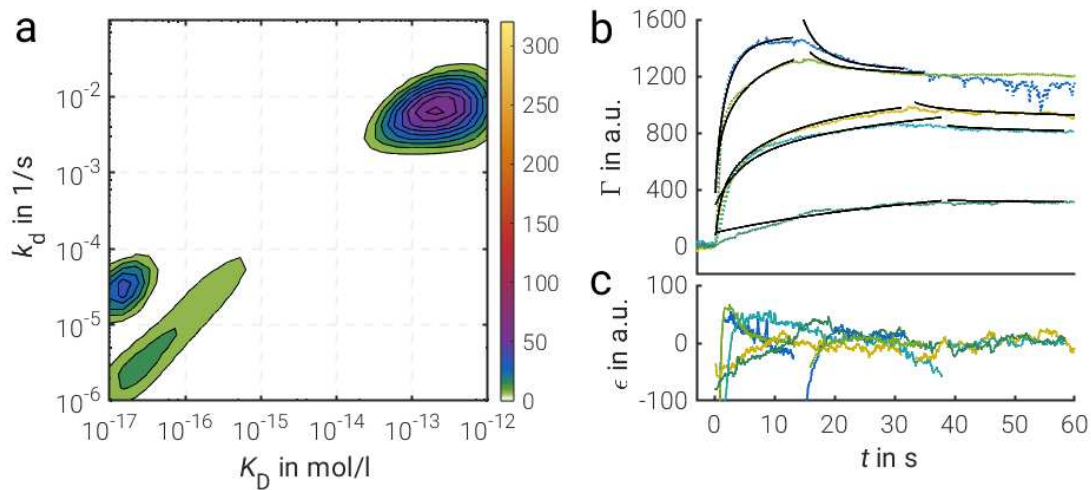


Abbildung 4.41: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

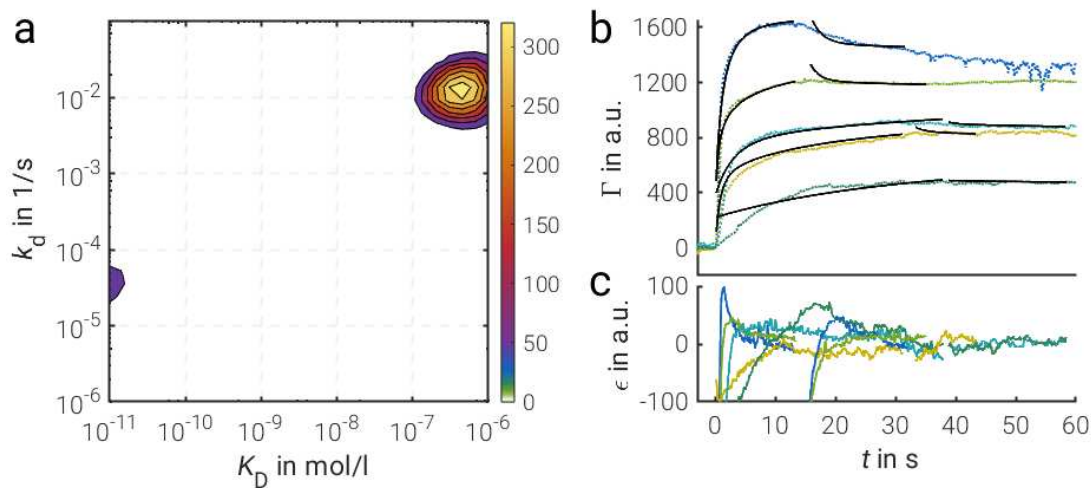


Abbildung 4.42: Kinetische Auswertung der Zelladsorption auf Glas mittels EvilFit. a) Ermittelte Verteilung von k_d und K_d mit zugehöriger Häufigkeit (Falschfarben). Die Basislinien der Assoziation und der Dissoziation wurden individuell angepasst. Das Konfidenzniveau wurde auf 0.95 festgelegt und keine Abnutzung der Oberfläche angenommen. b) Ergebnis der Kurvenanpassung mittels EvilFit. Die Messergebnisse der Zelladsorption von $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml (blaue Linie), $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellgrüne Linie), $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (gelbe Linie), $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (hellblaue Linie) und $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml (grüne Linie) und die zugehörigen angepassten Kurven (schwarze Linien) sind abgebildet. c) Residuen der Kurvenanpassung der Messungen bei verschiedenen Konzentrationen.

im Bereich von $5 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-2}$ für k_d und von $1 \cdot 10^{-12}$ – $1 \cdot 10^{-13}$ für K_d . Die Unterschiede der Verteilungen sind in Tabelle 4.4 detaillierter aufgeführt. Hierfür wurden die Werte über die einzelnen Verteilungsspitzen integriert und daraus der Mittelwert gebildet. Die Anpassung des Modells EvilFit an die Messdaten lieferte etwas schlechtere Ergebnisse, als mit der vorangegangenen einfacheren Auswertemethode (Abb. 4.37 bis 4.42 b). Dies ist auch in den etwas ausgeprägteren systematischen Abweichungen in der Darstellung der Residuen der angepassten Kurve gegenüber den Messwerten erkennbar (Abb. 4.37 bis 4.42 c).

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Verteilungsspitzen von K_d - k_d -Wertepaaren, dem Ergebnis der kinetischen Analyse der Zelladsorption auf mit Vitronektin, Kollagen, Albumin, Fibronektin und Laminin beschichtetem Glas, sowie unbeschichtetem Glas. Nach der Integration über die einzelnen Verteilungsspitzen ("links Mitte"Hauptverteilung im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ für k_d und $5 \cdot 10^{-16}$ – $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d , "links Unten"Hauptverteilung im Bereich von $2 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ für k_d und $2 \cdot 10^{-15}$ – $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d und "rechts Oben"im Bereich von $1,5 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ für k_d und $1 \cdot 10^{-12}$ – $1 \cdot 10^{-14}$ für K_d) wurde daraus der Mittelwert für K_d und k_d ermittelt. Die Werte für k_a wurden über den Zusammenhang $K_d = \frac{k_d}{k_a}$ bestimmt.

Integration über Verteilung	K_d in L/Mol	k_d in 1/s	k_a in Mol/(L·s)
Vitronektin			
links Mitte	$8,18 \cdot 10^{-17}$	$7,56 \cdot 10^{-5}$	$9,24 \cdot 10^{11}$
links Unten	$2,10 \cdot 10^{-16}$	$7,08 \cdot 10^{-6}$	$3,37 \cdot 10^{10}$
rechts Oben	$2,42 \cdot 10^{-13}$	$8,07 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{10}$
Kollagen			
links Mitte	$2,58 \cdot 10^{-17}$	$3,38 \cdot 10^{-5}$	$1,31 \cdot 10^{12}$
links Unten	$7,12 \cdot 10^{-17}$	$7,23 \cdot 10^{-6}$	$1,02 \cdot 10^{11}$
rechts Oben	$8,68 \cdot 10^{-14}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	$3,54 \cdot 10^{10}$
Albumin			
links Mitte	$2,02 \cdot 10^{-17}$	$3,32 \cdot 10^{-5}$	$1,64 \cdot 10^{12}$
links Unten	$7,72 \cdot 10^{-17}$	$7,49 \cdot 10^{-6}$	$9,70 \cdot 10^{10}$
rechts Oben	$1,03 \cdot 10^{-13}$	$4,92 \cdot 10^{-3}$	$4,78 \cdot 10^{10}$
Fibronektin			
links Unten	$1,02 \cdot 10^{-16}$	$8,16 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{10}$
Laminin			
links Mitte	$1,68 \cdot 10^{-17}$	$3,09 \cdot 10^{-5}$	$1,84 \cdot 10^{12}$
links Unten	$1,81 \cdot 10^{-16}$	$2,24 \cdot 10^{-5}$	$1,24 \cdot 10^{11}$
rechts Oben	$2,07 \cdot 10^{-13}$	$6,19 \cdot 10^{-3}$	$2,99 \cdot 10^{10}$
Glas			
rechts Oben	$4,16 \cdot 10^{-13}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,88 \cdot 10^{10}$

Für die Auswertung mithilfe des EvilFits wurde der größtmögliche Datenbereich – auch über 15 min der Assoziationsphase hinaus – ausgewählt, da bei dieser Methode die Daten der Desorptionsphase benötigt werden. Zudem wird die Verteilung der k_d - und K_d -Wertepaare mit der Abnahme des Informationsgehaltes der zugrundeliegen-

den Daten stetig breiter und die erhaltenen Ergebnisse werden ungenauer. Damit ist nicht sichergestellt, dass Einflüsse der morphologischen Veränderung der Zellen auf der Oberfläche ausgeschlossen werden und es ist zu erwarten, dass die berechneten Ergebnisse auch davon abhängen welche Bereiche der Assoziationsphase für die Analyse herangezogen werden. Daher wird die etwas schlechtere Anpassung des Modells an die Daten durch die Verwendung des größeren Datenbereichs erklärt.

Nach dem Zusammenhang $K_d = \frac{k_d}{k_a}$ folgt, dass in dieser Verteilungsdarstellung k_a als „Steigung“ sichtbar wird. Daraus lässt sich folgern, dass für diese beiden Verteilungen im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ für k_d und im Bereich von $3 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d , auf den Oberflächen Vitronektin, Albumin, Kollagen und Laminin, eine Vielzahl verschiedener k_d angenommen werden muss, um die Interaktion zu beschreiben, während für k_a eine weniger stark ausgebreitete Verteilung ausreicht, um die Interaktion gut zu beschreiben. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Bestimmung von k_d von der Überlagerung des Signals während der Dissoziationsphase durch morphologische Veränderungen der adhärennten Zellen beeinflusst ist.

Vergleicht man die Mittelwerte der Integrale über die einzelnen Verteilungsspitzen (Tabelle 4.4) mit den Ergebnissen für k_a und k_d (Abb. 4.32 und 4.36), kann folgendes festgestellt werden: Ein direkter einfacher Vergleich dieser beiden Methoden ist nicht möglich, da einem Wert für k_a und k_d aus der vorangegangenen Bestimmung der kinetischen Ratenkonstanten jeweils Werte für k_a und k_d für jede beobachtete Verteilungsspitze gegenüber stehen. Betrachtet man die Werte für k_d , wird deutlich, dass die Ergebnisse der Auswertung mittels EvilFit, teilweise einige Größenordnungen unter den zuvor erhaltenen Ergebnissen liegen. Die Werte für k_a , bestimmt mittels EvilFit, sind vorwiegend deutlich kleiner, als die Werte für k_a , bestimmt über eine Anpassung einer Mono-Exponentialfunktion mit anschließender Linearisierung. Die Mittelwerte der Verteilung „links Mitte“ (im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ für k_d und $5 \cdot 10^{-16}$ - $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d) auf den unterschiedlichen Oberflächen befinden sich jedoch in der selben Größenordnung, wie die der einfacheren Bestimmung der kinetischen Parameter. Betrachtet man die Ergebnisse der kinetischen Analyse qualitativ, so können auch im Falle der kinetischen Analyse mittels EvilFit, vergleichbare Unterschiede wie jene durch die kinetische Analyse mittels Anpassung einer Mono-Exponentialfunktion mit anschließender Linearisierung festgestellt werden: Die Geschwindigkeit der Adsorption der Zellen an die mit Laminin beschichtete Glasoberfläche erfolgt am schnellsten, gefolgt von mit Albumin und Kollagen und vergleichsweise langsamer auf mit Vitronektin und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen. Diese bemerkenswerte Übereinstimmung der Ergebnisse dieser beiden sehr unterschiedlichen Auswertemethoden zeigt, dass die Anwendung eines einfachen Modells zur Kinetik pseudoerster Ordnung vergleichbare, aber gemittelte Ergebnisse über alle Interaktionsvorgänge liefert. Die Auswertung mittels EvilFit lässt jedoch eine differenzierte Interpretation der Ergebnisse der Zellad-

sorption an die Oberfläche zu.

Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Beschichtung der Glastransducer mit Proteinen der extrazellulären Matrix (Kollagen, Vitronektin und Laminin) und Albumin nicht zu einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche geführt hat. Auf diesen Oberflächen lieferte die Analyse der Zelladsorption mittels EvilFit in ähnlichen Bereichen eine Verteilungsspitze wie für die Zelladsorption auf unbeschichtetem Glas. Besonders deutlich wird dies bei den Ergebnissen für die mit Laminin beschichtete Glasoberfläche (Abb. 4.41). Hier kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen mehr mit der Glasoberfläche interagieren, als mit dem Protein. Die Beschichtung der Glastransducer mit Fibronektin scheint hingegen vollständig zu sein, da sich in der erhaltenen Verteilung keine Spitzen im Bereich der Verteilungsspitze der Zelladsorption auf unbeschichtetem Glas findet. Eine radioaktive Markierung oder Markierung mit Fluorophoren der Proteine auf der Oberfläche – mit nachfolgendem bildgebenden Verfahren – könnte diese Hypothese bestätigen.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Verteilungsspitzen im Ergebnis des EvilFits im Bereich $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ für k_d und im Bereich von $3 \cdot 10^{-15}$ - $1 \cdot 10^{-17}$ für K_d , spezifische Interaktionen der Integrine der Zellen an die Proteine auf der Glasoberfläche widerspiegeln. Diese Hypothese könnte beispielsweise durch den Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse mit Messungen, bei den die Bindungsstellen der Integrine der Zellen vorab besetzt werden, bestätigt werden.

Mit den hier erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die kinetische Untersuchung der Zelladsorption mittels EvilFit qualitativ vergleichbare und detailliertere Ergebnisse im Bezug zur vorangegangenen Untersuchung der Kinetik der Zelladsorption mittels einer Mono-Exponentialfunktion liefert. Zudem ist die höhere Informationstiefe der Ergebnisse der kinetischen Analyse der Zelladsorption auf Oberflächen mittels EvilFit Grundlage für weiterführende spannende Forschungsfragen.

4.3.4 Dynamik der Zelladhäsion

Wie in Abschnitt 4.2.6 dargestellt sind mittels SCORE einzelne Phasen der Zelladhäsion erkennbar. In diesem Kapitel sollen diese für die mit Vitronektin und Fibronektin beschichteten Glasoberflächen genauer quantifiziert und verglichen werden. In Abschnitt 2.3 wird die Einteilung der Zelladhäsion in die Phasen 1) Erster Kontakt der Zellen mit der Oberfläche und deren Anbindung, 2) Ausbildung weiterer Kontaktpunkte und passives Ausspreiten der Zellen auf der Oberfläche und 3) aktive Bindung der Zelle an die Oberfläche mit Ausbildung von fokalen Adhäsionen und Umstrukturierung des Zytoskellets, vorgestellt und erläutert. Der erste Schritt der Zelladhäsion - das In-Kontakt-Kommen und Anbinden der Zellen mit der Oberfläche – wurde in den vorangegangenen Kapiteln mittels kinetischer Auswertung genauer betrachtet, quantifiziert

und bewertet. Die weiteren Interaktionsvorgänge der Zellen mit der Oberfläche können jedoch nicht stichhaltig mit einem auf Gleichgewichtsreaktionen zwischen einem Rezeptoren und Liganden basierenden kinetischen Modell betrachtet werden. Mit fortlaufender Interaktionszeit kommt es vermehrt zum Auftreten von sterischen und synergetischen Effekten. Die geometrische Form der Zelle wie auch deren struktureller Aufbau dominiert die Geschwindigkeit der Adhäsion in zunehmenden Maße. Die Zelle kann als Kugel mit visköser „klebriger“ Hülle um ein weniger visköses Innere modelliert werden. Die „Klebrigkeit“ der Zelle ist dann durch die Summe aller Interaktionen – unspezifische Wechselwirkungen, sowie spezifischer Interaktion zwischen Rezeptormolekülen der Zelle und der Oberfläche – gegeben. Die Verformung dieser Kugel und damit die zweite Phase des Ausspreitens der Zelle, kann dann durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden [131]. Hans-Günther Döbereiner et al. haben bei der Untersuchung der Adhäsion von MEF-Zellen auf Fibronectin drei Zeitregime unterscheiden können [85]. In der mathematischen Beschreibung der Vorgänge zeichnen sich diese Regime durch unterschiedliche Exponenten einer Exponentialfunktion aus. Hierauf basierend wurde auch in dieser Arbeit die Beschreibung der Zelladhäsion auf Fibronectin und Vitronectin über Exponentialfunktionen vorgenommen (Abb. 4.43).

Hierzu wurden die Bindungskurven der Zellen an mit Fibronectin oder Vitronectin beschichtetem Glas in einem kleinen Bereich innerhalb der Cluster, wie in Abschnitt 4.2.6 gezeigt, in einer doppelt logarithmierten Auftragung dargestellt. Der Exponent der Exponentialfunktion, die das Ausspreiten der Zelle beschreibt, kann so über die Steigung der Bindungskurve ermittelt werden. Es konnten drei Zeitregime bestimmt werden, die jeweils durch die Exponenten der Exponentialfunktion a_1 , a_2 und a_3 beschrieben werden können (Abb. 4.43). Der Übergang zwischen den drei Regimen findet an den Zeitpunkten A_1 und A_2 statt. Auf beiden Oberflächen kam es erst zu einem langsameren Ausspreiten der Zellen auf der Oberfläche, gefolgt von einem deutlich schnelleren Ausspreiten im zweiten Regime und einer sehr langsamen Vergrößerung der Zellfläche im dritten Regime. Die Auswertung von 10 Regionen innerhalb der Cluster wurde jeweils für die mit Vitronectin und Fibronectin beschichteten Glasoberflächen durchgeführt und ergab die Werte $a_1=0,35 \pm 0,14$, $a_2=1,32 \pm 0,48$ und $a_3=0,06 \pm 0,05$ für Vitronectin und $a_1=0,38 \pm 0,06$, $a_2=1,71 \pm 0,46$ und $a_3=0,12 \pm 0,14$ für Fibronectin. Damit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Adhäsion der MEF-Zellen in allen drei Regimen auf der mit Fibronectin beschichteten Glasoberfläche schneller, als auf der mit Vitronectin beschichteten Glasoberfläche. Der Übergang zwischen den drei Regimen findet auf der Fibronectin-Oberfläche im Gegensatz zur Vitronectin-Oberfläche jedoch jeweils zu einem späteren Zeitpunkt statt: Im Übergang des langsameren ersten in das schnellere zweite Regime bei $21,3 \pm 4,2$ min im Vergleich zu $16,4 \pm 3,0$ min und bei $45,4 \pm 5,2$ min im Vergleich zu $40,6 \pm 7,4$. Hieraus kann gefolgert werden, dass auf mit Vitronectin beschichtetem Glas aktive Prozesse der Zelladhäsion in Zellen frü-

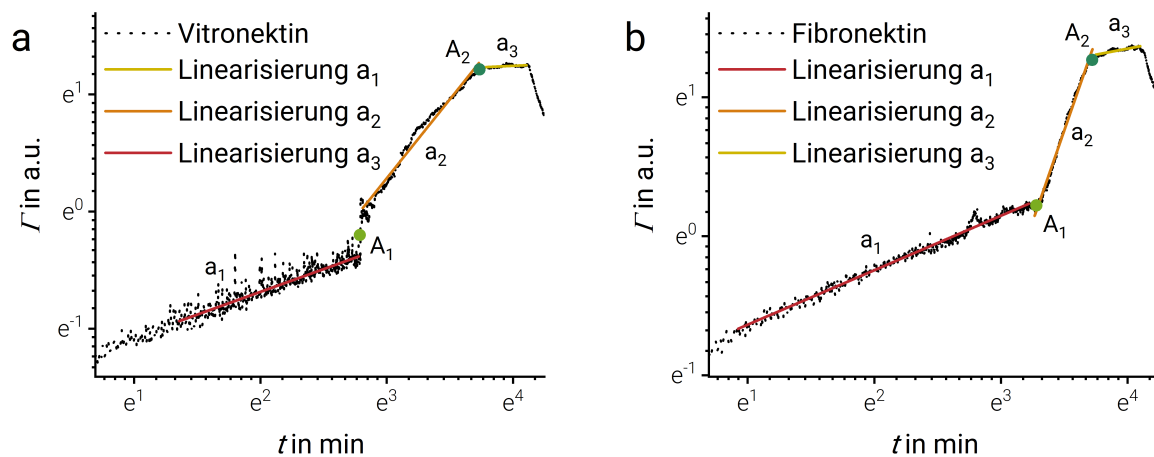


Abbildung 4.43: Dynamik der Zelladhäsion. Beispielhafte Bindungskurve der Zelladhäsion auf einem ausgewählten Bereich von einer mit a) Vitronectin und b) Fibronectin beschichteten Glasoberfläche. Die Messergebnisse sind in einer doppelt logarithmischen Darstellung aufgetragen (schwarze gepunktete Kurve). Die Ergebnisse einer linearen Anpassung an den Kurvenverlauf in unterschiedlichen Zeitregimen sind als gelbe, orange und rote Linien dargestellt. Die Steigung der Geraden entspricht damit den Exponenten a_1 , a_2 und a_3 der jeweiligen Exponentialfunktion, um das Zellspreiten in den verschiedenen Regimen zu beschreiben. Der Zeitpunkt, an dem die Regime der Zelladhäsion wechseln, sind mit A_1 und A_2 gekennzeichnet

her eingeleitet werden. Das erste Zeitregime, mit einem vergleichsweise langsameren Ausspreiten der Zellen, wird mit der zweiten Phase der Zelladsorption - dem passiven Ausspreiten der Zelle auf der Oberfläche - in Verbindung gebracht. Die weiteren zwei Zeitregime beschreiben das aktive Ausspreiten der Zelle an der Oberfläche.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Beschreibung der Zelladhäsion auf mit Vitronektin und Fibronektin beschichtetem Glas über Exponentialfunktionen. Die Exponenten der jeweiligen Exponentialfunktionen in den unterschiedlichen Zeitregimen a_1 , a_2 und a_3 spiegeln die Geschwindigkeit des Spreitvorgangs der Zellen auf den Oberflächen wieder, während der Zeitpunkt des Übergangs zwischen den Regimen durch A_1 und A_2 beschrieben wird ($n=10$).

	Vitronektin	Fibronektin
a_1	$0,35 \pm 0,14$	$0,38 \pm 0,06$
a_2	$1,32 \pm 0,48$	$1,71 \pm 0,46$
a_3	$0,06 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,14$
A_1 in min	$16,4 \pm 3,0$	$21,3 \pm 4,2$
A_1 in min	$40,6 \pm 7,4$	$45,4 \pm 5,2$

Nach den geometrischen Überlegungen von Damien Cuvelier et al. wäre in dem hier beobachteten ersten Regime, das der zweiten Phase der Zelladhäsion und damit dem passiven Ausbreiten der Zelle auf der Oberfläche entspricht, ein Wert von 0,5 für den Exponenten der Exponentialfunktion zu erwarten [131]. Die erhaltenen Werte für den Exponenten der Exponentialfunktion in diesem Regime liegen etwas unterhalb dieses Wertes. Eine sehr gute Übereinstimmung der hier erhaltenen Ergebnisse mit Ergebnissen gemessen mittels TIRF oder „differential interference contrast“ (DIC)-Mikroskopie konnte festgestellt werden. Hans-Günther Döbereiner et al. haben die Werte $a_1=0,4 \pm 0,2$ und $a_2=1,6 \pm 0,9$ für das Ausspreiten von Maus-Endothel-Fibroblasten auf Fibronektin ermittelt. Trotz der größeren Stichprobe im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen, ist die Varianz der Ergebnisse größer. Dies unterstreicht die Robustheit und die Vorteile der SCORE. Mit diesem Vergleich kann auch gezeigt werden, dass die Ergebnisse der SCORE sehr valide sind und ein Vergleich der Ergebnisse dieser Methode mit anderen direkten optischen Sensoren sehr gut möglich ist. Hiermit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die quantitative Beschreibung des Ausspreitens von Zellen auf Oberflächen mittels SCORE möglich ist. In Kombination mit der kinetischen Analyse der Zelladsorption an Oberflächen, sowie der Möglichkeit, die Bindungskräfte von Zellen an Oberflächen über die Erhöhung der Scherkräfte zu bestimmen, kann mit der SCORE eine sehr umfassende und beispiellose Beschreibung der Adhäsion von Zellen an Oberflächen vorgenommen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung der Interaktion von Zellen mit Oberflächen mittels der reflektometrischen Interferenzspektroskopie sehr gut möglich ist. Die hohe zeitliche Auflösung, die Unabhängigkeit von der Markierung der Zellen, die große Eindringtiefe des reflektierten Lichtes, sowie die Unabhängigkeit der reflektometrischen Interferenzspektroskopie gegenüber Temperaturschwankungen, sind Vorteile der reflektometrischen Interferenzspektroskopie gegenüber anderen Methoden, wie Gitterkoppler, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie oder Quarzkristall-Mikrowaage. In einem Langzeitversuch konnte gezeigt werden, dass, durch die reflektometrische Interferenzspektroskopie selbst, keine Einschränkungen beim Messen der Zelladsorption entstehen. Auch die Grundbedingungen für das erfolgreiche Bestimmen kinetischer Parameter sind zwar gegeben. Bedingt durch die höhere Schwanungsbreite der Messungen mit Zellen als Analyt im Vergleich zu Interaktionsanalysen zwischen Biomolekülen, den hohen Zeitaufwand der einzelnen Messungen und das sehr einfache Modell der Lichtinterferenz an einer Schicht, konnten die gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht für eine kinetische Analyse der Interaktion herangezogen werden. Auch das Verwenden des zeit- und ressourcensparenden Ansatz über eine Affinitäts titration mittels Stufenmessung war nicht erfolgreich, da Messartefakte ohne eine weitgehende Anpassung des mathematischen Modells zur Auswertung des Interferenzspektrums nicht behoben werden konnten.

Durch die Verwendung der Einwellenlängenreflektometrie konnten einige Lösungen für Einschränkungen beim Messen von Zellinteraktionen mittels der reflektometrischen Interferenzspektroskopie gefunden werden. Zu den Vorteilen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie kommt hier der Vorteil des Multiplexings hinzu. Mit der Einwellenlängenreflektometrie konnten somit zeitgleich verschiedene Proteinbeschichtungen der Glasoberfläche und mehrere Replika der einzelnen Oberflächen vermessen werden. Das Verwenden von Replika erlaubte trotz der hohen Streuung der Messwerte beim Messen mit Zellen als Analyt einen validen Vergleich der Interaktionsprozesse auf verschiedenen Oberflächen. Der Vergleich der Einwellenlängenreflektometrie-Ergebnisse mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte eine exzellente lineare Korrelation, was beweist, dass das aufgenommene Einwellenlängenreflektometrie-Signal nach 15 min mit dem in dieser Arbeit verwendeten Schichtsystem die Anzahl der Zellen an der Oberfläche widerspiegelt. Die Adsorption von Maus-

Endothel-Fibroblasten auf mit Vitronectin, Kollagen, Albumin, Fibronectin und Laminin beschichteten Glas-Slides konnte erfolgreich charakterisiert werden, indem signifikante Unterschiede im Einwellenlängenreflektometrie-Signal nach 15 min und in der Geschwindigkeit der initialen Zelladsorption festgestellt wurden. Auch Unterschiede im Erreichen einer Gleichgewichtsbeladung und während der Dissoziation der Zellen von der Oberfläche wurden erkannt. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lieferte zufriedenstellende Resultate. Es zeigte sich eine deutlich kleinere Intra-Assay-Variation im Vergleich zur Inter-Assay-Variation. Damit wurde deutlich, dass die Schwankung der Ergebnisse hauptsächlich durch das Verwenden unterschiedlicher Zellsuspensionen in den jeweiligen Versuchen und weniger durch Inhomogenitäten der Proteinbeschichtungen hervorgerufen wurden. Durch die Untersuchung der Dissoziation von Maus-Endothel-Fibroblasten von einer mit Vitronectin beschichteten Glasoberfläche konnte aufgezeigt werden, dass sich die Einwellenlängenreflektometrie auch eignet, um morphologische Veränderungen der Zelle während der Zelladhäsion zu beobachten. Der Anstieg des Signals während der Dissoziationsphase konnte auf das Ausspreiten der Zellen an der Oberfläche zurückgeführt werden. Durch die orts aufgelöste Untersuchung dieser Phasen der Zelladhäsion auf mit Fibronectin und Vitronectin beschichteten Glasoberflächen, konnten die einzelnen Phasen der Zelladhäsion noch deutlicher erkennbar und beschreibbar gemacht werden. In einem Proof-of-Principle-Versuch konnte auch gezeigt werden, dass es mit sehr einfachen Mitteln möglich ist, die Einwellenlängenreflektometrie mit der Untersuchung der Adhäsionskräfte der Zellen zu kombinieren. Durch die Erhöhung der Flussrate wurden die Scherkräfte an der Transduceroberfläche erhöht, was zum teilweisen Ablösen der Zellen von der Oberfläche geführt hat. Die Flussrate kann zeitgleich zum Einwellenlängenreflektometrie-Signal, bei der sich die Zellen von der Oberfläche wieder ablösen, aufgenommen werden und stellt ein Maß für die Adhäsionskräfte der Zellen mit der Oberfläche dar. Zusammengefasst haben sich bei der Charakterisierung der Einwellenlängenreflektometrie zum Messen mit Zellen als Analyten folgende Vorteile gezeigt:

- 1) Markierungsfrei
- 2) hohe Informationstiefe
- 3) keine bzw. nur sehr geringe Beeinflussung des Einwellenlängenreflektometrie-Signals durch Temperaturschwankungen
- 4) sehr gutes Signal-Zu-Rausch-Verhältnis
- 5) Multiplexing
- 6) großer Messbereich und damit sehr robuste Messungen, da das Einwellenlängenreflektometrie-Signal über größere Bereiche gemittelt werden kann

-
- 7) sehr hohe zeitliche Auflösung, sodass kinetische Analysen der Interaktion möglich sind
 - 8) hohe örtliche Auflösung, was die Analyse einzelner Bereiche oder Interaktionen einzelner Zellcluster oder Zellen mit der Oberfläche ermöglicht
 - 9) einfaches Wechseln der Probenflüssigkeit durch integrierte Fluidik
 - 10) einfache Möglichkeit zur Untersuchung der Adhäsionskräfte der Zellen durch Erhöhung der Scherkraft am Transducer

Um die Interaktionsprozesse der Zellen mit den verschiedenen Oberflächen besser vergleichen und quantifizieren zu können, wurde eine kinetische Analyse der Zelladsorption vorgenommen. Bei der Verwendung eines sehr einfachen Modells der Kinetik pseudoerster Ordnung und einer damit einhergehenden sehr starken Vereinfachung der komplexen Prozesse während der Zelladsorption konnten erstaunlich gute Ergebnisse erzielt werden. Die Verwendung unterschiedlicher Auswertebereiche und mathematischer Methoden lieferte für k_a unterschiedliche Werte, was die erwartete Einschränkung dieses einfachen Modells zur Analyse komplexerer Vorgänge bestätigt. Ein qualitativer Vergleich zwischen den Oberflächen war sehr gut möglich. Die Werte für k_a waren auf der mit Laminin beschichteten Glasoberfläche am größten, gefolgt von Albumin und Kollagen und danach Fibronectin und Vitronectin. Die unterschiedlichen Auswertemethoden ergaben Werte für k_a , welche die Kombination aller vorliegenden Ratenkonstanten der Einzelreaktionen einer Kinetik pseudoerster Ordnung oder die dominierende Einzelreaktion einer Kinetik pseudoerster Ordnung beschreiben. Eine zufriedenstellende Bestimmung von k_d konnte mit dem vorliegenden Datensatz nicht vorgenommen werden, da die Ergebnisse der Bestimmung von k_d über verschiedene Auswertemethoden sehr stark variierten. Für diese Schwierigkeiten war der Einfluss der morphologischen Veränderungen auf den Signalverlauf, vor allem während der gemessenen Dissoziationsphasen der Maus-Endothel-Fibroblasten, ausschlaggebend. Die Verwendung eines komplexeren Modells – dem EvilFit – zur Beschreibung der Adsorption der Zellen an die Oberfläche lieferte qualitativ vergleichbare Ergebnisse mit den vorangegangenen Analysen mittels eines Modells pseudoerster Ordnung. Hier konnten Wahrscheinlichkeitsverteilungen einzelner k_d - und K_d -Wertepaare ermittelt werden. Damit war die Bestimmung von k_d , k_a und K_d für unterschiedliche, parallel ablaufende Gleichgewichtsreaktionen möglich. Auch in dieser Auswertemethode wurde ersichtlich, dass im vorliegenden Datensatz die Bestimmung von k_d großen Unsicherheiten unterliegt. Nach der kinetischen Untersuchung der Zelladsorption – der ersten Phase der Zelladhäsion an Oberflächen – wurde die Dynamik der weiteren Phasen der Zelladhäsion untersucht. Es konnten drei verschiedene Zeitregime mit jeweils unterschiedlichen Geschwindigkeiten des Ausspreitens der Zellen auf der Oberfläche

unterschieden werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind sehr gut mit anderen Literaturwerten vergleichbar, was die Robustheit und Validität der Einwellenlängenreflektometrie-Messungen unterstreicht.

Trotz der oben genannten Limitierungen ist das Messen der Zellinteraktion mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie sehr vielversprechend. Um den Wert dieser Methode für die Untersuchung von Adsorptionsprozessen an Oberflächen zu erhöhen, ist eine genauere Beschreibung der Lichtinterferenz auch an Mehrschichtsystemen ein sehr wichtiger Schritt. Steht die mathematische Auswertung komplexerer Schichtaufbauten auch für die reflektometrische Interferenzspektroskopie zur Verfügung, können sich daraus spannende Erkenntnisse ableiten. Änderungen der physikalischen Schichtdicke oder des Brechungsindex der Interferenzschicht beeinflussen das Interferenzspektrum auf unterschiedlich Weise. Daher könnte mit einem geeigneten Modell erkannt werden, wann sich eine Zelle auf der Oberfläche ausspreitet und in welchen Phasen sich ggf. der Brechungsindex im Zytoplasma verändert. Diese Informationen in Kombination mit der hohen zeitlichen Auflösung und den anderen Vorteilen der reflektometrischen Interferenzspektroskopie könnten einen wichtigen Beitrag zum umfassenden Verständnis der Interaktion von Zellen mit Oberflächen liefern.

Da Messungen mit Zellen als Analyten im allgemeinen mit einem hohen Ressourcenaufwand verbunden sind, eröffnet die Möglichkeit des Multiplexings die Erschließung neuer Fragestellungen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten 20 Proteinspots konnten Fragen zur Reproduzierbarkeit der Versuche und zu unterschiedlichen Adsorptionscharakteristika auf fünf verschiedenen Oberflächen beantwortet werden. Eine viel größere Anzahl an Spots ist denkbar, sodass auch Screening-Versuche durchgeführt werden können. Die Möglichkeit, das Signal über einen vergleichsweise großen Bereich und damit das Verhalten vieler Zellen zu mitteln, macht diese Methode zudem sehr robust. Die sehr hohe örtliche Auflösung ermöglicht es jedoch auch, einzelne Bereiche von Interesse aus dem Signal zu isolieren. So können zukünftig auch sehr fein strukturierte Oberflächen oder Oberflächen mit einem Gradienten in den Oberflächeneigenschaften untersucht werden. Auch das Verhalten von einzelnen Zellclustern oder auch einzelnen Zellen an der Oberfläche kann untersucht werden. Die Kombination der Einwellenlängenreflektometrie mit der Messung der Adhäsionskräfte von Zellen erschließt ein neues Forschungsfeld. Durch diese kombinierte Methode können sehr ressourcenschonend qualitative Vergleiche der Adhäsionskraft auf verschiedenen Oberflächen oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Adsorption angestellt werden. Ist ein laminarer Fluss über den gesamten Bereich der Flusszelle gewährleistet und stehen Methoden zur Auswertung und Referenzierung der vorliegenden Kräfte zur Verfügung, können zukünftig auch quantitative Werte der Zelladhäsionskräfte bestimmt werden. Im Vergleich der kinetischen, thermodynamischen und der mechanischen Untersuchungen der Zelladhäsion können diese komplementären Ergebnisse

aktuelle Schwierigkeiten im Vergleich dieser sehr verschiedenen Methoden liefern.

Auch die Anwendung der verschiedenen kinetischen Modelle auf die Adsorption von Zellen an Oberflächen ist zudem von hohem Interesse. Da der Adsorption verschiedener Zelltypen an Implantaten weitere Schritte der Wundheilung folgen, ist ein grundlegendes Verständnis dieser Zusammenhänge ausschlaggebend für die Entwicklung verbesserter Implantatoberflächen. Durch die kinetische Untersuchung der Zel-ladsorption auf Oberflächen können mögliche bioaktive Beschichtungen – die beispielsweise die Anbindung bestimmter Zelltypen wie Neuronen, Osteoplasten oder bestimmter Leukozyten fördern – schnell und einfach untersucht werden. Auch könnte die Anzahl der Tierversuche in der Implantatentwicklung reduziert werden, wenn im Zellkultursystem die Interaktion der Implantatoberflächen mit verschiedenen Zelltypen einfacher und umfassender untersucht werden kann.

LITERATUR

- [1] Steven R Goodman. *Goodman's Medical Cell Biology*. Academic Press, 2020.
- [2] James M Anderson, Analiz Rodriguez und David T Chang. "Foreign body reaction to biomaterials". In: *Seminars in immunology*. Bd. 20. 2. Elsevier. 2008, S. 86–100.
- [3] Nathaniel Huebsch und David J Mooney. "Inspiration and application in the evolution of biomaterials". In: *Nature* 462.7272 (2009), S. 426–432.
- [4] You-Xiong Wang u. a. "Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility". In: *Pharmaceutical research* 21.8 (2004), S. 1362–1373.
- [5] Paul Roach u. a. "Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications". In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18.7 (2007), S. 1263–1277.
- [6] Hamed Amani u. a. "Controlling cell behavior through the design of biomaterial surfaces: a focus on surface modification techniques". In: *Advanced materials interfaces* 6.13 (2019), S. 1900572.
- [7] Ruben Daum u. a. "Fibronectin adsorption on oxygen plasma-treated polyurethane surfaces modulates endothelial cell response". In: *Journal of Materials Chemistry B* 9.6 (2021), S. 1647–1660.
- [8] David Richard Schmidt, Heather Waldeck und Weiyuan John Kao. "Protein adsorption to biomaterials". In: *Biological interactions on materials surfaces*. Springer, 2009, S. 1–18.
- [9] Rahul M Visalakshan u. a. "Biomaterial surface hydrophobicity-mediated serum protein adsorption and immune responses". In: *ACS applied materials & interfaces* 11.31 (2019), S. 27615–27623.
- [10] Alaa Jaafar u. a. "Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review". In: *Bioengineering* 7.4 (2020), S. 127.
- [11] A Santos-Coquillat u. a. "PEO coatings design for Mg-Ca alloy for cardiovascular stent and bone regeneration applications". In: *Materials Science and Engineering: C* 105 (2019), S. 110026.

- [12] Amir Dehghanghadikolaei und Behzad Fotovvati. “Coating techniques for functional enhancement of metal implants for bone replacement: a review”. In: *Materials* 12.11 (2019), S. 1795.
- [13] Dayo O Adewole u. a. “Bioactive neuroelectronic interfaces”. In: *Frontiers in Neuroscience* 13 (2019), S. 269.
- [14] Shirin Nour u. a. “Bioactive materials: a comprehensive review on interactions with biological microenvironment based on the immune response”. In: *Journal of Bionic Engineering* 16.4 (2019), S. 563–581.
- [15] Prachi Dhavalikar u. a. “Review of Integrin-Targeting Biomaterials in Tissue Engineering”. In: *Advanced healthcare materials* 9.23 (2020), S. 2000795.
- [16] Günter Gauglitz. “Critical assessment of relevant methods in the field of biosensors with direct optical detection based on fibers and waveguides using plasmonic, resonance, and interference effects”. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412.14 (2020), S. 3317–3349.
- [17] Yangyang Chen u. a. “Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review”. In: *Biosensors and Bioelectronics* 144 (2019), S. 111693.
- [18] Ye Fang. “Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery”. In: *Assay and drug development technologies* 4.5 (2006), S. 583–595.
- [19] JJ Ramsden u. a. “Kinetics of adhesion and spreading of animal cells”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 43.10 (1994), S. 939–945.
- [20] Günter Gauglitz. “Direct optical detection in bioanalysis: an update”. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 398.6 (2010), S. 2363–2372.
- [21] Steven M Shamah und Brian T Cunningham. “Label-free cell-based assays using photonic crystal optical biosensors”. In: *Analyst* 136.6 (2011), S. 1090–1102.
- [22] Yu-wen Su und Wei Wang. “Surface plasmon resonance sensing: from purified biomolecules to intact cells”. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 410.17 (2018), S. 3943–3951.
- [23] Y Fang. “Optical waveguide-based cellular assays”. In: *Label-Free Monitoring of Cells in vitro* (2018), S. 189–217.
- [24] Tushar Kumeria u. a. “Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells”. In: *Biosensors and Bioelectronics* 35.1 (2012), S. 167–173.
- [25] Stefan Merkl u. a. “Approaches to the detection of whole cells using reflectometric interference spectroscopy”. In: *physica status solidi (a)* 209.5 (2012), S. 864–870.

-
- [26] Stefan Merkl u. a. "Detection of whole cells using reflectometric interference spectroscopy". In: *physica status solidi (a)* 211.6 (2014), S. 1416–1422.
- [27] Bernd P Möhrle u. a. "Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RIfS)". In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 384.2 (2006), S. 407–413.
- [28] J Hutterer und G Gauglitz. "5.5-Charakterisierung von Zelladsorption auf Biomaterialien mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie". In: *Tagungsband* (2019), S. 82–87.
- [29] Eugene Hecht. "Optik, 4., überarbeitete Auflage". In: *München, Ouldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH* (2005).
- [30] Günter Gauglitz. "Opto-chemical and opto-immuno sensors". In: *Sensors update* 1.1 (1996), S. 1–48.
- [31] Günter Gauglitz u. a. "Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers". In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 11.1-3 (1993), S. 21–27.
- [32] H-M Haake, Armin Schütz und Günter Gauglitz. "Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors". In: *Fresenius' journal of analytical chemistry* 366.6 (2000), S. 576–585.
- [33] Guenter Gauglitz. "Direct optical sensors: principles and selected applications". In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 381.1 (2005), S. 141–155.
- [34] Juergen Burger u. a. "Low-volume label-free detection of molecule-protein interactions on microarrays by imaging reflectometric interferometry". In: *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 22.4 (2017), S. 437–446.
- [35] B Schwarz u. a. "Imaging Reflectometric Interference Spectroscopy (iRIfS) für die markierungsfreie biomolekulare Interaktionsanalyse von Peptid- und Proteinarrays". In: *Deutsches BioSensor Symposium, Heilbad Heiligenstadt*. Bd. 47. 2011.
- [36] Peter Fechner, Günter Gauglitz und Günther Proll. "Through the looking-glass-Recent developments in reflectometry open new possibilities for biosensor applications". In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2022), S. 116708.
- [37] Max Planck. "Über irreversible Strahlungsvorgänge". In: *Sitz. König. Preuss. Akad. Wissen* 26 (1899), S. 440.
- [38] Linus Pauling und E Bright Wilson. *Introduction to quantum mechanics with applications to chemistry*. Courier Corporation, 2012.
- [39] Heinz-Helmut Perkampus. *Lexikon Spektroskopie*. VCH-Verlag-Ges., 1993.
- [40] Peter W Atkins und Julio De Paula. *Physikalische chemie*. John Wiley & Sons, 2013.

- [41] Fred Rost. "Fluorescence Microscopy, Applications". In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*. Hrsg. von John C. Lindon, George E. Tranter und David W. Koppenaal. Third Edition. Oxford: Academic Press, 2017, S. 627–631. ISBN: 978-0-12-803224-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128032244001473>.
- [42] Jan Kapuscinski. "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe". In: *Biotechnic & histochemistry* 70.5 (1995), S. 220–233.
- [43] "Chapter 33 - Actin and Actin-Binding Proteins". In: *Cell Biology (Third Edition)*. Hrsg. von Thomas D. Pollard u. a. Third Edition. Elsevier, 2017, S. 575–591. ISBN: 978-0-323-34126-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34126-4.00033-5>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323341264000335>.
- [44] Liang Shan u. a. "Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)". In: *Bethesda (MD)* (2004).
- [45] Peter W Atkins. *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*. Bd. 27. John Wiley & Sons, 2006.
- [46] Todd M Squires, Robert J Messinger und Scott R Manalis. "Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors". In: *Nature biotechnology* 26.4 (2008), S. 417–426.
- [47] Jacob Piehler. *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. Shaker, 1997.
- [48] Ravi A Vijayendran, Frances S Ligler und Deborah E Leckband. "A computational reaction- diffusion model for the analysis of transport-limited kinetics". In: *Analytical Chemistry* 71.23 (1999), S. 5405–5412.
- [49] Byron Goldstein u. a. "The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore". In: *Journal of molecular recognition* 12.5 (1999), S. 293–299.
- [50] Keiko Tawa, Danfeng Yao und Wolfgang Knoll. "Matching base-pair number dependence of the kinetics of DNA–DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy". In: *Biosensors and Bioelectronics* 21.2 (2005), S. 322–329.
- [51] Caroline Kotlowski u. a. "Electronic biosensing with flexible organic transistor devices". In: *Flexible and Printed Electronics* 3.3 (2018), S. 034003.

-
- [52] Robert Karlsson u. a. "Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors". In: *Analytical Biochemistry* 349.1 (2006), S. 136–147. ISSN: 0003-2697. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.034>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269705006986>.
- [53] George Scatchard. "The attractions of proteins for small molecules and ions". In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 51.4 (1949), S. 660–672.
- [54] Robert Karlsson, Anne Michaelsson und Lars Mattsson. "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system". In: *Journal of immunological methods* 145.1-2 (1991), S. 229–240.
- [55] Xuan Guo und Jianlong Wang. "Comparison of linearization methods for modeling the Langmuir adsorption isotherm". In: *Journal of Molecular Liquids* 296 (2019), S. 111850.
- [56] Daniel J Oshannessy u. a. "Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods". In: *Analytical biochemistry* 212.2 (1993), S. 457–468.
- [57] Robert Karlsson und Anders Fält. "Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors". In: *Journal of immunological methods* 200.1-2 (1997), S. 121–133.
- [58] Monika Conrad u. a. "Comparison of methods for quantitative biomolecular interaction analysis". In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 414.1 (2022), S. 661–673.
- [59] Robert Karlsson, Anne Michaelsson und Lars Mattsson. "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system". In: *Journal of Immunological Methods* 145.1 (1991), S. 229–240. ISSN: 0022-1759. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90331-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90331-9). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175991903319>.
- [60] Juraj Svitel u. a. "Combined affinity and rate constant distributions of ligand populations from experimental surface binding kinetics and equilibria". In: *Biophysical journal* 84.6 (2003), S. 4062–4077.
- [61] Peter Schuck und Huaying Zhao. "The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing". In: *Surface plasmon resonance* (2010), S. 15–54.
- [62] Huaying Zhao, Lisa F Boyd und Peter Schuck. "Measuring protein interactions by optical biosensors". In: *Current protocols in protein science* 88.1 (2017), S. 20–2.

- [63] Huaying Zhao und Peter Schuck. “Detailed analysis of kinetic binding traces with distributions of surface sites”. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry (2017), S. 149–170.
- [64] James William Needham. “Multiplexed antibody kinetics using the Interferometric Reflectance Imaging Sensor”. Diss. Boston University, 2019.
- [65] André L Lira u. a. “Binding kinetics of ultrasmall gold nanoparticles with proteins”. In: *Nanoscale* 10.7 (2018), S. 3235–3244.
- [66] Flora S Groothuizen u. a. “Using stable MutS dimers and tetramers to quantitatively analyze DNA mismatch recognition and sliding clamp formation”. In: *Nucleic acids research* 41.17 (2013), S. 8166–8181.
- [67] Deepanshu Choudhary u. a. “Using thermal scanning assays to test protein-protein interactions of inner-ear cadherins”. In: *PLoS One* 12.12 (2017), e0189546.
- [68] JF Calver u. a. “Investigating the Pro-Fibrotic Effects of Galectins in Idiopathic Pulmonary Fibrosis-A Potential Role for Glycan-Mediated Interactions with Integrins”. In: *D101. TRANSLATIONAL AND BASIC SCIENCE ADVANCES IN PULMONARY FIBROSIS*. American Thoracic Society, 2022, A5330–A5330.
- [69] Vincent Bodiou, Panagiota Moutsatsou und Mark J Post. “Microcarriers for upscaling cultured meat production”. In: *Frontiers in nutrition* 7 (2020), S. 10.
- [70] Soonjin Hong. “Quantitative analysis of cell-surface interactions and cell adhesion process in real-time”. In: (2008).
- [71] J Xi u. a. “Quartz crystal microbalance in cell biology studies”. In: *J Biochips Tissue Chips S* 5 (2013), S. 1–9.
- [72] Yoshikazu Takada, Xiaojing Ye und Scott Simon. “The integrins”. In: *Genome biology* 8.5 (2007), S. 1–9.
- [73] Malgorzata Barczyk, Sergio Carracedo und Donald Gullberg. “Integrins”. In: *Cell and tissue research* 339.1 (2010), S. 269–280.
- [74] George I Bell, MICAH Dembo und PIERRE Bongrand. “Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding”. In: *Biophysical journal* 45.6 (1984), S. 1051–1064.
- [75] Yves F Dufrêne und Andrew E Pelling. “Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion”. In: *Nanoscale* 5.10 (2013), S. 4094–4104.
- [76] Cheng Zhu. “Kinetics and mechanics of cell adhesion”. In: *Journal of biomechanics* 33.1 (2000), S. 23–33.
- [77] Daniel A Hammer und Sachin M Apte. “Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion”. In: *Biophysical journal* 63.1 (1992), S. 35–57.

-
- [78] Rodger P McEver und Cheng Zhu. “Rolling cell adhesion”. In: *Annual review of cell and developmental biology* 26 (2010), S. 363.
- [79] Hanako Kobayashi, Kimberly C Boelte und P Charles Lin. “Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression”. In: *Current medicinal chemistry* 14.4 (2007), S. 377–386.
- [80] Michael Leiss u. a. “The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo”. In: *Current opinion in cell biology* 20.5 (2008), S. 502–507.
- [81] Richard O Hynes. “The extracellular matrix: not just pretty fibrils”. In: *Science* 326.5957 (2009), S. 1216–1219.
- [82] Ning Li u. a. “Mechanokinetics of receptor–ligand interactions in cell adhesion”. In: *Acta Mechanica Sinica* 31.2 (2015), S. 248–258.
- [83] William G Bardsley und JOHN D Aplin. “Kinetic analysis of cell spreading. I. Theory and modelling of curves”. In: *Journal of cell science* 61.1 (1983), S. 365–373.
- [84] Frederick Grinnell. “Cellular adhesiveness and extracellular substrata”. In: *International review of cytology* 53 (1978), S. 65–144.
- [85] Hans-Günther Döbereiner u. a. “Dynamic phase transitions in cell spreading”. In: *Physical review letters* 93.10 (2004), S. 108105.
- [86] Samuel Bell, Anna-Lena Redmann und Eugene M Terentjev. “Universal kinetics of the onset of cell spreading on substrates of different stiffness”. In: *Biophysical journal* 116.3 (2019), S. 551–559.
- [87] Miguel Vicente-Manzanares und Alan Rick Horwitz. “Adhesion dynamics at a glance”. In: *Journal of cell science* 124.23 (2011), S. 3923–3927.
- [88] Neil Ibata und Eugene M Terentjev. “Development of nascent focal adhesions in spreading cells”. In: *Biophysical journal* 119.10 (2020), S. 2063–2073.
- [89] Małgorzata Lekka u. a. “Traction force microscopy–Measuring the forces exerted by cells”. In: *Micron* 150 (2021), S. 103138.
- [90] Guenther Proll u. a. “Reflectometric interference spectroscopy”. In: *Biosensors and Biodetection*. Springer, 2009, S. 167–178.
- [91] Rüdiger Frank. “Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik”. Diss. Tübingen, Univ., Diss., 2005.
- [92] Oliver Bleher u. a. “Development of a new parallelized, optical biosensor platform for label-free detection of autoimmunity-related antibodies”. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 406.14 (2014), S. 3305–3314.

- [93] Alexander W Koch. *Optische Meßtechnik an technischen Oberflächen: praxisorientierte lasergestützte Verfahren zur Untersuchung technischer Objekte hinsichtlich Form, Oberflächenstruktur und Beschichtung; mit 4 Tabellen und 418 Literaturstellen*. expert Verlag, 1998.
- [94] Paul Petruck. “Beleuchtung und Mikro-Kohärenz für die Mikroskopie”. Diss. Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2013.
- [95] Sivan Isaacs und Ibrahim Abdulhalim. “Long range surface plasmon resonance with ultra-high penetration depth for self-referenced sensing and ultra-low detection limit using diverging beam approach”. In: *Applied Physics Letters* 106.19 (2015), S. 193701.
- [96] Jian-Ying Jing u. a. “Long-range surface plasmon resonance and its sensing applications: A review”. In: *Optics and Lasers in Engineering* 112 (2019), S. 103–118.
- [97] Danny S Tuckwell u. a. “Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge”. In: *Journal of cell science* 107.4 (1994), S. 993–1005.
- [98] Kiyotaka Yamamoto und Mari Yamamoto. “Cell adhesion receptors for native and denatured type I collagens and fibronectin in rabbit arterial smooth muscle cells in culture”. In: *Experimental cell research* 214.1 (1994), S. 258–263.
- [99] Daniel Frenzel und Dieter Willbold. “Kinetic titration series with biolayer interferometry”. In: *PloS one* 9.9 (2014), e106882.
- [100] Laurent Limozin und Kheya Sengupta. “Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion”. In: *ChemPhysChem* 10.16 (2009), S. 2752–2768.
- [101] Adam Wax u. a. “Cellular organization and substructure measured using angle-resolved low-coherence interferometry”. In: *Biophysical journal* 82.4 (2002), S. 2256–2264.
- [102] Yizheng Zhu u. a. “Design and validation of an angle-resolved low-coherence interferometry fiber probe for in vivo clinical measurements of depth-resolved nuclear morphology”. In: *Journal of biomedical optics* 16.1 (2011), S. 011003.
- [103] Min Xu, Tao T Wu und Jianan Y Qu. “Unified Mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures”. In: *Journal of biomedical optics* 13.2 (2008), S. 024015.
- [104] Paul Latimer. “Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters”. In: *Annual review of biophysics and bioengineering* 11.1 (1982), S. 129–150.

-
- [105] Manuel Grundmann. "Label-free dynamic mass redistribution and bio-impedance methods for drug discovery". In: *Current protocols in pharmacology* 77.1 (2017), S. 9–24.
- [106] Ellen E Codd u. a. "Dynamic mass redistribution as a means to measure and differentiate signaling via opioid and cannabinoid receptors". In: *Assay and drug development technologies* 9.4 (2011), S. 362–372.
- [107] Inna Szekacs u. a. "Integrin targeting of glyphosate and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical bio-sensing". In: *Scientific reports* 8.1 (2018), S. 1–13.
- [108] Tuhin Santra und Fan-Gang Tseng. *Single Cell Analysis in Biotechnology and Systems Biology*. März 2016. ISBN: 978-3-03842-194-8.
- [109] Amelia Ahmad Khalili und Mohd Ridzuan Ahmad. "A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications". In: *International journal of molecular sciences* 16.8 (2015), S. 18149–18184.
- [110] James L McGrath. "Cell spreading: the power to simplify". In: *Current Biology* 17.10 (2007), R357–R358.
- [111] Rita Ungai-Salánki u. a. "A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force". In: *Advances in Colloid and Interface Science* 269 (2019), S. 309–333.
- [112] L Marcotte und M Tabrizian. "Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials". In: *Irbm* 29.2-3 (2008), S. 77–88.
- [113] Andrés J Garcia, Paul Ducheyne und David Boettiger. "Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials". In: *Biomaterials* 18.16 (1997), S. 1091–1098.
- [114] Hang Lu u. a. "Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion". In: *Analytical chemistry* 76.18 (2004), S. 5257–5264.
- [115] Kevin V Christ u. a. "Measurement of single-cell adhesion strength using a microfluidic assay". In: *Biomedical microdevices* 12.3 (2010), S. 443–455.
- [116] Leonardo De La Fuente u. a. "Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber". In: *Applied and environmental microbiology* 73.8 (2007), S. 2690–2696.
- [117] T Ballet u. a. "Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science". In: *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences* 2 (2010).

- [118] Shimshon Belkin. “Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants”. In: *Current opinion in microbiology* 6.3 (2003), S. 206–212.
- [119] Hauke Harms, Mona C Wells und Jan Roelof Van der Meer. “Whole-cell living biosensors—are they ready for environmental application?” In: *Applied microbiology and biotechnology* 70.3 (2006), S. 273–280.
- [120] Mihaela Gheorghiu. “A short review on cell-based biosensing: challenges and breakthroughs in biomedical analysis”. In: *Journal of Biomedical Research* 35.4 (2021), S. 255.
- [121] Qingyuan Gui u. a. “The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics”. In: *Sensors* 17.7 (2017), S. 1623.
- [122] I Lundström. “Models of protein adsorption on solid surfaces”. In: *Surfactants, Adsorption, Surface Spectroscopy and Disperse Systems*. Springer, 1985, S. 76–82.
- [123] Michael Rabe, Dorinel Verdes und Stefan Seeger. “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces”. In: *Advances in colloid and interface science* 162.1-2 (2011), S. 87–106.
- [124] Paul Roach, David Farrar und Carole C Perry. “Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes”. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.22 (2005), S. 8168–8173.
- [125] Robert A Latour. “Fundamental principles of the thermodynamics and kinetics of protein adsorption to material surfaces”. In: *Colloids and surfaces B: biointerfaces* 191 (2020), S. 110992.
- [126] Kazuhiro Nakanishi, Takaharu Sakiyama und Koreyoshi Imamura. “On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon”. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 91.3 (2001), S. 233–244.
- [127] Jeffrey J Gray. “The interaction of proteins with solid surfaces”. In: *Current opinion in structural biology* 14.1 (2004), S. 110–115.
- [128] Robert A Latour. “The Langmuir isotherm: a commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior”. In: *Journal of biomedical materials research part A* 103.3 (2015), S. 949–958.
- [129] Gregory A Hudalla und William L Murphy. “Using “click” chemistry to prepare SAM substrates to study stem cell adhesion”. In: *Langmuir* 25.10 (2009), S. 5737–5746.
- [130] K Mougin u. a. “Construction of a tethered poly (ethylene glycol) surface gradient for studies of cell adhesion kinetics”. In: *Langmuir* 21.11 (2005), S. 4809–4812.
- [131] Damien Cuvelier u. a. “The universal dynamics of cell spreading”. In: *Current biology* 17.8 (2007), S. 694–699.

6 ANHANG

6.1 ERGEBNISSE DER BERECHNUNG KINETISCHER PARAMETER

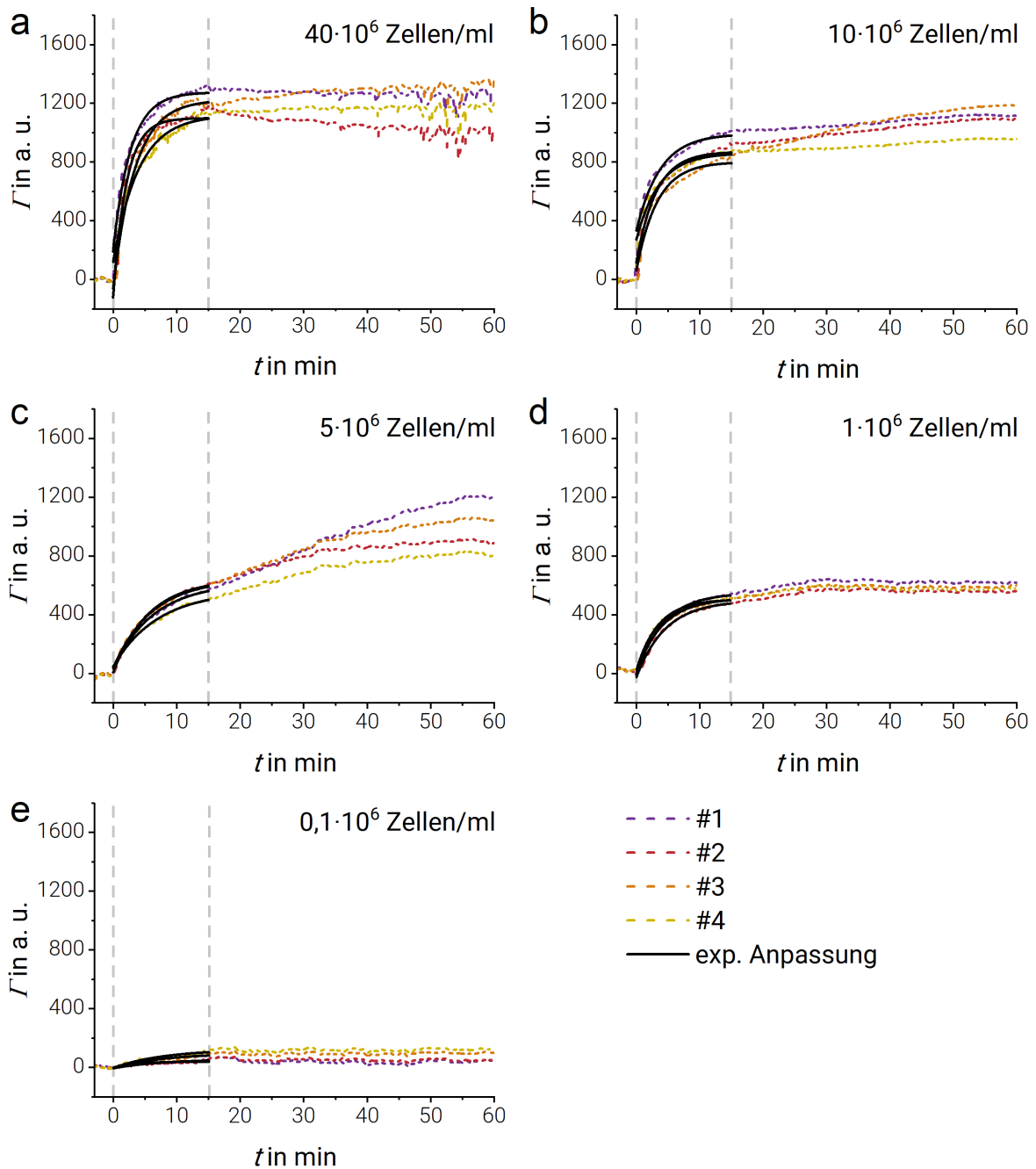


Abbildung 6.1: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Vitronektin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

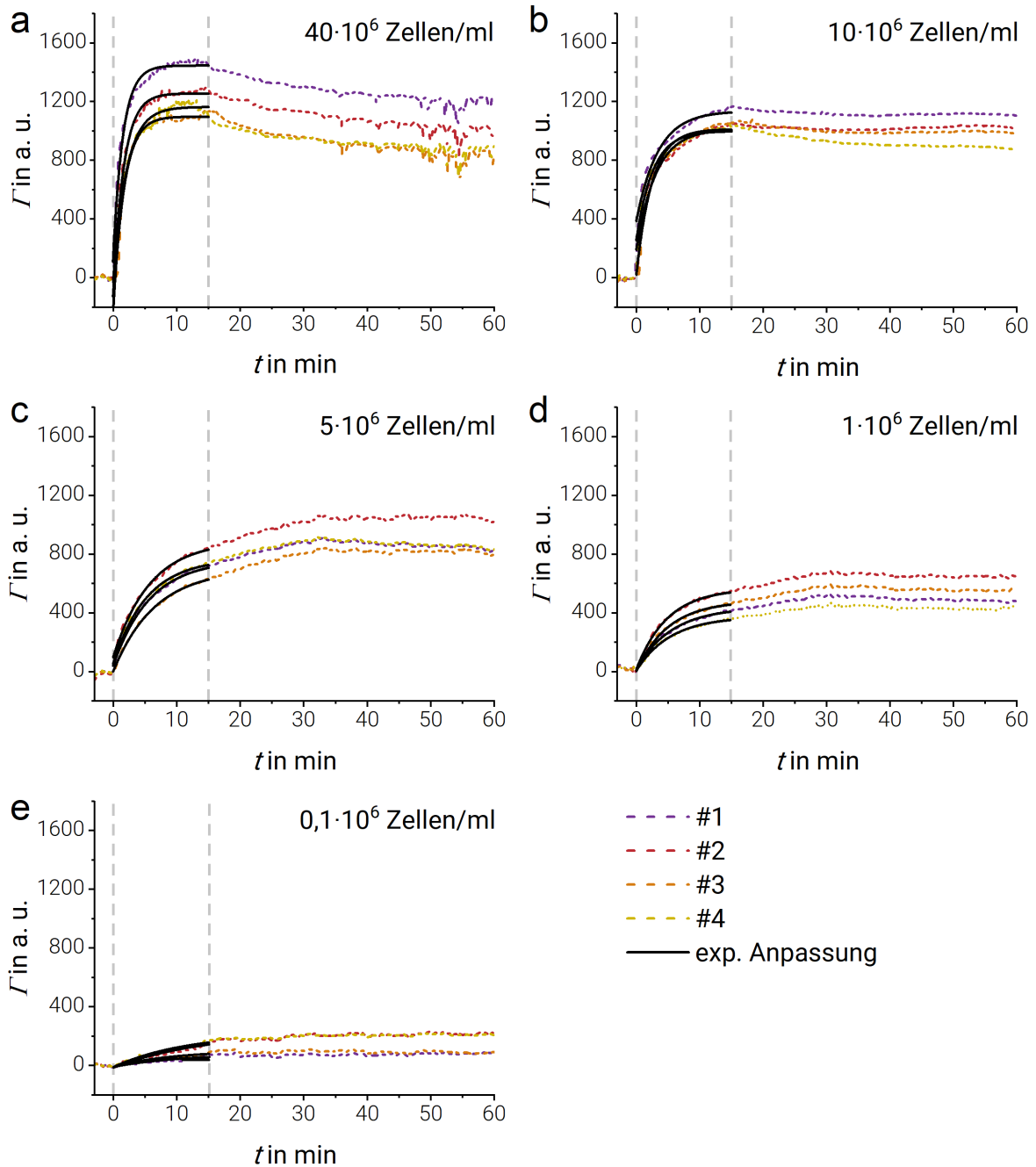


Abbildung 6.2: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Albumin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

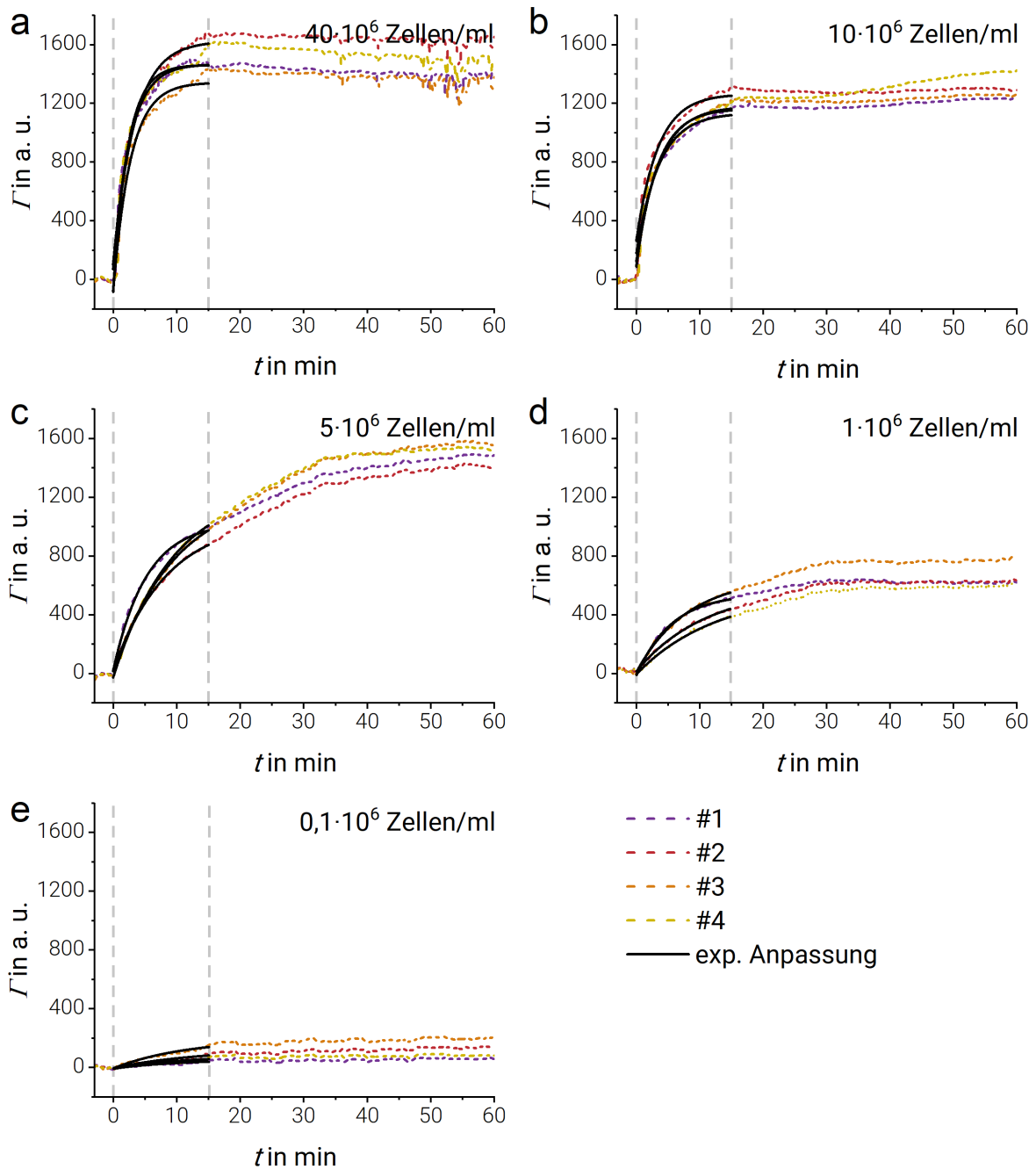


Abbildung 6.3: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Fibronektin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

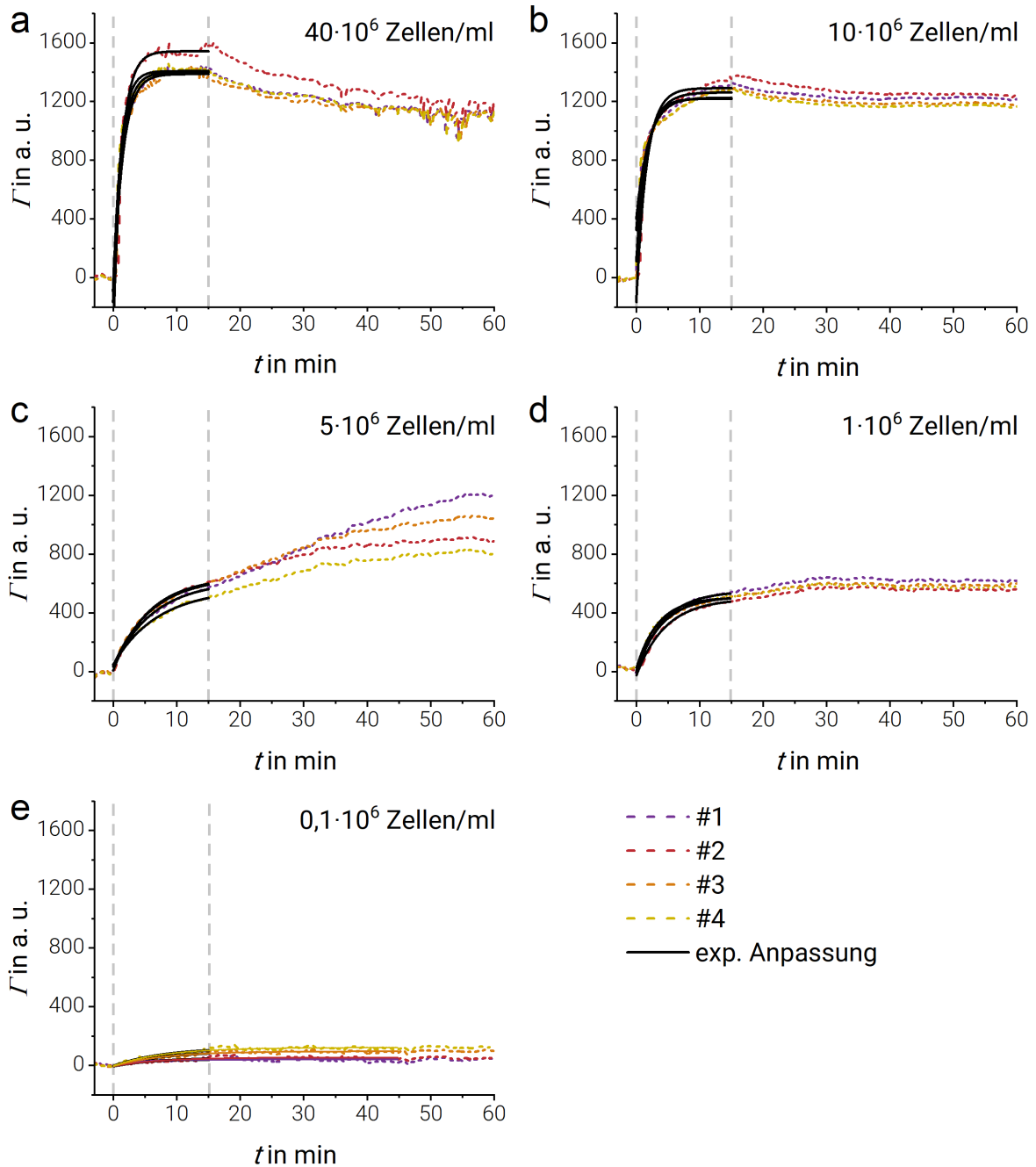


Abbildung 6.4: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im Bereich 0-15 min, gekennzeichnet durch die grauen gestrichelten Linien, herangezogen. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

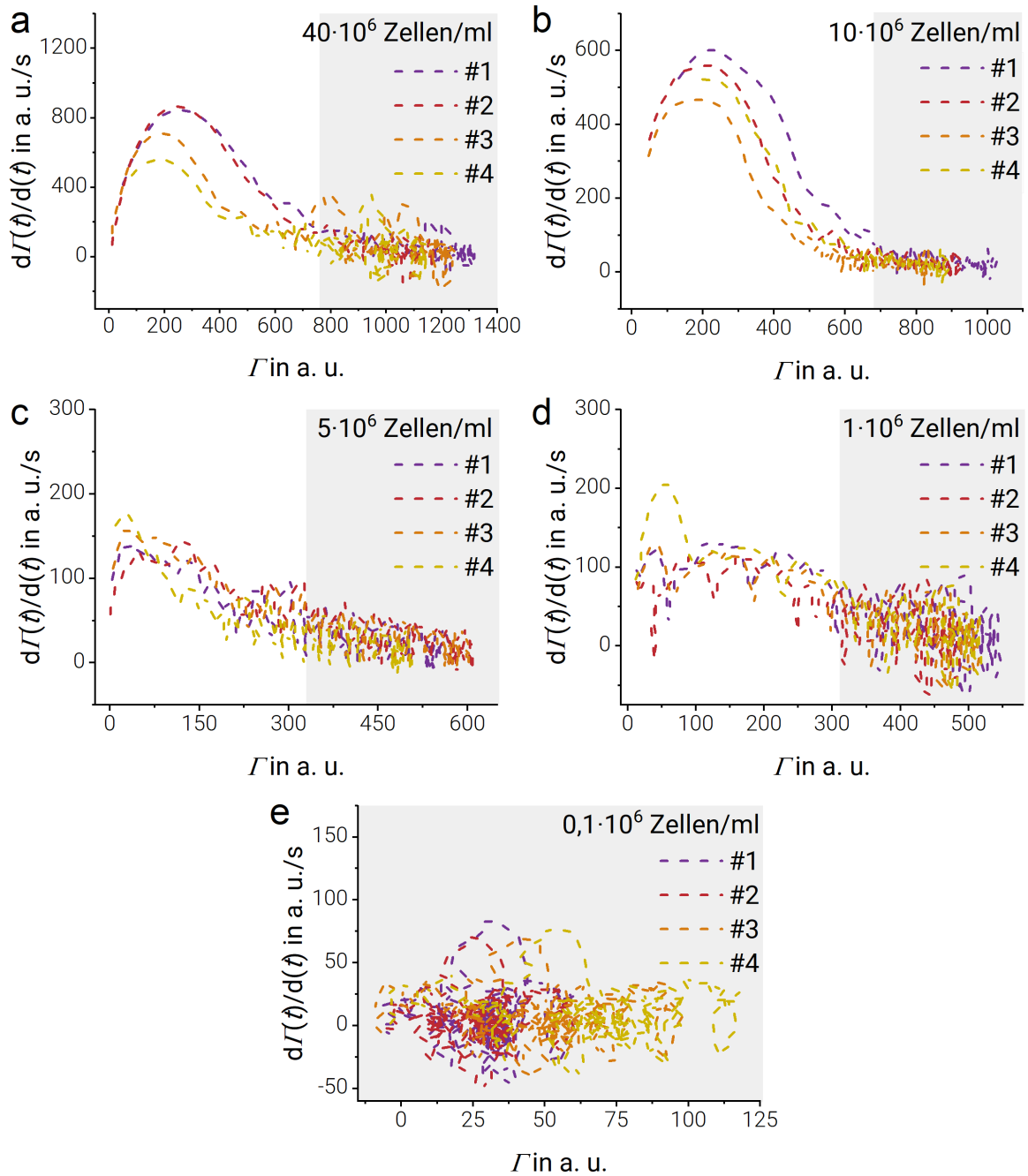


Abbildung 6.5: Einschränkung des Auswertebereiches zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Vitronektin beschichtetem Glas auf den Bereich, in dem die Sensorgramme nahezu einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Die Darstellung der Daten in Form von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ erlaubt die optische Beurteilung, ob der Signalverlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die Ergebnisse zu den 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Der eingeschränkte Datenbereich, in dem die Daten in dieser Darstellung bei allen Replika weitestgehend einer Geraden mit negativer Steigung folgen, wurde ausgewählt und ist in den Abbildungen hellgrau hinterlegt.

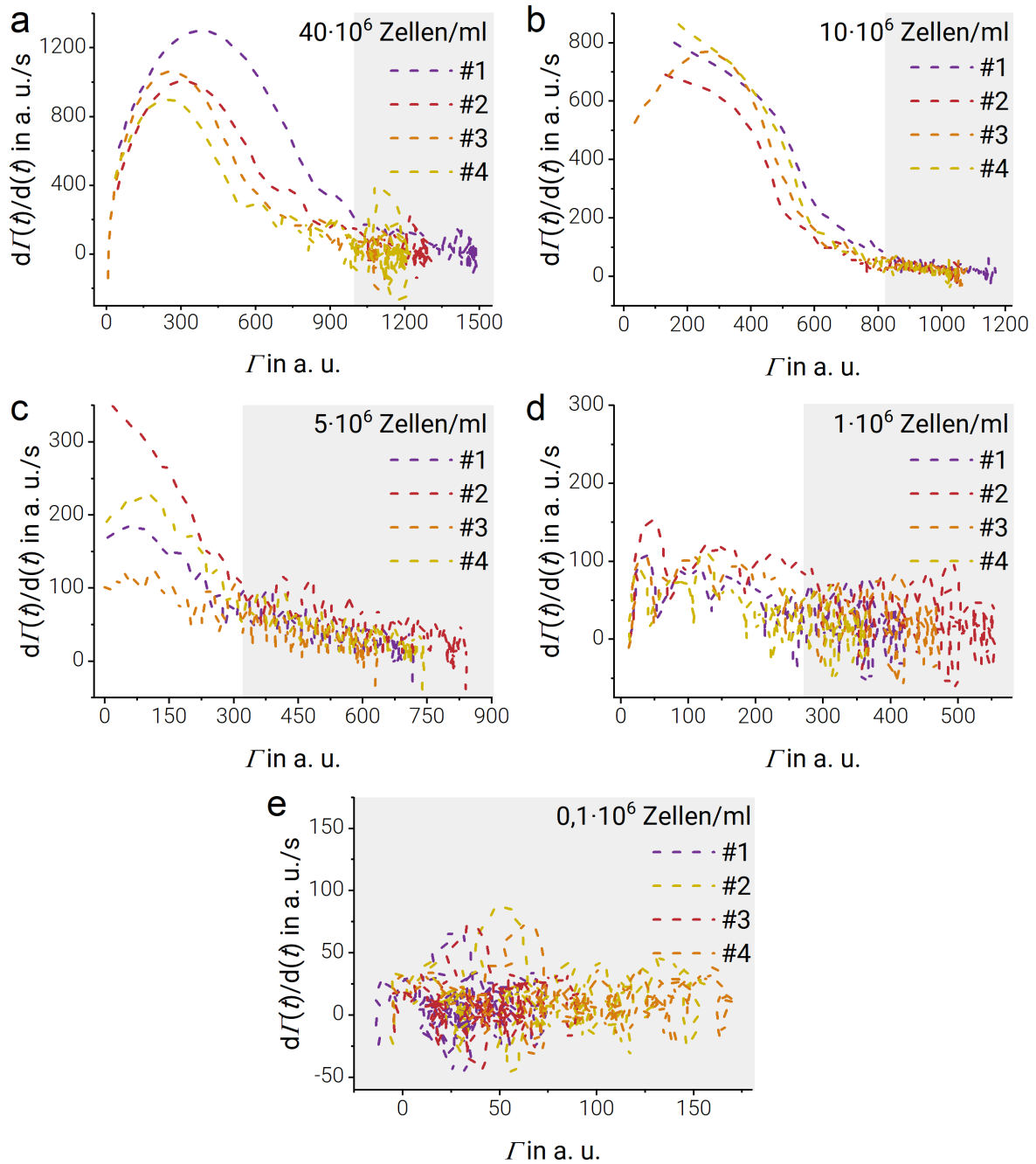


Abbildung 6.6: Einschränkung des Auswertebereiches zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Albumin beschichtetem Glas auf den Bereich, in dem die Sensorgramme nahezu einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Die Darstellung der Daten in Form von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ erlaubt die optische Beurteilung, ob der Signalverlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die Ergebnisse zu den 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Der eingeschränkte Datenbereich, in dem die Daten in dieser Darstellung bei allen Replika weitestgehend einer Geraden mit negativer Steigung folgen, wurde ausgewählt und ist in den Abbildungen hellgrau hinterlegt.

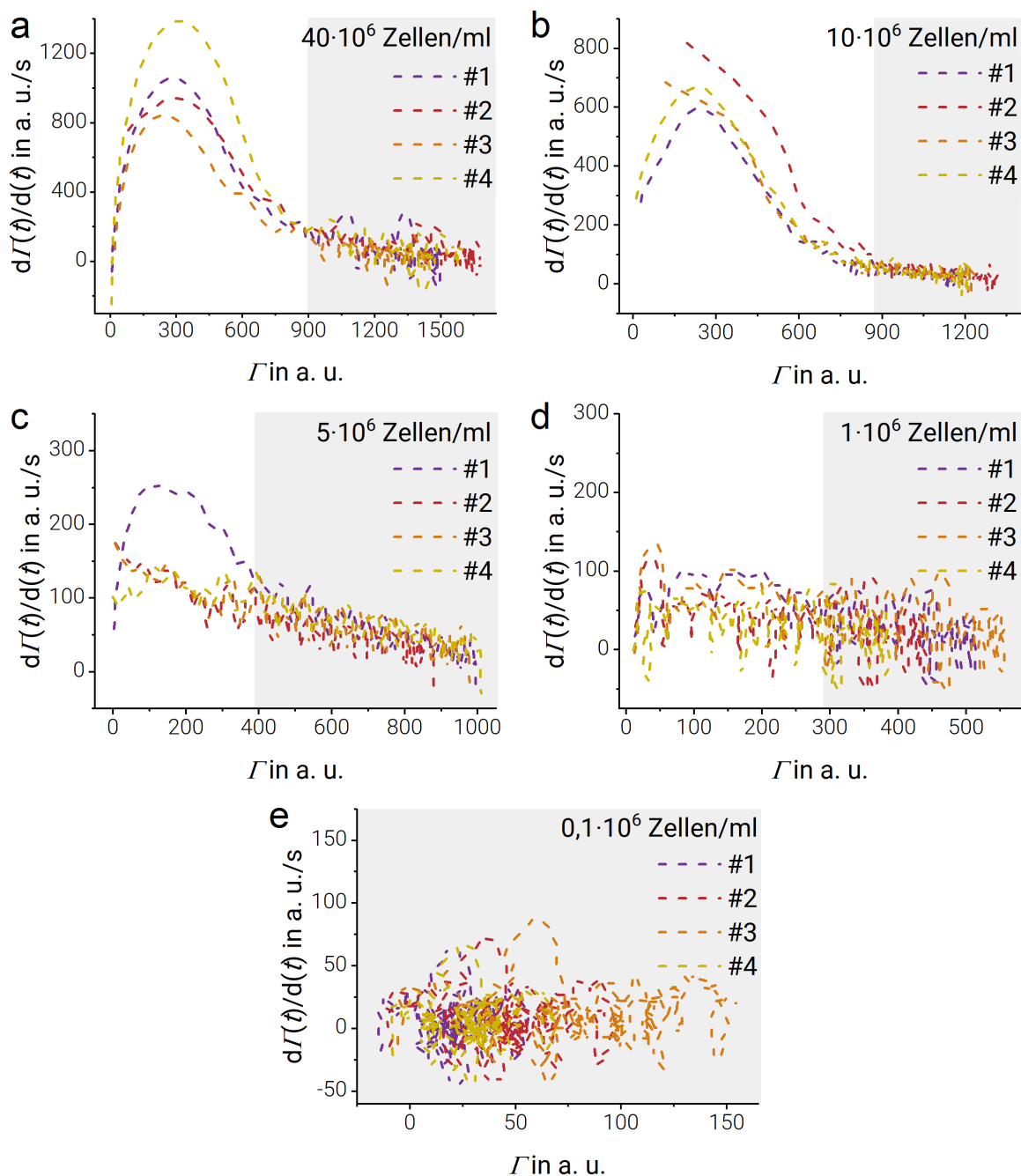


Abbildung 6.7: Einschränkung des Auswertebereiches zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Fibronectin beschichtetem Glas auf den Bereich, in dem die Sensorgramme nahezu einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Die Darstellung der Daten in Form von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ erlaubt die optische Beurteilung, ob der Signalverlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die Ergebnisse zu den 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Der eingeschränkte Datenbereich, in dem die Daten in dieser Darstellung bei allen Replika weitestgehend einer Geraden mit negativer Steigung folgen, wurde ausgewählt und ist in den Abbildungen hellgrau hinterlegt.

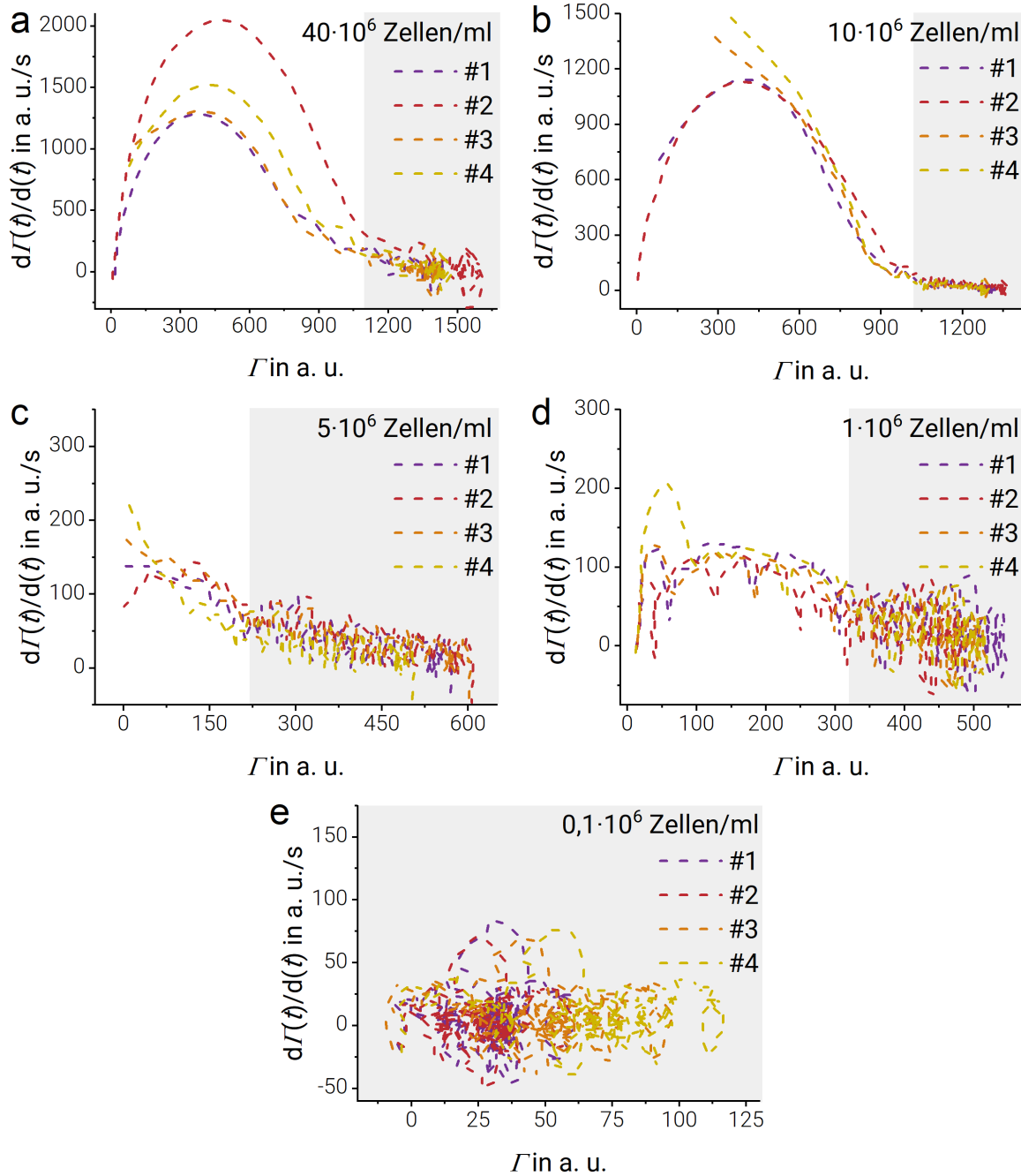


Abbildung 6.8: Einschränkung des Auswertebereiches zur Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas auf den Bereich, in dem die Sensorgramme nahezu einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgen. Die Darstellung der Daten in Form von $\frac{d\Gamma(t)}{dt}$ über $\Gamma(t)$ erlaubt die optische Beurteilung, ob der Signalverlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die Ergebnisse zu den 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Der eingeschränkte Datenbereich, in dem die Daten in dieser Darstellung bei allen Replika weitestgehend einer Geraden mit negativer Steigung folgen, wurde ausgewählt und ist in den Abbildungen hellgrau hinterlegt.

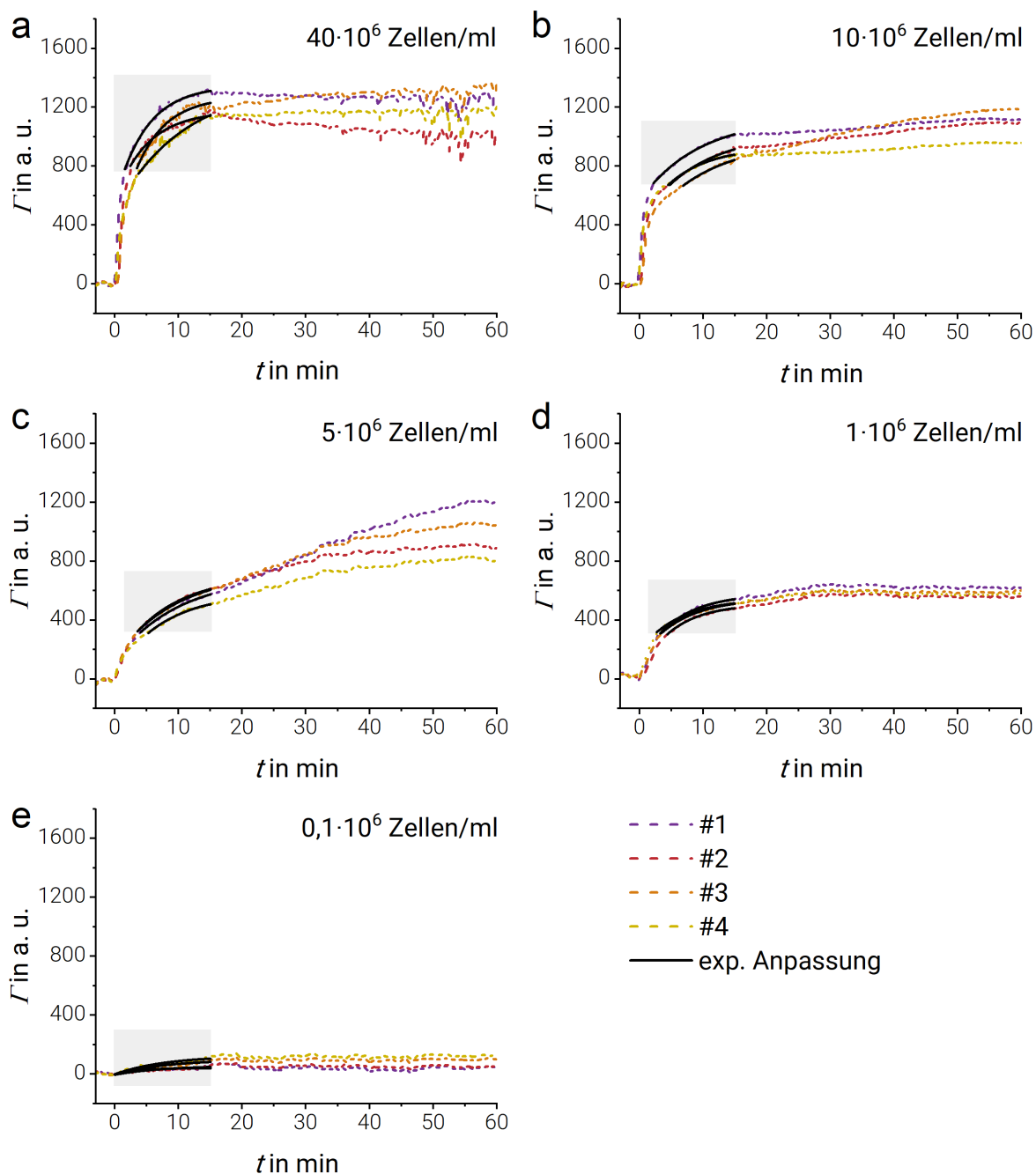


Abbildung 6.9: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Vitronektin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, zuvor festgelegten Bereich herangezogen. Die Daten im reduzierten Auswertebereich sind hellgrau hinterlegt. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

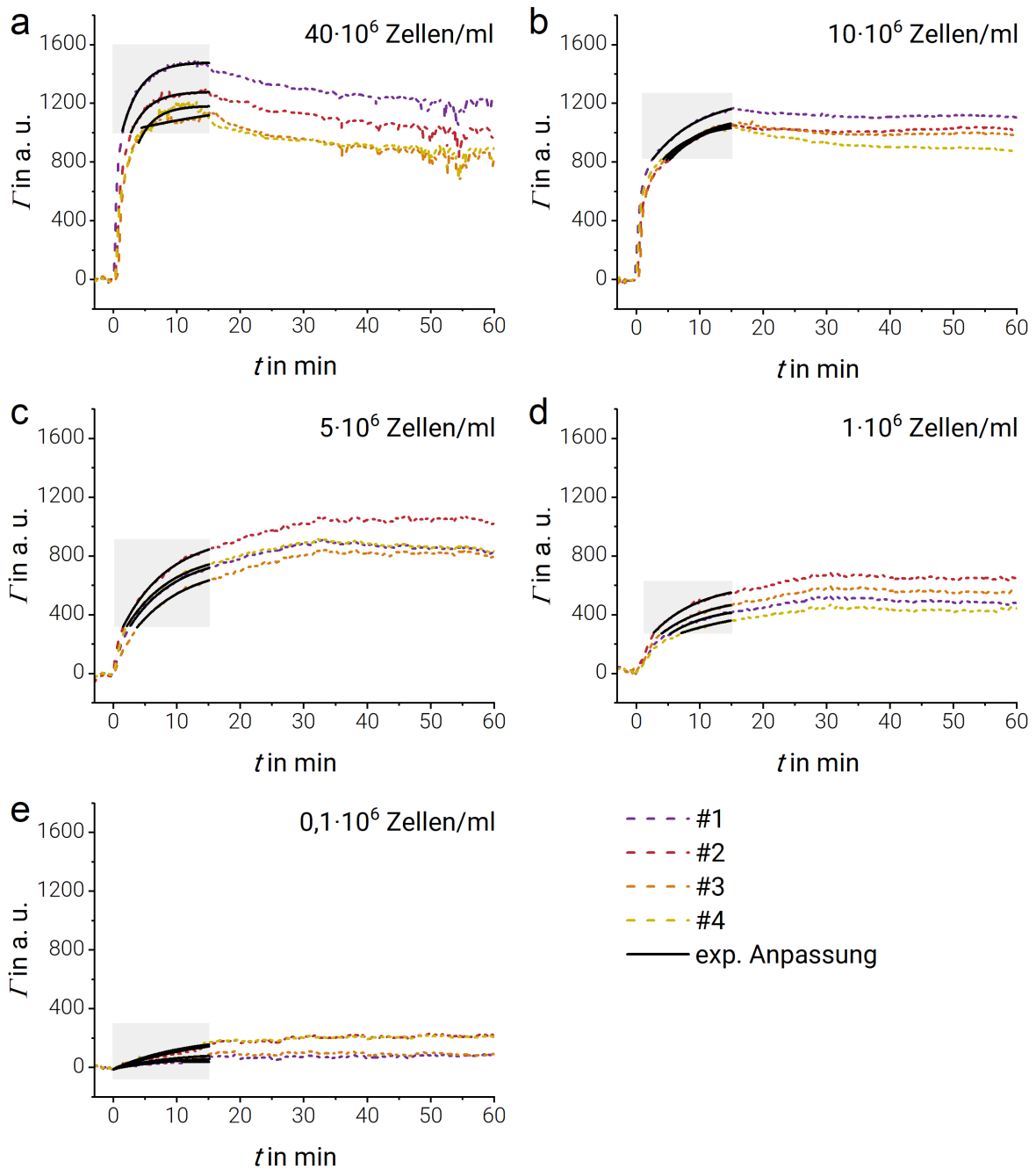


Abbildung 6.10: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Albumin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, zuvor festgelegten Bereich herangezogen. Die Daten im reduzierten Auswertebereich sind hellgrau hinterlegt. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

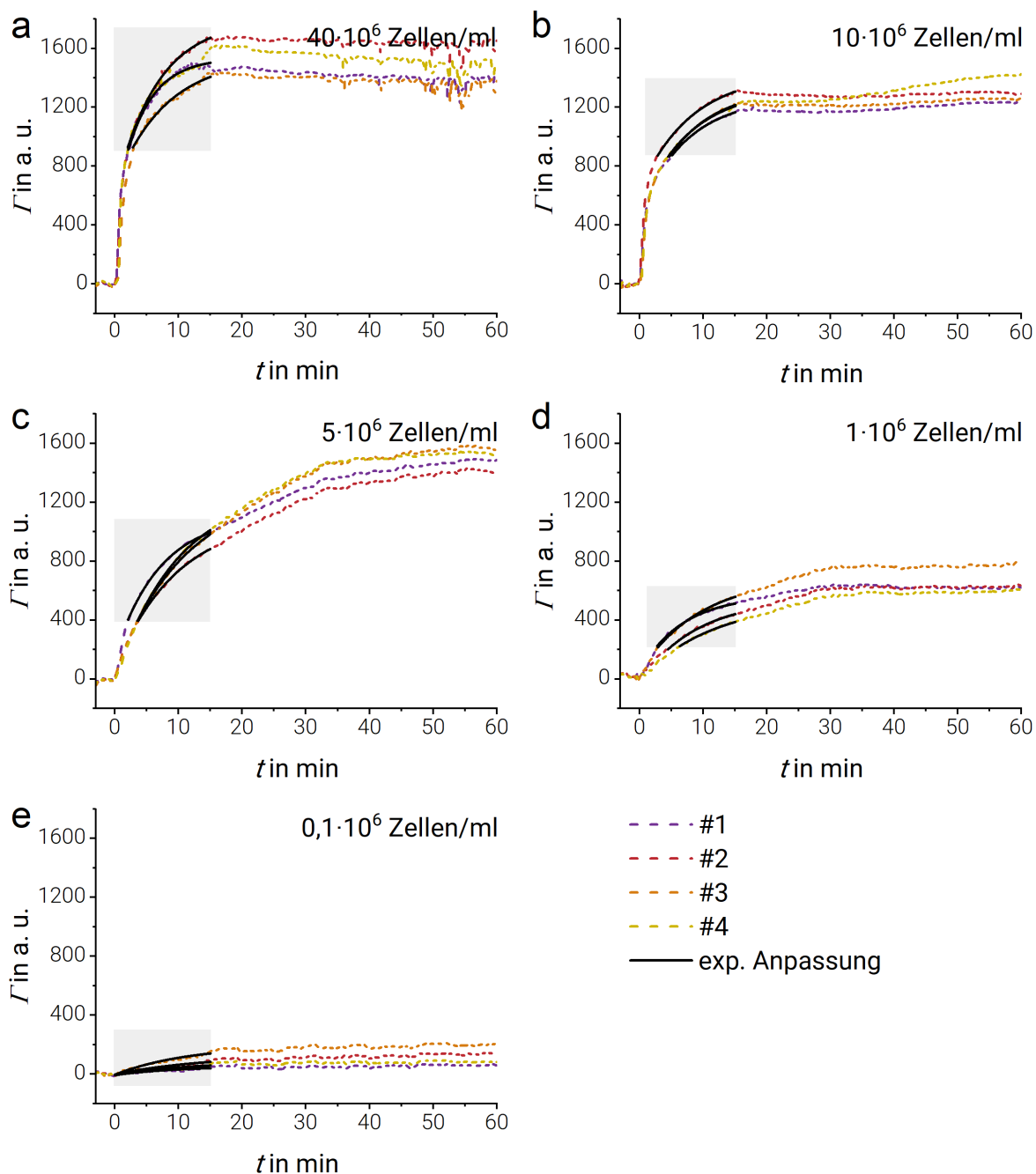


Abbildung 6.11: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Fibronektin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, zuvor festgelegten Bereich herangezogen. Die Daten im reduzierten Auswertebereich sind hellgrau hinterlegt. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

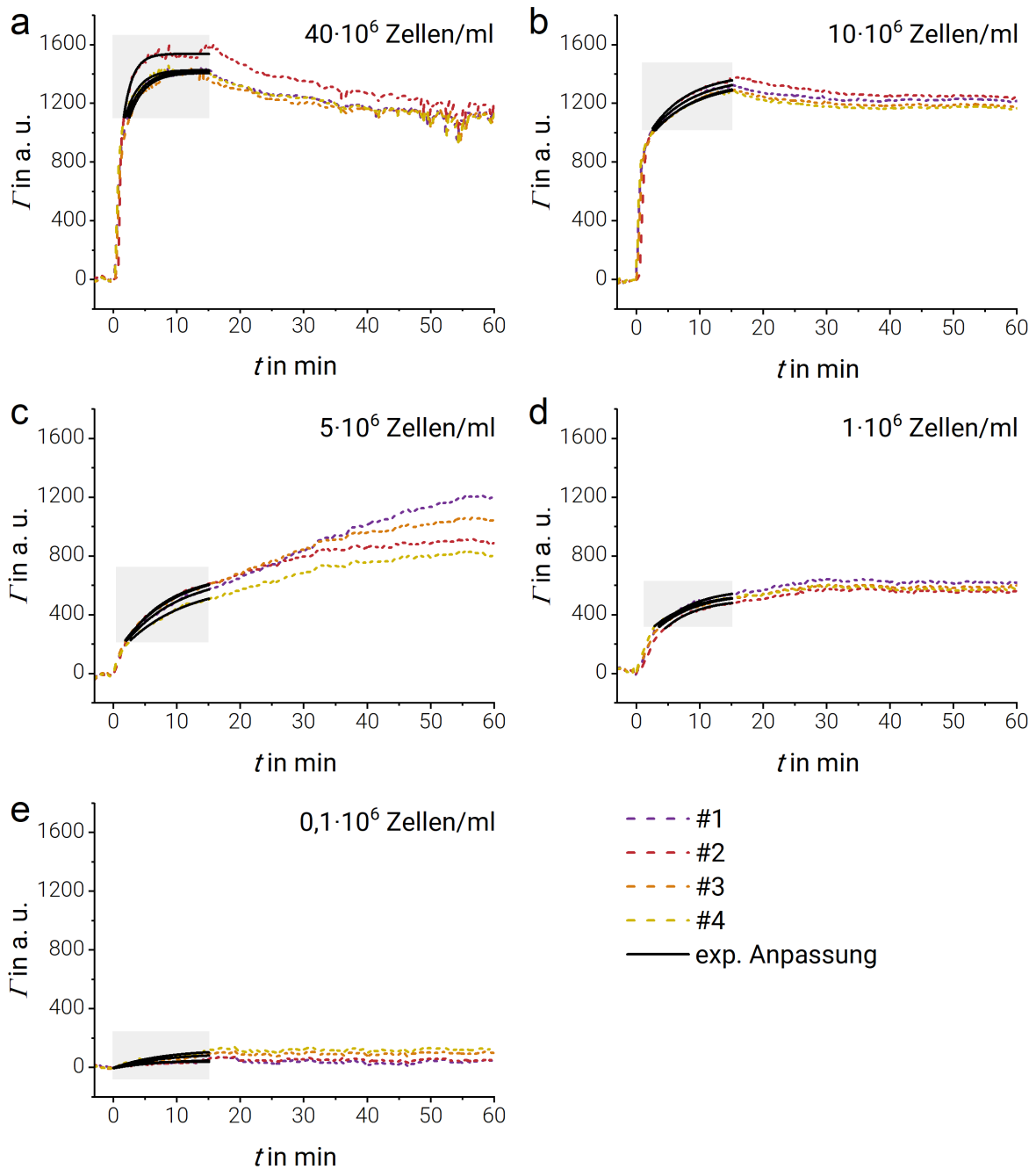


Abbildung 6.12: Bestimmung der scheinbaren Ratenkonstante k_s der Zelladsorption auf mit Laminin beschichtetem Glas mittels exponentieller Anpassung eines Modells Kinetik pseudoerster Ordnung mit reduziertem Auswertebereich. Sensorgramme der 4 Replika (gestrichelte Linien in lila, rot, orange und gelb) der Zelladsorption bei einer Konzentration von a) $40 \cdot 10^6$ Zellen/ml, b) $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml, c) $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d) $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und e) $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sind abgebildet. Für die Auswertung wurden die Daten im, durch Betrachtung des Differenzials von Γ über $\Gamma(t)$, zuvor festgelegten Bereich herangezogen. Die Daten im reduzierten Auswertebereich sind hellgrau hinterlegt. Das Ergebnis der exponentiellen Anpassung ist als schwarze Linie über den zugehörigen Daten dargestellt.

6.2 ABKÜRZUNGEN

Tabelle 6.1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AFM	Rasterkraft Mikroskopie (atomic force microscopy)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (charge-coupled device)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (fluorescein isothiocyanate)
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
LED	Leuchtdiode (light-emitting diode)
LRSPR	long range surface plasmon resonance
MEF	Maus-Endothel-Fibroblasten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PDMS	Polydimethylsiloxan
RiFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (reflectometric interference spectroscopy)
RWG	Gitter-Wellenleiter-Strukturen (resonant waveguide grating)
SCORE	Einwellenlängenreflektometrie (single colour reflectometry)
SNR	Signal-Zu-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance)
TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (total internal reflection fluorescence)
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage (quartz crystal microbalance)

6.3 PUBLIKATIONEN

6.3.1 Publikationen

Hutterer J, Proll G, Fechner P, Gauglitz G. "Parallelized label-free monitoring of cell adhesion on extracellular matrix proteins measured by single colour reflectometry." *Anal Bioanal Chem.* 2022 Jan;414(1):575-585

Daum R., Mrcic I., Hutterer J., Junginger A., Hinderer S., Meixner A. J., Gauglitz G., Schenke-Layland K. "Fibronectin adsorption on oxygen plasma-treated polyurethane surfaces modulates endothelial cell response." *Journal of Materials Chemistry B* 9.6 (2021), 1647-1660.

Drakopoulos, A.; Tzitzoglaki, C.; McGuire, K.; Hoffmann, A.; Konstantinidi, A.; Kolokouris, D.; Ma, C.; Freudenberg, K.; Hutterer, J.; Gauglitz, G.; Wang, J.; Schmidtke, M.; Busath, D. D.; Kolokouris, A., Unraveling the Binding, Proton Blockage, and Inhibition of Influenza M2 WT and S31N by Rimantadine Variants." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2018, 9 (3), 198-203.

Otto A. M., Biechl P., Fernandes H., Gkiouli M., Hintermair J., Hutterer J. "The activities of cell surface NADH-oxidases, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase: Signatures for cancer cells in precarious nutrient conditions." *European Journal of Cancer* 61 (2016): S99.

Hutterer, J.; Gauglitz, G., An optical sensor for studying hemocompatibility of biomaterials in a flow system. *13. Dresdner Sensor-Symposium 2017 (AMA)*, 2017, 162-166.

Gauglitz, G.; Tiemerding, T.; Sill, A.; Hecht, L.; Dietzel, A.; Schenk, F.; Weber, P.; Hutterer, J., Smartphone biosensor for Salmonella and Amitriptyline. *SPIE Proceedings Vol. 11028, Optical Sensors 2019*, 2019.

Hutterer, J.; Janoschek, P.; Gauglitz, G., Adsorption kinetics of proteins to biomaterials measured by reflectometric interference spectroscopy, *SPIE Proceedings Vol. 11028, Optical Sensors 2019*, 2019.

Hutterer, J.; Gauglitz, G., Charakterisierung von Zelladsorption auf Biomaterialien mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie. *14. Dresdner Sensor-Symposium 2019 (AMA)*, 2019, 82 – 87.

Schenk, F.; Hutterer, J.; Tondwa, K.; Schanbacher, C.; Gauglitz, G., Entwicklung eines Lateral Flow Assays zum Nachweis von Amitriptylin in Oberflächengewässern. *14. Dresdner Sensor-Symposium 2019 (AMA)*, 2019, 154 – 158.

6.3.2 Vorträge

„Charakterisierung von Zelladsorption auf Biomaterialien mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie“, 14. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland, 2019

„Single colour reflectometry for parallelized label-free characterisation of cell adhesion to proteins“, virtual, EBS Digital Seminar Series (2021)

6.3.3 Poster

2017

Hutterer, J.; Gauglitz, G. „Ein optischer Sensor zur Untersuchung der Hemokompatibilität von Biomaterialien im Flusssystem“, Wissenschaftsforum, Berlin, Deutschland

Hutterer, J.; Gauglitz, G., “An optical sensor for studying hemocompatibility of biomaterials in a flow system”, BBMEC 12, Rom, Italien

Hutterer, J.; Gauglitz, G., “An optical sensor for studying hemocompatibility of biomaterials in a flow system”, 13. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland

2018

Hutterer, J.; Gauglitz, G., “An optical sensor for studying hemocompatibility of biomaterials in a flow system”, EUROPTRODE XIV, Neapel, Italien

Hutterer, J.; Janoschek, P.; Wurster, V.; Gauglitz, G., “An optical sensor for studying hemocompatibility of biomaterials in a flow system”, Biointerfaces International 2018, Zürich, Schweiz

Hutterer, J.; Schanbacher, C.; Wurster, V.; Gauglitz, G., “Development of a direct optical biosensor for glyphosate determination in water”, 7th EuCheMS Chemistry Congress, Liverpool, England

Hutterer, J.; Janoschek, P.; Wurster, V.; Gauglitz, G., “An optical sensor for studying he-

mocompatibility of biomaterials in a flow system”, 7th EuCheMS Chemistry Congress, Liverpool, England

2019

Hutterer, J., Mrcic, I., Gauglitz, G., “Fibronectin adsorption to oxygen plasma treated polyurethane”, IPB Workshop, Konstanz, Deutschland

Hutterer, J., Gauglitz, G., “Adsorption Kinetics of Proteins to Biomaterials measured by Reflectometric Interference Spectroscopy”, SPIE Optics + Optoelectronics, Prag, Tschechien

Hutterer, J., Gauglitz, G., “Adsorption Kinetics of Proteins to Biomaterials measured by Reflectometric Interference Spectroscopy”, ANAKON 2019, Münster, Deutschland

Schenk, F., Hutterer, J., Tondwa, K., Schanbacher, C., Gauglitz, G., „Entwicklung eines Lateral Flow Assays zum Nachweis von Amitriptylin in Oberflächengewässern“, 14. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland

2020

Hutterer, J., Gauglitz, G., “Characterization of cell adsorption processes on biomaterials using a label-free optical sensor”, World Biomaterials Congress, Glasgow, England (via virtual Platform)